

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**FARKLI SÜRELERDE DERECELENDİRİLMİŞ
SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA
S. PNEUMONIAE VE P. AERUGINOSA'NIN ADERENSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. İlknur KUL ÇELİK

Trabzon-2005

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**FARKLI SÜRELERDE DERECELENDİRİLMİŞ
SİGARA DUMANINA MARUZ BIRAKILAN SIÇANLARDA
S. PNEUMONIAE VE P. AERUGINOSA'NIN ADERENSİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. İlknur KUL ÇELİK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Tevfik ÖZLÜ

Trabzon-2005

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1 – GİRİŞ	1
2 – GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bakteriyel Adezyon	4
2.2. Adezin ve Reseptörler.	4
2.3. Bakteriyel Adezyonu Etkileyen Faktörler	6
2.4. Sigara ve Solunum Sistemi	8
2.4.1. Sigara Dumanı	8
2.4.2. Sigaranın Solunum Sistemi Üzerine Etkileri	9
2.4.3. Sigara ve Solunumsal İmmün Yanıt	10
2.4.4. Sigaranın Bakteriyel Aderens Üzerine Etkileri	12
3 – MATERYAL VE METOD	14
3.1. Deney Hayvanları	14
3.2. Bakteriler	14
3.3. Sigara Dumanının Uygulanışı	14
3.4. Çalışma Grupları.	15
3.5. Çalışma Dizaynı	16
3.6. Bakterilerin Üretilmesi ve Süspansiyonun Hazırlanması	17
3.7. Sıçanların Yanak Mukozasından Epitel Örneği Alınması	17
3.8. Sıçanların Yanak Mukozasına Bakteri İnokülasyonu	17
3.9. Bukkal Epitel Hücre Örnekleri Alınması	17
3.10. Bakteriyel Aderensin Hesaplanması	18
3.11. İstatistiksel Yöntem	18
4 – BULGULAR	20
5 – TARTIŞMA	25
6 – SONUÇLAR VE ÖNERİLER	30
7 – ÖZET	32
8 – İNGİLİZCE ÖZET	33
9 – KAYNAKLAR	34

1 - GİRİŞ VE AMAÇ

Sigara alışkanlığı önemli bir toplum sağlığı sorunudur. Çünkü her on kişiden biri, tütün ürünlerinin neden olduğu hastalıklardan dolayı hayatını kaybetmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre yılda yaklaşık 5 milyon kişi, tütün kullanımına bağlı hastalıklar nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Sigara kullanma sıklığı aynen devam ederse, bu sayının 2020 yılında 10 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir.

Dünyada yaklaşık 1 milyar 300 milyon kişi sigara kullanmakta olup, bu nüfusun büyük kısmı gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Çoğu erkek cinsiyetlidir (1). Ülkemize ait 1994-1998 yılları arasındaki verilere göre, sigara içme sıklığı % 43 olup; erkeklerin %62'si, kadınların ise %24'ü sigara kullanmaktadır (2). Gelişmiş ülkelerde sigara içme sıklığı giderek azalırken, gelişmekte olan ülkelerde ise artmaktadır. Yani gelecekte sigaraya bağlı sağlık sorunlarının gelişmekte olan ülkelerde daha yoğun görüleceği açıktır.

Sigara içilen ortamdaki dumana maruz kalmak suretiyle (pasif içicilik) istemleri dışında sigara içmek zorunda kalan, aynı zamanda dumanın zararlı etkilerine daha hassas olanların başında, bebekler ve çocuklar gelmektedir. Çevresel sigara dumanına maruz kalanların kan ve idrarlarında, sigaranın toksik bileşenlerinin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Ülkemizde ilkökul çocuklarının $\frac{3}{4}$ 'ünün pasif içici olduğunu gösterilmiştir (3). Çevresel sigara dumanına maruz kalan çocuklar arasında yapılan araştırmalarda öksürük, hışıltılı solunum gibi semptomların; solunumsal enfeksiyonların, astım ve alerjik hastalıkların daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (4).

Sigara içimi kronik bronşit, amfizem ve akciğer kanseri gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biridir. Aktif veya pasif sigara içicisi olan kişilerde solunumsal enfeksiyonların daha sık görüldüğü ve daha ağır seyirli olduğu tespit edilmiştir (5-8). Sigaranın solunum sisteminde mukosilyer klirensi yavaşlattığı, lokal humoral ve hücrel yanıtı bozduğu, solunumsal savunma mekanizmalarını deprese ettiği bilinmektedir (9).

Çalışmalar bakteriyel invazyonun ilk aşaması olan aderensin, sigara içen kişilerde arttığını, bu artışın orofaringiyal kolonizasyon ve solunumsal enfeksiyonlarda artış ile birlikte olduğunu göstermiştir (10-14).

Sigaranın bakteriyel aderensi artırdığını bildiren çalışmalar, genel olarak uzun süre sigara içmiş kişilerde, orofaringiyal hücre örnekleri alınarak *in vitro* ortamda yapılmıştır (10-14). Saptanan aderens artışının kronik sigara içimiyle ilgili konakçı epitel hücrelerindeki olası yapısal ve fonksiyonel değişikliklere ya da sigara dumanının doğrudan etkisine bağlı olup olmadığı belirsizdir. Kronik sigara içimiyle ilgili değişiklikleri taşımayanlarda sigaranın bakteri aderensi üzerine doğrudan etkisi tam olarak aydınlatılamamıştır. Yine maruz kalınan sigara dumanının süre ve yoğunluk derecesindeki farklılıkların bakteriyel adereense etkisi, olası bir değişikliğin patojen bakteriler arasında spesifite gösterip göstermediği de belirsizdir.

Bu çalışmada sıçanlarda *in vivo* ortamda, farklı süre ve yoğunlukta çevresel sigara dumanına maruziyet sonrası, bukkal mukozal yüzeye inoküle edilen *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın aderens değerleri, sigara dumanı verilmeyen gruplar ile karşılaştırılarak; olası bir aderens değişikliğinin maruz kalınan dumanın süre ve yoğunluğuyla ilişkisi, bakteriler arasında spesifite gösterip göstermediği araştırılmıştır.

2 - GENEL BİLGİLER

2.1. Bakteriyel Adezyon

Solunumsal patojenler mukozal yüzeye bağlanmayı sağlayan yapılara sahiptir. Bakterilerin adezinler olarak adlandırılan bu yapılarıyla epitel hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanıp; mukozaya yapışmalarına “**bakteriyel adezyon**” denir. Bakteriyel adezyon, kolonizasyon ve enfeksiyonun gelişme sürecinin başlangıcındaki ilk adımdır (15, 16). Klinik olarak solunum yollarında kolonizasyon riskine neden olan durumlarda bakteriyel aderensin artmış olduğu saptanmıştır. Örneğin Johanson ve arkadaşları cerrahi sonrası orofarengeal kolonizasyon gelişen hastaların bukkal epitel hücrelerine bakteri aderensinin artmış olduğunu tespit etmişlerdir (17).

Bakteriler, epitel örtüsüne bağlanabilme ve orada canlılıklarını devam ettirebilme özelliklerine göre dokular arasında seçicilik gösterebilirler. Bu durum, yani bakterilerin belli bir dokuyu tercih ederek bağlanmaları, “**doku tropizmi**” olarak ifade edilir (15). Yapılan çalışmalarda *S. pneumoniae* hücre kültürlerinde nazofarengeal nazofarengeal epitel hücrelerine, Tip 2 alveoler epitel hücrelerine ve vasküler endotel hücrelerine spesifik olarak bağlandığı saptanmıştır (18, 19). Özellikle kistik fibrozisli ve bronşektazili hastalarda sık karşılaşılan fırsatçı patojen olduğu ifade edilen *P. aeruginosa*'nın ise solunum yollarının siliyalı epitelle örtülü bölgelerine daha fazla adere olduğu tespit edilmiştir (20, 21). *P. aeruginosa*'nın diğer Gram negatif bakterilerden farklı olarak, orofaringiyal bölgeden önce, doğrudan trakeabronşiyal sistemde kolonize olabildiği, yoğun bakımdaki hastaların seri kültür takipleriyle yapılan bir çalışmanın sonucunda görülmüştür (20). İmmunoelektron mikroskopisi ile Gram negatif bakterilerin sadece fibronektin örtüsünü kaybetmiş bukkal epitel hücrelerine bağlanabildiği gösterilmiştir (22).

2.2. Adezin ve Reseptörler

Bakteriyel adezinler ile konak hücre reseptörleri arasındaki etkileşim spesifik ve birbirini tamamlayıcı özelliktedir. Başka bir ifade ile adezinler, anahtar-kilit modeliyle reseptörleriyle bağlanırlar. Bir adezin birden fazla reseptöre bağlanabileceği gibi bir reseptör de birden fazla adezini tanıyabilmektedir. Ancak solunum yollarındaki adezin-reseptör etkileşimi tam olarak anlaşılammıştır. Epitel hücrelerine bakterinin bağlanması organizmaya spesifik, nispeten geri dönüşümsüz bir etkileşim şeklindedir. Adezinlerin reseptörlerine bağlanmalarının yarışmalı inhibisyon özelliği taşıdığı gösterilmiştir. Şöyle ki, aşırı reseptör ve adezin analogları yarışmalı etkileşimle bakteriyel adezinler ile reseptörlerinin bağlanmasını engelleyebilir (15, 16).

Bakteriyel adezinler, genel olarak protein yapıda Gram negatif bakterilerin yüzeylerinde fimbria; Gram pozitif bakterilerde ise fibril şeklinde yüzeyel uzantısal yapılardır. Bu yapılar mukozal yüzeydeki glikolipid, glikoprotein yapıdaki moleküllere bağlanmaktadır. Gram negatif bakteriler için hücre membranlarındaki reseptörler, genelde karbonhidrat bileşikleri iken; Gram pozitif bakteriler için ise, albümin benzeri protein veya glikoprotein özellikli yapılardır (15, 23).

Gram negatif bakterilerden *E. coli*, tip 1 fimbrialarıyla epitel hücresi yüzeyindeki D-mannoz rezidülerine yapışır. Aynı şekilde başka Gram negatif bakterilerin de fimbrialarıyla, D- mannoz rezidülerine yapıştığı tablo 1’de görülmektedir. *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Nisseria*, *Vibrio* gibi diğer bir çok Gram negatif bakteri de fimbria taşımakta ve genel olarak karbonhidrat bileşimli reseptörlere bağlanmaktadır (15, 16).

Fibriller, Gram pozitif bakterilerin yüzeylerinde ışınşal uzanım gösteren, fimbrial uzantılardan daha küçük adezin yapılardır. *Streptococcus*’ların yüzeylerinde fibriller lipoteikoik asit ve M proteini bileşiminden oluşmakta olup; konakçı hücresindeki glikoprotein yapısındaki fibronektine bağlanmaktadır (22, 24). *S. pneumoniae* yüzey proteinleriyle epitel yüzeyinin glikolipidleri üzerindeki Glc NAc β 1-3Gal ve Glc NAc β 1-4Gal disakkaritlerine bağlanmaktadır (19). Fimbrialar ve yüzey proteinleri yanında, bazı bakteriler kapsül yada glikokaliks örtüleri içindeki polisakkarit yapılarla da adezyon sağlayabilirler (16).

Tablo 1’de bazı bakterilerin adezin yapıları ve adere oldukları konak hücre reseptörleri özetlenmiştir.

Tablo 1. Bazı Bakterilerin Adezinleri ve Hücresele Reseptörleri (15).

Bakteri	Adezin	Reseptör
<i>S. pyogenes</i>	Lipoteikoik asit- M protein Fibriller	Fibronektin
<i>S. pneumoniae</i>	Yüzey proteini	Glc NAc1-4Gal ve Glc NAc1-3Gal
<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Shigella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Citroacter</i>	Tip I fimbria	D-mannoz
<i>E. coli</i> (üropatojenik)	Fimbria	GalNac α 1-3GalNac β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4 GlcCer (globotetrazilseramid)
<i>E. coli</i> CFA/I ve CFA/II	Fimbria	(?) GalNac β 1-4Gal α 1-4 GlcCer (GM2 gangliosid)
<i>E. coli</i> K88	Fimbria	(?) β -D-Gal / GalNac ve GlcNac
<i>E. coli</i> K99 ve K987	Fimbria	(?) GalNac β 1-4GalNac β 1-4 GlcCer
<i>V. cholerae</i>	Fimbria	Fruktoz ve mannoz
<i>Mycoplasma</i>	Membran Protein (P1 adezin)	Sialik asit; glikophorin
<i>N. gonorrhoeae</i>	Fimbria	Gal β 1-3Gal Nac β 1-4Gal
<i>Proteus</i>	Fimbria	?
<i>B. pertusis</i>	Fimbria	Steroller?
<i>P. aeruginosa</i>	Fimbria	Asialogangliosid (aGM1 ve aGM2)
<i>M. catarrhalis</i>	Fimbria	?

Gal: Galaktoz, GalNac: N-asetil galaktozamin, Glc: Glukoz, Cer: Seramid

2.3. Bakteriyel Adezyonu Etkileyen Faktörler

Bakterilerin solunum yollarına aderenslerinin esası burada yaşamlarını ve çoğalmalarını sürdürebilmelerine dayanmaktadır (25). Bakterilerin mukozal yüzeye aderenslerini etkileyen faktörler çok çeşitli olup konak hücresi, bakteri ve mikroçevre özellikleri olmak üzere üç grup içinde toplanabilir (20).

Bakterilerin aderens yetenekleri yüzeyel uzantılarının varlığı ve tipi, kapsüllerinin olup olmaması ve salgıladıkları ürünlerinin özellikleri tarafından belirlenmektedir. Bakteriler mukosilyer klirensi bozan, mukus bariyerini kıran ve epitel yüzeyini hasarlandıran ürünler salgılayarak aderenslerini kolaylaştırırlar (21). Konakçı hücrelerin taşıdıkları reseptör yapılar ve ait oldukları doku özellikleri bakterilerin adere olabilmelerini etkilemektedir. Bakterilerin çoğu nonkeratinize epitel hücrelerine adere olurken, *Streptococcus*'ların keratinize epitele daha fazla adere olduğu gösterilmiştir (26). Bukkal, nazal, trakeal epitel örnekleri alınarak yapılan bir aderens çalışmasında *P. aeruginosa*'nın trakeal ve nazal hücrelere benzeri oranlarda, bukkal epitelden daha yüksek yoğunlukta bağlandığı görülmüş, ancak mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (27). Kistik fibrozisli hastaların akciğerleri üzerinde yapılan histolojik bir çalışmada, ancak erozyone epitel hücre yüzeylerine *P. aeruginosa*'nın adere olduğu belirlenmiştir (21). Başka bir çalışmada da hasarlı trakea ve üriner sistem hücreleri arasında trakeal hücreleri daha yüksek oranlarda tercih ettikleri saptanmıştır (28).

Vücudun bağışıklık sisteminin ve solunum yollarının, lokal savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlarda solunumsal enfeksiyonların sıklığında artış olmaktadır. Kistik fibrozis, primer silyer diskinezi ve KOAH hastalarında olduğu gibi mukosilyer klirensin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, bakteriyel aderensi kolaylaştırmaktadır. Bu hasta gruplarında sıklıkla alt solunum yolu kolonizasyonlarına rastlanmaktadır (21, 29).

Epitel hücrelerinin tamir ve yenilenme süreçleri içinde hücre yüzeyindeki glikokonjugat yapılar ve sekresyonlar farklılaşmakta ve adezinlerin bağlanabileceği reseptörler çoğalmaktadır. Pnömonikal adezyonun, *Influenza A* enfeksiyonunu takiben solunum yollarının onarım veya yenilenme aşamasında en yüksek olduğu gösterilmiştir (30, 31).

Ciddi hastalıklarda konak savunmasının bozulması ve hücresel düzeyde olan değişiklikler, bakterilerin adezyon yeteneklerini artırmaktadır. Koma, hipotansiyon, trakeal

entübasyon, asidoz, postoperatif dönem gibi ağır klinik bozukluklarda, hastaların yarısından fazlasında orofarinkste Gram negatif bakteri kolonizasyonu geliştiği tespit edilmiştir. Bu gruptaki hastaların önemli bir kısmında nazokomiyal pnömoni gelişmekte olup; patogeneizde orofaringiyal Gram negatif bakteri kolonizasyonu, suçlanan faktörler arasındadır (27). Bu kolonizasyonun nedeni ağır hastalıklarda oral kavitede salınan çeşitli proteazların etkisiyle, bukkal epitel yüzeyini örten fibronektin örtüsünün sindirilmesidir (32).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, benzer şekilde malnütrisyon ve organizmanın metabolik dengesini etkileyen (renal infarkt ve azotemi gibi) akut ciddi stres hallerinde bukkal epitel hücrelerine bakteri aderensinin arttığı gösterilmiştir (33). Beslenme bozuklukları ile trakeal hücrelere aderens artışı arasında anlamlı bir korelasyon bildirilmiştir. Bu durumdaki hastalarda bakteriyel kolonizasyonun, daha çok alt solunum yollarında olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni tam olarak açık olmamakla beraber, alt solunum yolunun kolumnar epitel yapısının nutrisyonel eksikliklere karşı daha hassas olduğu söylenmiştir. Malnütrisyonlu ve kronik trakeostomili hastaların alt solunum yolu kolonizasyonlarında en sık saptanan ajan *Pseudomonas*'lar olmuştur (34).

Kronik trakeostomili hastalarda bukkal aderens, trakeostomisi olmayan sağlıklı kişilerle aynı iken; trakeal hücrelere aderens yüksek bulunmuştur. Bu çalışmayla kronik trakeostomi uygulanmasının alt solunum yollarındaki hücrelere bakteriyel bağlanmayı arttıran predispoze faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir (34).

Viral enfeksiyonlar mukozal hücrelerde hasarlanma ve yüzey değişikliklerine neden olarak aderensi kolaylaştıran faktörlerden bir diğeridir. İnfluenza virusu enfeksiyonunun *S. aureus*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*'ya bağlı pnömoni gelişiminde yatkınlığa neden olduğu bilinmekte olup; söz konusu bakterilerin influenza enfeksiyonu sonrası farengiyal hücrelere aderenslerinin arttığı, enfekte kişilerden alınan epitel hücre örnekleriyle yapılan *in vitro* bir çalışmada gösterilmiştir (31).

Alt solunum yollarında bakteriyel aderens için trakeabronşial hava akımı ve mukozal sekresyonların akışkanlığı önemli faktörlerdendir. Eğer hava akımı ve sekresyon akışkanlığında bozukluk oluşursa, bakterilerin epitel hücreleri ile olan etkileşimleri değişmektedir. Sekresyonlar ve hava akımının mücade ettiği ölçüde bakteriler epitel hücrelerine yaklaşabilmekte ve tutunabilmektedir (20, 21).

Epitelyal yüzeyin pH'ı, sekresyonlardaki proteaz ve musinlerin konsantrasyonu bakterilerin bağlanabilmelerini etkilemektedir. Gibbons ve arkadaşları üst solunum yolunun fizikokimyasal özelliklerinin normal floraya etkisini incelemişler ve pH, redoks potansiyeli, ısı, beslenme, oral sekresyonların bileşiminin normal florayı etkilediğini tespit etmişlerdir (25). Yine balgamda elastaz enzimi yüksek, Ig A düzeyi düşük olduğunda bakteriyel aderensin arttığı bulunmuştur (35).

2.4. Sigara ve Solunum Sistemi

2.4.1. Sigara Dumanı

Sigara dumanı; tütünün yanmasıyla oluşan gaz ve mikropartiküller halindeki kimyasal maddeleri içeren aerosol halindeki bir gaz karışımıdır. Bileşiminde 6000 çeşit sağlığa zararlı madde rapor edilmiştir. Bu maddelerin hepsi üzerinde ayrıntılı çalışma yapılamamış olmakla beraber; sağlığa zararlı bileşenlerin en önemlileri karbonmonoksit, katran ve nikotindir. Nitrik oksit, formaldehit, akrolein, feno ve piridin bileşikleri dumanın içeriğinde diğer önemli maddelerden bazılarıdır (5, 36).

Sigara dumanındaki bu maddelerin hücresel elemanları, proteinleri, lipidleri, DNA'yı tahrip edici, mutasyonlara yol açıcı etkileri olduğu bilinmektedir. Solunum ve kalp damar sistemi başta olmak üzere, tüm vücutta bir çok zararlı etkileri gösterilmiştir. Özellikle katran bileşiklerinden polisiklik aromatik hidrokarbonların etkin tümör başlatıcı maddeler oldukları saptanmıştır. Sigara denilince ilk akla gelen madde olan nikotin ise, son derece bağımlılık yapıcı olup; sempatik sistemi uyarıcı ve koroner damarları daraltıcı etkileriyle kardiyovasküler hastalıkların riskini artırmaktadır. Sigara içiciliğinin önemli bir yönü çevredekilerin de dumanın bu zararlı etkilerine maruz kalıyor olmasıdır. Çünkü sigaranın yanmasıyla oluşan dumanın % 45'i içici tarafından inhale edilirken % 55'i yanan sigara ucundan veya nefesle dışarı verilmektedir (5, 36, 37).

Sigara içen kişi her nefeste 30-80 ml duman inhale etmekte ve inhale edilen dumanın her mililitresinde partikül çapı 0.3-0.5 μm arasında değişen $0.3-3 \times 10^9$ tanecik bulunmaktadır (36-38). Sigaranın toksisiteden sorumlu en önemli maddeler oldukları ifade edilen katran ve nikotin bileşikleri bu tanecikli yapı içinde bulunmaktadır. Dumandaki tanecikler daha yoğun olarak akciğerlerin üst kısımlarında ve bronşların subsegmental dallanma noktalarında birikmekte ve bu birikime bağlı olarak solunum yollarında

bronşiolit, takip eden süreçte alveoler destrüksiyon ve sentrilobüler amfizem gelişebilmektedir (36).

Sigaranın toplumsal açıdan değerlendirildiğinde ölümcül olan akciğer kanseri, kronik bronşit ve koroner kalp hastalıklarına yol açtığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda tütün kullanım alışkanlığı olan toplumlarda akciğer kanserinden kaynaklanan ölümlerin %80-90'ından, kronik bronşit ve amfizemin %75-90'ından, koroner kalp hastalıklarının %25-30'undan sigara içiminin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Sigara dumanı çok sayıda kanserojen madde içerdiğinden vücudun diğer organlarında da kanser riskini artırmaktadır. Tüm kanser ölümlerinin % 30'u sigaraya atfedilmektedir. Sigara insan ömrünü ortalama 5-8 yıl kısaltmaktadır (39).

2.4.2. Sigaranın Solunum Sistemi Üzerindeki Etkileri

Sigara dumanının mukozal yüzey, bronşiyal duvar, alveoler de dahil olmak üzere tüm solunum sisteminde histolojik değişikliklere neden olduğu söylenebilir. Sigaranın alt solunum yollarında neden olduğu mukosilyer, inflamatuvar mukozal değişiklikler ve nükleer atipi gelişimi, benzer şekilde üst solunum yollarında da görülebilmektedir (40).

Dumanın ilk temas ettiği alan ağız kavitesi olduğu için dumandaki bileşiklerin ilk etkilediği yer de burasıdır. Bu etkiler arasında ağızdaki enzimatik ve biyokimyasal değişiklikler, ağız florasının farklılaşması, periodontitis, zamanla diş kaybına neden olabilecek diş eti ve diş çevresi kemik dokusunun dejenerasyonu, çürük insidansında artma, oral dokular ve protezlerde pigmentasyon ve kanserler sayılabilir (41, 42).

Sigara kullanımı ile tükürükteki yüksek laktobasil sayısı ve mantar varlığı arasında ki korelasyon Sakki ve Knuuttila tarafından 780 kişi üzerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu olgularda *S. mutans* varlığının da sigara içimi ile bağlantılı olduğu saptanmıştır (43). Raman ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, sigara içen kişilerin ağız epitel hücrelerinde pnömokokal aderensin arttığı bulunmuştur. Hatta bu çalışmada sigara içmeyen kişilerin ağız içi epitel hücrelerinin, sigara içen kişilerin tükürüklerinde bekletilmesi halinde bile bakteriyel aderensin artmış olduğu görülmüştür (12).

Sigara içen kişilerin bronşiyal mukoza biyopsilerinde, epitel hücreleri ve mukus salgılayan hücrelerin (goblet hücreleri) sayısında artma, submukozal bez kütlelerinde artma, silialarda bozulma ve mononükleer hücre infiltrasyonu gösterilmiştir (36).

Sigara çok yoğun miktarda toksik serbest oksijen radikalleri içermektedir ($>10^{14}$ /puff ve 10^{18} gram/katran) (36, 44). Yine nötrofil ve makrofajlardan serbest O_2 radikalleri üretimini artırmaktadır. Bu muazzam oksidatif strese vücudun antioksidan koruyucu glutasyon, süperoksit dismutaz, katalaz gibi enzim sistemleriyle karşı konulmaktadır. Sigara kullanan ve KOAH gelişen olgularda sistemik oksidanlar artarken antioksidanların azalmış olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca sigara oksidatif etkisiyle hücre zarlarının lipid komponentlerini ve akciğerin ekstrasellüler komponentlerini hasara uğratmaktadır. Elastin ve kollojen yapılar zarar görmekte, elastin sentezi bozulmaktadır. Oluşan oksidatif stres ve proteazlara bağlı yıkım sayesinde hava yolları ile alveollerde kalıcı hasar geliştiği ispatlanmıştır (36, 45-48).

Sigara akciğer kanser gelişimi için major risk faktörüdür. Sigara içen kişilerin epitel örtülerinde hasar sonucu metaplazik ve displazik değişiklikler saptanmıştır. Öyle ki; aktif veya pasif olarak alınan sigara dumanının süresiyle orantılı olarak, çok katlı siliyalı epitelde önce squamöz metaplazi, sonrasında karsinoma in situ hatta invaziv bronkojenik karsinomaya kadar varan yapısal değişiklikler oluşmaktadır (5).

2.4.3. Sigara ve Solunumsal İmmün Yanıt

Sigara dumanı inhalasyonu, hava yollarındaki epitel hücrelerini uyarak IL-2, IL-8, TNF- α ve GM-CSF serbestleşmesine neden olmaktadır (51, 52). IL-2, makrofaj ve CD8 (+) T lenfositlerin göçüne ve bunlardan serbestlenen sitokinler ve proteazlar sayesinde doku yapılarında hasara neden olmaktadır. IL-8 ise, epitelyal ve subepitelyal tabakaya nötrofillerin birikimini sağlamaktadır. Nötrofillerden nötrofil elastaz enzimi salınmasıyla siliyalarda yavaşlama, epitel hücrelerinde yıkım ile birlikte; bu hücrelerden de IL-8 serbestleşmesi ve bunun yanında goblet hücrelerinden mukus oluşumuna neden olmaktadır. Dokuda bulunan α_1 -antitripsin enzimi, nötrofil elastaz enziminin inhibitörüdür. Sigaradaki oksidan maddeler, bu enzimin inaktivasyonuna neden olurlar. Antiproteaz enzim sisteminin sigaraya bağlı inaktivasyonu, doku hasarına neden olmaktadır (36, 45, 49, 50).

Sigara, bronkoalveolar lavaj sıvısındaki (BAL) hücre oranlarını değiştirmektedir. Sigara içenlerde sağlıklı kişilere oranla, özellikle alveoler makrofajlar ve nötrofiller olmak üzere toplam hücre sayısı artmaktadır. İçilen sigara miktarıyla orantılı olarak BAL'da IL-1 β ve IL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin düzeyinde artma saptanmıştır. Ayrıca BAL sıvıları

ve serumlarında immunoglobulin düzeyinin yükseldiği tespit edilmiştir. Ayrıca fibronektin, lizozim ve kompleman komponentlerinin düzeylerinde de artış saptanmıştır (9). Yine sigara kullanımının yoğunluğu ile ilişkili olarak, özellikle sigaraya bağlı KOAH gelişen hastalarda CD8 (+) T lenfositlerinin artmış, Thelper/Tsupressör hücre oranının azalmış olduğu çalışmalarda gözlenmiştir (53). Costabel ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sigara içenlerin bronkoalveolar lavaj sıvısında CD4/CD8 oranında azalma ve CD8 oranında artışın sigara-paket yılı ile orantılı olduğu saptanmıştır. Sigara içenlerin dolaşımdaki CD8 (+) T lenfositlerinin de artmış olduğu belirlenmiştir (54). Bunun yanında, sigara, kemik iliğinde hemopoezi uyarmakta, kandaki nötrofil ve diğer lökosit gruplarının sayısını artırmaktadır (9).

Sigara içen kişilerin alveolar makrofaj sayısının 3-5 kat; nötrofil sayısının ise hafif arttığı tespit edilmiştir. Bu kişilerin alveolar makrofajlarında çap artışı, yüzeyel morfolojik değişiklikler olmaktadır. Alveolar makrofajlardaki sayı ve morfolojik değişiklikler yanında, metabolik ve fonksiyonel etkilenmeler de meydana gelmektedir. Makrofajlardaki lizozim enzim düzeyi azalmakta, glukoz kullanımı artmakta, artan O₂ tüketimi daha fazla O₂ ve H₂O₂ açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, sigara, alveolar makrofajların immün fonksiyonlarını da azaltmaktadır. Antijen sunumu ve lenfoproliferatif yanıt oluşumunda gecikme olmaktadır (9, 55, 56).

Sigara içenlerde alveolar makrofajların öldürme ve sindirme kabiliyetlerinin, sigara içmeyenlere göre azalmış olduğu gösterilmiştir. Savici ve arkadaşlarının çalışmasında sigara içen asemptomatik ve sigara içmeyen kişilerin alveolar makrofajlarının, bir fakültatif intraselüler mikroorganizma olan *L. monositogenesis*'i fagosite etme kabiliyeti ve mikrobisidal aktivesi karşılaştırılmış ve anlamlı bir farkın olmadığını belirlenmiştir. Ancak sigara içmeyenlerin alveolar makrofajları, fagosite edilen *L. monositogenesis*'i öldürmesine karşın; sigara içenlerin alveolar makrofajlarında bakterisidal ve bakteriostatik aktivitenin olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışma, sigara içenlerin alveolar makrofajlarının immün fonksiyonlarında defekt olduğunu desteklemektedir (57).

2.4.4. Sigaranın Bakteriyel Aderens Üzerine Etkileri

Aktif veya pasif sigara içiminin her ikisinin de bakteriyel pnömoni gelişimi için risk faktörü olduğu kanıtlanmıştır. Pasif sigara içicisi durumundaki çocuklar ve sağlıklı erişkinlerde solunumsal enfeksiyonların daha sık görülmekte ve daha ağır seyretmekte

olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmıştır (4-9). Benzer şekilde sigara içenlerde *Influenza A* infeksiyonunun daha sık tekrarlayıp, daha ağır seyrettiği tespit edilmiştir (58). Ayrıca toplum kökenli pnömoni olgularında, hastanede yatış gereksinimi sigara içenlerde daha fazla olmaktadır (9). Sigaraya bağlı olarak solunum sisteminde kolonizasyon riski artmakta; sık karşılaşılan ajan patojenlerden daha farklı mikroorganizmalar etken olarak görülebilmektedir. Örneğin, *Legionella* pnömonisi için sigara kullanımının bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuştur (59).

Sigara dumanı genel olarak mukozal yapılarda hasarlanma, mukus salgılamında artma, mukosilyer klirenste bozulma, epitelyal ve endotelial permeabilite artışına neden olmakta ve bozulan lokal immün yanıt sonucunda bakterilere karşı solunumsal savunma mekanizmalarını zayıf düşürmektedir. Hasarlı epitel yüzeyi ve üzerindeki mukusa bakterilerin adezyonunu kolaylaştırmaktadır (9, 21).

Kronik bronşitli sigara içicisi kişilerin, alt solunum yollarında sağlıklı kişilerin nazofarengeal floralarında bulunan *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catharralis* ve koagülaz negatif stafilokoklar kolonize olabilmektedirler. Ağır KOAH'lı hastaların transtrakeal aspirat kültürleri alınarak yapılan bir çalışmada, hastaların % 50'sinin trakeabronşiyal sistemlerinden mikroorganizma üretilmiştir. Ancak günde bir paketten az sigara kullanımı olan veya uzun süreli sigara kullanım öyküsü olmayan hastaların trakeabronşiyal sistemleri steril bulunmuştur. Bu çalışmada uzun süreli veya yoğun sigara kullanmış hastaların transtrakeal aspiratlarında *S. viridans* sıklıkla izole edilmiştir (11).

Riise ve arkadaşları, *H. influenzae*'nin kronik bronşitli hastaların siliya ve goblet hücrelerine, sigara içmeyen sağlıklı kişilerin hücrelerinden daha iyi yapıştığını; fakat *S. pneumoniae* için bu duruma uymayan farklı sonuçlar elde ettiklerini açıklamışlardır. *S. pneumoniae*'nin sigara içen kişilerin orofaringiyal hücrelerine bağlanma eğilimi olduğunu bulmuşlardır (13). Benzer sonuçlar Fainstein ve Musher tarafından sigara içen, içmeyen ve kronik bronşitli hastalardan alınan farengiyal hücrelere farklı bakterilerin aderensinin incelendiği bir çalışmanın sonucundan elde edilmiştir. Bu çalışmada sigara içenlerde pnömokokal adherensin; kronik bronşitte ise *H. influenzae* aderensinin arttığı tespit edilmiştir (10).

Raman ve arkadaşlarının bir çalışmasında, sigara içenlerde bukkal epitel hücrelerine pnömokokal adherensin, sigara içme süresinden bağımsız olarak artmış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma gruplarından hastaların bazılarında sigarayı bıraktıktan 3 yıl

sonra dahi pnömokokal aderensin artmış olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada, sigara içmeyenlerin bukkal epitel hücreleri, sigara içenlerin tükürüklerinde bekletildiğinde pnömokok aderensinin artmış olduğu saptanmıştır (12).

Sigara içen ve içmeyen gruplarda *S. pneumoniae*, *H. influenzae* *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'nın bukkal epitel hücrelerine adezyonlarının değerlendirildiği bir çalışmada, sigara içen kişilerde sadece *S. pneumoniae* aderensinin artmış olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun sigaranın epitel yüzeyinde pnömokokların bağlandığı spesifik Glc NAc β 1-4 Gal disakkarit dizisini artırması yoluyla olduğu tahmin edilmektedir (14).

Yapılan çalışmaların sonucunda sigaranın bakteriyel enfeksiyonları ve enfeksiyon sürecinin başlangıcındaki ilk basamak olan bakteriyel aderensi artırdığı gösterilmiştir. Bu da sigaranın solunum yollarında neden olduğu histolojik ve immünolojik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir.

3 - MATERYAL-METOT

3.1. Deney Hayvanları

Daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış 36 adet Sprague Dawley cinsi, 4 aylık, ortalama 200 gram ağırlığında sıçanlar seçildi. Sıçanlar her bir kafeste 3 sıçan kalacak şekilde 22-24 derece oda ısısında güneş ışığı alan ve havalandırılması yapılan bir mekanda barındırıldı ve ad libitum* olarak beslendi. Beslenmeleri için (Samsun Yem Sanayi Tic A.Ş. ait) hazır fare yemi kullanıldı. Yemin içeriği %88 kuru madde, %16 ham protein, %14 selüloz, %1 HCL'de çözünmeyen kül, %0.8-1.5 Ca, %0.5 P, %1 NaCl, %0.2-0.4 Na, 10.000 İÜ vit A, 1500 İÜ vit D, 30 İÜ vit E kullanılan kuru maddeler: Mısır, Buğday, Kepek, Razmaol, Soya Küspesi, Fındık Küspesi, Çavdar, Ayçiçeği, DCP, Kireç Taşı, Tuz, Melas, Pancar Tohumu, Tapiyoka, Sorgum, İyot, Demir, Mangan, Bakır, Çinko, Kobalt, Selenyumdan oluşmaktaydı.

3.2. Bakteriler

Çalışmada kullanılmak üzere solunumsal patojenlerden *S. pneumoniae* (American Type Culture Collection (ATCC) 49619) ve *P. aeruginosa* (ATCC 43088) seçildi. Bakteriler Karadeniz Teknik üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarındaki stoklardan temin edildi.

3.3. Sigara Dumanının Uygulanışı

Sıçanların sigara dumanına maruziyetini sağlayabilmek için 30x25x20 cm ebatlarında, üstten kapaklı cam kutular kullanıldı. Kutuların bir köşesinde 0.5 cm çapında enjektör ucu girebilecek kadar büyüklükte bir delik oluşturuldu. Çalışmada Tekel 2001 marka filtreli sigara kullanıldı. Sigara dumanı, sigaraya bir ağızlıkla birleştirilmiş enjektör vasıtasıyla aspire edildi. Her seferinde 50 cc sigara dumanı aspire edilerek sıçanlar cam kutu içine koyulduktan sonra kutu üzerindeki delikten içeriye püskürtüldü.

*Ad libitum: Hayvanların önlerinde devamlı yem bulundurulması yapılan besleme şeklidir.

3.4. Çalışma Grupları

Sigara dumanının verilmiş süresine göre, sıçanlar önce iki gruba ayrıldı. Bir gün süre ile sigara dumanı verilen grup akut (kısa süreli) maruziyet grubu, üç hafta süre ile duman verilen sıçanlar ise kronik (uzun süreli) maruziyet grubu olarak belirlendi. Daha sonra her iki grup içerisinde, sigara dumanı yoğunluğu derecesine göre üçer subgrup oluşturuldu. Her üç subgruptan birisi dumana maruz kalmayan kontrol grubu olarak çalışıldı (Tablo 2). Düşük duman grubundaki sıçanlar %6.5 oranında sigara dumanı içeren ortamda (her bir kafese 400 cc duman verildi) bekletilirken, yoğun duman grubundaki sıçanlar %13 oranında duman içeren ortamda (her bir kafese 800 cc duman verildi) bekletildi. Bu işlem her bakteri suşu için ayrı ayrı uygulandı ve her bakteri için toplam 18 adet sıçan kullanıldı.

Tablo 2. Sigara dumanına maruziyet süresi yoğunluğuna göre çalışma grupları

18 SİÇAN	Akut maruziyet gr. (9 sıçan)	Subgrup 1: Kontrol Subgrubu (3 sıçan) Subgrup 2: Düşük Duman Subgrubu (3 sıçan) Subgrup 3: Yoğun Duman Subgrubu (3 sıçan)
	Kronik maruziyet gr (9 sıçan)	Subgrup 1: Kontrol Subgrubu (3 sıçan) Subgrup 2: Düşük Duman Subgrubu (3 sıçan) Subgrup 3: Yoğun Duman Subgrubu (3 sıçan)

Her bir subgrup için üç ayrı kafes alındı; kontrol, düşük duman, yoğun duman subgrupları olarak etiketlendirildi. Her bir subgrupta sıçanlar kuyruklarından farklı renklerle boyanıp işaretlendirildiler ve numaralandırıldılar. Bu şekilde deney süresince subgrupların ayrı ortamlarda barındırılması sağlandı.

3.5. Çalışmanın Planlanması

A. AKUT MARUZİYET GRUBU

Çalışma sabahı sıçanlar kafeslerinden alınarak aynı şekilde üzerleri işaretli ve numaralı cam kutulara teker teker yerleştirildi ve kapakları kapatıldı. Takiben kontrol subgrubu hariç, diğer sıçanların yerleştirildiği cam kutulara, kutu üzerindeki delikten belirtilen miktarlarda sigara dumanı püskürtüldü ve delik kapatıldı. Hayvanların bu ortamda 1 saat süreyle bekletilmesi sonrasında cam kutular içinden alınarak normal yaşamlarını sürdürdükleri kafeslerine konuldu. 4 saat'lik bir aradan sonra aynı işlem tekrar edildi. Böylece sıçanlar bir günde 2 kez (4 saat arayla) olmak üzere 1'er saat süreyle sigara dumanına maruz bırakılmış oldu.

Sigara dumanı maruziyetinin hemen ardından, sıçanların bir yanak mukozalarından bukkal epitel hücre örnekleri alındı. Diğer yanak mukozalarına ise çalışılan bakteri inoküle edilip bir saat oda havasında bekletildikten sonra, o taraf yanak mukozasından da epitel örnekleri alındı.

B. KRONİK MARUZİYET GRUBU

Akut maruziyet grubunda olduğu şekilde sıçanlar günde 4 saat ara ile 1'er saat süreli sigara dumanına bırakıldı. Ancak bu işleme aralıksız 3 hafta süre ile her gün devam edildi. Son maruziyetin hemen ardından, yukarıda belirtildiği gibi, tekrar sıçanların bir yanak mukozalarından bukkal epitel hücre örnekleri alındı. Diğer yanak mukozalarına ise çalışılan bakteri inoküle edilip bir saat oda havasında bekletildi. Takiben o taraf yanak mukozasından da epitel örnekleri alındı. Deneyin yapılışı şekil 1'de şematik olarak gösterilmektedir.

3.6. Bakterilerin Üretilmesi ve Süspansiyonlarının Hazırlanması

Deneyde kullanılması planlanan bakteri suşlarından *S. pneumoniae* %5-10 CO₂ içeren mumlu kavanozda, *P. aeruginosa* ise atmosferik şartlarda, %5 kanlı agarda 37°C'de bir gece inkübe edildi. Üreyen kolonilerden öze ile bakteri alınarak 10 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonuyla süspanse edildi. Mc Farland bulanıklık tüpleri kullanılarak 10⁸ bakteri/ml olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyondaki canlı

bakteri sayısının (viable count) belirlenmesi için stok bakteri süspansiyonundan logaritmik sulandırılmalar yapıldı. Sulandırılardan kanlı besiyerine ekimler yapıp inkübasyonlarını takiben oluşan koloniler sayıldı. Dilüsyon faktörleri göz önünde bulundurularak stok sulandırımdaki canlı bakteri sayısı doğrulandı.

3.7. Sıçanların Yanak Mukozalarından Epitel Örneklerinin Alınması

Yanak mukozalarından epitel hücreleri alınmak istenilen tüm sıçanlar herhangi bir anestezi madde verilmeksizin boyun ve kuyruk bölgelerinden nazikçe tutuldu. Steril bir eldiven ve lanset yardımıyla aynı taraf yanak mukozası hafifçe sıyrıldı. Bu işlem ard arda 3 kez yapıldı. Lansetler, her rat için ayrı ayrı belirlenmiş 10 ml PBS solüsyonu içeren steril tüplere yerleştirildi.

3.8. Sıçan Yanak mukozasına Bakteri İnokülasyonu

Bukkal epitel hücre örnekleri alma işlemi tamamlandıktan sonra, hazırlanan bakteri süspansiyonundan steril pamuk uçlu kültür çubuklarına 1 ml emdirildi ve mukozal kazıntı alınmamış diğer yanak mukozasına sürüldü. Her bir sıçan için ayrı kültür çubuğu kullanıldı. Bakteri inokülasyonu yapılan sıçanlar ayrı bir kafes içinde 1 saat bekletildi. 1 saatin sonunda inokülasyon yapılan yanak mukozasından aynı şekilde steril olarak lanset yardımıyla mukoza hafifçe sıyrılarak 3 kez bukkal epitel örnekleri alındı. Yine lansetler PBS solüsyonu içeren steril tüpler içine konuldu. Bakteri inoküle edilip ardından epitel örnekleri alınan sıçanlar eter içeren kapalı bir kap içine konularak öldürüldü.

3.9. Bukkal Epitel Hücre Örneklerinin Hazırlanması

Tüpü hafifçe çalkalayarak hücreleri lansetlerden ayırdıktan sonra lansetler steril bir penset yardımıyla çıkarıldı. Vortekste 30 sn karıştırıldı. Süspansiyon 10µm porlu, 25mm çaplı polikarbonat filtre yerleştirilen filtre kabı içinden süzüldü. Aynı şekilde filtratdaki adere olmayan bakterileri uzaklaştırmak amacıyla 10'ar ml steril PBS solüsyonuyla 3 kez nazikçe yıkama yapıldı. Takiben filtre, filtrasyon yüzeyi lamın üzerinde olacak şekilde lama alındı. Filtre oda havasında kurutulduktan sonra lam üzerinden alındı. Lam yüzeyindeki filtrat metil alkol damlatılarak tespit edildi. Tespit işleminin ardından Gram boyama yöntemiyle boyanan örnekler mikroskoba alındı. Hazırlanan her bir preparata

100'lük objektif altında epitel hücrelerine tutunmuş bakteriler 40 hücre üzerinde Gram boyama ve morfolojik özelliklerine göre ayrılarak sayıldı. Bu şekilde bir subgrupta üç sıçanın yanak mukozasından elde edilen toplam 120 epitel hücresinin adere olan bakteri sayısı belirlendi.

3.10. Bakteriyel Aderensin Hesaplanması

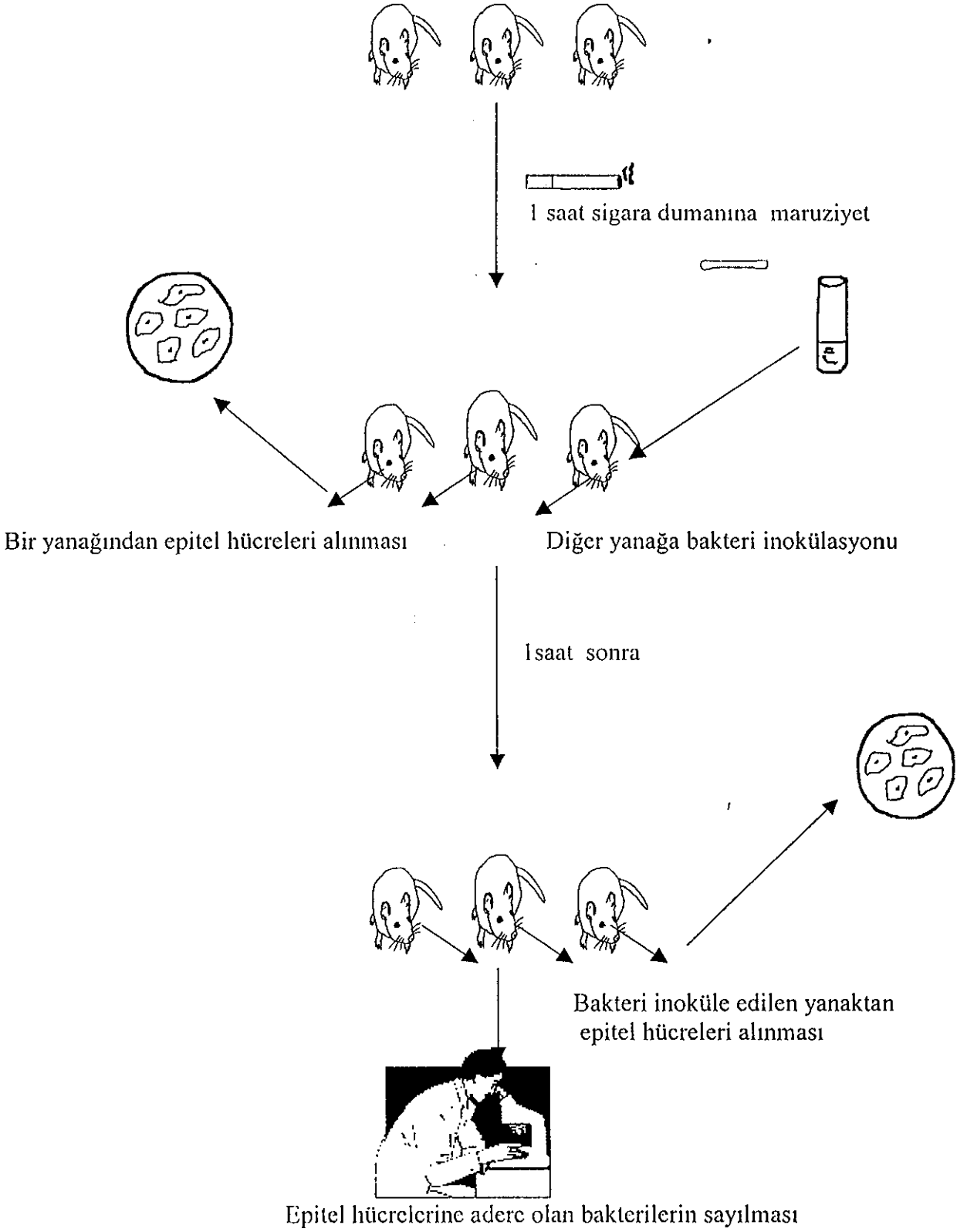
Çalışmada her bir subgrupta sıçanların bir yanağından alınan epitel hücrelerine adere olan bakteri sayılarıyla, bakteri inoküle edilen diğer yanağından alınan epitel hücreleri üzerindeki bakteri sayıları karşılaştırılarak bakterinin adere olup olmadığı; eğer aderens gerçekleşmiş ise, adere olan ortalama bakteri sayısı tespit edildi. Pnömonokların inoküle edildiği gruplarda öncesinde alınan epitel hücrelerindeki adere Gram pozitif bakteri sayıları ile pnömokok inoküle edildikten sonra belirlenen adere Gram pozitif bakteri sayılarının her epitel için farkları belirlendi. Bu değerlerin bir subgrubu oluşturan toplam 120 hücre için ortalamaları alındı. Sigara verilen çalışma gruplarında belirlenen değerler kontrol gruplarının değerleriyle karşılaştırıldı. Böylece sigaranın pnömokokkal aderens üzerine olası etkisi araştırıldı.

Aynı şekilde *Pseudomonas* inokülasyonu yapılan gruplarda da inokülasyon öncesi adere Gram negatif bakteri sayıları ile inokülasyon sonrası belirlenen Gram negatif bakteri sayılarının her bir epitel hücrelerindeki farkları tespit edilerek adere olan bakteri sayısı bulundu. Bu değerlerin toplam hücre sayısına bölünmesiyle bir subgrubtaki ortalama bakteri aderens belirlendi. Ortalama bakteriyel aderens değerleri kontrol grubu ve sigara verilen gruplar arasında karşılaştırılarak sigaranın çalışılan bakteri suşunun aderensine etkisi araştırıldı.

3.11. İstatistiksel Yöntem

İnokülasyon öncesi ve sonrası bakteriyel aderens değerleri Wilcoxon Signed Ranks testiyle karşılaştırılarak, *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın belirlenen aderens değerlerinin anlamlı olup olmadığı tespit edildi. Sigara dumanı verilen gruplar ile kontrol gruplarının karşılaştırılması Mann Withney U testiyle yapıldı. Her bir subgrup için ortalama bakteriyel aderens değeri ortalama değer±standart sapma olarak verildi. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alındı.

Şekil 1. Dencyin Yapılışı:



4 - BULGULAR

Çalışmada toplam 36 sıçan ve 2 bakteri suşu kullanıldı. Bir bakteri suşu için toplam 18 sıçan olmak üzere, her biri 3 sıçandan oluşan 6 çalışma grubu oluşturuldu. Sıçanların bir yanakları ve bakteri inoküle edilen diğer yanaklarının her birinden 40 tane epitel hücresinin üzerindeki adere olan bakteriler sayıldı. İnokülasyon sonrası adere olan bakteri sayıları tespit edilerek her bir subgrup için ortalama bakteriyel aderens değerleri bulundu. Bulunan değerler ortalama değer±standart sapma olarak verildi. Aderens değerlerinin anlamlılığı *p* değerleriyle tabloda gösterildi.

S. pneumoniae Aderensi

Akut ve kronik maruziyet grubu sıçanlarda ortalama *S. pneumoniae* aderens değerleri Tablo 3’de gösterilmektedir.

Tablo 3. *S. pneumoniae*’nin Akut ve Kronik Maruziyet Grubunda Ortalama Aderensi

Çalışma Grupları	Ortalama Bakteriyel Aderens±Standart Sapma	<i>p</i>
Akut Maruziyet		
Kontrol	3.9 ± 13.1	<i>p</i> : 0.002
Düşük D.	2.4 ± 7.9	<i>p</i> : 0.000
Yoğun D.	1.3 ± 8.2	<i>p</i> : 0.003
Kronik Maruziyet		
Kontrol	1.1 ± 5.5	<i>p</i> : 0.007
Düşük D.	4 ± 17.2	<i>p</i> : 0.004
Yoğun D.	7.7 ± 12.9	<i>p</i> : 0.000

S. pneumoniae inokülasyonu sonrası tüm gruplarda Gram pozitif bakteri aderensinde anlamlı artış saptandı. Kontrol grubu sıçanlar ve sigara dumanı verilen gruplardaki sıçanların tümünde *S. pneumoniae*'nin bukkal epitele adere olduğu görüldü.

Akut ve kronik maruziyet grubunun düşük ve yoğun duman subgruplarında tespit edilen ortalama pnömokokal aderens değerlerinin eş zamanlı oda havasında bekletilen kontrol sub grubundaki sıçanlarla karşılaştırılmaları sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 4'de sunulmaktadır.

Tablo 4. *S. pneumoniae*'nin Akut ve Kronik Maruziyet Gruplarındaki Ortalama Aderensinin Kontrol Subgruplarıyla Karşılaştırılma Sonuçları

<i>Çalışma Grupları</i>	<i>Ortalama Bakteriyel Aderens</i> ± <i>Standart Sapma</i>	<i>p</i>
Akut Maruziyet		
<u>Kontrol</u>	<u>Düşük D.</u>	
3.9 ± 13.1	2.4 ± 7.9	<i>p</i> : 0.127
<u>Kontrol</u>	<u>Yoğun D.</u>	
3.9 ± 13.1	1.3 ± 8.2	<i>p</i> : 0.301
Kronik Maruziyet		
<u>Kontrol</u>	<u>Düşük D.</u>	
1.1 ± 5.5	4 ± 17.2	<i>p</i> : 0.056
<u>Kontrol</u>	<u>Yoğun D.</u>	
1.1 ± 5.5	7.7 ± 12.9	<i>p</i> : 0.000

Akut maruziyet grubunda kontrol ile sigara dumanı verilen subgrupların ortalama *S. pneumoniae* aderensi değerleri karşılaştırıldığında, sigara verilen gruplarda hafif bir azalma olmakla beraber; aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Akut olarak düşük veya yoğun miktarda maruz kalınan sigara dumanının *S. pneumoniae*'nin bukkal epitel hücrelerine aderensini etkilemediği düşünüldü.

Kronik maruziyet grubundaki sigara dumanı verilen subgruplar kontrol gruplarıyla karşılaştırıldıklarında, yoğun dumana maruz bırakılan sıçanlarda pnömokokal aderenste kontrol grubuna göre anlamlı artma saptandı.

S. pneumoniae aderenesi çalışılan tüm gruplarda bukkal hücrelere pnömokokal aderenisin olduğu ve kronik olarak yoğun dumana maruz bırakılan grupta pnömokokal aderenisin anlamlı olarak artmış olduğu tespit edildi.

P. aeruginosa Aderenisi

Akut ve kronik maruziyet grubu sıçanlarda ortalama *P. aeruginosa* aderenis değerleri Tablo 5’de gösterilmektedir.

Tablo 5. *P. aeruginosa*’nın Akut ve Kronik Maruziyet Grubunda Ortalama Aderenisi

Çalışma Grupları	Ortalama Bakteriyel Aderenis±Standart Sapma	p
Akut Maruziyet		
Kontrol	0.0 ± 34.8	p: 0.687
Düşük D.	-1.4 ± 18.5	p: 0.921
Yoğun D.	-8.5 ± 29.7	p: 0.204
Kronik Maruziyet		
Kontrol	-0.6 ± 30.5	p: 0.800
Düşük D.	6.3 ± 33	p: 0.099
Yoğun D.	1.1 ± 29.2	p: 0.239

Çalışma gruplarında *P. aeruginosa* inokülasyonu sonrası ortalama bakteriyel aderenste anlamlı bir değişikliğin olmadığı görüldü. Çalışmamızdaki sigaraya maruz bırakılan sıçan grupları ve kontrol gruplarında *P. aeruginosa*’nın istatistiki anlam ifade eden bir değerde bukkal epitele adere olmadığı tespit edildi.

Yine kontrol grubu ile sigara dumanı verilen çalışma grupları karşılaştırılarak, sigara verilen gruplarda psedomonal aderenste artma veya azalma olup olmadığı değerlendirildi. Grupların karşılaştırma sonuçları Tablo 6’da gösterilmektedir.

Tablo 6. *P. aeruginosa'* nın Akut ve Kronik Maruziyet Gruplarındaki Ortalama Aderensinin Kontrol Subgruplarıyla Karşılaştırılma Sonuçları

<i>Çalışma Grupları</i>	<i>Ortalama Bakteriyel Aderens±Standart Sapma</i>	<i>p</i>
Akut Maruziyet		
<u>Kontrol</u>	<u>Düşük D.</u>	
0.0 ± 34.8	-1.4 ± 18.5	<i>p</i> : 0. 704
<u>Kontrol</u>	<u>Yoğun D.</u>	
0.0 ± 34.8	-2.8 ± 27.7	<i>p</i> : 0. 564
Kronik Maruziyet		
<u>Kontrol</u>	<u>Düşük D.</u>	
-0.6 ± 30.5	6.3 ± 33	<i>p</i> : 0. 161
<u>Kontrol</u>	<u>Yoğun D.</u>	
-0.6 ± 30.5	1.1 ± 29.2	<i>p</i> : 0.674

Akut maruziyet grubunda sigara dumanı verilen gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, sigara verilen gruplarda *P. aeruginosa* inokülasyonu sonrası ortalama bakteriyel aderenste hafif bir azalma saptanmakla beraber bunun anlamlı olmadığı görüldü.

Kronik maruziyet grubunda ise düşük duman grubunda daha belirgin olmak üzere her iki grupta da pseudomonal aderenste kontrol grubuna göre hafif bir artış saptandı. Ancak akut ve kronik maruziyet grubunun her ikisinde de sigara verilen çalışma grupları ile kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ve sıçanların bukkal epitel hücrelerine *P. aeruginosa* aderenisiyle sigara dumanına maruziyet arasında artırma veya azaltma lehine bir ilişki saptanmadı.

5 - TARTIŞMA

Bakteriyel aderens, mikroorganizmaların konakçı hücrelerine spesifik ve geri dönüşsüz bir şekilde bağlanmasını ifade etmektedir. Bakterilerin konakçının savunma mekanizmalarını aşarak adere olmaları ve çoğalmaları kolonizasyon ve enfeksiyon sürecinin başlangıcındaki ilk adımdır (15, 16).

Alt solunum yolu enfeksiyonlarının orofaringiyal kolonizasyonla ilişkisi bilinmekte ve bu bölgede kolonizasyona neden olabilecek faktörler alt solunum yollarını da doğrudan etkileyebilmektedir. Pek çok çalışmayla bukkal ve faringiyal mukoza hücrelerine artan bakteriyel aderens ile pnömoni gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (9-13, 20, 32).

Kronik sigara içen kişilerde orofaringiyal hücrelere bakteriyel aderensin artmış olduğu; solunumsal kolonizasyon ve enfeksiyonların daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (10-14). Aktif ve pasif sigara içiciliğinin her ikisi de bakteriyel pnömoni gelişimi için risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (3, 4, 6-9). Ayrıca sigara içmeyenlere göre enfeksiyon daha ağır seyirli olmakta ve iyileşme süreci daha uzun sürmektedir (9). Yine bazı solunumsal patojenlere sigara içenlerde daha sık rastlandığı bildirilmiştir. Aktif veya pasif sigara içiciliği olan kişilerde içmeyenlere göre daha yüksek oranda nazofaringiyal meningokok kolonizasyonu olduğu tespit edilmiştir (60). Kronik bronşitli hastalarda sigara içmeyen veya günde 1 paketten az içenlerde alt solunum yolları steril olarak bulunmuş; alt solunum yolu kolonizasyonu tespit edilen hastaların tümünde günde 1 paketten fazla sigara içme öyküsü saptanmıştır (11).

Kronik sigara içimine bağlı olarak konakçı epitel hücrelerinde gelişen yapısal ve fonksiyonel değişiklikler, solunumsal savunma mekanizmalarının deprese olması solunumsal enfeksiyonların daha sık görülmesini açıklayabilir. Bununla beraber sigaranın solunumsal enfeksiyonların spesifik mekanizmasındaki yeri tam olarak aydınlatılamamış tartışmalı bir konudur (14). Benzer şekilde sigara dumanına maruziyet derecesinin ve süresinin hangi bakterilerin aderensini nasıl etkilediği de kesin olarak açık değildir.

Sigaranın bakteriyel aderensi artırdığını bildiren çalışmalar da genel olarak uzun süre sigara içmiş kişilerde *in vitro* ortamda orofaringiyal hücre örnekleri alınarak yapılmışlardır (10-14). Yaptığımız çalışmada ratlarda *in vivo* ortamda farklı yoğunlukta ve sürelerde sigara dumanı maruziyetinin *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın bukkal epitel hücrelerine aderensleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Sigaranın bakteriyel aderens üzerine etkisiyle ilişkili olarak Fainstein ve arkadaşları sigara içen ve içmeyen genç erişkinler ve kronik bronşitli orta yaşlı hastaların farengiyal epitel hücrelerine farklı bakterilerin aderenslerini değerlendiren bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada sigara içmeyen gençlerde *S. pneumoniae* tip I'in aderensi 1.4 ± 1.2 , sigara içenlerde 21 ± 3.1 olarak tespit edilmiş, *S. pneumoniae* tip III ve *S. aerus*'un aderenslerinin *S. pneumoniae* tip I' e göre daha az, ancak anlamlı olarak artmış olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada sigara içenlerde *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*'nın aderensinin azalmış olduğu görülmüştür (10).

Benzer şekilde Raman ve arkadaşları sigara içen kişilerin bukkal epitel hücrelerine pnömokokal aderens değerini 12.3 ± 6.9 , içmeyenlerde ise 0.7 ± 0.4 olarak bulmuşlardır. Aynı çalışmada sigarayı bıraktıktan 3 yıl sonra dahi pnömokokal aderens artışın daha düşük oranda devam ettiği; sigara içmeyen kişilerin bukkal epitel hücreleri sigara içen kişilerin tükürüklerinde inkübe edildiklerinde yine pnömokokal aderens artmış olduğu saptanmıştır (inkübasyon öncesi 1.1 ± 0.9 , inkübasyon sonrası 8.2 ± 4.4). Bu çalışmada sadece pnömokokal aderens çalışılmış, üç yıl sonra dahi devam eden bakteriyel aderens artışı sigaraya bağlı kronik değişikliklerle, sigara içen kişilerin tükürükleriyle inkübasyon sonucu artan bakteriyel aderens ise tükürüğün bileşimindeki non-selüler yapıların hücre yüzeyinde değişikliğe neden olduğu ifade edilerek açıklanmıştır (12).

Bu konuyla ilgili Piatti ve arkadaşlarının yaptıkları bir diğer çalışmada sigaranın epitel yüzeyinde değişikliğe neden olduğu, *S. pneumoniae*'nın bağlandığı reseptör yoğunluğunu artırma yoluyla pnömokokal aderens artışına neden olabileceği belirtilmiştir. Bu çalışmada sigara içen ve içmeyen sağlıklı kişilerde *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*'nın bukkal epitel hücrelerine aderensleri karşılaştırılmış ve yalnızca *S. pneumoniae* aderensinin sigara içen kişilerde yaklaşık 2 kat artmış olduğu saptanmıştır. (sigara içmeyen kişilerde 29.85 ± 4.26 , sigara içen kişilerde ise 46.92 ± 5.12 , $p < 0.001$) (14). Sigara içmeyen sağlıklı gönüllülerden bukkal epitel hücreleri

alınarak yapılan başka bir çalışmada *S. pneumoniae*.ve *E. coli* aderensinin *in vitro*, akut sigara dumanı maruziyeti ile değişmediği gözlenmiştir (61).

Çalışmamızda ise *S. pneumoniae*'nin akut sigara dumanı maruziyet grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hem düşük duman hem de yoğun duman maruziyeti subgruplarında aderens değerlerinde hafif bir azalma olmakla beraber değişikliğin anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Kronik sigara maruziyeti olan grupta ise, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük duman maruziyeti ile pnömokokal aderensin yaklaşık 4 kat, yoğun duman maruziyeti ile yaklaşık 7 kat artmış olduğu görülmüştür. Ancak sadece kronik olarak yoğun dumana maruz bırakılan gruptaki aderens artışı istatistiki anlam ifade etmiştir.

S. pneumoniae'nin orofaringiyal hücrelere aderensi bakterinin yüzey proteinleriyle konakçı epitel yüzeydeki Gal β 1-4 Glc NAc zincir yapısındaki spesifik sakkarit zincirinin etkileşimiyle gerçekleşmektedir (21). Viral enfeksiyonların özellikle genç epitel hücrelerinde hasar oluşturarak, hücre yüzeylerinde *S. pneumoniae*'nin bağlandığı spesifik reseptörleri açığa çıkarma yoluyla adezyonu arttırdığı tahmin edilmektedir (31). Bizde sigaraya kronik maruziyetin reseptör dansitesini arttırdığını, akut maruziyetin ise *S. pneumoniae*'nin aderensini arttırabilecek yoğunlukta olmadığını düşünmekteyiz. Yani bu bulgular göstermektedir ki, muhtemelen sigaraya kronik maruziyet sonucu, akut maruziyetten daha fazla *S. pneumoniae* için spesifik yüzeyel reseptörler açığa çıkmaktadır.

Çalışmamızda akut maruziyet grubundaki düşük ve yoğun duman sub grubunda pnömokokal aderens kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlam ifade etmese de, kontrol grubundan hafif düşük olarak bulunmuştur. Bülbül ve arkadaşlarının çalışmasında *S. pneumoniae*'nin aderensinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlam ifade etmeyecek şekilde sigaralı gruplarda hafif azalmış olduğu tespit edilmiştir (61). Bu sonuç, sigara dumanının içerisindeki toksik maddelerin bakteriyel aderensi negatif yönde etkileyebileceği şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca sigara dumanının bakteriyel üremeyi Gram pozitif koklarda daha belirgin olarak inhibe ettiği de belirtilmiştir (62, 63).

Sağlıklı bireylerin solunum yollarından Gram negatif bakteri izole edilmesi nadirdir. Ciddi klinik bozukluğu olan hastalarda ise Gram negatif bakteri kolonizasyonu sıklıkla karşılaşılmaktadır (20, 21). Johanson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada yoğun bakım ünitelerindeki hastaların yaklaşık %53'ünde Gram negatif bakteri

kolonizasyonu olduğu ve alt solunum yollarında kolonizasyon olan her vakanın üst solunum yollarından elde edilen orofaringiyal epitel hücrelerinde de Gram negatif bakteri aderensinin olduğunu tespit edilmiştir (17).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda üremi ve malnütrisyon gibi sistemik bozukluklarda, özellikle Gram negatif bakterilerin yanak mukozasına aderensinin arttığı görülmüştür (20). Sağlıklı kişilerden trakeal epitel hücreleri izole edilerek çalışılan *in vitro* aderens analizinde *P. aeruginosa*'nın epitel hücrelerine adere olduğu gösterilmiştir. Fakat bakteriyel kolonizasyon veya enfeksiyon için bu bulgunun önemi sorgulanamamıştır (33).

P. aeruginosa için mukosilyer aktivitenin yokluğunda dahi bazal ve rejenera olan hücrelere adere olmadığı gösterilmiştir. Bozulmamış bir bazal membran tabakasına veya yenilenebilen hücre tabakasına sahip normal trakeada hemen hemen hiç pseudomonal aderens rapor edilmemiştir (22, 28). Ayrıca yalnızca musinöz glikoproteinler ve silyer hareketin bu bakterinin aderensini önleyebilmede yeterli olmadığı anlaşılmıştır. Yine siliyalı hücrelere ve özellikle alt solunum yollarının siliyalı epitel örtüsüne bağlanmayı tercih etmesi de *P. aeruginosa*'nın belirtilmiş özelliklerindedir (20, 21, 28).

Epitelyal hücrelere pseudomonasın aderensi için bakteriyel faktörlerin sorumluluğu geniş ölçüde bilinmemektedir. Yüzeylerindeki polisakkaritler, lipopolisakkaritler, glikoproteinler ve pili yapılarından herhangi birinin aderensle ilgili olabileceği bildirilmiştir (15). Konakçı hücrelerinin harabiyeti aderensin önemli bir basamağı olduğu için bakteri tarafından üretilen ekzotoksinler ve proteinler de önemli bir rol oynar (21). Mukozal yüzey değişikliği ve hücre harabiyetine neden olarak daha iyi aderens için hücreleri hazırlarlar. Ancak bu faktörler hakkındaki bilgiler yeterli değildir.

Ağır bir *Influenza* virus enfeksiyonu veya endotrakeal entübasyon sonrasında mukozal yüzeyde dökülen hücrelere *P. aeruginosa*'nın adere olduğu gösterilmiştir. Solunum yollarında dökülen epitel hücrelerine bakterinin adere olmasının *Pseudomonas*'a bağlı pnömoninin patogeneğinde önemli olduğu ifade edilmiştir (28). Çünkü bu kolonize hücrelerin bazıları akciğerler tarafından aspire edilmektedir. Bakterilerle yüklü dökülen hücreler gastrointestinal sistem ve üriner sistemde mekanik bir süpürme sayesinde temizlenebilir iken ucu bir çıkmaz sokak gibi olan solunum sisteminde dökülen hücreler dışarı atılmadıklarında akciğerin daha derinlerine ulaşarak enfeksiyonun başlangıç aşamasından sorumlu olabilmektedirler. Ayrıca inkübasyon süresi uzadıkça deskuame hücrelere *Pseudomonas*'ın daha fazla adere olduğu da bilinmektedir (28).

P. aeruginosa, sıklıkla konakçının savunma faktörlerinin bozulduğu ve epitelyal hasarlanmanın olduğu durumlarda karşılaşıldığından, fırsatçı bir patojen olarak bilinmektedir (21). *P. aeruginosa*'nın hasarlı kalp kapakçıklarına normal bireylerden daha fazla adere olduğu, korneal injuriye maruz kalanlarda aderensin yüksek olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (28). *P. aeruginosa* kolonizasyonlarıyla sık karşılaşılan kistik fibrozisli hastalarda viral veya bakteriyel patojenlerin sebep olduğu yüzeyel değişikliklerin pseudomonal aderensi kolaylaştırdığı bildirilmiştir. Yine tripsinizasyona maruz bırakılan bukkal hücrelerde pseudomonal aderensin arttığı tespit edilmiş ve yüzeydeki fibronektin kaybıyla ilgili olarak açıklanmıştır (64).

KOAH'lı hastaların atakların %40-60'ında balgamda bakteriler izole edilmektedir. Özellikle FEV₁<%50 olan hastalarda ve ağır ataklarda *P. aeruginosa* görülebilmektedir (65). Bu nedenle sigaranın *P. aeruginosa*'nın aderensine katkı sağlayıp sağlamadığı bizim çalışmamızda araştırılmıştır.

Fainstein ve arkadaşları *P. aeruginosa*'nın aderens değerlerini sigara içmeyen genç erişkinlerde 7.9±1.4, sigara içenlerde ise 5.6±1.6 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada orta yaşlı kişilerde, sigara kullanmayanlarda pseudomonal aderens 6.8±1.6, kronik bronşitli hastalarda ise 6.7±1.2 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada sigara içen genç erişkinlerdeki pseudomonal aderens değeri sigara içmeyen genç erişkinler grubuna göre daha düşük; orta yaş grubundaki kişilerde ise kronik bronşitli hasta grubu ile sigara kullanmayan kişilerdeki pseudomonal aderens değerlerinin benzer olduğu görülmektedir (10).

Çalışmamızda akut sigara dumanına maruz bırakılan grupta, düşük ve yoğun duman subgrubunun pseudomonal aderens değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; her iki grupta pseudomonal aderenste hafif bir azalma olduğu görüldü. Kronik sigara dumanına maruziyet grubunda ise, düşük ve yoğun duman subgruplarında kontrol grubuna göre pseudomonal aderens değerlerinde hafif derecede bir artma izlenmekle beraber; akut ve kronik maruziyet grubunun her ikisinde de kontrol gruplarıyla sigara dumanı verilen çalışma grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Yaptığımız çalışmada *P. aeruginosa*'nın genel anlamda epitel hücrelerine adere olma konusunda inatçı olduklarını gördük. Sigara maruziyetinin dozu ve süresi ile herhangi bir korelasyon tespit edemedik. Ancak düşük ve yoğun dumana akut maruziyet sonrası - istatistiki anlam ifade etmemekle beraber- bakteriyel aderensin düşük çıkması sigara

dumanındaki toksik maddelerin bakteriyel aderens faktörleri üzerindeki olumsuz etkilerinden kaynaklanabileceğini tahmin etmekteyiz (61-63).

P. aeruginosa ile elde edilen bilgilere, Fainstein ile arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya ve bizim çalışmamıza bakıldığında; bu bakterinin aderensi bir çok faktörlere bağlıdır denilebilir. Diğer Gram negatif bakterilerin aksine kendine özgü ortamlara, kendine özgü faktörlere sahiptir. Çalışmamızın sonucunda sigara dumanına maruziyet ile pseudomonal aderens arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

6 - SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma ile farklı sürelerde, derecelendirilmiş çevresel sigara dumanına maruz bırakılan sıçanların bukkal epitel yüzeylerine inoküle edilen *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin adrensinin değişip değişmediği *in vivo* olarak araştırılmış ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

1. *S. pneumoniae* inokülasyonu sonrası tüm gruplarda Gram pozitif bakteri adrensinde anlamlı artış saptanmıştır.
2. Akut maruziyet grubunda kontrol ile sigara dumanı verilen subgrupların ortalama *S. pneumoniae* adrensi değerleri karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Akut olarak düşük veya yoğun miktarda maruz kalınan sigara dumanının *S. pneumoniae*'nin bukkal epitel hücrelerine adrensini etkilemediği görülmüştür.
3. *S. pneumoniae*'nin kronik maruziyet grubundaki sigara dumanı verilen subgruplardan yoğun dumana maruz bırakılan sıçanlarda pnömokokal adrenste anlamlı artma saptanmıştır.
4. *S. pneumoniae* adrensi çalışılan tüm gruplarda bukkal hücrelere pnömokokal adrensini olduğu ve kronik olarak yoğun dumana maruz bırakılan grupta pnömokokal adrensini anlamlı olarak artmış olduğu tespit edilmiştir.
5. *S. pneumoniae* için sigaraya kronik maruziyetin reseptör dairesini arttırabileceğini, akut maruziyetin ise adrensini arttırabilecek yoğunlukta olmadığını düşünmekteyiz. Akut maruziyet grubunda pnömokokal adrensini istatistiksel anlam ifade etmese de, kontrol grubundan hafif düşük bulunmuştur. Bu sonucun, sigara dumanının içersindeki toksik maddelerin bakteriyel adrense negatif yöndeki etkisinden kaynaklandığını düşünüyoruz.
6. *P. aeruginosa* inokülasyonu sonrası ortalama bakteriyel adrenste anlamlı bir değişiklik olmadığını görülmüştür.

7. Akut maruziyet grubunda *P. aeruginosa* inokülasyonu sonrası ortalama bakteriyel aderenste hafif bir azalma saptanmakla beraber bunun anlamlı olmadığı görülmüştür.
8. Kronik maruziyet grubunda *P. aeruginosa* aderenesinde hafif bir artış saptanmıştır. Ancak akut ve kronik maruziyet grubunun her ikisinde de anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ve *P. aeruginosa* aderenisiyle sigara dumanına maruziyet arasında artırma veya azaltma lehine bir ilişki saptanmamıştır.
9. *P. aeruginosa* aderenisinin bir çok faktörlere bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Diğer Gram negatif bakterilerin aksine kendine özgü ortamlara, kendine özgü faktörlere sahip bu patojenin bukkal epitel hücrelerine aderenisiyle sigara dumanına maruziyet arasında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır.

7 – ÖZET

Farklı Sürelerde Derecelendirilmiş Sigara Dumanına Maruz Bırakılan Sıçanlarda *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'nın Aderensi

Amaç: Bu çalışmada, farklı sürelerde ve derecelendirilmiş çevresel sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda, bukkal epitele inoküle edilen solunumsal patojen olan *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin aderensinin değişip değişmediğinin *in vivo* olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: 36 adet sıçan *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* aderensi çalışılmak üzere iki gruba ayrıldı. Her bir gruptaki 18 sıçandan akut ve kronik maruziyet grubu oluşturuldu. Akut ve kronik maruziyet grubundaki sıçanlar, düşük ve yoğun miktarda sigara dumanı verilen ve sigara dumanı verilmeyen grup olmak üzere 3'er sıçandan oluşan 3 subgruba ayrıldı. Akut maruziyet grubunda 1 gün, kronik maruziyet grubunda 3 hafta süre ile; düşük duman grubunda % 6.5, yoğun duman grubunda %13 oranda, günde 2 kez 1saat sigara dumanında bekletildi. Sigara dumanı verildikten sonra sıçanların bir yanak mukozalarından bukkal epitel hücre örnekleri alındı ve diğer yanaklarına, çalışılan bakteri suşu inoküle edildi. Bir saat sonra inokülasyon yapılan yanak mukozasından epitel örnekleri alındı. İnokülasyon öncesi ve sonrası, bukkal epitel hücrelerinden hazırlanıp Gram boyama yapılmış örneklerin her birinden 40 epitel hücresine adere olan bakteriler sayıldı. Tüm gruplarda inokülasyon öncesi ve sonrası değerler Wilcoxon Signed Ranks testi, sigara dumanı verilen gruplar ile kontrol grupları Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Akut sigara dumanına maruziyet subgruplarında *S. pneumoniae*'nin, aderensinde hafif bir azalma olmakla beraber, bu azalma istatistiki olarak anlamlı değildi. Pnömonokokal aderensin kronik maruziyet subgruplarında, düşük duman maruziyeti ile yaklaşık 4 kat ($p>0.05$), yoğun duman maruziyeti ile yaklaşık 7 kat ($p<0.001$) arttığı bulundu. *P. aeruginosa* aderensinde akut maruziyet subgruplarında hafif bir azalma olmakla beraber ($p>0.05$), kronik maruziyet grubunda istatistiki anlam ifade etmeyen bir artma bulundu.

Sonuç: Kronik olarak yoğun miktarda sigara dumanına maruz bırakılan sıçanlarda, *S. pneumoniae* aderensi anlamlı olarak artmıştır. Ancak *P. aeruginosa*'nın bukkal epitele aderensiyle sigara maruziyetinin dozu ve süresi arasında herhangi bir korelasyon tespit edilmemiştir.

8. SUMMARY

Adherence of *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa* In Rats Exposed to Graded Cigarette Smoke for Different Durations

Objective: In this study, it is aimed to investigate as *in vivo* whether the adherence of bacteria *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, respiratory pathogens inoculated into the buccal epithelial cells of rats exposed to graded environmental smoke for different time period, changes or not.

Methods: 36 rats was divided into 2 groups to study *S. pneumoniae* and *P. aeruginosa* adherence. Acute and chronic exposure groups was formed by using 18 rats in each groups. The rats in acute and chronic exposure groups (9 for each group) was divided into 3 subgroups as low exposure, intensive exposure and non-exposure group. Low exposure and intensive exposure groups was exposed to 6.5% and 13% smoke for one hour in two times per day, respectively. After smoking, buccal epithelial cell samples were taken from one buccal mucosa of the rats and bacteria species studied was inoculated to other buccal mucosa of the rats. One hour later, epithelial samples were taken from the buccal mucosa, where bacteria inoculated. Adhered bacteria to 40 epithelial cells were counted in every sample prepared from buccal epithelial cells and stained with Gram, before and after inoculation. Average adherence for each bacteria was calculated with the subtraction of the adhered bacteria numbers counted on the slides before and after inoculation. Pre and post inoculation values of all groups were compared using Wilcoxon Signed Ranks test and samples exposed smoke and control groups were compared using Mann Whitney U test.

Results: There was a slight decrease in *S. pneumoniae* adherence in subgroup exposed to acute smoke, however this decrease was not statistically significant. Pneumococcal adherence was found 4 times ($p>0.05$) and 7 times ($p<0.001$) higher for chronic exposure subgroups, exposed to low and intensive smoke, respectively. The adherence of *P. aeruginosa* for acute exposure subgroup was found slightly decreased ($p>0.05$), however there was a statistically insignificant increase in the adherence of *P. aeruginosa* for chronic exposure groups.

Conclusion: There was a significant increase in the adherence of *S. pneumoniae* in the rats chronically exposed to intensive smoke. Any correlation could not be determined between adhesion of *P. aeruginosa* to buccal epithelial and smoke intensity/exposure duration.

9 - KAYNAKLAR

1. <http://www.who.int/features/2003/08/en/>
2. <http://data.euro.who.int/tobacco/Default.aspx?TabID=2404>
3. Özlü T: Gençlik ve Sigara. Sigara ve Sağlık, Özyardımcı N (Ed), Bursa, 2002, s. 74-84.
4. Joad JP: Smoking and pediatric respiratory health. Clin Chest Med, 21:37-46, 2000.
5. Rennard SI, Daughton DM: Cigarette Smoking and Disease. In: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, Fishman AP (Eds), 3rd edition, McGraw Hill, 1998, pp. 697-708.
6. Aronson MD, Weiss ST, Ben RL, Komaroff AL: Association between cigarette smoking and acute respiratory tract illness in young adults. JAMA, 248(2):181-83, 1982.
7. Marcy TW, Merrill WW: Cigarette smoking and respiratory tract infection. Clin Chest Med; 8(3):381-91, 1987.
8. Farr BM, Bartlett CL, Wadsworth J, Miller DL: Risk factors for community-acquired pneumonia diagnosed upon hospital admission. British Thoracic Society Pneumonia Study Group. Respir Med, 94(10):954-63, 2000.
9. Murin S, Bilello KS, Matthay R: Other smoking-affected pulmonary diseases. Clin In Chest Med, 21(1):121-37, 2000.
10. Fainstein V and Musher DM: Bacterial adherence to pharyngeal cells in smokers, nonsmokers, and chronic bronchitics. Infect Immun, 26:178-82, 1979.

11. Irwin RS, Erickson AD, Pratter MR, Corrao WM, Garrity FL, Myers JR, Kaemmerlen JT: Prediction of tracheobronchial colonization in current cigarette smokers with chronic obstructive bronchitis. *J Infect Dis*, 145:234-41, 1982.
12. Raman AS, Swinburne AJ, Fedullo AJ: Pneumococcal adherence to the buccal epithelial cells of cigarette smokers. *Chest*, 83:23-7, 1983.
13. Riise GC, Larsson S, Andersson BA: Bacterial adhesion to oropharyngeal and bronchial epithelial cells in smokers with chronic bronchitis and in healthy nonsmokers. *Eur Respir J*, 7(10):1759-64, 1994.
14. Piatti G, Gazzola T, Allegra L: Bacterial adherence in smokers and non-smokers. *Pharmacol Res*, 36(6):481-4, 1997.
15. Beachey EH: Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis*, 143:325-45, 1981.
16. Söyletir G: Konak parazit ilişkisi. *İnfeksiyon Hastalıkları*, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds), Nobel Tıp Kitapevleri, 1996, s. 29-36.
17. Johanson WG Jr, Higuchi JH, Chaudhuri TR, Woods DE: Bacterial adherence to epithelial cells in bacillary colonization of the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*, 121:55-63, 1980.
18. Adamou JE, Wizemann TM, Barren P, Langermann S: Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun*, 66:820-2, 1998.
19. Cundell DR, Tuomanen EI: Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells in vitro. *Microb Pathog*, 17(6):361-74, 1994.
20. Niederman MS: Bacterial adherence as a mechanism of airway colonization. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 8:15-20, 1989.
21. Wilson R, Dowling RB, Jackson AD: The biology of bacterial colonization and invasion of the respiratory mucosa. *Eur Respir J*, 9(7):1523-30, 1996.

22. Abraham SN, Beachey EH, Simpson WA: Adherence of streptococcus pyogenes, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa to fibronectin-coated and uncoated epithelial cells. *Infect Immun*, 41:1261-8, 1983.
23. Jones GW, Isaacson RE: Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit Rev Microbiol*, 10(3):229-60, 1983.
24. Courtney HS, Hasty DL, Dale JB, Poirier TP: A 28-kilodalton fibronectin-binding protein of group A streptococci. *Curr Microbiol*, 25(5):245-50, 1992.
25. Gibbons RJ, Van Houtte J: Selective Bacterial Adherence to Oral Epithelial Surfaces and Its Role as an Ecological Determinant. *Infect Immun*, 3:567-73, 1971.
26. Sklavounou A, Germanie GR: Adherence of oral streptococci to keratinized and nonkeratinized human oral epithelial cells. *Infect Immun*; 27:686-89, 1980.
27. Niederman MS, Rafferty TD, Sasaki CT, Merrill WW, Matthay RA, Reynolds HY: Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*, 127:85-90, 1983.
28. Ramphal R, Small PM, Shands JW Jr, Fischlschweiger W, Small PA Jr: Adherence of Pseudomonas aeruginosa to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. *Infect Immun*, 27(2):614-9, 1980.
29. Van Alphen L: Interaction of bacteria and airway epithelial cells. *Eur Respir J*, 9: 1342-3, 1996.
30. Plotkowski MC, Bajolet-Laudinat O, Puchelle E: Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa. *Eur Respir J*, 6(6):903-16, 1993.
31. Fainstein V, Musher DM, Cate TR: Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. *J Infect Dis*, 141:172-6, 1980.
32. Woods DE: Role of fibronectin in the pathogenesis of Gram-negative bacillary pneumonia. *Rev Infect Dis*, 9(Suppl 4):386-90, 1987.

33. Higuchi JH, Johanson WG Jr: The relationship between adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to upper respiratory cells in vitro and susceptibility to colonization in vivo. *J Lab Clin Med*, 95:698-705, 1980.
34. Niederman MS, Merrill WW, Ferranti RD, Pagano KM, Palmer LB, Reynolds HY: Nutritional status and bacterial binding in the lower respiratory tract in patients with chronic tracheostomy. *Ann Intern Med*, 100:795-800, 1984.
35. Niederman MS, Merrill WW, Polomski LM, Reynolds HY, Gee JB: Influence of sputum IgA and elastase on tracheal cell bacterial adherence. *Am Rev Respir Dis*, 133(2):255-60, 1986.
36. Sethi JM, Rochester CL: Smoking and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin In Chest Med*, 21(1):67-87, 2000.
37. Ü Özalp: Sigara Dumanının Kimyasal Bileşimi. Sigara ve Sağlık, Özyardımcı N (Ed), Bursa, 2002, s. 74-84.
38. Hinds W, First MW, Huber GL, Shea JW: A method for measuring respiratory deposition of cigarette smoke during smoking. *Am Ind Hyg Assoc J*, 44(2):113-8, 1983.
39. Özlü T, Bülbül Y: Temel Göğüs Hastalıkları. Trabzon, 2001, s. 360-384.
40. Phillips DE, Hill L, Weller P, Willett M, Bakewell : Tobacco smoke and the upper airway. *Clin Otolaryngol*, 28(6):492-6, 2003.
41. Sandhu HS: A practical guide to tobacco cessation in dental offices. *Can Dent Assoc J*, 67(3):153-7, 2001.
42. Kocher T, Schwahn C, Gesch D, Bernhardt O, John U, Meisel P, Baelum V: Risk determinants of periodontal disease - an analysis of the Study of Health in Pomerania (SHIP 0). *J Clin Periodontol*, 32(1):59-67, 2005.
43. Sakki T, Knuuttila M: Controlled study of the association of smoking with lactobacilli, mutans streptococci and yeasts in saliva. *Eur J Oral Sci*, 104(5-6):619-22, 1996.

44. Van Der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NH: Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, 59(8):713-21, 2004
45. Senior RM, Shapiro SD: Chronic obstructive pulmonay disease epidemiology, pathophysiology, and pathogenesis. In: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, Fishman AP (Eds), 3rd edition, Mcgraw Hill, 1998, pp. 65-696.
46. Kondo T, Tagami S, Yoshioka A, Nishimura M, Kawakami Y: Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*, 149(1):178-82, 1994.
47. Reddy S, Finkelstein EI, Wong PS, Phung A, Cross CE, van der Vliet A: Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Radic Biol Med*, 33(11):1490-8, 2002.
48. Stone PJ, Gottlieb DJ, O'Connor GT, Ciccolella DE, Breuer R, Bryan-Rhadfi J, Shaw HA, Franzblau C, Snider GL: Elastin and collagen degradation products in urine of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 151(4):952-9, 1995.
49. Ogushi F, Hubbard RC, Vogelmeier C, Fells GA, Crystal RG: Risk factors for emphysema. Cigarette smoking is associated with a reduction in the association rate constant of lung alpha 1-antitrypsin for neutrophil elastase. *J Clin Invest*, 87(3):1060-5, 1991.
50. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaouaj A: Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*, 163(6):2329, 2003.
51. Kuschner WG, D'Alessandro A, Wong H, Blanc PD: Dose-dependent related inflammatory responses in healthy adults. *Eur Respir J*, 9(10):1989-94, 1996.
52. McCrea KA, Ensor JE, Nall K, Bleecker ER, Hasday JD: Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*, 150(3):696-703, 1994.
53. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Mann DL, Pankiw-Trost LK, Blattner WA, Hoover RN: The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A

population-based survey of healthy caucasians. *Am Rev Respir Dis*, 139(6):1446-51, 1989.

54. Costabel U, Bross KJ, Reuter C, Ruhle KH, Matthys H: Alterations in immunoregulatory T-cell subsets in cigarette smokers. A phenotypic analysis of bronchoalveolar and blood lymphocytes. *Chest*, 90(1):39-44, 1986.
55. Green GM: Pharmacoprevention of tobacco smoke effects on macrophage cells. *Eur J Respir Dis Suppl*, 139:113-6, 1985.
56. Özyardımcı N, Erdoğan B: Sigaranın solunum sisteminin savunma mekanizmaları üzerine etkileri. *Sigara ve Sağlık*, Özyardımcı N (Ed), Bursa, 2002, s. 123-29.
57. King TE, Savici D, Campbell PA: Phagocytosis and killing of *Listeria monocytogenes* by alveolar macrophages: smokers versus nonsmokers. *J Infect Dis*, 158(6):1309-16, 1988.
58. Kark JD, Lebiush M, Rannon L: Cigarette smoking as a risk factor for epidemic a(h1n1) influenza in young men. *N Engl J Med*, 307(17):1042-6, 1982.
59. Straus WL, Plouffe JF, File TM Jr, Lipman HB, Hackman BH, Salstrom SJ, Benson RF, Breiman RF: Risk factors for domestic acquisition of legionnaires disease. Ohio legionnaires Disease Group. *Arch Intern Med*, 156(15):1685-92, 1996.
60. Stanwell-Smith RE, Stuart JM, Hughes AO, Robinson P, Griffin MB, Cartwright K: Smoking, the environment and meningococcal disease: a case control study. *Epidemiol Infect*, 112(2):315-28, 1994.
61. Bülbül Y, Özlü T. Akut sigara dumanı maruziyetinin bakteriyel aderense etkisi. *Solunum*, 2:72-76, 1999.
62. Ertel A, Eng R, Smith SM: The differential effect of cigarette smoke on the growth of bacteria found in humans. *Chest*, 100(3):628-30, 1991.
63. Özlü T, Özinel MA, Tokbaş A, Erdinç E. In vitro effect of cigarette smoke on the growth of bacterial flora in the respiratory tract. *J Smoking Related Dis*, 5:33-35, 1994.

64. Woods DE. Role of fibronectin in the pathogenesis of Gram-negative bacillary pneumonia. *Rev Infect Dis*, 9(4):386-90, 1987.
65. Acıcan T: KOAH atağında antibiyotik tedavisi. *Güncel Bilgiler Işığında Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı*, Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003, s. 222-24.