

**GYERMEKKORBAN GYOMORRAL VAGY BÉLLEL, VALAMINT GYOMORRAL ÉS
VASTAGBÉLLEL EGYÜTTESEN VÉGZETT HÓLYAGMEGNAGYOBBÍTÁSOKAT
KÖVETŐEN KIALAKULÓ SZÖVETTANI ELVÁLTOZÁSOK: HUMÁN ÉS
ÁLLATKÍSÉRLETES VIZSGÁLATOK**

DR. KISPÁL ZOLTÁN

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

PROGRAMVEZETŐ:

PROF. DR. HORVÁTH ÖRS PÉTER

TÉMAVEZETŐ:

DR. VAJDA PÉTER PH.D., MED. HABIL.

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

KLINIKAI KÖZPONT

GYERMEKKLINIKA



2014.

HÁTTÉR ÉS ELŐZMÉNYEK

A gyermekkori részleges vagy teljes vizelettárolási, tartási és/vagy -ürítési elégtelenség inkontinencia urinae (i.u.) egyike azon egész életre ható fogyatékoságoknak, melyek a betegek életminőségét, társadalomba való beilleszkedését súlyosan megnehezítik, vagy lehetetlenné teszik. A gyermekkori i.u. mintegy 80%-áért a húgyhólyag veleszületett beidegzési zavara (neuropathiás hólyag) felelős. Ez leggyakrabban a gerincvelő záródásának veleszületett hiánya, meningomyelokele (MMC) miatt jön létre. A gyermekkori vizeletinkontinencia további 20%-át egyéb fejlődési rendellenességek (hólyagextrófia, totális episzpiadiázis, kloáka extrófia) és a gerincvelőből kilépő idegek és/vagy a húgyhólyag beidegzését érő jóval ritkább szerzett károsodások (pl. Guillain Barré szindróma, gerincvelő sérülés, tumorok) alkotják.

Az i.u. patofiziológiai hátterében, gyermekkorban a következő okok (külön-külön vagy együtt) állhatnak:

1. Vizelettárolási elégtelenség: a hólyag csökkent kapacitása nem elegendő a termelődő vizelet kellő ideig (3-4 óra) történő tárolására;
2. Vizelettartási elégtelenség: a hólyagnyak záró funkciójának elégtelensége miatt a vizelet folyamatosan csorog annak ellenére, hogy a hólyagkapacitás megfelelő;
3. Vizeletürítési elégtelenség: a beteg nem képes húgyhólyagját maradéktalanul kiüríteni.

A fenti működési zavarok leggyakrabban egymással kombinálódva jelentkeznek, de előfordulhat, hogy a klinikai képet egyik vagy másik zavar önmagában uralja.

A kezelés célja, hogy a hólyagban uralkodó magas nyomást lecsökkentsük, ugyanakkor a hólyag tágulékonyágát (compliance) és kapacitását növeljük. A sikeres terápiának fontos követelménye, hogy a fenti patofiziológiai ok(ok) megszüntetése mellett a felső húgyútak, és a vesék funkcióját és morfológiáját megőrizzük. Továbbá, hogy első lépésben mindig konzervatív kezeléssel próbálkozzunk, mert a műtéti kezelés sokszor visszafordíthatatlan következményekkel jár.

Az i.u. a betegek kb. 80%-ában konzervatív módszerekkel – gyógyszeres hólyagmagnagyobbítás, tiszta intermittáló (ön)katéterezés (CIC), medencefenék torna és ezek kombinációja – jól kezelhetőek. Ha a gyermekkori vizeletinkontinencia kis hólyagkapacitás és/vagy nem megfelelő hólyagtágulékonyág (compliance) miatt alakul ki és ez konzervatív (szemi-konzervatív) kezelési formákkal más nem kezelhető, a húgyhólyag sebészi megnagyobbításra (augmentáció) van szükség. Bizonyos esetekben, amikor a hólyag extrémén kicsi (pl. extrophia vesicae urinae) vagy malignus folyamat (pl. rhabdomyosarcoma) miatt eltávolításra került, akkor a húgyhólyag teljes pótlására (szubsztitúció, orthotop hólyag létrehozása) is sor kerülhet. A húgyhólyag augmentációjára – számos, ritkábban alkalmazott műtéti megoldás (pl. autoaugmentáció, ureterocisztoplasztika, tissue engineering) mellett -

napjainkban a leggyakrabban végzett beavatkozás a tápcsatorna egy teljes falvastagságú szakaszának (gyomor-, vékony- vagy vastagbél-szegmentum) felhasználása erre a célra. A nemzetközi irodalom napjainkban a húgyhólyag sebészi megnagyobbításra (pótlásra) elsődlegesen ileum-szegmentumot ajánl, de evidencián alapuló ajánlás nem létezik. A bizonytalanságot az okozza, hogy a műtétek bevezetését követően az elmúlt három évtizedben ismertté váltak azon szövődmények, melyek a húgyhólyag megnagyobbításra vagy pótlásra használt tápcsatorna szakasz típusától függenek. A műtéteket követően fellépő szövődmények két nagy csoportra oszthatóak (metabolikus és nem metabolikus szövődményekre):

I. Metabolikus szövődmények és szövettani elváltozások

- metabolikus alkalózis/acidózis
- elektrolit eltérések (hypo/hyper -klorémia, -kalémia, -natrémia)
- növekedési zavar
- csontanyagcsere változások (csont demineralizáció, osteopénia)
- vitaminhiányok
- szövettani elváltozások: gyulladás, metaplázia, displázia, karcinóma kialakulása

II. Nem metabolikus, sebészi szövődmények

- hasi sztóma komplikációi
- bélelzáródás
- bélel vagy gyomorral megnagyobbított hólyag perforációja
- perisztáló reflux az ureter neoinplantációját követően
- obstrukció az ureter neoinplantációját követően
- hólyagnyakkzárást követően létrejövő szövődmények (veziko-urethralis fistula, orchidoepididymitis)
- hematuria-diszuria szindróma
- reaugmentáció
- vékonybél bakteriális kolonizációja
- egyéb sebészi szövődmények

Értekezésemben a fent részletezett szövődmények közül a húgyhólyag-megnagyobbító és -pótló műtétek után fellépő szövettani elváltozásokat, valamint a tumor képződést kívántam tanulmányozni. Ez potenciálisan a legsúlyosabb, a legnehezebben megelőzhető és gyakran csak későn felismerhető szövődmény. A gyermek és pubertás korban végzett hólyagmagnagyobbítás és -pótlás esetén – főleg a rosszindulatú daganatok kialakulásának lehetősége miatt – kiemelt fontossággal bír a betegek hosszú távú nyomonkövetése. Részben munkacsoportunk korábbi tanulmánya, részben az irodalomban folyamatosan megjelenő esetismertetések alapján ma már nemzetközileg is általánosan elfogadott, hogy a tápcsatorna valamely szakaszával megnagyobbított húgyhólyagból rendszeres szövettani mintavétel történjen (surveillance). A

különböző típusú hólyag-megnagyobbítások után kialakuló malignitás megelőzése, időben történő felismerése és szükség esetén a szövödmények kezelése az ilyen műtéteken átesett betegek gondozásának fontos feladata. Az életkor előrehaladásával a malignitás kockázata önmagában nő. Ennek kialakulását és gyakoriságát az augmentáció minden valószínűséggel tovább fokozza.

A hólyagmegnagyobbítás után megjelenő tumorok kialakulásáért a következő tényezők tehetők felelőssé:

1. Krónikus bakteriuria

A betegek hólyagjában tárolt vizeletben élősködő baktériumok a nírátokat nitríté, végül N-nitrosoaminokká képesek alakítani. Emellett képesek oxigén gyökök termelésére is. Mindkét anyag a rezervoár epitheliális sejtjeinek DNS-ét károsíthatja.

2. A vizelet direkt toxikus hatása a gasztrointestinális nyálkahártyára

A hólyag falában lévő urothelsejtek organikus ozmolitokat halmoznak fel és apikális barriert képeznek, mely kristályos hálózatú urolakinokból épül fel (assymmetric unit membrane). Ez a barrier nagy transepitheliális ellenállást és alacsony permeabilitást képez a víz és az urea számára. Ennek hiányában az ozmotikus stressz károsíthatja a genom integritását, mely tumor képződéshez vezethet.

3. Az enterális epitélium

Az augmentációt követően a hólyagmegnagyobbításra felhasznált tápcsatorna szakasz hosszú távon nem végez klasszikus értelemben táplálék felszívást. Ezt a funkcióját fokozatosan elveszti és a csak vizelettel érintkező bélnyálkahártya krónikus jellegű gyulladásba kerülhet („éhezési” enteritis).

4. A két különböző típusú szövet találkozása

A hólyagmegnagyobbítás során gasztrointestinális és uroepitéliális nyálkahártya találkozásánál (anasztomózis vonal) aberráns intercelluláris jelátviteli mechanizmusok alakulhatnak ki.

Ahhoz, hogy a hólyagmegnagyobbítást és -pótlást követően létrejövő legsúlyosabb szövödményt, a tumorok kialakulását megelőzhessük, olyan tumor markerokat kell keresnünk, melyek még a makroszkóposan detektálható tumor kialakulása előtti precancerosus állapotot jelzik. Az adenocarcinomák esetében ilyen markerek például a mucinok lehetnek.

A szervezetben minden epitéliumnak megvan a jellegzetes mucin kifejeződési mintázata (pattern), mely malignitás esetén megváltozik. A mucinok magas molekulású glikoproteinek, melyek 50%-ban szénhidrátot tartalmaznak. Mai tudásunk szerint legalább 20féle mucin ismert. Az uroepitélium fő mucin fehérjéje a MUC1. A vastag és vékonybél enterocitáinak felszínén főleg MUC2 figyelhető meg. Malignitás esetén ezek a kifejeződési minták megváltoznak. Felnőttekben vastagbél adenocarcinoma esetén megfigyelték, hogy ezek a változások a mucin kifejeződésében már a karcinogenezis korai fázisában megtörténnek. A makroszkóposan detektálható elváltozásokat meg is előzhetik. Kolon adenocarcinoma esetén a MUC2 fehérje kifejeződése a sejtek felszínén csökken, ugyanakkor a MUC1 emelkedik. Húgyhólyag adenocarcinoma esetén a MUC2 fehérje kifejeződése emelkedik és a MUC1 csökken.

CÉLKITŰZÉSEK

- 1) *Gyomor-, vékony- és vastagbél-szegmentummal végzett húgyhólyag-megnagyobbítás (augmentáció) és vastagbéllal végzett hólyagpótlás (szubsztitúció) után kialakuló szövettani elváltozások prospektív vizsgálata betegeken.*
- 2) *A MUC1 és MUC2 gének expressziójának vizsgálata a gyomor-, vékony- és vastagbél-szegmentummal végzett húgyhólyag-megnagyobbításon valamint vastagbéllal végzett hólyagpótláson átesett betegeken.*
- 3) *Gyomor- (gasztrocisztoplastika) vagy bél-szegmentummal (kolocisztoplastika), valamint gyomor- és bél-szegmentummal egyidejűleg végzett húgyhólyag-plasztika (kompozit hólyag) után kialakuló elváltozások szövettani-, vér- és vizeletvizsgálata kutyákban.*

ANYAG ÉS MÓDSZEREK

1. Humán vizsgálatok

Vizsgálatainkat a Pécsi Gyermekklinika Sebészeti Osztályán 1988 és 2008 között hólyagmagnagyobbító vagy -pótló műtéten átesett betegtől nyert szövettani mintákon végeztük (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásaitikai bizottság engedély szám:5011-0/2010-1018EKU). Ezen időszakban 86 betegben történt hólyagmagnagyobbítás vagy -pótlás. Harminckét betegben vékonybéllel (ileocisztoplasztika), 30 betegben vastagbéllel (kolocisztoplasztika), 18 betegben pedig gyomor-szegmentummal (gastrocisztoplasztika) történt a hólyagmagnagyobbítás. Vastagbéllel végzett teljes húgyhólyagpótlásra 6 esetben került sor. A betegek átlagos életkora a műtétkor 12,5 (4,3-20,9) év volt. A betegek műtétek utáni átlagos nyomonkövetési ideje 8,3 (0,25 -16,5) év volt.

Összesen 56 beteg, a gastrocisztoplasztikán átesett betegek közül 8, az ileocisztoplasztikán átesett betegek közül 22, a kolocisztoplasztikán átesett betegek közül 26-an vettek részt a hosszútávú nyomonkövetésben.

A csoport: Vékonybéllel történt hólyagmagnagyobbítás esetén (ileocisztoplasztika - 32 beteg) az átlagos életkor a műtétkor 132 hónap (11 év, 51-213 hónap), a nyomonkövetés átlagos ideje 42,5 hónap (3,9 év, 3-90 hónap) volt.

B csoport: Vastagbéllel történt hólyagmagnagyobbítás során (kolocisztoplasztika - 30 beteg) az átlagos életkor a műtétkor 160 hónap (13,3 év, 3-198 hónap), az átlagos nyomonkövetés 100,5 hónap (8,4 év, 3-198 hónap) volt.

C csoport: Gyomorral történt hólyagmagnagyobbítás során (gastrocisztoplasztika - 18 beteg) az átlagos életkor a műtétkor 160 hónap (13,3 év, 79-241 hónap), az átlagos nyomonkövetés 92,5 hónap (7,7 év, 12-173 hónap) volt.

D csoport: Vastagbéllel végzett hólyagpótlás során (6 beteg) az átlagos életkor a műtétkor, 123 hónap (10,3 év, 83 - 195 hónap), az átlagos nyomonkövetés 91,7 hónap, (7,6 év, 13-136 hónap) volt.

A műtétek előtt protokoll szerinti fizikális és eszközös (hasi ultrahang, cisztográfia, cisztomanometria), valamint vér- és vizeletlabor vizsgálatok történnek. A húgyhólyag magnagyobbító vagy pótló műtét elvégzésekor kórszövettani mintavételre került sor a hólyagból, valamint a magnagyobbításra vagy pótlásra használt tápcsatorna szakaszából.

A betegek a műtétet követően protokoll szerinti vizsgálatokon, rendszeres állapotfelmérésen vettek részt. Ennek során eszközös (hasi és kismedencei ultrahang, cisztográfia, scintigráfia, cisztomanometria, hólyagtükrözés és szövettani mintavételek), valamint labor (vér és vizelet) vizsgálatok történtek.

1.1. Hisztológiai vizsgálatok

A betegekből mukóza- szubmukóza szintű szövettani mintavétel történt a hólyagmagnagyobbító műtétek során az eredeti hólyagból, valamint a magnagyobbításra használt tápcsatorna szegmentumból. Gyomorral történő magnagyobbítás esetén a zéró mintákat *Helicobacter Pylorira* is vizsgáltuk. A műtétet követő 4. évtől kezdve a mintavétel évente, majd később két évente, folyamatosan a felnőttkorra is kiterjedően történt. Ennek során a magnagyobbított vagy -pótolt hólyag tükrözéses vizsgálata során történt mintavétel. A tükrözés fiatalabb, félnélsebb betegeknél (12-14 év alatti) altatásban, idősebb, együttműködő betegeknél Dormicum hatásban történt. Ha az eredeti urethra rendelkezésre állt, (nem került a korábbi műtétek során lezárásra) a tükrözéses vizsgálatot a húgycsővön keresztül (urethroscisztoszkópia során) végeztük. Más esetekben (ha az urethra lezárásra került és hasfali katéterezhető stomát alakítottunk ki), a kialakított hasfali stomát át végeztük mind a hólyag vizsgálatát, mind a biopsziás mintavételt. Ennek során különböző helyekről négy mintát vettünk a magnagyobbításra használt tápcsatorna szegmentum mucosájából, négy mintát az eredeti hólyag mucosából, valamint négyet a kettő közötti anasztomózis vonalból.

A mintákat formaldehidben fixáltuk, illetve fagyasztva tároltuk. A formaldehidben fixált biopsziás anyagokból készített metszetek (5-7 μm) rutin szövettani vizsgálatra kerültek (hematoxilín-eozin festés). A minták másik részét a mintavétel idején azonnal OCT-be (Optimal Cutting Temperature) ágyasztuk, majd beágyazást követően mínusz 80 °C-on tároltuk. A fagyasztott minták további vizsgálatára, (immunhisztokémiai és szubmikroszkópos), az USA-ban, az Evanston Hospitalban, Chicago, Illinoisban került sor.

1.2. Immunhisztológiai vizsgálatok

Cryostatban 7 μm -es metszeteket készítettünk, majd 4%-os formalinban történt fixálást követően az aldehidblokkolás glicines foszfát pufferolt sóoldatban történt (glicin-PBS). Foszfát pufferolt sóoldattal (Phosphate Buffered Saline/PBS) végzett mosás, majd foszfát pufferolt Tweenes sóoldattal (PBST) történő fél órás inkubáció után az antigénblokkolást 5%-os kecskeszérummal végeztük. A vizsgálati anyagokat ezt követően elsődleges monoklonális egér-Muc 1 elleni antitesttel (Invitrogen) és poliklonális nyúl-Muc 2 elleni antitesttel (Invitrogen) 4 °C fokon egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap ismételt PBST-vel történő átmosás után a mintákat Alexa Fluor 488-al konjugált egér elleni (zöld) és az Alexa Fluor 594-el konjugált (piros) nyúl elleni másodlagos antitestekkel kezeltük. Végezetül Diamino-fenilindolt (DAPI) és fedőanyagot (Invitrogen Slowfade Gold With DAPI) használtunk a magok megfestésére. A fenti immunfestés a MUC1 és MUC2 fehérje szint kvalitatív jellemzésére alkalmas.

A megfestett mintákat fluoreszcens mikroszkópia (kvantitatív analízis) során zöld, piros és kék fényrel világítottuk át. Azokon a helyeken, ahol a MUC1 fehérje található, ott a zöld fényrel történt átvilágítás során intenzív zöld fluoreszcenciát észleltünk. Ahol a MUC2 fehérje van, ott intenzív piros fluoreszcenciát észleltünk piros fényrel való átvilágításkor. A sejtmagokat kékkel festettük és kék fényrel világítottuk át. A megfestett mintákról készült képeket hűtött un. Charged

Coupled Device (CCD) kamerával nyertük. A mikroszkóphoz csatlakoztatott szoftver (IPLab 4.08) segítségével a zöld (MUC1), piros (MUC2) valamint a kék (sejtmagok) színek intenzitását mértük és az így nyert adatokat statisztikailag értékeltük. A $p < 0,05$ változásokat tekintettük szignifikánsnak.

Az adatok számítógépes feldolgozása a betegek teljes dokumentációjának áttekintésével, részletes és kritikus elemzésével történt. A statisztikai számításokhoz SPSS szoftvert, Fisher féle tesztet, legkisebb négyzetek módszerét, lineáris korrelációt használtunk, statisztikus bevonásával ($p < 0,05$).

1.3. MUC1, MUC2 gén expressziós vizsgálatok

A B csoport (kolocisztoplastika) azon betegeinek szövettani mintáiból, akikben a műtét több mint 15 éve történt (14 beteg) végeztünk szubmikroszkópos vizsgálatokat.

A fenti betegek $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on OCT-ben tárolt szövettani mintáin Laser Capture Microdissection (LCM) vizsgálat történt (2. ábra), mely a következőképpen zajlik. Az LCM során vékony lézersugár segítségével a szövettani minta tetszőlegesen kiválasztott sejtei (mukózális epithelium sejtek) károsodás nélkül kinyerhetők. Ezen eljárás a szubmikroszkópikus vizsgálatok (fehérje, RNS és DNS analízis) érzékenységét nagymértékben fokozza.

Az RNS extrakcióhoz először $50\text{ }\mu\text{L}$ extraction buffert tettünk egy 0.5 ml -es mikrocentrifuga csőbe (Applied BioSystems Catalog #N8010611). Ezt követően rátettük a Capsure Macro LCM cap-et a mikrocentrifuga csőre egy LCM sapka inerciós eszközt (Cap insertion tool) használva. Ezt a felállást 180 fokban megfordítottuk, majd így inkubáltuk fél óráig $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ fokon. A csövet $800\times\text{G}$ 2 percig centrifugáltuk, hogy a sejtextraktumot egy mikrocentrifuga csőbe gyűjtjük. A centrifugálás után a mikrocentrifuga cső tartalmazta a sejtextraktumot, amelyből az RNS-t izoláltuk. Az izolálás első lépéseként először az RNS purifikációs oszlopot prekondicionáltuk: $250\text{ }\mu\text{L}$ kondicionáló oldatot tettünk az oszlop filter membránjára és 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az oszlopot, az adott gyűjtőcsőbe centrifugáltuk $16,000\times\text{G}$ egy percig, majd $50\text{ }\mu\text{L}$ 70% -os etil alkoholt pipettáztunk a sejtextraktumba. Az etilalkoholt és sejtextraktum keveréket a prekondicionált purifikációs oszlopra pipettáztuk. A kötődés bekövetkezéséig az oszlopot 2 percig centrifugáltuk $100\times\text{G}$ -n, majd ezt követően azonnal $16,000\times\text{G}$ -n 30 másodpercig. Az oszlopból történő kimosás a következőképpen zajlott: $100\text{ }\mu\text{L}$ kimosó oldatot (Wash Buffert 1) pipettáztunk az oszlopra és 1 percig $8000\times\text{G}$ -n centrifugáltuk. Majd $100\text{ }\mu\text{L}$ másodlagos kimosó oldatot (Wash Buffert 2) pipettáztunk az oszlopra és 1 percig $8000\times\text{G}$ -n centrifugáltuk. Végül $100\text{ }\mu\text{L}$ másodlagos kimosó oldatot (Wash Buffer 2) pipettáztunk a purifikációs oszlopra és 2 percig $16000\times\text{G}$ -n centrifugáltuk. Ha maradt az oszlopon reziduum még egyszer centrifugáltuk egy percig. Az oszlopot egy új 0.5 ml mikrocentrifuga csőbe tettük. Kioldó keveréket (Elution Buffert) pipettáztunk rá, melynek mennyiségét a kit mellé adott táblázatból néztük ki és egy percet inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az oszlopot 1 percig centrifugáltuk $1000\times\text{G}$ -n, hogy a kioldó puffert (Elution Buffert) elosszuk az oszlopban, aztán 1 percig $16000\times\text{G}$ -n, hogy az RNS-t kioldjuk. Az eljárás végén a tisztított RNS rendelkezésünkre állt

és MUC1 és -2 primerrel Real Time PCR reakciót futtattunk. A fenti módszer a MUC1 és -2 expresszió kvantitatív meghatározására alkalmas.

2. Állatkísérletes modell: kompozit hólyag kialakítása kutyákban

Az állatkísérleteket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Sebészeti Oktató és Kutató Intézetében, az Egyetemi Etikai Bizottság engedélyével végeztük (PTE Etikai engedély szám: 3793.316-4612/2010). A műtétek 12 növekedésben lévő, hat hónapos, átlagosan 10 kg-os – a könnyebb katéterezhetőség és az ismételt cystoscopiával történő mintavétel miatt – nőstény beagle kutyákban történtek. Az állatokat három csoportra osztottuk:

A csoport: két kutyában csak gyomorral történt a húgyhólyag augmentációja (gasztrocisztoplasztika);

B csoport: két kutyában a húgyhólyag plasztika kirekesztett, antimezentériális oldalán felhasított vastagbél szegmentummal történt (kolocisztoplasztika);

C csoport: nyolc állatban gyomorral és béllal egy ülésben történt a hólyagplasztika (kompozit hólyag).

Az A és B csoport állatai kontrollként szolgáltak.

A húgyhólyag megnagyobbító műtétek előtt az állatok 24 órán át nem kaptak táplálékot, folyadékot korlátlanul fogyaszthattak. A műtéteket megelőzően a kutyák parenterális (i.m.) testsúlyra számított antibiotikumot (2,5 mg/tkg gentamycin és 2g penicillin) kaptak. A gyomorral és kompozit hólyaggal történő plasztika esetén H2-receptor blokkolót (150 mg ranitidin) is adtunk. A műtétek előtt vér és vizelet mintavétel is történt. A műtétek és az ismételt szövettani mintavételek (cisztoszkópiák) thiopental indukciót követően intratracheális narkózisban (halothan, N2O) történtek. A narkózis bevezetése után per urethram 10 Ch-es Foley katéter behelyezése történt a hólyagba az anasztomózis védelmére.

A csoport (gasztrocisztoplasztika): a műtéteket hosszú median laparotómiából végeztük. A gyomor corpusából egy kb. 7 x 7 cm-es kb. egyenlő oldalú háromszöget vágunk ki, melynek vérellátását az a. gastroepiploica sinistra biztosította. A gyomor folytonosságát kétrétegű varratsorral állítottuk helyre. Az érnyeles gyomorlebenyt intraperitonealisán vittük le az eredeti húgyhólyaghoz. A hólyag kraniális felét rezekáltuk, majd a gyomor-szegmentumot egyrétegű, tovaftató varratsorral varrtuk a visszamaradó kaudális hólyagrészhez.

B csoport (kolocisztoplasztika): a műtéteket alsó median laparotómiából végeztük. A kolon deszcendesből egy kb. 10-12 cm hosszú szakaszt izoláltunk érellátásának megtartásával. A vastagbél folytonosságát vég-a-véghez anasztomózással állítottuk helyre. Az izolált érnyeles vastagbél-szegmentumot anti-mezokólikus oldalán hosszanti irányban felhasítottuk, majd az így keletkezett téglalap alakú vastagbél szakaszt U alakban, „sapkaszerűen” összevarrtuk (detubularisatio) és azt a visszamaradó eredeti (1/2) hólyagrészhez egyrétegű, tovaftató varratsorral varrtuk.

C csoport (kompozit hólyagképzés): a műtéteket hosszú median laparotomiából végeztük. A gyomorból az A csoportban, a vastagbélből a B csoportban részletezett technikával izoláltunk gyomor- illetve vastagbél szegmentumokat. A húgyhólyag kraniális felét reszekáltuk, majd a kirekesztett gyomor- és vastagbél-szegmentumokat egy rétegben az eredeti fél hólyagrészhez és egymáshoz anasztomizáltuk. Így olyan vizeletrezervoárt kaptunk melynek egynegyedét gyomor, egynegyedét vastagbél, felét az eredeti hólyag maradéka alkotta.

A műtéteket követően mindhárom csoportban a vizelet elvezetését a módosított hólyagokban suprapubicusan visszahagyott 20 Ch-es Pezzer- és transurethralis (Foley-) katéter biztosította. Az állatok a 7. posztoperatív napig naponta parenterális (i.m.) fájdalomcsillapításban (10 mg/ttkg Algopyrin), valamint antibiotikus (gentamycin és penicillin) kezelésben részesültek, melyet a 7. nap után további egy hétig per os folytattunk (50 mg/ttkg amoxicillin és klavulánsav). Az A és C csoport állatai az 5. posztoperatív napig parenterális (i.m.) H2-receptor blokkolót (ranitidin) is kaptak. A kutyák a 3. posztoperatív naptól pépes, az 5. posztoperatív naptól szilárd ételt fogyaszthattak. A hólyagban visszahagyott transuretrális katétert a 7. posztoperatív napon, a szuprapubicus katétert a 14. posztoperatív napon távolítottuk el.

2.1. Hisztológiai vizsgálatok

A húgyhólyagplasztika során, valamint a 12 hónapos nyomonkövetés végén, az állatok túlaltatását követően, 4-4 szövettani minta vétele történt a hólyagplasztikára használt tápcsatorna szakaszából (gyomor és vastagbél), a saját hólyagból és a kettő közötti anasztomózisból. Kompozit hólyag esetén mintákat vettünk a gyomor-hólyag, a gyomor-vastagbél, valamint a vastagbél-hólyag anasztomózisból is. A műtétet követően 4 és 8 hónappal altatásban végzett cisztoszóphia során nyertünk ugyanezen helyekről a mintákat.

2.2. Immunhisztológiai vizsgálatok

A minták egy részét formalinban fixáltuk, a belőlük készített metszeteket két független patológus vizsgálta, hematoxillin-eozin, valamint PCNA festést követően. A metszetekben mitotikus index számítása is történt. Tíz nagy nagyítású (400x) random szelektált látómezőben megszámláltuk a PCNA-sejtmagpozitivitást (barnaszínreakciót) mutató sejtek számát és 1000 sejt számra vonatkoztatva adtuk meg a százalékot. A nagy nagyítású látótérben, patológiai konszenzus szerint kb. 1000 sejt volt érzékelhető. A vizsgálatainkba nem vontuk be a vérzések, necroticus, artefactualisan sérült szöveti területeket. A minták másik részét OCT-be ágyztuk és a humán mintáknál tárgyalt módon kettős immunfestést és digitális feldolgozást alkalmaztunk MUC1-re és -2-re a human vizsgálatokban részletezett módszerrel. Az adatokat itt is statisztikus segítségével értékeltük ki.

EREDMÉNYEK

1. Humán vizsgálatok eredményei

1.1. Hisztológiai vizsgálatok

Három betegen észleltünk metaplasztikus átalakulásokat 8, 10 és 14 évvel az augmentációt követően. Egyet a hólyagmagnagyobbításra használt vastagbélben, egyet az eredeti hólyagrészben és egyet a saját hólyag és a magnagyobbításra használt bélszakasz közti anasztomózis vonalban. Diszplázia 4 év után 6 alkalommal fordult elő. Beteganyagunkban egy alkalommal alakult ki malignitás (polipszerű in situ adenokarcinoma), melyet egy 11 évvel korábban vastagbéllel magnagyobbított hólyagban detektáltunk a vastagbél-saját hólyag anasztomózis vonalában, polipszerű növedék formájában. H. pylori fertőzöttséget egy betegen sem észleltünk gasztrocisztoplasztika után.

1.2. Immunhisztológiai vizsgálatok

A vizsgálat során nem találtunk az augmentációra használt szövetekben és az eredeti hólyag urotheljében szignifikáns fehérjeszint változást gasztrocisztoplasztika, ileocisztoplasztika valamint hólyagpótlást követően (A, C és D csoport betegeiben).

Vastagbéllel történő hólyagmagnagyobbítás (B csoport betegek) után a MUC1 fehérje expressziója nőtt ($p < 0,001$), a Muc 2 fehérje expressziója pedig számottevően csökkent ($p < 0,05$) az augmentációra használt kolon mukózájában. Vagyis az idő előrehaladásával a MUC1 fehérje mennyisége emelkedett az augmentációra használt kolon nyálkahártyájában, míg a MUC2 fehérje mennyisége csökkent. Huszonnyolc éves lánybetegen 11 évvel, a vastagbéllel végzett hólyagmagnagyobbítást követően végzett rutin cisztoszkópia során az eredeti hólyag-vastagbél anasztomózis vonalában észlelt polipszerű in situ adenokarcinoma kettős immunfestésekor igen erős MUC1 expressziót és igen gyenge MUC2 fehérje expressziót észleltünk. Ugyanezt észleltünk a polipszerű in situ adenokarcinoma környezetéből vett nyálkahártya festődésében is.

1.3. MUC1, MUC2 gén expressziós vizsgálatok

A 14 kolocisztoplasztikán átesett beteg cisztoszkópos vizsgálata során nyert minták RT PCR vizsgálata során a vastagbélből nyert biopsziás anyagokon a MUC1 gén expressziója az idő függvényében növekedett, míg a MUC2 gén expressziója csökkent ($p < 0,05$). Abban a betegen, akiben a kolocisztoplasztikát követően 11 évvel malignitást, in situ karcinómát találtunk, a 4 évvel korábbi mintájában már kifejezett volt a MUC1 gén expressziója és a MUC2 gén expressziója ugyanakkor csökkentnek mutatkozott. Ebben a betegen a műtétet követően 11 évvel az RT PCR vizsgálat során, maximális MUC1 gén kifejeződést, és minimális MUC2 gén expressziót észleltünk. Ugyanezen betegek eredeti hólyagmintáiban nem találtunk statisztikailag számottevő MUC1 és MUC2 gén expresszió változást.

2. Állatkísérletek eredményei

2.1. Hisztológiai vizsgálatok

A gyomorból, a vékonybélből és a hólyagból vett minden szövettani minta normális morfológiát mutatott a hólyag-megnagyobbításakor.

A csoport (gasztrocisztoplasztika): Mindkét augmentált hólyag normál morfológiát mutatott 4 hónappal a műtét után. Nyolc és 12 hónappal a műtét után krónikus gyulladást észleltünk mindkét állat saját hólyagrészében. Diszpláziát egy állat hólyagjában észleltünk. A PCNA index 38-40%-nak adódott.

B csoport (kolocisztoplasztika): Mindkét augmentált hólyag normális morfológiát mutatott 4 hónappal a műtét után. Nyolc és 12 hónappal a műtétet követően mindkét állat, eredeti hólyagjában krónikus gyulladást észleltünk. Az egyik kolonszegmentumban diszpláziát észleltünk. A PCNA index ebben a csoportban 35-40% volt.

C csoport (kompozit hólyag): A kompozit hólyag gyomor részében 4 hónappal a műtétet követően végzett cisztoszkópia során fekélyt észleltünk, ami a nyomonkövetési idő végére (12 hónap) spontán gyógyult. A műtétet követően 4 hónappal 6 kompozit hólyag mutatott normális morfológiát mind a gyomor, mind a bél és mind az eredeti hólyagrészekben. Krónikus gyulladást egy állat saját hólyagrészében és egy másik állatban a kompozit hólyag kolon részében észleltünk. Nyolc hónappal a műtét után 5 állat hólyagjában krónikus gyulladás volt megfigyelhető. Három állat saját hólyagrészében, és kettő bélrészben is gyulladást figyeltünk meg. Tizenkét hónappal a plasztika után krónikus gyulladást észleltünk, 4 állat kolon részében illetve két állat gyomorszegmentjében, valamint egy állat saját hólyagrészében is. Diszpláziát 3 állat neocisztájának bélrészében és egy állat gyomor-szegmentumában találtunk. Egy adenómát találtunk a kolonrészben és egy low grade diszpláziát egy másik állat hólyagjának gyomor részében. A PCNA index a gyomor-szegmentum hámján 85-90%-nak, a kolon - szegmentum hámján 70% volt.

2.2. Immunhisztológiai vizsgálatok

A statisztikai elemzés a vastagbélminták MUC1 fehérje expressziójában szignifikáns csökkenést mutatott mind a B (kolocisztoplasztika), mind a C csoport (kompozit) állataiban a műtétet követően 4, 8 és 12 hónappal ($p < 0,0001$). A kolonminták MUC2 fehérje expressziójában szignifikáns változást nem észleltünk. A gasztrocisztoplasztikán (A csoport) és kompozit húgyhólyagképzésen átesett állatokban (C csoport) a MUC2 fehérje expressziója kevésbé markánsan, de szignifikánsan csökkent ($p = 0,03$). A MUC1 fehérje expressziójában gasztrocisztoplasztikát követően nem találtunk számottevő eltérést.

A TÉMÁBAN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- 1) *Vékony-, vastagbél- valamint gyomor-szegmentummal végzett hólyagmagnagyobbítást követően rutin hisztológiai vizsgálatok alapján, és közel 15 éves prospektív nyomonkövetés során a műtéteket követő első tíz évben a malignitás kialakulása a betegekben nagy valószínűséggel nem várható, de metaplasziával vagy praemalignus elváltozásokkal (diszplázia) már az első dekádban számolhatunk.*
- 2) *Humán szövettani mintákon végzett vizsgálatok szerint a vastagbéllal végzett hólyagmagnagyobbítást követően a MUC1 fehérje expressziója jelentősen emelkedik a hólyagmagnagyobbításra használt szegmentumban a MUC2 expressziója pedig csökken.*
- 3) *Kolocisztoplastikán átesett beteg polipoid megjelenést mutató in situ adenocarcinoma biopótumának elemzésekor kiemelkedően magas MUC1 fehérje szint és rendkívül alacsony MUC2 szint észlelhető. Ugyanezen betegből származó korábbi minták vizsgálatakor, már a tumor megjelenése előtt, alacsony MUC2 szint és magas MUC1 fehérje szint jelenik meg, mely prognosztizálhatja a malignitás kialakulását, annak fokozott kockázatát.*
- 4) *Betegekből és a kutyákból vett szövettani minták immunhisztológiai vizsgálata alapján a MUC1 és MUC2 fehérjék műtét utáni szintjének nyomonkövetése segíthet a hólyagmagnagyobbítást követően kialakuló malignitás korai felismerésében.*
- 5) *Kutyákban gyomorral és vastagbéllal egyszerre és egyidejűleg végzett hólyagmagnagyobbítás (kompozit hólyag) során nem csökken a rezervoárban kialakuló szövettani elváltozások és az esetleges malignizáció kockázata.*
- 6) *Beagle kutyákban vastagbéllal vagy gyomorral végzett hólyagplasztika után a hólyagban, valamint a kompozit hólyag bélszégmensében mind a MUC1, mind a MUC2 fehérje szintje csökken a műtéttől eltelt idő előrehaladtával.*

KÖZLEMÉNYEK ÉS ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

KÖZLEMÉNYEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBŐL

- 1) Kispál Z., Vajda P, Vástyán A, Juhász Zs, Pintér A: A húgyhólyag gyomorral és bélel történő egyidejű megnagyobbítása – kompozit hólyag (állatkísérletes modell). Magyar Urológia. 18:(4) pp. 230-6, 2006. **IF:** -
- 2) Vajda P, Kispál Z., Lenart I, Farkas A, Vastyan AM, Pinter AB: Quality of life: Urinary bladder augmentation or substitution in children. *Pediatr Surg Int*, 2009, 25(2); 195-201. **IF₂₀₀₉: 0,945**
- 3) Kispál Z., Balogh D, Erdei O, Kehl D, Juhasz Z, Vastyan AM, Farkas A, Pinter AB, Vajda P: Complications after bladder augmentation or substitution in children: a prospective study of 86 patients. *BJU Int*. 108:(2) pp. 282-9, 2011. **IF₂₀₁₁: 2,844**
- 4) Kispál Z., Vajda P, Kereskai L, Jakab CS, Vastyan A.M., Juhasz ZS, Pinter A.B.: Composite urinary reservoirs in dogs: histological findings. *J Urol*. 187:(3) pp. 1110-5, 2012. **IF₂₀₁₂: 3,696**
- 5) Kispál Z., Vástyán A, Pintér A, Vajda P, Jilling T: MUC-1 és -2-fehérje expressziójának változása kutyákban gyomorral és vastagbélel egyidejűleg megnagyobbított húgyhólyagban. *Gyermekgyógyászat*. 63:(1) pp. 24-8, 2012. **IF:** -

Összesített impact faktor: 7,485

ELŐADÁSOK AZ ÉRTEKEZÉS TÁRGYKÖRÉBŐL

- 1) Kispál Z., Vajda P: Az életminőség hólyagmegnagyobbító és pótló műtétek után. Házi TDK konferencia. Pécs, 2006.
- 2) Vajda P, Kispál Z., Farkas A, Vástyán A, Lénárt I, Kappéter B: Quality of Life in Patients and Parents following Urinary Bladder Augmentation and Substitution. National Congress of the Hungarian Association of Pediatric Surgeons. Kőszeg, 2006.
- 3) Kispál Z., Vajda P: Urinary bladder augmentation performed simultaneously with gastric and intestinal segment-An experimental model in dogs. International Student Congress on Medical Sciences. Groningen, The Netherlands, 2007.
- 4) Kispál Z., Vajda P: A húgyhólyag gyomor- és bél-szegmentummal egyidejűleg történő megnagyobbítása - új állatkísérletes model. Házi TDK konferencia. Pécs, 2007.
- 5) Kispál Z., Vajda P: A húgyhólyag gyomor- és bél-szegmentummal egyidejűleg történő megnagyobbítása - új állatkísérletes modell. Országos TDK konferencia. Budapest, 2007.
- 6) Kispál Z., Vajda P: Húgyhólyag gyermek- és serdülőkorban végzett megnagyobbításának sebészeti szövdményei. Spring session of Hungarian Association of Pediatric Surgeons, (Young investigators' Forum). Göd, 2009.

- 7) Kispál Z., Balogh D, Juhász Zs, Vastyan AM, Farkas A, Pinter AB, Vajda P: Complications Following Bladder Augmentation or Substitution In Children - A Prospective Study of 86 Cases. 11th European Congress of Pediatric Surgery. Bern, Switzerland, 2010.
- 8) Kispál Z., Jilling T, Balogh D, Lovasz M, Vastyan AM, Farkas A, Pinter AB, Vajda P: Altered expression of muc 1 and 2 genes following urinary bladder augmentation or substitution in children as a predictive sign of malignancy. Spring session of Hungarian Association of Pediatric Surgeons (Young investigators' Forum). Pécs, 2011.
- 9) Kispál Z., Balogh D, Jilling T, Vastyan AM, Pinter AB, Vajda P: Changes of mucin gene expression (altered expression of mucin genes) in gastrointestinal mucosa used for creating a composite reservoir in dogs. 12th European Congress of Pediatric Surgery. Barcelona, 2011.

EGYÉB, A TÉMÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- 1) Widhalm K, Dietrich S, Prager G, Silberhümmel G, Orth D, Kispál Z.: Bariatric surgery in morbidly obese adolescents: a 4-year follow-up of ten patients. Int J of Ped Obesity. 2008; 3 Suppl 1:78-82. **IF₂₀₀₈: 2.276**

EGYÉB, A TÉMÁHOZ NEM KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁS ÉS POSZTER

- 1) Kispál Z., Vástyán A, Kelemen D: Sebészeti beavatkozást igénylő pancreas sérülés. Háziorvos továbbképzés. Pécs, 2008.
- 2) Kispál Z., Vástyán A, Kelemen D: Sebészeti beavatkozást igénylő pancreas sérülés. (Poszter) Fiatal Gyermekgyógyászok Kongresszusa. Kőszeg, 2009.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Az értekezés szerzője köszönetet mond:

- *Prof. Dr Horváth Örs Péternek, hogy a PhD programjába kerülhettem;*
- *Témavezetőmnek Dr Vajda Péter PhD-nek a segítségéért és a mindenkori támogatásáért;*
 - *Prof. Dr Pintér Andrásnak a segítségéért és a korrektúráért;*
- *Dr Magyarlaci Tamásnak (†) a kutyákon végzett laborvizsgálatokban nyújtott segítségéért;*
 - *A PTE ÁOK Kísérletes Sebészeti intézetének;*
 - *A PTE ÁOK Patológiai intézetének;*
 - *A PTE ÁOK Mikrobiológiai intézetének;*
- *Dr Polgár Beának az immunfestési módszer elsajátításáért;*
- *Dr Jilling Tamásnak az amerikai intézetében nyújtott segítségéért;*
 - *Dr Kereskai Lászlónak a szövettani analízisért;*
 - *Bornemissza Gergőnek a szövettani feldolgozásáért;*
- *Dr Jakab Csabának, (Szent István Egyetem, Állatorvos Tudományi kar) a kutya hisztológiáért;*
 - *Balogh L Dánielnek a statisztikáért;*
 - *Marla Isaacsnek, Simó Botondnak a támogatásáért;*

és végül, de nem utolsó sorban a PTE ÁOK Gyermekklinika Sebészeti osztályán dolgozóknak, akik az állatkísérletek végzésében, az anyaggyűjtésben és az eredmények értékelésében felbecsülhetetlen segítséget nyújtottak. Hálával tartozom szüleimnek, akik mindig és mindenben támogattak.