

Anne Sütüyle Beslenmenin İnvitro Lökosit Fonksiyonlarına Etkisi

Dr. Nevin ÖZCENK*
Dr. İbrahim ILDIRIM**

ÖZET

Süt çocuklarında anne sütüyle beslenmenin, invitro lökosit fonksiyonlarına etkisi incelendi. Anne sütü alan ve almayan çocukların, serum opsonik aktivitesi, lökositlerin fagositoz indeksi, bakterisidal aktivitesi ve NBT boyasını indirgeme yeteneği araştırıldı.

Anne sütü alan bebeklerde *Staphylococcus aureus*'a karşı opsonik aktivite yüksek bulundu. Lökositlerin fagositik ve bakterisidal aktivitesi ise, gerek anne sütüyle gerekse yapay beslenenlerde değişiklik göstermedi. Buna karşılık NBT—testi yapay sütle beslenen çocuklarda iki kat artmış olarak bulundu.

Sonuç olarak; lökositlerin antibakteriyel fonksiyonlarının anne sütü almayan çocuklarda azalmış olması, bu çocukların enfeksiyonlara duyarlılığının artmasına neden olabileceğini düşündürmüştür.

SUMMARY

Human Milk and Invitro Leukocyte Functions

In infants the effect of feeding of colostrum and milk on their invitro leukocyte functions were determined. Serum opsonic activity, phagocytic and bactericidal activities of leukocytes of breast-fed and formula-fed infants were examined. NBT-dye reduction ability of leukocytes were also investigated in two groups.

The opsonic activity against *Staphylococcus aureus* had increased in breast-fed infants. There was no difference between two groups in phagocytic and killing activities of leukocytes. But NBT-test increased two fold positivity in formula-fed infants.

This study indicates that leukocytic antibacterial function decreased in formula-fed infants and this may be an additional mechanism of infant's increased susceptibility to infection.

(*) Bursa Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı

(**) Bursa Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kürsü Profesörü

GİRİŞ

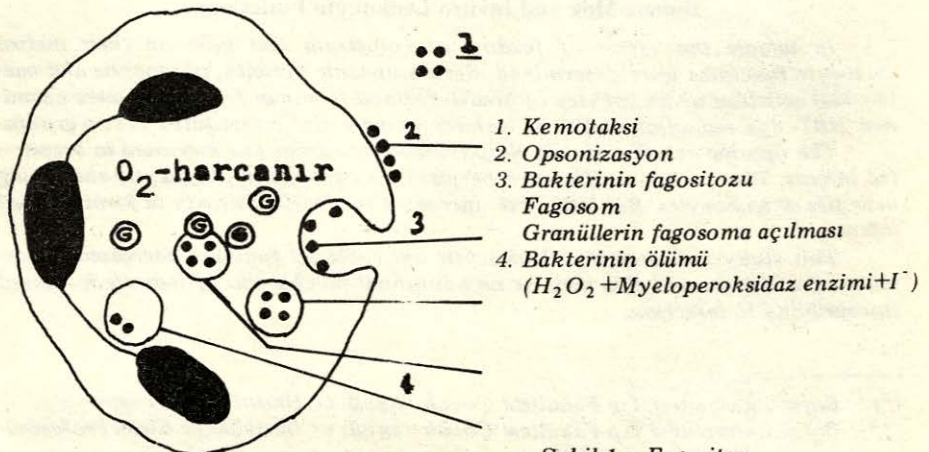
Kolostrum ve anne sütü ile beslenme, bebeğin enfeksiyonlara direnme gücünü pasif olarak arttırmaktadır¹⁻³. Bileşimindeki laktoferrin, lizozim, bifidus faktörü, antistafilokoksik faktör, a_1 - antitripsin, interferon, immunglobulinler, C_3 ve C_4 komplemanları gibi humoral savunma faktörlerine ek olarak canlı hücreleri de kapsamaktadır²⁻⁶. Bu hücreler arasında makrofajlar, kolostrum korpuskülleri, polimorf nüveli lökositler (PNL), B ve T lenfositleri ile epitel hücreleri bulunmaktadır. Sütte çok miktarda olan salgısal- IgA, annenin sindirim ve solunum sistemindeki lenfoid hücrelerle karşılaşan antijenlere karşı oluşturulmuş özgül antikorlardır^{7,8}.

Humoral ve hücresel bağışıklık, özgül ve honspesifik olarak kazanılabilir. Nonspesifik bağışıklığın gezici hücresel elemanlarından olan monosit ve PNL'lerin fagositoz fonksiyonu, dört aşamada oluşmaktadır⁹ (Şekil 1).

Bakterinin fagositler tarafından alınması enerji gerektiren bir olaydır. Bu enerji anaerobik glikoliz ve heksoz monofosfat şantı (HMPS) ile sağlanır. Fagositozu izleyerek gelişen biyokimyasal olaylar sırasında oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2); pentoz şantını aktive eder, bir kısmı katalaz enzimi ile suya dönüşür yada fagozom içine girip myeloperoksidaz enzimi ve halojenler ile birleşerek bakteriyi öldürür. Ortama Nitroblue tetrazolium (NBT) boyası konulursa; fagosit içinde H_2O_2 tarafından indirgenerek, lacivert-siyah renkli bir madde olarak sitoplazmada çöker¹⁰.

Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde, serum opsonin defektine bağlı olarak, lökositlerin bakterisidal aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir¹¹. Lökositlerin bakteriyi alma ve hücre içinde öldürme fonksiyonu, yenidoğan ve prematüre bebeklerde genellikle normaldir^{12,13}. Ayrıca birçok hastalık durumlarında örneğin; sepsis^{14,15}, radyasyon tedavisi¹⁶, ağır yanıklar¹⁷, malnütrisyon¹⁸, demir eksikliği anemisi, bazı ilaçların kullanımı¹⁹ ve genetik hastalıklarda²⁰ da granülosit aktivitesinin bozukluğu bildirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı: Anne sütü alımı ile bakteri ölümü için gerekli basamakların nasıl etkilendiğini ve dolayısıyla çocuk lökositlerinin invitro antibakteriyel fonksiyonlarını araştırmak olacaktır.



Şekil 1 : Fagositoz

GEREÇ ve YÖNTEM

Rastgele örnekleme yoluyla seçilen 24 sağlıklı süt çocuğu çalışmaya alındı. Bunlardan 13 bebek anne sütü, 11 bebek yapay besleniyordu. Anne sütüne ek olarak yapay beslenme de alan bebekler ilk guruba dahil edildi. Bebeklerin yaşları 4- 12 aylar arasında değışmekteydi. Anne sütü alan çocukların 5'i kız, 8'i erkek, yaş ortalaması 6.6 ay (4-10) idi. Yapay beslenen 4 kız, 7 erkek süt çocuğunun yaşları ise 4.5 - 12 ay (ortalama 7.6) arasında değışti. Anemi, malnütrisyon, raşitizm, genetik hastalık ve ilaç kullanımı yoktu. Lökosit fonksiyonları incelenecek bu olguların seçimi için, sağlam çocuk polikliniğimize aylık kontrol için getirilen bebekler ön çalışmaya alındı. Klinik muayene, laboratuvar ve radyolojik incelemeler yapıldı.

Lökosit fonksiyonlarının incelenmesi:

1- Test materyelinin hazırlanması:

a) Çalışmada gerekli olan lökosit süspansiyonları, anne ve bebeklerden steril şartlarda, 0.1 ml heparin (Liquemine - Roche, 1 ml/5000 Ü) konulmuş silikonlu cam tüplere alınan 10 ml venöz kandan elde edildi. Kanın şekilli elemanları, tüplere 7 ml dekstran solüsyonu (Macrodex - Baxter) eklenerek, ortalama bir saatte çöktürüldü. Üstteki sıvı steril bir pipet yardımıyla alınıp, 2000 devirde 10 dakika santrifüje edildi. Dipte kalan çöküntü fenol kırmızısı katılmış Hanks solüsyonu²¹ ile, 5×10^6 /ml PNL olacak şekilde sulandırıldı²². Sayının uygunluğu mikroskopta 5000 lökosit/mm³ sayılarak ayarlandı.

b) Oponik aktivite için kullanılan serumlar, sağlıklı beş yetişkinden alınan taze serumların karıştırılıp, küçük tüpler içinde - 20°C de dondurulmasıyla hazırlandı. Gereklikçe deney sırasında kullanıldı.

c) Test bakterisi olarak coagulase positive Staphylococcus aureus kullanıldı. Adı geçen bakterinin 20 saatlik buyyon kültürleri, dakikada 1500 devirde 15 dakika santrifüje edildi. Sediment Hanks solüsyonunda 40×10^6 bakteri/ml içerecek şekilde sulandırıldı²². Bakterinin yoğunluğu özel bir eşel yardımı ile ayarlandı.

2- Oponik aktivite:

Annelerin lökositleri kullanılarak, bebek serumlarının fagositöz indeksinin saptanması şeklinde yapıldı¹⁸. 1ml hücre, 1ml bakteri ve 0.2ml opsonin karışımı, steril silikonize cam tüpler içinde, 37°C lik otomatik çalkalayıcıda inkübe edildi. Bu karışımdan, fagositik aktiviteyi saptamak için 0,30,60,120 dakikalarda yayma preparatlar yapılarak Giemsa boyasıyla boyandı. Yüz adet PNL immersiyon objektifi altında incelenerek fagosite edilmiş bakteriler sayıldı. Toplam sayıdan bir PNL'e düşen bakteri sayısı (fagositik aktivite) bulundu.

3- Fagositik aktivite:

Bebek lökositlerinin fagositöz indeksi bulundu. Normal yetişkin serumu opsonin olarak kullanıldı²³.

4- Bakterisit aktivite:

Quie ve arkadaşlarının kullandığı yöntemeye göre, Bhuyon ve arkadaşlarının modifiye ettikleri şekliyle saptandı²³⁻²⁴. Her fagositik karışımdan 0.2ml alınıp 1.8ml steril distile suyla karıştırılıp kuvvetle çalkalanarak, lökositlerin parçalanıp bakterilerin açığa çıkması sağlandı. Süspansiyonlar tekrar sterli distile suyla 10^{-5} oranında sulandırıldıktan sonra 0.1ml agar besiyerine ekildi. Petri kutuları 37°C de 40 saat etüvde bekletilip stafilokok kolonileri sayıldı. Rakamlar ml'deki bakteri sayısına çevrilerek PNL'lerin bakterisit aktivitesi saptandı.

5- Kantitatif NBT - İndirgenme Testi:

Park ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemle göre yapıldı¹⁰. Yüz PNL içinde, NBT granülü kapsayan hücre sayısı bulundu.

Beslenme farkı tüm deneylerin bitiminde, istatistik değerlendirme sırasında gözönüne alındı. Gruplar Student'in t. testi ile kıyaslandı. Farklılıklar p değeri 0.05 den az veya eşitse anlamlı olarak değerlendirildi.

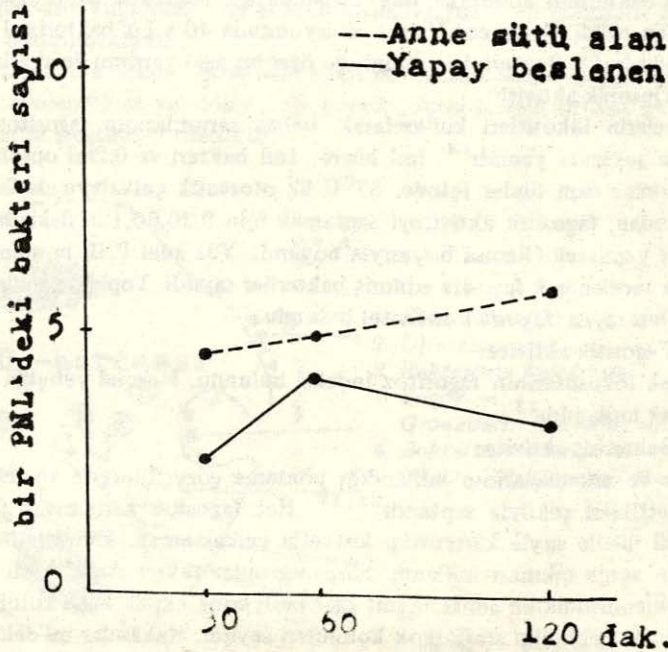
SONUÇLAR

Ortalama opsonik aktivite değerleri, anne sütü alan bebek serumlarında yüksek bulundu (Tablo I, Şekil 2). (120 dak. $p = 0.05$). Anne sütü alan grupta, deney ortamına katılmış olan 40×10^6 /ml bakterinin yüzde 77.5'i polimorf nüveli lökositler (5×10^6 /ml) tarafından fagosite edilmiştir. Diğer grupta bu sayı yine 120 dakika sonunda ancak yüzde 40'a ulaşabildi.

Tablo: I
Opsonik Aktivite (Bir PNL'deki Bakteri Sayısı)

İnkübasyon Süresi	30 dak.	60 dak.	120 dak.
Anne sütü alan (13)	4.8 \pm 1.53*	5.0 \pm 0.64	6.2 \pm 1.47
Yapay süt alan (11)	2.3 \pm 0.48	4.5 \pm 1.64	3.2 \pm 0.61
P	0.1 $>$ p $>$ 0.05	0.4 $>$ p $>$ 0.35	p = 0.05

(*) Ortalama Değer \pm Standart Hata

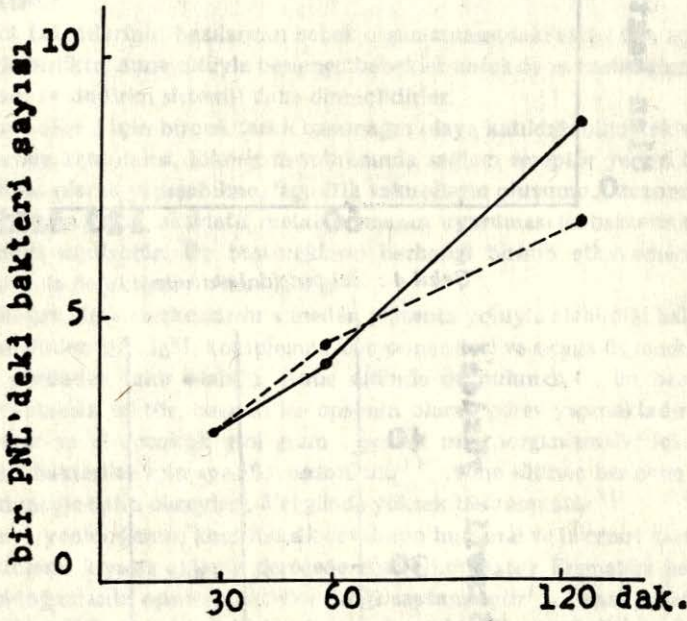


Şekil 2 : Opsonik aktivite sonuçları

Ortamda normal insan serumu opsonin olarak konulmuşsa, fagositik aktivite değerleri her iki grupta da farklı bulunmadı (Tablo II, Şekil 3). Her PNL'deki ortalama bakteri sayılarının benzerlikleri görülmektedir. Gruplar arasında istatistiksel olarak da fark yoktu.

Tablo: II
Fagositik Aktivite Sonuçları

İnkübasyon Süresi	30. dak.	60 dak.	120 dak.
Anne sütü alan (13)	2.4 ± 0.48	4.6 ± 0.74	7.1 ± 1.48
Yapay Beslenen (11)	2.4 ± 0.69	4.6 ± 0.75	9.3 ± 2.03
P	p = 0.5	0.3 > p > 0.25	0.2 > p > 0.15

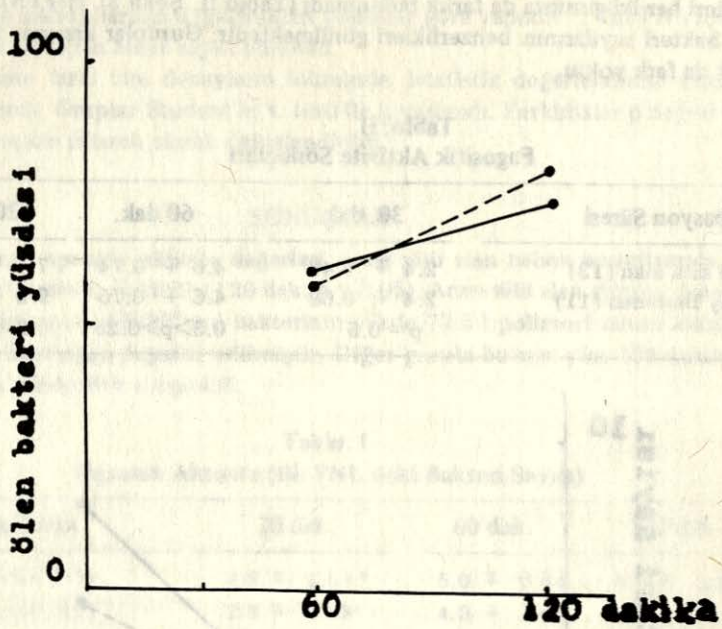


Şekil 3 : Fagositoz indeksi

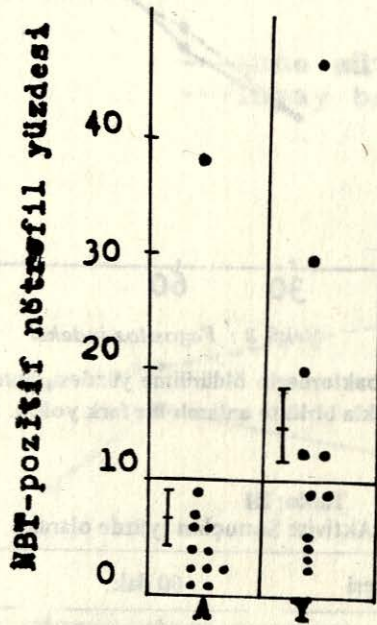
Hücreye alınmış bakterilerin öldürülme yüzdesi, anne sütüyle beslenen çocuklarda biraz yüksek olmakla birlikte anlamlı bir fark yoktu. Sonuçlar Tablo III ve Şekil 4'de verilmiştir.

Tablo: III
Bakterisidal Aktivite Sonuçları (yüzde olarak)

İnkübasyon Süresi	60 dak.	120 dak.
Anne sütü alan (13)	55.5 ± 4.47	79.8 ± 3.26
Yapay Beslenen (10)	57.4 ± 5.28	75.4 ± 4.50
P	0.4 > p > 0.35	0.25 > p > 0.2



Şekil 4 : Bakterisidal aktivite



Şekil 5 : NBT - testi sonuçları

NBT boyasının lökositler tarafından indirgeme yeteneği yapay sütle beslenen bebeklerde yüksek bulundu. Ortalama değerler anne sütü alanlarda 6.4 ± 3.4 iken, ikinci grupta 13.6 ± 4.0 idi. P değeri $0.1 > p > 0.05$ bulundu.

TARTIŞMA

Anne sütü doğal bir besin olmasına karşın, çağlar boyunca seçim ve gereksinim yönünden evrensel bir çocuk besini olmamıştır^{2,5}. Sanayileşmiş toplumlarda son 50 yıldır gözlenen anne sütü alımındaki sürekli azalma, az gelişmiş ülkelere de yayılma eğilimindedir^{2,6}. Klinik gözlemler ve karşılaştırmalı çalışmalar, sütle beslenme türünün bebek ölümleri ve hastalık tipi ile sıklığı üzerinde etkili olduğunu göstermiştir^{2,7-2,9}. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün raporunda; Şili kırsal bölge çocuklarında, anne sütüyle beslenmenin azalması ile ölüm oranının yükseldiği bildirilmektedir^{3,0}. Anne sütündeki antimikrobik faktörler formül mamalar ile sağlanamamaktadır.

Bu süt faktörlerinin bazılarının bebek organizmasındaki etkisi tam açıklanmamış olmakla birlikte, anne sütüyle beslenen bebekler enfeksiyon hastalıklarına (özellikle solunum ve sindirim sistemi) daha dirençlidirler.

Bakteri ölümü için birçok farklı basamağın olaya katıldığı bilinmektedir⁹⁻¹⁵. Bunlar arasında kemotaksi, lökosit membranında sağlam reseptör yerleri bulunması, zara normal olarak yapışabilme, fagositik vakuollerin oluşumu, lizozomal granüllerin vakuole boşalması, oksidatif metabolizmanın uyarılması ile bakterinin vakuolde sindirilmesi sayılabilir. Bu basamakların herhangi birinin etkilenmesi, lökosit fonksiyonlarında defektlere neden olabilir.

Yenidoğan, IgG antikorlarını anneden plasenta yoluyla alabildiği halde, diğer immunoglobulinler IgA, IgM, kompleman komponentleri ve sıcağa dayanıksız doğal opsoninler yönünden fakir olabilir. Anne sütünde de bulunan C₃ ün bazı komponentleri kemotaksik faktör, bazıları ise opsonin olarak görev yapmaktadır. Ayrıca, IgG stafilokok ve streptokok gibi gram - pozitif mikroorganizmalar için¹¹, IgM gram- negatif bakteriler için spesifik opsonindir¹². Anne sütüyle beslenen bebeklerin kan immunoglobulin düzeyleri, 5'ci günde yüksek bulunmuştur³¹.

Miller¹³ yenidoğanın, kemotaksik cevabının humoral ve hücrel komponentlerini, erişkinlere kıyasla anlamlı derecede düşük bulmuştur. Prematüre bebeklerde ve bazı yenidoğanlarda opsonik aktivite azlığı saptanmıştır¹¹. Fakat yenidoğan lökositlerinin fagositik ve bakterisidal aktiviteleri, erişkin düzeyindedir¹¹⁻¹⁴. Sepsisli ve stress altında olan yenidoğanlarda ise, fagositoz ve bakterisidal aktivite ile HMPS aktivite düşüklüğü bildirilmektedir^{14,15}. Daha büyük olgularda lökosit fonksiyonlarını etkileyebilen diğer bozukluklar arasında Down sendromu, diabetes mellitus, lenfoproliferatif hastalıklar, demir eksikliği anemisi, malnütrisyon, ısı ve radyasyon gibi fiziksel etkenler sayılabilir. Ayrıca bazı ilaçların kullanımı (prednisolon) asidoz, anoksi, hiperbilirubinemi, elektrolit bozuklukları da immatür lökosit fonksiyonlarında defektlere neden olabilir¹⁵⁻¹⁹.

Çalışmamızda yer alan ve yaşları 4 - 12 ay arasında değişen sağlıklı olgulardan anne sütü ile beslenmeyen grupta opsonizasyon eksikliği saptanmıştır. Aynı deney opsonin olarak normal yetişkin serumu katılarak yapıldığında, fagositik ve bakterisidal aktivite her iki grupta da benzer sonuçlar vermektedir. NBT indirgeme testi sonuçları yapay beslenen çocuklarda yüksekti.

NBT testi (kantitatif ve histokimyasal) kronik granülo-matoz hastalığının ve portörlerin tanısında bir araç olmanın dışında bir enfeksiyonun viral ve bakteriyel olmasının ayırımında da kullanılmıştır^{3,2}. Park ve arkadaşları^{1,0} bakteriyel enfeksiyonların seyrinde, periferik kan nötrofil lökositlerinin, NBT boyasını artar oranda indirgediğini gösterdiler. Hasta yetişkinlerin aksine, bakteriyel enfeksiyonlu yenidoğanlarda NBT indirgenmesinde azalma olur^{1,4}. Fagositoz bakteri yerine lateks partikülleriyle de uyarılmış ve NBT indirgenmesindeki azalmanın HMPS aktivite düşüklüğüne bağlı olduğu bildirilmiştir. Normalde fagositoz olayı sırasında lökositin oksidatif metabolik aktivitesi ve oksijen tutmasında ve kullanımında artış ile birlikte NBT boyasını indirgeme yeteneği de yükselmektedir. Bu oksidatif reaksiyonlar sonucu oluşan H₂O₂'in bakteri ölümü için gerekli olduğu bilinmektedir^{1,4}. Buna göre NBT-indirgenmesi testi lökositlerin bakterisidal aktivitesini gösteren bir indeks olabilir. Fakat deney tüpündeki bakteri ölümü tümüyle hücrenin içerisinde değildir⁵.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla anne sütü, bebeğin hastalıklara direncini artırmada nonspesifik bağışıklığı da olumlu yönde etkilemektedir. Bu yüzden uygun ek besinlerle birlikte verilmesinin özendirilip desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. HANSON, L.A., WINBERG, J.: Breast milk and defence against infection in the newborn. Arch. Dis. Child. 47: 845, 1972.
2. GOLDMAN, A.S., SMITH, C.W.: Host resistance factors in human milk. J. Pediatr. 82: 1082, 1973.
3. WELSH, J.K., MAY, J.T.: Anti-infective properties of breast milk. J. Pediatr. 94: 1, 1979.
4. SMITH, C.W., GOLDMAN, A.S.: The cells of human colostrum. I. Invitro studies of morphology and function. Pediatr. Res. 2: 103, 1968.
5. CRAGO, S.S., PRINCE, S.J., PRETLOW, T.G., MCGHEE, J.R., and MESTECKY J.: Human colostrum cells. I. Separation and characterization. Clin. Exp. Immunol. 38: 585, 1979.
6. PITT, J., BARLOW, B., HEIRD, W.C.: Protection against experimental necrotizing enterocolitis by maternal milk. I. Role of milk leukocytes. Pediatr. Res. 11: 906, 1977.
7. AHLSTEDT, S., CARLSSON, B., HANSON, L.A., GOLDBLUM, R.M.: Antibody production by human colostrum cells. Scand. J. Immunol. 4: 535, 1975.
8. GOLDBLUM, R.M., AHLSTEDT, S., CARLSSON, B., HANSON, L.A., JODAL U., LIDIN-JANSON, G., SOHL-AKERLUND, A.: Antibody-forming cells in human colostrum after oral immunization. Nature 257: 797, 1975.
9. EZER, G.: Nonspesifik immunité. Ist. Çocuk Kli. Der. 11: 73, 1975.
10. PARK, B.H., FIKRIG, S.M. SMITHWICK, E.M.: Infection and Nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet 2: 532, 1968.
11. FORMAN, M.L., STIEHM, E.R.: Impaired opsonic activity but normal phagocytosis in low-birthweight infants. N. Engl. J. Med. 281: 926, 1969.

12. DOSSETT, J.H., WILLIAMS, R.C.Jr. QUIE, P.G.: Studies on interaction of bacteria, serum factors and polymorphonuclear leukocytes in mother and newborns. *Pediatrics* 44: 49, 1969.
13. MILLER, M.E.: Phagocytosis in the newborn infant: Humoral and cellular factors. *J. Pediatr.* 74: 255, 1969.
14. ANDERSON, D.C., PICKERING, L.K., FEIGIN, R.D.: Leukocyte function in normal and infected neonates. *J. Pediatr.* 85: 420, 1974.
15. WRIGHT, W.C., ANK, B.J., HERBERT, J., STIEHM, E.R.: Decreased bactericidal activity of leukocytes of stressed newborn infants. *Pediatrics* 56: 579, 1975.
16. BAEHNER, R.L., NEIBURGER, R.G., JOHNSON, D.E.: Transient bactericidal defect of peripheral blood phagocytes from children with acute lymphoblastic leukemia receiving craniospinal irradiation. *N.Engl. J.Med.* 289: 1209, 1973.
17. ALEXANDER: J.W., WILSON, B.A.: Neutrophil dysfunction and sepsis in burn injury. *Surg. Gynecol. Obstet.* 130: 431, 1970.
18. SETH, V., CHANDRA, R.K.: Opsonic activity, phagocytosis, and bactericidal capacity of polymorphs in undernutrition. *Arch. Dis. Child.* 47: 282, 1972.
19. MILLER, D.R., KAPLAN, H.G.: Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. *Pediatrics* 45: 861, 1970.
20. MOWAT, A.G., BAUM, J.: Chemotaxis of PNL from patients with diabetes mellitus. *N.Engl.J.Med.* 286: 61, 1971.
21. FRANKEL, S., REITMAN, S., SONNERWIRTH, A.: *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.* The C.V.Mosby Company. Saint Louis, 1970, p. 1602.
22. STOSSEL, T.P.: Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with infection and with phagocytic disorders. *Blood* 42: 121, 1973.
23. BHUYON, U.N., MOHAPATRA, L.M., RAMALINGASWAMI, V.: Phagocytosis, bactericidal activity and NBT dye reduction by the rabbit neutrophils in protein malnutrition. *Indian J. Med. Res.* 62: 42, 1968.
24. QUIE, P.G., WHITE, J.G., HOLMES, B., GOOD, R.A.: Invitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. *J. Clin. Invest.* 46: 668, 1967.
25. GURSON, C.T.: History of infant feeding. *Textbook of Paediatric Nutrition.* Edited by D.S. McLaren, D. Burman. Edinburg, Churchill Livingstone, 1976, pp. 1-16.
26. BERG, A.: *The nutrition factor: Its role in national development.* D.C. Washington, Brookings Institute, 1973, p. 89-106.
27. GRULEE, G., SANFORD, N.N., HERRON: P.H.: Breast and artificial feeding. *JAMA* 103: 735, 1934.
28. STEVENSON, S.S.: Comparison of breast and artificial feeding. *J.Am.Dietet. Assoc.* 25: 752, 1949.
29. CUNNINGHAM, A.S.: Morbidity in breast-fed and artificially fed infants, *J. Pediatr.* 90. 417, 1978.

30. PLANK, S.J., MILANESI, M.L.: Infant feeding and infant mortality in rural Chile. Bull. WHO 48: 203, 1973.
31. AMMAN, A.J., STIEHM, E.R.: Immunoglobulin levels in colostrum and breast fed infants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122: 1098, 1966.
32. YALÇIN, I., YAKACIKLI, S., ÖNEŞ, Ü.: Çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tanısında N.B.T. testinin değeri. XIII. Türk Pediatri Kongresi 1974, Tebliğler kitabı. İstanbul, Sermet Mat., 1975, s. 424.