

ÚJ DIAGNOSZTIKAI ÉS MŰTÉTI ELJÁRÁSOK KERESÉSE A GYERMEKKORBAN VÉGZETT HÚGYHÓLYAG-MEGNAGYOBBÍTÁS ÉS –PÓTLÁS UTÁNI POSTOPERATÍV METABOLIKUS ZAVAROK MEGELŐZÉSÉRE ÉS A MALIGNIZÁCIÓ KORAI FELISMERÉSÉRE

RÉSZLETES BESZÁMOLÓ

Az OTKA 46213 sz. projekt zárójelentéséhez

HÁTTÉR ÉS ELŐZMÉNYEK

A gyermekkori részleges, vagy teljes vizelettárolási, -tartási és/vagy –ürítési elégtelenség (incontinentia urinae) egyike azon egész életre kiható fogyatékoságoknak, mely a beteg életminőségét, társadalomba való beilleszkedését (iskolai tanulmányok végzése, szakma elsajátítása, anyagi és fizikai önellátás) súlyosan megnehezítheti vagy lehetetlenné teszi. A gyermekkori incontinentia urinae mintegy 80%-áért a húgyhólyag veleszületett beidegzési zavara (neuropathias hólyag) felelős, melynek leggyakoribb oka a meningomyelocele, sacralis agenesis, tethered cord. Az etiopathológia további 20%-át egyéb fejlődési rendellenességek (exstrophia vesicae urinae, epispadiasis totalis) és a gerincvelőből kilépő idegeket ért szerzett károsodások (trauma, gyulladás, tumor, anorectalis agenesis, cloaca malformatio, hátsó urethra-billentyű súlyos formái miatt végzett műtétek, valamint iatrogen sérülések) alkotják.

Ma Magyarországon mintegy 2000-3000-re tehető azon 0-16 éves betegek száma, akik a fent részletezett okok miatt vizeletüket nem tudják tartani. E súlyos kórkép óriási terhet ró az egyénre, a családra és a társadalomra.

A fent említett problémák közül legfontosabb a megfelelő hólyagkapacitás biztosítása, mert ezzel egyidőben általában javul a hólyag-compliance, csökken az intravesicalis nyomás, amely már önmagában az esetek jelentős részében javítja a continentiat.

A hólyagkapacitás növelése (augmentatio) történhet konzervatív (gyógyszeres) vagy sebészi úton. A gyógyszeres hólyagmagnagyobbítással (oxybutynin) és intermittáló tiszta hólyagkatéterezéssel (clean intermittent catheterisation) kezeléssel a betegek felében tartós siker érhető el. Ha a konzervatív therápia önmagában nem hozza meg a várt eredményt (maximális dózisban adható oxybutynin – 0,8 mg/kg/nap – mellett sem növekszik a hólyag kapacitása és compliance-e, megmarad a magas, a supravesicalis húgyutakat is veszélyeztető intravesicalis nyomás), akkor mai ismereteink szerint a hólyag sebészi magnagyobbítása az incontinentia urinae therápiája.

A húgyhólyag sebészi augmentatiojának legkézenfekvőbb megoldása a tápcsatorna egy szakaszának (gyomorsegmentum, vékony- vagy vastagbél szakasz) felhasználása. A hólyag megnagyobbítása egyes esetekben történhet az ureterrel, nyálkahártyájától megfosztott (seromuscularis) tápcsatornával is.

A hólyagmagnagyobbítás extrém formája a húgyhólyag teljes pótlása (substitutio), melyre akkor van szükség, ha a hólyag kapacitása nagyon kicsi (exstrophia urinariae), vagy ha a beteg hólyagját malignus folyamat (pl. rhabdomyosarcoma) miatt el kellett távolítani.

A hólyagmagnagyobbító műtétek akkor tekinthetők eredményesnek, ha a 3-4 óra alatt termelő vizelet alacsony nyomáson tárolódik az új hólyagban, a húgyhólyag kellő tágulékenységű (compliance), valamint a hólyag intermittáló tiszta önkatéterezéssel residuum-mentesen üríthető és a beteg a két katéterezés között „száraz” marad.

A hólyagaugmentatio kedvező eredményei mellett számos, a hólyagmagnagyobbítással oki összefüggésbe hozható szövődmény vált ismertté az utóbbi évtizedekben, melyek az alkalmazott tápcsatornaszakasz típusától és annak hosszától függenek.

A bélel és a gyomorral történő hólyagmagnagyobbítás és –pótlás szövődményeiért a következő tényezők tehetőek felelőssé:

1. A tápcsatorna egy szakaszának hólyagképzés céljából történő kiiktatásával a tápcsatorna hossza megrövidül. Ez különböző szövődmények (felszívódási zavar, vitaminhiány) forrása lehet.
2. A hólyagmagnagyobbítás után a vizelettel állandóan érintkező heterotopias gyomor, vékonybél, vastagbél aktív felszívó és kiválasztó tulajdonsága miatt is számos szövődménnyel (pH- és ion-eltérések, nyáktermelés, savtermelés, kőképződés) számolhatunk.
3. A húgyhólyag képzésére használt tápcsatornaszakasz nyálkahártyájának vizelettel való érintkezése számos metabolikus következményhez vezethet, hypocalaemia, hypercloraemias metabolikus alkalosis (gyomorral történő hólyagmagnagyobbítás); hyponatraemia, hypochloraemias metabolicus acidosis (vékony vagy vastagbélel történő hólyagmagnagyobbítás).

A fent felsorolt kóros metabolikus változások esetenként különböző súlyosságú további következményeket eredményezhetnek. A krónikus metabolicus acidosis csontdemineralizációt, osteomaláciát okozhat. A kialakuló metabolicus változások jó vese és májfunkció mellett kompenzálódhatnak.

Az elmúlt 20 év során a Pécsi Gyermekklinika sebészeti osztályán több mint 80 betegben történt hólyagmagnagyobbító vagy -pótló műtét a tápcsatorna egy szakaszának (teljes falvastagságú gyomor-szegmentum, vékony- vagy vastagbél) felhasználásával, mely betegszám nemzetközi összehasonlításban is magas. A betegek többparaméteres nyomonkövetése tudományos igényű protokoll szerint történt és végezzük most is. Ezen prospektív vizsgálatok és a fenti témakörrel foglalkozó állatkísérleteink eredményeit hazai és vezető nemzetközi (urológiai) folyóiratokban közöltük.

Korábbi vizsgálataink alátámasztották, hogy a húgyhólyag-magnagyobbító és -pótló műtéteket követően metabolikus (ion és pH) eltérésekkel, csontanyagcsere-elváltozással, növekedésbeli elmaradással kell számolni, azonban ezek az elváltozások csak a műtéteket követő első néhány évben számottevőek. Az irodalomban elsőként bizonyítottuk tudományos igényességgel, hogy a gyermekkorban végzett húgyhólyag-magnagyobbítást és -pótlást követő első 10 évben a malignitás kialakulásának kockázata alacsony.

A JELEN KUTATÓMUNKA CÉLKITŰZÉSEI ÉS KÉRDÉSFELTEVÉSEI:

Célkitűzések:

1. A tápcsatorna különböző szakaszaival végzett hólyagmagnagyobbítások (-pótlások) után kialakuló, fent röviden részletezett, metabolikus szövődmények csökkentése.
2. A beteg saját hólyagjának funkciója és a magnagyobbításra (pótlásra) használt tápcsatornaszakasz bonyolult szekréciós és adsorptios kölcsönhatásai miatt kialakuló premalignus vagy malignus elváltozások finomabb, ultrastruktúrális módszerekkel történő tanulmányozása.

Kérdésfeltevések:

1. A beteg saját hólyagjának gyomor-szegmentummal és vékony- vagy vastagbéllal történő együttes (egyidőben) történő magnagyobbítása (pótlása) csökkenti-e (megszünteti-e) a csak gyomor-szegmentummal, vagy csak béllal végzett hólyagmagnagyobbítás (-pótlás) során észlelt metabolikus zavarokat. A koncepció alapja az, hogy a gyomor-szegmentummal vagy béllal végzett hólyagmagnagyobbítások esetén ellentétes irányú anyagcsere-változások alakulnak ki, mely zavarok a két különböző funkciójú és morfológiájú tápcsatornaszakasz *együttes* alkalmazása esetén csökkenek, a változások semlegesítik egymást. Célul tűztük ki, hogy állatokban végzett kísérletekkel meghatározzuk, hogy milyen arányú legyen az augmentációra használt tápcsatornaszakaszok felszíneinek egymáshoz viszonyított aránya. Koncepciónk szakmai létjogosultságát igazolja, hogy az Egyesült Államokban már végeztek

(kis számban és nem tudományos igényességgel) gyomorral és bélel együttesen történő hólyagmagnagyobbítást.

2. Mivel a hólyagaugmentált (pótolt) betegek hosszabb távú (10-30 év) nyomkövetése során a rosszindulatú folyamat kialakulásával kell számolni, vajon a műtét után 8-10 évvel az évente végzett hólyag-biopsziás mintavétel során nyert anyag vizsgálatával korábban felismerhető-e (és sikerebben kezelhető-e) az esetlegesen kialakuló malignizáció? Az augmentált hólyagban a rosszindulatú elfajulás vizsgálatát nehezíti, hogy gyermek- és serdülőkorban még ritka a hólyag-, gyomor- és bél-malignitás kialakulásának valószínűsége, de ennek valószínűsége normál felnőttkorú populációban (nem augmentált betegekben) felnőttkorban nő. Célunk olyan könnyen kivitelezhető és reprodukálható ultrastrukturális vizsgálati módszer kidolgozása (vizeletből történő citológiai vizsgálat) volt, mely alkalmas lehet-e betegcsoportokban megjelenő malignizáció korai felismerésére.

VIZSGÁLATI MÓDSZEREK ÉS EREDMÉNYEK

A vizsgálatokra a Pécsi Tudományegyetemen (Gyermekklinika, Klinikai Kémiai Intézet, Patológiai Intézet, Sebészeti Oktató és Kutató Intézet) és nemzetközi együttműködéssel (Northwestern University, USA) került sor.

1. Klinikai beteganyag: az augmentált és hólyagpótolt betegek részletes laboratóriumi és eszközös nyomkövetése. A malignitás kialakulásának az évenkénti hólyagbiopszia során nyert anyagok hisztológiai, immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokkal történő tanulmányozása. Cytológiai vizsgálatokat a malignitás korai, kevésbé invazív módszerekkel történő igazolására a vizeletből nyert sejtek analízisét végeztük..
2. Állatkísérletek: növekedésben levő kutyákban a hólyag gyomorszegmentummal és vékony- vagy vastagbélel történő együttes (composite hólyag) magnagyobbítása. Az augmentációt követően 3, 6, 9 és 12 hónappal történő laboratóriumi és szövettani vizsgálatok. A klinikai beteganyagban is végzett immunhisztológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok végzése a gyomorral+bélel (composite hólyag) augmentált hólyagú állatokban.

Humán vizsgálatok

A pályázat időtartama (2004-2008) alatt összesen 66, a fenti műtéteken átesett (ebből 35 több mint 10 éve operált) beteg visszarendelését és részletes után vizsgálatát végeztük el. 2008

végéig 57 beteg került a prospektíve nyomonkövetett betegek csoportjába, akiket a pályázatban leírt protokoll szerint követünk nyomon.

Munkacsoportunk 1987 óta összesen 86 hólyagmagnagyobbítást vagy hólyagpótlást végzett gyermekekben és fiatal felnőttekben. A betegek átlagéletkora a műtétkor 12,5 (4-21) év volt. A műtét indikációját 41 betegben meningomyelocele, 21 betegben hólyagexstrophia, 24 betegben egyéb betegség (szekunder neurogén hólyag, tumor, polytrauma stb) képezte. A húgyhólyag magnagyobbítása 32 betegben vékonybéllel (ileocystoplastica), 30 esetben vastagbéllel (colocystoplastica), 18 betegben gyomor-segmentummal (gastrocystoplastica) történt. Hat betegben a húgyhólyagot vékony- vagy vastagbéllel (Indiana vagy Mainz pouch) pótoltuk. A betegek átlagos nyomonkövetési ideje 8,3 (0,25-16,5) év.

A műtéteket követően fellépő nem metabolikus jellegű, jelentős számú, (sebészi) szövődeményeket táblázatban foglaltuk össze a betegek teljes dokumentációjának részletes és kritikus elemzését követően (1. Táblázat).

Teljes kontinenciát 59/86, számottevő javulást 15/86 betegben értünk el. Nem következett be értékelhető javulás 12/86 betegben. Szövődmény nélkül gyógyult 9/86 beteg. Huszonöt betegben 1, 53 betegben 2 vagy több szövődemény lépett fel.

A pályázat segítségével a beteganyag vonatkozásában 3 nemzetközi közlemény született (1) három beteg ismételt műtétének (re-augmentatio) szükségességéről, a hólyag-magnagyobbítás sikertelenségének lehetséges okairól, (2) a betegek cystometriás méréseinek eredményeiről, valamint (3) a betegek életminőségének alakulásáról.

Szövődmények		Ileocystoplastica (N=32)	Colocystoplastica (N=30)	Gastrocystoplastica (N=18)	Hólyagpótlás (N=6)
Korai	Vizeletfertőzés	2	2	7	1
	Katéterezési nehézség	1	2	1	1
	Nedvesedés	2	5	2	2
	Ileus	3	1	2	
	Egyéb	6	3	5	2
Késői	Vizeletfertőzés	6	7	5	6
	Katéterezési nehézség	8	13	2	8
	Nedvesedés	13	14	5	2
	Ileus	2	2	2	1
	Kő	2	22	3	1
	Egyéb	8	26	9	1

1. Táblázat: A gyermekkorban végzett húgyhólyag magnagyobbítást és –pótlást követően fellépő nem metabolikus jellegű (sebészi) szövődemények

Húsz vastagbéllel hólyagmagnagyobbított vagy –pótlott és 9 gyomor-segmentummal hólyagmagnagyobbított beteg (akikben a műtét 4 vagy annál több éve történt) szövettani

mintáinak immunhisztokémiai és submikroszkópos elemzését a pályázatban feltüntetett Egyesült Államokbeli kutatóhelyen végeztük. A mintákat -70 Celsius fokon tároltuk és ezeket hűtve küldtük ki az amerikai kutatóhelyre. Az USA-ban a fagyasztott szövetek beágyazását, és -23 Celsius fokon történt lemetzését követően a humán mintákból:

- a.) immunfluoreszcens festést végeztünk a Muc-1 és Muc-2 fehérje kimutatása céljából (minőségi analízis). Ehhez, egerekben termelt monoclonalis Mucin 1 és 2 antitesteket használtunk fel.
- b.) előfestést követően a fagyasztott metszetekből Laser Capture Microdissection készülékkel a vastag-, vékonybél- és hólyag szövetek azon sejtjeit izoláltuk (nyálkahártya sejtek) melyek Muc-1-vel és/vagy Muc-2-vel festődtek. PicoPure™ izolációs kitt segítségével a kinyert sejtekből RNS-t izoláltunk, végül RN-ase-től mentes, (szabad DN-ase hozzáadását követően) tisztított RNS nyertünk. A tisztított RNS-ből reverz transzkripcióval komplementer DNS-t (cDNS) készítettünk, mely már stabilabb, így további felhasználás céljából -80 Celsius fokon tárolható. A mintákból nyert cDNS-ekből megfelelő primerek, előgyártott „master mix” és Real-Time PCR készülék segítségével határoztuk meg a Muc-1 és Muc-2 expresszióját (mennyiségi analízis).

Az immunofluoreszcens metszetekből nyert image analysis alapján az augmentatio után a Muc-2 densitas idővel csökken a hólyagmagnagyobbításra felhasznált colon nyálkahártyáján (20 beteg, $p < 0.0001$). Colon: Muc-2 mRNS-t 20-ból 12 beteg colon mintájából sikerült kinyerni. A kvantitatív analízis során (RT-PCR) a 12-ből 6 betegben szignifikánsan alacsonyabb Muc-2 expresszió volt mérhető 8-20 évvel a műtét után ($p = 0.0165$). Hólyag: A hólyag nyálkahártyája Muc-2-t nem expresszált (hólyagmagnagyobbításakor vett minták), de 9 beteg hólyagjának nyálkahártyáján alacsony mértékű Muc-2 expressziót lehetett mérni a műtétet követően (CT érték > 37).

A fenti eredményeket összegezve, a hólyagmagnagyobbításra felhasznált tápcsatorna részben a MUC-2 fehérje expressziója idővel csökken. Az eredeti hólyagrész mucosajában (normál urothelium) ugyanezen fehérje a húgyhólyag magnagyobbításakor nem mutatható ki, idővel azonban expressziója - igen kis mértékben ugyan -, de megjelenik. A fenti marker változásai a hólyagmagnagyobbításra felhasznált szövetekben pre-malignus jelként értékelhetőek. A kutatás ezen, eddig nem közölt eredményeit további submikroszkópos vizsgálatokat követően, később kívánjuk publikálni.

A MUC-2 marker non-invazív (vizeletben megjelenő sejtekből történő) vizsgálata technikailag igen nehéz, mert a vizeletben állandóan jelen van a bél által termelődő nyák, ami a MUC-2 mérését rendkívül zavarja, vagy teljesen lehetetlenné teszi.

Állatkísérletek

Az általunk, állatkísérletes modellben kidolgozott, a húgyhólyag vastagbéllel és gyomorral egyszerre és egyidejűleg történő megnagyobbításáról („composite” hólyag) metodikai közleményt jelent meg hazai folyóiratban (4).

A munkatervben részletezett állati szövetek (kutya) egy részén a human vizsgálatban használt antitestekkel végeztünk immunfluoreszcens festést az amerikai kutatóhelyen. Az ellenanyaggal a kutya szövetek azonban nem festődtek. Az állati szövetek molekuláris biológiai feldolgozását a human anyaghoz hasonló módszerekkel későbbi időpontban tervezzük. Az ehhez szükséges megfelelő primereket külön kell megtervezni.

A KUTATÁSBAN ELÉRT ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

- 1.) A hólyagmagnagyobbító és –pótló műtétek korai és késői metabolikus és sebészi szövődményeinek száma magas. Ugyanakkor a betegek életminősége (iskolázottság, munkavállalás, társadalmi beilleszkedés) a műtétet követően kifejezetten javult; 92%-uk újra kérné a műtétet.
- 2.) A MUC-2 változásai a hólyagmagnagyobbításra felhasznált szövetekben pre-malignus jelként értékelhetőek. A fenti marker monitorizálásával a szövetek malignus irányba történő elfajulása már korai stádiumban detektálható lehet.

TOVÁBBI CÉLKITŰZÉSEK

A továbbiakban már a saját kutatóhelyünkön a MUC-2 marker további vizsgálatát tervezzük hosszútávon (10-30 év) a betegekből folyamatosan nyert szövettani minták felhasználásával. Ezen marker non-invazív (vizeletből történő) mérése és vizsgálata továbbra is megoldatlan problémát jelent.

A PÁLYÁZAT TÁMOGATÁSÁVAL MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK:

(1) Vajda, P., Buyukunal, C.SN., Soylet, Y., Danismed, N., Juhasz, Zs., Pinter, A.B.:

A therapeutic modality for failed bladder augmentation in children – re-augmentation

BJU Int, 2006, 97(4): 816-9 (IF: 2,635)

(2) Juhasz ZS., Somogyi R., Vajda P., Oberritter Z., Fathi K., Pinter A.B.:

Does the type of bladder augmentation influence the resolution of pre-existing vesicoureteral reflux? Urodynamic studies

Neurourology and Urodynamics, 2008, 27(5):412-416 (IF: 2,671)

(3) P. Vajda, Z. Kispal, I. Lenart, A. Farkas, A. M. Vastyan, A. B. Pinter:

Quality of life: Urinary bladder augmentation or substitution in children

Pediatr Surg Int 2009, 25(2):195-201 (IF: 0,69)

(4) Pinter A.B., Vajda P., Juhasz ZS.:

Bladder augmentation in childhood: metabolic consequences and surgical complications - review and own investigations

J Pediat Surg Specialities, 2008, 2:62-67

(5) Kispál Z. med., Vajda P., Vástyán A., Juhász Zs., Pintér A.:

A húgyhólyag gyomorral és bélel történő egyidejű megnagyobbítása – kompozit hólyag (állatkísérletes modell)

Magyar Urológia, 2006, 18(4);230-36