

Premio  
G.F. Frigeni  
1994

G. Vezzani, A. Piazzolla, A. Guerrini, M. Mordacci,  
L. Cantadori, G. Solari, A. Nicolopoulou.

Azienda USL PR - Ospedale di Fidenza - Servizio anest. e rian. - Servizio terapia iperbarica

ARCHIVIO RUOCCO

### HBO E ANTIMICROBICI

Negli stati settici dovuti ad infezioni batteriche, l'ossigeno iperbarico (HBO), esplica la sua azione sia sul batterio causa dell'infezione, sia sull'antimicrobico impiegato, con tutte le riserve e conferme che tale interazione ancora esige, sia sulla cellula eucariotica che in definitiva è il bersaglio dell'infezione. Notoriamente la letteratura è ricca di lavori scientifici riguardanti le azioni dell'ossigeno normo ed iperbarico sui batteri, pertanto in questa relazione non verrà preso in considerazione tale problema. Vorrei piuttosto porre in evidenza la interrelazione fra HBO e antimicrobici e quindi esporre l'azione di HBO sulla cellula eucariotica infetta. A parere dello scrivente le controversie che nascono circa l'esistenza di un sinergismo fra HBO e antimicrobici, nascono dalla reale impossibilità di confrontare dati ottenuti da modelli biologici diversi spesso ottenuti da animali di specie diverse. Riteniamo pertanto utile, prima di illustrare i nostri dati, prendere in esame alcuni modelli biologici.

### MODELLO ENDOTOSSINICO

Negli ultimi 25 anni un gran numero di studi ha confermato come sia possibile riprodurre uno stato "tossiemico" somministrando per via venosa la sostanza LPS, originantesi dalla parete dei batteri Gram-.

Tuttavia questo modello biologico, facilmente riproducibile, non è idoneo ad essere impiegato per lo studio della sinergia fra HBO e antimicrobici, non inducendo un vero stato settico per la mancanza dei corpi batterici. Inoltre vi è discrepanza fra dati ottenuti in "vivo" da pazienti settici in cui LPS è dosabile nel "range" dei microgrammi e dati sperimentali, per cui per produrre uno stato di shock endotossico sono necessarie quantità di LPS comprese nel range dei milligrammi. Per questi motivi non abbiamo giudicato idoneo il modello descritto ai fini della nostra ricerca.

### MODELLI BIOLOGICI SEPSI

#### *Infusione introvenosa di microorganismi viventi*

Questo modello biologico è stato ampiamente usato al fine di produrre lo stato settico, tuttavia l'obiezione che viene fatta è che l'animale soccombe rapidamente e quindi è difficile valutare completamente i vari meccanismi di difesa che l'ospite pone in essere per difendersi dall'aggressione batterica, pertanto neppure questo modello è stato giudicato idoneo ai nostri fini, mentre può essere idoneo allo studio dell'clearances ematiche batteriche, della risposta leucocitaria.

#### *Sepsi dovuta ad inoculazione intramuscolare di microorganismi.*

È un modello di facile realizzazione e quindi molto diffuso. Si realizza iniettando un numero noto di germi in genere come Unità Formanti Colonie (UFC), nel muscolo della coscia dell'animale assieme ad un vasocostrittore. In questo modo sono realizzati modelli di gangrena gassosa nei cani, Demello, oppure più recentemente nei topi, torneremo più avanti su quest'ultima sperimentazione.

#### *Sepsi dovuta a processi settici di origine endoperitoneale*

Si può ricorrere sostanzialmente a due metodiche:

- 1) induzione di un processo peritonico con impianto endoperitoneale di un numero noto di batteri, inglobati in vari mezzi, solfato di bario, pellet fecali con feci sterilizzate dello stesso animale, sospensione di muco.
- 2) induzione di un processo peritonico mediante legatura del cieco e puntura. Un vasto lavoro di Wichterman et al. ha dimostrato come la legatura del cieco in ratti, la successiva devascularizzazione seguita da doppia puntura con ago di 18 gauge, provoca la morte del 94% dei soggetti operati al quinto giorno di osservazione, per la comparsa di una peritonite puru-

lenta con sepsi generalizzata.

Noi abbiamo dato la preferenza a quest'ultimo modello, ritenendolo quello che più si avvicina alle condizioni di una sepsi umana a partenza dal cavo peritoneale. Infatti, a nostro parere, il modello illustrato al numero 1 può essere utile nello studio microbiologico dell'evoluzione di una sepsi, ma non si osserva mai, almeno in patologia umana, un'infezione peritoneale che sia durevolmente monomicrobica, si dovrà piuttosto ricercare mediante ripetute colture batteriche quello che i microbiologi chiamano il "colpevole di turno". Questo concetto è naturalmente estendibile a situazioni patologiche diverse dalla peritonite polimicrobica. In un nostro studio clinico, Vezzani et al., abbiamo potuto documentare nella mionecrosi clostridica, una prevalenza progressiva e costante di germi Gram - aerobi e, in minor misura, di germi Gram + aerobi, dopo una fugace e iniziale comparsa di Gram+ anaerobi.

ARCHIVIO RUCCO

#### DISEGNO SPERIMENTALE

Previa induzione di anestesia generale mediante somministrazione di Ketamina cloridrato per via intramuscolare, sono stati sottoposti a laparotomia mediana ratti di ceppo Wistar, di sesso maschile, del peso di 200 - 300 gr, isolato il cieco si è provveduto alla legatura alla base, alla devascularizzazione e quindi alla doppia puntura con ago 18 gauge.

Gli animali sono stati divisi in quattro gruppi:

- 1) Controllo. Animali operati e non trattati nè con HBO nè con antimicrobici
- 2) Animali operati e trattati solo con HBO con il seguente protocollo: tre sedute a 2,8 ATA per 80' nelle prime 24 ore, due sedute con la stessa esposizione nel secondo giorno, una seduta al giorno nei restanti tre giorni.
- 3) Animali trattati solo con l'antimicrobico prescelto
- 4) Animali trattati con l'antimicrobico e con HBO secondo il protocollo descritto al numero 2.

Sono stati impiegati i seguenti antimicrobici:

Antibiotici non-beta-lattamici: Vancomicina, Clindamicina, Netilmicina, Ciprofloxacina.

Antibiotici beta-lattamici: Piperacillina, Cefixozima.

Non antibiotici: Metronidazolo

Attualmente sono in corso di sperimentazione Meropenem e l'associazione Piperacillina Tazobactam.

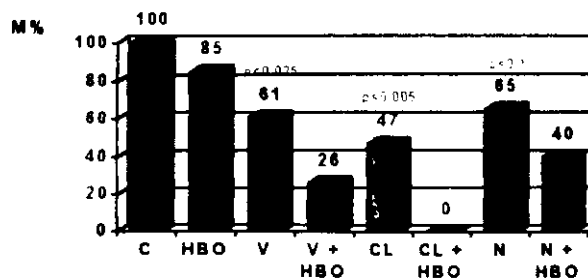


Fig. 1 Mortalità dopo 5 gg per Vancomicina, Clindamicina, Netilmicina

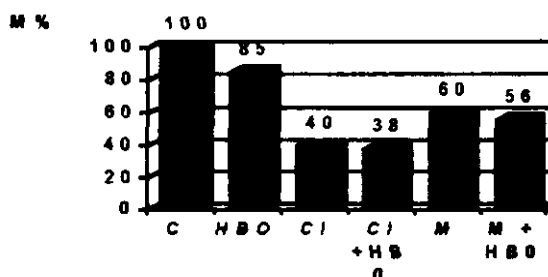


Fig. 2 Mortalità dopo 5 gg per Ciprofloxacina, Metronidazolo

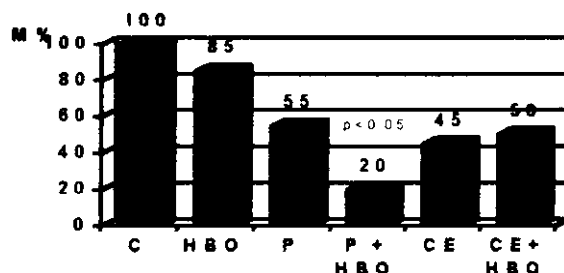


Fig. 3 Mortalità a 5 gg per Piperacillina e Cefixozima

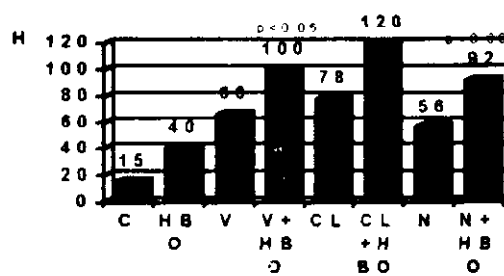


Fig. 4 Tempo medio di sopravvivenza a 5 gg

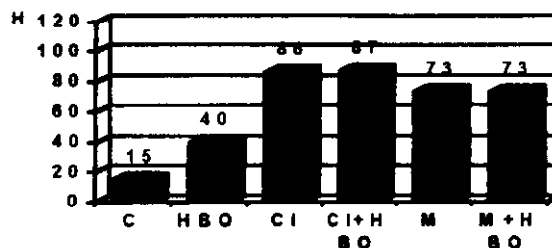


Fig. 5 Tempo medio di sopravvivenza a 5 gg

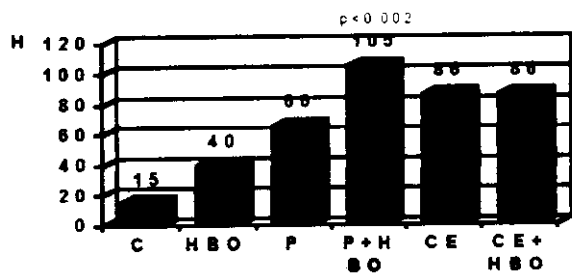


Fig. 6 Tempo medio di sopravvivenza a 599

Sono state valutate le percentuali di mortalità al quinto giorno dopo l'intervento chirurgico fig. 1, fig. 2, fig. 3 e il tempo medio di sopravvivenza (AST), fig. 4, fig. 5, fig. 6, mediante test del  $\chi^2$  e Man Whitney U- test.

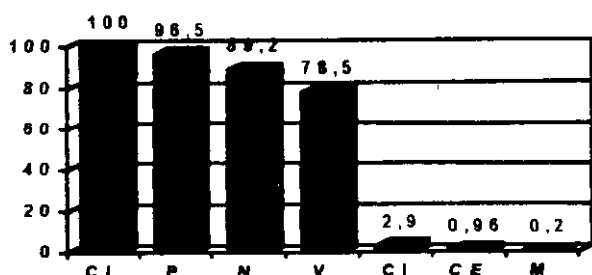


Fig. 7 Scala degli incrementi del tempo medio di sopravvivenza

Nella fig. 7, è stata riportata una scala dei sinergismi fra HBO e antimicrobici, ponendo uguale a 100 l'incremento di AST per la Clindamicina (Cl), si ottiene una scala delle interazioni fra HBO e antimicrobici.

## DISCUSSIONE

I dati in letteratura sono piuttosto discordanti circa l'esistenza di un sinergismo fra antibiotici e HBO, tuttavia è possibile individuare un sinergismo più spiccato per antibiotici non beta-lattamici, nei quali il meccanismo d'azione prevalente è l'inibizione della sintesi proteica, con l'eccezione della Vancomicina (V). In questo caso si può ritenere che lo stress ossidativo prodotto dalle successive esposizioni iperossiche nel batterio, produca un danno della membrana batterica favorendo l'ingresso dell'antibiotico nel batterio.

Attualmente non è possibile sostenere con certezza se esista una sinergia fra ant. beta-lattamici e HBO. I dati in letteratura sono pochi e in genere negano l'esistenza di una sinergia, pertanto al momento non è possibile spiegare il nostro dato riguardante la Piperac-

cillina (P). Si può argomentare in maniera del tutto ipotetica, ma indubbiamente interessante per future sperimentazioni, che i ripetuti stress iperossici possono ridurre la capacità di sintesi proteica e quindi di realizzazione di una resistenza batterica, oppure che possa essere disturbato il turn-over delle proteine bersaglio (PBPs) rendendole più vulnerabili ai beta-lattamici.

Per quanto detto prima sui modelli biologici, personalmente ritengo debbano essere considerati con molta prudenza tutti i risultati ricavati da modelli biologici che manifestamente si allontanano dalla fisiopatologia della malattia in esame, impiegando inoltre animali molto lontani filogeneticamente dall'uomo. Mi riferisco in particolare al modello di gangrena gassosa indotta mediante inoculo di un membro noto di un numero noto di UFC di Clostridium Perfringens in topi e realizzato da Muhvich. In questo lavoro la sopravvivenza dei topi era del tutto indipendente dall'impiego della HBO. A parere dello scrivente qualunque sia il risultato trovato in modelli biologici così "artificiali", ben difficilmente saranno di qualche utilità per la corrispondente patologia umana.

## CELLULA EUCARIOTICA INFETTA E HBO

Sulla base di dati desunti dalla "Conference report" tenutasi a Baltimora nel 1992, dedicata alla "Regulation of gene expression by oxygen tensions", abbiamo ipotizzato che ripetute esposizioni all'ossigeno iperbarico a bassa pressione, potesse in qualche modo influire sulla mortalità del modello biologico da noi adottato.

## DISEGNO SPERIMENTALE

Il modello biologico adottato è già stato descritto nel precedente disegno sperimentale. Gli animali sono stati suddivisi in quattro gruppi:

- 1) C, animali controllo. Operati e non trattati.
- 2) Animali operati e trattati con sola HBO, secondo lo schema già illustrato (HBO).
- 3) Animali esposti ad HBO : 2 ATA per 8 ore, quattro ore di recupero in aria e quindi operati (S.O.A.E.)
- 4) Animali operati e quindi esposti ad HBO con le modalità sopra dette (S.O.B.E.)

## RISULTATI

I dati riportati in fig. 8, riguardano la mortalità e sono validati secondo il test del  $\chi$ . Si nota una riduzione della mortalità al 75% nel gruppo S.O.A.E., e ancor più significativa nel gruppo S.O.B.E., 28,5%.

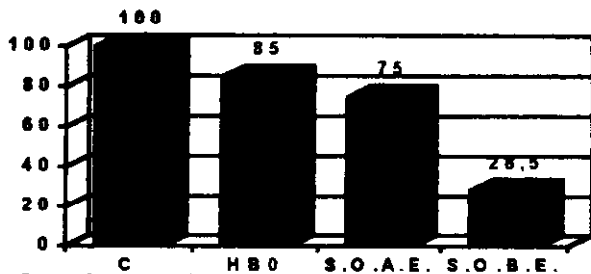


Fig. 8 Riduzione della mortalità con trattamento HBO a bassa pressione e lunga durata

## DISCUSSIONE

Vari lavori ipotizzano che la preesposizione ad un evento che può essere apportatore di shock, permette all'animale da esperimento di affrontare con maggior probabilità di sopravvivenza lo stato di shock indotto successivamente (Niu et al.).

Esposizioni prolungate all'iperossia permettono una sopravvivenza alla successiva esposizione iperossica tossica nei ratti, rispetto ai controlli non trattati (Conference report). E' pertanto logico supporre che ogni stato di shock, generatore di specie radicaliche dell'ossigeno, possa essere affrontato con maggiori possibilità di sopravvivenza da quegli animali preventivamente sottoposti a trattamenti che, presumibilmente, incrementano l'attività antiossidante di enzimi "scavengers". E' pertanto necessario indagare sull'azione dell'ossigeno nella regolazione genica della cellula eucariotica nel corso del processo settico.

E' attualmente poco noto il meccanismo di trasduzione del segnale di stress ossidativo nelle cellule eucariotiche. Si è posta comunque l'attenzione su interleuchina 1, gamma-interferon e TNF, quali possibili trasduttori. E' tuttavia accertato, almeno in vitro, la capacità dell'ossigeno di indurre la sintesi di fattori trascrizionali di natura proteica in grado di attivare i siti "promotori" e "intensificatori" della sintesi proteica, situati a monte dell'atomo di carbonio 5' del filamento del DNA del gene. Nel caso della nostra sperimentazione è logico supporre che il trattamento

iperossico sia prima dell'intervento chirurgico che dopo, per quanto con minor efficacia in quest'ultimo caso, possa indurre la sintesi di enzimi antiossidanti in grado di favorire la sopravvivenza al successivo shock settico. Tuttavia i dosaggi di enzimi antiossidanti, Superossido dismutasi, Catalasi e Perossidasi, eseguiti sul plasma di ratti trattati in iperossia nel modo descritto al n. 3 e 4, non hanno permesso di osservare alcun incremento dell'attività di questi enzimi. Attualmente stiamo valutando l'attività di questi enzimi su polmone, fegato e muscolo striato. I dati che si possono ricavare dalla letteratura permettono, a parere dello scrivente, solo di ipotizzare una "teoria dell'induzione enzimatica" da parte dell'ossigeno normo o iperbarico, almeno nella cellula eucariotica. In effetti è stato dimostrato da Messier su cellule eucariotiche in vitro l'esistenza di una induzione enzimatica, ma per tempi o per pressioni di esposizione assolutamente lontani da quelli clinici. È interessante notare come questa sperimentazione metta in evidenza risposte specie - specifiche allo stress iperossico.

### *Iperossia e funzioni endoteliali*

Una delle conseguenze più note della esposizione iperossica è indubbiamente la vasocostrizione. E' pertanto ovvio che sussistano rapporti tra le funzioni endoteliali e l'iperossia, in particolare tra endotelina-1 e HBO (Rocco). Noi abbiamo indagato i rapporti fra ossido nitrico (NO) prodotto, fra l'altro, dalle cellule endoteliali, e HBO tenendo conto dei lavori di Rubhanyi e Gryglewski in cui si dimostra che l'iperossia incrementa la distruzione di NO.

## DISEGNO SPERIMENTALE

Otto volontari sani, informati e consenzienti, sono stati sottoposti ad un solo trattamento iperbarico a 2,8 ATA per 60' con  $FiO_2 = 1$ . Sono stati effettuati prelievi di sangue prima del trattamento T0, a 30' T1, e 60' T2 dall'arrivo in quota e dopo 30' dalla fine del trattamento T3.

## MATERIALI E METODI

E' tuttora irrisolto il problema del dosaggio di NO almeno nella sperimentazione umana, non essendo proponibile il metodo della chemiluminescenza, abbiamo deciso di dosare i metaboliti

stabili di NO vale a dire nitrati e nitriti. Tuttavia anche per questi dosaggi i problemi sono notevoli proponendosi varie metodiche (Cortas & Wakid) con risultati fra loro difficilmente confrontabili. Abbiamo deciso di eseguire il dosaggio dei nitrati e nitriti mediante High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

#### RISULTATI

Attualmente sono stati analizzati quattro serie di campioni su otto. In tre sono stati trovati incrementi significativi di nitrati in T1 e T2 rispetto a TO mentre a T3 i livelli tornano verso la normalità. In una quarta serie di campioni analizzati non sono state trovate variazioni dei livelli plasmatici, probabilmente per errori tecnici nella determinazione che si presenta comunque estremamente indaginosa. Come dato preliminare si può affermare che esiste un trend all'incremento dei livelli ematici di nitrati dopo esposizione iperossica.

#### DISCUSSIONE

Sulla base di lavori precedentemente citati riteniamo che un incremento dei livelli plasmatici di nitrati e nitriti sia da mettere in relazione ad un incremento della distruzione di NO, prodotto, fra l'altro, dall'endotelio vascolare e ritenuto attualmente il più potente vasodilatatore endogeno. Se

il trend visto attualmente diventerà un dato statisticamente significativo si potranno fare almeno due considerazioni:

- 1) Lo stato di vasocostrizione iperossica può essere ricondotto ad un incremento della distruzione di NO, oltre che ad un incremento di sintesi dei Endotelina-1.
- 2) È noto come nell'evoluzione dello stato di shock settico possa manifestarsi una grave vasoplegia (crollo delle resistenze vascolari periferiche) resistente ai farmaci simpaticomimetici. Attualmente si tenta di fronteggiare tale situazione somministrando inibitori della ossido-nitrico sintetasi, quali ad esempio L-NMMA (levo monometil Arginina), che ostacolano la formazione di NO dall'Arginina. Tale metodica è già entrata nel trattamento dello shock settico in patologia umana. È chiaro che si potrà inequivocabilmente dimostrare che HBO incrementa la distruzione di NO, potranno essere più comprensibili i rapporti intercorrenti fra HBO e cellula eucariotica infetta, in particolare per ciò che attiene l'incremento della sopravvivenza in animali in stato di shock settico sottoposti a trattamento con HBO di lunga durata a bassa pressione, come è stato fatto da noi nella sperimentazione animale precedentemente esposta.

#### BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

1. Conference report: *Regulation of gene expression by O<sub>2</sub> tension*. American Physiological Society Bethesda, September 13-14 1990.
2. Cortas N.K., Wakid N.W.: *Determination of inorganic Nitrate in serum and urine by a kinetic Cadmium-reduction method*. Clin. Chem., 36/8, 1440-43, 1990.
3. Demello FJ et. al.: *Comparative study of experimental Clostridium Perfringens infections in dogs treated with antibiotics, surgery and hyperbaric oxygen*. Surgery 1971; 73: 936-41.
4. Messier A.A.: *Sensitivity of cultured mammalian cells to oxidative stress: adaption to replated exposure to hyperbaric oxygen*. U.B.R. vol. 17, n. 4, 305-22, 1990.
5. Muhvich KH et. al.: *Evaluation of antimicrobials combined with hyperbaric oxygen in a mouse model of clostridial myonecrosis*. J. Trauma, 36 (1): 7-10, 1994.
6. Niu A.K.C.: *Heat shock treatment protects rat from hyperbaric oxygen (HBO) toxicity*. U.H.M.S. vol. 2, (77), 55, 1994.
7. Rocco M. et. al.: *Produzione di Malonildialdeide, TNF, Endotelina-1 e HBO*. Atti congresso S.I.A.A.R.T.I. Rimini, 436, 1994.
8. Rubhanny G.M.: *Superoxyde anions and Hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor*. Am; J. Physiol. 250: H 822-827, 1986.
9. Vezzani G. et. al.: *Studio della popolazione microbica in corso di gangrena gassosa*. Atti congresso "Anestesia in ortopedia". Napoli, 305, 1994.
10. Witherman KA et. al.: *Sepsis and septic shock*. A review of laboratory models and a proposal. Journal of surgical research 29, 189-201. 1980.