

24324

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

BARSAKTAN BAKTERİ TRANSLOKASYONU
VE
MUKUSUN TRANSLOKASYONDAKİ ROLÜ

UZMANLIK TEZİ

Dr. İbrahim ULMAN

İzmir, 1992

T.C. YÜRÜTÜCÜ BAKANLIĞI
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	3
Giriş.....	4
Genel Bilgiler.....	7
Gereç ve Yöntem.....	15
Bulgular.....	23
Tartışma.....	36
Sonuç.....	40
Özet.....	41
Kaynaklar.....	42

ÖNSÖZ

Yenidoğan cerrahisinde mortalitenin en önemli nedenlerinden birisi enfeksiyondur. Son yıllarda yapılan araştırmalar sepsisin de dahil olduğu geniş bir hastalık grubunda sistemik enfeksiyon kaynağı olarak gastrointestinal sistemi sorumlu tutmaktadır. Ancak, barsaktaki enfeksiyon etkenlerinin barsak dışına hangi mekanizmalarla çıktığı ve sistemik enfeksiyona nasıl yol açtığı henüz bilinmemektedir. Bu çalışma, sözü edilen mekanizmaların aydınlatılması amacı ile planlanmış ve yapılmakta olan bir dizi deneysel araştırmanın, intestinal mukus ile ilgili olan bir bölümüdür. Barsak bariyerinin temel öğelerinden biri olan mukusun barsaktan bakteri translokasyonu konusunda oynadığı rol laboratuvar şartlarında incelenmiştir.

Çalışmanın gerçekteştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Pittsburgh Çocuk Hastanesi, Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mark I. Rowe'a, elektron mikroskopik çalışmaları gerçekteştiren University of Pittsburgh, Department of Neuroanatomy'den Dr. Simon Watkins, PhD'ye, ve Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkürü borç bilirim.

Dr. İbrahim ULMAN

GİRİŞ

Bebek ölüm nedenlerinin başında doğumsal anomaliler, prematürite, travma ve infeksiyon hastalıkları gelmektedir (11, 12, 56). Ülkelere göre değişmekle birlikte infeksiyon hastalıkları yurdumuz için hala en önde gelen çocuk ölüm nedenidir (21). Doğumsal anomalilerin önlenmesi yolunda henüz kayda değer sonuçlar elde edilememiştir. Oysa, özellikle yenidoğan döneminde çok yüksek mortaliteye yol açan infeksiyon faktörü, potansiyel olarak önlenebilir özelliktedir. Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde ölüme yol açan infeksiyonlar arasında perinatal infeksiyonlar (doğumsal pnömoni, nekrotizan enterokolit ve koryoamnionit) % 38, diğer pnömoniler % 14, sepsis % 14, ve meninjit % 8'lik paya sahiptir (31). Son zamanlarda giderek büyüyen bir sorun da, yenidoğan yoğun bakım ünitelerindeki hastaları etkileyen hastane infeksiyonlarıdır. Bu hastaların % 25'inde hastane infeksiyonlarının geliştiği ve en az 1/3'ünün kaybedildiği bildirilmektedir (25).

Son yıllarda ortaya atılan bir görüşe göre, cerrahi infeksiyonların önemli bir bölümü gastrointestinal kanaldan kaynaklanmaktadır. Bakteriler, bakteriyel translokasyon adı verilen bir işlem ile barsak bariyerini geçerek dolaşıma ve diğer organlara yayılmakta, sonuçta da sistemik infeksiyona yol açmaktadır. Bu infeksiyonlar arasında; travma ve yanık sonrası görülen sepsis, postoperatif sistemik infeksiyonlar, immunosupresif tedavi gören, malnutrisyonlu, prematür ve benzeri, sistemik direnci düşük hastalarda yapılan cerrahi girişimler sonrası karşılaşılan ve sepsise kadar varabilen infeksiyonlar sayılabilir. Multipl organ yetmezliğinin her zaman bir septik odakta kaynaklanmadığı, barsağın bakteriler için bir rezervuar olduğu ve

bu bakterilerin translokasyonu ile septik tablonun başladığı belirtilmiştir (46). Ayrıca, hayatta kalmayı başarabilenlerin hastalığı olarak nitelendirilen (32) ve bu nedenle, görülme sıklığı ve önemi neonatalojideki gelişmelerle paralel olarak her geçen gün daha da artan nekrotizan enterokolitin etiolojisinde, prematürelere ve yenidoğanlarda zaten matüritesini tamamlamamış olan intestinal bariyerin, barsakta yeni kolonize olan bakterilerce kolaylıkla aşılıp barsak duvarı invazyonu ve ardından peritonit gelişmesi teorisi ileri sürülmektedir (44). Antimikrobik tedavideki gelişmelere rağmen, cerrahi sonrası sepsisin de dahil olduğu, bakteriyeminin mortalitesi hala %25-50 arasında seyretmektedir (10). Gram-pozitif organizmalarla oluşan sepsisin sık olarak kateter kontaminasyonu sonucu geliştiği artık bilinmektedir (15). Ancak, yine de birçok gram-pozitif bakteri ve mantar sepsisinin nedeni bilinmemektedir. Gram-negatif sepsisin, hastanın kendi barsak florasından kaynaklanabileceğini gösteren çalışmalar konu ile ilgili çok sayıda klinik ve laboratuvar araştırmasını stimüle etmiştir (52). Çalışmaların temel dayanak noktası, barsak lumeninde bulunduğu bilinen bakterilerin, mezenterik lenf nodları başta olmak üzere, barsak dışı organ kültürlerinde üretilmesidir. Barsak lumenindeki bakterilerin barsak dışına geçmesi, hasara uğramış barsak duvarından olduğu gibi, normal barsak duvarından da olabilmektedir. Translokasyona yol açan etkenlerle ilgili çok sayıda çalışma yapılmış ve yapılmaktadır. Bunlar arasında travma, yanık, hemorajik şok, obstrüksiyon, basit laparotomi, total parenteral beslenme, ve barsak florasının değişmesi, en çok bilinenler olup standart araştırma modelleri oluşturulmuştur (5, 6, 13, 16, 19, 20, 38, 57). Ancak bu geçişin hangi mekanizma ile, hücre düzeyindeki hangi yollarla olduğu hala bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı, translokasyonun ilk basamağı olan, bakterilerin lumenden lamina propriaya kadar ilerlemesindeki mekanizmalardan bazılarını açıklığa kavuşturmaktır. Bu amaçla, barsak bariyerinin ilk ayağı olan mukusun bakteriyel translokasyondaki rolü Ussing sisteminin kullanıldığı in vitro yöntemle incelenmiştir. Bu sistem ilk olarak 1948 yılında intestinal membranlardan iyon transportunu çalışmak amacıyla kullanılmış, daha sonra yapılan modifikasyonlarla kullanım alanı genişletilmiş ve barsak fizyolojisi çalışmaları için çok değerli bir araç olarak yerini almıştır (22, 53). Bakteriyel translokasyonda rol oynayan mekanizmaların araştırılmasında çok yararlı olabileceği Mark I. Rowe tarafından farkedilerek bu alanda kullanılmaya başlanmıştır.

Çalışmamızda mukusun miktarı ve/veya kalitesi spesifik ajanlarla değerlendirilmek yoluyla bakterilerin intakt ileum mukozasından transepitelial geçişleri ve ileum preparatındaki morfolojik değerlikler araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Barsak Bariyeri

Enterik bakterilerin organizmaya yayılmalarını önleyen çok sayıdaki savunma mekanizmasının tümü, genel olarak barsak bariyeri adı ile anılır (28, 30). Bu bariyerin bir fizyolojik, bir de immunolojik ögesi vardır. Prematür yenidoğanlar, barsak bariyeri gelişmemiş olduğu için özellikle riskli gruba girerler. Barsak bariyerinin fizyolojik komponenti savunma sisteminin ilk basamağını oluşturur. Barsaktaki bakteri sayısının birçok faktör tarafından kontrol altında tutulduğu düşünülmektedir. Örneğin mide asidi ve pepsin yutulan bazı bakterileri yok etmektedir, ancak bazal asid salgısının erişkin düzeyine dördüncü haftada ulaştığı bildirilmiştir (29). En düşük düzeyler prematürelere bulunmuştur. Pankreasdan salgılanan proteaz ve lipazlar bakteriler üzerine etkilidir. Ancak yaşamın ilk yılında pankreasın relatif yetmezliği bebeklerde bu mekanizmayı da devre dışı bırakır (34, 45). Barsak enzimleri bakterilerin üremesini inhibe etmektedir. Ancak yenidoğan barsağında enterokinaz aktivitesi çocuklardakinin % 17'si kadardır. Peristaltizm, mikroorganizmaları onların üreme hızından daha süratli bir şekilde distale ilerleterek dışa atılmalarına yardım eder. Ancak düzenli barsak hareketleri intrauterin yaşamın sonuna doğru ortaya çıkar ve doğumdan sonraki sekizinci aya kadar tam olarak gelişmeyebilir. Bu örnekler, prematüre ve yenidoğanlarda barsak bakteri sayısı kontrolünün yeterli olmadığına işaret etmektedir.

Savunma sisteminin ikinci basamağında bakterilerin mukozaya penetrasyonunu önleyen mekanizmaların olduğu düşünülmektedir. Penetre

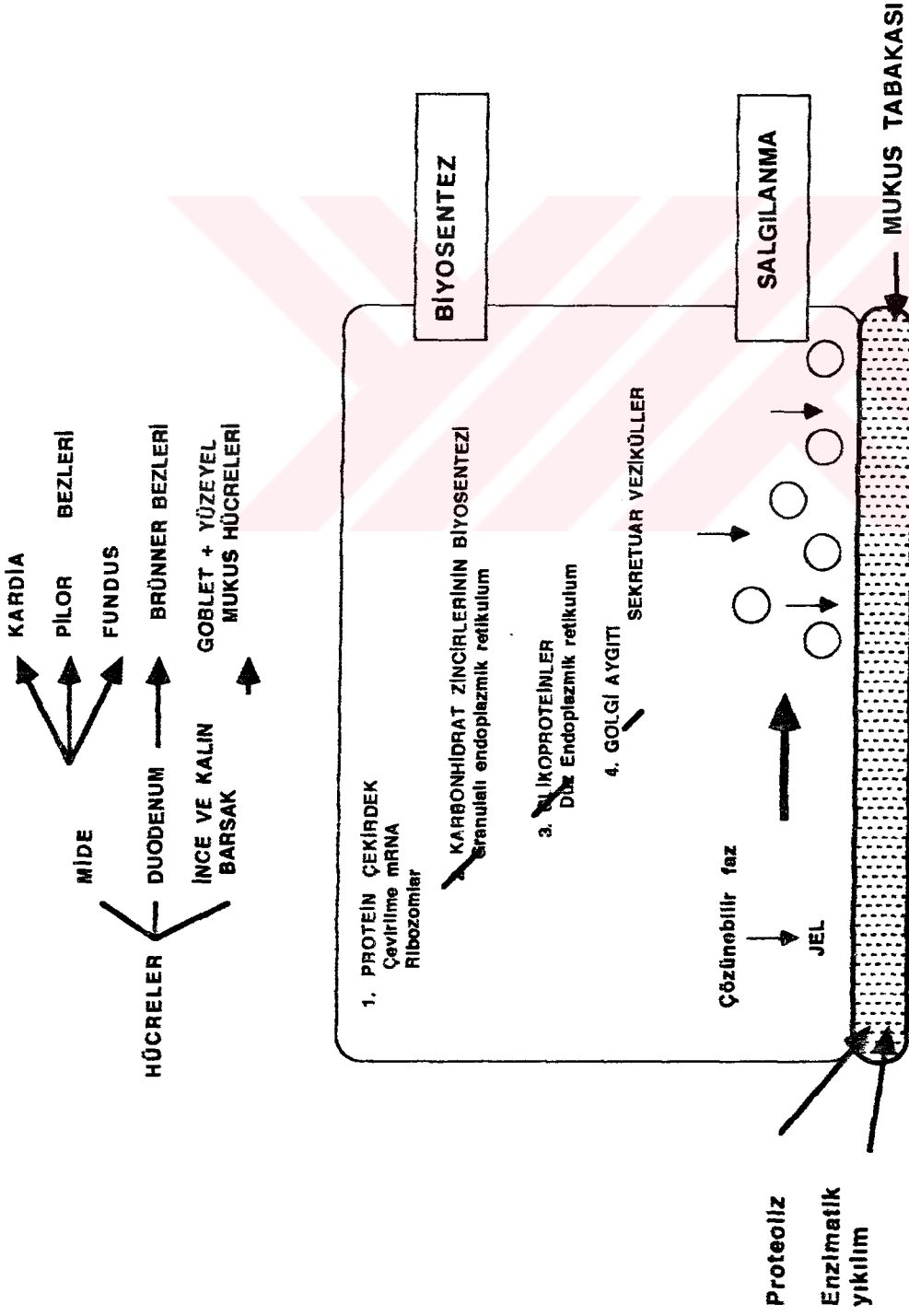
olabilmek için bakteriler öncelikle mukozaya tutunmak zorundadırlar (bakteriyel adhezyon). Mukus sekresyonu, bakterilerle mukoza hücreleri arasındaki kontağı önleyen mekanizmalardan biri olarak ileri sürülmektedir (40, 49). Bunun dışında, mukoza hücrelerinin bizzat kendileri ve aralarındaki sıkı bağların da mikroorganizmalara karşı bir engel olduğu düşünülmektedir. Bunlara rağmen bakteri ve mantarlar mukoza hücrelerini invaze ederek submukozaya geçebilirler (2).

Mukozadaki fırçamsı uzantılarda yerleşen bakteri kolonizasyonunun da patojen bakterilere karşı bir engel olabileceği düşünülmektedir. Normal bebeklerde barsak florası bifidobakterler ve anaeroblardan zengindir. Bu organizmalar, patojen bakterilerin üreme ve adhezyonunu engelleyen bir kolonizasyon-rezistansı oluşturmaktadırlar.

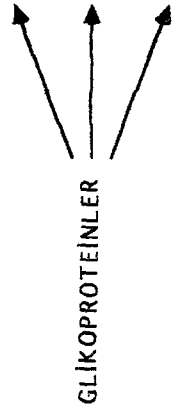
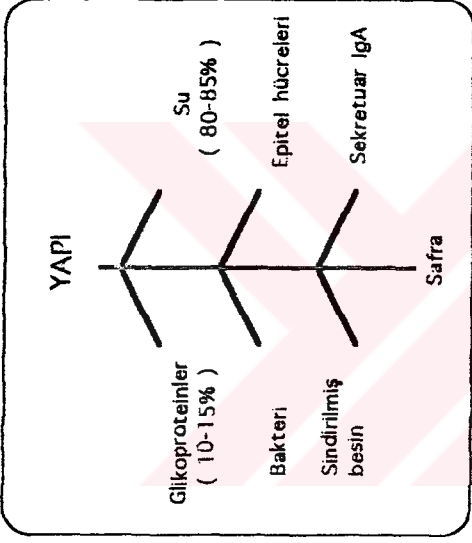
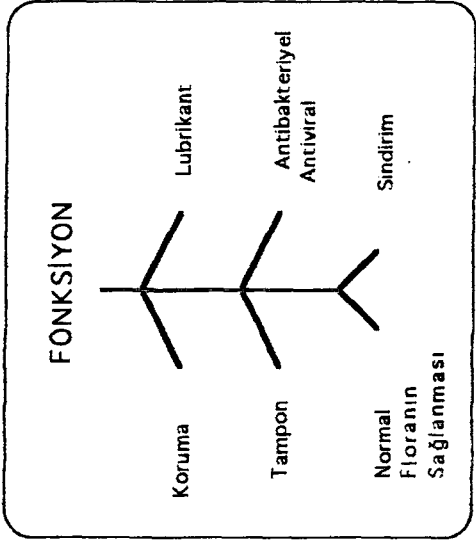
Barsak bariyerinin immun komponenti, sekretuar immunglobulin-A (IgA) ve Barsak Lenfoid Sisteminin (GALT) diğer elemanlarından oluşur. Bu, bölgesel immunité için özelleşmiş immun hücreler ve limfoid yapılardan oluşan bir kompleks sistemdir. GALT'nin bir görevi IgA'nın üretilip salgılanmasıdır. Sekretuar IgA (SIgA), bakterilerin fagositik öldürme için opsonizasyonunda rol almaz, ancak bakterileri sararak, barsak mukoza hücrelerine adhezyonlarını önlediği düşünülmektedir. Anne sütü almayan yenidoğanlarda, ilk hafta içinde yok denecek kadar az IgA mevcuttur (3, 27, 47). Tüm bu sayılan nedenler yüzünden, prematürelde ve bir dereceye kadar da yenidoğanlarda barsak bariyeri, bakteri sayısını sınırlama ve barsak dışına translokasyonlarını önleme yönünden immatür sayılabilir.

Gastrointestinal Mukus

Mukus gastrointestinal kanalın mukoza yüzeylerini kaplayan; su, elektrolitler, glikoproteinler, değişik makromoleküller, mikroorganizmalar ve dökülmüş epitel hücrelerinden oluşan, visköz, kaygan bir jeldir. Mukusun bütünlüğünü ve epitel hücrelerini koruyucu özelliğini, müsin adı verilen jel oluşturucu glikoproteinler sağlar. Müsinler özelleşmiş mukoza hücreleri tarafından sentez edilip salgılanır. Kökenlerini aynı endodermal ana hücreden alan bu özelleşmiş hücreler, gastrointestinal sistemde buldukları yerlere göre farklılıklar gösterirler ve değişik isimler alırlar (Şekil 1). Müsinin ağırlık olarak % 50'den fazlası karbonhidratlardan oluşur. Hücre içinde ayrı ayrı sentez edilen oligosakkaridler ve peptidler, serin ve treonin uçlarından bağlanarak glikoprotein yapıyı ortaya çıkarırlar. Golgi aygıtında veziküller içinde paketlenerek salgılanmaya hazır biçimde hücre apeksine yerleşirler. Müsinler nötr oldukları gibi, siyalik asid veya ester sulfat terminalleri de içerebilirler. Bu özellikler, bakteriler de dahil olmak üzere gastrointestinal sistemle ilişkiye giren birçok yabancı madde için reseptör fonksiyonunun yerine getirilmesinde önem taşımaktadır. Müsin salgılayan hücrelerin gastrointestinal sistemdeki dağılımları, morfolojileri, salgıladıkları müsinlerin glikoprotein bileşimleri ve düzenlenmeleri önemli farklılıklar gösterir (Şekil 2). Mukusun görevleri arasında mukazayı koruma, kayganlık sağlama, pH'nın ayarlanmasına yardımcı olma, sindirime katkıda bulunma ve normal barsak florasının devamlılığının sağlanması sayılabilir.



Şekil 1. Mukus salgılayan hücreler ve mukusun sentez ve sekresyonundaki basamaklar.



I Nötr müsinler

II Siyalik asid içeren müsinler

III Ester sülfat içeren müsinler

Şekil 2. Mukusun fonksiyonları ve yapısı.

Normal Barsak Florasının Gelişimi

İntrauterin dönemde, uzun süren bir membran rüptürü olmamışsa, fetus hiçbir mikroorganizma taşımaz. Amniotik membran ve amnion sıvısında bakteri kolonizasyonunu önleyen antibakteriyel peptidler bulunur. Yenidoğanın mikroorganizmalarla ilk karşılaşması doğum kanalından geçiş sırasında olur ve barsak kolonizasyonu bu anda başlar. Normal barsak flora gelişiminin büyük ölçüde beslenme şekline ve gestasyonel yaşa bağlı olduğu tahmin edilmektedir. Terminde doğan ve annesütü ile beslenen bebeklerde ilk kolonize olan bakteriler genellikle E. coli ve Lactobacillus gibi fakültatif anaeroblardır. Barsakta redoks potansiyelinin düşmesiyle birlikte bunları çok sayıda bifidobakter izler (9). Bu bakteriler, Klebsiella, Enterobakter ve Serratia sp. gibi diğer enterik bakterilerin kolonizasyonunu önler. Preterm ve mama ile beslenen bebeklerde kolonizasyon koliformlarla olur ve bifidobakterler çok yavaş gelişir. Anaeroblar normal barsak florasının temel ögesi olup önemli fizyolojik görevlere sahiptirler. Anaerobların patojenik aerob bakteri kolonizasyonunun önlenmesinde büyük katkıları olduğu 1971'de Van der Waaij ve ark. tarafından gösterilmiş ve bu savunma mekanizması aynı grup tarafından kolonizasyon rezistansı olarak adlandırılmıştır (54). Bir kez normal flora geliştikten sonra, diğer mikroorganizmaların ekolojik bir boşluk bulup gastrointestinal sisteme yerleşmeleri oldukça zordur.

Bakteriyel Translokasyon

Bakteriyel translokasyon ilk kez 1979 yılında Berg ve Garlington tarafından, canlı enterik bakterilerin mukoza epitelinden, mezenterik limf düğümlerine ve diğer uzak organlara geçmesi şeklinde tanımlanmıştır (8).

Yanıklı veya travmalı hastalarda gelişen gram-negatif sepsise bakteriyel translokasyonun neden olduğu ileri sürülmektedir (17). Ayrıca, barsaktan kaynaklanan sepsisin, multipl organ yetmezliğinde morbiditeyi arttıran önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (14). Yapılan çok sayıdaki çalışma tanımlamayı biraz daha netleştirerek translokasyonu, normal, hasarsız barsak mukozasından geçiş olarak nitelemiştir (60). Bu geçişin normal şartlarda, bakterinin lamina propria fagositoz yolu ile mezenterik limf düğümlerine taşınarak yok edilmesi ile sonuçlandığı düşünülmektedir. Ancak organizmanın direncinin düştüğü ve böylece bu fagositik öldürme işleminin yapılamadığı durumlarda, barsak dışına çıkmış halde tekrar aktif hale gelen bakteri, enfeksiyona neden olur. Bu şekilde, hayvan deneyleri ile translokasyonu arttırdığı gösterilmiş olan çok sayıda faktör bulunmaktadır (Tablo 1).

Translokasyonla geçen barsak bakterileri, normal barsak florasındaki bakteri türlerinin sayısına oranla çok azdır. Nedeni bilinmemekle birlikte mezenterik limf düğümlerinden alınan kültürlerde anaeroblar, aeroblara oranla çok daha az üretilmektedirler. En çok translokasyona uğrayan barsak bakterileri arasında *E. coli*, *K. pneumoniae*, diğer enterobakterler, enterokoklar, diğer streptokoklar, laktobasiller ve stafilokoklar sayılabilir (51). Bakteriler dışında, mantarların ve cansız partiküllerin de barsak mukozasını geçtiği gösterilmiştir (60). Bu yüzden translokasyonun mukoza epitel hücreleri tarafından gerçekleştirilen aktif bir yutma işlemi (endositoz) içerdiği, bunu hücrenin diğer tarafından atılma ve mezenterik limf düğümlerine ulaştırılmanın izlediği, bugün için en çok kabul gören hipotez sayılabilir.

İyonizan radyasyon.....	26
Endotoksin.....	18
Travma.....	19
Beslenme bozukluğu.....	1, 35
Periton inflamasyonu.....	18
Böbrek yetmezliği.....	24
Mikroflora değişiklikleri.....	16, 57
Barsak mukoza değişiklikleri.....	42
Tıkanma.....	20
Hemorajik şok.....	6
Hüresel immunitte bozuklukları.....	37, 43
Sekretuar IgA eksikliği.....	4
Fagositoz defektleri.....	43, 58
Total parenteral beslenme.....	5

Tablo 1. Bakteriyel translokasyon etiolojisinde etkili olan faktörler.

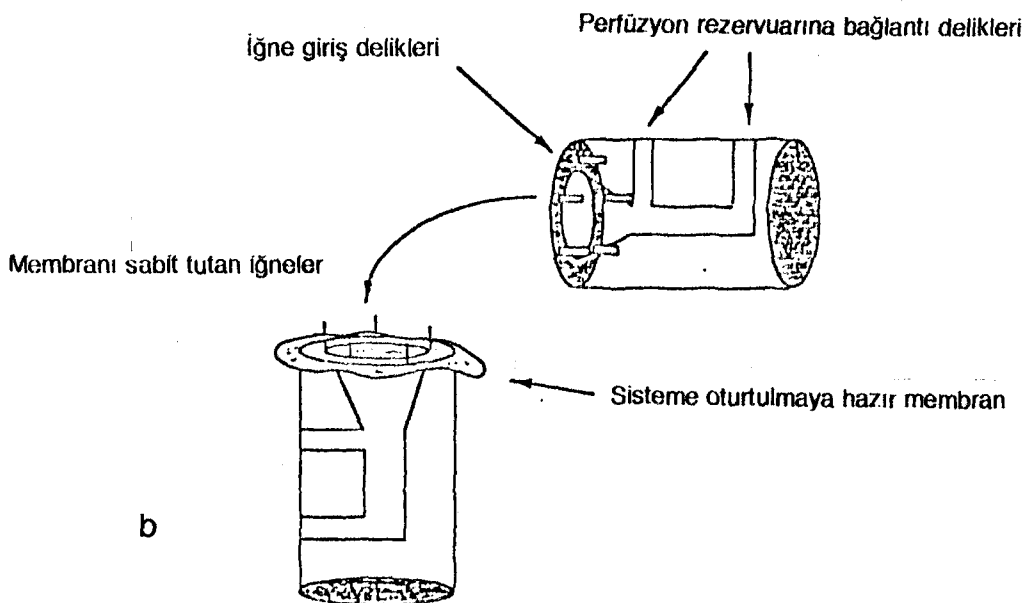
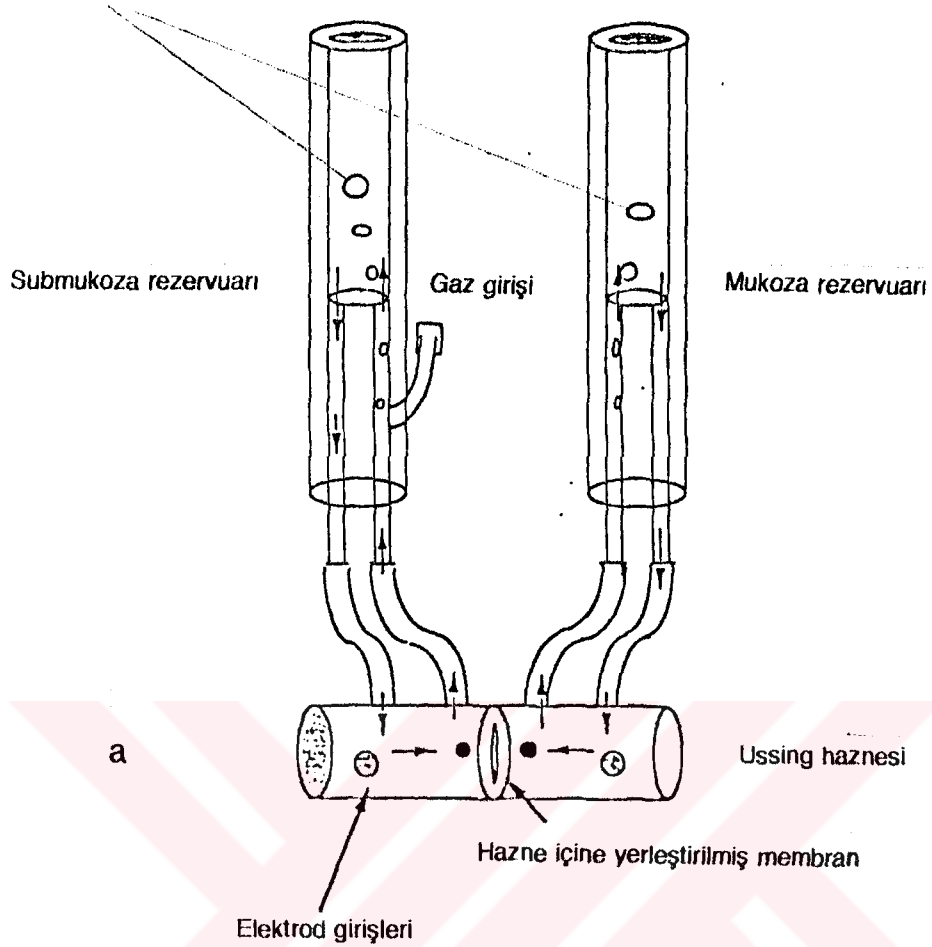
GEREÇ VE YÖNTEM

Ussing Sistemi

İlk kez 1948 yılında Hans Ussing tarafından izole hayvan membranlarında iyon transportunu elektrofizyolojik olarak araştırmak amacıyla geliştirilmiş bir in vitro sistemdir (53). Sistem sonradan, aktif ve pasif iyon akımını, ayrıca çeşitli büyük moleküllerin membrandan geçişini çalışabilmek amacıyla modifikasyonlara uğramıştır. Ussing sistemi kısa süre önce, barsak mukozasından hazırlanan membranlardan bakteri translokasyonunu araştırma amacıyla Simmons ve çalışma grubu tarafından kullanılmaya başlanmıştır (yayınlanmamış bilgi).

Ussing sistemi; Ussing haznesi, perfüzyon rezervuarları ve voltaj/akım klemp ünitesinden oluşur (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Ussing haznesi tam ortasından ikiye ayrılabilen, içi boş akrilik bir silindirdir (şekil 3, a ve b). Çalışılacak doku parçası yarım silindirlere birisinin kesit yüzeyine çepeçevre sıralanmış iğneler yardımı ile yerleştirilir ve silindirin içindeki boşluk bu şekilde membranla ikiye bölünmüş olur. Membranın kapattığı silindir iç boşluğunun kesit yüzey alanı $1,14 \text{ cm}^2$ dir. İki yarım silindir kapatılarak sisteme yerleştirilir ve iki uçtan sıkıştırılarak aradan su sızmayacak hale getirilir. Her iki yarım silindir kendilerine ait perfüzyon rezervuarı ve elektrodlarına bağlanır. Perfüzyon sıvısı rezervuarın üst bölümündeki açıklıktan doldurulur. Bu açıklık deneyler sırasında örnek almak ve eklemeler yapmak için de kullanılır. Perfüzyon sıvısının hazne içinde devamlı sirkülasyonu, rezervuarın alt kısmındaki gaz girişi sayesinde mümkün olmaktadır. Buradan verilen % 95 O_2 , %5 CO_2 karışımı gaz,

de oksijenasyonu ve sirkülasyonu sağlayan hava kabarcıkları



Şekil 3. a.) Ussing sisteminde perfüzyon rezervuarları ve Ussing haznesini gösteren şematik çizim, b.) Çalışılacak membranın hazneye yerleştirilmesi.

perfüzyon sıvısının sistem içinde sirkülasyonunu sağladığı gibi, oksijenasyonu için de gerekli oksijenin verilmesine yarar. Ayrıca, karışımdaki O₂ yüzdesini değiştirmek suretiyle perfüzyon sıvısının pH'sı da istenilen düzeye ayarlanabilir. Sıvının istenilen ısıda sabit tutulması, her iki rezervuarı saran ortak bir su ceketini ile mümkün olur.

Elektrofizyolojik monitoring, Ussing haznesi içindeki sıvıya agar jel köprüleri ile bağlanan iki çift elektrod aracılığı ile gerçekleştirilir. Elektrodların diğer uçları voltaj/akım klempine bağlanır (Model DVC 1000, WPI). Voltaja duyarlı olan bu kalomel elektrodlar doku yerleştirildikten hemen sonra, dokunun iki tarafındaki uygun yerlere bağlanır ve doku tarafından spontan olarak geliştirilen voltaj gradyanını (Potansiyel farkı-PD) sürekli olarak monitörize eder. Akımın geçtiği Ag-AgCl elektrodları da dokudan 2 cm uzaklıkta simetrik olarak yerleştirilir ve akım klempisi tarafından üretilen 50 mikroamperlik sabit akım, bir saniyelik pulslar halinde dokudan intermitan olarak (30 saniyede bir) geçirilir. Bir kaydedici (Kipp and Zonen, Rotterdam, The Netherlands) potansiyel farkını (PD) zamanın fonksiyonu olarak sürekli kaydeder. Dokuya aralıklı olarak verilen akımın PD'de yaptığı defleksiyonlar diken (spike) şeklinde kaydedilir. Bu dikenlerin yüksekliği dokunun direnci (rezistans) ile ilgilidir ve Ohm kanunu ($V=I \times R$; V =voltaj, I =akım, R =rezistans) ile matematiksel olarak direnç hesaplanır ve $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ cinsinden ifade edilir.

Elektrodların fonksiyonunu test etmek ve gaz karışımını ayarlamak amacıyla, doku yerleştirilmeden önce sisteme Hank's Dengeli Elektrolit Solüsyonu (HBSS) (GIBCO, Grand Island, NY) doldurularak sirküle edilir. Bu sıvı daha sonra toplanır, santrifüje edilir (3000 devir/dak, 15 dak süreyle) ve

sistemin steril olduğunu belirlemek için kültür yapılır. Bunun ardından rezervuarlar membran perfüzyonu için kullanılacak olan Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO) + 20 mM Glutamine (Sigma, St. Louis, MO) karışımının 15 ml'si ile doldurulur. Sıvı sistemde sirküle edilirken voltaj klipi membran yerleştirilmeden önce 0 potansiyel farkına ayarlanarak kalibre edilir. Akım elektrodları arasındaki sıvı rezistansı da 0'a ayarlanır. Artık sistem dokunun interpozisyonu için hazır hale gelmiştir.

Deney Hayvanları

Çalışmada 250-350 g ağırlığında, erkek SPF (specific pathogen free) Sprague Dawley sıçanlar (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, Indiana) kullanıldı. Sıçanlar Pittsburgh Çocuk Hastanesi Deney Hayvanı Bakım Merkezi'nde plastik kafesler içinde korundu. Tüm deneklere yapay olarak, 12 saatlik gece/gündüz ışık siklusu sağlandı. Standart sıçan yemi (Purina Mills Inc., St. Louis, MO) ve çeşme suyu ile ad libitum beslenme uygulandı. Denekler deney öncesi en az beş gün bu şartlarda tutuldu. Tüm girişimler için Hayvan Bakım Komitesinden onay alındı.

Membranın Hazırlanması

Ussing sisteminde çalışılacak membranlar üç deney grubundaki sıçanlardan alındı: 1) pilokarpin, 2) nöraminidaz, ve 3) kontrol grubu. Pilokarpin grubu membranlar, daha önceden in vivo pilokarpin enjekte edilmiş sıçanlardan elde edildi. Nöraminidaz ve kontrol grubu membranları ise önceden hiçbir tedavi uygulanmamış sıçanlardan alındı. Nöraminidaz, membranlara in vitro olarak uygulandı.

Deney günü, pilokarpin grubundaki hayvanlara laparotomiden 45 dak. önce pilokarpin (160 mg/kg i.p.) enjeksiyonu yapıldı. Bu doz mevcut intraselüler mukusun en az % 60'ını 30-45 dakikada boşalttığı bilinen bir dozdur (50). Tüm sıçanlara anestezi indüksiyonu eter inhalasyonu ile yapıldıktan sonra, intraperitoneal pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) ile anesteziye devam edildi. Orta hattan yapılan laparotomi ile terminal ileumda, ileoçekal valvden 10 cm uzaklıkta 5-6 cm.lik bir segment rezeke edildi. Eksize edilen barsak, mezenterik kenarı boyunca kesilerek açıldı ve soğuk HBSS solüsyonunda yıkanarak barsak içeriği temizlendi. Bundan sonra disseksiyon mikroskopu altında, seromuskuler tabaka, submukoza/mukoza tabakasından ayrıldı. Peyer plağı içermeyen mukoza/submukoza tabakası Ussing haznesine daha önce anlatıldığı şekilde yerleştirildi. İki yarım silindir birleştirildikten sonra sıkıştırıldı ve hemen perfüzyona başlandı. Membranın mukoza tarafını perfüze eden rezervuara mukoza rezervuarı (MR), submukoza tarafını perfüze eden rezervuara ise submukoza rezervuarı (SR) adı verildi. Membranla veya perfüzyon sıvısı ile direk ilişkisi olan tüm parçalar önceden gaz veya otoklavla sterilize edildi. Nöraminidaz grubunda, membran yerleştirilip perfüzyona başlandıktan 10 dak. sonra MR'na 5 ünite Nöraminidaz Tip V (Sigma, St. Louis, MO) eklendi. Clostridium perfringens'den elde edilmiş olan Tip V nöraminidaz'ın bir ünitesi, NAN-laktoz veya sığır submaksiller mukusu bulunan ortamda, pH 5,0 ve 37⁰C'da, bir dakikada 1,0 mmol N-acetylneuraminic acid açığa çıkarmaktadır.

Bakterinin Hazırlanması

In vitro translokasyon için, in vivo olarak translokasyona uğradığı daha önceden bilinen (38), streptomisine dirençli bir suş olan Escherichia coli C-25 kullanıldı. Bu suş Dr. Deitch ve Berg (Louisiana State University Medical Center, Shreveport, LA) tarafından sağlandı. Deney günü kültür santrifüj edilerek çöken bakteriler HBSS ile iki kez yıkandı. HBSS içinde en son 5×10^9 koloni/ml konsantrasyonu elde edilecek şekilde bir bakteri suspansiyonu hazırlandı. Mukoza rezervuarlarına, membran perfüzyonuna başladıktan 15 dakika sonra (nöraminidaz eklendikten 5 dakika sonra), MR içinde 10^7 - 10^8 koloni/ml olacak şekilde E. coli C-25 inoküle edildi. Deneyin başında (t=0) ve sonunda (t=3 saat) gerçek konsantrasyonu belirlemek için mukoza rezervuarlarından kültür alındı. Submukoza rezervuarlarından 0., 1., 2., ve 3. saatlerde seri kültür örnekleri alındı. Deneyin sonunda SR'da kalan sıvı toplanıp santrifüj edildi. Dipte kalan 0,5 ml'den kantitatif kültür yapıldı ve 3. saat toplam örneği olarak değerlendirmeye alındı. 100 ml'lik örnekler MacConkey agar besiyerine ekildi. Streptomisin rezistansı, 100 mg/L streptomisin sulfat içeren laktosuz MacConkey agar bazında üreme ile kontrol edildi. Bakteriyel translokasyon, 1., 2., veya 3. saatlerde alınan SR kültürlerinde E. coli C-25 üremesi ile belirlendi. Ayrıca, bu kültürler negatif ise ve 3. saat toplam örneğinde 10 koloni/ml'den daha çok üreme olursa bu da translokasyon kanıtı olarak kabul edildi. Submukoza kültür analizlerinin geçerli sayılabilmesi için sistemin membran yerleştirilmeden önce alınan kültürlerle steril olduğunun belirlenmesi ve ayrıca, mukoza rezervuarına bakteri inoküle edildiği sırada (t=0), submukoza rezervuarının steril olduğunun kültürle gösterilmesi şartı arandı.

Mukusun Ölçümü

Bakteri varlığında sürdürülen 3 saatlik perfüzyon sonunda Ussing haznesi açılarak membranın mukoza yüzeyi ortaya koyuldu. Deney sırasında biriken mukus, disseksiyon mikroskopu altında sıyırılmak suretiyle toplandı, önceden ağırlıkları alınmış petri kutularına koyularak tartıldı.

Mikroanatomi Çalışmaları

Histolojik inceleme için rasgele seçilen membranlar Ussing haznesi içinde in situ olarak fikse edildi. Tüm fiksasyonlar fosfat tampon çözeltisi içindeki %2,5'lük glutaraldehid ile, 4⁰C'da ve 1 saat süreyle yapıldı. Fiksasyon sonrası membranlar üç kez Sabatini çözeltisi (%6,8'lik sukroz içeren fosfat tampon çözeltisi) ile yıkandı ve küçük (1 mm³) küpler halinde kesildi. Bu parçalar %1'lik osmium tetroxide ile 1 saat boyunca tekrar fikse edildi ve yine üç kez Sabatini çözeltisi ile yıkandı. Kademeli alkol serisinden (%30, %50, %75, %90, %100: her biri 15 dak.) geçirilen örnekler 15 dak. propylene oxide ile, 1 saat 1/1 Epon-propylene oxide karışımı ile ve üç kez (3 saat, 3 saat, gece boyunca) saf epon ile muamele edildi. Örnekler Ladd gömme plaklarına longitudinal olarak gömüldü. Polimerizasyon 64⁰C'da gece boyunca yapıldı. Gömme işleminden sonra değişik bölgelerden ultra-ince (60 nm) kesitler alındı, ızgaralara yerleştirildi, %2'lik uranyl acetate ile 7 dak. ve %1 lead citrate ile 3 dak. boyama gerçekleştirildi. Tüm elektron mikroskopik incelemeler JEOL 100CX ile yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında, ortalama potansiyel fark ve rezistans değerleri, translokasyon insidensi ve submukoza kültürlerinin kantitatif sayımları t-testi ve ki-kare testi kullanılarak karşılaştırıldı. Analiz ncesi bakteri sayım değerlerinin logaritmik transformasyonu yapıldı (\log_{10} koloni/ml). Anlamlı istatistiksel farklılık için % 95'lik güven aralığı bulunması şartı arandı.



BULGULAR

Elektrofizyolojik Parametreler

Ussing sistemine yerleştirilen sıçan ileum mukoza/submukoza preparasyon-larında potansiyel fark (PD) ve standard 50 mA'lik transmembran akımına karşı oluşan rezistans (R) zamanın fonksiyonu olarak kaydedildi. Sonuçlar Şekil 4 ve 5'de gösterilmiştir. Deney süresi boyunca PD ve R giderek azalan bir eğri çizmiştir. Bu model için karakteristik olan bu düşüş membranda, deney süresi içinde kabul edilebilir sınırlarda olan canlılık kaybını yansıtmaktadır (22). Gruplar arasında, hiçbir zaman aralığında PD ve R yönünden istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Yani pilokarpin ve nöraminidazın elektrofizyolojik parametreler üzerine herhangi bir etkisi görülmedi.

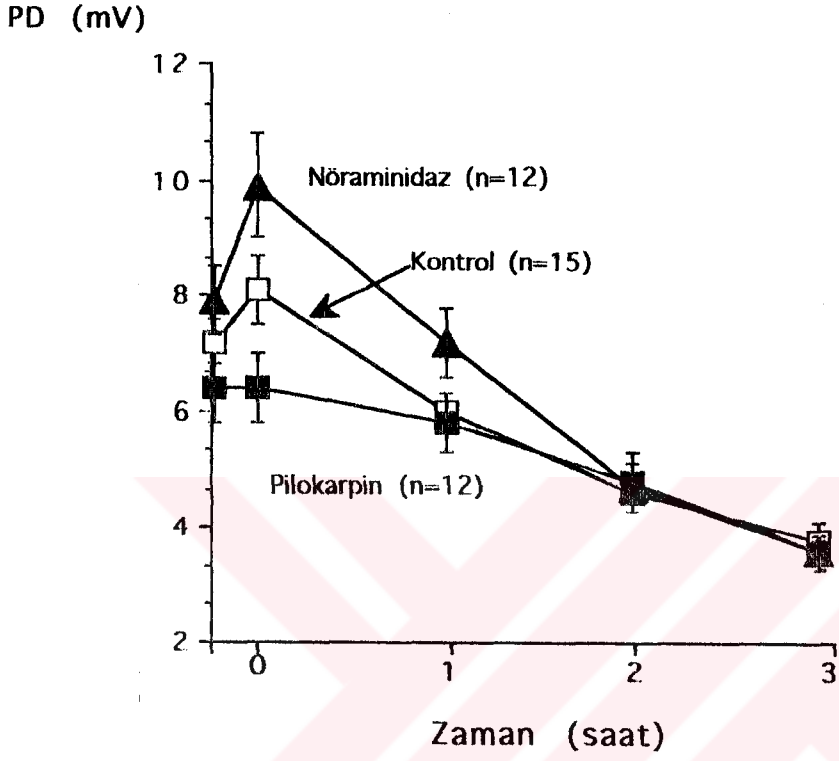
Mukus Salęısı

Deney süresince membranın mukoza yüzünde toplanan mukus miktarı hem pilokarpin hem de nöraminidaz grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak düşüş bulundu ($p<0,05$) (Şekil 6) . Pilokarpin grubundaki membranların mukoza yüzünde biriken mukus miktarı ile, nöraminidaz ile işlem görmüş membranların mukoza yüzünde biriken mukus miktarı arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

İleum Membranından Bakteriyel Translokasyon

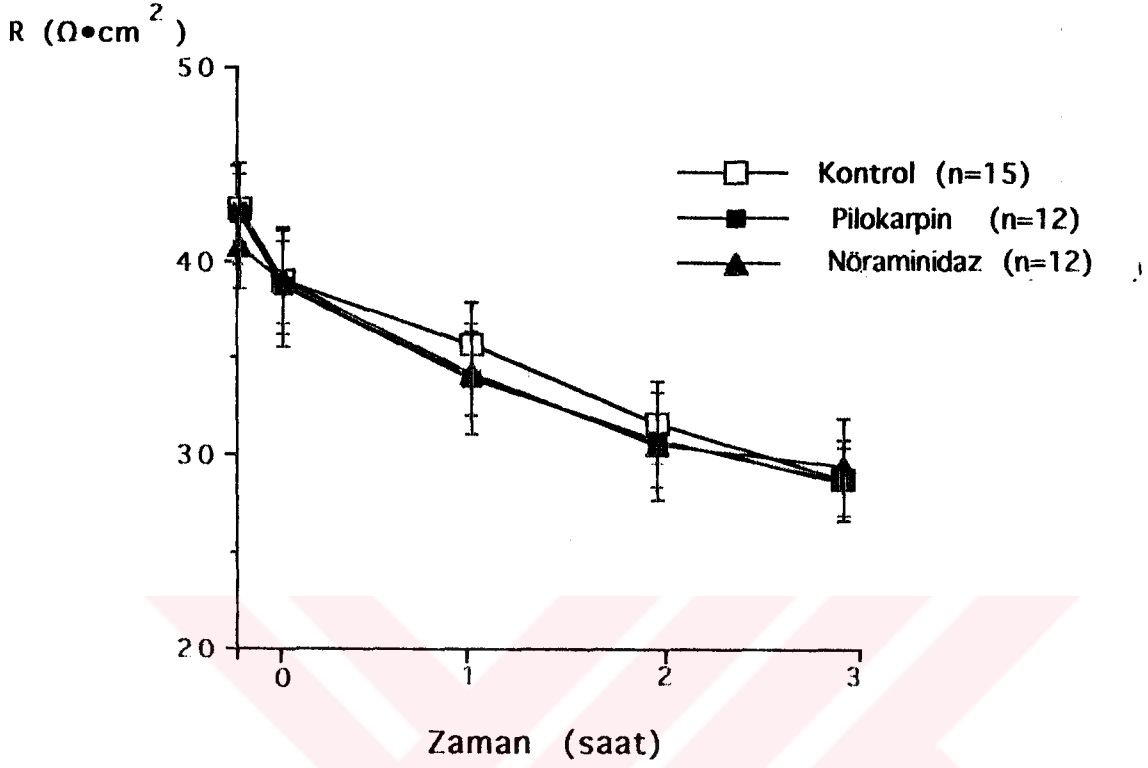
Bakteriyel translokasyon insidensi, bir saatlik aralarla submukoza rezervuarından alınan kültür örneklerinde E. coli C-25'in üretilmesi ile dokümante edildi (Tablo 2). Pilokarpin ileum membranından bakteri geçiş oranını 2. saatte anlamlı olarak arttırdı ($p<0,05$). Buna karşılık, E. coli C-25, 3.

POTANSİYEL FARKI

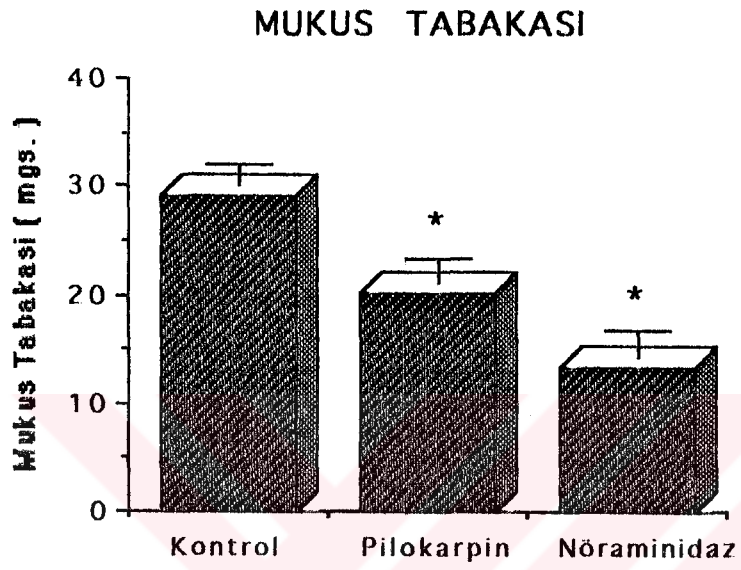


Şekil 4. İleum mukoza/submukoza membranında potansiyel farkın zamanla değişimi (n=deney sayısı, PD=potansiyel fark) ($p>0,05$).

REZİSTANS



Şekil 5. İleum mukoza/submukoza membranında rezistansın zamanla değişimi (n=deney sayısı, R=rezistans) ($p>0,05$).



Şekil 6. Mukoza yüzeyinde deney sırasında biriken mukus (* p<0,05).

Bakteriyel Translokasyon İncidensi

<u>Süre (saat)</u>	<u>Kontrol</u>	<u>Pilokarpin</u>	<u>Nöraminidaz</u>
1	0/15 (%0)	3/12 (%25)	0/12 (%0)
2	4/15 (%26.6)	9/12 (%75) *	1/12 (%8.3)
3	9/15 (%60)	9/12 (%75)	2/12 (%16.6) *
Toplam (3 saat)	9/15 (%60)	11/12 (%91.6)	4/12 (%33.3)

Tablo 2. Gruplara göre değişik zaman birimlerinde bakteriyel translokasyon oranları (* p<0,05).

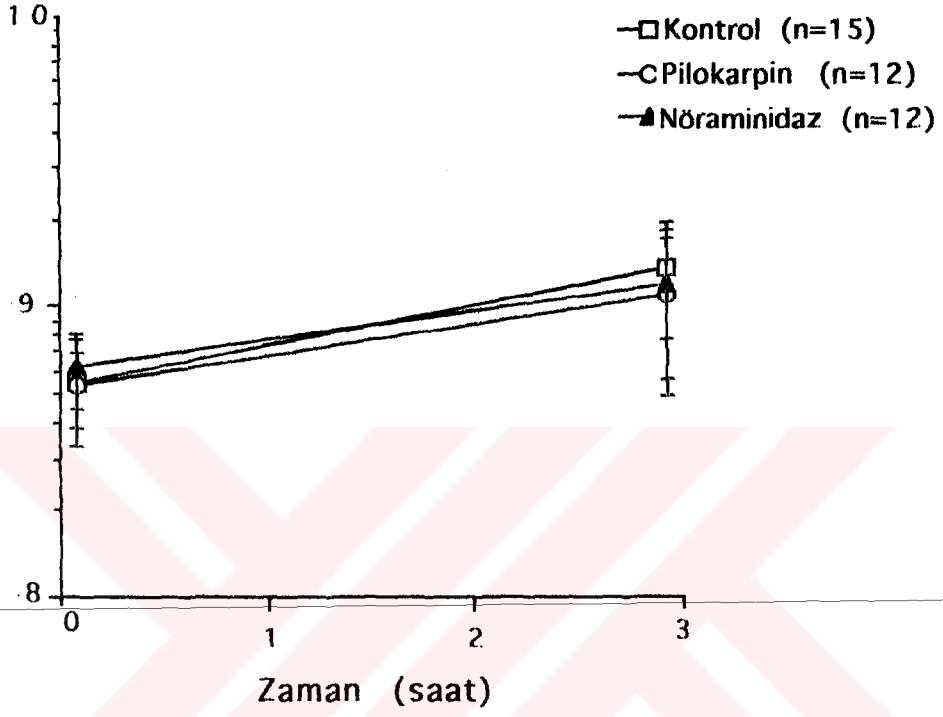
saatin sonunda nöraminidaz ile işlem görmüş membranlardan anlamlı olarak az oranda geçti.

Hem mukoza hem de submukoza rezervuarlarından birer saatlik aralarla kantitatif kültür örnekleri alındı. E. coli C-25'in mukoza rezervuarındaki konsantrasyonu deney süresince tüm gruplarda, hafif ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış gösterdi (Şekil 7). Gruplar arasında başlangıç ve 3. saat mukoza rezervuarı bakteri konsantrasyonları karşılaştırıldı ve anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Bu sonuçlar mukoza rezervuarına eklenen nöraminidazın bakteriler üzerine hiç bir direk etkisi olmadığını, bakterilerin deney süresince normal üremelerini sürdürdüklerini göstermektedir. Ayrıca, sistemde bakteriyel translokasyon için gerekli olan şartların deneylerin sonuna kadar korunduğu kanıtlanmıştır.

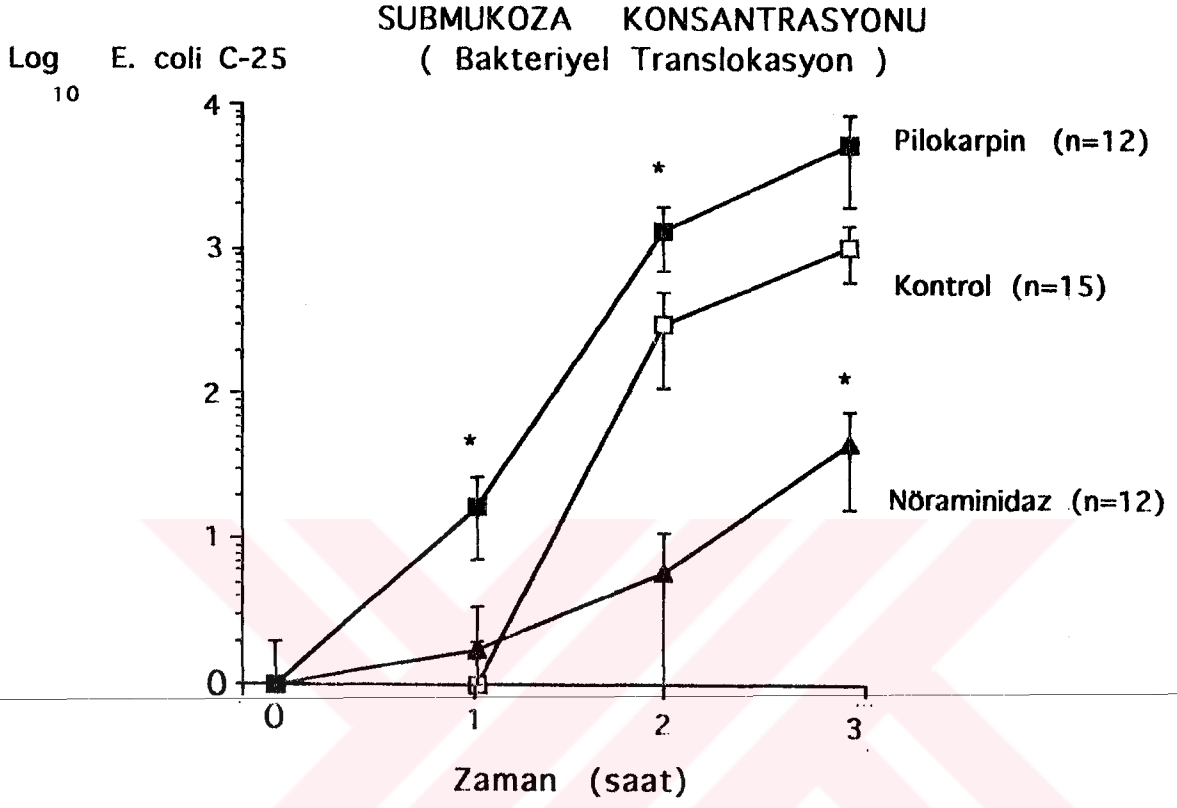
Bakteriyel translokasyonun pozitif olduğu deneylerde submukoza rezervuarındaki bakteri konsantrasyonları Şekil 8'de görülmektedir. Bu grafiğe submukoza rezervuarının 3. saatin sonuna kadar steril kaldığı deneyler dahil edilmemiştir. Pilokarpin ile tedavi edilmiş hayvanlarda membrandan geçen bakteri sayısı gerek kontrol gerekse nöraminidaz guruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Hiçbir tedavi görmemiş olan kontrol grubuna ait membranlardan nöraminidaz grubu membranlara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek sayıda bakteri geçmiştir. 3. saatin sonunda alınan toplam örnek kültürlerinde yine nöraminidaz grubunda geçen bakteri sayısının diğer iki gruba kıyasla anlamlı olarak az olduğu belirlenmiştir (Şekil 9).

MUKOZA KONSANTRASYONU

Log₁₀ E. coli C-25



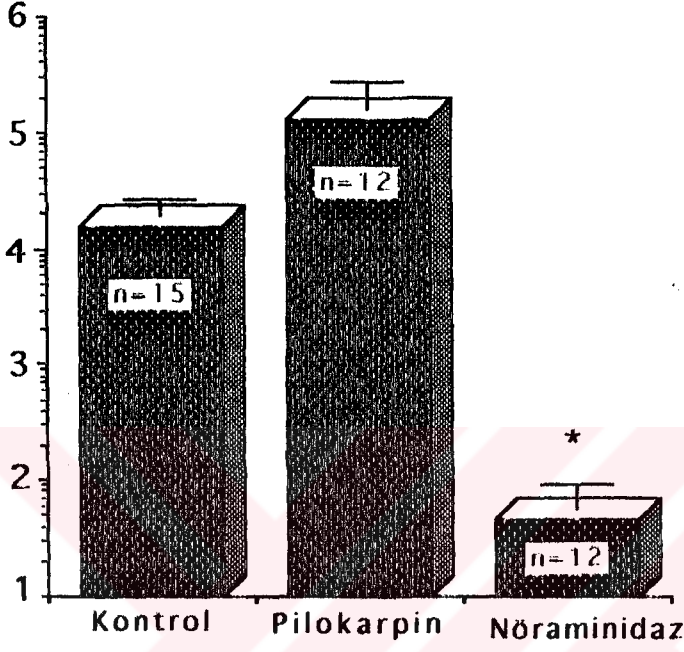
Şekil 7. Mukoza rezervuarındaki E. coli C-25 konsantrasyonunun deney süresi boyunca değişimi (n=deneş sayısı).



Şekil 8. Submukoza rezervuarındaki E. coli C-25 konsantrasyonunun deney süresi boyunca değişimi (n=deney sayısı) (* p<0,05).

SUBMUKOZA KONSANTRASYONU
(Toplam sayılar)

Log₁₀ E. coli C 25



Şekil 9. Deney sonu toplam örneklerinde E. coli C-25 konsantrasyonu (n=deney sayısı) (* p<0,05).

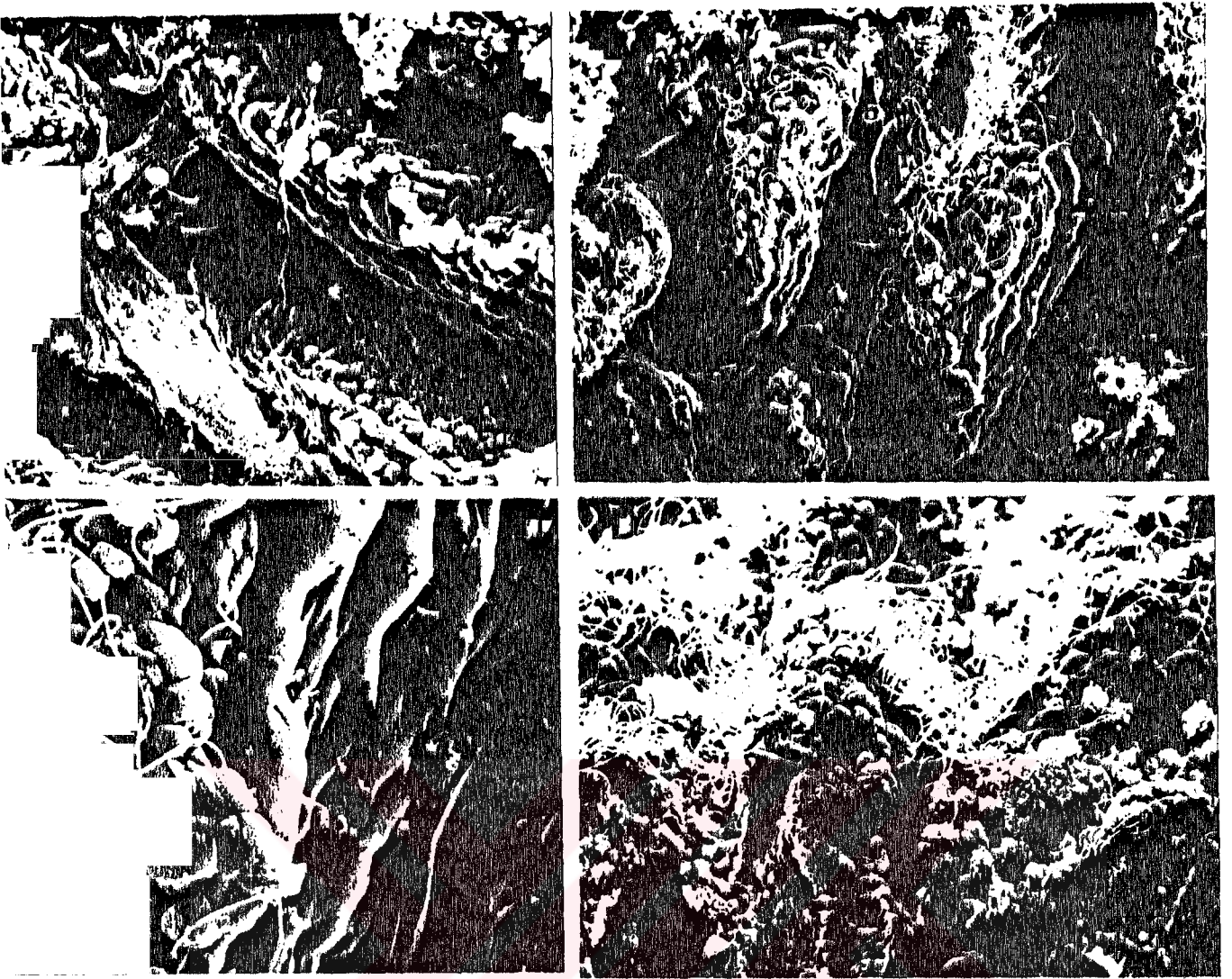
Mikroanatomik Çalışmalar

Şekil 10.a'da scanning elektron mikroskobu (SEM) ile, hiçbir tedavi görmemiş normal sıçan ileum mukozasının yüzey morfolojisi izlenmektedir. Villuslar yaprak şeklinde düzgün yapılar olarak görülmekte, epitel hücrelerinin oluşturduğu kaldırım taşı görünümü dikkati çekmektedir. Kriptler arasında bol miktarda mukus iplikçığı olduğu kolaylıkla görülebilir.

Pilokarpin ile tedavi edilmiş membranlarda normal yüzey morfolojisinin korunduğu görülmektedir. Şekil 10.b de ayrıca, arthromitaceae türüne ait çok sayıda endojen filamentöz organizma villus apekslerine oturmuş halde görülmektedir. Bu organizmalar normal membranların da birçoğunda gözlenmiştir. Dikkati çeken önemli bir bulgu mukusun yokluğudur. Büyük büyütmede (x750) intakt yüzey epiteli, enterositlerin normal apikal ayrılması ve filamentöz organizmalara ek olarak yüzeye tutunmuş basiller de gösterilmiştir (Şekil 10.c).

Histolojik incelemeye alınan nöraminidaz grubundaki membranlar tümüyle anormal bulunmuştur. Yüzey epiteli bazal membrandan ayrılmış görünümündedir (Şekil 10.d). SEM ile incelenen membranlardaki yüzey epitel kaybı mekanik hasarı andırmaktaysa da, bu bulgular, pilokarpin grubundakilerden farklı olarak incelenen membranların tümünde ve yüzeyin hemen her tarafına yayılmış şekilde görülmüştür. Böylece nöraminidazın Ussing haznesi içindeki epiteli daha fragil ve yırtılmaya daha duyarlı hale getirdiği düşünülmüştür.

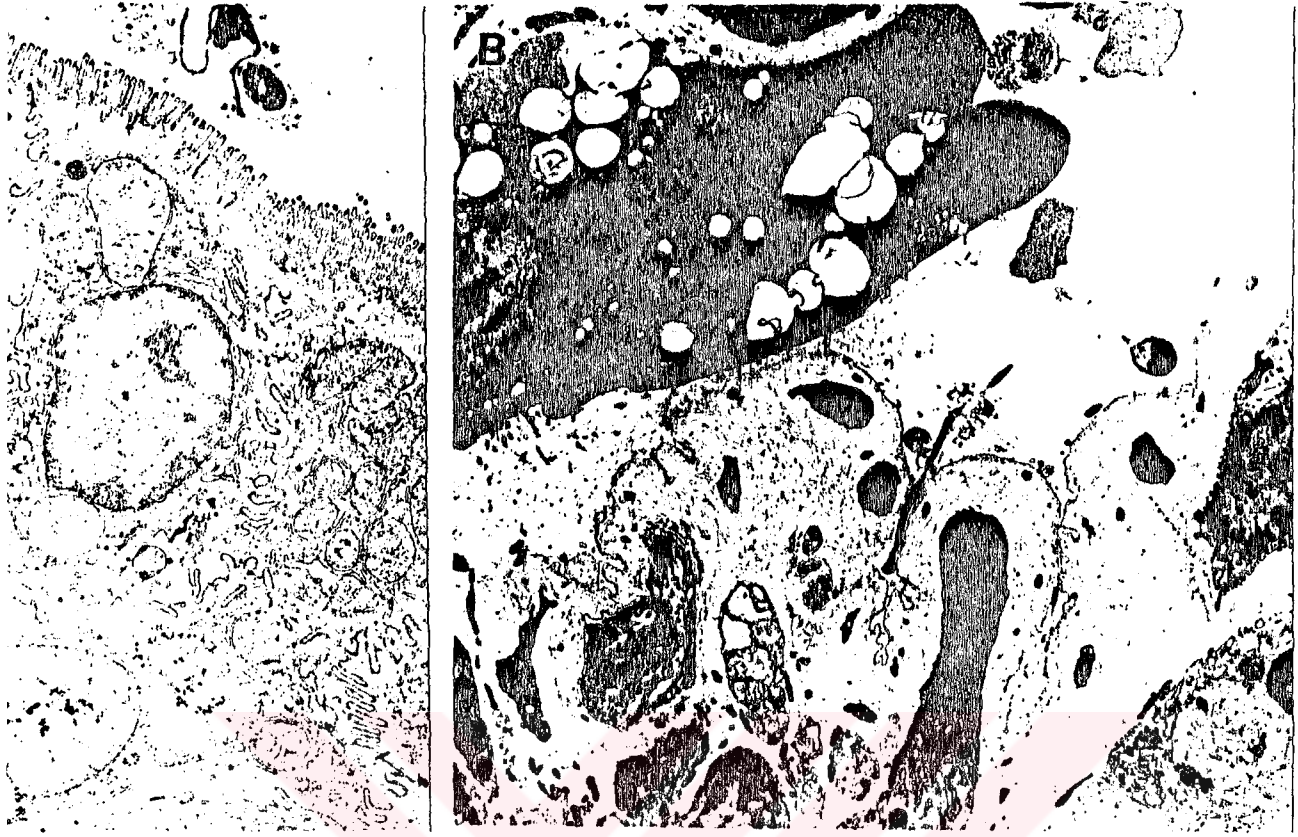
Transmission elektron mikroskobisi (TEM) ile pilokarpin grubu



Şekil 10. Scanning elektron mikroskobisi ile; a) hiç bir tedavi görmemiş normal ileum nukozaasının görünümü. Mukus iplikçikleri görülmekte (x350), b) Pilocarpin grubunda nukoza normal ancak mukus görülmemekte (x200), c) Pilocarpin grubunda büyük büyütme ile normal mukozanın görünümü (x750), d) Nöraminidaz grubunda gözlenen raygın epitel kaybı.

membranlarda yüzey epiteli normal olup, mikrovilluslar pilokarpin tedavisinden etkilenmemiş görülmektedir (Şekil 11.a). Öte yandan nöraminidaz tedavisi sonrası apeks epiteli morfolojisinde belirgin yıkım gözlenmiştir (Şekil 11.b). Epitel bazal membrandan ayrılmış görünmektedir. Bu bulgu nöraminidaz tedavisi için tipiktir. Buna ek olarak epitel altı tabakalar muhtemelen dış ortama açılma sonucu karşılaştıkları ozmotik stresler nedeniyle normal yapılarını kaybetmiş görünmektedirler.





Şekil 11. Transmission elektron mikroskobisi ile; a) Tedavi görmemiş normal ileum mukozası (x3600), b) Nöraminidaz grubunda görülen epitel kaybı (x3600).

TARTIŞMA

Bakteriyel adhezyonun invaziv hastalığa yol açan ilk basamak olduğu düşünülmektedir (7). Bakteriyel adhezyon için gerekli olan glikolipid ve glikoprotein yapısındaki reseptörler hem mukusta hem de epitel hücreleri üzerinde gösterilmiştir (23, 33, 39, 48). Adhezyonun antikorlarla ve reseptör analogları ile bloke edilebildiği bildirilmiştir (48). Domuz ince barsağında müsinin membrana bağlı siyaloglikolipidlere göre 100 kat daha fazla bağlanma bölgesi (reseptör) içerdiği gösterilmiştir (33, 36) . Bu bulgu mukusun henüz hipotez halindeki bir fonksiyonu olan, bakterileri tutma ve mukozaya yapışmalarını engelleme görevini desteklemektedir. Wells ve arkadaşlarının in vivo bir model kullanarak yaptıkları çalışmada fitohemaglütininle beslenen sıçanlarda, barsak mukus miktarının azalması sonucunda barsaktan bakteri translokasyonunun arttığı gösterilmiştir (59). Barsak mukus tabakasının miktarını değiştirmek amacıyla çalışmamızda, hücre içindeki mevcut mukusun salgılanmasını uyaran ve hücredeki mukusu boşaltan pilokarpin kullanılmıştır. Salgılanan bu mukus, membran Ussing sistemine yerleştirilmeden önce yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Scanning elektron mikroskopisi ve deney sırasında salgılanan mukusun deney sonunda ölçülmesi yöntemleriyle de gösterildiği gibi, önceden tahmin edilen şekilde mukusun uzaklaştırılması işlemi başarılı olmuştur. Bu işlem E .coli C-25'in epitelden geçiş oranını ve mutlak sayısını arttırmıştır. Deneyin bu safhasında mukusun, mekanizması ne olursa olsun, bakteriyel translokasyonu önlediği düşünülmüştür. Gerek patojen gerekse normal barsak bakterilerinin ve ayrıca cansız inert partiküllerin morfolojik olarak intakt enterositlerden direk olarak geçtiği konusunda önemli kanıtlar

bulunmaktadır (2, 61). Bunların yüzey epitel hücrelerine bağlandıktan sonra hücreler tarafından hücre içine alındıkları varsayılmaktadır. Hücrelerden geçen bu partiküller hücrenin diğer tarafından çıkarlar ve burada makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Bütün translokasyonların bu normal mekanizma ile olduğu düşünülmemelidir. Stresin de bakteriyel translokasyonu arttırdığı Deitch ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (19). Ancak strese görülen mezenterik lenf nodlarına translokasyonun, enterositlerin partikülleri alma eğilimindeki bir artmaya mı yoksa, makrofajlardaki bir bozukluk sonucu hücre içi öldürme işleminin yapılamamasına mı bağlı olduğu, bilinmemektedir. Bizim düşüncemize göre mukusun varlığı yüzey temasını engellediği için transepitelyal geçiş azalmaktadır. Azalmış mukus üretiminin translokasyonu arttırdığı ileri sürülmektedir ve stres mukus üretimini azaltmaktadır (41). Mukusun, bakterilerin barsak yüzeyine temasını engellediği görüşü çalışmamızın nöraminidaz gurubu sonuçları ile de desteklenmektedir. Nöraminidaz mukusu önemli oranda azaltmıştır. Bu enzim hem mukusta hem de epitel yüzeylerinde bulunan siyalik asit reseptör bölgeleri üzerine etkiyerek bunların yıkımına neden olmaktadır. Deneyden önce bu yöntemin glikokaliksleri ortadan kaldırmak için kullanılabilecek ılımlı bir yöntem olabileceği düşünülmüştür. Hipotezimize göre, glikokaliksler ortadan kaldırılınca bakterilerin bağlanması için gerekli olan reseptör bölgeleri de bundan etkilenecektir. Nöraminidaz ile tedavi edilen membranlardaki düşük translokasyon oranı bu hipotezi desteklemiştir. Ancak elektron mikroskopisi ile membranlarda ciddi yıkım gösterilmiştir. Bu nedenle nöraminidazın umulduğu kadar ılımlı bir etki yapıp yapmadığı konusundan emin olunamamaktadır. Her şeye rağmen bu bulguların çok önemli olduğu düşünülmektedir, çünkü membranda önemli derecede bir hasar olmasına

rağmen bakteriyel translokasyonun artmayabileceği gösterilmiştir. Bu yüzden stres durumlarında membranda görülen hasarın translokasyonun asıl nedeni olduğu kesin olarak söylenemez. Translokasyon spesifik bir olaydır. Hasar ya çok ağır olup bakteriyel invazyona neden olmalı veya çok spesifik olup bakteriyel adhezyon ve translokasyonla sonuçlanmalıdır.

Çalışmamız in vitro bir model kullanılarak intestinal mukustaki değişikliklerin bakteriyel translokasyona etkilerini inceleyen ilk çalışmadır. Ussing sistemi bize tek bir değişken üzerinde çalışabilme (bu çalışmada mukus sekresyonu) avantajını sağlamıştır. Ayrıca in vivo modellerde kontrolü zor olan fizyolojik değişkenler de bu sistemde önemli sorun yaratmaz. Bu sistemin kullanılmasındaki temel amaç, in vivo şartların taklit edilmesi değil, kontrollü bir mikroçevre olarak tanımlanabilen, bazal barsak şartlarının kontrol ve monitorize edilebildiği, basit ve tekrarlanabilir bir modelden yararlanmaktır.

Pilokarpin grubundaki artmış bakteriyel translokasyon oranı için alternatif bir açıklama da, pilokarpinin sistemik etkilerine bağlı olarak barsak bariyerinin fonksiyonundaki azalma olabilir. Ancak, mukus miktarının azalması dışında, pilokarpinle işlem görmüş membranlarda elektron mikroskopisi ile normal yapıdan farklı herhangi bir morfolojik değişiklik gösterilememiştir. Buna ek olarak elektrofizyolojik parametrelerde de canlılığın kaybını düşündürecek bir değişiklik olmamıştır.

Nöraminidaz grubu membranlarda elde edilen düşük bakteriyel translokasyon oranı, nöraminidazın bakteriler üzerine direk olumsuz etkisi

olarak düşünülebilir. Ancak deneyin başında ve sonunda mukoza rezervuarından alınan kültürlerde, aynen kontrol grubunda olduğu gibi, stabil bir bakteri üreme eğrisinin gösterilmesi, enzimin böyle bir inhibe edici etkisi olması olasılığını azaltmaktadır. Yine de nöraminidazın bakteri hücre duvarındaki reseptörler üzerinde gösterilemeyen olası bir etkisi ile üremenin değil, adhezyonun önlenebileceği şeklinde bir açıklama bu çalışmayla çürütülemez.

Mukusun mukoza bariyerindeki rolünün önemi bu çalışmayla bir kez daha vurgulanmıştır. Mukusun miktarında ve/veya kalitesinde yapılan değişikliklerin bakteriyel translokasyonda ilk ve önemli bir basamak olan mukozadan geçişi arttırabileceği veya azaltabileceği kanısına varılmıştır. Bakteriyel translokasyonun mekanizmalarıyla ilgili çalışmaların gelecekte, giderek yenileri tanımlanan bakteriyel reseptör bölgeleri üzerinde yoğunlaşması beklenmektedir.

SONUÇ

Bu çalışma ile, cerrahi hastalarda yüksek mortalite nedeni olan sistemik infeksiyonların barsaktan kaynaklanabileceği yönündeki hipotez, in vitro bir sistem kullanılarak araştırılmış ve intakt ileum mukozasından bakteri geçişi, fizyolojik, mikrobiyolojik ve mikroanatomik yöntemlerle dokümanite edilmiştir. Barsaktan bakteri translokasyonunun ilk basamağı olduğu düşünülen mukozadan geçiş için bakterilerin mukozaya tutunmaları gerektiği ve intestinal mukusun bu tutunma işlemini engelleyerek translokasyonu azalttığı ortaya koyulmuştur. Mukusun miktar ve kalitesinde yapılan değişikliklerin translokasyonu farklı şekilde etkilemesi, bakterilerin mukoza ve mukusa tutunmaları için reseptör bölgelerine gereksinim duydukları yönündeki hipotezi desteklemiştir.

Yenidoğan cerrahi hastalarında barsak bariyerinin henüz matüritesini tamamlamamış olduğu bilinmektedir. Barsak bariyerinin en önemli elemanlarından birisi olan mukusun bakteriyel translokasyonda oynadığı rolün önemi bu çalışma ile bir kez daha vurgulanmıştır. Cerrahi sepsis, multipl organ yetmezliği ve nekrotizan enterokolit gibi mortalitesi yüksek hastalıklarda infeksiyonun kaynağının bilinmesi, mekanizmalarının ortaya koyulması, ve sonuçta profilaksi ve tedavinin bunlara göre düzenlenmesi gibi önemli noktaların, konu ile ilgili giderek yoğunlaşan araştırmaların ilgi alanları olmaya devam edeceği düşünülmektedir.

ÖZET

Sepsis, ve multipl organ yetmezliği gibi ağır ve mortalitesi yüksek sistemik infeksiyonların, gastrointestinal sistemdeki normal enterik bakterilerin organizmaya yayılmaları ile ortaya çıkabileceği bildirilmiştir. Bakteriyel translokasyon adı verilen bu olayın varlığı gösterilmişse de oluşma mekanizmaları hala bilinmemektedir. Bakteriyel translokasyonda rol oynayan faktörlerin araştırılması amacı ile, bu çalışmada intestinal bariyerin önemli bir komponenti olan mukusun translokasyona etkisi araştırılmıştır. Sıçan ileum mukozasından hazırlanan canlı intakt membranlar Ussing sistemi adı verilen in vitro sisteme yerleştirilerek, mukusun miktarı (pilokarpin ile) ve kalitesi (nöraminidaz ile) değişikliğe uğratılmış ve bilinen bir bakterinin (E. coli C-25) membrandan geçişi incelenmiştir. Üç saat boyunca canlı kaldığı, elektrofizyolojik parametrelerle (potansiyel farkı ve rezistans) izlenen membranlardaki ve mukustaki miktar ve yapı değişiklikleri, doğrudan ağırlık ölçümü yoluyla ve elektron mikroskopik yöntemlerle gösterilmiştir. Mukusun pilokarpin ile azaltılması, bakteriyel translokasyonu anlamlı olarak arttırırken, nöraminidaz ile işlem gören membranlarda bakteri geçişi azalmıştır. Nöraminidazın enterosit yüzeylerinde bulunan siyalik asid reseptörlerini yıkıma uğrattığı bilinmektedir. Bu nedenle, tutunma işlemi gerçekleşemediği için nöraminidaz grubu membranlarda translokasyon oranı düşük olmuştur. Normalde mukustaki reseptörlere bağlanan bakteriler, pilokarpin grubunda gelişen mukus yokluğunda, doğrudan epitel hücreleri ile karşılaşarak bağlanmış ve translokasyon oranı artmıştır. Bu sonuçlar mukusun bakteriyel translokasyonda bir anahtar rol oynadığını göstermiş, barsak bariyerinin henüz matüritesini tamamlamadığı yenidoğan cerrahi hastalarda sistemik infeksiyon nedeni olarak barsaktan bakteri translokasyonunun göz önünde bulundurulmasının önemini vurgulamıştır.

KAYNAKLAR

1. Alexander JW. Nutrition and translocation. JPEN 14 (5 Suppl.): 170S-174S, 1990.
2. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, et al. The process of microbial translocation. Ann Surg 212: 496-512, 1990.
3. Allensmith M, McClellan BH, Butterworth M, et al. The development of immunoglobulin levels in man. J Pediatr 72: 276-290, 1968.
4. Alverdy JC, Chi HS, Sheldon GS. The effect of parenteral nutrition on gastro-intestinal immunity, the importance of enteric stimulation. Ann Surg 202: 681-684, 1985.
5. Alverdy JC, Aoyo E, Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. Surgery 104: 185-190, 1988.
6. Baker JW, Deitch EA, Li M, et al. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. J Trauma 28: 896-906, 1988.
7. Beachey EH. Bacterial adherence: adhesion-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J Infect Dis 143: 325-345, 1981.
8. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. Infect Immun 23: 403-411, 1979.
9. Bollen JJ. In: Immunologic Aspects of Infection in the Fetus and Newborn. Academic Press, London, 1981.
10. Bryan CS, Reynolds KL, Brenner ER. Analysis of 1186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: The effects of antimicrobial therapy. Rev Infect Dis 5: 629-638, 1983.
11. Buehler JW, Kleinman JC, Hogue CJ, Strauss LT, Smith JC. Birth-weight

- specific infant mortality, United States, 1960 and 1980. Public Health Reports 102 (2): 151-161, March-April 1987.
12. Buehler JW, Strauss LT, Hogue CJ, Smith JC. Birth-weight specific causes of infant mortality, United states, 1980. Public Health Reports 102 (2): 162-171, March-April 1987.
 13. Buyruk MN, Salman T, Gürler N, Çelik A. The effect of surgical trauma on the bacterial translocation from the gut. Abstract Book, British Association of Pediatric Surgeons, 38. Annual International Congress, A3, 1991.
 14. Carrico J, Meakin JL. Multiple organ failure syndrome. Arch Surg 121: 196-208, 1986.
 15. Christensen GD, Bisno AL, Parisi JT, et al. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic-resistant Staphylococcus epidermidis. Ann Intern Med 96: 1-10, 1982.
 16. Deitch EA, Maejima K, Berg RD. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of GI tract microflora in burned rats. J Trauma 25: 385-392, 1985.
 17. Deitch EA. Bacterial translocation from the gut: A mechanism of infection. J Burn Care Rehabil 8: 475-482, 1987.
 18. Deitch EA, Berg RB, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. Arch Surg 122: 185-190, 1987.
 19. Deitch EA, McIntyre-Bridges R. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. J Surg Res 42: 536-542, 1987.
 20. Deitch EA, Sittig K, Li M, et al. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. Am J Surg 159: 79-84, 1990.
 21. T. C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü: Türkiye İstatistik Yıllığı. Ankara, s61-84, 1989.

22. Donowitz M, Madara JL. Effects of extracellular calcium depletion on epithelial structure and function in rabbit ileum: a model for selective crypt or villus epithelial cell damage and suggestion of secretion by villus epithelial cells. *Gastroenterology* 83: 1231-43, 1982.
23. Forstner GG, Forstner JF. Structure and function of gastrointestinal mucus. In "Molecular and Cellular Basis of Digestion". Desnuelle P, Sjostrom H, Noren O. (eds). 1986 Elsevier Science Publishers B.V. pp. 125-143.
24. Frank HA, Seligman AM, Fine J. Further experiences with peritoneal irrigation for acute renal failure. *Ann Surg* 128: 561-608, 1948.
25. Gladstone IM, Ehrenkranz RA, Edberg SC, Baltimore RS. *Pediatr Infect Dis J* 9 (11): 819, 1990.
26. Guzman-Stein G, Bonsack G, Liberty J, Delaney JP. Abdominal radiation causes bacterial translocation. *J Surg Res* 46: 104-107, 1989.
27. Haneberg B, Aarskog D. Human faecal immunoglobulins in healthy infants and children, and in some with diseases affecting the intestinal tract or the immune system. *Clin Immunol* 22:210-222, 1975.
28. Hemming VG, Overall JC, Britt MR. Nosocomial infections in a newborn intensive-care unit. *New Engl J Med* 294: 1310-1315, 1976.
29. Hyman PE, Clarke DD, Everett SL, et al. Gastric acid secretory function in preterm infants. *J Pediatr* 106: 467-471, 1985.
30. Israel EJ, Walker WA. Host defense development in gut and related disorders. *Ped Clin North Am* 35: 1-15, 1988.
31. Jason JM. Infectious disease-related deaths of low birth weight infants, United States, 1968 to 1982. *Pediatrics* 84 (2) : 296-303, 1989.
32. Kliegman RM. Models of the pathogenesis of necrotising enterocolitis. *J Pediatr* 117: S2-S5, 1990.

33. Kyogashima M, Ginsburg V, Krivan HC. Escherichia coli K99 binds to N-glycolylsialoparagloboside and N-glycolyl-GM3 found in piglet small intestine. Arch Biochem Biophys 270, 391-397.
34. Lebenthal E, Lee PC. Development of functional responses in human exocrine pancreas. Pediatrics 55:556-560, 1980.
35. Li M, Specian RD, Deitch EA. Effects of protein malnutrition and endotoxin on the intestinal mucosal barrier to the translocation of indigenous flora in mice. JPEN 13: 572-578, 1989.
36. Lindahl M, Carlstedt I. Binding of K99 fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli to pig small intestinal mucin glycopeptides. Journal of General Microbiol 136 : 1609-1614, 1990.
37. Maddaus MA, Wells CL, Platt JL, et al. Effect of T cell modulation on translocation of bacteria from the gut and mesenteric lymph node. Ann Surg 207: 387-398, 1987.
38. Maejima K, Deitch E, Berg R. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice. Arch Surg 119: 166-172, 1984.
39. Mouricout MA, Julien RA. Pilus-mediated binding of bovine enterotoxigenic Escherichia coli to small intestinal mucins. Infect Immun 55 : 1216-1223, 1987.
40. Moxey PC, Trier JS. Specialized cell types in the human fetal small intestine. Anat Rec 191: 269,286, 1978.
41. Neutra MR, Forstner JF. Gastrointestinal Mucus: Synthesis, Secretion, and Function. In "Physiology of the Gastrointestinal Tract ", 2nd Edition, Johnson LR (Ed), Raven Press, New York, 1987.
42. O'Dwyer ST, Smith RJ, Hwang TL, Wilmore DW. Maintenance of small

- bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *JPEN* 13: 579-585, 1989.
43. Owen WE, Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract of athymic (nu/nu) mice. *Infect Immun* 27: 461-467, 1980.
 44. Rowe MI. Necrotising Enterocolitis. (Baskıda).
 45. Rubinstein E, Mark Z, Haspel J, et al. Antibacterial activity of the pancreatic fluid. *Gastroenterology* 88: 927-932, 1985.
 46. Saadia R, Schein M, MacFarlane C, Boffard KD. Gut barrier function and the surgeon. *Br J Surg* 77: 487-492, 1990.
 47. Selner JC, Merrill DA, Calman HN. Salivary immunoglobulin and albumin: Development during the newborn period. *J Pediatr* 72: 685-689, 1968.
 48. Sharon N, Eshdat Y, Silverblatt FJ, Ofek I. Bacterial adherence to cell surface sugars. In "Adhesion and Microorganism Pathogenicity". Ciba Foundation Symposium 80. Pitman Medical Ltd., London, 1981.
 49. Shub MC, Pang KY, Swann DA, Walker WA. Age-related changes in chemical composition and physical properties of mucus glycoproteins from rat small intestine. *Biochem J* 215: 405-411, 1983.
 50. Specian RD, Neutra MR. Regulation of intestinal goblet cell secretion. I. Role of parasympathetic stimulation. *Am J Physiol* 242 (Gastrointest Liver Physiol 5) :G370-G379, 1982.
 51. Steffen EK, Berg RD, Deitch EA. Comparison of the translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis* 157: 1032-1038, 1988.
 52. Tancrede CH, Andremont AO. Bacterial translocation and gram negative bacteremia in patients with hematologic malignancies. *J Infect Dis* 152: 99-103, 1985.

53. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110-127, 1951.
54. Waaij Van der, Berghuis-deVries JM, Lekkerkerk-van der Wees JEC. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice. *J Hyg Camb* 69: 405-411, 1971.
55. Walker J. In; *Update in Intensive Care and Emergency Medicine*. Springer Verlag, 1989.
56. Wegman ME. Annual summary of vital statistics-1989. *Pediatrics* 86 (6): 835-847, 1990.
57. Wells CL, Maddaus MA, Reynolds CM et al. Role of anaerobic flora in the translocation of aerobic and facultative anaerobic intestinal bacteria. *Infect Immun* 55: 2689-2694, 1987.
58. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Role of macrophage in translocation of intestinal bacteria. *Arch Surg* 122: 48-53, 1987.
59. Wells CL, Jechorek RP, Kouzi-Koliakis K, Erlandsen SL. Bacterial translocation and the presence of intestinal mucous-like material in weanling rats. *Microecology and Therapy* 17: 37-43, 1987.
60. Wells CL, Maddaus MA, Simmons RL. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 10: 958-979, 1988.
61. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Evidence for the translocation of *Enterococcus faecalis* across the mouse intestinal tract. *J Infect Dis* 162: 82-90, 1990.