

Συμβολή του αραχιδονικού οξέος στην ενίσχυση της δραστηριότητας των αντιβιοτικών στην πειραματική σήψη από πολυανθεκτική *Pseudomonas aeruginosa*

ΣΚΟΠΟΣ Η θεραπευτική προσέγγιση της πειραματικής σήψης από πολυανθεκτικό στελέχος *Pseudomonas aeruginosa* με την ενδοφλέβια συχορήγηση αραχιδονικού οξέος (ΑΟ), κεφταζιντίμης και αμικασίνης. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΙ** Πέντε κουνέλια χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της δόσης του ΑΟ, πέντε έγιναν σπηπτικά και παρέμειναν χωρίς θεραπεία ως μάρτυρες, πέντε έγιναν σπηπτικά και έλαβαν θεραπεία με κεφταζιντίμη και αμικασίνη, πέντε έγιναν σπηπτικά και έλαβαν θεραπεία με κεφταζιντίμη, αμικασίνη και ΑΟ και ένα έγινε σπηπτικό και έλαβε θεραπεία με κεφταζιντίμη, αμικασίνη και το διαλύτη του ΑΟ. Η σήψη εγκαταστάθηκε με την ενδοφλέβια χορήγηση πολυανθεκτικού στελέχους *P. aeruginosa* και μισή ώρα μετά χορηγήθηκε θεραπεία με 50 mg/kg κεφταζιντίμης, 15 mg/kg αμικασίνης χωρίς/με ΑΟ σε δόση 25 mg/kg σε έγχυση 10 min. Ακολούθησε τακτική αιμοδυναμική παρακολούθηση και λήψη δειγμάτων αίματος για ποσοτική καλλιέργεια και για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της μαλινοδιαδεΰδης (MDA), των ενδοτοξινών (LPS) και των αντιμικροβιακών. Τρεις ώρες μετά την εφαρμογή της θεραπείας έγινε ευθανασία και λήψη ιστοτεμαχίων προς καλλιέργεια. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Μετά την εφαρμογή της θεραπείας, οι μάρτυρες και τα ζωικά πρότυπα στα οποία χορηγήθηκαν μόνο τα αντιμικροβιακά παρουσίασαν σημαντικές αυξομειώσεις της αρτηριακής τους πίεσης και δυσανάλογη βραδυκαρδία, ενώ μετά τη συχορήγηση του ΑΟ διαπιστώθηκε αρχική πτώση της αρτηριακής πίεσης και διατήρησή της στη συνέχεια σταθερή, χωρίς αυξομειώσεις και χωρίς μεταβολές του αριθμού των σφύξεων. Τρεις ώρες μετά τη συχορήγηση του ΑΟ με τα αντιμικροβιακά μειώθηκε σημαντικά ο αριθμός των αποικιών στο αίμα καθώς και στους μεσεντέριους ηεμφαδένες και στον πνεύμονα. Παράλληλα, αυξήθηκαν οι συγκεντρώσεις της MDA, οι οποίες δεν συσχετίστηκαν με τις συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών και των LPS. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η συχορήγηση ΑΟ με αντιμικροβιακά αποτελεί αξιόλογη προοπτική για τη θεραπεία πειραματικής σήψης από πολυανθεκτική *P. aeruginosa*. Η δράση του θα μπορούσε να αποδοθεί στη μη ενζυμική υπεροξειδωσή του.

Ο επιπολασμός των πολυανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* παρουσιάζεται στα ελληνικά νοσοκομεία ιδιαίτερα αυξημένος και το πρώτο εξάμηνο του 2001 ανήλθε στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) σε 48%.¹ Η χορήγηση των ανοσοτροποποιητικών ουσιών, που μεταβάλλουν την παραγωγή των προφλεγμονωδών κυταροκινών, για λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη ήταν αρχικά ελπιδοφόρα, αλλά ακολουθήθηκε από κλινική αποτυχία. Ως κυριότερος λόγος της αποτυχίας θεωρήθηκε

το γεγονός ότι κατά την πειραματική τεκμηρίωση της δράσης τους η έκθεση των πειραματοζώων στο σπηπτικό παράγοντα γινόταν μετά τη χορήγηση του ανοσοτροποποιητή.² Ανάλογη ανοσοτροποποιητική δράση χαρακτηρίζει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (ΠΛΟ),³ τα οποία έχουν επιπλέον τη δυνατότητα της μη ενζυμικής υπεροξειδωσης. Τα ΠΛΟ μπορούν να μεταβάλουν *in vitro* τα πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* σε ευαίσθητα στο συνδυασμό της κεφταζιντίμης με την αμικασίνη.^{4,5}

Σ. Σκιαθίτης,¹
Ε. Ι. Γιαμαρέλλης-Μπουρμπούλης,²
Θ. Αδάμης,¹
Μ. Μουκταρούδη,²
Β. Κούσουλας,³
Λ. Σαμπράκος,¹
Α. Διονυσίου-Αστερίου,³
Π.Ε. Καραγιαννάκος,¹
Ε. Γιαμαρέλληου²

¹Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας

²Δ' Παθολογική Κλινική, ³Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών

Enhancement by arachidonic acid of the activity of antibiotics on experimental by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sepsis

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Αμικασίνη
Αραχιδονικό οξύ
Κεφταζιντίμη
Σήψη

Β' Βραβείο
Έπαθλο «Σ. Παπασταμάτης» 2002

Ως συνέπεια των ανωτέρω δεδομένων, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ενίσχυση του συνδυασμού της κεφταζιμίνης και της αμικασίνης με τη χορήγηση του αραχιδονικού οξέος (ΑΟ), που είναι ένα ω-6 ΠΛΟ, στη θεραπεία της πειραματικής σήψης από πολυανθεκτική *P. aeruginosa*. Παράλληλα, μελετήθηκε η δράση του ΑΟ επί των αιμοδυναμικών παραμέτρων που εντάσσονται στην οντότητα του σηπτικού συνδρόμου.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Αριθμός και ομάδες ζωικών προτύπων

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 21 λευκά αρσενικά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας μέσου βάρους 3,45 kg. Η μελέτη έλαβε άδεια από τη Νομαρχία Αθηνών, σύμφωνα με τους νόμους της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τα ζώα παρέμειναν σε ξεχωριστά μεταλλικά κλουβιά και είχαν ελεύθερη πρόσβαση στο νερό και στη συνήθη τροφή τους. Η θερμοκρασία στον περιβάλλοντα χώρο κυμαινόταν μεταξύ 18 °C και 22 °C, η σχετική υγρασία ήταν 65% και ο κύκλος φωτός/σκότους 8 π.μ.–8 μ.μ. Από το σύνολο των ζωικών προτύπων, πέντε χρησιμοποιήθηκαν για τον καθορισμό της μέγιστης ανεκτής δόσης του ΑΟ, πέντε έγιναν σηπτικά και παρέμειναν χωρίς θεραπεία ως μάρτυρες, πέντε έγιναν σηπτικά και έλαβαν θεραπεία με κεφταζιμίνη και αμικασίνη, πέντε έγιναν σηπτικά και έλαβαν θεραπεία με κεφταζιμίνη, αμικασίνη και ΑΟ και ένα έγινε σηπτικό και έλαβε θεραπεία με κεφταζιμίνη, αμικασίνη και το διαλύτη του ΑΟ.

Γαλάκτωμα του αραχιδονικού οξέος

Ο αιθυλεστέρας του ΑΟ (Sigma Co, St. Louis, USA) διαλύθηκε με απόλυτη αιθανόλη 99% (Merck, Darmstadt, Germany) σε αρχικό διάλυμα 10 mg/mL, που διατηρήθηκε σε ατμόσφαιρα N₂ στους -70 °C. Κάθε ημέρα πειράματος, η αντίστοιχη ποσότητα αποψύχεται και αραιωνόταν με ύδωρ στείρου πυρετογόνων (BioWhittaker, Walkersville, Maryland) σε τελικό όγκο 5 mL, που ήταν κατάλληλος για ενδοφλέβια χορήγηση.

Μετά από αναισθησία με ενδομυϊκή χορήγηση 25 mg/kg κεταμίνης και 5 mg/kg ξυλοζίνης έγινε καθετηριασμός της φλέβας του δεξιού ωτός με βελόνη 20 G, από την οποία χορηγήθηκε το ΑΟ. Σε καθένα από τα πέντε ζωικά πρότυπα χορηγήθηκαν με μεσοδιαστήματα επτά ημερών καθεμία από τις δόσεις των 1, 2, 5, 10, 15, 25 και 50 mg/kg, σε χρόνους έγχυσης 5 και 10 min, υπό αντλία και παράλληλη ηλεκτροκαρδιογραφική παρακολούθηση (Criticon Dinamap). Επίσης, τα ζώα παρακολούθηθηκαν επί 24 ώρες μετά το πέρας της έγχυσης. Διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη άριστα ανεκτή δόση ήταν 25 mg/kg σε έγχυση 10 min, η οποία επιλέχθηκε για το υπόλοιπο της μελέτης. Η χορήγηση των 50 mg/kg και στους δύο χρόνους έγχυσης συνοδεύτηκε από ακαριαίο θάνατο λόγω κοιλιακής μαρμαρυγής, ενώ η δόση των 25 mg/kg σε έγχυση 5 min προκάλεσε σε ένα ζώο κοιλιακή ταχυκαρδία, χωρίς θανατηφόρα κατάληξη.

Εγκατάσταση και θεραπευτική αντιμετώπιση πειραματικής σήψης

Χρησιμοποιήθηκε ένα πολυανθεκτικό στέλεχος *P. aeruginosa*, που απομονώθηκε από το αίμα ασθενούς με σήψη και πολυοργανική ανεπάρκεια. Ο καθορισμός των ευαισθησιών του στελέχους στα αντιμικροβιακά έγινε μετά από προσδιορισμό των ελαχίστων ανασταλτικών πυκνοτήτων (ΕΑΠ) με τεχνική μικροδιάλυσης των αντιμικροβιακών σε τελικό όγκο 0,1 mL και επώαση επί 18 ώρες στους 35 °C, και των ελαχίστων βακτηριοκτόνων πυκνοτήτων (ΕΒΠ) μετά από ανακαλλιέργεια σε άγαρ McConkey (Oxoid Ltd, London, UK). Οι ΕΑΠ στην τικαρκιλίνη/κλαβουλανικό, πιπερακιλίνη, κεφταζιμίνη, ιμιπενέμη, μεροπενέμη, αμικασίνη και σιπροφλοξασίνη ήταν 256/2, 512, 16, 64, 32, 128 και 256 μg/mL και οι ΕΒΠ >512/2, >512, 128, 128, 128, 256 και >512 μg/mL, αντίστοιχα, ώστε το στέλεχος να θεωρηθεί ανθεκτικό σε όλα τα ανωτέρω αντιμικροβιακά.⁶

Μετά την αναισθησία του ζωικού προτύπου, όπως προαναφέρθηκε, έγινε μέση επιμήκης τομή στον τράχηλο υπό άσπτες συνθήκες. Ακολούθησε τραχειοτομή και διασφάλιση (καθετήρας Mallinckrodt Medical) και σύνδεση του ζώου με αναπνευστήρα σταθερού όγκου, στον οποίο ο αριθμός των αναπνοών καθορίστηκε στις 16/min (Harvard Roden Ventilator). Η διατήρηση της αναισθησίας γινόταν με την ενδοφλέβια έγχυση νατριούχου θειοπεντάλης σε δόση 20 mg/kg ανά 30 min. Ακολούθησε παρασκευή και καθετηριασμός και των δύο σφαγιτίδων φλεβών καθώς και των δύο καρωτίδων αρτηριών με καθετήρες 18 G (Abbotath, venisystems TM). Μετά τον καθετηριασμό των αγγείων χορηγήθηκε ταχέως από την αριστερή σφαγίτιδα όγκος 1 mL θρεπτικού ζωμού Mueller-Hinton (Oxoid Ltd, London, UK) με 1×10^8 cfu του στελέχους. Τρία min μετά την έγχυση του βακτηρίου χορηγήθηκε ενδοφλέβια θεραπεία με ταχεία έγχυση κεφταζιμίνης και αμικασίνης από τη δεξιά σφαγίτιδα φλέβα, ακολουθούμενη ή όχι από το γαλάκτωμα του ΑΟ. Η δόση της κεφταζιμίνης (Glaxo, MacClesfield, UK) ήταν 50 mg/kg και της αμικασίνης (Bristol, Syracuse, NY) 15 mg/kg, σε αναλογία με άλλους συγγραφείς.⁶

Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος γινόταν ανά 10 min καταγραφή της συστολικής (SP), της διαστολικής (DP) και της μέσης (MAP) αρτηριακής πίεσης, αλλά και του αριθμού των αρτηριακών σφύξεων από ενδαρτηριακό καθετήρα εντός της δεξιάς καρωτίδας, ο οποίος μέσω μετατροπέα της πίεσης (pressure transducer) είχε συνδεθεί με πολυδιαυλικό καταγραφικό μηχανήμα (Electronics for Medicine). Ο προσδιορισμός της κεντρικής φλεβικής πίεσης (ΚΦΠ) γινόταν από βαθμολογημένη στήλη νερού σε επικοινωνία με τη δεξιά σφαγίτιδα. Η θερμοκρασία του ορθού μετριοταν με απλό υδραργυρικό θερμόμετρο (Omron).

Δείγματα περιφερικού αίματος συνολικού όγκου 7 mL λαμβάνονταν από την αριστερή καρωτίδα αμέσως πριν και αμέσως μετά τη χορήγηση του βακτηρίου, αμέσως πριν την εφαρμογή της θεραπείας και 0,5, 1,5, 2,0 και 3,0 ώρες μετά την

εφαρμογή της θεραπείας. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για ποσοτική καλλιέργεια και για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της μαλνοδιαλδεΐδης (MDA), των ενδοτοξινών (LPS), της κεφταζιντίμης και της αμικασίνης. Στα αρχικά και τελικά δείγματα γινόταν επίσης προσδιορισμός των λευκών αιμοσφαιρίων. Παράλληλα, ποσότητα αρτηριακού αίματος 1 mL συλλεγόταν κατά το τελευταίο χρονικό διάστημα σε σύριγγα με ηπαρινισμένα τοιχώματα για προσδιορισμό του pH, της pCO_2 και των HCO_3^- .

Τρεις ώρες μετά την εφαρμογή της θεραπείας, στα πειραματόζωα γινόταν ευθανασία με την εφάπαξ χορήγηση 10 mg/kg νατριούχου θειοπεντάλης και ακολουθούσε ευρεία μέση λαπαροτομή υπό άσπτες συνθήκες. Λαμβάνονταν τεμάχια βάρους 0,5–0,8 g ήπατος, σπλήνα, μεσεντέριων λεμφαδένων και του δεξιού κάτω πνευμονικού λοβού και καλλιεργούνταν ποσοτικά, όπως θα αναλυθεί κατωτέρω.

Ποσοτικές καλλιέργειες αίματος και ιστών

Η ποσοτική καλλιέργεια αίματος γινόταν αμέσως μετά τη λήψη. Πιο συγκεκριμένα, 1 mL αίματος προστίθεται σε σωληνάριο με 4 mL ζωμού Mueller-Hinton και ακολουθούσαν πέντε διαδοχικές αραιώσεις σε αναλογία 1:10. Ποσότητα 0,1 mL κάθε αραιώσης καλλιεργείται σε άγαρ McConkey. Τα τρυβλία επωάζονταν επί 24 ώρες στους 37 °C και ο αριθμός τους στο αίμα καθοριζόταν μετά από πολλαπλασιασμό με τον αντίστοιχο συντελεστή αραιώσης. Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ήταν 50 cfu/mL. Τα ληφθέντα ιστοτεμάχια κάθε οργάνου ζυγίζονταν και ομογενοποιούνταν. Η καλλιέργεια του ομογενοποιημένου γινόταν όπως και αυτή του αίματος και το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ήταν 10 cfu/mL.

Προσδιορισμός μαλνοδιαλδεΐδης, ενδοτοξινών και αντιμικροβιακών

Οι μετρήσεις έγιναν στον ορό μετά τη φυγοκέντρηση των δειγμάτων του περιφερικού αίματος. Ο προσδιορισμός της MDA έγινε με τη μέθοδο του θειοβαρβιτουρικού οξέος.^{7,8} Σε συντομία, 0,1 mL ορού αναμείχθηκαν με 0,9 mL διαλύματος τριχλωροξικού οξέος 20% (Merck, Darmstadt, Germany) και φυγοκεντρήθηκαν επί 10 min στους 4 °C στα 12.000 g. Το υπερκείμενο επωάστηκε με 1 mL διαλύματος PBS (pH 7,0) και με 1 mL διαλύματος θειοβαρβιτουρικού οξέος 0,6% (Merck, Darmstadt, Germany) επί 20 min στους 90 °C. Ακολούθησε ανάγνωση της οπτικής πυκνότητας στα 535 nm (Hitachi, Tokyo, Japan) και ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων της MDA έγινε με πρότυπη καμπύλη από γνωστές συγκεντρώσεις διαλύματος 1,1,3,3-τετραμεθοξυ-προπανίου (Merck, Darmstadt, Germany).

Οι συγκεντρώσεις των LPS προσδιορίστηκαν με τη χρωμομετρική μέθοδο Limulus Amoebocyte Lysate (BioWhittaker, Maryland, USA), με χαμηλότερο όριο ανίχνευσης τις 0,1 EU/mL. Προηγήθηκε αραιώση του ορού 1:10 με νερό στείρο πυ-

ρετογόνων και επώαση επί 5 min στους 70 °C, με σκοπό την αποδέσμευση των συνδεδεμένων LPS με τα λευκώματα.⁹

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων των αντιμικροβιακών έγινε με μικροβιολογική μέθοδο, με 24ωρη επώαση των δειγμάτων των ορών εντός άγαρ Mueller-Hinton με ενσωματωμένο βακτηριακό στέλεχος. Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της κεφταζιντίμης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* ICB4004, που έγινε ανθεκτικό στην αμικασίνη (EAI>1012 μg/mL) μετά από διαδοχικές ανακαλλιέργειες σε άγαρ με ενσωματωμένες αυξανόμενες συγκεντρώσεις της αμικασίνης, ενώ για την αμικασίνη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Bacillus subtilis* ATCC6633. Οι μετρήσεις έγιναν μετά το σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης σε ημιλογαριθμικό χαρτί από γνωστές συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών. Η επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC) προσδιορίστηκε με τον κανόνα των τραπεζοειδών.¹⁰

Στατιστική αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων

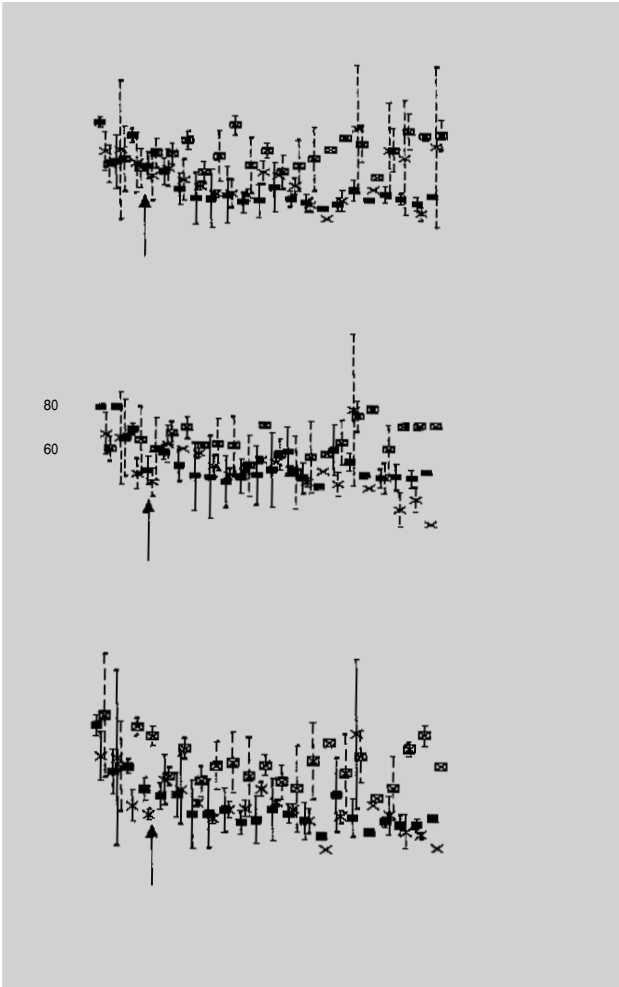
Οι μετρούμενες παράμετροι εκφράστηκαν σε μέσες τιμές (\pm SD ή \pm SE). Προσδιορίστηκαν οι λογαριθμικές μεταβολές του αριθμού των βακτηρίων μετά τη θεραπεία σε σχέση με τον αριθμό αμέσως πριν από τη θεραπεία. Κριτήριο θανάτωσης των βακτηρίων αποτέλεσαν τιμές ίσες ή μεγαλύτερες από 3.¹¹

Οι συγκρίσεις των παραμέτρων έγιναν με τη δοκιμασία ANOVA και οι συσχετίσεις των αντιμικροβιακών με τις LPS και την MDA με τον προσδιορισμό του γραμμικού συντελεστή συσχέτισης^{12,13} ($P < 0,05$).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι γραφικές απεικονίσεις της MAP, της SP και της DP των ζωικών προτύπων μετά την έγχυση του βακτηριακού στελέχους και η επίδραση της θεραπείας δίνονται στην εικόνα 1. Η έγχυση του βακτηρίου προκάλεσε πτώση των τιμών και των τριών πιέσεων μετά από μισή ώρα. Στους μάρτυρες και στα ζωικά πρότυπα που έλαβαν θεραπεία με κεφταζιντίμη και αμικασίνη, διαπιστώθηκαν στη συνέχεια μεγάλες αυξομειώσεις και των τριών πιέσεων. Στα ζωικά πρότυπα όπου χορηγήθηκε το ΑΟ μαζί με τα αντιμικροβιακά, διαπιστώθηκε αρχικά πτώση των πιέσεων και στη συνέχεια σταδιακή άνοδός τους, με μικρές αυξομειώσεις. Στο τέλος του χρόνου παρακολούθησης, τα ζωικά πρότυπα που έλαβαν ΑΟ και τα αντιμικροβιακά είχαν υψηλότερες τιμές SP συγκριτικά με τους μάρτυρες.

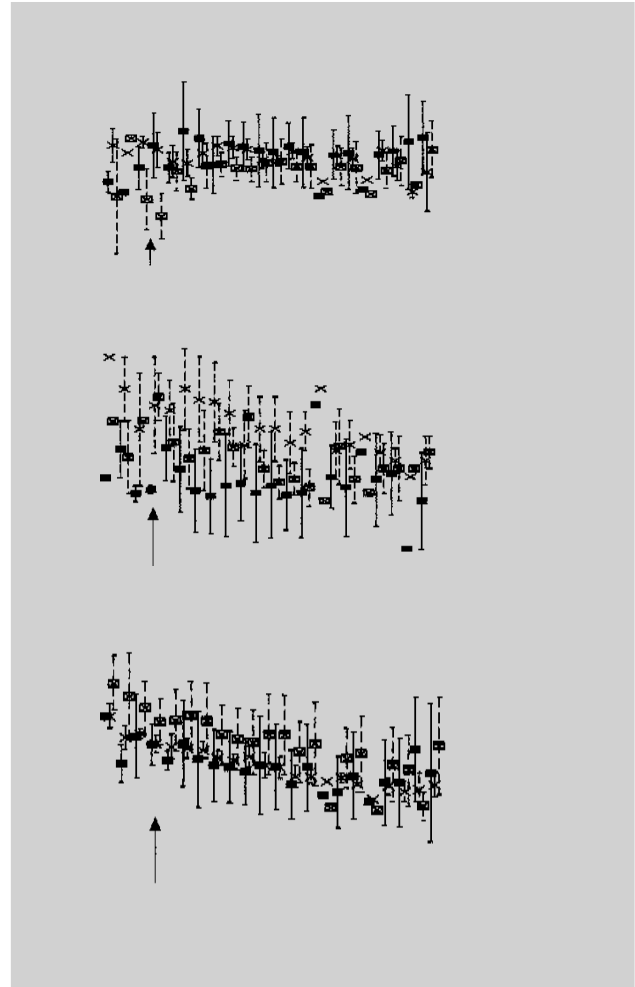
Οι γραφικές απεικονίσεις του αριθμού των σφύξεων, της ΚΦΠ και της θερμοκρασίας του ορθού των ζωικών προτύπων μετά την έγχυση του βακτηριακού στελέχους και η επίδραση της θεραπείας περιγράφονται στην εικό-



Εικόνα 1. Μεταβολές της μέσης (MAP), της συστολικής (SP) και της διαστολικής (DP) αρτηριακής πίεσης μετά την ενδοφλέβια έγχυση του πολυανθεκτικού στελέχους *Pseudomonas aeruginosa*. Με το βέλος συμβολίζεται η εφαρμογή ενδοφλέβιας θεραπείας με τη χορήγηση κεφταζιτιμής και αμικασίνης με/χωρίς αραχιδονικό οξύ (ΑΟ)

να 2. Μετά την εφαρμογή της θεραπείας, τα ζωικά πρότυπα που έλαβαν ΑΟ και αντιμικροβιακά παρουσίασαν υψηλότερες τιμές σφύξεων και χαμηλότερες τιμές ΚΦΠ συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες πειραματοζώων. Αντίθετα, η μείωση της θερμοκρασίας ήταν ανάλογη και στις τρεις ομάδες.

Οι αντίστοιχες μέσες τιμές (\pm SD) των λευκών αιμοσφαιρίων των μαρτύρων, των ζωικών προτύπων που έλαβαν μόνο αντιμικροβιακά και εκείνων στα οποία συγχορηγήθηκε το ΑΟ πριν από την έγχυση του βακτηρίου ήταν $5120,0 \pm 545,6$, $5166,7 \pm 550,8$ και $4575,0 \pm 892,0$ / mm^3 και μεταβλήθηκαν σε $1933,3 \pm 750,6$, $2300,0 \pm 1153,0$ και $2100,0 \pm 757,8$ / mm^3 τρεις ώρες μετά την εφαρμογή της θεραπείας. Στο τελευταίο χρονικό διάστημα, οι αντίστοιχες τιμές pH ήταν $7,17 \pm 0,17$, $7,27 \pm 2,82$ και



Εικόνα 2. Μεταβολές του αριθμού των περιφερικών σφύξεων, της κεντρικής φλεβικής πίεσης (ΚΦΠ) και της θερμοκρασίας του ορθού μετά την ενδοφλέβια έγχυση του πολυανθεκτικού στελέχους *Pseudomonas aeruginosa*. Με το βέλος συμβολίζεται η εφαρμογή ενδοφλέβιας θεραπείας με τη χορήγηση κεφταζιτιμής και αμικασίνης με/χωρίς αραχιδονικό οξύ (ΑΟ).

$7,23 \pm 0,14$, $p\text{CO}_2$ $49,8 \pm 13,3$, $48,8 \pm 9,2$ και $41,8 \pm 9,4$ mmHg και HCO_3^- $17,46 \pm 2,82$, $23,82 \pm 7,07$ και $17,94 \pm 2,72$ mmol/L.

Οι μεταβολές του αριθμού των βακτηρίων στο αίμα μετά την εφαρμογή της θεραπείας αναφέρονται στον πίνακα 1. Σημαντικότερες μεταβολές διαπιστώθηκαν στις 3 ώρες, όπου οι μέσες μεταβολές στο αίμα των μαρτύρων, των ζωικών προτύπων που έλαβαν μόνο αντιμικροβιακά και εκείνων στα οποία συγχορηγήθηκε το ΑΟ ήταν $-0,64$, $-1,40$ και $-3,31$ \log_{10} . Βακτηριακός θάνατος επιτεύχθηκε σε τρία πειραματοζώα (60%), στα οποία συγχορηγήθηκαν ΑΟ και αντιμικροβιακά, ενώ δεν διαπιστώθηκε σε κανένα από τα ζωικά πρότυπα όπου χορηγήθηκαν μόνο τα αντιμικροβιακά.

Πίνακας 1. Μεταβολές του αριθμού των αποικιών στο αίμα των ζωικών προτύπων από το συνδυασμό της κεφταζιτίμης και της αμικασίνης με/χωρίς αραχιδονικό οξύ (ΑΟ). Η θεραπευτική παρέμβαση έγινε μισή ώρα μετά την ενδοφλέβια χορήγηση της *Pseudomonas aeruginosa*.

Χρόνος (ώρες) από την εφαρμογή της θεραπείας	Μέση (± SE) \log_{10} (μεταβολή του αριθμού των αποικιών (cfu/mL))		
	Μάρτυρες	Κεφταζιτίμη + αμικασίνη	Κεφταζιτίμη + αμικασίνη + ΑΟ
0,5	-0,88 ± 0,30	-0,59 ± 0,30 ^a	-1,84 ± 1,01 ^{a,b}
1,5	-1,21 ± 0,41	-1,65 ± 0,47 ^a	-2,82 ± 1,19 ^{a,b}
2,0	-0,71 ± 0,46	-1,89 ± 0,60 ^a	-1,95 ± 0,56 ^{a,b}
3,0	-0,64 ± 0,50	-1,40 ± 0,87 ^a	-3,31 ± 1,06 ^{b,d}

Μεταβολές συγκριτικά με την ομάδα των μαρτύρων: ^aP:NS (μη σημαντικό), ^bP: 0,048

Μεταβολές συγκριτικά με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε κεφταζιτίμη και αμικασίνη: ^aP:NS (μη σημαντικό), ^bP: 0,05

Η σύγκριση του αριθμού των αποικιών του ήπατος, του σπλήνα, των μεσεντέριων λεμφαδένων και του πνευμονικού λοβού των τριών ομάδων πειραματοζώων τρεις ώρες από τη θεραπευτική παρέμβαση περιγράφονται στον πίνακα 2. Ο μέσος αριθμός αποικιών που απομονώθηκε από το ήπαρ των μαρτύρων, των ζωικών προτύπων που έλαβαν μόνο αντιμικροβιακά και εκείνων στα οποία χορηγήθηκε το ΑΟ ήταν, αντίστοιχα, 5,47, 5,40 και 4,84 \log_{10} , από το σπλήνα 5,36, 4,89 και 4,79 \log_{10} , από τους μεσεντέριους λεμφαδένες 4,49, 2,46 και 0,69 \log_{10} και από τους πνεύμονες 4,87, 3,56 και 2,65 \log_{10} .

Οι μεταβολές των LPS και της MDA στο αίμα των τριών ομάδων ζωικών προτύπων πριν και μετά την εφαρμογή θεραπείας και η συσχέτισή τους με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών φαίνονται στον πίνακα 3. Οι μέσες συγκεντρώσεις MDA των μαρτύρων, των ζωικών προτύπων που έλαβαν μόνο αντιμικροβιακά και εκείνων στα οποία χορηγήθηκε το ΑΟ πριν από την εφαρμογή θεραπείας, ήταν 5,9, 3,2 και 6,4 M, αντίστοιχα, και μεταβλήθηκαν μετά την εφαρμογή θεραπείας σε 6,7, 15,8 και 11,6 M στις 0,5 ώρες, σε 7,0, 15,3 και 34,9 M στις 1,5 ώρες, σε 6,7, 12,3 και 21,3 M στις 2,0 ώρες και σε 5,7, 9,9 και 16,3 M στις 3 ώρες, αντίστοιχα. Δεν διαπιστώθηκαν διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων των LPS μεταξύ των ομάδων ούτε στατιστικές συσχετίσεις μεταξύ των συγκεντρώσεων των αντιμικροβιακών και των αντίστοιχων συγκεντρώσεων LPS και MDA σε κάποιο χρονικό διάστημα. Η μέση τιμή (±SD) των AUC της κεφταζιτίμης μετά τη χορήγηση μόνο των αντιμικροβιακών ήταν 135,8±22,8 και μετά τη χορήγηση με το ΑΟ 124,4±14,1 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{ώρα}$. Οι αντίστοιχες τιμές για την αμικασίνη ήταν 101,2±28,5 και 106,6±38,7 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{ώρα}$. Ο μάρτυρας στον οποίο χορηγήθηκε ο διαλύτης του ΑΟ μαζί με τα αντιμικροβιακά παρουσίασε την ίδια βιολογική συμπεριφορά με τα ζώα στα οποία χορηγήθηκαν μόνο τα αντιμικροβιακά.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της νοσοκομειακής σήψης αποτελεί ένα συχνό και δυσεπίλυτο πρόβλημα, λόγω της πολυανθεκτικότητας των υπευθύνων παθογόνων. *In vitro* δεδομένα έχουν δείξει ότι, παρουσία των ΠΛΟ, τα πολυανθεκτικά στελέχη *P. aeruginosa* γίνονται ευαίσθητα στο συνδυασμό κεφταζιτίμης-αμικασίνης.⁶ Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η θεραπευτική αντιμετώπιση της πειραματικής σήψης από πολυανθεκτική *P. aeruginosa* με την ενδοφλέβια συγχορήγηση του ΑΟ με δύο αντιμικροβιακά.

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε προκάλεσε αιμοδυναμική αστάθεια εντός ημιώρου από την ενδοφλέβια χορήγηση του, με πτώση της αρτηριακής πίεσης, άνοδο των περιφερικών σφύξεων και πτώση της θερμοκρασίας του ορθού (εικ. 1). Στο πέρας της παρακολούθησης διαπιστώθηκε στους μάρτυρες λευκοπενία και πτώση του pH και των HCO_3^- , δηλαδή σοβαρή σήψη.¹⁴ Κατά συνέπεια, η έναρξη της θεραπευτικής αντιμετώπισης μισή ώρα από την έγχυση του στελέχους συνέπεσε σε ένα χρονικό διάστημα όπου η σπητική διεργασία είχε κινητοποιηθεί, γεγονός που, όπως θα αναμενόταν, συμπίπτει με σημαντική συστηματική ενδοτοξιναιμία (πίν. 3). Η εφαρμογή της θεραπείας με έναν παράγοντα που μπορεί να δράσει και ανοσοτροποποιητικά³ μετά την κλινική εκδήλωση του σπητικού συνδρόμου αποτελεί πρωτοτυπία, καθόσον στα υπάρχοντα πειραματικά πρότυπα η χορήγηση του παράγοντα προηγείται της έκθεσης στο λοιμώδες αίτιο.²

Για τη θεραπεία, το ΑΟ παρασκευάστηκε υπό μορφή γαλακτώματος και προτού χρησιμοποιηθεί διαπιστώθηκε ότι ήταν άριστα ανεκτό σε μη σπητικά ζωικά πρότυπα στη δόση των 25 mg/kg σε έγχυση 10 min. Είναι η πρώτη φορά, απ' όσο γνωρίζουμε, που γίνεται στη βιβλιογραφία προσπάθεια ενδοφλέβιας χορήγησης του ΑΟ. Στην καθημερινή κλινική πράξη διατίθενται έτοιμα δια-

Πίνακας 2. Αριθμός αποικιών στο ήπαρ, το σπλήνα, τους μεσεντέριους λεμφαδένες και το δεξιό κάτω πνευμονικό λοβό των ζωικών προτύπων που θυσιάστηκαν τρεις ώρες μετά τη χορήγηση του συνδυασμού της κεφταζιτίμης και της αμικασίνης με/χωρίς αραχιδιονικό οξύ (ΑΟ).

	Μέση (± SD) \log_{10} [βακτηριακού φορτίου (cfu/g)]		
	Μάρτυρες	Κεφταζιτίμη + αμικασίνη	Κεφταζιτίμη + αμικασίνη + ΑΟ
Ήπαρ	5,47 ± 1,66	5,40 ± 0,46 ^a	4,84 ± 0,86 ^{a,b}
Σπλήνας	5,36 ± 1,46	4,89 ± 0,47 ^a	4,79 ± 0,45 ^{a,b}
Μεσεντέριος λεμφαδένας	4,49 ± 2,04	2,46 ± 0,15 ^a	0,69 ± 0,95 ^{v,b}
Πνευμονικός λοβός	4,87 ± 1,54	3,56 ± 0,24 ^a	2,65 ± 1,79 ^{a,b}

Μεταβολές συγκριτικά με την ομάδα των μαρτύρων: ^aP:NS (μη σημαντικό), ^vP:0,003

Μεταβολές συγκριτικά με την ομάδα στην οποία χορηγήθηκε κεφταζιτίμη και αμικασίνη: ^bP:NS (μη σημαντικό), ^βP: 0,005

λύματα παρεντερικής διατροφής εμπλουτισμένα σε ΠΛΟ, χωρίς όμως αυτά να αποτελούν έτοιμα σκευάσματα ενός και μόνο ΠΛΟ. Το μετά λιθίου άλας ενός άλλου ΠΛΟ, του γ-λινολενικού οξέος, έχει χορηγηθεί παρεντερικά σε τρεις ασθενείς με καρκίνο παγκρέατος σε συνολική δόση 0,28–0,84 g/kg για 10 ημέρες. Αναλογικά, κάθε ξεχωριστή δόση του άλατος του γ-λινολενικού παραλληλίζεται με αυτή της παρούσας μελέτης για το ΑΟ.¹⁵

Το γαλάκτωμα χορηγήθηκε αμέσως μετά την έγχυση των δύο αντιμικροβιακών. Με την εφαρμογή της θεραπείας, τόσο οι μάρτυρες όσο και τα ζωικά πρότυπα στα οποία χορηγήθηκαν μόνο τα αντιμικροβιακά παρουσίασαν σημαντική αιμοδυναμική αστάθεια, με μεγάλες αυξομειώσεις της αρτηριακής τους πίεσης (εικ. 1). Ιδιαίτερα όσα έλαβαν μόνο αντιμικροβιακά εκδήλωσαν, σε αντίθεση με το αναμενόμενο, σχετικά χαμηλό αριθμό σφύξεων, γεγονός που μαρτυρεί πιθανή μετάπτωση σε υποδυναμική καταπληξία (εικ. 2). Αντίθετα, η συγχορήγηση του ΑΟ με τα αντιμικροβιακά παρεμπόδισε την εμφάνιση αυξομειώσεων των πιέσεων, ενώ διατήρησε τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της αντιδραστικής ανόδου των περιφερικών σφύξεων. Παράλληλα, συνοδεύτηκε από διατήρηση χαμηλής της ΚΦΠ, ενώ δεν φάνηκε να επηρεάζει τη θερμοκρασία από το ορθό. Αντίθετα, δεν απέτρεψε την εκδήλωση λευκοπενίας, αλλά περιορίσε το βαθμό της πτώσης του pH και διατήρησε χαμηλότερη τη συγκέντρωση του pCO_2 συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες ζωικών προτύπων.

Η δράση του ΑΟ μπορεί να αποδοθεί στη δραστική μείωση του εύρους της βακτηριαμίας, που συνοδεύει τη συγχορήγηση του με τα αντιμικροβιακά, συγκριτικά με τη δράση των αντιμικροβιακών μόνων τους (πίν. 1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εγκατάσταση μικρότερου αριθμού βακτηρίων στους μεσεντέριους λεμφαδένες και στους πνεύμονες των ζωικών προτύπων συγκριτικά με τις δύο άλλες ομάδες, ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζει τον αποικισμό του ήπατος και του σπλήνα (πίν. 2). Τα δεδομένα

αυτά είναι ενδεικτικά της εκδήλωσης ταχείας, εντός τριών ωρών, δράσης του ΑΟ μετά τη συγχορήγηση με τα αντιμικροβιακά, χαρακτηριστικό που θεωρείται απαραίτητο προκειμένου να επιτευχθεί θεραπεία στη σήψη.¹⁶

Η επίδραση στον αριθμό των βακτηρίων που αποικίζουν το πνευμονικό παρέγχυμα, σε συνδυασμό με τις χαμηλές τιμές ΚΦΠ και pCO_2 , θα μπορούσε να αποτελέσει έμμεση ένδειξη διατήρησης ικανοποιητικής πνευμονικής λειτουργίας μετά τη χορήγηση του ΑΟ συγκριτικά με τις δύο άλλες ομάδες ζωικών προτύπων. Εξάλλου, ο περιορισμός του αποικισμού των μεσεντέριων λεμφαδένων είναι υψίστης σημασίας, καθόσον αυτοί αποτελούν την κύρια εστία της βακτηριακής αλλόθεσης, που συνοδεύει το σπητικό σύνδρομο.¹⁷

Για να μπορέσει ένα β-λακταμικό παράγωγο να δράσει αποτελεσματικά στο σπητικό σύνδρομο, θα πρέπει ο λόγος της επιτυχανόμενης AUC προς την ΕΑΠ να είναι τουλάχιστον 100. Για τις αμινογλυκοσίδες, θα πρέπει οι επιτυχανόμενες συγκεντρώσεις να είναι μεγαλύτερες της ΕΑΠ.¹⁶ Με δεδομένες τις συγκεντρώσεις των αντιμικροβιακών στο αίμα των πειραματοζώων (πίν. 3) και τις τιμές ΕΑΠ του στελέχους που ήδη αναφέρθηκαν, καθίσταται σαφές ότι οι φαρμακοδυναμικές προϋποθέσεις δράσης των αντιμικροβιακών δεν πληρούνται. Κατά συνέπεια, η ενίσχυση της αντιμικροβιακής δράσης της κεφταζιτίμης και της αμικασίνης στο συγκεκριμένο πειραματικό πρότυπο αποδίδεται στη συγχορήγηση του ΑΟ. Τα αντιμικροβιακά φαίνεται να συνεπικουρούνται στη δράση τους επί του βακτηριακού κυττάρου από την άνοδο του οξειδωτικού δυναμικού του ορού, δηλαδή της MDA, που συνοδεύει τη χορήγηση του ΑΟ (πίν. 3), όπως έχει πιθανολογηθεί να συμβαίνει *in vitro*.⁴ Επαγωγή της υπεροξειδωσής των ΠΛΟ μπορεί να γίνει στον οργανισμό και από τις LPS, των οποίων όμως οι συγκεντρώσεις στην παρούσα μελέτη ήταν παρόμοιες και στις τρεις ομάδες ζωικών προτύπων. Συνεπώς, η αύξηση της MDA θα πρέπει να αποδοθεί στο ΑΟ. Στην αύξηση της MDA θα

Πίνακας 3. Συγκεντρώσεις μαλονοδιαλδεύδης (MDA), ενδοτοξινών (LPS) και αντιμικροβιακών των τριών ομάδων ζωικών προτύπων πριν από την έγχυση του βακτηρίου, πριν και μετά τη χορήγηση του συνδυασμού της κεφταζιμής και της αμικασίνης με/χωρίς το αραχιδονικό οξύ (ΑΟ).

	Μέση τιμή (± SD) των αντίστοιχων παραμέτρων									
	Μάρτυρες		Κεφταζιμίμη + Αμικασίνη				Κεφταζιμίμη + Αμικασίνη + ΑΟ			
	MDA (M)	LPS (EU/mL)	Κεφταζιμίμη (μg/mL)	Αμικασίνη (μg/mL)	MDA (M)	LPS (EU/mL)	Κεφταζιμίμη (μg/mL)	Αμικασίνη (μg/mL)	MDA (M)	LPS (EU/mL)
Πριν	5,6±0,6	- ^a	- ^a	- ^a	4,2±2,2	- ^a	- ^a	- ^a	4,6±2,4	- ^a
0,5 ώρες	5,9±0,8	31,1±12,7	- ^a	- ^a	3,2±2,1	23,2±31,6	-	- ^a	6,4±3,9	24,2±19
<i>Θεραπευτική παρέμβαση</i>										
0,5 ώρες	6,7±1,0	21,6±18,3	121,0±43,1	99,3±70,0	15,8±1,7	25,0±17,5	128,8±45,9	121,3±78,0	11,6±9,4	39,8±11
1,5 ώρες	7,0±2,8	20,9±18,6	55,0±24,1	20,6±4,2	15,3±0,4	28,3±20,1	93,8±28,7	16,6±4,2	34,9±30,8 ^{a,b}	27,8±21
2,0 ώρες	6,7±0,7	19,3±19,2	42,0±32,5	15,0±2,8	12,3±4,7	28,5±19,3	49,0±15,6	13,0±2,8	21,3±8,38 ^{a,b}	33,5±12
3,0 ώρες	5,7±0,2	20,9±19,3	42,5±24,7	11,7±6,6	9,9±7,0	27,8±23,6	32,0±18,0	15,7±18,4	16,3±12,5	32,6±7

^a Τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα, οι μετρούμενες παράμετροι απουσιάζουν από το περιφερικό αίμα

^b Διαφορές με την αντίστοιχη συγκέντρωση των μαρτύρων P: 0,05, με τα ζώα που έλαβαν κεφταζιμίμη και αμικασίνη P: 0,022

μπορούσε επίσης να αποδοθεί και η ευνοϊκή επίδραση του ΑΟ στις αιμοδυναμικές παραμέτρους των σπηκτικών ζωικών προτύπων.

Η παρούσα μελέτη επιδίωξε να προσεγγίσει θεραπευτικά το πειραματικό μοντέλο της σήψης από πολυανθεκτικό στέλεχος *P. aeruginosa* με τη συγχορήγηση ΑΟ και αντιμικροβιακών. Αποδείχθηκε ότι έτσι επιτυγχάνεται αιμοδυναμική σταθερότητα του πειραματοζώου και δραστι-

κή μείωση του αριθμού των βακτηριακών κυττάρων, τόσο στο αίμα όσο και στους μεσεντέριους λεμφαδένες και στους πνεύμονες. Η δράση του ΑΟ θα μπορούσε να αποδοθεί στην άνοδο του οξειδωτικού δυναμικού του ορού, που προκαλεί. Τα ανωτέρω αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω μελέτης σε σπηκτικά ζωικά πρότυπα από διαφορετικό είδος πολυανθεκτικών στελεχών, με απώτερο στόχο την εισαγωγή τους στην κλινική πράξη.

ABSTRACT

Enhancement by arachidonic acid of the activity of antibiotics on experimental by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sepsis

S. SKIATHITIS,¹ E.J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS,² Th. ADAMIS,¹ M. MOUKTAROUDI,² V. KOUSOULAS,³ L. SAMPRAKOS,¹ A. DIONYSSIOU-ASTERIOU,³ PE. KARAYANNACOS,¹ H. GIAMARELLOU²

¹Department of Experimental Surgery and Surgical Research, ²4th Department of Internal Medicine,

³Department of Biological Chemistry, University of Athens, Medical School, Greece.

Archives of Hellenic Medicine 2002, 19(5):553-560

OBJECTIVE Treatment of experimental multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* sepsis with intravenous co-administration of arachidonic acid (AA), ceftazidime and amikacin. **METHOD** The study was conducted using 21 rabbits, of which 5 were used for the determination of the dose of AA, 5 became septic and were left untreated as controls, 5 became septic and were treated with ceftazidime and amikacin, 5 became septic and were treated with ceftazidime, amikacin and AA, and one became septic and was treated with ceftazidime, amikacin and the diluent of AA. Sepsis was induced by intravenous (IV) administration of one multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolate and treatment was given thirty minutes after bacterial challenge. Ceftazidime was administered by bolus IV at 50 mg/kg, amikacin by bolus IV at 15 mg/kg and AA at 25 mg/kg within 10 minutes. Hemodynamic monitoring was performed and blood was sampled at regular time intervals for quantitative culture and determination of the concentrations of malonaldehyde (MDA), endotoxins (LPS) and antimicrobials. Three hours after treatment the animals were sacrificed and tissue samples were collected for culture. **RESULTS** Both the controls and the animals treated with ceftazidime and amikacin showed hemodynamic instability characterized by wide fluctuations of blood pressure and bradycardia. Administration of AA resulted in fall of

blood pressure followed by stabilization and adequate pulse rate. Reduction of viable cell counts was detected in the blood 3,0 hours after AA administration, and in the mesenterial lymph nodes and the lung. MDA concentrations were raised after the administration of AA whereas concentrations of LPS were similar in all study groups. No correlation was found between MDA and drug levels. **CONCLUSIONS** AA administered with ceftazidime and amikacin holds new promise for the treatment of multidrug-resistant *P. aeruginosa* sepsis. Its therapeutic activity might be attributed to its peroxidation properties.

Key words: Amikacin, Arachidonic acid, Ceftazidime, *Pseudomonas*, Sepsis

Βιβλιογραφία

1. WHONET GREECE. The Greek system for surveillance of anti-microbial resistance, <http://www.mednet.gr/whonet/01pseu5-statistics.htm>
2. ABRAHAM E, LATERRE PF, GARBINO J, PINGLETON S, BUTLER T, DUGERNIER T ET AL. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. *Crit Care Med* 2001, 29:503–505
3. CALDER PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Lipids* 2001, 36:1007–1024
4. GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, GRECKA P, DIONYSIOU-ASTERIOU A, GIAMARELLOU H. *In vitro* activity of polyunsaturated fatty acids on *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1998, 58:283–287
5. GIAMARELLOS-BOURBOULIS EJ, GRECKA P, DIONYSIOU-ASTERIOU A, GIAMARELLOU H. Impact of n-6 polyunsaturated fatty acids on growth of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Interactions with amikacin and ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:2187–2189
6. ROBAUX MA, DUBE L, CAILLON J, BUGNON D, KERGUERIS MF, NAVAS D ET AL. *In vivo* efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of ceftazidime alone or in combination with amikacin relative to human kinetic profiles in a *Pseudomonas aeruginosa* rabbit endocarditis model. *J Antimicrob Chemother* 2001, 47:617–622
7. BEGIN ME, ELLS G, HORROBIN DF. Polyunsaturated fatty acid-induced cytotoxicity against tumour cells and its relationship to lipid peroxidation. *J Natl Cancer Inst* 1988, 80:188–194
8. DHAR P, GHOSH S, BHATTACHARYA DK. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*) levels on blood lipids and nonenzymatic *in vitro* lipid peroxidation in rats. *Lipids* 1999, 34:109–114
9. HURLEY JC. Antibiotic-induced release of endotoxin. A therapeutic paradox. *Drug Saf* 1995, 12:183–195
10. BENET LZ, GALEAZZI RL. Noncompartmental determination of the steady-state volume of distribution. *J Pharm Sci* 1979, 68:1071–1074
11. HINDLER J. Tests to assess bactericidal activity. In: Eisenberg HD (ed) *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1992: 5.16.14–5.16.24
12. GODFREY K. Comparing the means of several groups. In: Bailar JC, Mosteller F (eds) *Medical uses of statistics*. 2nd ed. Boston, Massachusetts Medical Society, 1992:201–232
13. GODFREY K. Simple linear regression in medical research. In: Bailar JC III, Mosteller F (eds) *Medical uses of statistics*. 2nd ed. Boston, Massachusetts Medical Society, 1992: 233–275
14. AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992, 20:864–874
15. KAIREMO KJA, JENUKEN AP, KORPPI-TOMMOLA ET, PYRHÖNEN SO. Effects of lithium gammalinolenate on the perfusion of liver and pancreatic tissues in pancreatic cancer. *Anticancer Res* 1997, 17:3729–3736
16. PERITI P, MAZZEI T. Antibiotic-induced release of bacterial cell wall components in the pathogenesis of sepsis and septic shock: a review. *J Chemother* 1998, 10:427–448
17. SCHIOEFFEL U, PELZ K, HARING RU, AMBERG R, SCHANDL R, URBASCHEK R ET AL. Inflammatory consequences of the translocation of bacteria and endotoxin to mesenteric lymph nodes. *Am J Surg* 2000, 180:65–72

Corresponding author:

E.J. Giamarellos-Bourboulis, 4th Department of Internal Medicine, Sismanoglion General Hospital, GR-151 26 Marousi Attikis, Greece