

Neonatal Sepsiste Lökosit Fonksiyonları

Dr. Ünsal GÜNAY (*)

ÖZET

Neonatal sepsiste lökosit fonksiyonlarını inceleyen araştırmalar az sayıdadır. Bu konuda daha geniş araştırmaların yapılması gerekmektedir. Bu nedenle plânlanan bu çalışmada, 40 neonatal sepsisli hasta ile 25 normal yenidoğanın lökosit fonksiyon test sonuçları kıyaslandığında, sepsislielerde fagositik ve bakterisidal aktivitelerde anlamlı düşüklükler belirlenmiştir. Bozuklukların hastalığın klinik gidişi üzerine olumsuz etki yapabileceği sonucuna varılmıştır.

SUMMARY

LEUKOCYTE FUNCTIONS IN NEONATAL SEPSIS

Leukocyte functions in neonatal sepsis have been investigated in a few number of studies. More studies are needed to clarify the subject.

In this prospective and controlled study, a comparison of the results of leukocyte function tests of 40 neonatal sepsis cases and 25 normal newborn revealed significant deficiency in phagocytic and bactericidal activities of leukocytes of septic newborns. It was concluded that these alterations may, adversely, effect the clinical course of the disease.

Neonatal sepsiste lökosit fonksiyonlarını inceleyen araştırmalar bizim bilgilerimize göre çok azdır¹⁻². Bunlardan birinde Forman ve arkadaşları¹, 2'si sepsisli, çeşitli klinik bozukluklar gösteren 9 yenidoğanda fagositoz ve bakterisidal aktivitenin düşüklüğünü göstermişlerdir. Wright ve arkadaşları² ise, 9'u sepsisli, 40 hasta yenidoğanda bakterisidal aktivitenin düşüklüğünü saptamışlardır.

Buna karşın normal yenidoğan lökositlerinin fagositoz ve bakterisidal aktivitelerinin erişkinlerdeki düzeyde olduğu bildirilmiştir¹⁻⁴. Yalnız bir çalışmada hayatın ilk 12 saatinde bu fonksiyonlarda düşüklük gösterilmiştir⁵. Diğer bazı çalışmalarda da lökosit fonksiyonlarında değişkenlik saptanmışsa da bu, serumdaki opsonizasyon yetersizliklerine bağlanmıştır¹⁻³. Bu hastalardaki lökosit fonksiyon bozukluklarının daha geniş çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir. Bu nedenle prospektif ve kontrollü bir çalışma plânlanmıştır.

MATERYEL ve METODLAR

Bursa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğine "Neonatal Sepsis" ön tanısı ile yatırılan, bebekler araştırma grubuna alındılar. Neonatal sepsis ön tanısı, klinik ve laboratuvar bulgulara göre konuldu⁶⁻⁹.

(*) Bursa Üniv. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kürsüsü Öğretim Üyesi

Araştırma grubundaki hastalardan, yatışlarından hemen sonra en az iki ayrı kan kültürü alınarak rutin antibiyotik tedavisine başlandı. Tam kan sayımı ve serum opsonik aktivitesiyle nötrofillerin fagositik ve bakterisidal aktiviteleri tayin edildi.

Çalışma süresi içinde, kliniğe sepsis ön tanısı ile yatırılan yenidoğanlardan kan kültüründe üreme olmayanlar çalışma dışı bırakıldı. Üreme olan 40 yenidoğan araştırma grubuna alındı. Fakültemiz Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde doğan ve tamamen sağlıklı olan 25 yenidoğan bebek "Kontrol Grubu" olarak incelendi ve adı geçen testlerin tümü onlara da uygulandı.

I. Lökosit Fonksiyon Testleri:

1- Test Materyelinin Hazırlanması:

a) Lökosit süspansiyonların hazırlanması için, hastalardan ortalama 7 ml. venöz kan, içinde 500 ünite heparin bulunan silikonlanmış, steril cam tüplere alındı. Üzerine 5 ml. dekstranın izotonik sodyum klorürdeki % 6'lık solusyonu (Macrodex) eklenerek karıştırıldı. Eritrositlerin çökmesi için oda ısısında 1 saat bırakıldı. Üstteki lökositten zengin sıvı, steril şartlarda başka bir tüpe aktarıldı. Hettich Universal II santrifüjünde, dakikada 1000 devirde 10 dakika çevrilerek, lökositlerin çökmesi sağlandı. Üstte kalan sıvı tamamen boşaltıldı ve tüpün alt kısmındaki lökosit kümesi üzerine, 1 ml. % 0.1 jelatinli steril Hanks solusyonu ilave edilip karıştırıldı. Spencer sayma kamarasında lökosit sayımı yapıldı ve ml'deki lökosit sayısı 5×10^6 olacak şekilde, ilave Hanks solusyonu ile ayarlandı¹⁰.

b) Test organizmaları olarak, koagülaz pozitif stafilokoküs aureus (coag. pos. staph. aureus) kullanıldı. Bu bakterinin seçilme nedeni kliniğimizde daha önce tetkik ve tedavi edilen neonatal sepsis vak'alarının kan kültürlerinde en sık üretilen mikroorganizma olmasıdır^{7,11}. Adı geçen bakterinin 20 saatlik buyyon kültürleri, dakikada 1500 devirde 15 dakika çevrilerek, sedimenti oluşturan bakteriler, % 0.1 jelatinli steril Hanks solusyonunda 40×10^6 /ml. bakteri içerecek şekilde sulandırıldı¹². Bakteri sayısının ayarlanmasında McFarland, nephelometric standartları kullanıldı¹³.

c) Opsonin olarak, normal erişkin serumu kullanıldı. Bunun için, 4 normal şahıstan elde edilen kan, steril koşullarda pıhtılaştırıldıktan sonra, elde edilen serumlar karıştırıldı ve 1 ml. lik bölümler halinde ayrı ayrı tüplerde -20°C 'de donduruldu. Kullanılacağı zaman ısısı 37°C 'a getirildi. Her 2 hafta sonunda, yeniden taze olarak hazırlandı¹⁰.

d) Fagositik karışımlar, 1 ml., lökosit, 1 ml. bakteri süspansiyonu ve 0.2 ml. opsonin karıştırılarak yapıldı. Bu materyel, 25×170 mm. lik silikonlanmış steril cam tüpler içinde hazırlanarak, otomatik çalkalayıcı su banyosunda düşük hızda, 37°C 'de inkübe edildi¹².

2- Fagositik Aktivite Testi: Fagositik karışımlardan 0, 30, 60 ve 120 dakikalarda alınan örnekler, kan yayma tekniğine uygun olarak 26×76 mm'lik lamlara yayıldı ve kuruduktan sonra metanolle tesbit edilip Giemsa boyası ile boyandı. Böylece hazırlanmış preparatlar mikroskop altında, immersiyon objektifi ile incelenerek, her preparatta 100 nötrofil sayıldı, herbirinin içinde bulunan ortalama bakteri sayısı saptandı. Her nötrofile düşen fagosite edilmiş ortalama bakteri sayısı 30, 60, 120 dakikalar için fagositik aktivite olarak kaydedildi¹².

3- Bakterisidal Aktivite Testi: Bunun için Ouie ve arkadaşlarının¹⁰ kullandıkları metot, Bhuyan ve arkadaşlarının¹² modifiye ettikleri şekliyle kullanıldı. Hazır-

lanış şekli yukarıda belirtilen fagositik karışımlardan 0, 30, 60 ve 120'inci dakikalarda, 0,2 ml'lik örnekler alınarak, ayrı tüplerde 1.8 ml. steril distile su ile karıştırıldı. Vortex-Genie marka tüp çalkalayıcısı ile kuvvetli olarak çalkalanarak lökositlerin parçalanması ve içlerindeki fagosite edilmiş bakterilerin çıkması sağlandı. Böylece elde edilen süspansiyonlar gene steril distile suda, 10^{-5} oranında sulandırıldı. Bu dilüsyonlardan 0.1 ml.'si Petri kutularındaki DST agar (Oxoid) basiyerlerine ekilip, 37°C 'de 40 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, Petri kutuları incelenerek, herbirinde üreyen bakteri kolonileri sayıldı. Sıfır dakika fagositik karışımının sulandırılıp ekildiği Petri kutusundaki canlı bakteri kolonilerinin sayısı % 100 olarak kabul edildi ve 30, 60 ve 120 dakika örneklerinininki, buna oranlanarak yüzde öldürülen bakteri şeklinde kaydedildi.

4- Oponik Aktivite Testi: Bunun için neonatal sepsisli bebeklerden alınan serumlar oponin olarak kullanıldı. Normal erişkinlerden elde edilen lökositler ve hasta serumu, yukarıda fagositik karışımlar bölümünde belirtilen oranda karıştırıldı. 0.2 ml. hasta serumu, 1 ml. normal lökosit ($5 \times 10^6/\text{ml}$) ve 1 ml. bakteri süspansiyon ($40 \times 10^6/\text{ml}$) karıştırılarak 37°C 'de otomatik çalkalayıcılı su banyosunda inkübe edildi ve 30, 60 ve 120 dakikalarda yayma preparatlar hazırlandı. Preparatlar immersiyon objektifi ile mikroskopta incelendi. Her normal nötrofile düşen ortalama fagosite edilmiş bakteri sayısı saptanarak oponik aktivite belirlendi⁴.

II. İstatistiksel Analizler:

İstatistiksel analizlerde "Eşleştirilmemiş örneklerde ortalamalar arası farkın önem kontrolü" (t-testi) kullanıldı¹⁴.

BULGULAR

1. Cinsiyet, Yaş ve Ağırlık:

Kontrol grubundaki bebeklere ait bulgularla, araştırma grubundaki hastaların tedavi öncesi bulgularının karşılaştırılması yapılmıştır.

a- Cinsiyet: Kontrol grubunda 13 erkek (% 52) ve 12 kız (% 48) vardı. Araştırma grubunda ise 23 erkek (% 57) ve 17 kız (% 43) bulunuyordu. İki grup arasında cinsiyet oranı yönünden anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.5$).

b- Yaş: Kontrol grubundaki bebeklerin yaş ortalaması ve standart sapma 4.6 ± 2.5 gün idi. Araştırma grubunda ise 5.2 ± 2.8 gün idi. Aradaki fark önemsiz bulundu ($p > 0.3$).

c- Ağırlık: Çalışmaya alınan normal bebeklerin ağırlıkları 3154 ± 541 g. olarak bulundu. Araştırma grubundaki bebeklerin ağırlıkları ise 2975 ± 571 g. idi. Aradaki fark anlamsızdı ($p > 0.2$).

2. Lökosit Fonksiyonları:

Tablo 1'de görüldüğü gibi oponik aktivite yönünden sepsislielerde genel bir düşüklük gözlemlendi. Fakat bu farklılıklar anlamlı değildi.

Fagositik aktivite yönünden ise sepsislielerde genel bir düşüklük gözlemlendi. Fakat yalnızca 120 dakika bulguları istatistiksel olarak anlamlı idi.

Bakterisidal aktivite yönünden ise sepsislielerde 30, 60, 120 dakikalarda olmak üzere anlamlı bir düşüklük bulundu.

Tablo: 1— Kontrol Grubu ile Araştırma Grubundaki 40 Neonatal Sepsislinin Lökosit ve Fonksiyon Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

Lökosit Fonksiyon Testleri	Kontrol Grubu (n = 25)		Araştırma Grubu (n = 40)		df	t	p
	x	SD	x	SD			
1. Oponik aktivite							
— 30 dakika	1.81	0.52	1.57	0.60	60	1.60	> 0.1
— 60 dakika	2.62	0.64	2.33	0.80	58	1.46	> 0.1
— 120 dakika	3.59	0.81	3.17	1.21	59	1.43	> 0.1
2. Fagositik Aktivite							
— 30 dakika	1.76	0.82	1.52	0.60	60	1.37	> 0.1
— 60 dakika	2.94	1.32	2.37	0.96	61	1.99	> 0.05
— 120 dakika	3.75	1.13	3.15	1.04	59	2.13	< 0.05
3. Bakterisidal aktivite							
— 30 dakika	37.2	16.9	22.6	9.4	56	4.20	< 0.001
— 60 dakika	56.7	18.2	43.9	11.1	59	3.40	< 0.005
— 120 dakika	75.1	16.2	66.5	15.5	61	2.11	< 0.05

x : Aritmetik ortalama

SD : Standart sapma

df : Serbestlik derecesi

TARTIŞMA

Bulgular bölümünde belirtildiği gibi, normal kontrol grubundaki 25 yenidoğanla, araştırma grubundaki toplam 40 sepsislinin tedavi öncesi bulguları karşılaştırılmıştır. Normal bebeklerle, sepsisli olgular arasında yaş, cins ve ağırlık yönünden anlamlı bir farklılık yoktur.

1. Lökosit Fonksiyonları:

Lökosit fonksiyon testlerinde normal yenidoğanlarla, sepsisliiler arasında bazı farklılıklar vardı.

a- Oponik Aktivite Yönünden: Araştırma grubundaki sepsisli olgularla, kontrol grubundaki normal yenidoğanlar arasındaki farklılıklar anlamsızdı (Tablo: 1). Bilgilerimize göre, neonatal sepsiste görülebilecek oponik aktivite değişikliklerini inceleyen araştırmalar çok azdır. McCracken ve arkadaşlarının³ çalışmasında 1'i sepsisli, 4 enfeksiyonlu bebekte, hastalık etkeni olan E. coli'ye karşı serum oponik aktivitesinde düşme gösterilmiştir.

E. coli ve serratia marcescens gibi gram-negatif bakterilere karşı olan serum oponik aktivitesi, IgM-spesifik antikorlara bağlıdır^{1,4,15}. Stafilokok ve streptokok gibi gram-pozitif mikroorganizmalar için ise, IgG sınıfı immunglobulinler opsonin görevi yaparlar^{1,4,15}. IgG immunglobulinler, gebeliğin 20'inci haftasından sonra placenta yoluyla fetüse geçmeye başlar ve doğumda en az anne düzeyinde bulunurlar¹⁶. Bu durumda, stafilokoklara karşı olan oponik aktivitenin annenin immunolojik durumu ile yakından ilişkili olduğu söylenebilir. Bulgularımız, sepsisli hastalarda anlamlı bir şekilde düşüklüğünü gözlemediğimiz oponik aktivitenin, yenidoğanda ağır enfeksiyon durumlarından bile etkilenmediğini düşündürmektedir.

b- Fagositik Aktivite Yönünden: Sepsislilerde özellikle 120 dakikada anlamlı düşüklük saptandığı, bulgular bölümünde belirtilmiştir (Tablo: 1). Bu konuda yapılan araştırmalar, normal yenidoğan lökositlerinin, fagositik aktivitelerinin yeterli olduğunu göstermiştir^{1.3.4}. Buna karşın 2'si neonatal sepsisli, çeşitli klinik bozukluklar gösteren 9 yenidoğanda, fagositik aktivite düşüklüğü bulunmuştur¹.

Fagositoz, aktif enerjiye bağlı bir olaydır ve burada miyosin-aktin etkileşimi gibi, enerji harcayan bir mekanizmanın rolü ileri sürülmüştür. Bazı metabolik zehirler ve hipertonsite bu olayı inhibe edebilir^{7.18}. Fagosite edilmek için tanınan partikül veya bakterinin, nötrofiller içine alınış mekanizması kesin olarak bilinmemekle beraber, iki değerli katyonlardan, Mg⁺⁺ ve Ca⁺⁺ iyonlarının burada önemli rol oynadıkları sanılmaktadır. Oponik olarak aktif C₃, bu iyonların etkisini artırmak suretiyle fagositoza yardım eder. Fakat gene de bu iyonların kesin etki yerleri bilinmemektedir⁸.

Neonatal sepsislilerde gözlemiş olduğumuz düşük fagositik aktivitenin kesin açıklamasını yapmak güçtür. Ağır enfeksiyon, lökositlerdeki metabolik olaylar üzerine inhibe edici etki gösterebilir. Bakteri toksin ve artıkları, elektrolitik dengesizlikleri ve özellikle bu hastalarda ortaya çıkabilecek hipertonsitenin de burada etkili olabileceği düşünülebilir.

c- Bakterisidal Aktivite Yönünden: Sepsisli yenidoğanlar, normallere göre 30, 60 ve 120 dakika olmak üzere, anlamlı bir düşüklük gösterdiler (Tablo: 1). Literatürde bu konuda yapılan çalışmalarda, çeşitli klinik bozukluklar gösteren veya stress altındaki yenidoğanların bakterisidal aktivitelerinde, düşüklük saptanmıştır^{1.2.5.19}. Bu çalışmalarda en ilginç olanı Wright ve arkadaşlarının² yapmış oldukları çalışmadır. Bu araştırmacılar, 9'u sepsisli, 40 hasta yenidoğanda, stafilkoklara ve E. coli'ye karşı bakterisidal aktivitede düşüklük saptamışlardır. Bulgularımız da bu gözlem sonuçlarına uygunluk göstermektedir. Neonatal sepsislilerde bakterisidal aktivite yetersizliğinin, stress altındaki yenidoğan lökositlerindeki, geçici heksozmonofosfat (HMF) aktivite düşüklüğüne bağlı olabileceği sanılmaktadır^{2.20}. Diğer taraftan, Thong ve Rencis²¹, yapmış oldukları in vitro deneylerde indirekt bilirubin, nötrofillerdeki HMF aktivitesini anlamlı bir şekilde düşürdüğünü göstermişlerdir. Neonatal sepsislilerde anlamlı derecede yüksek bulduğumuz indirekt bilirubin de, gözlediğimiz düşük bakterisidal aktiviteye katkısını olabileceği düşünülebilir.

KAYNAKLAR

1. FORMAN, M.L., STIEHM, E.R.: Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low-birth-weight infants. N. Engl. J. Med, 281: 926, 1969.
2. WRIGHT, W.C., JR., ANK, B.J., HERBERT, J., STIEHM, E.R.: Decreased bactericidal activity of leucocytes of stressed newborn infants. Pediatrics, 56: 579, 1975.
3. MC CRACKEN, G.H., Jr., EICHENWALD, H.F.: Leucocyte function and development of opsonic and complement activity in the neonate. Am. J. Dis. Child., 121: 120, 1971.
4. DOSSETT, J.H., WILLIAMS, R.C., Jr., OUIE, P.G.: Studies on interaction of bacterial factors and polymorphonuclear leucocytes in mothers and newborns. Pediatrics, 44: 49, 1969.

5. COEN, R., GRUSH, O., KAUDER, E.: Studies of bactericidal activity and metabolism of leucocyte in the full-term neonates. *J. Pediatr.* 75: 400, 1969.
6. ALOJIPAN, L.C., ANDREWS, B.F.: Neonatal sepsis, a survey of eight years experience at the Louisville General Hospital. *Clin. Pediatr.* 14: 181, 1975.
7. GÜNAY, Ü., KAÇAR, M., ÖZEKE, T., ILDIRIM, İ.: Sepsis Neonatorum (34 Vak'anın Klinik ve Laboratuar İncelenmesi). XV.inci Türk Pediyatri Kongresi (19-24 Temmuz 1976, İstanbul). Tebliğler Kitabı, s. 417.
8. WIENTZEN, R.L., J.R., MC CRACKEN, G.H., J.R.: Patogenesis and management of neonatal sepsis and meningitis. *Curr. Probl. Pediatr.* 8 (2): 1, 1977.
9. KLEIN, J.O., MARCY, S.M.: Bacterial Infections in Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant (Ed. Remington, J.S. ve Klein, J. O.), W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1976, p. 747-802.
10. QUIE, P.G., WHITE, J.G., HOLMES, B., GOOD, R.A.: In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leucocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.*, 46: 668, 1967.
11. GÜNAY, Ü., ERALP, Ö., HASAN, P.: Neonatal Sepsisin Tanısında Yardımcı Bulgu Trombositopeni, XVI. Türk Pediyatri Kongresi (18-22 Temmuz 1977, İstanbul) Tebliğler Kitabı (Perinatoloji) Cilt 1, s. 393.
12. BHUYAN, U.N., MOHAPATRA, L.N., RAMALINGASWANI, V.: Phagocytosis bactericidal activity and nitroblue tetrazolium reduction in the rabbit neutrophil in protein malnutrition. *Indian. J. Med. Res.* 62: 42, 1974.
13. FRANKE, S., REITMAN, S., SONNENWIRTH, A.C.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, 7 th. Edition. The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1970, p. 1058.
14. GÜLESEN, Ö.: Tıbbi ve Hayati İstatistik. A. Ü. Tıp Fakültesi Yayınları. Sayı 195, A. Ü. Basımevi 1969, Ankara, s. 121-135.
15. MILLER, M.E., BLOOM, R.S.: Neonatal Immunology and related protective mechanisms. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, 4 (1): 1, 1973.
16. ALFORD, C.: Immunoglobulin determinations in the diagnosis of fetal infection. *Pediatr. Clin. North. Am.*, 18(1): 99, 1971.
17. STOSSEL, T.P.: Phagocytosis (Third of three parts). *N. Engl. J. Med.*, 290: 833, 1974.
18. STOSSEL, T.P.: Phagocytosis (Second of three parts). *N. Engl. J. Med.*, 290: 774, 1974.
19. XANTHOU, M., VALASSI-ADAM, E., KINTZONIDOU, E., MATSANIOTIS, N.: Phagocytosis and killing ability of candida albicans by blood leucocytes of healthy term and preterm babies. *Arch. Dis. Child.* 50: 72, 1975.
20. ANDERSON, D.C., PICKERING, L.K., FEIGIN, R.D.: Leucocyte function in normal and infected neonates. *J. Pediatr.* 85: 420, 1974.
21. THONG, Y.H., RENCIS, V.: Bilirubin inhibits hexose-monophosphate shunt activity of phagocytosing neutrophils. *Acta. Pediatr. Scand.* 66: 757, 1977.