

TC.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKUT SİGARA DUMANININ
BAKTERİ ADHERENSİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yılmaz BÜLBÜL

Trabzon - 1998

TC.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖĞÜS HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKUT SİGARA DUMANININ
BAKTERİ ADHERENSİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yılmaz BÜLBÜL

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Tevfik ÖZLÜ

Trabzon - 1998

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Tanım	4
2.2 Tarihçe	5
2.3 Adherens Mekanizması	5
2.4 Adhesinler ve Reseptörler	6
2.5 Tropizm	9
2.6 Adherensi Etkileyen Faktörler	9
2.7 Adherensten Korunma	10
2.8 Anti-adhesiv Tedavi	11
3. MATERYAL-METOD	12
3.1 Donör Seçimi	12
3.2 Hücre Örneklerinin Hazırlanması	12
3.3 Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması	12
3.4 Sigara Dumanı	13
3.5 Sigaraya Maruz Kalmış Epitel ve Bakteri Süspansiyonu Hazırlanması	13
3.6 İnkübasyon	14
3.7 İstatistiksel Yöntem	16
4. BULGULAR	17
5. TARTIŞMA	22
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	27
7. ÖZET	29
8. SUMMARY	30
9. KAYNAKLAR	31

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Milattan önce 2000 yıllarına kadar uzanan bir öyküsü olan tütünün Avrupa'da tanınması, 1492 yılında Kristof Colomb'un Amerika kıtasına seferi ile olmuştur. Keyif verici bir madde olarak kullanılan tütünün, 20. yüzyıl başlarında kağıda sarılarak fabrikalarda üretilmesi, alışkanlığın hızla yayılmasına neden olmuştur. Tütün ve ürünlerine karşı, değişik zamanlarda nedeni tam açık olmayan yasaklar uygulanmıştır. Ancak, 20. yüzyıl ile birlikte bu yasaklar ve sigara karşıtı faaliyetler, sağlıkla ilgili bilimsel verilere dayandırılmaya başlamıştır. İlk kez 1938 yılında Raymond Pearl, yaşam süresi ile sigara arasında istatistiki bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Sigara içimi, önemli bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Sigara içenlerde başta akciğer hastalıkları olmak üzere koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalıklar, periferik damar hastalıkları, ülser ve osteoporoz gibi hastalıklar sık olarak görülmektedir.

Solunum sistemi ile ilgili olarak sigaranın; kronik bronşit, amfizem ve akciğer kanserleri başta olmak üzere, solunumsal infeksiyonlarda da artışa neden olduğu bilinmektedir (1-9). Çalışmalar, bakteriyel invazyonun ilk aşaması olan adherensin, sigara içen insanlarda arttığını ve bu artışın da orofaringeal kolonizasyon ve solunumsal infeksiyonlarda artış ile birlikte olduğunu göstermektedir (10-13).

Sigaranın bakteriyel adherensi arttırdığını ve infeksiyonlara yatkınlık oluşturduğunu bildiren çalışmalar kronik, uzun süreli sigara içimi öyküsü olan gönüllülerde yapılmıştır (10,11,13). Dolayısıyla saptanan adherens artışının kronik sigara içimi ile ilişkili olabilecek konakçı hücrelerindeki olası yapısal ve / veya

fonksiyonel değişikliklere mi, yoksa sigara dumanının doğrudan etkisine mi bağlı olduğu açık değildir.

Bu çalışmada, hiç sigara içmemiş gönüllülerden alınan, kronik sigara içimiyle ilişkili olası değişiklikleri taşımayan epitel hücreleri kullanılmış ve *Streptococcus pneumonia* ve *Escherichia coli* adherensinin akut sigara dumanı maruziyeti ile değişip değişmediği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bütün infeksiyon hastalıkları, kana doğrudan inoküle olanlar hariç, mikroorganizmanın deri veya müköz membranlara (solunum, sindirim ve genitoüriner sistem mukozasına) kolonize olması ile başlar. Kolonizasyon değişik şekillerde sonuçlanabilir;

1. Alınan mikroorganizma konağı hiçbir şekilde etkilemeden uzaklaştırılır. Bu durum **geçici kolonizasyon** olarak bilinir.

2. Kolonizasyon kalıcı olabilir ve kolonize olan mikroorganizmalar vücut yüzeyinde çoğalabilir. Kolonize olan mikroorganizma vücutta bağışıklık oluşturabilir ki bu durum **infeksiyon** olarak bilinir.

3. İnfeksiyona neden olan mikroorganizmanın üremesi veya metabolik ürünleri ile kişinin dokularına zarar verecek düzeyde reaksiyon oluşturması hali ise **infeksiyon hastalığı** olarak bilinir (14).

Kolonizasyon sık gözlenen bir olaydır ancak infeksiyon hastalığı daha nadirdir. Yani kolonize olan her mikroorganizma vücutta mutlaka bir infeksiyöz hastalık oluşturmayabilir.

İnfeksiyöz sürecin önlenmesi için konakçı, oldukça efektif savunma mekanizmalarına sahiptir. Bu mekanizmalar **doğal savunma mekanizmaları** (öksürük, mukosilier aktivite, yutma, sıvı akımı gibi non-spesifik savunma mekanizmaları) ve **kazanılmış bağışıklık** (hücrel ve humoral immünite) olarak iki bölüme ayrılmaktadır. Örneğin; sürekli olarak, birçok solunumsal patojeni de içeren mikroorganizma inhale edildiği halde, sağlıklı insanların alt solunum yolları sterilidir ve

bakterilerce kolonize edilmemiştir. Solunum yollarının bu sterilitesi, belirtilen defans mekanizmaları ile sağlanır (15-18).

Savunma mekanizmalarının çoğu (doğal savunma mekanizmaları), genellikle ilgili mikroorganizmaya spesifik değildir. Ciltteki kornifiye epitel ve sekresyonların akışı gibi mekanik bariyerler yanında, mide ve mesanenin asidik ortamı da kimyasal bir bariyer oluşturarak infeksiyöz olayın oluşumunda önleyici görev üstlenirler. Bunlar yanında öksürük, gag refleksi gibi bazı davranışsal ve nörolojik mekanizmalar da alt solunum yollarının infeksiyonlardan korunmasına yardım ederler. Ayrıca mukozal yüzeylerde mevcut normal mikroflora da patojen bakterilerin buraya yerleşimini güçleştirir (19).

Vücut hümmoral ve hüccresel immüniteden oluşan (kazanılmış bağışıklık sistemi) spesifik bazı savunma mekanizmalarına da sahiptir. Barsak mukozası, nazal mukoza ve diğer bölgelerde mevcut makrofaj ve lenfositler dış çevreyle temas halindedir ve savunmada etkin rol üstlenirler (19).

Belirtilen savunma bariyerlerini aşabilen patojen mikroorganizmalar, konakçıda kolonize olabilmekte ve arkasından hastalık oluşturabilmektedir. Ancak bunun için mikroorganizmanın kolonizasyondan bir önceki ve ilk basamak olan adherens işlemini gerçekleştirmiş olması gerekmektedir.

2.1. Tanım

Mikroorganizmaların hüccrelere ve diğer yüzeylere bağlanması işlemi **adherens** olarak bilinmektedir. Adherens, mikroorganizmanın konakçı ile ilk etkileşimi ve mikrobiyal invazyonun ilk aşamasıdır (20-21).

Mikroorganizmaların konakçıya bağlanmasında rol alan ve adherensi yönlendiren yüzeyel mikrobiyal moleküller veya organellere de **adhesin** denilmektedir. **Reseptörler** ise, adhesinlerin bağlandığı konakçı molekülleridir. Bir adhesin birden fazla reseptöre sahip olabileceği gibi, bir reseptör de birden fazla adhesin tarafından tanınabilmektedir (20-21).

2.2. Tarihçe

İlk kez Guyot 1908 tarihinde, bakterilerin eritrositlere bağlanarak hemaglütinasyona neden olduklarını ileri sürmüştür. Bakteriyel adherense tıp alanında ilgi, 1955 yılında Duguit ve arkadaşlarının, bazı gram negatif basillerin yüzeyel filamentöz yapıları ile intestinal hücrelere bağlandıklarını gösteren yayınları ile başlamıştır. Daha sonra 1970 'lerde Gibbons ve van Houte, bakterilerin değişik oral yüzeylere selektif olarak tutunmasının bazı dental hastalıklara neden olduğunu belirtmişlerdir (20-21).

2.3. Adherens Mekanizması

Sıvı ortam içerisinde bulunan objeler, aynı ortamda süspansiyon halinde bulunan mikroorganizmalar dahil, tüm partikülleri kendi yüzeylerine doğru çekerler. Derjaguin ve Landau ile Verwey ve Overbeek (**DVLO teorisi**) bu etkileşimi, sıvı ortamda bulunan objeler etrafında mevcut olan termodinamik stabilitenin iki pozisyonu ile açıklarlar. Solubl partiküllerin yüzeylere tutunmasında, iki düşük potansiyel enerji noktası mevcuttur. Hücre yüzeyine en yakın olan düşük enerji noktası "**Primer Enerji Minimumu**" olarak bilinir. Yüksek bir enerji bariyeri ile primer minimumdan ayrılan ve hücre yüzeyinden daha uzakta bulunan enerji noktasına ise "**Sekonder Enerji Minimumu**" denir. Sekonder minimumun enerji seviyesi, daima primer minimumdan daha yüksektir (21).

Yerçekimi, kemotaksis, London van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler ve yüzey gerilimi gibi fiziksel veya kimyasal kuvvetlerin etkisi ile, uzak mesafede bulunan partikülde bir çekme kuvveti oluşur. Ancak partikül daha yakın mesafeye geldiğinde, her iki partikülün yüzeyindeki negatif elektriksel yük ve diğer kuvvetlerin etkisi ile, partiküller arasında bir itme kuvveti doğar (21).

Sonuç olarak, itme ve çekme kuvvetleri arasındaki denge nedeniyle partikül, sekonder minimumda tutulur. Partiküllerin bu şekilde sekonder minimumunda toplanması hali **absorbsiyon** veya **docking** olarak bilinir. Yüzeylere tutunmada ilk faz olan bu non-spesifik absorpsiyon fazı reversibildir (20-21).

Eğer partikül itme kuvvetlerini yenebilirse, yüksek enerji bariyerini aşp primer enerji minimumuna ulaşır, daha güçlü ve kısa mesafede etkin kuvvetlerin etkisi ile yüzeye bağlanır. Partiküllerin bu şekilde sekonder minimumdan ayrılıp, primer minimuma girmesi işlemi **adherens** olarak bilinmektedir ve bu bağlanma irreversibildir. Partikül burada; kovalent, hidrojen, iyonik ve hidrofobik bağlanma kuvvetlerinin etkisi altındadır (21).

Sekonder minimumunu, primer minimumdan ayıran enerji bariyeri değişik şekillerde aşılabilir. Sıvı bir ortamda, örneğin bir mukozal yüzeyde, mikroorganizmanın yüzeysel hidrofobisitesi, onun ökaryotik hücre membranının liyofilik bölgeleri ile yakın ilişki kurmasına neden olur. Ek olarak bazı mikroorganizmalar *slime* gibi polimerik yapıları extrete ederler. Konakçı yüzey bu yapıları absorbe eder ve yüzeyine yapıştırır (21).

Burada en ilgi çeken yapılar adhesiv yüzey yapıları (adhesinler) dir. Küçük yapılarına rağmen, adhesinler konakçı yüzey ile mikroorganizma arasında köprü oluştururlar (21).

2.4. Adhesinler ve Reseptörler

Adhesinler konakçı dokularına tutunmayı sağlayan mikrobiyal yüzey yapılarıdır ve hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanırlar. Genellikle adhesinler, sadece özel reseptörleri tanırlar ve bu reseptörlere bağlanma oldukça spesifiktir. Adhesinlerin reseptörle bağlanması, bir antijenin antikora bağlanması veya bir karbonhidratın lectin ile bağlanmasına benzerdir (14,21). Mikrobiyal adhesinler tablo 1'de verilmiştir (22).

Adhesinlerin bağlandığı, konakçı hücre yüzeyindeki reseptörler genellikle glikoprotein ve glikolipid gibi karbonhidrat içeren moleküllerdir. Adhesinler ise genellikle mikroorganizma yüzeyinde yer alan protein nitelikli yapılardır. *E. coli* üropatojenik ve enteropatojenik subtipleri, adherens mekanizmasının en iyi çalışıldığı bakterilerdendir. Bu suşlar sıklıkla adhesyona destek olan ve **fimbria** veya **pili** olarak adlandırılan yüzey yapılarını taşırlar. Tip I fimbria taşıyan *E. coli*, hücrelere hücre yüzeyinde bulunan mannoz sensitif ve mannoz rezistan ligandlar

Tablo 1. Mikrobiyal adhesinler ve sınıflandırılması

1. Lectinler	<ul style="list-style-type: none"> • Sialik asit bağlayan (<i>Orthomyxovirus</i>) • Galaktoz bağlayan (<i>Entamoeba histolytica</i>) • Galaktosilserebrosid bağlayan (<i>HIV gp 120/gp 41</i>) • Trans-sialidaz bağlayan (<i>Trypanosoma cruzi</i>)
2. Fimbria (pili)	<ul style="list-style-type: none"> • P, S, tip 1, K-88, K-99, CFA-1 (<i>E.Coli</i>) • Tip 4 (<i>Neisseria gonorrhoea</i>) • Tip 1 (<i>Salmonella</i>) • Tcp (<i>V. Cholerae</i>)
3. Non-fimbrial bakteriyel adhesinler	<ul style="list-style-type: none"> • Inv ve Ail proteinleri (<i>Yersinia</i>) • Pertactin (<i>B. pertussis</i>) • P1 sito adhesin (<i>M. pneumonia</i>) • Fibronectin bağlayan protein (<i>Treponema pallidum</i>)
4. Lipid	<ul style="list-style-type: none"> • Lipoteikoik asit (<i>Streptococcus pyogenes</i>) • Lipofosfoglikan (<i>Leishmania</i>)
5. Glikozaminoglikan	<ul style="list-style-type: none"> • Heparin-sulfat benzeri glikozaminoglikan (<i>Chlamidia trachomatis</i>)
6. Viral kapsid proteinleri	<ul style="list-style-type: none"> • VP 1/VP 3 (<i>Rhinovirus</i>) • VP1 (<i>Aphtovirus</i>)
7. Mekanik	<ul style="list-style-type: none"> • Tutunma diski (<i>Giardia lamblia</i>)

vasıtasıyla bağlanır ve bu fimbriyanın diğer adhesinlerle herhangi bir ilişkisi yoktur. *Vibrio*, *pseudomonas*, *moraxella* ve *bacteroides* gibi diğer birçok gram negatif bakteri de fimbria taşımaktadır. Gram pozitif organizmalarda ise yüzey fibrilleri mevcuttur. *S. pneumonia* epitelyal hücreler üzerinde bulunan spesifik karbonhidratlara bağlanmaktadır. Pnomokokkal hücre duvarı ile, hücre yüzeyindeki reseptör arasında köprü görevi gören protein benzeri bir adhesin molekülü tarif edilmiştir (23-25). Bazı mikroorganizmalar dış membran proteinleri ile (örneğin gonokoklar), bazıları da salgılanan ama bakteri yüzeyi ile gevşek bir şekilde bağlı kalan proteinler ile (örneğin *Bordotella pertussis*) konak hücrelerine tutunabilir. Aşağıda tabloda bazı mikroorganizmalara ait adhesinler ve konak hücre reseptörleri verilmiştir (14,20,21,26);

Tablo 2. Bazı mikroorganizmalara ait adhesinler ve bunlarla ilgili hücre reseptörleri

	Adhesin	Hücre reseptörü
Bakteri		
<i>M. pneumonia</i>	• Protein P1	• Siyalik asit
<i>S. pneumonia</i>	• Yüzey proteini	• GlcNAc1-4Gal veya GalNAc1-4Gal içeren glukokonjugatlar
<i>S. pyogenes</i>	• LTA- M protein	• Fibronectin
<i>B. pertussis</i>	• Pertaktin	• Sterol?
<i>E. Coli</i>	• Fimbriya (P,S, Tip 1,CFA/1,CFA/2)	• Mannoza, siyaloglikoprotein v.b
Virus		
<i>Rhinovirus</i>	• VP 1 / VP2	• ICAM-I
<i>Orthomyxovirus</i> (Influenza virusu)	• Hemaglütinin	• Siyalik asit

2.5. Tropizm

Bazı mikroorganizmalar karakteristik olarak belli bölgelere kolonize olurlar. Dokularda mikroorganizmanın yapışmasını sağlayan reseptörlere bağlanma oldukça spesifiktir. Bu reseptörlere bağlanma uygun adhesin varlığına bağlıdır. Bu da mikroorganizmanın bazı dokulara kolonize olurken, bazılarında da bağlanamamasına neden olur ki bu durum **doku tropizmi** olarak bilinir. Örneğin, *Streptococcus pyogenes*, nazofarinks ve deride bulunurken, *E. coli* genitoüriner sistem infeksiyonlarında sık rastlanan bir ajandır ve nazofaringeal kaviteye nadiren kolonize olur. Yine mikroorganizmaların konakçı dokularına selektif adherensine ait literatürde değişik örnekler mevcuttur (16,20,27-29). Mikrobiyal adherens aynı zamanda türe de spesifiktir. Örneğin, rhinovirus kapsid proteinleri insan hücre reseptörlerine adhere olurken fare hücre reseptörlerine adhere olmaz (24).

2.6. Adherensi etkileyen faktörler

İnfluenza virusu infeksiyonu sonrasında *S. aureus*, *H. influenza* ve *S. pneumonia* gibi ajanlarla sekonder pnomonilerin daha fazla görüldüğü bilinmektedir. Bu, olasılıkla viral infeksiyonlar sırasında mukozal hücrelerde oluşan değişikliklere bağlı olarak gelişen adherens artışı ile ilgilidir. Nitekim çalışmalar, viral infeksiyonların bakteriyel adherensi arttırdığını göstermektedir (4,30-32).

Sigara içen insanlarda yapılan çalışmalarda, bakteriyel adherensin arttırdığı gösterilmiştir. Sigara içen genç sağlıklılarda, *S. pneumonia* adherensi artmış bulunurken, sigara içen kronik bronşitlilerde ise *H. influenza* adherensi artmış olarak bulunmuştur (10,11). Yine bir çalışmada, günde 1 paket üzerinde sigara içen insanların yaklaşık yarısında trakeal kolonizasyon saptanmıştır (13).

Mikroorganizmanın bağlandığı hücre türü de adherenste önemlidir. Bir çalışmada *Pseudomonas aeruginosa*'nın silli hücrelere, buccal epitel hücrelerinden daha fazla tutunduğu gösterilmiştir (12). Sklavounou ve Germanie tarafından yapılan bir çalışmada da oral Streptokokların keratinize epitel hücrelerine, non-keratinize hücrelerden daha fazla tutunduğu gösterilmiştir (33).

Koma, hipotansiyon, trakeal intübasyon, asidoz, postoperatif dönem, antibiotik kullanımı gibi ciddi hastalık durumlarında, hastaların yarısından fazlasında orofarinkste gram negatif ajan kolonizasyonu olmaktadır (32,34,35).

Solunum mukozasında KOAH 'lı hastalarda olduğu gibi, yaygın mukozal lezyonların bulunması bakteriyel adherensi arttırabilir (17,36).

Adherens, ilgili patojen mikroorganizmanın konakçı dokularına bağlanabilme yeteneği ile de ilgilidir. Bir çalışmada *S. pyogenes*' in faringeal hücrelere *S. pneumonia*' dan daha iyi adhere olduğu gösterilmiştir (37).

Adherensin, ortamın ısısı ve pH'sı yanında, konakçı hücre ile mikroorganizmanın karşı karşıya kalma süresi ile de ilişkili olduğu bilinmektedir (21,38).

2.7. Adherensten korunma

Adherens, mikrobiyal invazyonun ilk aşamasıdır. Mikrobiyal kolonizasyon ve infeksiyon hastalığının oluşumu için gereklidir. Ancak adherens, bazan mikroorganizmanın zararına olur. Örneğin adhere olan mikroorganizma fagositlerce sindirilip yok edilebilir. Bu durumdan kurtulmak için mikroorganizmalar yüzey karakteristiklerini değiştirebilirler. Bunu üç şekilde gerçekleştirebilirler (21);

a. Mikroorganizma kendi adhesinlerinin üretimini durdurabilir.

b. Mikroorganizma adhesinlerini bir kapsül ile örtebilir. Çoğunlukla polisakkarit yapıda olan kapsüller, ayrıca non-spesifik fonksiyonlara sahiptirler. Kapsüller, partikül yüzeyindeki negatif yük dansitesini arttırarak, itme kuvvetlerinde artışa neden olurlar. Kapsül, hidrofilik özelliktedir ve hidrofobik yüzeyleri örterler. Ayrıca kapsüller yüzeyel antijenik veya komplemanı aktive eden yapıları maskeleyebilirler.

c. Mikroorganizmalar konakçı proteinlerini absorbe ederek kendi yüzeylerini değiştirebilirler.

Adherens özelliği mikroorganizmadan mikroorganizmaya geçişebilmekle birlikte, genel prensipleri benzerdir.

2.8 Antiadhesiv tedavi

Birçok adhesin-reseptör sisteminin tanımlanması sonrasında, infeksiyonların başlamadan önlenmesine yönelik antiadhesiv profilaktik çalışmalar üzerinde durulmaya başlanmıştır. Etkin profilaktik stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar 3 kısımda toplanmaktadır (20,21);

a. İmmünizasyon (aktif ve pasif aşılar dahil)

b. Antimikrobiyal tedavi

c. Reseptör analogları

a. İmmünizasyon: Bakteriyel adhesinlerin identifiye ve pürifiye edilebilmesi ile, adhesin aşılar geliştirilmiştir. Bu aşıların etkin olabilmesi için, oluşan antikorların ilgili dokuda meydana gelmesi gereklidir.

İmmünizasyon denemeleri, enterotoksijenik *E. coli* diresine karşı etkin aşıların geliştirilmesini sağlamıştır. Halen veterinerlikte kullanılmakta olan ve K-88 antijeni içeren pürifiye fimbrial aşı, gebe domuzların yavrularını ishalden korumak amacıyla kullanılmaktadır (20-22).

b. Antimikrobiyal tedavi: Dokulara adherens antibiyotiklerle de bloke edilebilir. Subinhibitör konsantrasyonlarda antibiyotikler, birçok biyolojik fonksiyonu ve bakteriyel yüzey adherens yeteneğini etkiler. Bu etki, bakteriyel adherens ve infeksiyonu önlemek için kullanılabilir (39).

c. Reseptör analogları: Aranson ve arkadaşları çalışmalarında, bir reseptör analogu olan monnozu intraveziküler olarak uygulamışlar ve bunun *E. coli* kolonizasyonunu azalttığını göstermişlerdir (20,21).

3. MATERYAL - METOD

3.1. Donör Seçimi

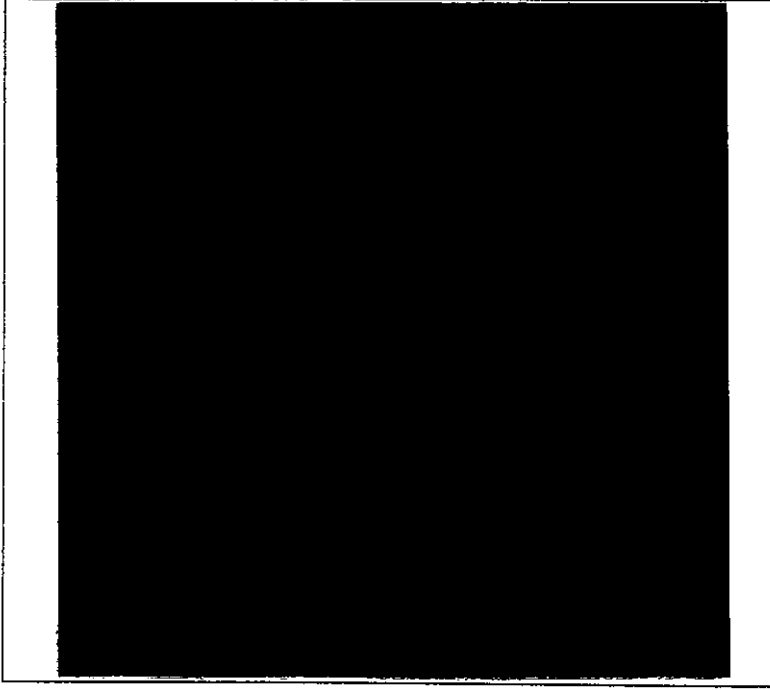
Çalışmaya aktif ya da pasif sigara içiciliği ve solunumsal bir hastalığı olmayan, 20 'si erkek ve 10 'u bayan olmak üzere toplam 30 sağlıklı donör alındı.

3.2. Hücre Örneklerinin Hazırlanması

Buccal epitel hücreleri (BEC), donörlerin yanak mukozası steril metal bir abesleng ile hafifçe sıyrılarak alındı. Alınan epitel hücreleri 8 °C 'de 10 cc phosphate buffered saline (PBS) içinde süspansiyon edildi ve 30 saniye süreyle vortexte karıştırıldı. Oral florada mevcut olan, ancak hücrelere adhere olmamış bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla süspansiyon 10 µm. porlu 25 mm çaplı polikarbonat filtre (Millipore) üzerinde PBS ile yıkandı. Ardından, filtrat tekrar 10 cc PBS içinde süspansiyon edildi. İşlem sonucunda PBS içinde 10^4 hücre / ml içeren hücre süspansiyonu elde edildi (10,31). (Hücre sayısı, Thoma lamı ile sayıldı.)

3.3. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Vakaların hepsinde insan solunum yolu örneklerinden izole edilmiş *Streptococcus pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşu kullanıldı. Ancak kullanılan her iki bakteri için tip tayini yapılamadı. Bir gün öncesinde kanlı agara ekilen bakterilerden ertesi gün PBS içinde 10^7 bakteri / ml içeren süspansiyonlar hazırlandı. Bakteri yoğunluğu Mc Farland bulanıklık yöntemiyle tayin edildi.



Resim 1. PBS ile yıkanmış, deney için hazır buccal epitel hücresi

3.4. Sigara Dumanı

Çalışmada filtreli sigara kullanıldı. Sigara yakıldıktan sonra, sigara ağızlığı vasıtasıyla bir enjektöre 50 cc sigara dumanı aspire edildi. Daha sonra aspire edilen duman, çalışmanın gerekli gördüğü, ağız pamukla kapalı olan 50 cc hacimli erlenler içerisine ilave edildi (40).

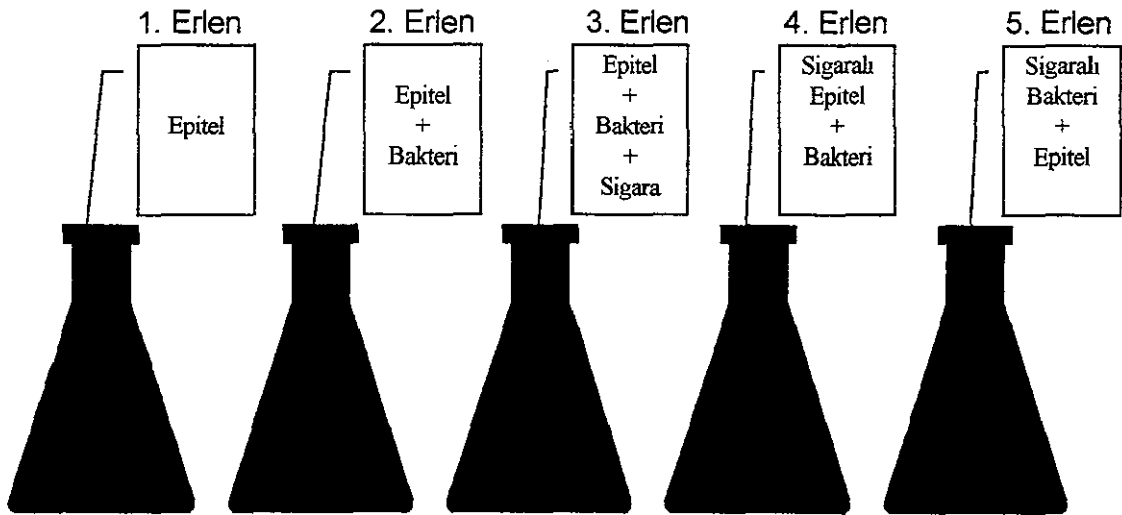
3.5 Sigaraya Maruz Kalmış Epitel veya Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Hem bakteri hem de epitel hücreleri ayrı ayrı erlenler içinde 50 cc sigara dumanı ile shaker içinde 1/2 saat süreyle muamele edilip, ardından santrifüj edildi. Daha sonra supernatan dökülüp üzerlerine ayrı ayrı PBS ilave edilerek süspansiyon hazırlandı.

3.6. İnkübasyon

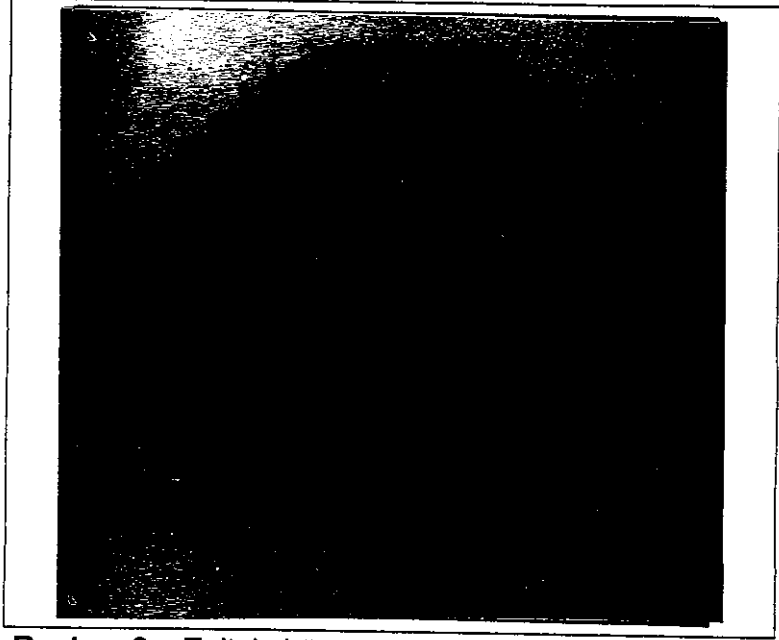
Hazırlanan bakteri ve hücre süspansiyonları aşağıda belirtildiği şekilde, 50 cc 'lik erlenler içinde, değişik karışımlar halinde, shaker (Gesellschaft für Labortechnik mbH D-30938 Burgwedel Tip: 1086) içinde 37 °C de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı.

1. Erlen: 1 cc epitel + 1 cc PBS (*BAZAL ADHERENS*)
2. Erlen: 1 cc epitel + 1 cc bakteri süspansiyonu (*KONTROL*)
3. Erlen: 1 cc epitel + 1 cc bakteri süspansiyonu + Sigara dumanı
4. Erlen: 1 cc sigaraya maruz kalmış epitel + 1 cc bakteri süspansiyonu
5. Erlen: 1 cc sigaraya maruz kalmış bakteri süspansiyonu + 1 cc epitel

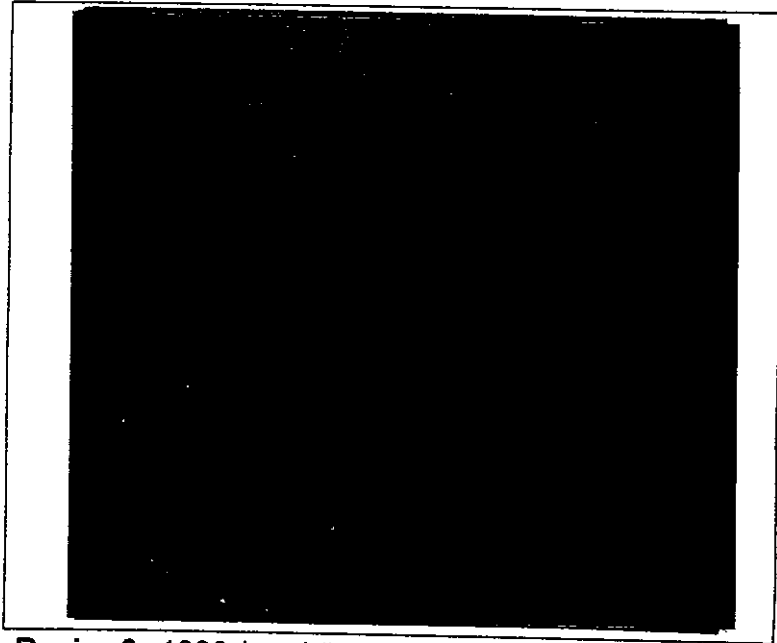


Şekil 1. İnkübasyona hazır bakteri ve hücre süspansiyonları

İnkübasyon sonunda adhere olmamış bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla hücreler 10 µm. porlu polikarbonat filtre (Millipore) üzerinde süzülerek yaklaşık 50 cc PBS ile yıkandı. Daha sonra lam üzerine aktarılan hücreler metil alkolle tesbit edilip, gram boyama yöntemiyle boyandı. 100 'lük objektif altında her bir preparatta toplam 50 epitel hücrelerine tutunmuş bakteri adeti sayıldı. Bulunan total bakteri sayısı 50 'ye bölünerek hücre başına düşen bakteri sayısı tesbit edildi.



Resim 2. Epitel hücrelerine tutunmuş gram pozitif diplokoklar (*S. pneumoniae*) izleniyor (x1000).



Resim 3. 1000 kez büyütülen buccal epitel hücrelerine adhere olmuş gram negatif basiller (*E. coli*).

Son olarak, ilk preparatta her donör için ayrı ayrı saptanan bazal adherens miktarı, ilgili donöre ait her preparattan tek tek düşülerek gerçek adherens değeri saptandı (10,13,31).

3.7. İstatistiksel yöntem:

Verilerin analizinde SPSS student's versiyon istatistik paket programı kullanıldı. Gruplar parametrik varsayımları yerine getirmediğinden ve bağımsız olduğundan, ortalama adherens yönünden ikişerli karşılaştırmada Mann Whitney-U testi kullanılmıştır. Veriler ort \pm standart hata olarak ifade edildi. Anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Çalışmaya 20 erkek ve 10 bayan olmak üzere toplam 30 donör alındı. Donörlerin yaş ortalaması pnömokok çalışılan vakalarda 24.2 ± 4.75 (\pm SD) ve *E. coli* çalışılan vakalarda 26.3 ± 3.29 idi ve ayrıca tüm vakaların yaş ortalaması $24, 9 \pm 3.64$ idi. 10 erkek ve 5 bayan olmak üzere toplam 15 kişide pnömokok, kalan 15 kişide (10 erkek ve 5 bayan) de *E. coli* adherensi çalışıldı.

Bazal adherens: Bazal adherens, pnömokok adherensinin çalışıldığı vakalarda 8.3 ± 1.5 ve *E. coli* adherensinin çalışıldığı vakalarda 11.5 ± 2.8 olarak bulunmuştur.

Kontrol grubu adherensi: Kontrol grubu adherensi *S. pneumonia* için 8.2 ± 1.7 ve *E. coli* için ise 20.5 ± 4.1 olarak saptanmıştır.

Sigaraya maruz bırakılan örneklerde adherens: Sigaraya maruz kalmış tüm grupların adherens ortalaması pnömokok için 6.0 ± 0.92 ve *E.coli* için ise 17.7 ± 2.25 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sigaranın bakteriyel adherenste anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür (Tablo 3).

Tablo 3. Sigaraya maruz bırakılmış tüm örneklerin ortalama adherensi

BAKTERİ	Ortalama bakteriyel adherens / hücre		
	Kontrol	Tüm Sigaralı örnekler	p
<i>S. pneumonia</i>	8.2 ± 1.7	6.0 ± 0.92	0.2387
<i>E. coli</i>	20.5 ± 4.1	17.7 ± 2.25	0.5276

Hem epitel hücresi, hem de bakterilerin sigara dumanına birlikte maruz bırakıldığı örneklerde pnomokok adherensi 8.4 ± 1.8 , *E. coli* adherensi ise 19.9 ± 4.2 olarak bulunmuştur. Bulunan değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, arada istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 4). Ayrıca hem bakteri ve hem de epitel hücresinin birlikte sigara dumanına maruz bırakıldığı örneklerde bulunan adherens değerleri, tek tek şekil 2 ve şekil 3' te verilmektedir.

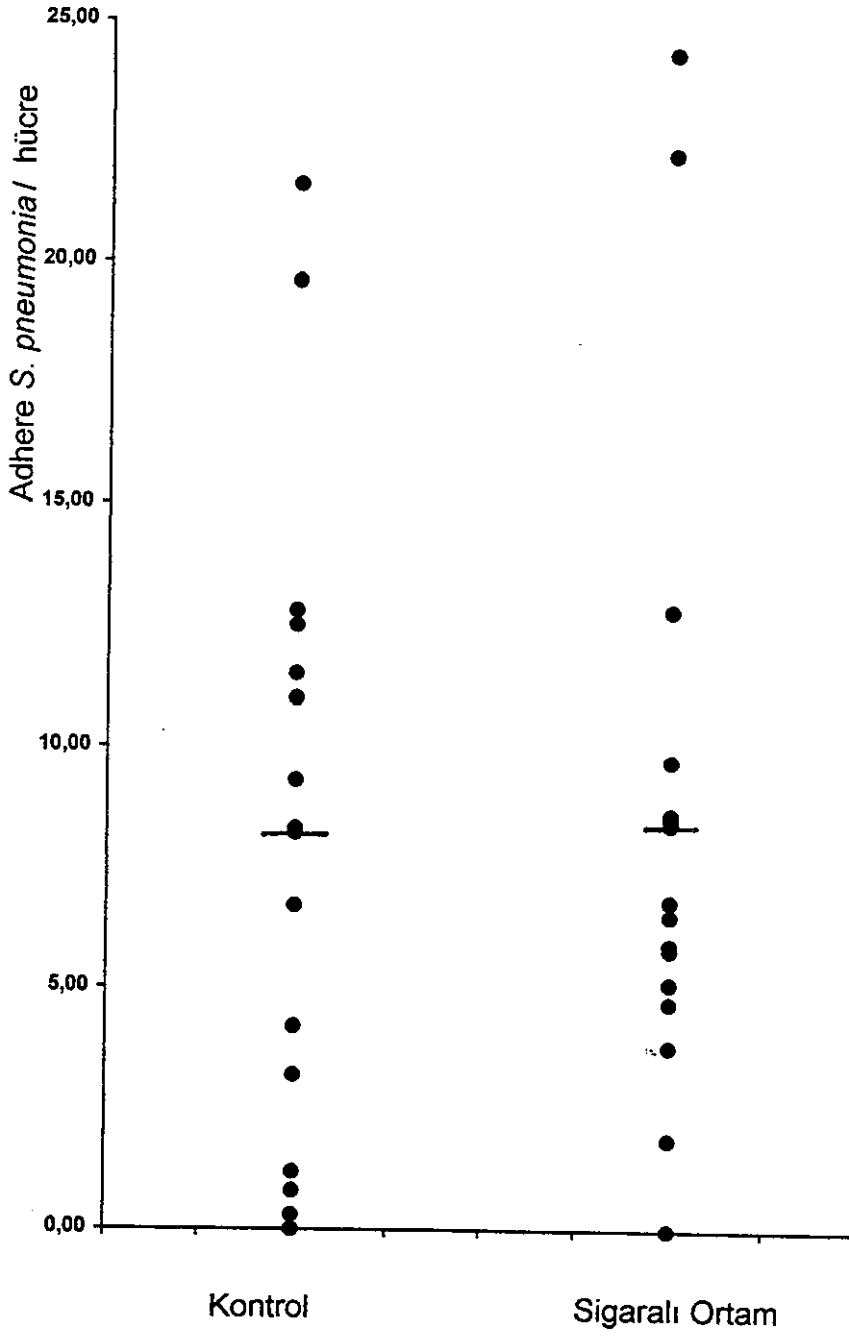
Tablo 4. Epitel hücresi ve bakterilerin sigaralı ortamda inkübasyonu ile bulunan adherens değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması.

BAKTERİ	Ortalama bakteriyel adherens / hücre		
	Kontrol	BEC ve bakteri birlikte sigaralı ortamda	p
<i>S. pneumonia</i>	8.2 ± 1.7	8.4 ± 1.8	0.9835
<i>E. coli</i>	20.5 ± 4.1	19.9 ± 4.2	0.9339

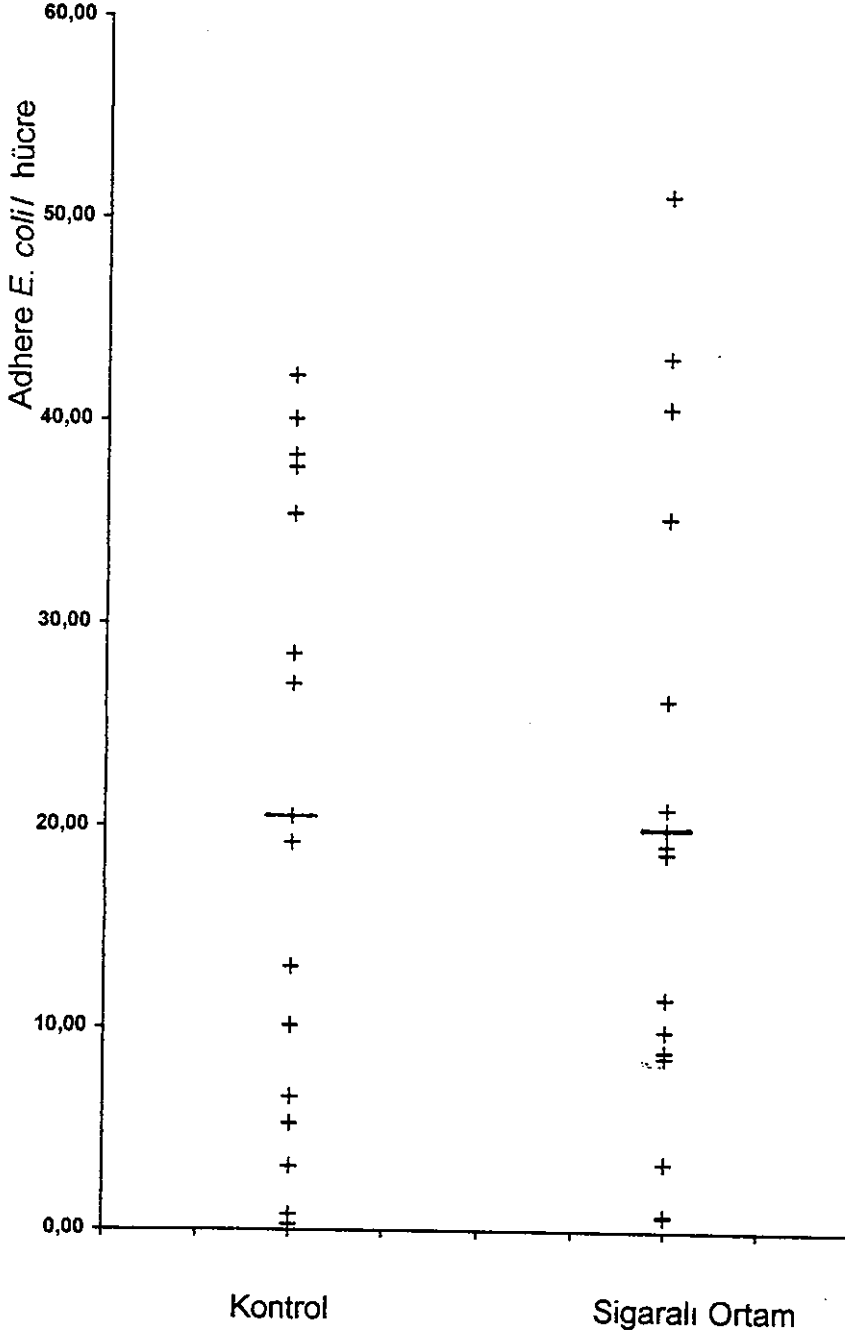
Pnomokokkal adherens, sadece buccal epitel hücrelerinin sigara dumanına maruz bırakıldığı örneklerde 3.5 ± 0.95 olarak bulunurken, aynı örneklerde *E. coli* adherensi 17.0 ± 4.0 olarak saptanmıştır. Bu değerler de kontrol grubuna göre anlamlı bir fark ifade etmemektedir (Tablo 5).

Tablo 5. Sigaraya maruz bırakılmış epitel hücresine adhere olan bakteri miktarları

BAKTERİ	Ortalama bakteriyel adherens / hücre		
	Kontrol	Sigaralı BEC ile Bakteri	p
<i>S. pneumonia</i>	8.2 ± 1.7	3.5 ± 0.95	0.0678
<i>E. coli</i>	20.5 ± 4.1	17.0 ± 4.0	0.5203



Şekil 2. *S. pneumoniae* adherensinin vakalara göre dağılımı



Şekil 3. *E. coli* adherensinin vakalara göre dağılımı

Yine sadece bakterilerin sigaraya maruz bırakıldığı örneklerde adherens, pnömokoklar için 6.2 ± 1.8 ve *E. coli* için ise 16.3 ± 3.2 düzeyinde bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arada istatistiksel bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 6).

Tablo 6. Epitel hücrelerine adhere olan, sigaraya maruz bırakılmış bakteri miktarları

BAKTERİ	Ortalama bakteriyel adherens / hücre		
	Kontrol	Sigaralı Bakteri ile BEC	p
<i>S. pneumonia</i>	8.2 ± 1.7	6.2 ± 1.8	0.2900
<i>E. coli</i>	20.5 ± 4.1	16.3 ± 3.2	0.4186

Bulgularımız, bakteri veya epitel hücrelerinin birlikte veya tek tek sigara dumanına maruz bırakılmasının, *Streptococcus pneumonia* ve *Escherichia coli* adherensini etkilemediğini ortaya koymaktadır.

5. TARTIŞMA

Mikroorganizmaların hücrelere ve diğer yüzeylere bağlanması işlemi olan adherens, mikroorganizmanın konakçı ile ilk etkileşimidir ve birçok infeksiyöz hastalığın patogeneğinde önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Vücut savunma mekanizmalarını yenebilen mikroorganizmalar konakçı dokularına bağlanıp kolonize olmakta ve ardından infeksiyon hastalıklarına neden olabilmektedir.

Alt solunum yolu infeksiyonlarının orofaringeal kolonizasyon ile ilişkisi iyi bilinmektedir. Orofaringeal kolonizasyonda artışa neden olan her tür olay, aynı zamanda solunumsal infeksiyonlarda da artışa neden olmaktadır. Kronik sigara içicilerde yapılan çalışmalar, bu insanlarda hem bakteriyel adherens, hem de solunumsal infeksiyonlarda artış olduğunu göstermektedir (3,4,6,7,10,11,13). Çalışmamız, sigara içenlerde bildirilen bakteriyel adherens ve solunumsal infeksiyonlarındaki artışın, sigara dumanının akut etkisine mi, yoksa kronik sigara dumanı maruziyetine bağlı olarak konakçıda oluşan sekonder değişikliklere mi bağlı olduğunu araştırılması amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Bilindiği üzere oral mukozal epitelial hücreler anlamlı sayıda bakteri içerirler ve bu bakteriler yüzeye öylesine sıkı yapışmışlardır ki güçlü bir yıkama ile bile uzaklaştırılmazlar (41). PBS ile yıkama sonrasında, bakteri ile inkübe etmeden önce lam üzerine yayılan hücrelerde sayılan ve çalışmamızda **bazal adherens** olarak belirtilen bu bakteri miktarları, önceki araştırmalarda bulunan sonuçlara benzerdir. Fainstain ve Musher araştırmalarında basal adherensi genç adultlarda 3.5 ± 0.9 ve orta yaşlı adultlarda 4.6 ± 1.1 , Gibbons ve van Houte 19 ± 6 , Raman ve arkadaşları ise sigara içmeyen deneklerde yaptıkları araştırmalarında basal adherensi 8.5 ± 21.1 olarak bulmuşlardır (10,11,41). Çalışmamızda ise pnömokok

adherensinin çalışıldığı vakalarda basal adherens 8.3 ± 1.5 , *E. coli* adherensinin çalışıldığı vakalarda ise 11.5 ± 2.8 olarak bulunmuştur.

Sigarasız ortamda, epitel hücresi ve bakterinin birlikte inkübe edildiği **kontrol grubunda** adherens; pnomokoklarda 8.2 ± 1.7 , *E. coli* için ise 20.5 ± 4.1 olarak bulunmuştur. Fainstain ve Musher tarafından yapılan çalışmada, tip I *S. pneumonia*'nın farinks hücrelerine adherensi genç adultlarda 1.4 ± 1.2 ve orta yaşlı adultlarda 3.3 ± 1.2 , *S. pneumonia* tip III adherensi ise sırası ile 1.3 ± 1.2 ve 1.9 ± 0.9 olarak bildirilmiştir (10). Yine Fainstain ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada *S. pneumonia* tip I ve tip III 'ün farinks hücrelerine adherensi sırası ile, tip I için 1.4 ± 1.0 ve tip III için 1.2 ± 1.0 olarak bulunmuştur (31). Bu çalışmalarda bulunan değerlerin çalışmamızda bulunan değerlerden daha düşük olması birkaç şekilde açıklanabilir. İlk olarak tez çalışmamızda kullandığımız *S. pneumonia*'nın tip tayini yapılamamıştır. Kullandığımız bakteri suşu, belirtilen bu çalışmalardaki suşlardan daha iyi adhere olabilen bir suş olabilir. Nitekim Fainstain ve Musher tarafından sigara içen insanlarda yapılan bir çalışmada, tip I *S. pneumonia*'nın faringeal hücrelere tip III *S. pneumonia*'dan daha iyi adhere olduğu gösterilmiştir (10). Ayrıca bu çalışmalarda bakteri ve hücreler plastik bir tüpe konarak shaker içinde inkübe edilmiş. Ancak shaker hızı ile ilgili olarak kesin bilgi verilmemiştir. Bizim çalışmamızda ise bakteri ve hücre karışımı cam erlenler içine konarak shakerde 120 / dk. hız ile inkübe edilmiştir. Raman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, tip 25 *S. pneumonia*'nın buccal hücrelere adherensi 0.7 ± 0.4 olarak bulunmuştur (11). Ancak bu çalışmada da bakteri konsantrasyonları 10^6 / ml. ve inkübasyon süresi 35 dakika idi. Bu çalışmalarda bakteriyel adherenste gözlenen farklılık, belirtilen nedenlerle ilişkili olabilir. *E. coli* adherensiyle ilgili olarak Bruce ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *E. coli*'nin üroepitelial hücrelere adherensi araştırılmış ve bu çalışmada kontrol grubu adherensi 11.5 ± 2.1 olarak bulunmuştur (38). Bu çalışmada da inkübasyon süresi ½ saat olarak tutulmuştur. Ellen ve Gibbons tarafından yapılan bir çalışmada da *E. coli*'nin insan farinks epitel hücrelerine adherensi 13 ± 3.7 , rat diline

adherensi 14.0 ± 1.5 ve yine rat mesanesine adherensi 74.6 ± 2.9 olarak bulunmuştur (28). İnkübasyon süresi bu çalışmada 35 dakika olarak belirlenmiştir.

Tüm sigaralı grupların ortalama adherensi pnömokok için 6.0 ± 0.92 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sigaranın adherensi arttırmadığı gözlenmiştir. Bu değer *E. coli* için 17.7 ± 2.25 olarak bulunmuştur ki bu da kontrol grubuna göre bir değişiklik ifade etmemektedir. Dolayısıyla akut sigara dumanı maruziyeti tek başına *S. pneumonia* ve *E. coli* adherensini arttırıcı bir faktör olarak görülmemektedir. Daha önce yapılmış çalışmalarda bu bulguyu indirekt olsa da destekleyen veriler mevcuttur. Sigarayı bırakan insanlarda, sigaranın bırakılmasından sonra üç yıl kadar süreyle bakteriyel adherensin yüksek kalması, adherens artışının direkt sigara dumanı akut maruziyeti ile değil, sekonder kronik değişikliklerle ilgili olduğunu düşündürmektedir (11). Bir başka çalışmada, günde 1 paketten daha az sigara içenlerin trakeası çoğunlukla steril bulunurken, daha fazla sigara içenlerin yaklaşık yarısında trakeal kolonizasyon saptanmış (13). Bu bulgu içilen sigara miktarının da adherenste önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Finklea ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da özellikle ağır sigara içicilerde solunumsal infeksiyonların daha fazla görüldüğü belirtilmiştir (8).

Raman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, sigara içmeyen insanlardan alınan epitel hücreleri, sigara içen insanların tükürüğü ile inkübe edilmiş ve tip 25 pnömokok adherensinde artış saptanmıştır. Yazar, bu adherens artışının olasılıkla sigara içen insanların tükürüğündeki non-sellüler yapıların buccal epitel hücrelerinin yüzey yapılarının değiştilmesi ile gerçekleştiğini ve tükürüğün *S. pneumonia* için bağlanma bölgeleri oluşturduğunu ileri sürmüştür (11). Yine aynı çalışmanın devamında tükürükteki amilazın sigara içenlerde arttığı belirtilmiş ve tripsin ile fibronektinin uzaklaştırılmasının *P. aeruginosa* adherensini arttırdığını gösteren çalışma (42) örnek gösterilmiştir. Bir başka çalışmada da epitel hücrelerinin tripsin ile muamele edilmesinin *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae* adherensini arttırdığı gösterilmiştir (34). Literatürde *Streptococcus pyogenes* (grup A streptokok) ve *S. aureus*' un reseptör olarak fibronektine bağlandıkları

belirtilmektedir (43). Ellen ve Gibbons tarafından yapılan bir başka çalışmada da insan farinks hücrelerinin tripsin ile muamelesinin *Streptococcus pyogenes* adherensini azalttığı gösterilmiştir (28). Bilindiği gibi tükrük amilaz ve tripsin dahil birçok enzim içermektedir. Burada olay, muhtemelen kronik sigara içimi nedeniyle tükrükte tripsinin artması ve tripsinin de fibronektini hücre yüzeyinden uzaklaştırması ile ilgilidir. Olasılıkla sigara dumanı içindeki maddelerle ilgili değildir. Kronik sigara içimine bağlı olarak gelişen tripsin seviyesindeki olası artış, fibronektinin uzaklaştırılmasını, dolayısıyla adı geçen bakterilerin (*Streptococcus pyogenes* ve *S. aureus*) adherensini azaltacaktır.

Kronik sigara içen insanlarda adherens artışına neden olan faktörlere yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur. Finklea ve arkadaşları çalışmalarında sigara içenlerde akut üst ve alt solunum yolu infeksiyonlarında artış saptamışlar ve bunun sigaranın vücut savunma mekanizmalarını bozması ile gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir (8). Bu görüşü destekleyen başka literatürler de mevcuttur (2,44). Sigaranın alveoler makrofaj fagositozunu azalttığı ve fonksiyonlarını bozduğu, ayrıca akut sigara dumanının nötrofil fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir (40,45,46). Yine sigaranın IgE' yi arttırırken, IgG, A ve M'i azalttığı, CD8-T lenfosit sayısını arttırdığı bilinmektedir. Makrofaj sayılarını arttırmakla birlikte, aktive makrofajların fonksiyonlarında anomalilere (yüzey MHC 2 antijen ekspresyonu ve interlökin-1 ile araziidonik asit metabolitlerinden kaynaklanan diğer inflamatuvar mediatörleri - lökotrien B4, prostaglandin E2, tromboxan B2 - salgılama kapasitelerinde bozukluk olmakta) neden olmaktadır (2,47). Sigara içen insanların bronş mukozasında silia kaybı, atipik hücre formasyonu ve mukozal hücre hiperplazisi oluşmaktadır (1,48,49). Belirtilen bu değişikliklerin bakteriyel adherensi etkileyeceği aşıkardır. Nitekim Williams ve Gibbons tarafından yapılan bir çalışmada sekretuar IgA' nın, Streptokokların epitel hücrelerine adherensini inhibe ettiği gösterilmiştir (50).

Bu çalışmada bulunan değerlere dikkatli bakıldığında sigaralı gruplarda saptanan adherens değerlerinin, istatistiksel olarak bir anlam ifade etmese de, kontrol grubundan hafif düşük olduğu görülmektedir. Yani, önceki çalışmaların aksine, bakteriyel adherenste bir miktar azalma saptanmıştır. Bu sonuç, sigara

dumanı içerisindeki toksik maddelerin bakteri adherensini negatif yönde etkileyebileceği şeklinde açıklanabilir. Nitekim bazı çalışmalarda sigara dumanının bakteriyel üremeyi, gram pozitif koklarda daha belirgin olmak üzere inhibe ettiğini gösterilmektedir (51,52).

Bulgularımız akut sigara dumanı maruziyetinin, in-vitro koşullarda *Streptococcus pneumonia* ve *Escherichia coli*' nin buccal epitel hücrelerine adherensini önemli ölçüde etkilemediğini ortaya koymaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışma, akut sigara dumanı maruziyetinin, *S. pneumonia* ve *E. coli*'nin buccal epitel hücrelerine adherensini etkileyip etkilemediğini araştırmak üzere gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen, hiç sigara içmeyen ve solunumsal bir infeksiyonu olmayan 30 gönüllüden alınan buccal epitel hücreleri PBS ile yıkayıp filtre edildikten sonra PBS içinde 10^4 hücre / ml olacak şekilde hücre süspansiyonu ve yine PBS içinde 10^7 bakteri / ml olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Vakaların yarısında *S. pneumonia* ve diğer yarısında da *E. coli* adherensi çalışıldı. Ardından hücre ve bakteri süspansiyonları sırasıyla;

- 1 cc. hücre süspansiyonu ve 1 cc. PBS (*Bazal adherens*)
- 1 cc. hücre ve 1 cc. bakteri süspansiyonu (*Kontrol Grubu*)
- 1 cc. hücre ve 1 cc. bakteri süspansiyonu sigaralı ortamda
- Sigaraya maruz kalmış 1 cc. hücre, 1 cc. bakteri süspansiyonu ile
- Sigaraya maruz kalmış 1 cc. bakteri, 1 cc. hücre süspansiyonu ile shaker içinde 37^0 'de 1 saat süreyle inkübe edildi.

Sonuçta tüm sigaraya maruz kalmış gruplar birlikte veya tek tek kontrol grubu ile karşılaştırıldığında arada istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu bulgu, akut sigara dumanı maruziyetinin, *S. pneumonia* ve *E. coli*'nin buccal epitel hücrelerine adherensini etkilemediğini oraya koymaktadır.

Herne kadar akut sigara dumanı maruziyeti, *S. pneumonia* ve *E. coli*'nin buccal epitel hücrelerine adherensini etkilememişse de, bu diğer bakterilerin adherensinin de etkilenmeyeceği anlamını taşımamaktadır. Dolayısıyla çalışma, diğer solunumsal patojenlerle de tekrarlanabilir.

Bilindiği üzere sigaranın vücutta birçok sisteme zararlı etkisi mevcuttur. Kronik sigara içenlerde saptanan adherens artışı bu zararlardan sadece birisini oluşturmaktadır. Çalışmamızda, akut sigara dumanı maruziyeti ile belirtilen bakterilerin adherensinde değişiklik olmaması, akut sigara dumanı maruziyetinin diğer sistemlere zarar vermeyeceği şeklinde yorumlanmamalıdır. Nitekim değişik çalışmalarda, akut sigara dumanı maruziyetinin vücutta değişik fonksiyonel bozukluklara neden olduğu ortaya konulmuştur.

7. ÖZET

Daha önce yapılmış çalışmalarda kronik sigara içenlerde bakteriyel adherensin arttığı gösterilmiştir. Ancak saptanan bu adherens artışının sigara dumanının akut etkisine mi, yoksa kronik sigara içimiyle ilişkili olarak epitel hücrelerinde oluşan yapısal ve/veya fonksiyonel değişikliklere mi bağlı olduğu açık değildir. Bu çalışma akut sigara dumanı maruziyetinin, buccal epitel hücrelerine (BEC) bakteriyel adherensi etkileyip etkilemediğini saptamak amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya 20 erkek ve 10 kadın olmak üzere ortalama yaşları 24.9 ± 3.64 (ort \pm SD) olan toplam 30 kişi alındı. Çalışma grubu, yarısında *S. pneumonia* ve diğer yarısında da *E. coli* adherensi çalışılmak üzere iki gruba ayrıldı. BEC, donörlerin yanak mukozası metal bir spatula ile nazikçe sıyrılarak alındı ve phosphate buffered salin (PBS) içinde süspanse edildi. Hücrelerin polikarbonat membran filtre üzerinde yıkanıp süzülmesi sonrasında, PBS içinde 10^4 hücre/ml ve 10^7 bakteri/ml içeren süspanسیونlar hazırlandı. Ardından sigaralı ortamda BEC ve bakteri birlikte, sigaraya maruz kalmış BEC ile sigaraya maruz kalmamış bakteri ve sigaraya maruz kalmış bakteri ile sigaraya maruz kalmamış BEC shaker içinde inkübe edildi. Sigarsız ortamda her iki örneğin inkübasyonu ile kontrol grubu oluşturuldu. 1 saatlik inkübasyon sonunda hücreler tekrar yıkanıp süzüldü ve lam üzerine yayılarak hücrelere yapışan bakteri adeti sayıldı.

Sigaraya maruz bırakılan tüm örneklerin ortalama bakteriyel adherensi, kontrol grubuna benzer bulundu. *S. pneumonia* için sigaralı örneklerin adherensi 6.0 ± 0.92 ve kontrol grubu adherensi 8.2 ± 1.7 (p: 0.2387) idi. Bu değerler *E. coli* için sırası ile (17.7 ± 2.25 ve 20.5 ± 4.1 (p: 0.5276) olarak bulundu. Sigaraya maruz bırakılan her bir örnek tek tek kontrol ile karşılaştırıldığında da arada fark olmadığı görüldü.

Sonuçlarımız, daha önce kronik sigara içenlerde yapılan ve adherensin arttığını rapor eden çalışmaların aksine, akut sigara dumanının *S. pneumonia* ve *E. coli*'nin BEC'e adherensini etkilemediğini göstermektedir.

8. SUMMARY

The increased bacterial adherence has been reported in cigarette smokers. But, it is not apparent whether enhanced bacterial adherence is due to acute effect of smoke or changes of structure and/or function of the epithelium associated with chronic smoking. The aim of this study was to investigate whether the bacterial adherence is influenced from the acute exposure of cigarette smoke.

30 normal subjects, with a mean age of 24.9 ± 3.64 (mean \pm SD) years were selected for this study. The subjects were divided in to two groups. *Streptococcus pneumoniae* adherence was studied in the first half (10 men, 5 woman), and *E. Coli* adherence was studied in the second half (10 men and 5 woman) of them. The BEC obtained by gently scarping of buccal mucosa with a spatula and suspended in phosphate buffered saline (PBS). After washing and filtering cells by a polycarbonate membrane filter, the suspensions including BEC (10^4 cells per ml) and bacteria (10^7 bacteria per ml) were prepared in PBS. Then, both smoke-treated BEC and bacteria, smoke-treated BEC with smoke-untreated bacteria and smoke-treated bacteria with smoke-untreated BEC were incubated in a shaking water bath. Smoke-untreated bacteria and BEC were used as control. After 1 hour incubation period, the cells were washed and filtered again. Then, the number of adherent bacteria to 50 epithelial cells were counted.

The average number of adherent bacteria to the epithelium in all smoke-treated suspensions was similar to control group for *S. pneumoniae* (6.0 ± 0.92 vs. 8.2 ± 1.7 , $p: 0.2387$) and for *E. coli* (17.7 ± 2.25 vs. 20.5 ± 4.1 , $p: 0.5276$). Each smoke-treated sample were also compared to control group alone and no meaningfull results were found.

In contrary to previous studies which showed increased bacterial adherence to epithelial cells in chronic cigarette smokers, our findings suggest that acute exposure of bacterium and / or epithelium to smoke has no significant effect on the adherence of *S. pneumoniae* and *E. coli* to BEC .

9. KAYNAKLAR

1. Savaş İ: Sigara ve akciğerler. In: Klinik Solunum Sistemi ve Hastalıkları, Numanoğlu N (Ed), Antıp yayınları, 1997, s. 365-368
2. Holbrook JH: Nicotine addiction. In: Harrison's Principles of Internal Medicine, Issebacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (Eds), McGraw Hill , 13th edition, 1994, pp 2433-2437.
3. Haynes WF, Krstulovic VJ, Bell ALL: Smoking Habit and Incidence of Respiratory Tract Infections in a Group of Adolescent Males. Am Rev Respir Dis. 1966; 93: 730-735.
4. Kark JD, Lubiush M, Rannon L: Cigarette Smoking as a Risk Factor for Epidemic A (H1N1) Influenza in Young Men. N Eng J Med.1982; 307: 1042-1046.
5. Blake GH, Abell TD, Stanley WG: Cigarette Smoking and Upper Respiratory Infection among Recruits in Basic Combat Training. Ann Int Med 1988; 109: 198-202.
6. Parnell JL, Anderson DO, Kinnis C: Cigarette Smoking and Respiratory Infections in a Class of Student Nurses. N Eng J Med 1966; 274: 979 - 984.
7. Crowdy JP, Sowden RR: Cigarette Smoking and Respiratory ill-health in the British Army. Lancet 1975; May 31: 1232-1234.
8. Finklea JF, Hasselblad V, Sandifer SH, Hammer DI, Lowrimore GR: Cigarette Smoking and Acute Non-influenzal Respiratory Disease in Military Cadets. Am J Epidem 1971; 93: 457-462.

9. Peters JM, Ferris BG: Smoking, Pulmonary Function, and Respiratory Symptoms in a College-Age Group. *Am Rev Respir Dis* 1967; 95: 774-782
10. Fainstain V, Musher DM: Bacterial Adherence to Pharyngeal Cells in Smokers, Nonsmokers and Chronic Bronchitis. *Infec Immun* 1979; 26: 178-182.
11. Raman AS, Swinburne AJ, Fedullo AJ: Pneumococcal Adherence to Buccal Epithelial Cells of Cigarette Smokers. *Chest* 1983; 83: 23-27.
12. 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.* 1983; 127: 85-90.
13. Irvin RS, Erickson AD, Pratter MR, Corrao WM, Garrity FL, Meyers JR, Kaemmerlen JT: Prediction of Tracheobronchial Colonisation in Current Cigarette Smokers with Chronic Obstructive Bronchitis. *J Infect Dis.* 1982; 145: 234-241.
14. Söyletir G: Konak parazit ilişkisi. In: *İnfeksiyon Hastalıkları*, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds), Nobel Tıp Kitabevleri, 1996, s. 29-36.
15. Kılıçturgay K: İmmünoloji. *Güneş ve Nobel Kitabevleri*, Bursa, 1997, s. 225-246.
16. Babacan F: *İnfeksiyon hastalıklarının patogenezi ve immünopatolojisi*. In: *İnfeksiyon Hastalıkları*, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Eds), Nobel Tıp Kitabevleri, 1996, s. 36-52.
17. Jansen HM, Sachs APE, Van Alphen L: Predisposing Conditions to Bacterial Infections in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2073-2080.

18. Toews GB: Pulmonary Clearance of Infectious Agents. In: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, Fishman AP (Ed), McGraw Hill, 3rd edition, 1998, pp 1891-1904.
19. Madoff LC, Kasper DL: Introduction to Infectious Disease-Host Parasite Interaction. In: Harrison's Principles of Internal Medicine, Issebacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (Eds), McGraw Hill , 13th edition, 1994, pp 485-489.
20. Beachey EH: Bacterial adherence, Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143: 325-345.
21. Baddour LM, Christensen GD, Simpson WA, Beachey EH: Microbial Adherence. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (Eds), Churchill Livingstone, 1990, pp 9-25.
22. Petri WA, Mann BJ: Microbial Adherence. In: Principles and Practice of Infectious Diseases, Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds), Churchill Livingstone, 1995, pp 11-19.
23. Sansonetti PJ: Introduction of the Diversity of Bacterial Pathogens. In: Oxford Textbook of Medicine, Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrel DA (Eds), Oxford University Press, 3rd edition. 1996, pp 268-272.
24. Johanson WG, Dever LL: Microbial Flora and Colonisation of the Respiratory Tract. In: Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, Fishman AP (Ed). McGraw Hill, 3rd edition, 1998, pp 1883-1890.

25. Beachey EH, Giampapa CS, Abraham SN: Adhesin Receptor-mediated Attachment of Pathogenic Bacteria to Mucosal Surfaces. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: S45-S48.
26. Van Alphen L, Jansen HM, Dankort J: Virulence Factors in the Colonisation and Persistence of Bacteria in the Airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 2094-2100.
27. Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z: Selective Adherence as a Determinant of the Host Tropisms of Certain Indigenous and Pathogenic Bacteria. *Infect Immun* 1976; 13: 238- 246.
28. Ellen RP, Gibbons RJ: Parameters Affecting the Adherence and Tissue Tropisms of *Streptococcus Pyogenes*. *Infect Immun* 1974; 9: 85-91.
29. Liljemark WF, Gibbons RJ: Proportional Distribution and Relative Adherence of *Streptococcus mitis* (mitis) on Various Surfaces in the Human Oral Cavity. *Infect Immun* 1972; 6: 852-859.
30. Hakanson A, Carlstedt I, Davies J, Mossberg AK, Sabharwal H, Swanborg C: Aspects on the Interaction of *Streptococcus pneumoniae* and a *Haemophilus influenzae* with Human Respiratory Tract Mucosa. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S187-S191.
31. Fainstein V, Musher DM, Cate TR: Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. *J Infect Dis.* 1980; 141; 172-176

32. Ramphal R, Small PM, Shands SW, Fischlschweiger W, Small PA: Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Tracheal Cells Injured by Influenza Infection or by Endotracheal Intubation. *Infec Immun* 1980; 27: 614-619.
33. Sklavounou A, Germanie GR: Adherence of Oral Streptococci to Keratinized and Nonkeratinized Human Epithelial Cells. *Infec Immun* 1980; 27: 686-689.
34. Johansen WG, Woods DE, Chaudhuri T: Association of Respiratory Tract Colonisation with Adherence of Gram Negative Bacilli to Epithelial Cells. *J Infect Dis.* 1979; 139: 667-673.
35. Johanson WG, Higuchi JH, Chaudhuri TR, Woods DE: Bacterial Adherence to Epithelial Cells in Bacillary Colonisation of the Respiratory Tract. *Am Rev Respir Dis* 1980; 121: 55-63.
36. De Bentzman S, Plotkowski C, Puchelle E: Receptors in the *Pseudomonas auroginosa* Adherence to Injured and Repairing Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S155-S162.
37. Selinger DS, Reed WP: Pneumococcal Adherence to Human Epithelial Cells. *Infec Immun* 1979; 23: 545-548.
38. Bruce AW, Chan RCY, Pinkerton D, Morales A, Chadwick P: Adherence of Gram Negative Uropathogens to Human Uroepithelial Cells. *The Journal of Urology* 1983; 130: 293-298.
39. Özgümüş OB: Subinhibitör Konsantrasyonlardaki Bazı Antibiotiklerin Üropatojenik *Escherichia coli*'nin Hemagglütinasyonuna ve Epitel Hücrelerine in-vitro Yapışmasına Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Trabzon 1996, s. 25-29.

40. Green GM, Carolin D: The Depressant Effect of Cigarette Smoke on the in vitro Antibacterial Activity of Alveolar Macrophages. *N Eng J Med* 1967; 276: 421-427.
41. Gibbons RJ, van Houte J: Selective Bacterial Adherence to Oral Epithelial Surfaces and Its Role as an Ecological Determinant. *Infec Immun* 1971; 3: 567-573.
42. Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Bass JA: Role of Fibronectin in the Prevention of Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Buccal Cells. *J Infec Diss* 1981; 143: 784-790.
43. Finlay BB, Falkow S: Common Themes in Microbial Pathogenicity. In: *Microbiological Reviews* 1989; 53: pp: 210-230.
44. Green GM, Jakab GJ, Low RB, Davis GS: Defense Mechanisms of the Respiratory Membrane. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115: 479-514.
45. Demarest GB, Hudson LD, Altman LC: Impaired Alveolar Macrophage Chemotaxis in Patients with Acute Smoke Inhalation. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 279-286.
46. Selby C, Drost E, Brown D, Howie S, MacNee W. Inhibition of Neutrophil Adherence and Movement by Acute Cigarette Smoke Exposure. *Exp Lung Res* 1992; 18: 813-827.
47. Hendrick DJ: Extrinsic allergic alveolitis. In: *Oxford Textbook of Medicine*, Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrel DA (Eds) Oxford University Press, 3rd edition, 1996, pp 2809-2817.

48. Gaziöglu K: Sigaranın akciğerlere etkisi. In: Sigaraya Hayır (No Tobacco), Erkan F, Kılıçarslan Z, Tabak L, Özkardeşler S (Eds), Akciğer Hastalıkları Derneği Yayınları, 1992, s. 32-45.
49. Uçan ES: Sigara ve akciğerler. In: Sigaraya Hayır (No Tobacco), Erkan F, Kılıçarslan Z, Tabak L, Özkardeşler S (Eds), Akciğer Hastalıkları Derneği Yayınları, 1992, s. 46-50.
50. Williams RC, Gibbons RJ: Inhibition of Bacterial Adherence by Secretory Immünoglobulin A: A Mechanism of Antigen Disposal. Science 1972; 177: 697-699.
51. Ertel A, Eng R, Smith SM: The Differential Effect of Cigarette Smoke on the Growth of Bacteria Found in Humans. Chest 1991; 100: 628-630.
52. 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 1994; 5: 33-35.