

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

TEZ YÖNETİCİSİ
PROF. DR. MEHMET PUL

86532

YENİDOĞAN SIÇANLARDA AKUT HİPOKSİNİN
GASTROİNTESTİNAL SİSTEM BAKTERİ
KOLONİZASYONU ÜZERİNE ETKİSİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Mustafa İNAN

T 86532

EDİRNE 1999

Y.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
REKÖMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
YÖNTEM VE GEREÇLER	10
BULGULAR	16
TARTIŞMA	25
SONUÇLAR	29
ÖZET (Türkçe ve İngilizce)	30
KAYNAKLAR	32

GİRİŞ VE AMAÇ

Yenidoğan döneminde en önemli mortalite ve morbidite sebebi olarak, bakteriyel sepsis ve nekrotizan enterekolit (NEK) karşımıza çıkmaktadır. Özellikle ameliyat gibi ciddi bir travmanın ardından, çocuk cerrahisi servislerinde takip edilen bebeklerde bakteriyel sepsis önemli bir sorundur. Hastanede kalış süresi uzayan hastalar daha da fazla risk altındadır (1-5). Yapılan çalışmalarla, gastrointestinal sistem (GİS) florasındaki mikroorganizmaların bakteriyel sepsis ve NEK gelişiminde aktif rol oynadığı ortaya konulmuştur (1-12).

NEK, prematüre ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin hastalığı olarak bilinir (7). Etiyoloji tam aydınlanmamış olmakla beraber hiperosmolar beslenme, hipotermi, hipoksi, umbilikal ven kateterizasyonu, indometazin tedavisi ve bazı enfeksiyon ajanları sorumlu tutulmaktadır (3,7,10-12).

Yenidoğan sepsisi ve NEK'in etyolojisinde aktif rol oynadığı ileri sürülen GİS bakteriyel kolonizasyonu ile ilgili bilgilerimizde halen eksiklikler vardır (1-3, 12-14). Yapılan deneysel çalışmalarda akut hipoksinin bakteriyel translokasyona neden olduğu belirtilmiştir. Ancak translokasyonun etkeni olan bakterilerin GİS kolonizasyonu ise çok iyi incelenmemiştir. Bazı araştırmacılar yaygın inanışın aksine, GİS bakteriyel kolonizasyonunun rektumdan başlayıp kolon, ileum ve jejunuma doğru olduğunu ileri sürmektedirler. (1-3,13-15). Ayrıca GİS florasında bulunan mikroorganizmalar belirlenmiş ve bakteriyel kolonizasyonun oluşumu hakkında önemli sonuçlara ulaşılmıştır (1,2,5,12-15). Fakat hipoksinin GİS bakteri kolonizasyonu üzerine olan etkisi araştırılmamıştır.

Doğum esnasında ve hemen sonraki dönemde hipoksiye maruz kalan bebeklerde, NEK ve bakteriyel sepsis sıklığında artış olduğu gözlenmiştir (1,7,9,12,16). Buradan yola çıkarak yenidoğan sıçanlarda akut hipoksinin GİS bakteri kolonizasyonu üzerine etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

İnsanoğluyula mikroorganizmalar arasındaki ilişki, intrauterin dönemin ilk aylarından itibaren başlamakta ve hayatın sonuna kadar devam etmektedir. TORCH grubu enfeksiyonlarda olduğu gibi, fetusun, bazı enfeksiyon ajanlarından etkilenmesi sebebiyle kalıcı ve ciddi sorunlar ortaya çıkabilmektedir (7). Yenidoğan, mikroorganizmalarla yoğun olarak doğum kanalında ve doğduktan sonra dış ortamda karşılaşır. Bundan sonraki dönemde insan ve hayvan vücuduyla mikroorganizmalar simbiyoz bir yaşam sürdürürler ve karşılıklı olarak birbirlerinden yararlanırlar (14). Sağlıklı yenidoğanlarda dengede olan bu ilişki hastalık durumunda hayatı tehdit eden bir boyut kazanabilmektedir. Genel durumu bozulan yenidoğanlarda, GİS florasında bulunan mikroorganizmalar ajan patojen durumuna geçerek bakteriyel sepsis ve NEK'e sebep olur (17). Bu nedenle GİS bakteriyel kolonizasyonunun temel mekanizmalarının çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

D) Sindirim Sisteminin Embriyolojisi ve Fonksiyonel Gelişimi

GİS'in epitel ve parankimatöz dokuları endodermden, musküler ve peritoneal elemanları ise mezodermden köken alır ve bukkofarengial membrandan kloakal membrana kadar uzanır (1,18).

Intrauterin hayatın 20. haftasında, fetusun sindirim sistemine ait damar, lenf, kas, mukoza ve villus yapıları oluşur. Aslında, yenidoğanın sindirim sistemi oldukça gelişmiş durumdadır. Prematürelde GİS matürasyonu diğer sistemlerle kıyaslandığında daha iyi durumdadır. Doğumdan sonra da mide barsak sistemi gelişimine devam eder. Bu gelişim sürecinde, sindirim sisteminin hormonal fonksiyonları ve bağışıklık sistemine ait işlevleri de aktivite kazanır (19).

Yenidoğan döneminde sayıca fazla miktarda bulunan B lenfositler fonksiyonel olarak immatür durumdadır (4,20). Ayrıca kemotaktik cevap, bakteriosidal etki, kompleman aktivitesi ve lenfokin düzeyleri düşüktür (4). Hücre sel immünitede rol oynayan T lenfositler ve diğer lökositler anne sütü aracılığıyla GİS

lumenine bol miktarda geçmekte ve koruyucu fonksiyonunu yerine getirmektedir (1,5,20).

IgA, IgG gibi plasental bariyeri geçemez, dolayısıyla serum IgA ve GİS lümenindeki sekretuar IgA seviyesi yenidoğanlarda düşüktür. Torliev ve arkadaşları (21) doğumdan sonraki ikinci haftaya kadar IgA immünoisitlerinin yenidoğanların barsaklarında bulunmadığını göstermiştir. Bu durumda humoral immünitinin majör komponenti olan sekretuar IgA, en kolay anne sütüyle alınmaktadır (4,20-22).

Yenidoğan hayvan yavrularında yapılan çalışmalarda, barsak geçirgenliğinin daha fazla olduğu ve barsak mukus yapısının zayıf olduğu tespit edilmiştir. Barsak mukozası, bakterilerin daha rahat yapışabileceği bir yapıya sahiptir. Ayrıca endotoksin geçirgenliği daha yüksektir. Miadında doğan yenidoğanlarda mide asiditesi fazladır ve serum gastrin düzeyi yüksektir (14,20-22).

II) Yenidoğanın GİS Bakteriyel Kolonizasyonu

Yapılan araştırmalarda memeli GİS'inin doğumda steril olduğu tespit edilmiştir (23). Doğumdan çok kısa bir süre sonra GİS kolonizasyonu; yenidoğanın içinde bulunduğu çevreye, diyetine, hastalık ve açlık gibi etkenlere bağlı olarak oluşmaya başlar (4,13,15,17).

Yenidoğan GİS'inin bakteriyel kolonizasyonu ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllarda başlamış, sonraki on yılda ise hız kazanmıştır. Bugüne kadar GİS'in bakteriyel kolonizasyonunun dinamiği tam olarak aydınlatılmış değildir (1,13). Son yıllarda yapılan araştırmalarda normal yenidoğan feçesinde fazla sayıda aerob ve anaerob bakteri bulunduğu ortaya konulmuştur. Yenidoğan feçesinden izole edilen mikroorganizmaların başında bakterioides, enterobakter, streptokok ve bifidobakterium ailesinden bakteriler gelmektedir (1,13-15,17,23).

Bifidobakteriumlar insanlar için patojen olmayıp anaerob, mikrofil, polimorf ve karbonhidratları gaz yapmadan asetik asit ve laktik aside yıkan mikroorganizmalardır. Mide barsak kanalının asitliğini artırarak, özellikle yenidoğanlar için önemli patojen olan enterobakterler gibi mikroorganizmalara karşı olumsuz ortam yaratırlar. Böylece patojen bakterilerin üremesi engellenmiş olur (17,23-25).

Yoshioko ve arkadaşları (26) 1983 yılında anne sütüyle beslenen normal yenidoğanlarda gaitanın kolonizasyonunu incelemişlerdir. Bu çalışmayla erken dönemde enterobakter ailesinin özellikle de E. Coli'nin varlığı gösterilmiş olup, anne sütü alan yenidoğanlarda yaşamın ilk haftasından itibaren bifidobakterium ailesinin ağırlık kazandığı ortaya konmuştur. Ancak mama ile beslenen yenidoğanlarda, enterobakter ailesinin etkinliğinin daha uzun süre korunmakta olduğu bildirilmiştir. Bununla beraber birinci ayın sonunda hem mamayla beslenen hem anne sütü alan bebeklerde bifidobakteriumlar tamamen hakim duruma geçmektedir (17,27).

Yenidoğanın barsak kolonizasyonu ile ilgili çalışmalar iki günlük yenidoğan feçesinde oldukça fazla miktarda mikroorganizma olduğunu göstermiştir. Fakat feçes incelemeleri ile GİS bakteri kolonizasyonunun dinamiği konusunda yeterli bilgi sahibi olmak mümkün değildir (9,15).

Van Camp ve arkadaşlarının (13) 1994 yılında yaptıkları çalışmada; yenidoğan bebeklerin mide aspiratlarında, rektal ve ağız sürüntülerinde %100'e yakın üreme gösterilmiştir. Buna rağmen ince barsaklardan alınan örneklerin ekiminde erken dönemde üremeye rastlanmamıştır. Buradan yola çıkarak GİS bakteriyel kolonizasyonunun anüsten kolona ve ince barsaklara doğru olduğu ileri sürülmüştür. Kalın barsaklar 10. günden sonra tam kolonize olurken, ince barsaklar 13. günde %64 oranında kolonize olmuşlardır. Bu durumda barsak içeriğinin duodenuma geçtiğinde mide asiditesi sebebiyle steril olduğu kabul edilmiştir (13,15).

Hanson ve arkadaşlarının (5) 1990 yılında yaptıkları çok merkezli bir çalışmada; Pakistan'lı yenidoğanların gaita örnekleriyle, İsveç'li yenidoğanların gaita örnekleri karşılaştırılmıştır. Pakistan'lı infantların E. Coli ve diğer enterobakterlerle daha erken dönemde kolonize oldukları ortaya konulmuştur. Bu da çevresel faktörlerin GİS bakteri kolonizasyonunda belirleyici bir etken olduğunu göstermektedir.

Bell ve arkadaşları (17) herhangi bir sebepten dolayı yenidoğan ünitesinde yatmakta olan bebeklerin mide içeriği ve dışkılarında, yenidoğan için patojen olan bakterilerin arttığını göstermiştir. Hastanede yatan bebeklerin GİS bakteriyel kolonizasyonu olumsuz biçimde etkilenmekte ve patojen mikroorganizmaların sayısı artmaktadır.

Bakteriyel kolonizasyona etkili olan önemli bir faktör de yenidoğanın mamayla veya anne sütüyle beslenmesidir (1,3-5,13-15,20,23,25,27-29).

III) Anne Sütünün Barsak Kolonizasyonuna Etkisi

Anne sütü, yenidoğan barsak sisteminin eksiklerini mükemmel bir şekilde kapatacak niteliktedir (4). Birçok araştırmacı, anne sütünün insan ve hayvan yavruları için koruyucu etkisi olduğunu bildirmiştir. Buna göre anne sütünün başlıca özellikleri şöyle sıralanabilir:

- 1- Laktobasilleri büyütücü faktör içerir.
- 2- Yapısında bakteriyel translokasyondan koruyucu faktörler vardır.
- 3- İçindeki laktoferrin enterobakter ailesine üye patojen bakterilerden demir çalarak onların büyümelerini engeller.
- 4- İçinde laktobasillerin temel ihtiyaç maddelerinden olan aminoşeker niteliğindeki N-asetil glikozamin ve N-asetil neurominik asit bol miktarda bulunur .
- 5- Yenidoğan mide barsak kanalında IgA yoktur. Ancak anne sütünde IgA ve canlı lökosit hücreleri bulunur. Bu da hem humoral hem de sellüler immünite yönünden yenidoğana avantaj sağlar.
- 6- Anne sütünde bulunan lizozomlar bakterilere yapışarak öldürücü etki gösterirler (5,17,22,29-32).

Anne sütünde inek sütüne kıyasla demir miktarı daha düşüktür. Ancak emilebilirliği mükemmeldir. Anne sütü alan yavruların barsak hücrelerinde DNA ve protein içeriklerinin arttığı tespit edilmiştir. Doğumdan sonra gelen ilk anne sütünde; epidermal growth faktör, nerve growth faktör, insülin, insülin benzeri büyütücü faktör, tirozin, kortizol, taurin, glutamine ve somatomedin C vardır (22,26,28). Bu özellikler göz önüne alındığında, anne sütüyle beslenen yenidoğan bebeklerin ve deneklerin; ishal, bakteriyel sepsis, NEK gibi hastalıklarla daha az sıklıkta karşılaştıkları ortaya konulmuştur (22,24-26,31). Anne sütü almayan yenidoğanlarda ise ilk bir aylık dönemde enterobakter ailesinin hakim olduğu tek tip barsak kolonizasyon paterni oluşur. Böylece bakteriyel translokasyona eğilim artar (1,13-15, 27).

Barsak bakterilerinin sindirim kanalı dışındaki doku ve organlara geçmesi bakteriyel translokasyon olarak adlandırılmaktadır (1,2,4,15). Barsak kolonizasyonu ve flora bakterilerinin sindirim sistemine yerleşmesini takiben barsak mukoza engelinin bozulması, bağışıklık sisteminin zayıflaması, mide asitliğini azaltan ilaçların kullanılması gibi durumlarda bakteriler barsak duvarına ve daha uzak

organlara geçebilmektedirler ve bu duruma sıklıkla ince barsak kaynaklı gram negatif çomaklardan enterobakterler sebep olmaktadır (14, 16,32). Bakteriye sepsis ve NEK gibi patolojilerin kökeninde translokasyon yatar. Anne sütünde translokasyonu engelleyen faktörler bulunur (13-15,33).

IV) Yenidoğan Hipoksisi

Doğumdan kısa bir süre önce ve doğum anında fetüsün oksijen ihtiyacının yerine getirilememesi perinatal hipoksiyle sonuçlanır. Hipoksi, fetüs ve yenidoğanın oksijen eksikliğine ya da çeşitli organların perfüzyon bozukluğuna bağlı olarak zedelenmesidir. Bu durumda barsak, deri, böbrek ve akciğere giden kan akımı azalır. Beyin, kalp ve adrenallere giden kan akımı ise artar (19). Hipoksiye sistemik yanıt başlıca şu biçimlerde olmaktadır.

- 1- Adrenal bezden özellikle norepinefrin başta olmak üzere, bol miktarda katekolamin salgılanması olur.
- 2- Kemoreseptör ve baroreseptörlerden kaynaklanan taşikardi ve hipertansiyon meydana gelir. Olay devam ederse bradikardi ve şok gelişir.
- 3- İç içe girmiş halde respiratuvar ve metabolik asidoz gözlenir.
- 4- Metabolik asidoz, miyokard işlevlerinin hipoksi sebebiyle baskılanmasına ve anaerobik doku metobolizmasına ikincil olarak meydana gelmektedir.
- 5- Ciddi uzamış neonatal ve intrauterin hipoksi vital organların etkilenmesine yol açabilir (8-10,16-19,32-35).

Fetal veya neonatal gaz alışverişini bozan koşulların yol açtığı hipoksiye hiperkapni ve asidoz eşlik etmektedir. Hipoksik uyarı sonucunda dokulara oksijen iletimi bozulmakta, perfüzyonun da bozulmasıyla hipoksik-iskemik hasar oluşmaktadır.

Hipoksiye yol açan 5 temel mekanizma söz konusudur:

- 1- Kordon sarkması veya kordon dolanması gibi nedenlerle umbilikal kan dolaşımının kesintiye uğraması.
- 2- Plasental gaz alışverişinin bozulması (Ablatio plasenta, plasenta previa).
- 3- Plasentanın maternal yüzünün yetersiz perfüzyonu (Maternal hipo- hipertansiyon, anormal uterus kontraksiyonları).

- 4- Maternal oksijenizasyonda bozulma (Gebedeki kardiyopulmoner hastalıklar, derin anemi, vs.).
- 5- Yenidoğan akciğerinin yeterince havalanmaması, fetal dolaşımdan neonatal dolaşıma geçişte başarısızlık (Mekonyum aspirasyonu, amnion sıvısı aspirasyonu, pulmoner hipoplazi).

Bu temel mekanizmaların rol oynadığı doğum öncesi, doğum esnası ve doğum sonrası risk faktörleri söz konusudur. Risk faktörlerinin dağılımı açısından gelişmekte olan ülkelerde multiparite, annenin kötü beslenme koşulları, maternal anemi gibi önlenebilir doğum öncesi risk faktörleri ön plandadır. Kordon sarkması, maternal kanama, travayın uzaması, makat gelişi gibi öngörülmeyen doğum esnasındaki risk faktörleri hafif ya da orta dereceden, ağır dereceye kadar hipoksik hasara yol açar. Bu durumda iyi organize, eğitilmiş, yetenekli bir doğum ve primer canlandırma ekibinin varlığı büyük önem taşımaktadır.

Hipoksik iskemik olayların %51'i doğumdan önce, %40'ı doğum esnasında ve %9'u doğum sonrası dönemde gelişmektedir.

Hipoksinin hem fetüs hem de yenidoğan üzerindeki etkilerini anlayabilmek için kronik parsiyel asfiksi ve akut asfiksinin ayrı ayrı incelenmesi gerekir.

Kronik Parsiyel Asfiksi : Daha önce normal gelişen fetüsün oksitosinle indüklenmiş, hipertonic ve koordineli olmayan uterus kontraksiyonlarıyla gelişen ya da umbilikal kordonun fetüsün bir kısmına dolanması nedeniyle tekrarlayan parsiyel asfiksi epizotlarına maruz kalma durumudur. Böyle bir yenidoğan hemen doğurtulacak olursa solunumu deprese olabilir, fakat canlandırmaya kısa sürede yanıt verir ve sistemik olarak bu durumdan etkilenme ihtimali düşüktür. Ancak hipoksik ataklar ısrar eder, uzun sürerse, hipotansiyon ve derin asidoz gelişir. Bu durumda zamanında yapılan canlandırma girişimlerine rağmen kalıcı nörolojik sekel gelişimi ve sistemik etkilenim riski yüksektir.

Akut Asfiksi : Klinik yaşamda daha nadir görülen bu durum, total akut hipoksiye maruz bırakılan yenidoğan maymunlarda yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur. Burada hipoksik uyarıyı takiben birkaç yüzeysel solunum hareketinden sonra solunum durmaktadır ve bu döneme "primer apne" denir. Hipoksi atağını takiben bir iki dakika sonra hızlı ve canlı gasping başlamakta, beş on dakika süren bu periyodu "terminal apne" dönemi izlemektedir. Kalp hızı giderek azalmaktadır. Kan

pH'sı başlangıçtan itibaren giderek düşmekte $pH < 7$ olduğunda solunum merkezi uyarılarak apne dönemi sonunda gasping tekrar başlamaktadır. Kan basıncı ise giderek düşme eğilimindedir.

Hipoksik atak belirgin ve çarpıcı etkisini merkezi sinir sistemi üzerinde gösterir. Hipoksik kalan term bir yenidoğanda ortaya çıkan ensefalopatinin klinik ve nöropatolojik bulgular bütünü "Hipoksik İskemik Ensefalopati" olarak tanımlanmaktadır. Nelson, beyinde hasara yol açacak kadar sistemik kan akımı bozulan bir yenidoğanda diğer organların etkilenmemesinin imkansız olduğunu öne sürmüştür. Multisistem tutulumu; kan akımının vital organlara (beyin, kalp, adrenal) yönlendirilmesi, böbrek, akciğer, karaciğer, gastrointestinal sistem, cilt ve kas iskelet sisteminden uzaklaştırılması ile ortaya çıkmaktadır (36).

Pekçok klinik çalışmada, hipoksi ile NEK arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Llyod'un (7,12) "Dalma Teorisine" göre (Diving Reflex), belirli bir süre devam eden hipoksik durumlara tolerans gösterebilen splanknik dolaşım, bu sürenin uzaması halinde yeterli kan akımını sağlayamamakta ve barsak mukozasında kalıcı zedelenmeler ortaya çıkabilmektedir. Klinik gözlemler, NEK'li bebeklerin %80'inin zor doğumlar sonucu meydana geldiğini göstermektedir (6). Birçok hayvan deneyinde hipoksinin barsak mukozasında zedelenmeye yol açtığı ortaya konmuştur. Hipoksiye uğramış hayvanlarda gözlenen bu zedelenmeyle ilgili değişiklikler şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Barsak kan akımı azalır.
- 2- Hipoksiyi takiben, yeniden oksijen ihtiyacı karşılanan GİS dokusunda, hipoksi-reperfüzyon hasarı karşımıza çıkar. Bunun sebebi serbest radikallerin üretimindeki artmadır.
- 3- Barsak mukozasının geçirgenliği artar.
- 4- Barsak mukoza hücrelerinde oksijen tüketimi azalır.
- 5- Mukozal dokuda zedelenme meydana gelir.
- 6- Mide hücrelerinin hipoksiye bağlı olarak zarar görmesi sonucunda gastrik pH değişiklikleri ortaya çıkar.

Hipoksiye maruz kalan deneklerde mezenterik kan akımının azaldığı ve barsak mukozasındaki oksijen konsantrasyonunun düştüğü gösterilmiştir. Hipoksi reperfüzyon hasarı sırasında oluşan anaerobik metabolizma sonucunda serbest

oksijen radikalleri üretilir. Ortaya çıkan bu serbest radikaller de GİS mukozasında ciddi hasarlar meydana getirirler (1,9,19,34,36-38).



YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

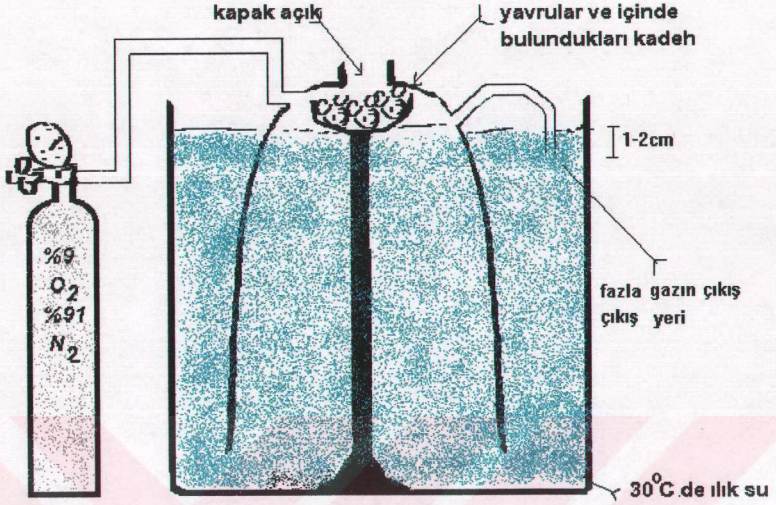
Çalışmada 56 adet outbred wistar albino yenidoğan sıçan yavrusu kullanıldı. Deneysel, erkek ve dişi sıçanların ikinci, üçüncü kuşak çiftleştirilmesi sonucu elde edilen yavrularla yapıldı. Doğuma tahminen bir hafta kala gebe hayvanlar tek başlarına ayrı kafeslere alındı. Günde üç kez ziyaret edilerek yavruların doğum günleri ve doğum saatleri tespit edildi.

Sıçanlar oda koşullarında tutuldular. Şebeke suyuyla sulandılar. Yonca Yem Sanayi tarafından üretilmiş olan en az %14 protein içerikli süt pellet yem ile beslendiler.

Çalışmamızda kullanılan outbred wistar albino sıçan yavruları yenidoğan döneminde ortalama altı gram, bir günlükken ortalama yedi gram, 10 günlükken ortalama 15 gram olarak tartıldılar. Sıçanlar doğumlarından laparotomi yapılana kadar olan sürede sadece anne sütüyle beslendi. Laparotomi esnasında mide piyeslerinde sadece kazeifiye olmuş süt bulundu.

Araştırmamızda besiyerlerinin hazırlanması için kullanılan 60x10 mm.'lik cam petri kutuları, otoklavda standart koşullarda sterilize edildi ve bakteriyolojik incelemelerde kullanıldı. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda standart koşullarda hazırlanan kanlı agar, aerob, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin üretildiği besiyeri olarak kullanıldı. Brucella agar ise anaerob, gram negatif ve gram pozitif bakterilerin üretildiği besiyeri olarak kullanıldı. Anaerob besiyerleri ekim yapıldıktan sonra Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan, özgün anaerob kültür sistemlerine konarak, 48 saat süreyle tıpkı aerob besiyerleri gibi standart koşullarda etüvde bekletildi.

Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda Urao ve arkadaşlarının (1) yapmış olduğu hipoksi modeline benzer bir model oluşturuldu. HABAŞ Oksijen Sanayi'den temin edilen %9 oksijen ve % 91 azot gazı karışımı kullanılarak denekler hipoksiye uğrattıldı (Şekil. 1).



ŞEKİL 1 : Hipoksi İşlemi Başlamadan Önce Sistemin Şematik Görünümü.

Sulandırma ve homojenizasyon esnasında kullanılan propilen tüpler otoklavda, ependorf tüpler ise etilen oksit gazıyla sterilize edildi. Hassas tartılar için Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan Shimadzu AEX 120G model tartı aleti kullanıldı.

Çalışmamızda denek olarak kullanılan yenidoğan sıçanlar rastgele kontrol grubu ve hipoksi grubu olarak ikiye ayrıldı. Kontrol grubundaki deneklere doğumdan sonra laparotomi yapılanaya kadar hiçbir işlem uygulanmadı. Laparotomi işlemi birinci gün, beşinci gün ve 9-11. gün olmak üzere toplam üç grupta 34 denek üzerinde uygulandı. Bu deneklerden altı tanesinden yalnızca ileum ve kolon örnekleri alınırken geriye kalan 28 denekten; mide, jejunum, ileum, kolon ve karaciğer örnekleri alındı. Bu grupta deney boyunca yenidoğan sıçan kaybımız olmadı.

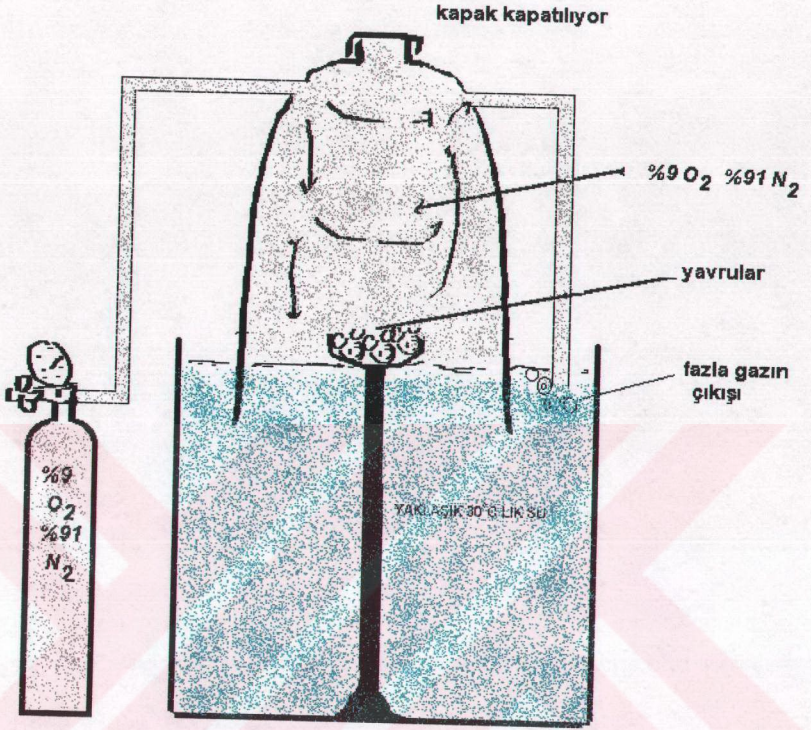
Hipoksi grubundaki deneklerin tümü, doğumdan sonraki ilk saatlerde annelerinden ayrılıp kurulan sistem aracılığıyla hipoksiye maruz bırakıldı. Takiben annelerinin bulunduğu kafese tekrar konuldu ve laparotomi yapılmaya kadar olan dönemde başka bir işlem yapılmadı. Hipoksi grubunda deneye 26 yenidoğan sıçanla

başlandı. Deneklerden bir tanesi hipoksi işlemi sırasında öldü. Hipoksik yenidoğan sıçanlardan üç tanesi de annelerinin yanına bırakıldıktan sonra öldü. Laparotomi yapıncaya kadar yavrular anne sütüyle beslendiler. Hipoksi grubundaki laparotomi işlemi birinci günde ve 9-11. günlerde olmak üzere iki grupta yapıldı. Bu gruptaki deneklerin hipoksiye uğratılması işlemi %9 oksijen ve %91 azot gazı içeren karışım kullanılarak Urao ve arkadaşlarının (1) uyguladığı sistem deney laboratuvarında oluşturmak suretiyle yapıldı.

Sistem yukarıdaki şekilde görüldüğü biçimde hazırlandı. Daha sonra yenidoğan sıçan yavrularıyla oda havasının ilişkisi kesildi ve deneklerin bir saat süreyle hazırlanan gaz karışımını solumaları sağlandı. Yenidoğan sıçanların hipotermik kalmalarını önlemek gerektiğinden sistemde kullanılan suyun sıcaklığı 30°C'ye ayarlandı. Ayrıca bir iki cm. su basıncının üstünde bir değer oluşmaması için gerekli düzenleme yapılarak gaz karışımının sistem içinde dolanımı sağlanmış oldu (Şekil. 2).

Her iki gruptaki deneklere de aynı şekilde laparotomi işlemi uygulandı. Deneklerin tümü servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Üç dakika sonra denekler laparotomi işleminin yapıldığı tahtaya dört üyesinden flasterle tespit edildi. Cilt temizliği %10 povidon iyot ile yapıldı. Denekler boylarına uygun steril bir delikli yeşil ile örtüldü. Steril koşullarda karın cildi bir makas ve penset ile kesilip çıkartıldı. Bu aletler daha sonra hiç kullanılmadı. Periton bir başka penset ve makas yardımıyla açılıp karın içi organlara ulaşılmış oldu (Resim. 1). Bundan sonra laparatominin her aşamasında başka aletler kullanıldı. Sırayla karaciğer, jejunum, ileum, kolon ve mideden birer parça alındı. Çıkarılan bu parçalar steril eppendorf tüplere kondu.

Alınan örnekler eppendorf tüpleriyle beraber +/- 0,1 miligram hassasiyeti olan tartı aletiyle tartıldı. Parçalar steril olarak içinde bir tutam kum bulunan steril tüplere alındı. Bu tüplere steril koşullarda bir mililitre serum fizyolojik eklendi. Alınan parçalar steril bagetlerle homojenize edildi. Takiben karaciğer, jejunum, mide örnekleri 1/25'lik, ileum ve kolon örnekleri de 1/100'lük olacak şekilde mikropipet yardımıyla serum fizyolojikle sulandırıldı.

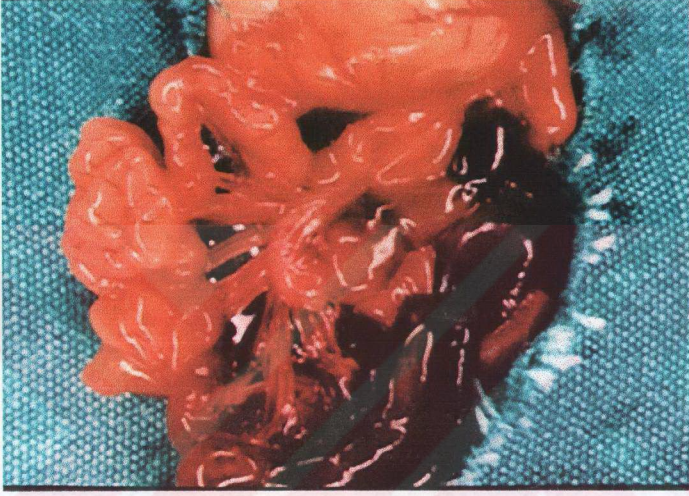


Şekil. 2: Hipoksi İşlemi Esnasında Sistemin Şematik Görünümü.

Daha sonra 0.4 cm. çaplı özeyle, 6x10 cm.'lik. petri kutularına dökülmüş kanlı agar ve brucella besiyerlerine ekim yapıldı. Boşalan eppendorf tüpler tekrar tartıldı. Elde edilen sonuçlar ilk tartımla karşılaştırılarak homojenize edilen materyallerin esas ağırlıkları tespit edilmiş oldu.

Aerob besiyerleri 24 saat süreyle etüvde 37°C'de tutuldu. Takiben koloni sayımları yapıldı ve 48 saat sonra tekrar kontrol edildi. Anaerob besiyerleri ise Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan özel jarların içine yerleştirilip izole edildikten sonra 48 saat süreyle hiç açılmadan 37°C'de etüvde tutuldu. Bu sürenin sonunda jarlar açılarak koloni sayımları yapıldı ve kaydedildi.

İstatistiksel değerlendirmeler için χ^2 Analizi ve Mann Whitney U Testi kullanıldı. Her grup için ayrı p değeri saptandı ve $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Korelasyon için de Pearson Testi yapıldı (39).



Resim. 1 : Deneklerin Peritonunun Steril Koşullarda Açıldıktan Sonraki Durumu Görülmektedir.

BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan toplam 56 adet outbred wistar albino yenidoğan sıçan yavrusunun karaciğer dokularından alınan örneklerin kanlı agar ve brucella besiyerlerine yapılan ekimlerinin hiçbirinde üreme saptanmadı.

Kontrol grubunda 34, hipoksi grubunda ise 22 deneğin mide, jejunum, ileum ve kolon örnekleriyle hazırlanan besiyerlerinin değerlendirilmesiyle ilgili toplu sonuçlar aşağıda sunulan tablolarda gösterilmiştir.

Tablo. I: Mideden Alınan Örneklerin Koloni Sayım Sonuçları.

GRUP	KONTROL						HİPOKSİ			
	Kanlı Agar			Brucella			Kanlı Agar		Brucella	
Besi Yeri	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün
Yaş										
Denek Sayısı	10	10	8	10	10	8	11	11	11	11
Ortalama $\bar{X}(10^5)^*$	59481	132468	79121	7987	124159	79121	140917	269804	192260	255584
Median $\bar{X}(10^5)^*$	48825	105923	67911	38731	131502	67911 93053	109272	204632	145570	169449
Üreme olmayan Denek Sayısı	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

* CFU(Colony Forming Unit)

Tablo. I'de, mide örnekleri ile ekim yapılan kontrol ve hipoksi grubuna ait aerob ve anaerob besiyerlerinin koloni sayım sonuçları sunulmuştur. Kontrol grubunda bulunan anaerob besiyerlerinden bir günlük anaerob besiyeri dışında bütün besiyerlerinde üreme olduğu tespit edildi. Kontrol grubunda birinci günde aerob besiyerinde ortalama değer 59.481×10^5 , hipoksi grubunda birinci günde aerob besiyerinde ise 140.917×10^5 olarak bulundu. Koloni sayım sonuçlarının hipoksi grubunda 9-11. günde kanlı agarda 269.804×10^5 , brucellada ise 255.584×10^5 olduğu tespit edildi.

Tablo. II: Jejunumdan Alınan Örneklerin Koloni Sayım Sonuçları.

GRUP	KONTROL						HİPOKSİ			
	Kanlı Agar			Brucella			Kanlı Agar		Brucella	
Besi Yeri	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün
Yaş										
Denek Sayısı	10	10	8	10	10	8	11	11	11	11
Ortalama $X(10^5)^*$	0	16241	8614	0	22040	15391	11096	34285	39301	48340
Median $X(10^5)^*$	0	2570	6711	0	10140	10906	2632	26983	5618	30819
Üreme olmayan Denek Sayısı	10	3	2	10	1	1	4	0	3	0

* CFU(Colony Forming Unit)

Tablo. II'de, jejunum örnekleriyle ekim yapılan kontrol ve hipoksi grubuna ait aerob ve anaerob besiyerlerinin koloni sayım sonuçları sunulmuştur. Kontrol grubundaki bir günlük yenidoğan sıçanlardan alınan jejunum örnekleri ile ekim yapılan aerob ve anaerob besiyerlerinin hiçbirinde üreme yoktu. Hipoksi grubunda birinci günde, aerob besiyerlerinde %63.6 oranında üreme gözlemlendi ve ortalama değer 11.096×10^5 düzeyine çıktı. Yine birinci günde hipoksi grubunda anaerob besiyerlerinde kontrol grubuna göre %72.7'lik bir artış gözlenerek ortalama değer 39.301×10^5 olarak tespit edildi. Kontrol grubunda 9-11. günde aerob besiyerlerinde ortalama değer 8.614×10^5 , anaerob besiyerlerinde ise 15.391×10^5 olarak bulundu.

Tablo. III: İleumdan Alınan Örneklerin Koloni Sayım Sonuçları.

GRUP	KONTROL						HİPOKSİ			
	Kanlı Agar			Brucella			Kanlı Agar		Brucella	
Besi Yeri	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün
Yaş										
Denek Sayısı	16	10	8	16	10	8	11	11	11	11
Ortalama $X(10^5)^*$	8303	125103	652630	11875	17246	299529	164307	373462	218273	350965
Median $X(10^5)^*$	0	67321	407609	0	80766	306178	129412	366125	113208	351025
Üreme olmayan Denek Sayısı	9	0	1	10	0	0	0	0	0	0

* CFU(Colony Forming Unit)

Tablo. III incelendiğinde, birinci günde ileum örneklerinden hazırlanan kontrol grubuna ait aerob besiyerlerinin koloni sayımında %43.7 oranında bir üreme olduğu saptandı. Hipoksi grubunda birinci günde hazırlanan aerob besiyerlerinin tümünde üreme olduğu gözlemlendi. Ayrıca kontrol grubunda birinci günde ortalama değer 8.303×10^5 , hipoksi grubunda ise 164.307×10^5 olduğu görüldü. Kontrol grubundan birinci günde hazırlanan aerob besiyerlerinde üreme oranı %47.3'iken, 9-11. günde %87.5'e çıkarak, 652.630×10^5 olarak tespit edildi. Bu artış birinci günde anaerob besiyerlerinde ise %100 olarak saptandı.

Tablo. IV: Kolondan Alınan Örneklerin Koloni Sayım Sonuçları.

GRUP	KONTROL						HİPOKSİ			
	Kanlı Agar			Brucella			Kanlı Agar		Brucella	
Besi Yeri	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	5.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün	1.Gün	9-11. Gün
Yaş										
Denek Sayısı	16	9	7	16	10	8	10	11	11	11
Ortalama $X(10^5)^*$	171434	1377830	2904346	181106	1831169	2868904	766369	3068980	871194	2917683
Median $X(10^5)^*$	134539	1407895	2946482	75709	1812732	3053608	716842	2159097	400000	2379542
Üreme olmayan Denek Sayısı	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0

* CFU(Colony Forming Unit)

Tablo. IV; kolon örnekleriyle ekim yapılan besiyerlerindeki koloni sayım sonuçlarını göstermektedir. Buna göre, kontrol grubunda bir günlük anaerob besiyerlerinden iki tanesi dışında tüm besiyerlerinde üreme vardı. Kontrol grubunda birinci günde hazırlanan aerob besiyerlerinde ortalama değer 171.434×10^5 , 9-11 günlerdeyse $2.904.346 \times 10^5$ olarak saptandı. Kontrol grubunda birinci günde hazırlanan anaerob besiyerlerinde ortalama değer 181.106×10^5 , 9-11 günlüklerde ise $2.868.904 \times 10^5$ olarak bulundu. Hipoksi grubunda birinci günde hazırlanan aerob besiyerlerinde ortalama değer 766.369×10^5 , 9-11. günlerde ise $3.068.980 \times 10^5$ olarak tespit edildi.

Tablo. V: Bir Günlük ve 9-11 Günlük Deneklerin Mann-Whitney U Testi ile Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar.

Gruplar	Kontrol Grubunda 1 Günlük ve 9-11 Günlük deneklerin karşılaştırılması		Hipoksi Grubunda 1 Günlük ve 9-11 Günlük deneklerin karşılaştırılması	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
Mide	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Jejunum	P<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05
İleum	P<0,05	p<0,05	p<0,05	p>0,05
Kolon	P<0,05	p<0,05	p<0,05	P<0,05

Tablo. V'te kontrol grubu ve deney grubu verileri Mann-Whitney U Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Kontrol grubunun tümünde, ayrıca hipoksi grubunun aerob kısmında mide dışında jejunum, ileum ve kolon piyeslerinin koloni sayımları karşılaştırıldığında $p<0.05$ bulundu. Ancak bu değer hipoksi grubu deneklerinin anaerob kısmında kolon dışındaki bütün GIS bölgelerinde 0.05'in üzerinde saptandı.

Tablo. VI: Bir Günlük Deneklerle 9-11 Günlük Deneklerin Mann-Whitney U Testi Kullanılarak Ayrı Ayrı Kontrol ve Hipoksi Grubu Olarak Karşılaştırılmasından Elde Edilen Sonuçlar.

Gruplar	1 Günlük deneklerde Kontrol ve Hipoksi Grubunun karşılaştırılması		9-11 Günlük deneklerde Kontrol ve Hipoksi Grubunun karşılaştırılması	
	Aerob	Anaerob	Aerob	Anaerob
Mide	p>0,05	p>0,05	p<0,05	P<0,05
Jejunum	p<0,05	p<0,05	p<0,05	P<0,05
İleum	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Kolon	p<0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05

Y. C. YÜKSEKOKULU İLAHİ İLMİ
BOKÜMANTASYON MERKEZİ

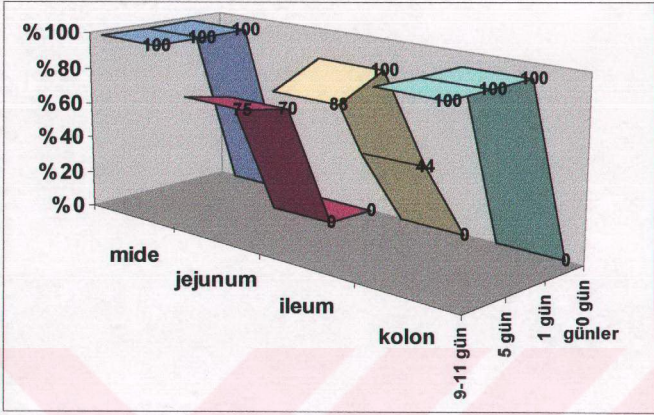
Tablo. VI'da bir günlük deneklerle 9-11 günlük deneklerin kontrol grubu ve hipoksi grubu arasındaki bağlantı Mann-Whitney U Testi kullanılarak araştırıldı. Mide piyeslerinden hazırlanan besiyerlerine ait sayım sonuçları bir günlük deneklerde $p>0.05$, 9-11 günlük deneklerde ise $p<0.05$ olarak bulundu. Bir günlük deneklerin kontrol ve hipoksi grupları karşılaştırıldığında, hem aerob, hem de anaerob gruplarda mideye ait bulgular dışında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlendi. Kolon, ileum ve jejunuma ait değerlerin tümü $p<0.05$ olarak saptandı. 9-11 günlük deneklerde kontrol ve hipoksi grupları karşılaştırıldığında mide ve jejunum örneklerine ait aerob ve anaerob kültürler arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edildi.

Tablo. VII: χ^2 Analizi Kullanılarak, Hipoksi Grubunda Bir Günlük Yenidoğan Sıçanların Jejunum ve İleum p Değerlerinin Karşılaştırılması.

Gruplar	Brucella Besiyeri	Kanlı Agar
Jejunum	p=0,008	p=0,003
İleum	p=0,0009	p=0,0024

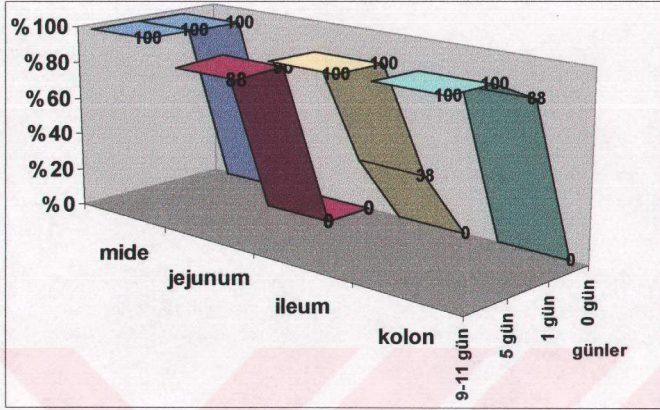
Tablo. VII'de hipoksi grubunda bir günlük yenidoğan sıçanlardan alınan örneklerin besiyerlerine ekilmesi sonucunda elde edilen veriler χ^2 Analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Mide ve kolon ile ilgili çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde anlamlı bir fark gözlenmedi. Ancak jejunumla ileuma ait verilerin farklı olduğu saptandı. Hipoksi grubunda bir günlük deneklerde aerob ve anaerob besiyerlerinde jejunum ve ileumda $p<0,05$ olarak bulundu.

Kontrol ve deney grubundaki bir günlük ve 9-11 günlük deneklerle yapılan çalışmalar Pearson Testiyle karşılaştırıldı. Buna göre, kontrol grubunda 9-11 günlük deneklerde aerob besiyerlerinde yapılan çalışmalarda jejunum ve ileum arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($r=0.87$). Brucella besiyerleriyle yapılan çalışmalarda ise ileum ve kolon arasında orta derecede anlamlı bir ilişki bulundu ($r=0.62$). Diğer karşılaştırma sonuçları istatistiksel olarak anlamsızdı.



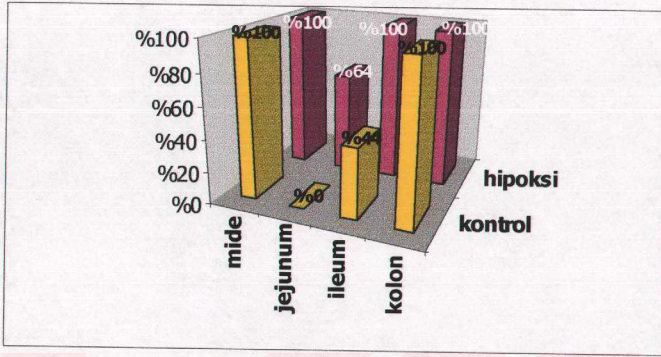
Şekil. 3: Kontrol Grubunda Günlere Göre GİS'in Aerob Kolonizasyonunun Seyri.

Şekil. 3'de de görüldüğü gibi, kontrol grubundan hazırlanan besiyerlerinin yapılan koloni sayımlarında birinci günden itibaren midede %100 oranında üreme vardı. Jejunumda aynı dönemde hiç üreme olmadığı görüldü. Ancak ilerleyen günlerde GİS'in bu bölgesinde hızlı bir artış olmasına karşın, 9-11. günde %100'lük üreme gerçekleşmedi.



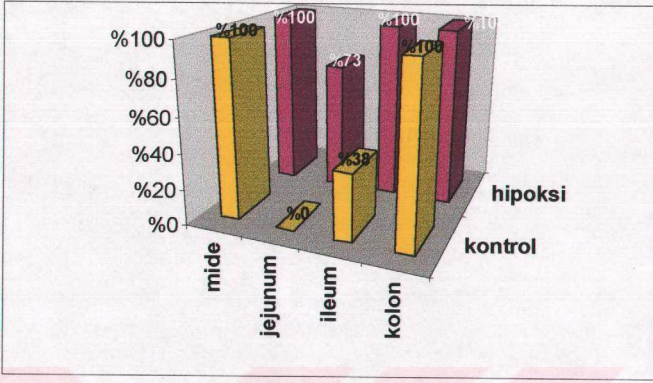
Şekil. 4: Kontrol Grubunda Günlere Göre GİS'in Anaerob Kolonizasyonunun Seyri.

Şekil. 4'de ise kontrol grubunda birinci günden başlayarak GİS'in anaerob kolonizasyonu gösterilmiş olup, aerob kolonizasyona oldukça benzer bir tabloyla karşılaşıldı. Birinci günde jejunumda üreme yoktu ancak midede %100 oranında üreme gözlemlendi. Jejunumdaki üreme oranı 9-11. günde ancak %88 oldu.



Şekil. 5: Birinci Günde Hipoksi ve Kontrol Gruplarında Aerob Bakteri Kolonizasyonu.

Şekil. 5’de birinci günde kontrol ve hipoksi grupları birlikte verilerek aerob bakteri kolonizasyonu gösterilmiştir. Hipoksi grubunda jejunum ve ileuma ait ekim sonuçlarında belirgin bir artış vardı. Jejunumda kontrol grubunda hiç üreme yokken, hipoksi grubunda %64 oranında üreme tespit edildi. İleumda ise bu oran kontrol grubunda %44, hipoksi grubunda ise %100 olarak bulundu.



Şekil. 6: Birinci Günde Hipoksi ve Kontrol Gruplarında Anaerob Bakteri Kolonizasyonu.

Şekil. 6'da birinci günde hipoksi ve kontrol gruplarında anaerob bakteri kolonizasyonu gösterilmiştir. Jejunum segmentinden hazırlanan besiyerlerindeki koloni sayımı sonucunda kontrol grubunda üreme yokken, hipoksi grubunda %73 oranında üreme vardı. İleum segmentinden hazırlanan besiyerlerinde kontrol grubunda kolonizasyon oranı %38 hipoksi grubunda ise %100 olarak bulundu.

TARTIŞMA

Nekrotizan Enterekolit, yenidoğan döneminde oldukça sık karşılaşılan ve bazen de cerrahi tedavi gerektiren bir patolojidir (4,6). Ayrıca, postoperatif dönemde yoğun bakım ünitelerinde takip edilmekte olan bebeklerde, mortalite ve morbiditeyi etkileyen sebeplerden birisi de yenidoğan sepsisidir (4,27). Çocuk Cerrahları için son derece önemli olan bu iki problemin oluşmasında barsak bakterilerinin aktif rol oynadığı kabul edilmektedir. Bu nedenle GİS bakteriyel kolonizasyonu ile ilgili olarak yapılan çalışmalar önceleri yenidoğan dışkı ve rektal sürüntüler üzerine yoğunlaştırılmıştır (4,6,13,32,40). Ancak 1994'te Van Camp ve arkadaşları (4) rektal sürüntü ve dışkı incelemesiyle GİS bakteri kolonizasyonu hakkında fikir edinilemeyeceğini ileri sürmüşlerdir. Urao ve arkadaşları (14) 1995'te yaptıkları çalışmada rektumun doğumu takip eden erken dönemde kolonun ise ancak 10. günden sonra tamamen kolonize olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda da ince barsakların 13. güne kadar yaklaşık %65 oranında kolonize olduğu ileri sürülmüştür (2,4,13-15).

Çalışmamızda kontrol grubundaki deneklerden alınan ince barsak örneklerinde birinci günde jejunuma ait aerob besiyerlerinde üremeye rastlanmadı. Beşinci günde %70, 9-11. günlerde ise %75 oranında üreme olduğu tespit edildi (Tablo. II). Yine kontrol grubundaki deneklerden birinci günde alınan ileum örneklerinin aerob kültürlerinde ise %43.7 oranında üreme saptandı (Tablo. III). Burada da açıkça görüldüğü gibi jejunum doğumda henüz kolonize olmamıştır. Günler ilerledikçe kolonizasyon oranının arttığı, ancak 9-11 günlük deneklerde bile kolonizasyonun tamamen oluşmadığı gözlenmektedir. Ayrıca, doğumdan hemen sonra ileumun ancak %43 oranında kolonize olduğu gözlenmektedir. 9-11 günlük yenidoğanlardan hazırlanan numunelerin aerob ve anaerob besiyerlerine ekim sonuçlarının değerlendirilmesi ile ileumun yaklaşık %90 oranında kolonize olabildiği görülmüştür. Böylece Urao ve arkadaşlarının (14) bulgularıyla paralel olarak 11. günde GİS kolonizasyonunun henüz tamamlanmadığı ortaya konulmuştur.

Kontrol grubundaki kolon örneklerinden hazırlanan aerob ve anaerob besiyerlerindeki üremeler değerlendirildiğinde, birinci günden itibaren mikroorganizmaların varlığı göze çarpmaktadır (Tablo. IV). Tablo. II ve III'teki bulgular gözönüne alındığında GİS kolonizasyonunun rektumdan başladığı, daha sonra ileumun ve en son olarak da jejunumun kolonize olduğu düşünülmektedir. Bu süreçte kolonizasyonun rektumdan yukarı doğru olduğu ve mide asidinin bakteriler açısından bir engel niteliği taşıdığı ortaya çıkmaktadır. Mide, tablo. VI'da da görüldüğü gibi jejunum, ileum, ve kolondan bağımsız olarak kolonize olmaktadır. Bu sonuçlar, Van Camp ve Urao'nun ileri sürdüğü GİS bakteriyel kolonizasyonunun rektumdan başladığı fikrini desteklemektedir (8,13,14).

Çalışmamızda kontrol grubunda bulunan jejunum, ileum ve kolon numuneleriyle ekim yapılan besiyerlerindeki üremeler değerlendirildiğinde; öncelikle kolonun daha sonra ileumun ve son olarak da jejunumun kolonize olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda birinci günde mide numuneleriyle ekim yapılan besiyerlerinin tümünde üreme olduğu tespit edildi. Ancak kontrol grubunda birinci günde jejunum numuneleriyle ekim yapılan aerob ve anaerob besiyerlerinin hiçbirinde üreme olmadığı gözlemlendi. Bu durumda Van Camp ve Urao'nun ileri sürdüğü gibi yenidoğan sıçanlarda GİS bakteri kolonizasyonunun rektumdan yukarı doğru bir seyir gösterdiği düşünülmektedir (2,8,13-15).

GİS bakteri kolonizasyonunu; çevresel faktörler, mamayla beslenme, erken doğum, düşük doğum ağırlığı, immün yetmezlik, nazogastrik tüp uygulanması, gastrotomi ve mide asitliğini azaltan ilaçlar etkilemektedir (3-5,14,40-42).

Whetstine ve arkadaşları (38) 1995 yılında yaptıkları bir çalışmada doğumdan hemen sonraki dönemde oksijen desteğine ihtiyaç duyan hiç beslenmemiş bebeklerin mide sıvılarında yaptıkları pH ölçümlerini oksijen desteğine ihtiyaç duymayan yenidoğanlara göre daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmayla hipoksiye bağlı olarak mide asiditesinin düştüğü ortaya konmuştur. Başaran ve arkadaşlarının (2) 1998 yılında yaptığı çalışmada mide asiditesini düşüren ve pH'sını yükselten ilaçların bakteriyel kolonizasyonu hızlandırdığı ileri sürülmüştür. Bizim çalışmamızda da bir günlük deneklerde mide ile jejunum arasında kontrol grubunda hiçbir ilişki yokken hipoksi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır. Kontrol grubunda mide diğer GİS bölgelerinden bağımsız bir şekilde kolonize olmaktadır. Jejunum kolonizasyonu ileumdan etkilenmek suretiyle ortaya çıkmaktadır. Hipoksiye uğratılmış yenidoğan sıçanlarda ise, mide ile jejunum arasındaki istatistiksel

anlamdaki ilişkidir, mide asiditesinin azalması sebebiyle jejunumun mideden etkilenerek beklenenden daha erken dönemde kolonize olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Urao ve Van Camp yenidoğan tavşanlarda, Başaran da yenidoğan sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda; jejunumun ileumdan sonra kolonize olduğunu ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda kontrol grubunda bulunan bir günlük deneklerin jejunum ve ileum örnekleriyle hazırlanan besiyerlerindeki koloni sayımları gözönüne alındığında; jejunumun ileumdan sonra kolonize olduğu gözlemlendi. Bu durum mide asiditesinin bakteriler açısından bir engel niteliği taşıdığı ve jejunuma geçişe izin vermediği görüşünü desteklemektedir (4,13-16,32).

Bir günlük deneklerin mide piyeslerine ait ekimlerin sonuçlarına bakıldığında kontrol ve hipoksi grubunda p değerinin 0,05'ten büyük olduğu görülmektedir. Bu birinci günün henüz erken olmasından kaynaklanmaktadır. Oysa 9-11 günlük deneklerin mide piyeslerinin ekim sonuçları bir günlük deneklere ait ekim sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, p değeri 0.05'ten küçüktür. Bu hipoksinin midedeki bakteri kolonizasyonu üzerine etkisinin 9-11. günlerde ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Van Camp ve arkadaşları (4,32) normal GİS motilitesinin, kolonizasyonu geciktiren ve bununla birlikte translokasyondan koruyan bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ancak hipoksiye bağlı olarak mide asit bariyerini geçen bakterilerin jejunuma gelmesiyle, GİS motilitesi proksimalden distale doğru kolonizasyonu hızlandırır (1,13,32). Jejunuma geçen bakteriler barsak hareketlerinin etkisiyle rektuma doğru daha hızlı yol alırlar ve ince barsaklarında erken dönemde kolonize olmasını sağlarlar (15).

Uzun yıllar hipoksinin yenidoğan bebekleri nasıl etkilediği araştırılmıştır. NEK ve yenidoğan sepsisinin hipoksi ile bağlantısı ciddi şekilde irdelenerek önemli veriler elde edilmiştir. Lelli ve arkadaşları (16) 1992 yılında yenidoğan köpek yavrularında hipoksinin bakteriyel translokasyonu nasıl etkilediğini araştırmışlardır. Bu araştırmanın sonucunda hipoksinin bakteriyel translokasyonu arttırmadığı sonucuna varılmıştır. Benzer bir çalışma da 1996 yılında Urao ve arkadaşları (1) tarafından yapılmış ve yenidoğan tavşanlarda akut hipoksinin bakteriyel translokasyonu arttırmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada yenidoğan tavşanların büyük tavşanlara karşı hipoksiye daha dayanıklı olduğu ve anne sütünün tavşan yavrularını bakteriyel translokasyondan koruduğu ortaya konulmuştur. Anne sütünün

bu işlevini özellikle mukozal bariyeri koruyarak bakterilerin barsak duvarına invazyonunu engelleyerek yaptığı ileri sürülmüştür (29,33). Deneyimizdeki bütün yavruların anne sütüyle beslendiği gözönünde bulundurulursa, karaciğer örnekleri ile ekim yapılan besiyerlerinde üreme olmayışı bu görüşü destekler niteliktedir. Anne sütüyle alınan humoral ve sellüler immüniteyle ilgili faktörler yenidoğanı NEK ve bakteriyel sepsisten korumada önemli rol oynarlar. Stephens ve arkadaşları (29) bu görüşleri destekler tarzda anne sütüyle beslenen yenidoğanların bakteriyel translokasyondan doğal olarak korunduğunu ileri sürmüşlerdir.

Hem kontrol hem de hipoksi grubunda mide, jejunum, ileum ve kolon örnekleriyle ekim yapılan besiyerlerindeki koloni sayım sonuçları değerlendirildiğinde, aerob ve anaerob besiyerlerindeki üremeler arasında istatistiksel anlamda bir fark tespit edilmedi. GİS'in aerob ve anaerob bakteri kolonizasyonu hipoksiden aynı oranda etkilenmektedirler.

Çalışmamızda hipoksiye uğrayan yenidoğan sıçanlarda GİS bakteriyel kolonizasyonunun mideden başlayarak anlamlı derecede hızlandığı tespit edildi. Ancak, bu çalışmada bakteri türleri belirlenmedi. Bundan sonra planlanacak araştırmalarda üretilen bakterilerin adlandırılmasının faydalı olacağını düşünmekteyiz. Böylece NEK ve yenidoğan sepsisi etiolojisinin aydınlatılmasında önemli bilgiler elde edilecektir.

SONUÇLAR

Yenidoğan sıçanlarda, hipoksinin GİS bakteriyel kolonizasyonuna etkisini ortaya koymak amacıyla yapılan deneysel çalışmamızda;

Kontrol grubunda, GİS kolonizasyonunun rektumdan yukarı doğru bir seyir gösterdiği tespit edildi. Ayrıca, 9-11 günlük grupta GİS bakteri kolonizasyonunun henüz tamamlanmadığı gözlemlendi. Midenin diğer gastrointestinal bölgelerden bağımsız olarak kolonize olduğu ancak, jejunum, ileum ve kolonun birbirlerinden etkilenecek, aşağıdan yukarıya doğru bir seyirle kolonize olduğu saptandı. GİS bakteriyel kolonizasyonunun, aerob ve anaerob bakteriler açısından bir paralellik sergilediği görüldü.

Hipoksi grubunda ise jejunumun mideden etkilenecek kolonize olduğu görüldü. Bu grupta jejunum, ileum ve kolonun kontrol grubuna göre daha hızlı kolonize olduğu gözlemlendi. Hipoksi grubunda da aerob ve anaerob bakteriyel kolonizasyon açısından bir fark bulunamadı. Hem hipoksi grubunda hem de kontrol grubunda karaciğer örnekleriyle ekim yapılan besiyerlerinin hiçbirinde üreme görülmedi.

Yenidoğan sıçanlarda hipoksinin; bakteriyel translokasyona sebep olmadığı ancak GİS'de bakteriyel kolonizasyonun, jejunum seviyesinden itibaren erken dönemde başlamasına yol açtığı ve aerob ve anaerob kolonizasyon arasında bir fark oluşturmadığı sonucuna varıldı.

ÖZET

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda, akut hipoksinin yenidoğan sıçanlarda GİS bakteri kolonizasyonu üzerine etkisini araştırmak amacıyla toplam 56 adet outbred wistar albino yenidoğan sıçan yavrusu kullanıldı. Denekler rastgele iki gruba ayrıldı. Kontrol grubunda bulunan 34 adet yenidoğan sıçan, bir, beş ve 9-11 günlükken sakrifiye edilerek steril koşullarda mide, jejunum, ileum, kolon ve karaciğer dokularından örnekler alındı. Hipoksi grubunda bulunan 22 adet yenidoğan sıçan ise doğumdan hemen sonra %9 oksijen ve %91 azot gazı karışımında bir saat süreyle tutularak hipoksiye maruz bırakıldı. Bu gruptaki yavrular da bir ve 9-11 günlükken sakrifiye edilerek steril koşullarda mide, jejunum, ileum, kolon ve karaciğer dokularından örnekler alındı. Bu örnekler tartıldı ve standart oranlarda sulandırıldı. Aerob üremeler için kanlı agar, aneorob üremeler için brucella agar besiyerlerine ekildi.

Her iki grupta da besiyerlerine ekimler tamamen steril koşullarda yapıldı. Enkübasyon periyodunu takiben, besiyerlerinde oluşan koloniler tek tek sayıldı. Koloni sayımları kendi aralarında Mann Whitney U Testi, Pearson Testi ve χ^2 Analizi ile değerlendirildi.

Buna göre, kontrol grubunda GİS bakteriyel kolonizasyonunun 9-11. günde henüz tamamlanmamış olduğu, rektum, kolon, ileum, ve jejunum yönünde seyrettiği gözlemlendi. Midenin bağımsız olarak kolonize olduğu ortaya kondu. Ancak hipoksi grubunda jejunumun erken dönemde kolonize olduğu saptandı.

Hem kontrol hem de hipoksi grubunda karaciğer örnekleriyle ekim yapılan besiyerlerinde üreme olmadı. Ayrıca tüm gruplarda aerob ve anaerob besiyerlerindeki koloni sayımı sonuçları birbirine benzerdi. Hipoksi sonrasında aerob ve anaerob bakteriyel kolonizasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadığını saptadık. Hipoksinin yenidoğan sıçanlarda bakteriyel translokasyona sebep olmadığını ve GİS'in bakteriyel kolonizasyonunu hızlandırdığı kanısındayız.

SUMMARY

56 newborn outbred wistar albino rats were used in order to investigate the effect of acute hypoxia on bacterial colonization of gastrointestinal tract in newborn rats in Research Laboratory of Trakya University School of Medicine. Rats were randomly divided into two groups. 34 newborn rats in control group were sacrificed in 1, 5 and 9 to 11 days of age and taken specimen from the gastric, jejunal, ileal, colonic and hepatic tissues in sterile conditions. 22 newborn rats in the early period of their birth were exposed to hypoxia as keeping them an hour in atmosphere compound of 9% oxygen and 91% nitrogen. The rats in this group were sacrificed in 1 and 9 to 11 days of age and were taken specimen from the gastric, jejunal, ileal, colonic and hepatic tissues in sterile conditions. These samples were weighed and were diluted with standard ratios. Blood agar was used for aerobic reproduction and brucella agar was used for anaerobic reproduction.

Inoculations into agars were performed in sterile conditions in both groups. Each colonies in the agars were counted following incubation period. The number of colonies evaluated in each other with Mann Whitney U Test, Pearson test and χ^2 Analysis.

In according to result of tests they were observed that bacterial colonization of the gastrointestinal tract had not been completed in 9 to 11 days and coursed to the rectum, colon, ileum and the jejunum respectively. It was determined that the stomach was colonised independently. However it was observed that the jejunum colonised in early term in the hypoxic group.

No reproduction was observed in agars prepared with hepatic samples in both groups. Colony count results in aerobic and anaerobic agars were similar in both groups. Statistically no significant difference between aerobic and anaerobic colonization in the gastrointestinal tract after hypoxia was determined. We consider that hypoxia does not cause bacterial translocation in newborn rats but accelerates the bacterial colonization of the gastrointestinal tract.

KAYNAKLAR

1. Urao M, Coran AG, Drongowski RA, Teitelbaum DH: Acute hypoxia does not increase bacterial translocation in newborn rabbits. *J Pediatr Surg* 1996; 31:665-669
2. Başaran ÜN, Celayir S, Eray N, Öztürk R, Şenyüz ÖF: The effect of H₂ receptor antagonist on small-bowel colonization and bacterial translocation in newborn rats. *Pediatr Surg Int* 1998; 13:118-120
3. Kosloske AM: Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Pediatr* 1994; 396:2-7
4. Van Camp MJ, Tomaselli V, Coran AG: Bacterial translocation in the neonate. *Curr Op Pediatr* 1994; 6:327-333
5. Hanson LA, Ashraf R, Cruz JR, Hahn-Zoric M, Jalil F, Nave F ve ark.: Immunity related to exposition and bacterial colonization of the infant. *Acta Pediatr Scand (Suppl)* 1990; 356:38-45
6. Hansbrough F, Priebe Jr JC, Falterman KW, Bornside GH, Welsh RA: Pathogenesis of early necrotizing enterocolitis in the hypoxic neonatal dog. *Am J Surg* 1983; 145:169-175
7. Başaklar AC: Yenidoğanın Cerrahi Hastalıkları. Ankara: Palme Yayıncılık, 1994:441-451
8. Rowe MI: The intestinal barrier and its relationship to pediatric infections. *Pediatric Cerrahi Dergisi* 1994; 8:5-10
9. Karna P, Senagore A, Chou CC: Comparison of the effect of asphyxia, hypoxia and acidosis on the intestinal blood flow and oxygen uptake in newborn piglets. *Pediatr Res* 1986; 20:929-932
10. Touloukian RJ, Posch JN, Spencer R: The pathogenesis of ischemic gastroenterocolitis of the neonate: Selective gut mucosal ischemia in asphyxiated neonatal piglets. *J Pediatr Surg* 1972; 7:194-205
11. Kleigman RM: Models of pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 1988; 8:151-152

12. Cohen TI, Nelson SD, Moxley RA, Hirsh M, Counihan TC, Martin RF: Necrotizing enterocolitis in a neonatal piglet model. *J Pediatr Surg* 1991; 26:598-601
13. Van Camp MJ, Drongowski RA, Gorman R, Altabba M, Hirschl BR, Coran AG: Colonization of intestinal bacteria in the normal neonate: Comparison between mouth and rectal swabs and small and large bowel specimens. *J Pediatr Surg* 1994; 29:1348-1351
14. Urao M, Moy J, Van Camp MJ, Drongowski RA, Altabba M, Coran AG: Determinant of bacterial translocation in the newborn: Small bowel versus large bowel colonization. *J Pediatr Surg* 1995; 30:831-836
15. Goldmann DA: Bacterial colonization and infection in the neonate. *Am J Med* 1981; 70:417-472
16. Lelli JL, Drongowski RA, Coran AG, Abrams GD: Hypoxia induced bacterial translocation in the puppy. *J Pediatr Surg* 1992; 27:974-982
17. Bell MJ, Rudinsky M, Brotherton T, Schroder K, Boxerman S: Gastrointestinal microecology in the critically ill neonate. *J Pediatr Surg* 1984; 19:745-751
18. Başaklar AC: *Medikal Embriyoloji*. Ankara: Palme Yayıncılık, 1995: 231-259
19. Ulsen M: Normal development of structure and function of the stomach and intestines. In Behrman RE, Kliegmen RM, Arvin AM (Eds). *Nelson Text Book of Pediatrics*. 15th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 1997:1059-1060
20. Bastion JF, Ruedi JM, Macpherson GA: Lymphocyte Ecto 5 nucleotidase activity in infancy. Increasing activity in peripheral blood B Cells precedes their ability synthesize IgG in vitro. *J Immunology* 1984; 132:1767-1772
21. Torliev RO, Thrane PS, Stolberg L: Development of intestinal mucosal immunity in fetal life and the first postnatal months. *Pediatr Res* 1992; 32:145-149
22. Sheard NF, Walker WA: The role of breast milk in the development of the gastrointestinal tract. *Nutr Rev* 1988; 46:1-8
23. Long S, Swenson RM: Development of anaerobic fecal flora in healthy newborn infants. *J Pediatr* 1977; 91:298-301
24. Wiewer TW: Gastrointestinal Disorders. In Robertson NDC (Ed) *Text book of Neonatology*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone Co., 1992:636-638
25. Smith HW, Crabb WE: The fecal bacterial flora of animals and man: It's development in the young. *J Pathol Bacteriol* 1961; 82:53-66
26. Yushioka H, Iseki K, Fujita K: Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. *Pediatrics* 1983; 72:317-321

- 27.Zadnikova RL, Slavikova M, Hogenova HT, Adlerberth I, Hanson LA, Wold A ve ark: The antibody response in breast-fed and non-breast-fed infants after artificial colonization of the intestine with escherichia coli O83. *Pediatr Res* 1991; 29:396-399
- 28.Mantha LJ, Urritia JJ: Intestinal colonization of breast fed children in a rural area of low socioeconomic level. *Ann N Y Acad Sci* 1971; 176:93-109
- 29.Stephens S, Dolby JM, Mantrevil J, Spik G: Differences in inhibition of the growth of commensal and enteropathogenic strains of E. Coli by lactoferrin and secretory IgA isolated from human milk. *Immunology* 1980; 41:597
- 30.György P, Jeanloz RW, Von Nikolai H, Zilliken F: Undializable growth factors for lactobacillus bifidus pennsylvanius. *Eur J Biochem* 1974; 43:29-33
- 31.Barlow B, Santulli TV, Heird WC Pitt J, Blanc WA, Schullinger JN: An experimental study acute neonatal enterocolitis-The importance of breast milk. *J Pediatr Surg* 1974; 9:587-595
- 32.Van Camp MJ, Tomaselli V, Drongowski RA, Coran AG:Bacteriel translocation in the newborn rabbits: Effect of age frequency of translocation. *Pediatr Surg Int* 1995; 10:134-137
- 33.Go LL, Albanese CT, Watkins SC, Simmons RL, Rowe MI: Breast milk protects the neonate from bacterial translocation. *J Pediatr Surg* 1994; 29:1059-1064
- 34.Panigrahi P, Gupta S, Gewolb IH, Morris JG: Occurrence of necrotizing enterocolitis may be dependent on patterns of bacterial adherence and intestinal colonization: Studies in caco-2 tissue culture and weanling rabbit models. *Pediatr Res* 1994; 36:115-121
- 35.Ford HR, Rowe MI: Sepsis and related considerations. In O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG (Eds) *Pediatric Surgery*. 5th ed. St.Louis, Missouri: Mosby Times Mirror Co., 1998:135-156
- 36.Acunaş B: Perinatal asfiksi. *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 1998; 15:123-132
- 37.Szabo JS, Stonestreet BS, Oh W: Effects of hypoxemia on gastrointestinal blood flow and gastric emptying in the newborn piglet. *Pediatr Res* 1985; 19:466-471
- 38.Whetstine LJ, Hulsey TC, Annibale DJ, Pittard WB: Supplemental oxygen and gastric pH in unfeed preterm infants. *South Med J* 1995; 88:458-461
- 39.Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V: *Bioistatistik*. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 1990:114-136

40. Bennet R, Nord CE, Zetterström R: Transient colonization of the gut of newborn infants by orally administered bifidobacteria and lactobacilli. *Acta Pediatr* 1992; 81:784-787
41. Salman FT, Buyruk MN, Gürler N, Çelik A: The effect of surgical trauma on the bacterial translocation from the gut. *J Pediatr Surg* 1992; 27:802-804
42. Go LL, Ford HR, Watkins SC, Healey PJ, Albanese CT, Donhalek A ve ark: Quantitative and morphologic analysis of bacterial translocation in neonates. *Arch Surg* 1994; 129:1184-1190

Y. C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİRİMİ