



Antibiotika-indusert frigjøring av lipopolysakkarid hos *Escherichia coli*

Forfattere: August Andre Lukkassen, Martin Thormodsrud og Alexander Marks, Ullern videregående skole

Ifølge Verdens helseorganisasjon (WHO) er sepsis en av de største helseutfordringene i vår tid. Antibiotika-indusert frigjøring av lipopolysakkarid (LPS) fra yttermembranen til Gram-negative bakterier er medvirkende til den høye dødeligheten ved sepsis. Mengden LPS som frigjøres kan være avhengig av klassen av antibiotika. Denne studien undersøkte mengden frigjort LPS ved å eksponere *E. coli* for tolv antibiotika fra åtte ulike klasser. *Limulus ameocyte lysate* (LAL) assay ble brukt for å kvantifisere mengden frigjort LPS fra løsninger med minimum-inhibitory concentrations og standard lab-konsentrasjoner av antibiotika. Resultatene viste at kloramfenikol, spektinomycin, tetrasyklin, og zeocin ga høyere verdier frigjort LPS enn ubehandlet løsning, og burde derfor brukes med forsiktighet i behandling av sepsis. Studien viste ingen klar sammenheng mellom generell virkningsmekanisme og frigjøring av LPS. LPS-frigjøring ser i stedet ut til å være knyttet opp til antibiotikaklasse og deres spesifikke virkningsmekanismer.

Introduksjon

Sepsis er en livstruende tilstand som oppstår når en kraftig immunrespons forårsaker skade på kroppens vev og organer (Mayo Clinic, 2021). Den utløsende årsaken er i de fleste tilfeller en avgrenset bakterieinfeksjon, for eksempel lungebetennelse, urinveisinfeksjon eller mage-tarminfeksjon (NHI, 2020). Disse infeksjonene kan utvikle seg til systemiske infeksjoner, og dermed øke risiko for sepsis. Til tross for store fremskritt innen behandling av kritisk syke pasienter, er sepsis fremdeles en vesentlig dødsårsak over hele verden (Vincent, et al., 2009). WHO anslår at sepsis er årsaken til ca. 20 % av alle dødsfall på verdensbasis (World Health Organization, 2020). Antibiotika er det viktigste verktøyet ved behandling av bakterieinfeksjoner, og er nødvendig i behandlingen av sepsis. Likevel har moderne fremskritt innen antibiotikaforskning ikke lyktes i å løse den høye dødsraten (Halbach, et al., 2017). Studier antyder at antibiotika forårsaker en høyere dødelighet under antibiotikabehandling enn det opprinnelig antatt. Dette er forårsaket av at antibiotikabehandling medfører frigjøring av immunologisk aktive komponenter (pyrogener) fra bakteriens cellevegg (Lepper, et al., 2002).

Den mest potente gruppen av pyrogener involvert i patogenesen ved sepsis er endotoksiner (Opal, 2007). Endotoksiner, også kjent som lipopolysakkarider (LPS), finnes i yttermembranen hos Gram-negative bakterier, som *Escherichia coli* (*E. coli*) (Gorbet & Sefton, 2004). Tilstedeværelse av LPS i blodet hos pasienten forårsaker en kraftig immunrespons ved å aktivere Toll-like reseptor 4 (TLR4) i det medfødte immunforsvaret. Toll-like reseptorer (TLRs) spiller en viktig rolle i den innledende immunaktivering (Lu, Yeh, & Ohashi, 2008). De fungerer som medfødte immunsystemsensorer ved å gjenkjenne en rekke mikroorganismer. Aktiveringen av TLRs induserer en inflammatorisk respons for å bekjempe bakterieinfeksjonen.

Dette resulterer i lokal vasodilatasjon, frigjøring av cytotoxiske kjemikalier, og ødeleggelse av det invaderende patogenet (Esteban, Ferrer, Alsina, & Antonio, 2013). Denne responsen er fordelaktig i forsvaret mot bakterielle infeksjoner, men kan under noen forhold, være skadelig mot kroppen selv. LPS-aktivering av TLR4 er et typisk eksempel på en overdrevet immunreaksjon som fører til feber, toksisk sjokksyndrom, sepsis, og død.

Antibiotika deles inn i ulike klasser etter virkemåte og kjemisk struktur. Antibiotikaklasser inkludert i studien er aminoglykosider, β -laktam-antibiotika, polypeptid-antibiotika og tetrasykliner. De resterende antibiotikaene faller utenfor denne vanligste inndelingen. Ampicillin og karbenicillin tilhører klassen β -laktam-antibiotika, og hemmer bakteriell celleveggsyntese. β -laktam-antibiotika er baktericid, da de virker som irreversible hemmere av enzymet transpeptidase som binder glykopeptider og peptidoglykaner i bakteriens cellevegg (Liabø, 2021). Polymyxin B er et baktericid polypeptid-antibiotika som virker ved å destabilisere fosfolipidene og lipopolysakkaridene som utgjør yttermembranen til Gram-negative bakterier (Wanger, et al., 2017). Aminoglykosider som gentamicin, streptomycin og kanamycin er baktericide, og hemmer proteinsyntesen ved å binde seg til 30s ribosom subenheten. I tillegg har de en destabiliserende virkning på yttermembranen hos Gram-negative bakterier (Norsk legemiddelhåndbok, 2016). Spektinomycin er et aminocyklitol-antibiotikum, som deler egenskaper med aminoglykosider, men er bakteriostatisk (Chopra, 2012). Tetrasykliner og kloramfenikol ligner også aminoglykosider, men binder seg til 50s ribosom subenheten, og er i tillegg bakteriostatisk. Rifampicin vil hemme proteinsyntesen ved å forme et stabilt kompleks med RNA-polymerase (Wikipedia Contributors, 2021). Trimetoprim er bakteriostatisk ved å hemme enzymet dihydrofolatreduktase som stopper celledeling, og hindrer videre vekst av bakterien (Patrick, 2022). Zeocin er baktericid, og forårsaker celledød ved å spalte opp DNA i cellen gjennom en rekke reaksjoner (Trastoy, Defais, & Larminat, 2005).

Ulike klasser av antibiotika har vist å variere i deres evne til å frigjøre LPS fra bakteriens cellevegg (Lepper, et al., 2002). Ved behandling av en systemisk Gram-negativ infeksjon, har en studie vist at noen klasser av β -laktam-antibiotika fører til en betydelig økning av frigjort LPS, samtidig som behandling med karbapenemer og aminoglykosider fører til relativt små mengder frigjort LPS (Lepper, et al., 2002). På grunn av disse observasjonene er det viktig å etablere kjente målinger av hvor mye LPS som frigjøres når bakterier utsettes for antibiotika. Dette gjør det enklere å forutse frigjort LPS i klinisk behandling av pasienter. Tidligere studier har i tillegg antatt at antibiotika sin evne til å frigjøre LPS er direkte knyttet til virkningsmekanisme (Jackson & Kropp, 1992). For å undersøke den mulige sammenhengen mellom virkningsmekanismen til antibiotika og LPS-frigjøring ble det i denne studien målt antibiotika-indusert LPS-frigjøring hos *E. coli*.

Vår hypotese er at mengden antibiotika-indusert frigjort LPS hos E. coli avhenger av antibiotikaenes virkningsmekanisme.

Metode

For å undersøke hvordan ulike typer antibiotika påvirker frigjøring av LPS hos Gram-negative bakterier ble det benyttet *Escherichia coli* K-12 BW 25113. *E. coli* er en modellorganisme som ofte benyttes i forskning. Dette er på grunn av bakteriens egenskap til å vokse raskt med lite næring, samt muligheten til å manipulere DNA-et. I tillegg ble hele genomet til K-12 slekten kartlagt i 1997 (Blattner, et al., 1997). Grunnet den høye konsentrasjon av LPS i yttermembranen, samt at *E. coli* også er blant bakteriene som oftest forårsaker sepsis hos mennesker, vil det være relevant å bruke *E. coli* for å undersøke sepsis.

Utvalget av antibiotika er gjort for å inkludere flere klasser og virkningsmekanismer, samt både bakteriostatisk og baktericide antibiotika (se Tabell 1). Antibiotika inkludert i studien er ampicillin (Thermo-Fisher), gentamicin (PanReact AppliChem), kanamycin (PanReact AppliChem), karbenicillin (Thermo-Fisher), kloramfenikol (Sigma-Aldrich), polymyxin B (SigmaAldrich), rifampicin (Sigma-Aldrich), spektinomycin (Merck), streptomycin (PanReact AppliChem), tetrasyklin (PanReact AppliChem), trimetoprim (Serva) og

zeocin (InvivoGen). Samtlige antibiotika benyttes til behandling av bakterielle infeksjoner hos mennesker, og minimum inhibitory concentrations (MIC) ble valgt for å etterligne kliniske forhold. MIC er laveste konsentrasjon av et antibiotikum som hemmer vekst hos bakterien, og benyttes ofte klinisk hos pasienter (Wikipedia Contributors, 2021). Forsøket ble også gjort på kulturer med standard lab konsentrasjoner (SLK) av ampicillin, kanamycin, rifampicin og streptomycin. Standard lab konsentrasjoner er høyere enn MIC, og brukes i forskning for å oppnå maksimal virkning. Dette ble gjort for å sammenligne forskjellen av frigjort LPS fra *E. coli* mellom høye og lave konsentrasjoner av samme type antibiotika. Oversikt over antibiotika er gitt i Tabell 1.

Tabell 1. Oversikt over antibiotika benyttet i studien (A-Å), og dets minimum inhibitory concentration (MIC). Ampicillin, kanamycin, rifampicin og streptomycin har standard lab konsentrasjon (SLK) i tillegg til MIC. Konsentrasjonen til antibiotikumet er målt i µg/ml. Oversikt over om antibiotikumet er baktericid eller bakteriostatisk, og dets virkemekanisme. Produsenten til antibiotikumet er også nevnt.

Antibiotika	Konsentrasjon (µg/ml)	Baktericid/ Bakteriostatisk	Generell virknings- mekanisme	Produsent
Ampicillin (MIC/SLK)	5,00/100,00	Baktericid	Inhiberer celleveggsyntesen	Thermo-Fisher
Gentamicin (MIC)	11,36	Baktericid	Inhiberer proteinsyntesen	PanReact AppliChem
Kanamycin (MIC/SLK)	23,00/50,00	Baktericid	Inhiberer proteinsyntesen	PanReact AppliChem
Karbenicillin (MIC)	32,00	Baktericid	Inhiberer celleveggsyntesen	Thermo-Fisher
Kloramfenikol (MIC)	8,00	Bakteriostatisk	Inhiberer proteinsyntesen	Sigma-Aldrich
Polymyxin B (MIC)	4,50	Baktericid	Svekker yttermembranen	Sigma-Aldrich
Rifampicin (MIC/SLK)	12,00/50,00	Baktericid	Inhiberer proteinsyntesen	Sigma-Aldrich
Spektinomycin (MIC)	16,00	Bakteriostatisk	Inhiberer proteinsyntesen	Merck
Streptomycin (MIC/SLK)	23,00/100,00	Baktericid	Inhiberer proteinsyntesen	PanReact AppliChem
Tetrasyklin (MIC)	4,00	Bakteriostatisk	Inhiberer proteinsyntesen	PanReact AppliChem
Trimetoprim (MIC)	10,00	Bakteriostatisk	Inhiberer DNA-syntesen	Serva
Zeocin (MIC)	2,00	Baktericid	Ødelegger dobbeltrådet DNA	InvivoGen

Tilberedelse av bakterier

I 15 ml sterilt M9 minimal medium (M6895-Sigma) ble det innokulert *E. coli* som kom fra fryst kultur. Bakteriekulturen ble inkubert over natten ved 37 °C til stasjonær fase. Deretter ble bakteriekulturen sentrifugert (3000 × g i 10 min), og supernatant fjernet for å unngå kontaminering av endotoksiner. Bakteriekulturen ble resuspendert i 20 ml M9, og inkubert ved 37 °C til OD600 ~ 1. Deretter ble bakteriekulturen fortynnet med sterilt M9 til en OD600 på 0,1. M9 brukt i forsøket ble sterilisert ved filtrering gjennom et 0,22 µm filter. Dette ble gjort for å unngå kontaminering av ville mikrober, som sopp og bakterier.

Tilberedelse av antibiotika med bakteriekultur

Det ble laget 16 løsninger med 4 ml M9. Løsningene ble tilsatt utvalgt antibiotika i konsentrasjoner som vist i Tabell 1. I tillegg ble det laget bufferkontroll (M9) og ubehandlet kultur, som ikke er tilsatt antibiotikum (ubehandlet løsning). Løsningene med 4 ml M9 ble innokulert med 4 µl fra fortynnet bakteriekultur ved OD ~ 0,1. Bakteriekulturene ble inkubert i 6 timer ved 37 °C, med unntak av ubehandlet kultur. Denne

ble inkubert ved 4 °C for å forhindre fri vekst av bakterier, som ville ført til betydelig større bakgrunns-LPS-frigjøring. 2 ml av løsningene ble filtrert gjennom 0,22 µm sprøytefilter for å fjerne bakteriene, og deretter lagret ved -20 °C for senere analyse.

Limulus amebocyte lysate assay

Limulus amebocyte lysate assay (LAL) er gjeldende standard for å bestemme LPS-konsentrasjoner i løsninger, og er ekstremt sensitivt, med en sensitivitet ned til ca. 0,1 ng/ml (1×10^{-10} g/ml) LPS, som tilsvarer 1 endotoksinenhet per milliliter (EU/ml). LAL-assay ble gjennomført etter produsentens protokoll.

Protokollen i korte trekk (illustrert i vedlegg 1):

Endotoksin standard-løsningene ble fortynnet slik beskrevet på hetteglasset, og 4 ml av følgende standard-løsninger ble klargjort:

Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Blank
1,0 EU/ml	0,5 EU/ml	0,25 EU/ml	0,1 EU/ml	0 EU/ml

Lyofilisert amebocyttylsat ble rekonstituert i 1,7 ml endotoksinfritt vann. Kromogen substans ble rekonstituert i 3,4 ml endotoksinfritt vann. Rekonstituering ble utført ved å rotere hetteglassene forsiktig for å unngå skumdannelse. Hetteglassene ble varmet opp til 37 °C

510 minutter før bruk. Endotoksinfri 96-brønnsplate ble pre-ekvilibrert til 37 °C på varmeblokk. 50 µl av endotoksinstandarder, blank og prøver ble overført til brønnene. 50 µl av rekonstituert amebocyttylsat ble overført til brønnene. Tiden ble målt fra lysat ble tilsatt den første brønnen. Etter at lysatet var tilsatt alle brønnene ble platen banket forsiktig på siden for å blande løsningene. Løsningene ble inkubert ved 37 ± 1 °C i 8 minutter. Etter nøyaktig

8 minutter ble 100 µl kromogen substans tilsatt hver brønn og blandet ved å banke forsiktig på siden av platen. Løsningene ble inkubert ved 37 °C i 6 minutter. Etter nøyaktig 6 minutter ble 50 µl 1 % eddiksyre tilsatt for å stoppe reaksjonen. Løsningene ble blandet slik forklart tidligere. Platen ble umiddelbart lest ved 405 nm i en mikroplateleser (Synergy HTX). Alle standardløsninger og prøver ble gjennomført som triplikater. Gjennomsnittsverdier og standardavvik ble beregnet for hver standardløsning og prøve. Dose-respons-sammenheng ble fastsatt ved regresjon av standardløsningene og brukt til å beregne endotoksin-konsentrasjonene i prøvene.

For å kartlegge et aktuelt fortynningsvindu for videre prøver ble det gjennomført en analyse av polymyxin B og bakgrunn uten antibiotika (se Tabell 1). Polymyxin B ga uventede lave verdier i LAL-assayet. Verdiene til polymyxin B ga nærmere 0 EU/ml. Dette var det motsatte av hva vi forventet grunnet at polymyxin B ødelegger yttermembranen til bakterier, og vil dermed medføre store mengder LPS frigjørelse. De uventede resultatene viste seg å skyldes at polymyxin B binder LPS og hemmer enzymaktiviteten i LAL-assay (Tamura, Johannes, & Nagaoka, 2021). På grunn av uklare resultater for polymyxin B, var det vanskelig å fastslå et presist fortynningsvindu. Det endelige fortynningsvinduet ble dermed fra 10^3 - 10^5 ut fra verdiene kalkulert fra bakgrunnsprøvene.

Resultater

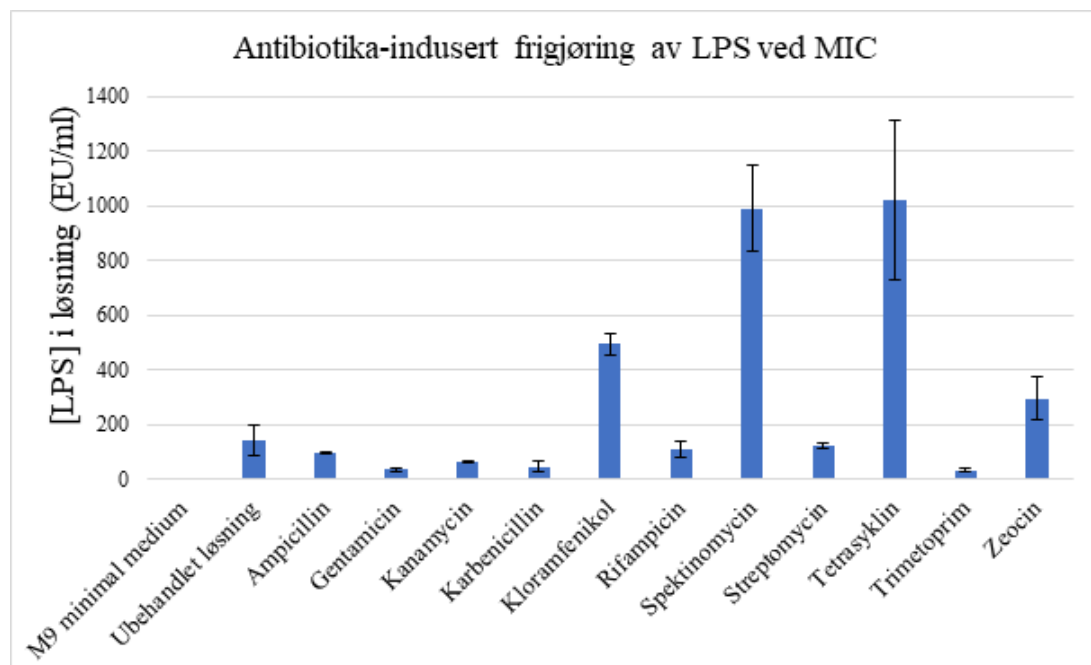
Resultater fra LAL-assay viste at konsentrasjon av LPS i M9 (bufferkontroll) var $0,0 \pm 0,0$ EU/ml (gjennomsnitt \pm standardavvik). Ubehandlet *E. coli* (ubehandlet løsning) frigjorde LPS i konsentrasjon $143,1 \pm 53,3$ EU/ml. Fire av tolv antibiotika forårsaket en høyere konsentrasjon frigjort LPS fra *E. coli* enn den ubehandlede løsningen. Tetrasyklin frigjorde størst mengde LPS med en konsentrasjon på $1020,9 \pm 292,7$

EU/ml, etterfulgt av spektinomycin ($990,8 \pm 155,4$ EU/ml), kloramfenikol ($494,4 \pm 38,8$ EU/ml), og zeocin ($294,3 \pm 79,3$ EU/ml). De resterende antibiotikaene ga lavere LPS-verdier enn ubehandlet løsning. Dette inkluderte følgende antibiotika med konsentrasjon av frigjort LPS i synkende rekkefølge: streptomycin; $121,9 \pm 9,8$ EU/ml, rifampicin; $108,9 \pm 29,7$ EU/ml, ampicillin; $96,0 \pm 3,7$ EU/ml, kanamycin; $64,6 \pm 5,4$ EU/ml, karbenicillin; $47,3 \pm 17,5$ EU/ml, gentamicin; $37,2 \pm 5,7$ EU/ml, og trimetoprim; $32,9 \pm 7,9$ EU/ml. Polymyxin B ga ingen resultat ved LAL-assay, og er derfor ikke inkludert i Tabell 2 og Figur 1.

Tabell 2. Oversikt over antibiotika (A-Å), og dets minimum inhibitory concentration (MIC). Gjennomsnittlig LPS-utslipp fra *E. coli*, samt standardavvik ved bruk av antibiotika ved MIC. Konsentrasjonen til antibiotikumet er målt i $\mu\text{g/ml}$. Gjennomsnitt og standardavvik av frigjort LPS er målt i endotoksinenhet per milliliter (EU/ml).

Antibiotika	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Gjennomsnitt (EU/ml)	Standardavvik (EU/ml)
Ampicillin (MIC)	5,00	96,0	$\pm 3,7$
Gentamicin (MIC)	11,36	37,2	$\pm 5,7$
Kanamycin (MIC)	23,00	64,6	$\pm 5,4$
Karbenicillin (MIC)	32,00	47,3	$\pm 17,5$
Kloramfenikol (MIC)	8,00	494,4	$\pm 38,8$
Rifampicin (MIC)	12,00	108,9	$\pm 29,7$
Spektinomycin (MIC)	16,00	990,8	$\pm 155,4$
Streptomycin (MIC)	23,00	121,9	$\pm 9,8$
Tetrasyklin (MIC)	4,00	1020,9	$\pm 292,7$
Trimetoprim (MIC)	10,00	32,9	$\pm 7,9$
Zeocin (MIC)	2,00	294,3	$\pm 79,3$

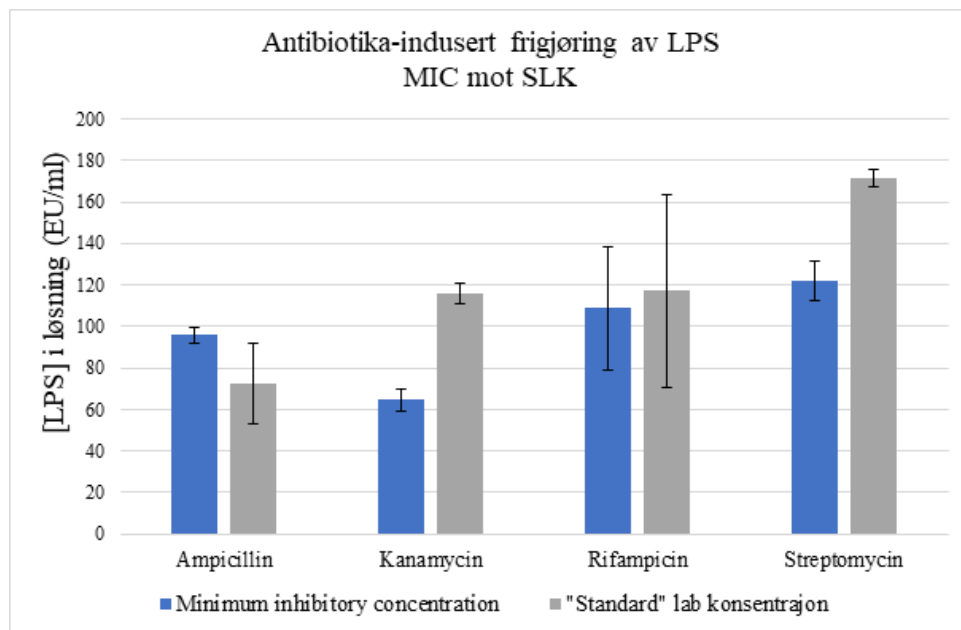
Målinger av frigjort LPS fra *E. coli* ved bruk av standard lab konsentrasjoner (SLK) av antibiotika viste at ampicillin frigjorde $72,5 \pm 19,3$ EU/ml (gjennomsnitt \pm standardavvik), kanamycin; $116,0 \pm 5,1$ EU/ml, rifampicin; $117,1 \pm 46,6$ EU/ml, og streptomycin; $171,3 \pm 4,2$ EU/ml. En T-test ble gjennomført for å bestemme statistisk signifikans mellom LPS-frigjøring induisert av antibiotika i MIC og SLK. Signifikansnivået benyttet i studien er 0,001, som er vanlig i medisinsk forskning. P-verdiene var følgende: ampicillin; 0,17, kanamycin; 0,00030, rifampicin; 0,79, og streptomycin; 0,00058. P-verdiene tilsier at kun løsningene med kanamycin og streptomycin viser en statistisk signifikant forskjell mellom LPS-frigjøring av antibiotikaene i MIC og SLK.



Figur 1. Måling av antibiotika industert frigjøring av LPS fra *Escherchia coli* ved minimum inhibitory concentrations (MIC). M9 minimal medium (bufferkontroll), ubehandlet løsning (kontroll uten antibiotika), ampicillin; 5,00 µg/ml, gentamicin; 11,36 µg/ml, kanamycin; 23,00 µg/ml, karbenicillin; 32,00 µg/ml, kloramfenikol; 8,00 µg/ml, rifampicin; 12,00 µg/ml, spektinomycin; 16,00 µg/ml, streptomycin; 23,00 µg/ml, tetrasyklin; 4,00 µg/ml, trimetoprim; 10,00 µg/ml, zeocin; 2,00 µg/ml. Her er konsentrasjonen MIC på alle antibiotika. Gjennomsnitt og standardavvik av frigjort LPS er målt i endotoksinenhet per milliliter (EU/ml).

Tabell 3. Oversikt over antibiotika (A-Å), og dets minimum inhibitory concentration (MIC) og standard lab konsentrasjon (SLK). Gjennomsnittlig LPS-utslipp fra *E. coli*, samt standardavvik ved bruk av antibiotika ved MIC og SLK. P-verdi beregnet ved bruk av gjennomsnitt og standardavvik. Konsentrasjonen til antibiotikumet er målt i µg/ml. Gjennomsnitt og standardavvik av frigjort LPS er målt i endotoksinenhet per milliliter (EU/ml).

Antibiotika	Konsentrasjon (µg/ml)	Gjennomsnitt (EU/ml)	Standardavvik (EU/ml)	P-verdi
Ampicillin (MIC/SLK)	5,00/100,00	96,0/72,5	±3,7/19,3	0,17
Kanamycin (MIC/SLK)	23,00/50,00	64,6/116,0	±5,4/5,1	0,00030
Rifampicin (MIC/SLK)	12,00/50,00	108,9/117,1	±29,7/46,6	0,79
Streptomycin (MIC/SLK)	23,00/100,00	121,9/171,3	±9,8/4,2	0,00058



Figur 2. Sammenligning av frigjort LPS fra *Escherchia coli* ved bruk av minimum inhibitory concentration (MIC) og standard lab konsentrasjon (SLK) av samme antibiotika. Denne sammenligningen er gjort på ampicillin; 5,00/100,00 µg/ml, kanamycin; 23,00/50,00 µg/ml/, rifampicin; 12,00/50,00 µg/ml, og streptomycin; 23,00/100,00 µg/ml. Her er den første konsentrasjonen MIC og den andre konsentrasjonen SLK (MIC/SLK). Gjennomsnitt og standardavvik av frigjort LPS er målt i endotoksinenhet per milliliter (EU/ml).

Diskusjon

Fire av de elleve undersøkte antibiotikaene ga økt LPS-frigjøring fra *E. coli*. De resterende syv antibiotikaene ga lavere LPS-verdier enn ubehandlet løsning. Antibiotikaene som ga økt utslipp av LPS var spektinomycin, tetrasyklin, kloramfenikol og zeocin.

Studien viste ingen klar sammenheng mellom generell virkningsmekanisme (se Tabell 1) og LPS-frigjøring. LPS-frigjøring ser i stedet ut til å være knyttet opp til antibiotikaklasse og deres spesifikke virkningsmekanismer. Av de fire antibiotikaene som ga økt utslipp av LPS, fungerer tre av dem som hemmende på proteinsyntesen, i.e. spektinomycin, tetrasyklin og kloramfenikol. Samtidig ga rifampicin og gentamicin, som også hemmer proteinsyntesen, ingen økning av frigjort LPS. En studie fra 1993 kan mulig forklare den lave LPS-frigjøringen hos gentamicin (Evans & Pollack, 1993). Ved å måle prosentvis LPS-frigjøring og bakteriedød hos *E. coli* ved en rekke ulike konsentrasjoner av antibiotika, så studien at alle antibiotika frigjorde LPS på en "konsentrasjonsavhengig måte". Resultatene antydte også at gentamicin i konsentrasjon 11,36 µg/ml ikke er høy nok til å være baktericid. Disse observasjonene kan samlet forklare hvorfor gentamicin ga lavere LPS-frigjøring enn de andre proteinsyntesehemmende antibiotikaene. Til tross for dette har vi ikke nok grunnlag til å med sikkerhet si at proteinsyntesehemmende antibiotika induserer frigjøring av størst mengde LPS av klasser inkludert i studien. Samtidig ser vi at antibiotika fra samme klasse gir lignende utslipp av LPS. Dette gjelder for både β-laktam-antibiotika og aminoglykosider. For fremtidige forsøk skulle vi gjerne undersøkt om denne sammenhengen også gjelder for flere klasser antibiotika.

Ettersom β -laktam-antibiotika er aggressivt baktericid og i tidligere studier har gitt økning av frigjort LPS, forventet vi økning av LPS hos ampicillin og karbenicillin. Studien ga uventede resultater, da ampicillin og karbenicillin ga utslipp på henholdsvis $96,0 \pm 3,7$ EU/ml og $47,3 \pm 17,5$ EU/ml. Begge målingene ligger derfor under ubehandlet løsning. Ampicillin i konsentrasjon 100 μ g/ml ga heller ikke økt frigjøring av LPS. Disse resultatene støttes av forskningen til professor i medisin J. C. Hurley (Hurley, 1995). Hurley påstår at det ikke finnes bevis for at antibiotika med rask baktericid virkning kan resultere i plutselig lysering av bakterier og frigjøring av celleveggkomponenter. Han fastslår videre at aggressiv baktericid antibiotika derfor ikke forårsaker forverring av sepsis, som kunne vært unngått med bruk av antibiotika med et langsommere handlingsforløp. Disse observasjonene kan tyde på at yttermembranen holdes intakt ved bakteriedød forårsaket av β -laktam-antibiotika, og filtreres bort. Med studiens eksperimentelle oppsett måles ikke bakteriell død, bare frigjort LPS i løsning, og dette er en svakhet ved det eksperimentelle oppsettet. Fremtidige forsøk burde inkludere elektronmikroskopi av behandlede løsninger for å undersøke nærmere hvordan antibiotika virker på *E. coli*. Ved å plate behandlede bakterier på LB-plater vil det være mulig å måle i hvilken grad av bakteriene dør ("colony forming units" (CFU) per ml).

En annen svakhet med studien er at utslipp av LPS *in vitro* ikke nødvendigvis er representativt for LPS utslipp *in vivo*. Menneskekroppen har flere mekanismer som angriper og destabiliserer den bakteriemembranen. Døde bakterier vil derfor sannsynligvis gå i oppløsning fortere hos pasienten enn *in vitro*, som kan øke sannsynligheten for antibiotika-indusert sepsis. Fremtidige forsøk i dyremodeller vil kunne fastsette effekten av antibiotikaene under fysiologiske forhold.

Ved sammenligning av frigjort LPS fra *E. coli* ved bruk av MIC og SLK av samme antibiotika var det ingen klare resultater. Ut ifra p-verdiene ble det bevist en statistisk signifikant forskjell mellom LPS-frigjøring i MIC og SLK konsentrasjoner hos kanamycin og streptomycin. Resultatene fra både kanamycin og streptomycin antydte at standard lab konsentrasjon (SLK) av antibiotika frigjorde en større mengde LPS fra *E. coli* enn det minimum inhibitory concentration (MIC) gjorde. Ampicilin og rifampicin ga uklare resultater, og man kan derfor ikke trekke noen konklusjon fra disse antibiotikaene. Fordi 50% av prøvene var uklare, kan vi ikke trekke en generell konklusjon som sier at det er en sammenheng mellom konsentrasjonen av antibiotika og frigjort LPS. Derimot kan vi si at det er sannsynlig at kanamycin og streptomycin fører til større mengde frigjort LPS ved en høyere konsentrasjon av antibiotikaene.

Konklusjon

Kloramfenikol, spektinomycin, tetrasyklin, og zeocin fører trolig til økt utslipp av endotoksiner fra *E. coli in vitro*, og bør derfor brukes med forsiktighet i behandling av bakterieinfeksjoner, særlig i tilfeller med økt risiko for sepsis. Vi kan ikke si sikkert om effekten er like omfattende for andre antibiotika under fysiologiske forhold, og flere eksperimenter (som beskrevet over) er nødvendig for å undersøke dette videre.

Anerkjennelser

Prosjektet ble økonomisk støttet av Thermo Fisher, og utført i samarbeid med UiO. Vi vil gi en spesiell takk til Daniel Hatlem og Dirk Linke som ga god veiledning gjennom hele prosjektet.

Referanser

- Blattner, F. R., Plunkett 3rd, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., . . . Shao, Y. (1997, 5. september). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, 277(5331), ss. 1453-1462. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Chopra, I. (2012, 21. mars). Modes of action. *Antibiotic and Chemotherapy*, ss. 10-23. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4064-1.00002-6>
- Esteban, E., Ferrer, R., Alsina, L., & Antonio, A. (2013, 22. oktober). Immunomodulation in Sepsis: The Role of Endotoxin Removal by Polymyxin B-Immobilized Cartridge. *Mediators of Inflammation*,

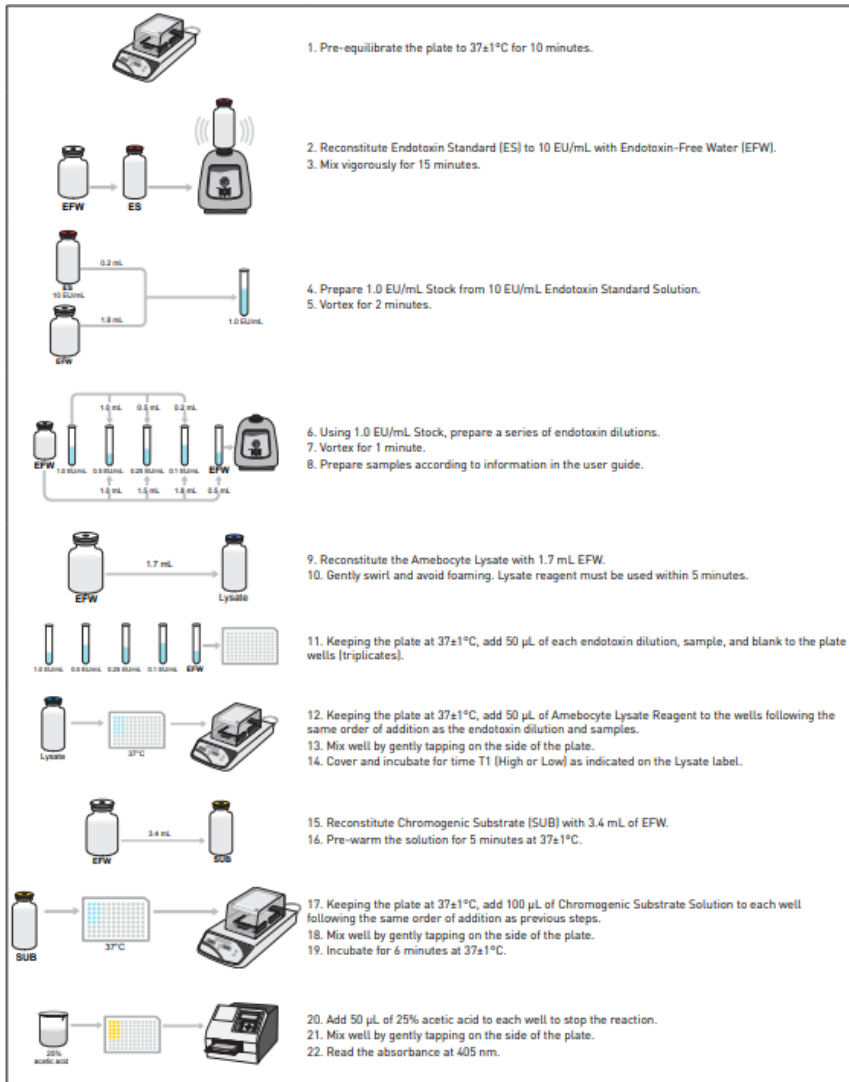
- 2013, ss. 1-12. Doi: <https://doi.org/10.1155/2013/507539>
- Evans, M. E., & Pollack, M. (1993, 1. juni). Effect of Antibiotic Class and Concentration on the Release of. *The Journal of infectious diseases*, 167(7), ss. 1336-1347. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/167.6.1336>
- Gorbet, M. B., & Sefton, M. V. (2004). Review: Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, ss. 291-241. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50025-3>
- Halbach, J. L., Wang, A. W., Hawisher, D., Cauvi, D. M., Lizardo, R. E., Rosas, J., . . . De Maio, A. (2017, 17. november). Why Antibiotic Treatment Is Not Enough for Sepsis Resolution: an Evaluation in an Experimental Animal Model. *Infection and Immunity*, 85(12). Doi: <https://doi.org/10.1128/IAI.00664-17>
- Hurley, J. C. (1995). Antibiotic-Induced Release of Endotoxin A therapeutic Paradox. *Drug Safety*, 12(3), ss. 183-195. Doi: <https://doi.org/10.2165/00002018-199512030-00004>
- Jackson, J. J., & Kropp, H. (1992, 1. juni). β -Lactam Antibiotic-Induced Release of Free Endotoxin: In Vitro Comparison of Penicillin-Binding Protein (PBP) 2-Specific Imipenem and PBP 3-Specific Ceftazidime. *The Journal of infectious diseases*, ss. 1033-1041. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/165.6.1033>
- Lepper, P., Held, T., Schneider, E., Bölke, E., Gerlach, H., & Trautmann, M. (2002). Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Medicine*, 28, ss. 824-833. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00134-002-1330-6>
- Liabø, V. (2021, 19. desember). Betalaktam-antibiotika i *Store Medisinske Leksikon*. Hentet fra *Store Medisinske Leksikon*: <https://sml.snl.no/betalaktam-antibiotika>
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008, 2. mai). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), ss. 145-151. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Mayo Clinic. (2021, 19. januar). Sepsis. Hentet fra Mayo Clinic: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/sepsis/symptoms-causes/syc-20351214>
- NHI. (2021, 12. august). NHI. Hentet fra Sepsis (blodforgiftning): <https://nhi.no/sykdommer/infeksjoner/bakteriesykdommer/blodforgiftning-sepsis/>
- Norsk legemiddelhandbok. (2016, 16. november). *Aminoglykosider*. Hentet fra Norsk legemiddelhandbok: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.9/Aminoglykosider>
- Opal, S. M. (2007). The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. *International journal of medical microbiology*, 297(5), ss. 365-377. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.006>
- Patrick, A. (2022, 26. januar). Trimethoprim i *Store Medisinske Leksikon*. Hentet fra *Store Medisinske Leksikon*: <https://sml.snl.no/trimetoprim>
- Tamura, H., Johannes, R., & Nagaoka, I. (2021, 11.mai). Outstanding Contributions of LAL Technology to Pharmaceutical and Medical Science: Review of Methods, Progress, Challenges, and Future Perspectives in Early Detection and Management of Bacterial Infections and Invasive Fungal Diseases. *Biomedicine*, 9(5), s. 536. Doi : <https://doi.org/10.3390/biomedicine9050536>
- Trastoy, M. O., Defais, M., & Larminat, F. (2005, 2. mars). Resistance to the antibiotic Zeocin by stable expression of the Sh ble gene does not fully suppress Zeocin-induced DNA cleavage in human cells. *Mutagenesis*, ss. 111-114. Doi: <https://doi.org/10.1093/mutage/gei016>
- Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., . . . Investigators, E. I. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302(21), ss. 2323-2329. Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R. S., Wahed, A., Actor, J. K., & Dasgupta, A. (2017). Antibiotics, Antimicrobial Resistance, Antibiotic Susceptibility Testing, and Therapeutic Drug Monitoring for Selected Drugs. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*, ss. 119-153. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805351-5.00007-7>
- Wikipedia Contributors. (2021, 11. oktober). Minimum inhibitory concentration. *Wikipedia*. Hentet fra Wikipedia: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Minimum_inhibitory_concentration&oldid=1049294284

Wikipedia Contributors. (2021, 5. november). Rifampicin. *Wikipedia*. Hentet fra Wikipedia: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Special:CiteThisPage&page=Rifampicin&id=1053722364&wpFormIdentifier=titleform>

World Health Organization. (2020). Global report on the epidemiology and burden of sepsis: current evidence, identifying gaps and future direction. *World Health Organization*, ss. 1-55. Hentet fra World Health Organization: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/334216/9789240010789-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Vedlegg

Workflow



Pierce® Chromogenic Endotoxin Quant Kit User Guide

5

Vedlegg 1: LAL protokoll