

Deneysel splenik arter ligasyonu ve splenik ototransplantasyonun pnömokok sepsisi oluşumuna etkisi

Rıza RIZALAR, Mithat GÜNAYDIN, Murat GÜNAYDIN, Salih SOMUNCU, Ferit BERNAY, Naci GÜRSES

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Cerrahisi ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalları, Samsun

Özet

Dalak koruyucu cerrahi yöntemlerden splenik arter ligasyonu ve splenik ototransplantasyonun pnömokok sepsisi oluşumuna etkileri ve birbirlerine karşı üstünlüklerini ortaya koymak amacıyla deneysel bir çalışma planlanmıştır.

Bu amaçla ağırlıkları 162-270 gr arasında değişen genç ve dişi 40 Sprague-Dawley sıçan 10'arlı dört gruba bölündü. I. grup kontrol, II. grup splenektomi, III. grup splenik arter ligasyonu ve IV. grup ise splenik ototransplantasyon grubu olarak ayrıldı. Ameliyat sonrası 30. günde tüm deneklerin serum kompleman 3 ve 4 (C3-C4), immunoglobulin M, G, A (IgM, IgG, IgA) ve fibronektin düzeyleri bakıldı ve kan kültürleri alındı. Ameliyat sonrası 45. günde bütün deneklere intraperitoneal olarak "streptococcus pneumoniae tip 25" enjekte edilerek 48 saat sonra aynı kan parametrelerinin düzeyleri incelendi ve hayvanlar kurban edilerek akciğer doku kültürleri yapıldı. Pnökokok enjeksiyonundan sonra grup II ve IV arasında C3, IgM, fibronektin düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. İntraperitoneal pnömokok enjeksiyonu ile oluşturulan sepsis indüksiyonu sonrası akciğer doku kültürlerinde III. grupta %20, IV. grupta ise %40 oranında üreme saptanmıştır. Grup II'ye göre grup III ve grup IV serum C3, IgM ve fibronektin düzeylerinin yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). Grup III ve Grup IV de kendi aralarında kıyaslandıklarında genel olarak grup III'deki değerlerin grup IV'e göre daha iyi olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.01$).

Anahtar kelimeler: Postsplenektomi sepsisi, splenik arter ligasyonu, splenik ototransplantasyon

Summary

Effectiveness of experimental splenic artery ligation and splenic autotransplantation on occurrence of pneumococcal sepsis

This experimental study aims to evaluate the relative effectiveness of splenic artery ligation and splenic autotransplantation as spleen-saving surgical procedures. Forty female Sprague-Dawley rats, weighing 162-270 g were divided into four groups: group I control, group II for splenectomy, group III for splenic artery ligation and group IV for splenic autotransplantation. Serum levels of complement 3 and 4 (C3, C4), immunoglobulin M, G, A (IgM, IgG, IgA) and fibronectin were measured, and control blood samples were cultured in all animals on the 30th postoperative day. On the 45th postoperative day *Streptococcus pneumoniae* type 25 was injected intraperitoneally, the same parameters tested 48th later. The animals were sacrificed after blood sampling to obtain lung tissue cultures. Pneumococcal injections resulted in statistically significant differences in C3, IgM, fibronectin levels between the splenic artery ligation group (III) and the splenic autotransplantation group (IV). The sepsis induced by intraperitoneal *Pneumococcus* injection, colonization was detected in lung in group III and tissue cultures in 2 (20 %) rats in group III and 4 (40 %) rats in group IV. The elevated levels of C3, IgM and fibronectin in groups III and IV compared to group II were considered to be statistically significant ($p<0.01$). These results indicated a statistically significant ($p<0.01$) advantage of splenic artery ligation over autotransplantation.

Key words: Postsplenectomy sepsis, splenic artery ligation, splenic autotransplantation

Giriş

Postsplenektomi pnömokok sepsis mortalitesi % 50'den fazladır. Bu nedenle splenik fonksiyonların ko-

runması büyük önem taşımaktadır (12). Dalağın fizyolojik ve immünolojik fonksiyonları hakkındaki bilgilerin artması özellikle çocuklarda bu organın korunma endikasyonlarını arttırmaktadır (1). Postsplenektomi sepsisi erişkinlerde nadir görülürken çocuklarda yüksek bir insidense sahiptir (13,14). Literatürde travma nedeniyle yapılan splenektomi

sonrasında sepsisin en az, thalassemia major nedeniyle yapılan splenektomi sonrası sepsisin ise en fazla olduğu bildirilmektedir (13,14).

Postsplenektomi sepsisi; fagositik ve opsonik aktivitemin azalması, IgM ve kompleman düzeyinin düşmesi, lenfosit sayısında ve fonksiyonlarında azalma, Howell-Jolly cisimlerinin temizliğinin yetersizliği, ayrıca tuftsin oluşumunda azalma gibi splenik fonksiyonların kaybına bağlıdır (1,8,12,13,14). Bu nedenle dalak koruyucu cerrahi teknikler üzerine birçok çalışma yapılmıştır (1,7,8,12,17). Bizim çalışmamızda da splenik arter ligasyonu ve splenik ototransplantasyonun pnömokok sepsisinin önlenmesinde etkinliklerinin, birbirlerine karşı üstünlükleri araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Genç ve dişi, ağırlıkları 162-270 gr arasında değişen 40 adet Sprague-Dawley sıçan herbiri on'ar denek içeren dört gruba ayrıldı. Hayvanların bakımı normal laboratuvar şartlarında yapıldı. Tüm ameliyatlar aseptik koşullarda ve eter inhalasyon anestezi altında yapıldı. Bütün deneklere ameliyat esnasında 100 mg/kg tek doz seftriakson uygulandı.

Birinci gruba sadece laparotomi uygulandı ve kontrol grubu olarak ayrıldı. İkinci gruba splenektomi, III. gruba ise splenik arter ligasyonu uygulandı. Dördüncü gruba splenektomi yapıldıktan sonra dalaktan 2 mm kalınlığında enine kesilmiş iki parça hazırlanarak omental poş içine implante edildi. Dalak parçaları omentum içine konduktan sonra, omentum dalak parçalarını da tutacak şekilde 5/0 kromik katkıtle kapatıldı. Ameliyatların tümünde orta hat kesisi tercih edildi, damar bağlama ve karın tabakalarının kapatılmasında 4/0 ipek sütürler kullanıldı. Ameliyatları izleyen otuzuncu günde sıçanlardan alınan kan örneklerinden "spektrofotometrik" yöntemle serum immünglobulin M,G,A (IgM, IgG, IgA) ve kompleman (C3,C4) düzeyleri bakıldı. Ayrıca "single radial immunodiffüzyon" yöntemiyle de plazma fibronektin düzeyleri incelendi ve kan kültürleri alındı.

Çalışmamızda streptococcus pneumoniae tip 25 kullanıldı. Kültür +40° C'de %5 koyun kanlı trypticase soy sıvı besiyerinde saklandı. Virülansı arttırmak ve

patojeniteyi sağlamak amacıyla *S. pneumoniae* deneklere verilmeden önce normal sıçanlarda pasajlandı. Koyun kanlı agarda 24 saatlik subkültür yapıldıktan sonra alınan koloniler sıvı besiyerine ekildi ve 35° C'de 2-4 saat bekletilerek Mc Farland 0.5 standartta uygun olacak şekilde hazırlandı. (yaklaşık 1×10^8 "colony forming units" CFU/ml). Kültürler seri bir şekilde steril serum fizyolojik ile sonunda yaklaşık 10^1 CFU/ml olacak şekilde sulandırıldı. %5 koyun kanlı agara ekim yapılarak son süspansiyonun mililitresindeki pnömokok sayısı doğrulandı. Hazırlanan süspansiyondan 0.5 ml (yaklaşık on pnömokok) ameliyat sonrası 45. günde herbir sıçana intraperitoneal olarak enjekte edildi. Pnömokok enjeksiyonundan 48 saat sonra hayatta kalan sıçanlardan ameliyat sonrası 30. günde değerlendirilen parametreleri tekrar incelemek için kan örnekleri alınarak hayvanlar intrakardiyak 10 cc hava enjekte edilerek sakrifiye edildiler. Akciğer dokuları çıkarılarak doku kültürleri hazırlandı. İstatistiksel çalışmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı.

Bulgular

Ameliyat sonrası 45. güne kadar tüm grublardaki deneklerden ölen olmadı. Ameliyat sonrası 30. günde daha önce gereç ve yöntem bölümünde belirtilen parametreler değerlendirildi. Pnömokok enjeksiyonundan önceki bu parametrelerin ortalama değerleri Tablo I'de gösterilmiştir.

Pnömokok enjeksiyonu öncesi C3, IgM ve fibronektin düzeyleri karşılaştırıldığında bunların grup III ve IV'de kontrol grubuna göre daha düşük, splenektomi grubuna göre ise daha yüksek olduğu ve bu farklılıkların da istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0.01$). Bununla beraber kan kültürlerinin hiçbirinde bakteri üretilmedi. Grup III ve IV arasında yapılan istatistiksel analizlerde IgM ve fibronektin düzeylerinde de anlamlı bir fark elde edilirken ($p < 0.01$), C3 değerlerindeki fark anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

İntraperitoneal pnömokok enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra alınan kan immunoloji-seroloji ortalama değerleri ve akciğer doku kültür sonuçları Tablo II'de görülmektedir. Grup III ve IV'de saptanan değerler yine kontrol grubundan daha düşük, sple-

Tablo I. Pnömokok enjeksiyonundan önceki immünolojik-serolojik değerler ve kan kültürü sonuçları

	Grup I (n=10)	Grup II (n=10)	Grup III (n=10)	Grup IV (n=10)
C3 (g/l)	0.25	0.15	0.20*	0.21*
C4 (g/l)	0.08	0.03	0.07	0.05
IgM (g/l)	0.38	0.10	0.28+	0.24+
IgG (g/l)	4.3	3.2	3.5	3.0
IgA (g/l)	0.25	0.12	0.15	0.13
Fibronektin (mg/dl)	33	17	28#	25#
Kan kültürü	üreme yok	üreme yok	üreme yok	üreme yok

* $p>0.05$, + $p<0.01$, # $p<0.01$

Tablo II. İntraperitoneal pnömokok enjeksiyonundan sonraki immünolojik-serolojik değerler ve akciğer doku kültürü sonuçları

	Grup I (n=10)	Grup II (n=10)	Grup III (n=10)	Grup IV (n=10)
C3 (g/l)	0.28	0.14	0.24*	0.21*
C4 (g/l)	0.09	0.03	0.08	0.05
IgM (g/l)	0.40	0.11	0.35+	0.28+
IgG (g/l)	4.3	3.0	3.6	3.1
IgA (g/l)	0.25	0.10	0.18	0.15
Fibronektin (mg/dl)	45	10	34#	32#
Doku kültürü	üreme yok	Pnömokok (10)	Pnömokok (2)	Pnömokok (4)

* $p<0.01$, + $p<0.01$, # $p<0.05$

nektomi grubundan ise daha yüksektir. Grup III ve IV'ün bu değerler açısından kendi aralarında yapılan karşılaştırmalarında ise grup III'ün değerleri istatistiksel açıdan anlamlı derecede daha yüksek olarak görülmektedir ($p<0.01$). İkinci gruba göre grup III ve IV serum C3, IgM ve fibronektin düzeylerinin yüksekliği de istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$).

Akciğer doku kültürleri incelendiğinde kontrol grubunda hiç üreme olmazken, splenektomi grubundaki tüm deneklerde pnömokok üremiş ve bu sıçanlardan dördü pnömokok enjeksiyonunu takiben ilk 24 saat içinde ölmüşlerdir. Grup III'de sekiz deneğin akciğer doku kültüründe üreme olmazken, iki denekte (%20) pnömokok üremiştir. Pnömokok üreyen sıçanlardan biri enjeksiyonu takiben ilk 24 saat içinde ölmüştür. Grup IV'de sadece altı denekte üreme olmamış diğer

dört (%40) sıçanın akciğer doku kültüründe pnömokok üremiştir. Bu grubda pnömokok üreyen deneklerden ikisi erken dönemde ölmüştür.

Splenik arter ligasyonu yapılan grup III'deki sıçanlar sakrifiye edildikten sonra dalakları makroskopik olarak incelendiğinde dalakların canlılığını koruduğu ve kontrol grubuna oranla çok fazla değişikliklerin oluşmadığı dikkat çekti.

Splenektomi sonrasında ototransplantasyon yapılan grup IV'deki sıçanlar sakrifiye edildikten sonra yapılan makroskopik incelemede ise genel olarak omental poş içindeki dalakların yaklaşık iki katına erişecek şekilde büyüdüğü ve canlılıklarını korudukları gözlemlendi. Ancak bunlardan üç tanesinde omental poş içinde abse geliştiği ve dalak dokularının nispeten canlılıklarını kaybettikleri gözlemlendi.

Tartışma

Morris ve Bullock 1919 yılında splenektomi yapılan sıçan ve insanlarda enfeksiyonlara karşı direncin azaldığını ve mortalitenin arttığını gösterdiler. King ve Shumacker ise 1952 yılında splenektomi yapılan çocuklarda ciddi, sıklıkla da fatal seyreden septik tablolar bildirdiler (2,6).

Postsplenektomi sepsisinin %50'sinden fazlasında pnömokoklar etkindir. Bu sepsisin mortalitesi %50'den çoktur. Sepsis hayat boyu görülebildiği gibi en sık dalağın çıkarılmasından sonraki ilk iki yıl içinde ortaya çıkar ve çocuklarda erişkinlere göre daha sık görülür. Bu nedenle dalak fonksiyonlarının korunması büyük önem taşımaktadır. Ayrıca dalağın fizyolojik ve immunolojik fonksiyonları hakkındaki bilgilerin artması özellikle çocuklarda bu organın korunma endikasyonlarını arttırmaktadır (1,3,12,14,16).

Splenektomi sonrasında dalak tarafından temizlenen özellikle enkapsüle bakterilerin ortadan kaldırılması yetersiz kalmaktadır (3). Ayrıca fagositik ve opsonik aktivitenin azalması, IgM düzeyinde kalıcı bir düşme, IgG ve IgA düzeylerinde geçici değişimler, kompleman düzeyinin düşmesi, lenfosit sayısında ve fonksiyonlarında azalma, Howell-jolly cisimlerinin temizliğinin yetersizliği ayrıca tuftsın oluşumunda azalma gibi splenik fonksiyonların kaybı sonucu postsplenektomi sepsisi ortaya çıkmaktadır (1,8,12,14,16).

Bugüne kadar birçok yazar splenik ototransplantasyon ve diğer dalak koruyucu girişimler sonrası dalağın fonksiyonlarını değerlendirmede serum IgM, IgG, IgA, C3-C4 düzeyleri, opsonik aktivite, trombosit sayısı, periferik yayma bulgularını değerlendirmişler ve sintigrafik çalışmalar yapmışlardır (1,8,11,13). Curtis dalak fonksiyonlarının değerlendirilmesinde fibronektinin önemli olduğunu vurgulayarak, retiküloendotelial sistemin fonksiyonunun direkt olarak kolloid klirens tekniklerle indirekt olarak da plazma fibronektin düzeyiyle değerlendirilebileceğini bildirmiştir (3).

Splenektomi sonrasında özellikle serum IgM ve C3 düzeyinde belirgin düşme olmakta ve plazma fibronektin düzeyi önemli ölçüde azalmaktadır (1,3,8,

12). Biz de çalışmamızda serum IgM, IgG, IgA, C3-C4 ve plazma fibronektin düzeylerini değerlendirdik. Ayrıca kan ve akciğer doku kültürleri ararak gruplar arasındaki dalak fonksiyonlarını karşılaştırdık.

Patel insanlarda yaptığı splenik ototransplantasyonlarla ilgili deneyimlerinde ototransplantasyon sonrası IgM ve C3 düzeylerinin normale döndüğünü bildirdi (11). Büyükelise ise splenektomi grubuna göre ototransplantasyon grubunda C3 düzeyinde artış olduğunu ancak IgM düzeyinde farklılık olmadığını gösterdi (1). Patel sıçanlarda yaptığı bir başka çalışmada omental poş içine yapılan ototransplantasyon sonrası IgM düzeylerinin normale döndüğünü ve bu sıçanların intraperitoneal pnömokok verilmesinden sonra %89'unun hayatta kaldığını gösterdi (12). Literatürde splenektomi sonrasında plazma fibronektin düzeyinin azaldığı, sepsis indüksiyonundan sonra bu düzeyin daha fazla azalma gösterdiği, splenektomi yapılmamış grupta ise sepsis indüksiyonundan sonra fibronektin düzeyinde önemli ölçüde artış olduğu bildirilmektedir (3,5).

Bizim çalışmamızda da splenektomi grubunda intraperitoneal pnömokok enjeksiyonu öncesi C3-C4, IgM, IgG, IgA ve fibronektin düzeylerinde önemli ölçüde azalma görüldü (Tablo I). Grup III ve IV'de bu parametrelerin yüksekliği splenektomi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.01$). İntraperitoneal pnömokok enjeksiyonundan sonra splenektomi grubunun C3-C4, IgM, IgG, IgA düzeylerinde önemli bir değişiklik olmazken plazma fibronektin düzeyindeki azalma daha da belirginleşti (Tablo II). Yine grup III ve IV splenektomi grubu ile karşılaştırıldığında immunolojik-serolojik değerlerden C3, IgM ve fibronektin düzeylerinin yüksek saptanması istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.01$).

Pnömokok verilmesinden 48 saat sonra sakrifiye edilen sıçanlardan splenektomi yapılanların hepsinin akciğer doku kültüründe pnömokok ürerken splenik arter ligasyonu yapılanların ikisinde (%20), ototransplantasyon yapılanların ise dördünde (%40) pnömokok üretti. Sonuç olarak splenik arter ligasyonu ve splenik ototransplantasyon yapılan grupların intraperitoneal pnömokok enjeksiyonuyla yapılan sepsis indüksiyonuna verdiği yanıtlar splenektomi

grubu ile karşılaştırıldığında verilerin literatürle uyumlu olduğu saptandı. Bu iki grup kendi aralarında kıyaslandıklarında splenik arter ligasyon grubunun sonuçlarının daha iyi olduğu görüldü.

Dalak yaralanmalarında topikal hemostatik ajanlar veya omentumla beraber basit kapsüller sütür, kapsül veya parankime direkt sütür konulması, splenik arterin ya da segmental damarların ligasyonu, parsiyel splenektomi gibi konvansiyonel cerrahi tekniklerle dalağın korunabilmesi %70-95 olguda mümkündür (4,8,10). Eğer bu teknikler yetersiz kalırsa splenektomi şarttır ve peritoneal kavite içine ototransplantasyon yapılması tavsiye edilmektedir (8). Bazı araştırmacılar postsplenektomi sepsisine karşı splenik ototransplantasyonun yetersiz kaldığını gösterirken diğer yazarlar ise splenik implantın pozitif immunolojik ve filtrasyon etkilerinin olduğunu ortaya koydular (9,10,12,15,17). Mizrahi tek başına splenik ototransplantasyonun maksimal regenerasyondan sonra sepsise karşı kısmen koruyucu olduğunu bildirdi (8).

Splenik ototransplantasyondan sonra reimplante dokuda nekroz gelişebilir ayrıca bu doku enfeksiyonlar için bir odak oluşturabilir (2,13). Yine birçok yazar büyük dalak yaralanmalarında dalağı yerinde bırakıp splenik arter ligasyonu yapmanın hemostazı sağlamak ve dalağın fonksiyonlarının korunmasında etkili olduğuna inanırlar. Fakat bu yaklaşım için daha fazla tecrübe gerekmektedir (1,17). Bizim çalışmamızda da elde edilen bulgular sonucunda splenik ototransplantasyon ve splenik arter ligasyonunun sepsise karşı kısmen koruyucu olduğu görüldü.

Birçok çalışmada belirtildiği gibi gerek ototransplantasyonun gerekse arter ligasyonunun postsplenektomi sepsisine karşı morbidite ve mortalite oranını ne kadar etkilediği tam olarak bilinmemektedir ve daha fazla araştırmaya gerek vardır (1,13). Biz de çalışmamızı dalak koruyucu tekniklerden popüler olan bu iki yöntemi karşılaştırmak amacıyla yaptık.

Sonuç olarak bizim çalışmamızda; sıçanlarda splenik arter ligasyonu ve splenik ototransplantasyon, splenektomi uygulanmasına göre, postsplenektomik

pnömokok sepsisi oluşturulmasında immüno-serolojik cevabın korunması açısından daha üstün olarak bulunmuştur. Dalağın arter ile birlikte korunamadığı durumlarda öncelikle splenik arter ligasyonu olmak üzere bu iki yöntemin tercih edilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Kaynaklar

1. Büyükkunal C, Danişmend N, Yeker D: Spleen-saving procedures in paediatric splenic trauma. *Br J Surg* 74:350, 1987
2. Cullinford GL, Watkins DN, Watts ADJ, et al: Severe late postsplenectomy infection. *Br J Surg* 78:716, 1991
3. Curtis SC, Aldridge MC, Biglin JEJ, et al: Effect of splenectomy on gram negative bacterial clearance in the presence and absence of sepsis. *Br J Surg* 75:177, 1988
4. Eichelberger MR, Randolph JG: Abdominal trauma. In Welch KJ, Randolph JG, Ravitch MM (eds): "Pediatric Surgery". Chicago, Year Book Medical Publishers 1986. p.164
5. Hashimoto T: Plasma fibronectin levels after splenectomy and splenic autotransplantation in rats with and without dietary ascorbic acid supplementation. *J Ped Surg* 18:805, 1983
6. Holdsworth RJ, Irwing AD, Cuschieri A: Postsplenectomy sepsis and its mortality rate: Actual versus perceived risks. *Br J Surg* 78:1031, 1991
7. Keramidis DC: Ligation of splenic artery: Effects on the injured spleen and its function. *J Ped Surg* 15:38, 1980
8. Mizrahi S, Bickel A, Haj M, et al: Posttraumatic autotransplantation of spleen tissue. *Arch Surg* 124:863, 1989
9. Moore FA, Moore EE, Moore GE, et al: Risk of splenic salvage after trauma. *Am J Surg* 148:800, 1984
10. Pabst R, Kamran D: Autotransplantation of splenic tissue. *J Ped Surg* 21:120, 1986
11. Patel J, Williams JS, Shmigel B, et al: Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. *Surgery* 90:683, 1981
12. Patel J, Williams JS, Naim JO, et al: Protection against pneumococcal sepsis in splenectomized rats by implantation of splenic tissue into omental pouch. *Surgery* 91:638, 1982
13. Pisters PWT, Pachter HL: Autologous splenic transplantation for splenic trauma. *Ann Surg* 219:225, 1994
14. Quinlan RM: Operations on the spleen, in Shackelford RT, Zuidema GD (eds): *Surgery of Alimentary Tract*. Philadelphia, WB Saunders Co. 1983. p.667
15. Tesluk GC, Thomas CG, Benjamin JT, et al: Fatal overwhelming postsplenectomy sepsis following autologous splenic transplantation in severe congenital osteoporosis. *J Ped Surg* 19:269, 1984
16. Timens W, Leemans R: Splenic autotransplantation and the immune system. *Ann Surg* 215:256, 1992
17. Vega A, Howell C, Krasna I, et al: Splenic autotransplantation: Optimal functional factors. *J Ped Surg* 16:898, 1981