

BADANIA DOŚWIADCZALNE NAD WPLYWEM HIPERBARII TLENOWEJ NA PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN VITRO

Małgorzata Wolańska

Laboratorium sanitarno-higieniczne MW, Gdynia

STRESZCZENIE

Celem badania było określenie wpływu zastosowania hiperbarii tlenowej na wzrost i metabolizm pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Doświadczalne przeprowadzono na podłożach agarowych oraz płytkach krwawych. Płytki z posiewami bakteryjnymi poddawano działaniu hiperbarii tlenowej w różnicowanych warunkach ciśnienia i czasu oddziaływania. Stwierdzono istotne hamowanie wzrostu bakterii oraz aktywności proteolitycznej. Poddane działaniu hiperbarii patogeny wykazywały także mniejszą zjadliwość po zakażeniu nimi zwierząt doświadczalnych.

Słowa kluczowe: tlen, hiperbaria, bakterie tlenowe, bakterie względnie beztlenowe.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2023 Vol. 84 Issue 3 pp. 57 – 62

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.2478/phr-2023-0016

Strony: 6, rysunki: 3, tabele: 0

page **www of the periodical:** www.phr.net.pl

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society

Typ artykułu: oryginalny

**Wydrukowano w Rocznik Służby Zdrowia
MW 1981-82**

**Termin zatwierdzenia do druku w PHR:
10.12.2022 r.**



WSTĘP

Zainteresowanie wpływem hiperbarii tlenowej na drobnoustroje najczęściej dotyczy bakterii beztlenowych, gdyż w niektórych postaciach zakażeń, wywołanych przez te bakterie, hiperbaria tlenowa znalazła zastosowanie jako jedna z metod leczniczych [1,2,3,4,5].

Dotychczasowe wyniki prac dotyczących bakterii z grupy względnych beztlenowców i bezwzględnych tlenowców wskazują, że podwyższone ciśnienie tlenu wpływa hamująco również na wzrost tych bakterii [6,7,8,9,10,11]. Zmiany, jakie obserwowano u badanych bakterii, dotyczyły nie tylko wzrostu, ale i wyglądu, metabolizmu, zdolności wytwarzania jądów i pigmentów oraz wrażliwości na antybiotyki [9,10,12,13,14].

Prace na temat wpływu hiperbarii tlenowej na *Pseudomonas aeruginosa* in vitro oraz na temat możliwości zastosowania tej metody w leczeniu zakażeń wywołanych przez te bakterie są nieliczne, a wyniki prac poszczególnych autorów niejednoznaczne [6,7,10,15].

Zakażenia *Pseudomonas* występują jednak coraz częściej, głównie śródszpitalnie, zagrażają niejednokrotnie życiu ludzkiemu, zwłaszcza na oddziałach noworodkowych, reanimacyjnych, urologicznych, chirurgicznych, u wszystkich tych pacjentów, u których prawidłowe fizjologiczne mechanizmy obronne są upośledzone. Liczba tych zakażeń dynamicznie rośnie, a możliwości leczenia etiotropowego są ograniczone, często zawodne.

Ponieważ zakażenia *Pseudomonas aeruginosa* stanowią współcześnie jeden z największych problemów epidemiologicznych i klinicznych, postanowiono zbadać wpływ hiperbarii tlenowej na te bakterie in vitro, w celu uzyskania podstaw dla ewentualnego zastosowania w przyszłości tej metody leczniczej w zwalczaniu zakażeń wywołanych przez te bakterie.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczep *Pseudomonas aeruginosa* wyizolowany z moczu, który charakteryzował się wysoką aktywnością proteolityczną i dużą zjadliwością dla myszy. Badania prowadzono przy użyciu podłoży stałych (agar zwykły i płytka agarowa z 5% ludzką krwią konserwowaną). Stosowano technikę posiewu powierzchniowego. W pierwszym etapie badań płytka z posianym materiałem poddawano działaniu tlenu pod ciśnieniem 2, 3 i 4 ata przez 4, 8 i 16 godzin, a w drugim etapie badano właściwości fizjologiczne i biochemiczne szczepów w porównaniu z kontrolą. Kontrolę stanowiły płytki z materiałem, przechowywane w warunkach ciśnienia atmosferycznego oraz płytki poddane działaniu 1 ata O₂ przez 4, 8 i 16 godzin.

Badania przeprowadzono w tlenowej komorze ciśnieniowej skonstruowanej do doświadczeń na zwierzętach. Ogółem poddano działaniu hiperbarii tlenowej 1800 płytek. Po wyjęciu płytek z komory inkubowano je 24 godziny w temperaturze 37°C, a następnie określano cechy biochemiczne, fizjologiczne, oznaczano LD₅₀ dla myszek i oporność na antybiotyki. Zakres badań obejmował ;

- Oznaczenie barwników [16],
- Oznaczenie wzrostu i ruchu w obecności 1% TTC na podłożu Selenka w modyfikacji własnej,
- Obserwację wzrostu w temperaturze 22 i 42° wg. Hayensa [17],
- Wzrost w obecności 6% chlorku sodu [18],
- Wzrost w obecności 0,1% cetrymidu metodą Browna i Lowbury w modyfikacji Muszyńskiego [17],
- Wytwarzanie oksydazy cytochromowej metodą Kovacs [16],
- Tlenowy rozkład glukozy [18],
- Wytwarzanie dwuhydrolazy argininy wg. Phillipsa [18],
- Rozkład żelatyny,
- Wytwarzanie katalazy,
- Oznaczenie aktywności proteolitycznej wg. Schmidta i wsp.[20],
- Oznaczenie stopnia aktywności hemolizyn wg Liu [17],
- Oznaczenie LD₅₀ dla myszek metodą Reeda i Muoncha [16],
- Oznaczenie oporności na antybiotyki metodą seryjnych rozcieńczeń na podłożu Grova i Rendalla [16].

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej, określając stopień znamienności wyników na poziomie ufności $\alpha = 0,01$ i $\alpha = 0,05$ i stosując test Studenta. Zależność między cechami przedstawiono w postaci prostej równania regresji, które obliczono metodą najmniejszych kwadratów.

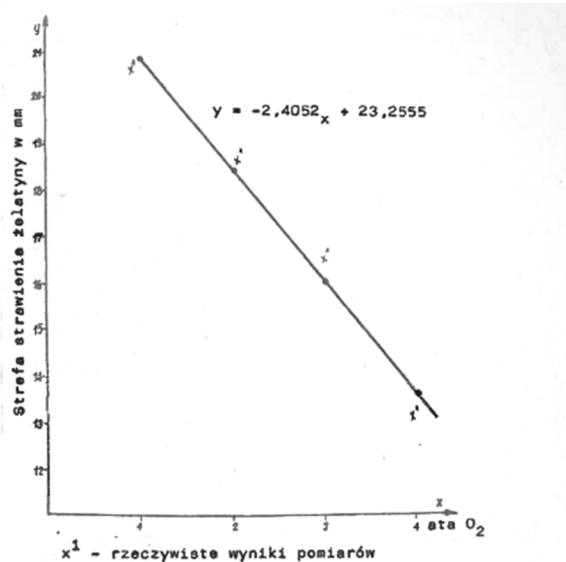
WYNIKI BADAŃ

Otrzymane wyniki badań świadczą, że niektóre z badanych cech pod wpływem hiperbarii tlenowej ulegają istotnym zmianom. Różnice między szczepem badany a kontrolnym dotyczyły wzrostu, zdolności produkowania barwników, aktywności proteolitycznej i zjadliwości dla myszy. Najczęściej zmiany te występowały po działaniu na bakterie ciśnienia tlenu o wartości 3 i 4 ata O₂ przy 16-godzinnych ekspozycjach. Stwierdzono, że ciśnienie 3 i 4 ata O₂ w czasie 16-godzinnej ekspozycji powoduje utratę zdolności wytwarzania barwników picyjaniny i fluoresceiny oraz brak hemolizowania krwinek na płytce z 5% ludzką krwią konserwowaną.

Wpływ hiperbarii tlenowej na wzrost bakterii zaznaczył się już przy 2 ata O₂ po 16-godzinnych ekspozycjach, po których nastąpił znamienny spadek liczby bakterii. Przy ciśnieniach 3 i 4 ata O₂ znamienny spadek liczby bakterii zaznaczył się już po 8-godzinnej ekspozycji. W grupie, która poddana była ciśnieniu 1 ata O₂ obserwowano znamienny wzrost liczby bakterii po ekspozycjach 4-godzinnych.

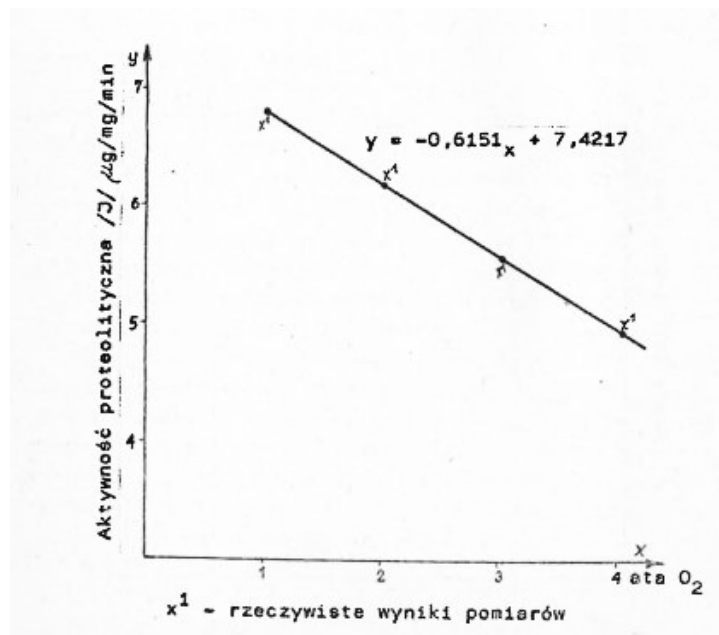
W badaniach stwierdzono również wpływ hiperbarii tlenowej na zdolność wytwarzania żelatyny przez *Pseudomonas aeruginosa*. Ciśnienie tlenu o wartości 2 ata O₂ przy 16-godzinnych ekspozycjach powodowało występowanie różnic statystycznie znamiennej między szczepem badanym, a kontrolnym. Przy ciśnieniach 3 i 4 ata O₂ różnice te występowały także po 16-godzinnych ekspozycjach. Na podstawie wyników można powiedzieć, że zwiększającym się wartościom ciśnienia tlenu towarzyszył spadek aktywności żelatyny, co przejawiało się zmniejszoną strefą strawienia żelatyny. Zauważono, że korelacja cech ma charakter prostoliniowy.

Dla otrzymanych wyników obliczono równanie regresji, a prostą dla tego równania przedstawiono na ryc. 1.



Rys. 1 Zależność aktywności *Pseudomonas aeruginosa* od ciśnienia tlenu (ekspozycje 16-godzinne).

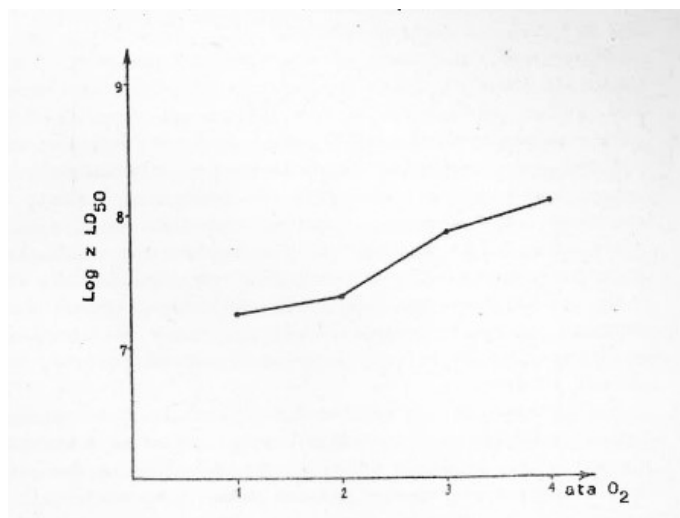
Podobne wyniki otrzymano przy badaniu wpływu hiperbarii tlenowej na aktywność proteolityczną *Pseudomonas aeruginosa*. Różnice statystycznie znamienne wystąpiły przy ciśnieniu 2, 3 i 4 ata O₂, ale również tylko po 16-godzinnych ekspozycjach. Stwierdzono, że aktywność proteolityczna malała wraz ze wzrostem ciśnienia. Prostą równania regresji przedstawiono na ryc. 2.



Rys. 2. Zależność aktywności proteolitycznej *Pseudomonas aeruginosa* od ciśnienia tlenu (ekspozycje 16-godzinne).

Ważnym etapem było sprawdzenie, czy i w jakim stopniu zmienia się zjadliwość *Pseudomonas aeruginosa*, poddanych działaniu hiperbarii tlenowej. Poprzez oznaczenie LD₅₀ dla myszy wykazano, że zjadliwość zmniejsza się przy ekspozycjach 16-godzinnych od wartości 1,8 x 10⁷ komórek dla szczepu kontrolnego do 13 x 10⁷ komórek dla szczepu poddanego ciśnieniu 4 ata O₂.

Otrzymane wyniki przedstawia ryc. 3.



Rys. 3 Wpływ ciśnienia tlenu na wartość LD *Pseudomonas aeruginosa* dla myszek (ekspozycja 16-godzinna).

Spadek zjadliwości szczepu wiąże się zapewne z obniżeniem jego aktywności proteolitycznej, ponieważ role tych enzymów w zjadliwości szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, według ostatnio prowadzonych prac, wydają się być niewątpliwe [17,21].

Należałoby rozważyć, jaki jest mechanizm działania zwiększonego ciśnienia tlenu, w wyniku którego powstały zaobserwowane zmiany. Trudno jest dyskutować na ten temat, ponieważ w dostępnym piśmiennictwie nie napotkano na próby wyjaśnienia tego mechanizmu u bakterii. Istnieje szereg teorii tłumaczących mechanizm toksycznego działania tlenu na ustrój ludzki i zwierzęcy [22]. Wydaje się, że podobnymi mechanizmami można by tłumaczyć toksyczne działanie tlenu na bakterie. Obniżenie aktywności enzymów proteolitycznych można by tłumaczyć działaniem tlenu pod ciśnieniem na grupy sulfhydrylowe, ponieważ są one szczególnie wrażliwe na działanie tlenu [22]. Tlen powoduje blokadę grup -SH enzymów, a więc jest ich inhibitorem. Większość enzymów proteolitycznych zawiera w swych centrach aktywnych grupy -SH. Być może, że w wyniku przyłączenia się inhibitora nastąpiła zmiana konformacyjna białka [23], w wyniku czego doszło do obniżenia się aktywności enzymu. Skutkiem tego byłaby zmniejszona liczba oligopeptydów przedostających się do komórki bakteryjnej, a powstających właśnie przy udziale enzymów proteolitycznych. Wydaje się, że z tego powodu może osłabnąć aktywność metaboliczna komórki, a jednocześnie zmniejszony będzie bilans energetyczny niezbędny m.in. dla wzrostu komórki.

Obniżony metabolizm komórkowy i zbyt mała ilość magazynowanej energii mogły być także powodem zahamowania wydalania barwników, ponieważ mechanizm ich wydalania na zewnątrz komórki odbywa się kosztem zużycia pewnej ilości energii.

WNIOSKI

1. Tlen w warunkach hiperbarii wykazywał bakteriostatyczne działanie na pałeczki *Pseudomonas aeruginosa in vitro*.
2. Stwierdzono, że pod wpływem hiperbarii tlenowej następuje spadek aktywności proteolitycznej *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Przy wyższych wartościach ciśnienia tlenu notowano brak wytwarzania piocyjaniny i fluoresceiny.
4. Pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, poddane działaniu tlenu w warunkach hiperbarii, wykazywały mniejszy stopień zjadliwości dla myszy.
5. Efekt działania hiperbarii tlenowej na *Pseudomonas aeruginosa in vitro* był zależny od wartości ciśnienia tlenu i czasu jego działania.

LITERATURA

1. Boerema I., Brumelkamp W., Meijne N.G. /red./; *Clinical Application of Hyperbaric Oxygen*, Elsevier Amaterdas /London/. New York 1964; 20-30;
2. Brumelkamp W.: *Hyperbaric Oxygenation*. W. Proc. Of the Second Int. Congr. Glasgow – september 1964. ED. I. Mc A. Ledingham Edinburgh and London. 1965;
3. Grogan J. B.: Effect of hyperbaric oxygen on experimental Infections. *Arch. Surg.* 1966. 92: 740-742;
4. Kayo D.: Effect of Hyperbaric Oxygen on Clostridia in vitro and in vivo: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967. 124: 360-364;
5. Morretti G., Fontanesi S., Ghittini L.: Prospottiva attuali di impiego della ossigenoterapia iperbarica. *Ann. Di Med. Nav. e Trop.* 1973. 1: 11-32;
6. Bornaide G.H.: Exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to Hyperbaric Oxygen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967. 125: 1152-1156;
7. Brown G.L., Thomson P.D., Meder T.J., Milton J. G., Browne M.E., Wells C.H.; Effect of hyperbaric oxygen upon *S. aureus*, *Ps. Aeruginosa* and *C. albicans*. *Aviot. Space. Environ. Med.* 1979. 50; 717-720;
8. Irvin T.T., Norman I.N., Suwanagul A., Smith G.:P Hyperbaric oxygen in treatment of infections by aerobic microorganisms. *Lancet.* 1966. 1: 392 – 394;
9. Irvin T.T., Suwanagul A., Norman J.N., Smith G.: The effect hyperbaric oxygen on *Staphylococcus*. *Surg. Obstet. Gynecol.* 1967. 125: 1217-1231;
10. Mc Allister T.A., Stark I.M., Norman J.N., Ross R.M.: Inhibitory effects hiperbaric oxygen on bacteria and fungi: *Lancet.* 1963. 16: 1040-1042;
11. Wiseman G.M., Viologo F.C., Roberts E., Penn I., The effect of hyperbaric oxygen upon aerobic bacteria. *Canad. Jurnal. of Microbiology.* 1966. 12: 521-529;
12. Argamaso R.V., Wiseman G.M., Peen J.; The effect of hiperbaric oxygen upon aerobic bacterie. II Studies of toxin production by *Staphylococcus aureus*. *Can. Jour. Of Microb.* 1966. Vol. 12; 863-864;
13. Van Unnik: Inhibition of toxin production in *Clostridium* in vitro hyperbaric oxygen. *Antoine van Leewenhoek J. Microbiol.* 1963. 31: 181-186;
14. Wolański W.: Badania doświadczalne nad leczeniem zakażeń paciorkowcowych oxygenacją hiperbaryczną. *Praca doktorska.* Gdynia 1978;
15. Gottlieb S.: Effect of hyperbaric oxygen on microorganisms. *Ann. Rev. Microb.* 1971. 25: 111-152;
16. Kędzia W., Koniar H.: *Diagnostyka mikrobiologiczna.* PZWL, Warszawa 1974;
17. Muszyński Z.: Właściwości biologiczne szczepów *Pseudomonas aeruginosa* o różnym stopniu zjadliwości. *Praca doktorska.* Poznań. 1971;
18. Philippa I.: Identyfikation of *pseudomonas aeruginosa* in the clinical laboratory. *J. Med. Microbiol.* 1969. 2: 9-11;
19. Burzyński H.: Metody wykrywania i identyfikacji pałeczek z grupy *Pseudomonas – Achromobactor* i grup pokrewnych. *Roczn. PZH.* 1964. 2: 171-181;
20. Schmidt P.J., Gae P.S., Dennis J., Lennette E.H.: Enzymes which inhibitors of certain viral hemagglutins produced by a *Pseudomonas* species. I. Identyfikation and purification of a protetion and purification of a proteinose and phospholipase C. *Appl. Microbiol.* 1969. 18:500-505;
21. Pajdak E., Bilińska M.: Niektóre enzymy zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe;
22. Doboszyński T.: Podstawy fizyczne oddziaływania na ustrój środowiska gazowego w hiperbarii. W: *Podstawy terapii hiperbarycznej* pod red. T. Doboszyńskiego i T. Orłowskiego. Gdynia. 1977: 27-35;
23. Kotelko K., Sedlaczek L., Lachowicz T.M.: *Biologia bakterii.* PWN. Warszawa 1979.

Małgorzata Wolańska

Laboratorium sanitarno-higieniczne Marynarki Wojennej w Gdyni

