

Gyermekkorban végzett húgyhólyag-megnagyobbítást követően fellépő szövettani változások klinikai és állatkísérletes vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés



Dr. Kardos Dániel József

Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Gyermekgyógyászati Klinika Manuális Tanszék

Témavezetők: Dr. Vajda Péter, egyetemi docens, Dr. Vástyán Attila, egyetemi docens

Programvezető: Prof. Dr. Vereczkei András, egyetemi tanár

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem

OGYDHT

Pécs, 2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítések magyarázata	2
I. Bevezetés	4
I.1. Az organikus eredetű húgyhólyagműködési zavar okai gyermekkorban	4
I.2. Az organikus eredetű húgyhólyagműködési zavar kezelése gyermekkorban	11
I.3. A műtéti húgyhólyag-megnagyobbítás szövődményei	17
I.3.1. Húgyhólyag-megnagyobbítás követő szövettani elváltozások	19
I.3.2. A húgyhólyag-megnagyobbításon átesett betegek nyomonkövetése	26
I.3.3. Állatkísérletes modellek a húgyhólyag megnagyobbítását követően kialakuló szövettani elváltozások vizsgálatára	29
II. Célkitűzések	31
III. Minták és Módszerek	32
III.1. Klinikai vizsgálatok	32
III.2. Állatkísérletek	34
IV. Eredmények	40
IV.1. Klinikai vizsgálatok eredményei	40
IV.2. Állatkísérletek eredményei	47
V. Megbeszélés	53
V.1. Klinikai vizsgálatok.....	53
V.2. Állatkísérletek.....	59
VI. Összefoglalás	63
VII. Az értekezés új eredményei és megállapításai	64
VIII. A klinikai és állatkísérletes kutatás további tervei	65
Irodalomjegyzék	66
Mellékletek	77
A dolgozat alapjául szolgáló és egyéb közlemények, előadások jegyzéke	80
Köszönetnyilvánítás	84

Rövidítések magyarázata

Ach – acetil-kolin

AMS – American Medical Systems (Amerikai Orvosi Rendszer)

BOTOX – Botulinum toxin

CCP – kolocisztoplastika

cfu – colony forming unit

CIC – clean intermittent (self) catheterization [tisza intermittáló (ön)katéterezés]

CMV – cytomegalovírus

COX-2 – ciklooxygenáz-2

CPRE – complete primary repair of exstrophy (a húgyhólyag exstrophia komplett elsődleges rekonstrukciója)

EAU – European Association of Urology (Európai Urológus Társaság)

EBV – Epstein-Barr vírus

ESPU – European Society of Paediatric Urology (Európai Gyermekeuroológus Társaság)

FISH – fluoreszcens in situ hibridizáció

FGFR3 – fibroblast growth factor receptor 3

GCP – gasztrocisztoplastika

HDS – haematuria dysuria syndrome

HE – hematoxin-eozin

ICCS – International Children's Continent Society (Nemzetközi Gyermekek Kontinencia Társaság)

ICP – ileocisztoplastika

K.O. – knock out

MMC – meningomyelokele

MSRE – modern staged repair of bladder exstrophy (a húgyhólyag exstrophia modern, többlépcsős rekonstrukciója)

NA – noradrenalin

PAS – Perjód-Acid-Schiff

TNM – T-tumorméret, N-nyirokcsomó áttét, M-távoli áttét

UH - ultrahang

UTI – urinary tract infection

VUR – vesicoureteralis reflux

vt - vörösvértest

I. Bevezetés

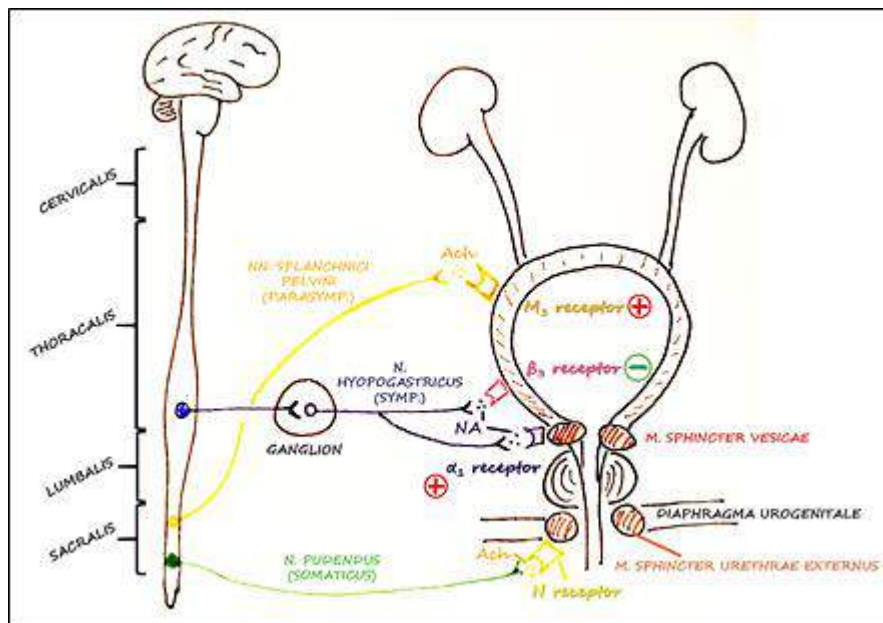
Húgyhólyag-megnagyobbító műtétet gyermekkorban ritkán és következetes szempontrendszer szerint végzünk. Ilyen összetett beavatkozásra többnyire olyan gyermekeknél van szükség, akiknél legtöbbször veleszületett, organikus eredetű vizelettárolási rendellenesség, leggyakrabban neurogén hólyagműködési zavar és következményes vizeletinkontinencia áll fenn. Ilyenkor az oki tényező általában a kis kapacitású, magas nyomású, rossz tágulékonyságú hólyag. A műtét akkor jön szóba, ha minden egyéb konzervatív és operatív próbálkozás sikertelen volt. Dolgozatom a húgyhólyag-megnagyobbító műtétekkel összefüggésbe hozható szövettani elváltozásokkal foglalkozik. A bevezetőben az organikus eredetű húgyhólyagműködési zavar gyermekkori okait, kezelési lehetőségeit és a műtétek rövid-, közép-, illetve hosszú távú szövődményeit kívánom bemutatni.

I.1. Az organikus eredetű húgyhólyagműködési zavar okai gyermekkorban

Az szervi okok 80%-ában a húgyhólyag beidegzésének veleszületett zavarai, például meningomyelocele (MMC), tethered cord vagy caudalis regressziós szindróma állnak a háttérben. Második helyen a hasfal záródási rendellenességei közül az exstrophia vesicae urinariae és az epispadiasis totalis szerepelnek. Hólyagműködési zavarhoz nemcsak a gerincvelőt és a gerincvelői idegeket érintő veleszületett, hanem egyéb, szerzett károsodások (anorectalis malformáció, myelitis transversa, gerincet és/vagy a kismedencét érintő politrauma, tumorok, hátsó húgycső billentyű súlyos formái és iatrogén sérülések) is vezethetnek [1].

Egészséges emberben az alsó húgyutak egyes részeinek (detrusor izomzat, hólyagnyak, külső sphincter) és az ezek irányításáért felelős idegelemeknek (plexus sacralis, plexus hypogastricus, gerincvelő, pontin vizelési központ, agykéreg, stb.) irányított együttműködése biztosítja a vizelet megfelelő tárolását és ürítését (1. ábra). Fiziológiásan ez megfelelő hólyagkapacitás és többnyire 30 vízcm alatti maximális intravesicalis nyomás mellett történik. Gyermekkorban a normális hólyagkapacitás 12 éves korig nem lineáris módon növekszik. A

gyermekkorban „várható” hólyagkapacitás kiszámítására leggyakrabban a következő képletet használjuk: (évek száma×30)+30 ml. A várható hólyagkapacitás kb. 400 ml-es mennyiségnél találkozik a felnőttkorra jellemző értékkel [2]. Bármelyik fent említett anatómiai összetevő – mind funkcionális, mind strukturális – károsodása hólyagműködési zavarhoz és következményes vizeletinkontinenciához vezethet.



1. ábra: A húgyutak részei (férfiakban) és az ezek irányításáért felelős idegelemek.

A kimenetel szempontjából várható legrosszabb következmény, amikor egy kis kapacitású, magas nyomású, gyengült tágulékonyágú húgyhólyag jön létre. Ha a húgyhólyagban uralkodó maximális nyomás tartósan 40 vízcm feletti („hostile bladder”), a vizelet elfolyási akadályának következtében a vesék károsodásának a veszélye szignifikánsan megnő [3, 4].

Húgyhólyag megnagyobbításra döntően az alábbi két nagy betegcsoport szorulhat:

I.1.1. Meningomyelocele

A nyitott hátgerinc legsúlyosabb formája, amikor mind az agyburkok, mind a gerincvelő nyitott (2. ábra). Ez a fejlődési rendellenesség napjainkban is a neurogén húgyhólyag működési zavar leggyakoribb oka gyermekkorban. A nyitott hátgerinc gyakorisága világszerte 0,17-6,39:1000 (hazánkban 1,2:1000) [5, 6].



2. ábra: Thoracolumbalis MMC típusos megjelenése újszülött korban.

MMC esetén a neurogén hólyag többféleképpen vezethet a vizelet tárolásának vagy ürítésének elégtelenségéhez. A detrusor és a sphincter izomzat működési zavarai az alábbi módokon kombinálódhatnak egymással [7]:

Alulműködő detrusor / Túlműködő sphincter

Alulműködő detrusor / Alulműködő sphincter

A petyhüdt, megfelelő nyomást kialakítani képtelen detrusor izomzat nem képes a hólyagban levő összes vizelet egyidejű kiürítésére, így ott mindig maradék vizelet, ún. reziduum maradhat vissza. Ennek mértéke akkor számít kórosnak, ha meghaladja a kor szerinti becsült hólyagkapacitás 10%-át [8]. Egyidejű elégtelen záróizom funkció esetén a reziduum, azaz az akaratlagos vizeletürítés után a húgyhólyagban maradó vizelet, ilyenkor akaratlanul távozik a hólyagból.

Túlműködő detrusor / Túlműködő sphincter

Túlműködő detrusor / Alulműködő sphinter

A hiperaktív detrusor izomzat a kis mennyiségű vizelet tárolását is magas nyomáson végzi, ami szintén inkontinenciához vezet. MMC esetén a záróizomzat funkciója többnyire gyenge, illetve az akaratlagos elemei sem működnek megfelelően. A fent leírt mechanizmusok keveredhetnek is egymással. Például amikor a húgyhólyag kapacitása kicsi, de nem képes a vizelet egészének kiürítésére sem.

A pontos patofiziológia felderítése a kezelés szempontjából fontos, de nem könnyű feladat. Egyrészt a gerincvelő záródási rendellenesség etiológiája, típusa vagy szintje (a laesio anatómiai magassága) nem korrelál a detrusor és a sphincter diszfunkcióval. Másrészt a tünetek az életkorral dinamikusan is változhatnak. Az MMC-vel született betegek kb. 12%-a születik neuro-urológiai eltérés nélkül, azonban az első életév végére nagy részükben megjelenik valamilyen kezelést igénylő eltérés. Jellemző továbbá, hogy a kezdetben kedvező urodinamiás vizsgálati eredménnyel bíró beteg állapota is az ellenkezőjére változhat az első néhány életévben (pl. az alacsony nyomású, jó tágulékonyságú és compliance-ű hólyag túlműködő hólyaggá változik). A betegek nyomonkövetése mindezért, valamint a társbetegségek (pl. VUR, veseelégtelenség, hydrocephalus, magasabb tumor rizikó) miatt elengedhetetlen. Egyelőre nem létezik nemzetközileg egységesen használt nyomonkövetési protokoll, de a közelmúltban több szervezet, illetve nemzetközi társaság (ESPU, EAU, ICCS) is megfogalmazott számos ponton egyező ajánlásokat, amik a különböző centrumok protokolljainak alapját adják [7, 8].

Minden gyermekurologiai beavatkozás elsődleges terápiás célja a felső húgyutak, azaz a vesék védelme. Mindemellett a kontinencia elérése „csak” másodlagos feladat lehet. Jellemzően a közösségbe (óvodába, iskolába) történő integrációval veszi kezdetét ennek felmérése. A kamaszkorba lépve azonban a vizelet- és/vagy széklettartó képesség mellett már a szexuális funkciók javításának igénye is látótérbe kerül.

Napjainkra a neurogén hólyag kezelésére két fő szemlélet terjedt el:

- 1.) A „proaktív kezelés” középpontjában a felső húgyutak védelme áll. E szerint a MMC-el megszületett gyermekek mindegyikénél már újszülött korban bevezetésre kerül a tiszta intermittáló katéterezés (CIC). Ezáltal sokkal nagyobb eséllyel

kerülhető el az elégtelen hólyagürülés, vizelet pangás okozta veseelégtelenség vagy akár az augmentáció. Detrusor túlműködés esetén a gyógyszeres kezelés (antimuscarin terápia, pl. oxybutinin) mielőbbi elkezdését is ajánlják, mert ez szintén csökkenti a későbbi komplikációk esélyét. Mindezzel párhuzamosan történik a hólyagműködés, a vesefunkció és az egyéb eltérések felmérése. Amennyiben később alacsony nyomáson működő, reziduum nélkül spontán is kiürülő húgyhólyagra derül fény, a CIC egyes esetekben elhagyhatóvá válhat.

- 2.) A másik személet „várakozó jellegű”. Ez utóbbi szerint a CIC bevezetése csak a felső húgyutakat veszélyeztető magas nyomású hólyag vagy elégtelen hólyagürülés esetén szükséges.

Napjainkban egyre több közlemény inkább a „proaktív kezelés” fontosságát hangsúlyozza. Ennek oka az, hogy a MMC-vel született betegek 25%-ában valamilyen fokú vesekárosodás (kb. 1%-ban végstádiumú veseelégtelenség) mutatható ki felnőttkorra [9].

MMC esetén a neurogén hólyagürülési zavar terápiajával párhuzamosan a vizeletfertőzések, a vesicoureteralis reflux (VUR), a székletinkontinencia, a liquor keringési zavar kezelése és a musculosceletalis rehabilitáció további fontos elemei a komplex ellátásnak.

I.1.2. Exstrophia vesicae urinariae

A hólyagexstrophia a hasfal alsó részének záródási rendellenessége, mely szerint a köldök vonala alatt a hasfal a húgyhólyaggal, a medencével és legtöbbször a genitáliákkal együtt a külvilág felé nyitott (3. ábra). A rendellenesség gyakorisága Európában 1:46.000. Döntően a fiúk érintettek, kb. 2-3:1 arányban gyakrabban a lányokhoz képest [10]. Húgyhólyag exstrophia esetén a húgyhólyag, a csontos és a szalagos medence, a medencefenék izomzat és a genitáliák anatómiai rendellenességei vezetnek a vizelet tárolásának és tartásának elégtelenségéhez.



3. ábra: A húgyhólyag exstrophia típusos újszülöttkori megjelenése fiúban.

A rekonstrukciós beavatkozások célja a sikeres hólyagzárás, a hólyagnyak, a húgycső és barlangos testek (penis) helyreállítása, valamint a VUR megszüntetése. Funkcionálisan egy jó kapacitású, alacsony nyomású, nem refluáló, kontinens és kozmetikailag jó megjelenésű húgyúti és ivarszervi rendszer elérésére kell törekednünk.

Amennyiben a hólyagtelep mérete lehetővé tesz, annak korai (a megszületést követően 72 órán belüli) zárása ajánlott. Ha a hólyagtelep kis mérete miatt korai (újszülöttkori) zárásra nem alkalmas, akkor ún. halasztott zárás javasolt legkésőbb 12 hónapos életkorig. Ez történhet a vizelet elterelésével vagy anélkül. Számos módszer és ennek módosítása létezik mind a hólyagtelep zárására, mind a medence osteotomia kivitelezésére, a hólyagnyak rekonstrukciójára, illetve a húgycsőplasztikára is. A műtétek időzítésében is több protokoll ismert. A húgyhólyag zárásával együtt javasolható a hólyagnyak és a hímvessző rekonstrukciója is, a medence osteotomiájával vagy anélkül (CPRE – Complete Primary Repair of Exstrophy) [11]. Napjainkban egyre több centrum az ún. „több lépcsős” vagy szakaszos rekonstrukciót javasolja (MSRE – Modern Staged Repair of Bladder Exstrophy) hólyagexstrophia esetén [12, 13]. Ez utóbbi szerint a hólyagzárásra újszülött-, vagy csecsemőkorban (egy éves életkor előtt) kerül sor. Az epispadiasis korrekciója kb. 6-12-(18) hónapos életkorban történik. A hólyagnyaki plasztikát és anti-reflux beavatkozást 5-6 éves kor körül végzik el, ha a hólyagkapacitás ezen életkorra eléri a 100 ml-t. Ez utóbbi esetben feltétel, hogy a gyermek a vizelet kontinencia tréningre mentálisan is érett legyen. A nemzetközi irodalmi adatok az alkalmazott módszertől függetlenül 22-80%-os kontinencia

arányról számolnak be [14]. Húgyhólyag exstrophia esetén is az elsődleges és legfontosabb kezelési cél a felső húgyutak védelme. Ennek érdekében a rekonstrukciós beavatkozásokkal párhuzamosan fontos a betegek folyamatos és rendszeres állapotfelmérése, illetve gondozása. A nyomonkövetés során a hólyag működését, a hólyagnyak rezisztenciáját, VUR jelenlétét és a vesék állapotát szorosan monitorizálni kell [15].

I.2. Az organikus eredetű húgyhólyagműködési zavar kezelése gyermekkorban

Az etiológiától függetlenül a gyermekkori húgyhólyagműködési zavar kezelése során - a felső húgyutak és a vesék funkciójának lehető leghosszabb távú megőrzése mellett - a következőkre kell törekedni:

- A. Megfelelő húgyhólyag kapacitás kialakítása;
- B. Megfelelő időközönként történő, reziduum-mentes hólyagürülés biztosítása;
- C. A vizeletürítések közti szárazság biztosítása.

A fenitek elérésére számos módszer és azok kombinációi állnak rendelkezésre. A kezelésnek mindig egyénre szabottnak kell lennie. A konzervatív és műtéti kezelési lehetőségek mellett mindig figyelembe kell vennünk a gyermek pszichés fejlettségét, családjának vagy gondozójának szociális helyzetét is. Fontos továbbá, hogy a kezelés lehetőség szerint a későbbiekben majd önellátást is lehetővé tegyen.

I.2.A. Megfelelő hólyagkapacitás kialakítása

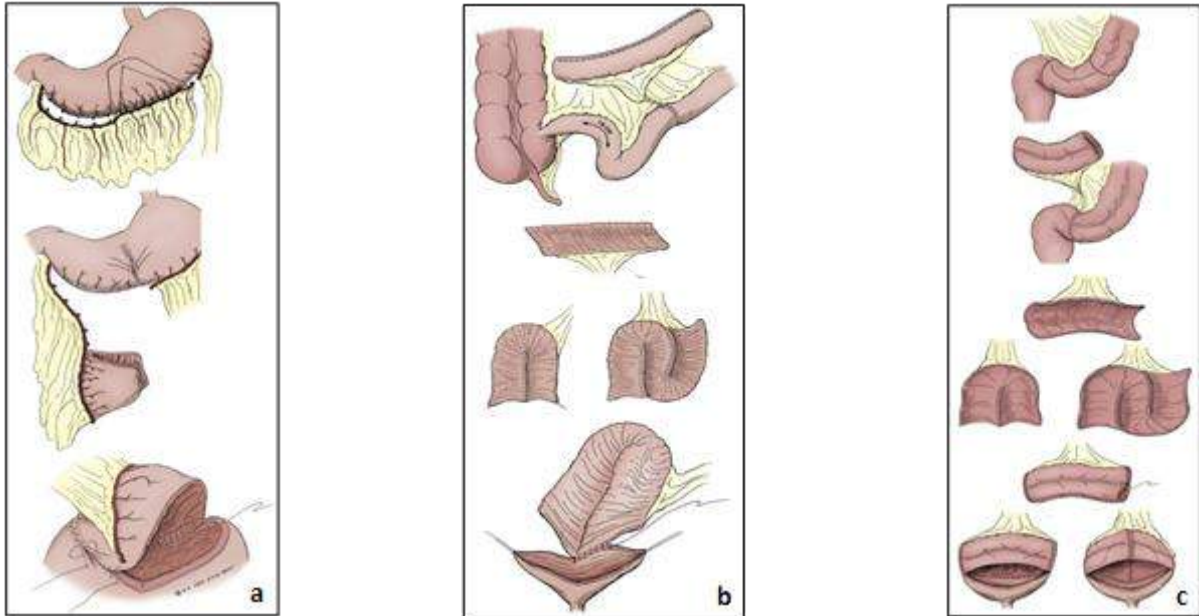
A húgyhólyag kapacitásának növelése első lépésben konzervatív úton, gyógyszeresen történhet. A legszélesebb körben (gyermekkorban használatra Magyarországon egyedüli engedélyezett hatóanyagként) használt gyógyszer az oxybutinin-hydrochlorid. Az oxybutinin a detrusor izomzat muszkarinerg receptorain direkt gátló hatást fejt ki, így szimpatikus túlsúlyt hozva létre, ami a kapacitás növekedéséhez vezet. Az oxybutinin nem csak a hólyagkapacitás növelésében, hanem az akaratlan, autonóm detrusor izomkontrakciók kivédésében is fontos [16, 17]. A húgyhólyag izomtónusának csökkentésével a vizelet kiürítésének hatékonysága is csökken, így az oxybutinin használata mellett jelentős reziduum maradhat vissza a hólyagban. A gyógyszeres kezelés kiegészítője a CIC bevezetése, amit a bevezető későbbi részében kívánok tárgyalni. Az oxybutinin és a CIC kombinációjával az esetek közel felében sikerül megfelelő vizelet kontinenciát elérni. Mindezzel megvédjük a felső húgyutakat és elkerülhetővé válik a sokszor visszafordíthatatlan változásokat és számos komplikációt okozó műtéti beavatkozás [18].

Ha a fenti konzervatív terápia sikertelen, a hólyagkapacitás növelésére második vonalban minimál invazív kezelés, a detrusor izomzat BOTOX A injekciója jöhet szóba endoszkópos úton. A neurotoxin húgyhólyag izomzatba történő injektálásának eredményessége igen széles skálán mozog. A jelenlegi irodalmi adatok alapján az injektáló kezeléssel az esetek 32-100%-ában érhető el megfelelő vizelettárolási képesség. Ezen kezelés hátránya azonban, hogy csak átmenetileg hatásos, tehát ismételni kell [19].

Neurogén hólyag esetén – egyes magyarországi intézetekben is – további kezelési alternatíva lehet az intravesicalis elektrostimuláció. Az irodalmi adatok alapján ennek kapacitás növelő hatása nem bizonyított [20].

Mind a neurogén hólyagműködési zavar (pl. MMC), mind az anatómiai rendellenesség (pl. hólyagexstrophia) esetén a legvégső megoldás a húgyhólyag kapacitásának növelésére a hólyag sebészi megnagyobbítása vagy pótlása.

A húgyhólyag műtéti megnagyobbítására (augmentáció) napjainkban számos módszer ismert. Erre a gastrointestinalis traktus valamely teljes falvastagságú szegmense vagy ezek kombinációi használhatók fel. Az augmentátum típusa alapján így megkülönböztetünk gastrocisztoplastikát (GCP), amikor gyomorral, ileocisztoplastikát (ICP), amikor vékonybéllel és kolocisztoplastikát (CCP), amikor vastagbéllel történik a húgyhólyag megnagyobbítása (4. ábra) [1, 21]. A '80-as évek elején leggyakrabban az ileocoecalis-segmentumot (Mainz I. ileocisztoplastika) vagy a szigmabél egy szakaszát használták fel erre a célra [22]. A gyomorral történő hólyagmagnagyobbítás a '90-es évek elején vált népszerűvé, főként a károsodott vesefunkciójú betegekben [23, 24]. Napjainkban leggyakrabban – ha ennek kontraindikációja nincs (pl. rövid bél szindróma) – vékonybél-segmentumot használnak fel a húgyhólyag megnagyobbítására [1]. A gastrointestinalis traktus valamely szakaszának a húgyhólyagba ültetése, a heterotópiás nyálkahártya jelenléte miatt, a későbbiekben részletezett számos szövődmény lehetőségét hordozza magában. A szövődmények elkerülése céljából manapság is törekvés egy jobb alternatíva létrehozása [25].



4. ábra: A húgyhólyag megnagyobbításának sémás rajzai: (a.) gyomorral (gastrocisztoplasztika), (b.) vékonybél- (ileocisztoplasztika), illetve (c.) vastagbél-szegmentummal (kolocisztoplasztika) végzett húgyhólyag-megnagyobbítás [1].

A húgyhólyag megnagyobbítására a teljesség igénye nélkül a következő további lehetőségek adódnak. Auto-augmentációról akkor beszélünk, amikor a serosa és a detrusor izomzat behasításával egy művi pseudodiverticulumot hoznak létre, azaz itt a hólyagfalat csak húgyhólyag nyálkahártyája alkotja [26]. A seromuscularis enterocisztoplasztika során a gyomor- vagy bélszegmentumot megfosztják nyálkahártyájától. Ez vagy önmagában használható, vagy egy muscularis rétegetől megfosztott, „autoaugmentált hólyag” epitheliumára ültetik rá [27]. Elméletben ezek a módszerek működhetnek, azonban az eddigi klinikai tapasztalatok a zsugorodás, hegesedés miatt nem olyan kedvezőek, mint a hagyományos enterocisztoplasztika esetén. Ha az egyik oldali ureterben már létrejött a felső húgyutak dilatációja, akkor az azonos oldali kitágult ureter segítségével is elvégezhető a húgyhólyag megnagyobbítása (ureterocisztoplasztika) [28]. A módszer hosszú távú eredményeiről ellentmondásosak az adatok, főként, hogy a műtétre alkalmas betegek száma limitált.

Bizonyos esetekben, amikor a hólyag extrémén kicsi (pl. hólyagexstrophia), vagy malignus folyamat (pl. leiomyosarcoma) miatt a húgyhólyag eltávolításra került, akkor a húgyhólyag teljes pótlására (szubsztitúció, orthotop hólyag létrehozása) is sor kerülhet. Erre

is a tápcsatorna valamely szakasza használható fel a leginkább. A húgyhólyag teljes pótlása (szubsztitúció) történhet gyomorral (gastric pouch, gastroileal pouch), vékonybéllel (ileum conduit – pl. Kock pouch), ileocecalis szegmenssel (pl. Mainz I. pouch, Penn pouch, Indiana pouch) vagy vastagbéllel is (pl. Mainz II., III. pouch, sigma pouch) [1, 22, 29].

A húgyhólyag megnagyobbítására és pótlására napjaink legfőbb törekvése a „regeneratív medicina” segítségével létrehozni olyan heterológ vagy autológ graftokat, amelyek in vitro vagy in vivo a hólyagfal regenerációját idézik elő. Atala és munkatársai voltak az elsők, akik biológiailag lebomló „műhólyag mintára” vittek fel autológ urothel és detrusor izom sejteket. Ezeket a sejteket a tenyésztés után visszaültették a neuropathiás hólyagú betegekbe [30]. A kezdeti biztató eredmények ellenére a célt azonban mind a mai napig nem sikerült elérni [31]. A szövettenyésztéssel létrehozott („tissue engineered”) húgyhólyagok kifejlesztésében újabban talán az új generációs bioreaktoroktól és a 3D bionyomatóktól remélhető előrelépés [32].

I.2.B. Megfelelő időközönként történő, reziduum-mentes hólyagürülés biztosítása

Lapides és munkatársai a '70-es évek elején vezették be a tiszta intermittáló (ön)katéterezés módszerét (CIC) a felnőtt neurogén hólyagú betegek terápiájában [33]. A technika elsajátításával a gyermek akár önmaga vagy szülője segítségével képes húgyhólyagjának megfelelő, ideálisan 3-4 órás időközönként történő – gyakran bizonyos segédmanőverekkel (pl. Valsalva, Credé) kivitelezett – maradéktalan kiürítésére. Ezzel nem csak a vizelet pangást és az esetlegesen egyidejű VUR esetén fennálló felső húgyúti károsodást lehet megelőzni, hanem a teljes kontinencia is elérhetővé válhat, ami a társadalomba való beilleszkedés szempontjából alapvető fontosságú.

A húgyhólyag katéterezése két úton lehetséges: az eredeti húgycsőn vagy egy művi úton létrehozott hasfali stomán át. Per urethram abban az esetben történhet kontinens CIC, ha a húgyhólyag a katéterezések között megfelelő záró mechanizmussal rendelkezik és a katéterezés technikailag nem nehéz (pl. kerekesszékhez kötöttség, férfi nem) vagy fájdalmas (pl. hólyagexstrophia esetén) a beteg számára. Ellenkező esetben egy kontinens hasfali stoma kialakítása jöhet szóba a hólyag nyak lezárásával vagy anélkül. A klinikai tapasztalatok azt mutatják, hogy a betegek kényelmesebbnek ítélik meg a hasfali stomán át történő

katéterezést [34]. A vizelet elvezetésére legtöbbször Mitrofanoff szerinti appendicocutaneostomia kerül kialakításra. Ez a módszer a féregnyúlvány felhasználásával, a hólyag falában egy submucosus csatorna kialakítása után hoz létre szelep-szerű záró mechanizmust [35, 36]. Ugyanezen az elven alapszik a vékonybélből készült Yang-Monti stoma elkészítése is [37]. Másik lehetőség a szelep-szerű, kontinens stoma kialakítására, ha a katéterezhető stomát a megnagyobbításra használt bélszegmentumba ún. „csecs-szerű bedomborodással” ültetjük be. A módszernek a legtípusosabb példája az Indiana pouch, ahol ez a szelep a Bauhin billentyű [38]. Alternatívaként említhető a ritkán használt ureter csomk katéterezhető stomává alakítása is [39].

I.2.C. Vizeletürítések közti szárazság biztosítása

Veleszületett okból diszfunkcionálisan működő hólyag esetén a hólyagnyak megfelelő záró funkciójának (azaz a megfelelő hólyagnyaki ellenállásnak) a biztosítására döntően csak műtéti módszerek állnak rendelkezésre.

Konzervatív úton a hólyagnyaki izomtónus fokozható alfa-adrenerg agonista gyógyszerekkel, medencefenék tornával, a hólyagnyak vagy a sacralis idegek elektrostimulációjával. Neuropathiás hólyag, illetve exstrophia esetén ezektől a módszerektől azonban kevésbé várható eredmény [40, 41].

A kifolyási ellenállás növelése műtételeg többek között a hólyagnyak alátámasztásával vagy megemelésével (pl. autológ fascia lemez), az urethra lumenének arteficiális anyaggal történő külső (pl. arteficiális urethra sphincter – AMS 800 Urinary Control System) vagy belső szűkítésével (pl. submucosus macroplast injektálás), illetve hólyagnyak plasztikával (Young-Dees-Leadbetter vagy Pippi-Salle eljárások) történhet [42-46]. Az említett módszerek akkor tekinthetőek sikeresnek, ha az előző pontokban említett tényezők fennállása esetén a beteg spontán vizeletürítésre vagy önkatéterezésre képes. Ellenkező esetben a hólyagnyaki ellenállás fokozása mellett egy katéterezhető (általában hasfali) stoma kialakítására is szükség lehet. Ha az említett módszerekkel sem sikerül elérni a megfelelő vizelettartási képességet, akkor a hólyagnyak lezárása és egy, a rezervoárba ültetett katéterezhető kontinens hasfali stoma kialakítása jöhet szóba [47].

Mivel a dolgozatom a húgyhólyag-megnagyobbítást követően fellépő szövődmények – azon belül a szövettani változások – témakörével foglalkozik, ezért a továbbiakban ezeket kívánom részletezni.

I.3. A műtéti húgyhólyag-megnagyobbítás szövődményei

A húgyhólyag megnagyobbítását követően a betegek jelentős részében fordulhat elő valamilyen szövődmény. Ezek a szövődmények kb. 30%-ban tünetek nélkül, lappangó módon alakulnak ki [48, 49]. A fellépő komplikációk sebészi és nem sebészi jellegű szövődményekre oszthatók fel (1. táblázat).

Sebészi szövődmények	Nem sebészi szövődmények– Metabolikus, funkcionális és szövettani változások
<ul style="list-style-type: none">• bél obstrukció• kőképződés a neohólyagban• perforáció• vesicourethralis fistula• vesicoureteralis reflux• stoma komplikációk• haematuria-dysuria szindróma (HDS)	<ul style="list-style-type: none">• húgyúti fertőzések• krónikus hasmenés• elektrolit és sav-bázis elváltozások• csontmetabolizmus zavara• növekedési zavar• vitaminhiányok• húgyhólyag compliance változások• nyákképződés• malignitás

1. táblázat: Húgyhólyag-megnagyobbítást követő sebészi és nem sebészi szövődmények [48].

A szövődmények egyrészt a műtéti technikától, de még inkább a megnagyobbításra felhasznált gastrointestinalis szegmens tulajdonságaitól függenek. Az egyes műtéti típusok előnyeit és hátrányait a 2. táblázat mutatja be.

Minden műtéti eljárás alkalmazása esetén az egyik legsúlyosabb, és patomechanizmusát tekintve legkevésbé ismert szövődmény a malignus elfajulás lehetősége.

Műtét típusa	Előnyök	Hátrányok/Szövődmények
Gasztrocisztoplasztika	<ul style="list-style-type: none"> • Minimális mucin termelődés • Nincs kőképződés • Csökkent infekció hajlam • Vastagabb izomréteg (gyomor>colon>ileum) • Könnyű ureter neoinplantatio • Veseérintettség, rövid bél szindróma. esetén is használható • Jobb spontán ürítési lehetőség • Laparoszko-posan is végezhető 	<ul style="list-style-type: none"> • Heterotopias nyálkahártya • Haematuria Dysuria Syndroma • Hypergastrinaemia • Metabolikus alkalózis • Hypochloroemia, hypokalaemia • Kifejezettebb kontraktilitás (gyomor>colon>ileum) • Spontán fekély/perforatio/ruptura • Helicobacter pylori infectio • GERD kialakulása • Csont demineralisatio • Malignitás
Ileocisztoplasztika	<ul style="list-style-type: none"> • Tágulékonyága a legnagyobb (ileum>>colon) • Könnyen, kellő hosszúságban nyerhető • Jó vérellátású • Jól manipulálható • Mucin képződés kisebb mértékű (colon>>ileum) • Alacsonyabb ritmikus kontraktilitás • Kevésbé súlyos metabolikus komplikációk, mint gyomor vagy colon esetén • Laparoszko-posan is végezhető 	<ul style="list-style-type: none"> • Nehezebb submucosus csatornaképzés, ureter neoinplantatio • Heterotopias nyálkahártya • Infekció hajlam magas • Kőképződésre hajlamosít • Metabolikus acidózis • Hypochloroemia, hyponatraemia • Bélobstrukcióra hajlamosít • B₁₂-vitamin hiány (terminális ileum) • Epesav felszívódás csökken • Hasmenés • Vékonyabb izomréteg • Csont demineralisatio • Malignitás <p>Nem alkalmazható: Rövid bél sy.-ban, IBD-ben, Hasi irradiatio után, Veseérintettség esetén</p>
Kolocisztoplasztika	<ul style="list-style-type: none"> • Könnyen, kellő hosszúságban nyerhető • Jó vérellátású • Nagyobb kaliber miatt rövidebb szakasz is elegendő • Könnyen detubularisálható • Könnyebb ureter neoinplantatio (colon>ileum) 	<ul style="list-style-type: none"> • Heterotopias nyálkahártya • Mucin képződés (colon>>ileum) • Infekció hajlam magas • Kőképződésre hajlamosít • Metabolikus acidózis • Hyperchloroemia, hypernatraemia • Hasmenés (ileocecalis szegmentum) • B₁₂-vitamin hiány (ileocecalis szegmentum) • Kifejezettebb kontraktilitás (colon>>ileum) • Vékonyabb izomréteg • Csont demineralisatio • Malignitás <p>Nem alkalmazható: Rövid bél sy.-ban, IBD-ben, Hasi irradiatio után, Veseérintettség esetén</p>
Ureterocisztoplasztika	<ul style="list-style-type: none"> • Eredeti urothelium – nincs metabolikus eltérés • Intakt bélrendszer 	<ul style="list-style-type: none"> • Kevés betegben, ritkán alkalmazható (Egyoldali, tágult ureter + u.a. oldalon végstádiumban lévő vese pl. VUR miatt nephrectomia történt) • Tágulékonyága kérdéses
Autoaugmentáció	<ul style="list-style-type: none"> • Eredeti urothelium – nincs metabolikus eltérés • Intakt bélrendszer • Extraperitonealis beavatkozás • Enterocisztoplasztika végezhető, ha nem eredményes 	<ul style="list-style-type: none"> • A hólyagkapacitás megnövelésének mértéke és sikeressége bizonytalan • Spontán perforatio / ruptura
Seromuscularis enterocisztoplasztika	<ul style="list-style-type: none"> • Urothelium újraképződése – nincs metabolikus eltérés 	<ul style="list-style-type: none"> • Technikailag nehezen kivitelezhető • Zsugorodási hajlam • Malignitás?
„Tissue engineering”	<ul style="list-style-type: none"> • Eredeti urothelium – nincs metabolikus eltérés • Intakt bélrendszer 	<ul style="list-style-type: none"> • Kivitelezhetőség • Általánosan még nem használt • A hólyagkapacitás megnövelésének mértéke és sikeressége bizonytalan

2. táblázat: Hólyag-megnagyobbítás és -pótlás előnyei és hátrányai a különböző műtéti eljárások esetén.

I.3.1. Húgyhólyag-megnagyobbítás követő szövettani elváltozások

A húgyúti és a gastrointestinalis traktus egyesítéséből fakadó tumorgenezis gyanúja a múlt évszázad második felében merült fel, amikor az uretero-sigmoideostoma képzésen átesett betegekben magasabb számban észleltek malignus elfajulást az uretero-enteralis junctionokban. A 80'-as évek végéig ez a beavatkozás volt az egyik legszélesebb körben alkalmazott kontinens diverzió az egyéb módszerrel vizeletkontinenciát elérni képtelen húgyhólyag exstrophias betegeknel. Az irodalmi adatok igen magas, 42-7000-szeres rizikót becsültek a korcsoport szerinti kontrollhoz képest. A tumorok kialakulási ideje a rekonstrukciós műtétől számítva átlag 21 (6-50) év volt. Fontos megemlíteni, hogy a közlemények egy része a tumoros és más, a húgyhólyagot érintő betegséget (pl. tuberculosus cystitis) követő cystectomiák utáni kontinens diverziós esetekkel is számolt. Ez jelentősen korlátozza a hólyagexstrophia-ra vonatkozatható következtetéseket. A megfigyelt tumorok többsége adenocarcinoma volt és a tumoros elváltozás szinte mindig az uretero-colonicus junctionból indult ki. Napjainkra a malignus elfajulás és az egyéb súlyos metabolikus szövődmények miatt az uretero-sigmoidostoma képzése ezen betegekben teljesen visszaszorult [50-52].

A húgyhólyag műtéti úton történő megnagyobbításának elterjedésével a nyolcvanas és kilencvenes években egyre több közlemény jelent meg, amelyek egy-egy eset kapcsán a malignus transzformáció nagyobb esélyére hívták fel a figyelmet [53-55].

Az angol nyelvű irodalomban napjainkig, a veleszületett hólyagbetegség miatt húgyhólyag-augmentáción átesett betegekben, kb. 30 malignus tumor kialakulásáról találhatunk közlést. A tumorok döntő többsége MMC-s, kisebb hányada hólyagexstrophias és hátsó húgycső billentyűs betegekben alakult ki. A lappangási időt illetően egyetértés van abban, hogy a malignus transzformáció kifejlődéséhez legalább 10 év szükséges (Biardeau et al. – 19 év, Rove et al. - 14 év, Husmann et al. - 39 év). Ha minden közleményt figyelembe veszünk, akkor azt látjuk, hogy 0,25-53 év szükséges a műtéttel összefüggésbe hozható tumorok kialakulásához [56-58]. A TNM stádiumot tekintve csak Husmann és Biardeau munkacsoportja tudott adatokkal szolgálni. Az előbbi 8-ból 6 esetben, utóbbi szerző 34-ből 12 esetben talált előrehaladott stádiumú és az esetek 59%-ában távoli metasztázist is adó rezervoár tumort betegiben [57, 58]. Az augmentált húgyhólyagban kialakult rosszindulatú

elváltozások az alább részletezett feltételezések miatt szokatlanul agresszív viselkedésűek, illetve hamar metasztázist adnak. A betegek túlélése alacsony [57, 59, 60].

A gyomorral, vagy bélel megnagyobbított húgyhólyagban jellemzően adencocarcinoma, illetve tranzicionális sejtes karcinóma alakulhat ki [57]. Egy-egy esetben leiomyosarcoma, karcinoid, kis sejtes karcinóma, illetve laphámkarcinóma is megfigyelésre került [61-63]. Ritkán praecancerosus elváltozást is lehet találni, ami döntően villosus adenoma megjelenését jelenti a bélel vagy gyomorral megnagyobbított húgyhólyagban [64]. A jóindulatú daganatok közül a nephrogén adenoma a leggyakrabban észlelt elváltozás [65]. A tumorok legtöbbször a húgyhólyag és a bél-, vagy gyomor anasztomózisának vonalában alakulnak ki [57].

A szövettani elváltozások és a tumorigenezis hátterében számos okot feltételeznek.

I.3.1.1. A húgyhólyag-megnagyobbítást követő szövettani elváltozások kóroktana

„Nitrózamin” elmélet: Az egyik legkorábbi elmélet szerint a vizeletben levő nitritet a székletben és a bélfalon normálisan is jelen levő baktériumok potenciálisan karcinogén hatású N,N-dimetilnitrosamin vegyületekké alakítják át [66]. Az elmélet megjelenését követően igen korán bizonyították, hogy ez tisztán ebben a formában valószínűleg nem elégséges a tumor kialakulására, azonban mind a mai napig ez az egyik legszélesebb körben ismert és idézett feltételezés [67, 68].

„Krónikus gyulladás” elmélet: A vizelet bélfalra kifejtett hatása, illetve a bélnyáknak vagy a gyomorsavnak az urotheliumra kifejtett irritációja okozta krónikus gyulladós folyamat következtében felszabaduló faktorok az augmentált húgyhólyag epitheliumát érzékenyvé tehetik egyéb karcinogén hatású ágensekre, továbbá fokozhatják a sejtek „kicserélődésének” ciklusát (sejt-turnover) ami ugyancsak elősegíti a karcinogenezist. A tumorok kialakulása során számos, a gyulladós folyamatokban is szerepet játszó mediátor (pl. prostaglandinok, eicosanoidok, cytokinek, COX-2) és oxigén szabadgyök szabadul fel, amik elősegíthetik a malignus átalakulást. Számos in vivo és in vitro kísérlet bizonyította a gyulladás következtében felszabaduló potenciálisan karcinogén anyagok magasabb koncentrációját az entero-vesicalis anasztomózis szintjében [69, 70].

Vizelet „hyper-osmolalis” elmélet (a vizelet toxicus hatása a gastrointestinalis epitheliumra): Dixon és munkatársai in vitro gyomorból és vastagbélből vett sejt kultúrákat vizsgáltak hyper-osmolalis környezetben, ahol ezeknek a sejteknek a DNS sérülésre adott válaszait elégtelennek ítélték. Ugyanezen kísérletet húgyhólyagból nyert sejtekkel is elvégezve a szerzők már nem figyelték meg ezt a változást [71].

„Sejt-sejt interakció” elmélet: A szervezet egyes részein jól ismert, hogy a különböző típusú hámok találkozásánál nagyobb eséllyel alakul ki tumoros elváltozás [72]. Li és munkatársai azt feltételezték, hogy az entero-vesicalis anasztomózis vonalban levő sejtek mind az urothelialis, mind az enteralis irányba történő differenciációra kapnak sejt-szignálokat. Az eredményeik alapján azt találták, hogy az intestinalis stroma az urothelium glandularis epithelium irányában történő differenciációját idézte elő [73]. Egy másik kutatócsoport molekuláris biológiai módszerekkel igazolta, hogy az anasztomózis vonalhoz közelebbi urothelium sejtek nagyobb mértékű genetikai instabilitást mutatnak a távolabb eső sejtekhez képest [74]. Hamid és munkatársai szerint a húgyhólyag megnagyobbítása esetén sokkal kifejezettebb a bélen a krónikus gyulladás és a villus atrófia, mint hólyag pótlás esetén. Ez szintén az urothelium potencírozó hatását veti fel [75].

„Szubmikroszkopikus” változások: A megnagyobbított húgyhólyagban végbemenő szubmikroszkopikus, molekuláris biológiai és genetikai változások kevésbé vizsgáltak. Sung és munkatársai 4, korábban hólyagmegnagyobbításon átesett betegben 17-21 év után kialakult tumort tanulmányoztak. A diagnóziskor megjelenő tünetek a haematuria, a visszatérő vizeletfertőzések és a hólyagnyaki kontrakciók voltak. Mind a négy betegben high-grade urothelialis karcinóma alakult ki, amik szokatlanul agresszív klinikai lefolyást mutattak. A diagnózistól számítva egy éven belül valamennyi beteg elhunyt. A tumorok mikroszkópos megjelenése rendkívül sokszínű volt, azaz a szokványos papillaris urothelialis karcinóma megjelenés mellett teljesen kevert differenciációt mutató glanduláris, laphámsejtes, fészkesen vagy tubulosus formában elhelyezkedő sejteket is találtak. Az immunhisztokémiai és a molekuláris vizsgálataik minden esetben β -catenin overexpressziót mutattak ki. A négy esetből csak egyben találtak FGFR3, illetve p53 mutációt. A vizsgált gének közül a 3, 7, 17 kromoszómák overexpresszióját és 9p21 kromoszóma delécióját látták [60]. Appanna és munkatársai augmentáción átesett betegek hólyagtumoros mintáit, illetve augmentált húgyhólyagból biopsziás úton nyert mintákat vizsgáltak és hasonlítottak össze. Összességében

azt találták, hogy az anasztomózis vonalhoz közelebbi urothelium sejtek – a tumoros és a tumormentes mintákban egyaránt – genetikailag instabilabbnak mutatkoztak (2q, 5q, 10p, 21pq amplifikáció és 5p, 16p deléción) az anasztomózis vonaltól távolabb eső hólyagnyálkahártyához képest [74]. Ivi és munkatársai is támogatták ezen utóbbi megfigyeléseket [76]. Munkacsoportunk korábban az urotheliumra és a vastagbélre jellemző sejtfelszíni mucin glikoproteineket vizsgálta a malignus elfajulások korai előrejelzése céljából. Kolocisztoplastikát követően, a húgyhólyag-megnagyobbításra használt vastagbél nyálkahártyáján idővel a normálisan jelenlevő MUC-2 fehérje expressziójában csökkenés, míg az urotheliumra inkább jellemző MUC-1 expressziójában pedig növekedés volt megfigyelhető [77].

1.3.1.2. A húgyhólyag-megnagyobbítást követően kialakult tumorok előfordulása és rizikó tényezői

Előfordulás: A pontos incidencia becslése a húgyhólyag-megnagyobbítást követően kialakuló tumorok rendkívül kis száma miatt nehéz. A megjelent közleményeket figyelembe véve a megnagyobbításra használt bélszakasztól függetlenül vett előfordulás 1-12% [57, 78, 79].

A húgyhólyag-megnagyobbító műtét típusa: Douglas A. Husmann 2009-ben egy tanulmányában külön-külön vizsgálta, hogy az augmentált hólyag egyes alkotóelemeinek a normális és augmentátumként használt lokalizációjukban az élet 6. évtizedére mekkora rizikója van malignus elfajulásra. Az akkor ismert adatok alapján kolocisztoplastikát és ileocisztoplastikát követően évtizedenként 1,5%-os, gasztrocisztoplastika esetén 2,8%-os rizikónövekedéssel számolt. Az összefoglaló közlemény alapján a megnagyobbításra használt vastagbél esetén az élet 6. évtizedére így 5-6%-os rizikóval lehet számolni. Mivel a felnőtt populációban a colon adenocarcinoma rizikója gyakorlatilag ugyanennyi, így Husmann szerint ezen műtégi típus alkalmazása a malignitás szempontjából nem képez a normálisnál nagyobb rizikót. Ugyanezt a vékonybél esetén megvizsgálva a normális populációhoz képest 40-50-szeres rizikót, gyomor esetén pedig 30-40-szeres rizikót becsült. A szerző a húgyhólyagra nézve azonban nem tudott ilyen előfordulást számolni. A szerző, a diszfunkcionálisan működő húgyhólyag alapvető hajlamát a tumor kialakulására számszerűen nem tudta megbecsülni

[79]. Gasztrocisztoplasztikával kapcsolatban a legutóbbi átfogó közleményt Boissier és munkatársai közölték. Tizenegy betegükből háromnál alakult ki malignus tumor az augmentációt követően. Az irodalmi áttekintésük alapján, a tumor kialakulásra nézve, a gasztrocisztoplasztikát önálló rizikó faktornak tekintik [80].

Veleszületett hajlam diszfunkcionális húgyhólyag esetén: Higuchi és munkatársai 153 húgyhólyag-megnagyobbításon átesett beteg adatait hasonlították össze ugyanolyan számú, kor szerint megegyező, de húgyhólyag-megnagyobbító műtéten át nem esett húgyhólyag működési zavarral küzdő betegével. A tumor kialakulásának kockázata a két csoport között nem különbözött. Ez arra engedte következtetni őket, hogy a veleszületett húgyhólyag működési zavar (neuropathiás hólyagműködési zavar, exstrophia vesicae urinariae, hátsó húgycső billentyű) önmagában is rizikót jelent a tumorok kialakulására nézve [81]. Barrington és munkatársai augmentáción átesett és anélkül élő neuropathiás húgyhólyagú betegeket vizsgáltak és hasonlítottak össze normális húgyhólyag működésű emberekkel. Úgy találták, hogy a normális populációhoz képest a neuropathiás hólyaggal született betegekben a szérum antioxidáns szint alacsonyabb az augmentáció elvégzésétől függetlenül [81, 82]. Az 1950-es évektől jól ismert, hogy húgyhólyag exstrophia esetén a húgyhólyag nyálkahártyán megjelenő tumor kialakulásának a kockázata magasabb. A „nyitott” húgyhólyag nyálkahártyája (exstrophia) a megszületést követően ún. glandularis metaplázián esik át. Ez a jelenség önmagában talajául szolgálhat az adenocarcinoma későbbi megjelenésének, különösen a diverzió nélkül hagyott és nem zárt húgyhólyagok esetében [83]. Az esetek másik részében, a sokáig végzett ureterosigmoideostomiák miatt, szintén magasabb tumor rizikót találtak a hólyagexstrophias betegeknél. A korai húgyhólyag rekonstrukciók, az újabb típusú diverziók, illetve a béllal helyettesített húgyhólyagok elterjedésével ezek a kockázati csoportok megszűntek. Az újszülött- és csecsemőkori húgyhólyagzáró műtétek során észlelt pseudopolypok formájában megjelenő glandularis cystitis egyes szerzők szerint továbbra is szignifikáns tényezőként merül fel a tumorok kialakulásában. Ezen utóbbi állítást más kutatócsoportok azonban cáfolják [84-86].

Vizelet fertőzések (UTI): A patogenezisben ismertetett nitrosamin elmélet alapján felmerült, hogy a tumorok kialakulásában a krónikus húgyúti fertőzéseknek is szerepe lehet [53]. Vékony-, vagy vastagbél-szegmentummal történt húgyhólyag-megnagyobbítást követően a vizeletfertőzések gyakorisága magas, amiben a bél által termelt nyák, az alkalikus

vizelet pH, illetve a bélnyálkahártya kedvező mikrokörnyezete is szerepel hajlamosító tényezőként [87, 88]. Gyomorral történő augmentációt követően a gyomorsav okozta savanyúbb pH „védő hatású” a fertőzésekkel szemben [89]. A krónikus bakteriuria jól ismert jelenség az augmentáción átesett, illetve az önkátéterező betegeknél. A korábban standard módon használt antibiotikus profilaxis egyre kevésbé tűnik hatásosnak a bakteriuria szanálását illetően. Mind a tünetekkel járó, mind a tünetmentes vizeletfertőzésekkel szemben a megfelelő gyakoriságú (min. napi 4 alkalommal történő) önkátéterezés és a fiziológiás sóval (naponta legalább 240 ml-el) történő hólyagöblítés tűnik a legeredményesebbnek [90, 91]. Az augmentációt követően a betegek 45-85%-ában alakul ki visszatérő bakteriuria, azonban csak kevesebb, mint 20%-ában kell tünettel járó UTI-al számolni [87, 88, 90]. Ha a tünetekkel járó krónikus vizeletfertőzés gyakorisága növekszik, akkor a bakteriuria hátterében valamilyen okot (kövesség, tumor) keresni kell [92]. A neuropathiás hólyagműködési zavarral küzdő betegekben a „tünetmentesség” tárgyalása nehéz feladat, hiszen a szenzoros funkciók kiesése miatt a dysuria esetükben nem észlelhető tünet. A tünetekkel járó vizeletfertőzés ebben a betegcsoportban a következőképpen határozható meg: pozitív vizelet leoltás (10^5 cfu/ml $<$) és az alábbiak közül legalább egy további tünet – 38,5 °C feletti láz, két napnál tovább tartó rossz közérzet vagy levertség, alhasi-medencei vagy húgyhólyagtáji fájdalom, bűzös, zavaros vizelet (ami nem tisztul fel 72 órán túl) és/vagy újkeletű vizeletinkontinencia – jelenléte [92, 93]. Husmann és munkatársai a 153 vékony- vagy vastagbéllel végzett húgyhólyag-megnagyobbításon átesett beteg vizsgálata során nem találtak szignifikáns különbséget a tumoros és nem tumoros betegek tünettel járó vagy tünetmentes vizeletfertőzéseinek gyakorisága között [92]. A microbiom változásainak tumorgenezisben betöltött szerepét az utóbbi időben egyre fontosabb tényezőként valószínűsítik. Egy újabb kutatás alapján, ami augmentáción átesett betegeket is vizsgált, a neuropathiás húgyhólyag működési zavarban szenvedő betegek hólyag microbiomja nem mutatott szignifikáns különbséget tünetes vagy tünetmentes bakteriuria esetén, illetve steril vizelet esetén sem [94]. Augmentációt követően a húgyhólyag és az augmentációra használt gastrointestinalis szegmens mikrokörnyezetében bekövetkezett változásokkal kapcsolatos átfogó vizsgálat még várat magára. Kutatócsoportunk nemrégiben publikált közleményében a megnagyobbított húgyhólyag, illetve a megnagyobbításra használt vastagbél vagy vékonybél microbiomjának változásait vizsgálta. A húgyhólyag és bél microbiomja között azonban nem találtunk lényeges különbséget [95].

Hólyagkövesség: Húgyhólyag-megnagyobbítást követően a bél által termelt nyák nem csak a vizelet bakteriális kolonizációjának, hanem ezzel együtt a kőképződésnek is kedvez. A bélhám vizelettel történő folyamatos kapcsolata miatt további, a kőképződésnek kedvező metabolikus eltérés jöhet létre. Augmentációt követően a betegek kb. 40-50%-ban alakulnak ki hólyagkövek [91, 96]. A kőképződés kolocisztoplasztika után a leggyakoribb. Gyomorral történt augmentáció után a vizelet savas kémhatása mind a bakteriális kolonizációt, mind a kőképződést gátolja, ezért ebben az esetben a hólyagkő kialakulása ritka jelenség. A kőképződést a húgyhólyag-megnagyobbításra használt gastrointestinalis szegmens fajtáján kívül a katéterezések és a hólyagöblítések gyakorisága, illetve a katéterezés útja (Mitrofanoff appendicostoma esetén 10x nagyobb a rizikó a per urethram katéterezéshez képest) is befolyásolja. A tumorok kialakulásával a kövek okaként és következményeként fenntartott krónikus vizeletfertőzést, illetve a mechanikai irritációt hozzák kapcsolatba, habár az eddig ismert klinikai vizsgálatok alapján a kő önmagában, mint rizikófaktor nem valószínű [57, 81].

Immunszuppresszió: A húgyhólyag-megnagyobbításon átesett betegek egy részénél a korábbi VUR talaján létrejött progresszív reflux nephropathia okozta krónikus veseelégtelenség miatt vesetranszplantációra lehet szükség. A vesetranszplantációt követő immunszuppresszió és az ehhez köthető onkogén vírusfertőzés (EBV, CMV), illetve elégtelen szupresszor-T sejt funkció hajlamosító tényezőként szerepelhetnek a hólyagtumor kialakulására nézve. A megjelent tumorok rapidan progrediálnak, kevésbé differenciáltak, korán metasztázist adnak és a mortalitásuk magas. Húgyhólyag-megnagyobbítás, immunszuppresszió és korábban igazolt EBV vagy CMV fertőzés együttes fennállása esetén különösképpen fel kell hívni a beteg figyelmét a tumor kialakulásának lehetőségére, illetve ennek tüneteire [92, 97].

Környezeti faktorok: A környezeti tényezőknek bármilyen tumor kialakulásában jól ismert szerepük van. Az életkor előrehaladtával mind a vastagbél, a gyomor és a húgyhólyag tumorok kialakulásának esélye szignifikánsan megnő. A dohányzás, az excesszív alkoholfogyasztás, illetve a rossz szociális körülmények ezeket csak tovább súlyosbíthatják. Ezek a tényezők, bár kevésbé vizsgáltak, de fontosak lehetnek az augmentációt követően kialakult rosszindulatú folyamatok kialakulásában. Eddig két munkacsoport figyelt meg összefüggést a dohányzás és az augmentált hólyagban kialakult urothelialis karcinóma kialakulása között [55, 92].

I.3.2. A húgyhólyag-megnagyobbításon átesett betegek nyomonkövetése

Az előbbiekből következik, hogy a tumorképződés egy ritka, ám annál jelentősebb szövődménye lehet a húgyhólyag-megnagyobbító műtéteknek. A malignus elfajulás leggyakrabban azonban csak lassan, évek, sőt akár évtizedek múltán jelentkezik és a tumorok általában későn, már előrehaladott stádiumban kerülnek diagnózisra. A tumoros és az egyéb, lappangva kialakuló szövődmények miatt az augmentáción átesett betegek hosszú távú nyomon követése elengedhetetlen. Napjainkra sem született olyan, nemzetközileg elfogadott nyomonkövetési protokoll a tumorok időben történő felismerésére, ami multicentrikus vizsgálatot vagy metaanalízist lehetővé tenne.

Egy tumoros betegség hatékony szűréséhez az alábbi kritériumoknak kell teljesülnie [78]:

1) A tumornak magas előfordulási aránnyal kell rendelkeznie a vizsgált betegcsoportban;

A veleszületett húgyhólyag betegséggel küzdő betegek (eredendően) magasabb rizikót hordoznak a hólyagtumor kialakulására. A húgyhólyag tumorok incidenciája azonban még mindig sokkal alacsonyabb, mint bármely más urológiai probléma, ami később e betegcsoportban felmerülhet.

2) Kezeletlen esetben a tumornak magas morbiditásúnak és mortalitásúnak kell lennie;

3) A tumor már a kezdeti stádiumban is legyen kellően magas prevalenciájú, illetve a tumor a két szűrés között ne progridáljon előrehaladott stádiumig;

Az augmentált hólyagban kialakult tumorok ennek éppen ellenkezőjét mutatják, hiszen az előfordulásuk alacsony és szinte mindig előrehaladott stádiumban jelentkeznek.

4) A szűrővizsgálatnak a tumort olyan kezdeti stádiumban kellene felismernie, hogy a felismerés pillanatában indított kezelés jó prognózist biztosítson a beteg számára;

Mind a mai napig nem bizonyított, hogy az augmentált hólyagban kialakult tumorok miatt végzett teljes hólyageltávolítás (cystectomy) kedvezőbb mortalitást vagy morbiditást jelentene (mint önmagában a tumor lefolyása);

5) A szűrővizsgálatnak biztonságosnak, olcsónak, megbízhatónak, reprodukálhatónak, illetve magas specificitásúnak és szenzitivitásúnak kell lennie.

A tumorok időben történő felismerésére számos munkacsoport fogalmazott már meg javaslatokat. Az egyébként végzett „szoros” nyomonkövetésen túl az augmentációt követően 5-10 évvel kezdődően szűrő jellegű képkotó vizsgálatokra, vizelet citológiára, illetve cystoscopiára (biopsziával vagy a nélkül) van szükség [53, 55, 92, 98, 99].

Vizelet citológia: Augmentációt követően a citológia eredménye rendkívül nehezen értelmezhető. A krónikus pyuria, az önkatetrizés és az enteralis epitheliáról leváló hámsejtek műtermékeket okoznak. Higuchi és munkatársai tárgyalták elsőként, hogy az augmentáció önmagában szinte lehetetlenné teszi a citológia értékelését [49]. Buson és munkatársai állatkísérletes modellen vizsgálták a citológia hatékonyságát. A hólyagtumoros állatok vizeletének citológiai vizsgálata minden esetben negatív eredményt adott [100].

Vizeletből végzett molekuláris vizsgálatok: Ivil és munkatársai endoscopos úton nyert felszíni urothelium sejteket vizsgálták FISH módszerrel [76]. A szerzők az urothelialis karcinómához hasonló genetikai instabilitásokat és eltéréseket találtak. Docimo és munkatársai PCR alapú micorsatellita analízist végeztek egy korábban húgyhólyag-augmentáción átesett beteg vizelet-, és vérmintáin, akinek adenocarcinoma alakult ki a húgyhólyagjában. A normális kontrollhoz képest klonális abnormalitásokat találtak [101]. Az említett módszerekkel még nem végeztek átfogó állatkísérletes vagy klinikai vizsgálatokat, illetve elérhetőségük a klinikai gyakorlatban korlátozott.

Képkotó vizsgálatok: Átfogó vizsgálat ezek értékelésére nem készült. Egy-egy esetben úgy derült fény időben a malignitásra, hogy egyéb tünet nélküli, újkeletű hydronephrosist okozott. A húgyutak rendszeres ultrahangos nyomonkövetése kiemelt jelentőséggel bír a húgyhólyag-augmentációt követően, nem csak a hólyagban megjelenő neoplasia felismerése, hanem az indirekt eltérések keresése céljából is [98, 102].

Cisztoszkópia (biopsziával vagy anélkül): A nem augmentált hólyagban a cisztoszkópia mind a mai napig az alapmódszer a hólyagtumorok diagnosztikájában és nyomonkövetésében, közel 90%-os szenzitivitással rendelkezik [103]. A 90-es évektől kezdődően, egészen a 2000-es évek végéig az augmentált hólyagban kialakuló tumorok magas malignitása miatt számos munkacsoport ajánlotta az augmentáción átesett betegek cisztoszkópos szűrését évente vagy kétévente a posztoperatív 10. évtől kezdődően. Egyesek, köztük saját munkacsoportunk is a szkópián túl a megnagyobbított húgyhólyag nyálkahártyájából, különösképpen az anasztomózis vonalból rendszeres biopsziás mintavételt javasoltak [53, 55, 104, 105]. Az

elmúlt tíz évben azonban néhány nagyobb esetszámú összefoglaló közlemény jelent meg a cisztoszkópos szűrés alacsony érzékenységről és hatásfokáról, ami a centrumok alkalmazott protokolljának felülvizsgálatát tette szükségessé [49, 75, 106].

A Pécsi Gyermekgyógyászati Klinika Sebészeti osztálya a veleszületett húgyhólyag működési zavarban szenvedő (hólyagexstrophia, MMC miatti neuropathiás hólyag) gyermekek ellátásának országos központja. Gyermekkori hólyagmagnagyobbító műtét az országban egyedül klinikánkon történik. A műtéteket követő rövid-, közép- és hosszú távú komplikációk nyomonkövetését, a betegek gondozását is osztályunk végzi. Mivel a betegek tranzíciója a felnőtt ellátásba sokszor késik, vagy területi okok miatt elmarad, ezért sok esetben gondozásukat felnőttkorban is folytatjuk. A húgyhólyag-magnagyobbító vagy -pótló műtétet követően a betegek 3, 6 hónappal, a negyedik évig évente, majd ettől kezdve két évente jönnek vissza protokoll szerinti állapotfelmérésre. Az állapotfelmérések magukba foglalják a húgyutak anatómiai és funkcionális állapotának felmérését, vizelet leoltást, esetleges kövesség keresését és a beteg metabolikus státuszának a vizsgálatát. A posztoperatív 4. évtől kezdődően a fenti vizsgálatok cisztoszkópiával és biopsziás mintavétellel egészülnek ki (*1. melléklet*). A mintavételek az eredeti húgyhólyagból, a magnagyobbításra használt bélből vagy gyomorból, illetve a kettő közötti anasztomózis vonalból történnek [48].

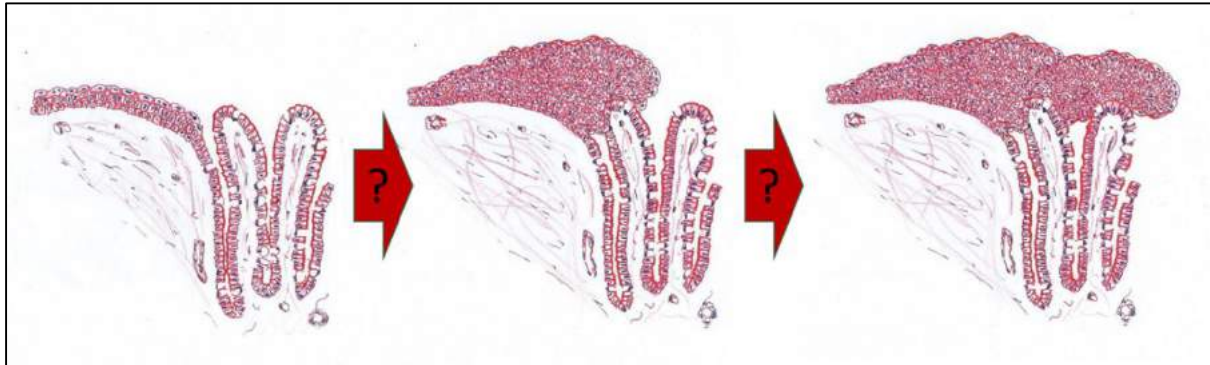
A pécsi gyermeksebészet munkacsoportja 2002-ben publikálta első eredményeit a húgyhólyag-augmentációt követően észlelt szövettani elváltozásokról, illetve ennek a vizeletfertőzésekkel és hólyagkövességgel való kapcsolatáról. A szerzők összesen harmincöt (20 kolicisztoplastikán és 15 gasztrocisztoplastikán átesett) beteget vizsgáltak. A szövettani mintavételek során metaplasztikus elváltozásokat, hegesedést, krónikus gastritist és egy esetben diszplasztikus elváltozásokat találtak. Szignifikáns összefüggés volt kimutatható a bakteriuria gyakorisága és a szövettani elváltozás típusa között kolicisztoplastika után. A kövesség gyakorisága egyik műtéti típus esetén se mutatott kapcsolatot a szövettani elváltozással. A munkacsoport a 2000-es évek elejétől a rendszeres cisztoszkópos (biopsziás mintavétellel járó) nyomonkövetés mellett foglalt állást [107].

I.3.3 Állatkísérletes modellek a húgyhólyag megnagyobbítását követően kialakuló szövettani elváltozások vizsgálatára

A klinikai vizsgálatok, főként, amelyek invazív beavatkozással járnak, számos ok miatt nehezen kivitelezhetők. A húgyhólyag-augmentációval kapcsolatos humán tumorkutatást tovább nehezíti a tumorok ritka előfordulása, illetve a kialakuláshoz szükséges hosszú idő. A húgyhólyag-megnagyobbító műtétet követő tumorgenezis és egyéb szövődmények (pl. kövesség, metabolikus szövődmények) alaposabb megértéshez, illetve az újabb műtéti technikák kidolgozásához számos állatkísérletes modell született az elmúlt három évtizedben. Az irodalomban kutyaival, nyulakkal, egerekkel, malacokkal és patkányokkal végzett kísérletekről is találunk közlést [108-112]. Munkacsoportunk korábban kutyaival, majd nyulakon végzett állatkísérletekben vizsgálta az augmentáció szövődményeit [113, 114]. A nagyobb testméretű és hosszabb életű laborállatok gondozása egy részről drágább és nehezebb, más részről a szövettani változások kialakulásához sok időre van szükség. A szövettani minták feldolgozásánál a nagy méret szintén hátrányos, ha az egész mintát (a teljes húgyhólyagot) át szeretnénk vizsgálni. Mindezen okokból a hólyagmagnagyobbító műtét szövődményeinek vizsgálatára a legelterjedtebb a patkány modell lett. A kisállat és tartása viszonylag olcsó, a műtéti megterhelést a patkányok jól viselik és a beavatkozást könnyű kivitelezni. A szövődmények időben viszonylag hamar vizsgálhatók, hiszen az állatok életciklusa (2-3 év) alatt nagy valószínűséggel alakulhatnak ki tumorok. A szövettani feldolgozás technikailag könnyű és szükség szerint K.O. (knock-out) mutáns állatok is elérhetők a szubmikroszkópos elváltozások vizsgálatára.

A 90-es évektől kezdve számos közlemény jelent meg patkányokban végzett húgyhólyag megnagyobbításról, döntően ileocisztoplastikáról [100, 108, 115-123]. A hisztopatológiai vizsgálatok többnyire tranzicionális sejtes karcinómát, laphám-metapláziát és hiperplastikus papillaris laesiokat írtak le. Ezek az elváltozások szinte kivétel nélkül az anasztomózis vonalából indultak ki [100, 115, 116]. Több kutatócsoport is megfigyelte, hogy patkányban a hólyag megnagyobbítására használt ileum nyálkahártyáján urothelium jelenik meg, hasonlóan a mucosa-fosztott béllel történő hólyagmagnagyobbítást (seromuscularis enterocystoplastica) követő urothelizációhoz [117]. Ezt a jelenséget egyes szerzők az urothelium bélhámra történő „rákúszásának”, migrációjának, mások a hiperplastikus urothelium „bélhámra borulásának” tulajdonítják (5. ábra) [108, 116].

Mind a mai napig nem ismert, hogy ez az urothelizációs jelenség állatokban végzett húgyhólyag-megnagyobbítást követően milyen módon és milyen mintázatot követve jön létre [116, 118, 119]. Megfigyelték továbbá a bélbolyhok atrófiáját is a junkcionális zónától távolabbi területeken. Ez szintén egyfajta hám átalakulási folyamatra engedte a szerzőket következtetni [108, 116]. A közleményekben az állatok nyomkövetési ideje az egy évet többnyire nem érte el, és a szerzők nem az urothelizációs jelenségre helyezték a hangsúlyt [116, 118].



5. ábra: Az urothelizáció feltételezett jelensége patkányban (sémás rajz).

A humán vizsgálatok ilyen jellegű morfológiai vizsgálatra nem alkalmasak. Az augmentációra felhasznált bélhám morfológiai elváltozásaira egyes munkacsoportok biopsziás mintavételeinek elemzéséből történtek következtetések [124]. Klinikánk kutatócsoportja egy korábbi klinikai vizsgálat során talált arra utaló molekuláris változásokat, hogy a megnagyobbításra használt bél hámjának az expressziós mintázata megváltozik, mely az állatokban megfigyeltékhez hasonló jelenség lehet [77].

II. Célkitűzések

Kutatásunk kérdésfeltevéseire klinikai vizsgálatokkal és állatokban történő kísérletekkel próbáltunk válaszokat keresni:

A.) Vizsgáltuk, hogy a Pécsi Gyermekgyógyászati Klinika, Sebészeti osztályán használt (2001-ben felállított, majd 2009-ben átdolgozott) nyomkövetési protokoll alkalmas-e a húgyhólyag-megnagyobbító műtéttel összefüggésbe hozható tumorok időben történő felismerésére.

Az alábbi kérdésekre kerestük a válaszokat:

- 1.) Kialakult-e tumor kolocisztoplastikán (CCP) és gasztrocisztoplastikán (GCP) átesett betegen az elmúlt 16 évben (2002-2018 között)?*
- 2.) A felhasznált gastrointestinalis szegmens, vagy az alapbetegség (MMC és húgyhólyag exstrophia) mutat-e kapcsolatot a szövettani elváltozásokkal?*
- 3.) Van-e változás a húgyúti fertőzések és a kövek gyakoriságában a korábbi, 2002-ben végzett vizsgálatok során találtakhoz képest?*
- 4.) Van-e különbség a húgyúti fertőzések és a kövesség gyakoriságában a felhasznált gastrointestinalis szegmens, illetve az alapbetegség tekintetében?*
- 5.) A húgyúti fertőzések gyakorisága korrelál-e a szövettani leletekkel?*
- 6.) A biopsziás mintavétel (és a cisztoszkópia önmagában) alkalmas módszer-e a szövettani elváltozások kimutatására, illetve a vizsgálat segít-e a tumor kialakulásának előrejelzésében?*

B.) A humán vizsgálatokkal párhuzamosan fontosnak tartottuk egy olyan állatkísérletes modell létrehozását, ami alkalmas a húgyhólyag-megnagyobbítást követő szövettani elváltozások (állati léptékben) hosszútávú vizsgálatára. A módszer kidolgozása során további célunk volt, hogy az állatkísérlet alkalmas legyen az urothelizációs jelenség alaposabb megfigyelésére is.

III. Minták és Módszerek

III.1. Klinikai vizsgálatok

A jelenleg alkalmazott klinikai nyomonkövetési protokollunk felülvizsgálatához a bevezetőben említett, 2002-ben felmért, egyúttal a legrégebben operált betegeinket kívántuk újra megvizsgálni. Az akkori felmérés a szövettani elváltozások mellett a vizelet fertőzések és a kövesség szövettani elváltozásokkal való kapcsolatát is vizsgálta. A 2002-ben közölt vizsgálatunkban szereplő, 1988 és 2000 között húgyhólyag-megnagyobbító műtéten átesett 35 beteget vettük be jelen klinikai vizsgálatunkba is. Húsz betegben vastagbéllel (kolocisztoplasztika – CCP csoport), 15 betegben pedig gyomorral (gasztracisztoplasztika – GCP csoport) történt a húgyhólyag megnagyobbítása [107]. A korábbi protokollunknak megfelelően a biopsziás mintavételek a húgyhólyag-megnagyobbító műtét során, illetve a negyedik posztaugmentációs évtől kezdve két évente történtek. Két-két nyálkahártya mintát vettünk az eredeti húgyhólyagból, a megnagyobbításra használt gastrointestinalis szegmensből és a kettő közötti anasztomózis vonalból. A mintavételek cisztoszkópos úton vagy pl. kőeltávolítás esetén nyílt úton történtek. A mintákból készült preparátumokat standard hematoxin-eozin (HE) festéssel patológus vizsgálta. A mintavételekbe a szülők vagy a gondozók, illetve a betegek írásos beleegyezésüket adták. A klinikai vizsgálat etikai engedély birtokában történt (3043/2007).

Azok a betegek, akik egyetlen állapotfelmérésen se jelentek meg, telefonon lettek kikérdezve tumoros betegség irányában, de az ismételt vizsgálat(ok)ba nem kerültek beválogatásra.

A szövettani vizsgálattal párhuzamosan a tünetes vagy tünetmentes szignifikáns bakteriuria ($>10^5$ cfu/ml), illetve a hólyagkövesség is feljegyzésre került.

Az adatok leíró jellegű elemzésén túl az alábbi statisztikai tesztek alkalmaztuk a célkitűzésben felsorolt kérdéseket sorban véve:

1.) Kialakult-e tumor kolocisztoplasztikán (CCP) és gasztrocisztoplasztikán (GCP) átesett betegben az elmúlt 16 évben (2002 és 2018 között)? ; 2.) A felhasznált gastrointestinalis szegmens, vagy az alapbetegség (MMC és húgyhólyag exstrophia) mutat-e kapcsolatot a szövettani elváltozással?

A CCP és GCP csoportok közötti szövettani elváltozások összehasonlítására khi-négyzet próbát alkalmaztunk. Tekintve, hogy a CCP csoporton belül az MMC-s és a húgyhólyag exstrophias betegek aránya közel egyenlő volt, a két etiológiai csoport összehasonlítását is hasonló módon végeztük el a szövettani elváltozások tekintetében.

3.) Van-e változás a húgyúti fertőzések és a kövek gyakoriságában a korábbi, 2002-ben végzett vizsgálatok során találtakhoz képest?

A CCP és GCP csoportokon belül a pozitív vizelet leoltások gyakoriságának 2002-es eredményeit a jelenlegi eredményekkel Wilcoxon-próbával hasonlítottuk össze. A kőképződés tekintetében – az adatok természetéből fakadóan – csak leíró elemzés történt.

4.) Van-e különbség a húgyúti fertőzések és a kövesség gyakoriságában a felhasznált gastrointestinalis szegmens, illetve az alapbetegség tekintetében?

A pozitív vizelet leoltások gyakoriságában levő különbséget a CCP és a GCP csoportok között, illetve a CCP csoporton belül az MMC-s és a húgyhólyag exstrophias betegek között Mann-Whitney-próbával vizsgáltuk. A kőképződést e tekintetben is leíróan elemeztük.

5.) A húgyúti fertőzések gyakorisága korrelál-e a szövettani leletekkel?

A szövettani elváltozások és a pozitív vizelet leoltások gyakorisága közötti kapcsolatot a csoportokon belül khi-négyzet próbával vizsgáltuk.

A statisztikai elemzéshez az IBM SPSS Statistics szoftver 25-s verzióját használtuk. Az eredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt.

III.2. Állatkísérletek

Az állatkísérletek a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Állatkísérletes Laboratóriumának műtőjében, állatkísérleti engedély (BA02/2000-15/2012) birtokában zajlottak.

Vizsgálatainkat 45, 3-5 hónapos, 200-400 gramm súlyú, hím Wistar patkányon végeztük. Harminc patkányban vékonybél-szegmentum felhasználásával ileocisztoplasztika, míg 15 patkányban álműtét (sham operation), hólyagmegnyitás (sectio alta) történt.

A műtétek előtt az állatok 24 óráig csak folyadékot fogyaszthattak annak érdekében, hogy a gastrointestinalis traktust kiürítsük. Az altatás intraperitonealis diazepammal (Seduxen, dózis: 10 mg/kg) és ketaminnal (Calypsol, dózis: 50 mg/kg) történt. A két szert egymás után 10 perccel adtuk be. Minden műtétet perioperatív, három napon át, intramuscularisan adott antibiotikus védelemben (cefuroxim - Zinacef, dózis: 50 mg/kg) végeztünk.

A műtéteket hagyományos és mikrosebészeti eszközökkel végeztük. A bél-bél és bél-hólyag anasztomózis elkészítéséhez 3,5-szeres lupe nagyítást használtunk.

III.2.1. Ileocisztoplasztika (ICP) – 30 patkányban

A műtéti technika kivitelezésében a Burgu és munkatársai által kidolgozott módszer leírása, valamint a szerzővel történt többszöri személyes egyeztetés szolgált alapul [122].

Az állat hasának leborotválását és lemosását követő median laparotomia után felkerestük a húgyhólyagot, melybe tartóöltéseket helyeztünk (6.A. ábra).

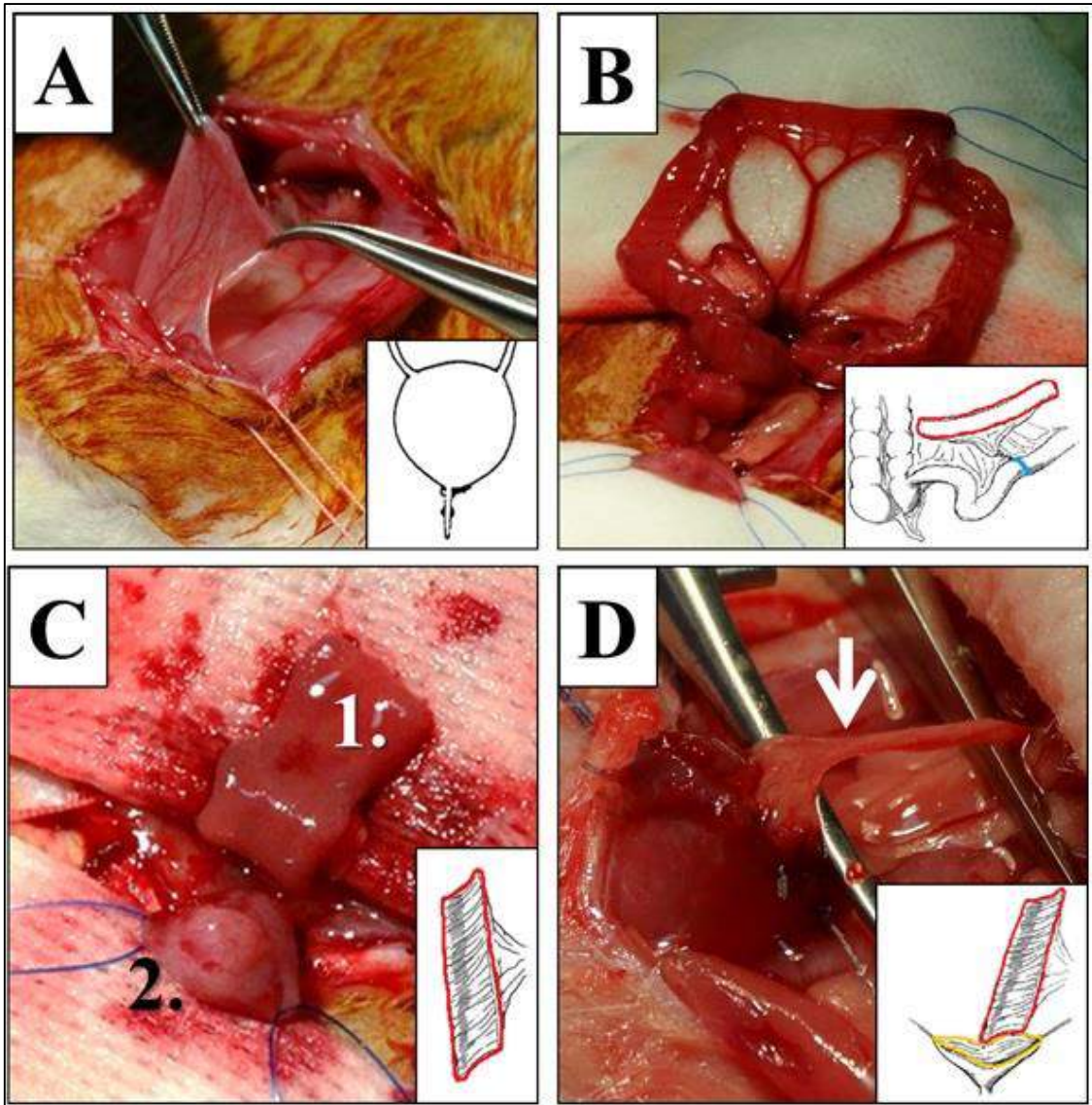
A vékonybélen egy megfelelő hosszúságú érnnyéllel rendelkező, kb. 15 mm hosszúságú szegmenst kerestünk fel (6.B. ábra). Ezt követően a kiválasztott vékonybélszakaszhoz tartozó érnnyelet óvatosan szkeletizáltuk, majd a bélszegmenst orális és aborális végén átvágva iktattuk ki a béltraktusból. Az ileum folyamatosságát a szabad bélvégek end-to-end anasztomózisával, egy rétegű csomós öltésekkel állítottuk helyre, melyhez 6/0-s sodrott, felszívódó fonalat használtunk. A kirekesztett ileumszakaszt anti-mesenteriallyan felhasítottuk (detubularizáltuk) és nyálkahártyáját fiziológias sóval mechanikusan tisztítottuk. Ezt követően a húgyhólyagot mediansagittális síkban megnyitottuk. A húgyhólyagot, valamint az

augmentációra előkészített és 90 fokkal elforgatott ileum szegmentumot egy rétegű, felszívódó, tovaftó varratsorral egyesítettük, 6/0-s felszívódó fonállal. Előbb a húgyhólyag hátsó falán, majd az elülsőn készítettük el az anasztomózist (6.C. és D. ábra).

A műtét alatt a szervek kiszáradásának és az állat hypothermiájának megelőzése céljából többször testmeleg fiziológiás sócsepegtettünk a hasúri szervekre. A vékonybél-szegmentummal megnagyobbított húgyhólyag létrehozása után a hasüreget meleg fiziológiás sóoldattal átöblítettük és a hasfalat két rétegben, tovaftó varratsorral, 3/0-s felszívódó fonalat használva zártuk.

A beavatkozások után az állatok 24 órán át csak folyadékot kaptak. Posztoperatív fájdalomcsillapítás céljából ketoprofent alkalmaztunk.

Az állatokat 12 (A csoport), 18 (B csoport) és 24 (C csoport) hónap után dolgoztuk fel.



6. ábra: Ileummal végzett húgyhólyag-megnagyobbítás (ICP) lépései patkányban:

A. Húgyhólyag felkeresése és identifikálása;

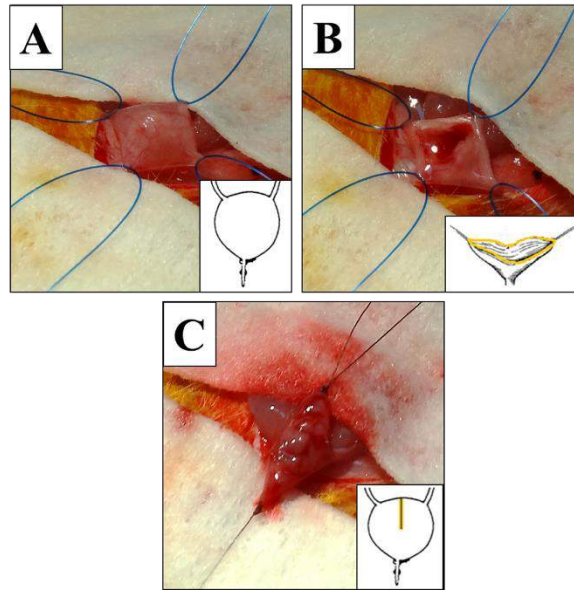
B: 12-15 mm hosszú ileum szegmens kiválasztása;

C: Detubularizált ileum (1.) és a natív húgyhólyag (2.);

D: Az augmentált húgyhólyag az ileum szegmens érnyelével (fehér nyíl).

III.2.2. Álműtét – 15 patkányban

Ebben a csoportban augmentációra nem került sor, csupán a húgyhólyag megnyitása és bezárása történt 6/0-s felszívódó, tovafutó varratsorral. Minden más tekintetben az ICP-nál leírtak szerint jártunk el. Mindegyik állatot 24 hónap után dolgoztuk fel (D csoport) (7. ábra).



7. ábra: Az álműtét (sham operation) lépései patkányban:

A. Húgyhólyag felkeresése és identifikálása;

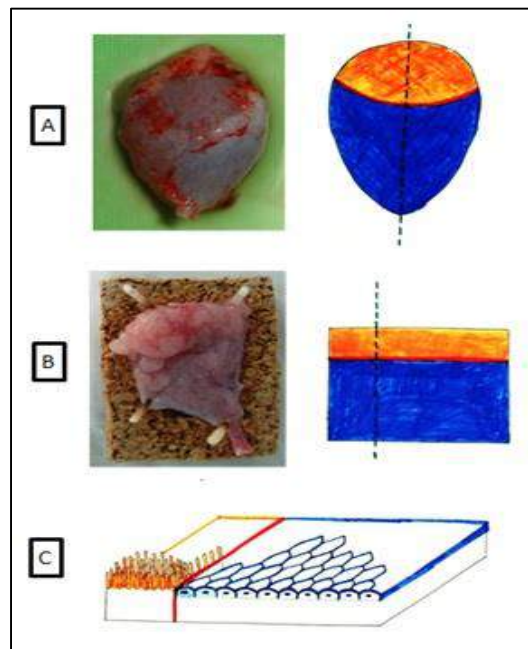
B: A húgyhólyag megnyitása (sectio alta);

C: Hólyagzárás

III.2.3. Az állatok és a minták feldolgozása

A műtét után a patkányokat az állattartási előírásoknak megfelelő körülmények között, a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Állatházában tartottuk.

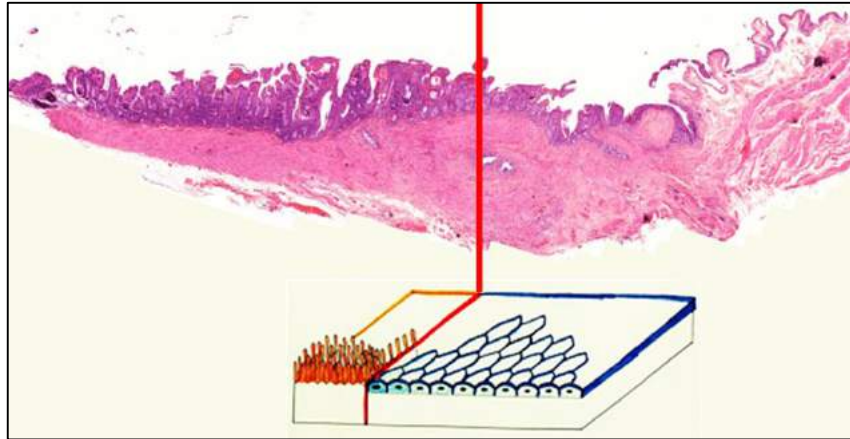
A szöveti ischaemiás károsodás megelőzésére és a fájdalom minimalizálására a megnagyobbított (és a kontroll) húgyhólyagok eltávolítását a műtéti beavatkozásnál ismertetett altatásban végeztük. Median laparotomiát követően a hólyagon a hólyagnyakig preparáltunk, ahol azt átvágtuk. Ezt követően került sor az ureterek és végül az érnél átvágására. A húgyhólyagot mediansagittalisan kettémetszettük, így kiterített „két fél” húgyhólyagot kaptunk, melyen jól láthatóak voltak a különböző típusú nyálkahártyák és a köztük lévő anasztomózis vonal. Makroszkóposan, illetve lupe alatt történő átvizsgálás után a megnagyobbított húgyhólyag egyik felét parafa lapon kiterítve 6%-os pufferolt formalinban fixáltuk. Az orientáció a minták feldolgozása során kulcsfontosságú volt. A kiterített helyzet lehetővé tette, hogy később egy metszeten vizsgálható legyen mind a hólyagmagnagyobbításra használt vékonybél, mind az anasztomózis, mind az eredeti hólyag nyálkahártyája (8. ábra).



8. ábra: Ileummal végzett húgyhólyag-magnagyobbítást (ICP) követő feldolgozás lépései patkányban. A: egyben eltávolított húgyhólyag; B: kiterített fél húgyhólyag: jól látszik a natív hólyag – kék – és az ileum – sárga – közötti anasztomózis vonal – piros –; C: a szövettani feldolgozás síkja.

Az állatokat intrakardiális kálium-klorid adásával termináltuk. Az áloperált csoport feldolgozása is a fent ismertetett módon történt.

A formalin-fixált mintákat paraffinba ágyztuk, majd az anasztomózis vonalra merőlegesen, 5 µm-s metszeteket készítettünk (9. ábra). A preparátumokat hematoxilin-eozinnal (HE) festettük. A minták elemzéséhez független patológus segítségét is igénybe vettük.



9. ábra: A szövettani feldolgozás síkja sémásan és az egyik metszet áttekintő ábrázolásával (HE, 6x nagyítás).

IV. Eredmények

IV.1. Klinikai vizsgálatok eredményei

Az eredeti, 2002-es felmérésben is részt vevő, majd utána is nyomonkövetett 35 betegből (CCP – 20 beteg, GCP – 15 beteg) 30 beteget (CCP – 19 beteg, GCP – 11 beteg) válogattunk be a fenti kritériumok alapján, 2018-ig bezárólag. Öt beteg egyik kontroll vizsgálaton sem jelent meg. Ezeket a betegeket a vizsgálatból kizártuk, a későbbiekben nem szerepelnek az eredményekben. A telefonos interjú alapján a vizsgálati időszakban (2002-2018 között) egyiküknél sem diagnosztizáltak daganatos betegséget.

A CCP-án átesett és szoroson nyomonkövetett 19 beteg közül 10 betegben húgyhólyag exstrophia, 9 betegben pedig MMC talaján kialakult húgyhólyag működési zavar volt a húgyhólyag-megnagyobbítás indikációja. A GCP-án átesett betegekben minden esetben MMC volt az alapbetegség. A betegek átlagéletkora az augmentációkor 11,8 (6-21) év volt. Az eredeti és a jelen felmérés között eltelt átlagos idő 11 év volt mindkét csoportban. A műtéttől eltelt átlagos nyomonkövetési idő CCP esetén 19,6 (13-27) év, GCP esetén 15 (6-20) év volt. Az összes beteg önkatéterezéssel bocsátja le a vizeletét és rendszeresen végez hólyagöblítést, valamint fenntartó antibiotikus terápiát alkalmaz a húgyúti fertőzések megelőzésére.

Eredményeinket a célkitűzésben feltett kérdések sorrendjében kívánom részletezni:

1.) Kialakult-e tumor kolocisztoplastikán (CCP) és gasztrocisztoplastikán (GCP) átesett betegben az elmúlt 16 évben (2002 és 2018 között)?

A vizsgált nyomonkövetési periódus alatt végzett cisztoszkópiák és biopsziás mintavételek során nem észleltük tumoros vagy tumort megelőző elváltozás kialakulását sem makro-, sem mikroszkóposan. A mintákban a normális szövettani megjelenés mellett döntően akut és/vagy krónikus gyulladós jeleket, illetve metaplasztikus elváltozásokat figyeltünk meg (3. táblázat).

CCP	Urothelium (n=55)	Anasztomózis (n=55)	Vastagbél (n=55)
Normális	33 (60%)	28 (51%)	17 (31%)
Gyulladás	19 (34%)	23 (42%)	38 (69%)
Metaplázia	3 (6%)	4 (7%)	0
GCP	Urothelium (n=36)	Anasztomózis (n=36)	Gyomor (n=36)
Normális	10 (28%)	15 (42%)	27 (75%)
Gyulladás	20 (55%)	16 (44%)	9 (25%)
Metaplázia	6 (17%)	5 (14%)	0

3. táblázat: A húgyhólyag vastagbéllel (CCP) vagy gyomorral (GCP) történő megnagyobbítását követően a nyomonkövetés részeként vett biopsziás minták eredményeinek összefoglalása betegeinkben.

A két csoport betegeinek részletes szövettani eredményeit, a pozitív vizelet leoltásainak gyakoriságát és a hólyagkövek előfordulását az 4. és 5. táblázat foglalja össze.

CCP, n=19 (4. táblázat): Egy (az eredeti, 2002-es tanulmányban a 10-es számú) beteg nem került beválogatásra a tanulmányunkba. A minták 48%-ában a nyálkahártya normális megjelenésű volt. Egy betegnél a hólyagmagnagyobbító műtét óta egy alkalommal sem észleltünk szövettani elváltozást, négy betegnél az urothelium és a colon nyálkahártyája végig normális morfológiájú volt. Ez utóbbiak közül egy betegnél a korábbi, 2002-es felmérésnél a hólyag és a colon nyálkahártyán dysplastikus, az anasztomózis vonalban metaplasztikus jelek kerültek leírásra. A többi három betegnél korábban gyulladós jelek látszottak. Gyulladós jelenség a minták 48%-ában került felismerésre. A legnagyobb arányban a bél nyálkahártyája mutatott gyulladós jeleket. Metaplasztikus elváltozás négy betegben alakult ki. Az összes (165 db) minta 4%-ában találtunk metapláziát. A metaplázia minden esetben a hólyagmintában vagy az anasztomózis vonal eredeti, húgyhólyag felőli oldalán fejlődött ki. Egy colon metapláziás mintát kivéve laphám metapláziát figyeltünk meg.

GCP, n=11 (5. táblázat): Négy (az eredeti vizsgálatban a 2, 3, 6 és 13-as számmal feltüntetett) beteg került kizárásra az ismételt felmérésből. A biopsziás minták 48%-ában nem volt ebben a csoportban sem mikroszkópos eltérés. Krónikus gyulladás a minták 42%-ában volt jelen és legjobban az urothelium volt érintett. Ezzel szemben a gyomor mucosája

mutatta arányaiban a legkevesebb gyulladós elváltozást. Összesen 4 betegben 11 metaplasztikus elváltozást találtunk az urotheliumon vagy az anasztomózis vonalban. Egy (az eredeti vizsgálatban 9-es számú) betegben a gyomor nyálkahártyája mutatott colon metapláziát az anasztomózis vonalban, a többi esetben az urothelium laphám metapláziája volt kimutatható. Két betegben a metaplasztikus elváltozások a későbbi biopsziákon már nem voltak kimutathatók.

2.) A felhasznált gastrointestinalis szegmens, vagy az alapbetegség (MMC és húgyhólyag exstrophia) mutat-e kapcsolatot a szövettani elváltozással?

CCP vs. GCP: Egyik csoportban sem derült fény rosszindulatú elváltozásra. Az augmentáció típusa szignifikáns összefüggést mutatott a szövettani elváltozás típusával az urotheliumon ($p=0,003$) és a megnagyobbításra használt colon vagy gyomor nyálkahártyáján ($p<0,001$). Az urotheliumon gyakrabban fordult elő gyulladós és metaplasztikus elváltozás gyomorral történt húgyhólyag-megnagyobbítást követően, mint CCP után. A colon mucosája nagyobb arányban mutatott gyulladós elváltozást a gyomornyálkahártyával szemben (3. táblázat).

MMC vs. Exstrophia: A CCP csoporton belül szignifikáns összefüggés mutatkozott a húgyhólyag diszfunkció etiológiája és a szövettani elváltozás típusa között a húgyhólyag nyálkahártyáján ($p=0,009$) és az anasztomózis vonalban ($p=0,025$). Metaplasztikus elváltozást csak húgyhólyag exstrophias betegekben találtunk. A colon mucosájának elváltozásai nem mutattak összefüggést az alapbetegséggel.

Beteg sorszáma - nem, életkor a műtétkor	A műtéttől a legutóbbi mintavételig eltelt évek száma	Kolocisztoplastikát követő szövettani elváltozások			Pozitív vizelet leoltások gyakorisága #	Hólyagkövek száma *
		<i>Urothelium</i>	<i>Anasztomózis</i>	<i>Vastagbél nyálkahártya</i>		
1 - ♀, 10	22	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	++	0
2 - ♀, 13	20	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	++	+
3 - ♂, 16	21	<u>Intakt: 2</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	++	++
4 - ♂, 21	24	<u>Intakt: 3</u>	Intakt: 2, <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 2</u>	+	++++
5 - ♂, 7	19	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	++	0
6 - ♂, 6	18	<u>Intakt: 2</u> , Laphám metaplázia: 1	<u>Intakt: 2</u> , <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Intakt: 2</u> , <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	++	+++
7 - ♀, 13	27	<u>Krónikus gyulladás: 3</u>	<u>Krónikus gyulladás: 3</u>	<u>Krónikus gyulladás: 3</u>	++	+
8 - ♂, 6	12	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	++	+
9 - ♂, 7	22	<u>Intakt: 2</u>	<u>Intakt: 2</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	++	++
11 - ♂, 17	24	<u>Krónikus gyulladás: 7</u>	<u>Krónikus gyulladás: 7</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 6</u>	++	+
12 - ♂, 17	23	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	++	+
13 - ♂, 12	17	Intakt: 2, <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Krónikus gyulladás: 3</u>	++	++++
14 - ♂, 7	25	Intakt: 5, <u>Krónikus gyulladás: 1</u> , Colon metaplázia: 1	Intakt: 5, <u>Krónikus gyulladás: 2</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 6</u>	++	+
15 - ♂, 11	17	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	+	+
16 - ♀, 9	16	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	<u>Intakt: 1</u>	+	0
17 - ♂, 11	13	<u>Intakt: 2</u>	<u>Intakt: 2</u>	<u>Intakt: 1</u> , <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	++	0
18 - ♂, 7	20	Intakt: 4, <u>Krónikus gyulladás: 3</u> , <u>Laphám metaplázia: 1</u>	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 4</u> , Laphám metaplázia: 3	Intakt: 1, <u>Krónikus gyulladás: 7</u>	++	++
19 - ♂, 10	16	<u>Intakt: 3</u>	<u>Intakt: 3</u>	<u>Krónikus gyulladás: 3</u>	++	+++
20 - ♀, 11	17	Intakt: 3, <u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Intakt: 3</u> , Laphám metaplázia: 1	<u>Intakt: 4</u>	+	++

4. táblázat: Kolocisztoplastikát követő szövettani elváltozások, vizeletfertőzések és kőképződések az ismételt állapotfelmérések során (n=19).

A betegek sorszáma a 2002-es közleményben közöltnek felel meg (megjegyzés: A 10-es számú beteg nem vett részt az ismételt felmérésben). A különböző szövettani elváltozások utáni számok azt jelölik, hogy hány alkalommal került az adott elváltozás leírásra. A legutóbbi állapotfelmérés során észlelt szövettani elváltozást aláhúzás jelöli. # „0” – nem volt pozitív leoltás; „+” – ritka pozitív vizelet leoltás (1-49%); „++” – gyakori pozitív vizelet leoltás (50-99%); „+++” – mindig pozitív vizelet leoltások. * „0” – nem volt kő; „+” – kőképződés egy alkalommal; „++” – kőképződés két alkalommal; „+++” – kőképződés három alkalommal; „++++” – kőképződés négy alkalommal; „+++++” – kőképződés öt alkalommal

Beteg sorszáma - nem, életkor a műtétkor	A műtéttől a legutóbbi mintavételig eltelt évek száma	Gasztrcisztoplastikát követő szövettani elváltozások			Pozitív vizelet leoltások gyakorisága #	Hólyagkövek száma *
		<i>Urothelium</i>	<i>Anasztomózis</i>	<i>Gyomor nyálkahártya</i>		
1 - σ, 10	17	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Intakt: 2</u>	<u>Intakt: 2</u>	+	0
4 - σ, 20	15	<u>Intakt: 1</u>	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	+	0
5 - ♀, 6	20	<u>Intakt: 3, Krónikus gyulladás: 1, Laphám metaplázia: 1</u>	<u>Intakt: 2, Krónikus gyulladás: 3</u>	<u>Intakt: 3, Krónikus gyulladás: 2</u>	+	0
7 - σ, 14	20	<u>Intakt: 1, Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Intakt: 1, Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Intakt: 2, Krónikus gyulladás: 1</u>	+	0
8 - σ, 12	6	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Krónikus gyulladás: 1</u>	+	0
9 - σ, 15	20	<u>Intakt: 1, Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Intakt: 1, Colon metaplázia: 1</u>	<u>Intakt: 2</u>	+	0
10 - ♀, 15	6	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Intakt: 1, Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Intakt: 2</u>	++	0
11 - ♀, 11	20	<u>Intakt: 1, Krónikus gyulladás: 3, Laphám metaplázia: 3, Intestinalis metaplázia: 1</u>	<u>Intakt: 3, Krónikus gyulladás: 3, Laphám metaplázia: 2</u>	<u>Intakt: 6, Krónikus gyulladás: 2</u>	+	0
12 - σ, 9	18	<u>Intakt: 3, Krónikus gyulladás: 5</u>	<u>Intakt: 4, Krónikus gyulladás: 4</u>	<u>Intakt: 6, Krónikus gyulladás: 2</u>	+	0
14 - ♀, 17	11	<u>Krónikus gyulladás: 2</u>	<u>Intakt: 1, Krónikus gyulladás: 1</u>	<u>Intakt: 2</u>	+	0
15 - ♀, 13	12	<u>Krónikus gyulladás: 1, Laphám metaplázia: 1</u>	<u>Laphám metaplázia: 2</u>	<u>Intakt: 2</u>	+	+

5. táblázat: Gasztrcisztoplastikát követő szövettani elváltozások, vizeletfertőzések és kőképződések az ismételt állapotfelmérések során (n=11).

A betegek sorszáma a 2002-es közleményben közöltnek felel meg (megjegyzés: A 2, 3, 6, 13-es számú betegek nem vettek részt az ismételt felmérésben). A különböző szövettani elváltozások utáni számok azt jelölik, hogy hány alkalommal került az adott elváltozás leírásra. A legutóbbi állapotfelmérés során észlelt szövettani elváltozást aláhúzás jelöli. # „0” – nem volt pozitív leoltás; „+” – ritka pozitív vizelet leoltás (1-49%); „++” – gyakori pozitív vizelet leoltás (50-99%); „+++” – mindig pozitív vizelet leoltások. * „0” – nem volt kő; „+” – kőképződés egy alkalommal (ami a veséből származott)

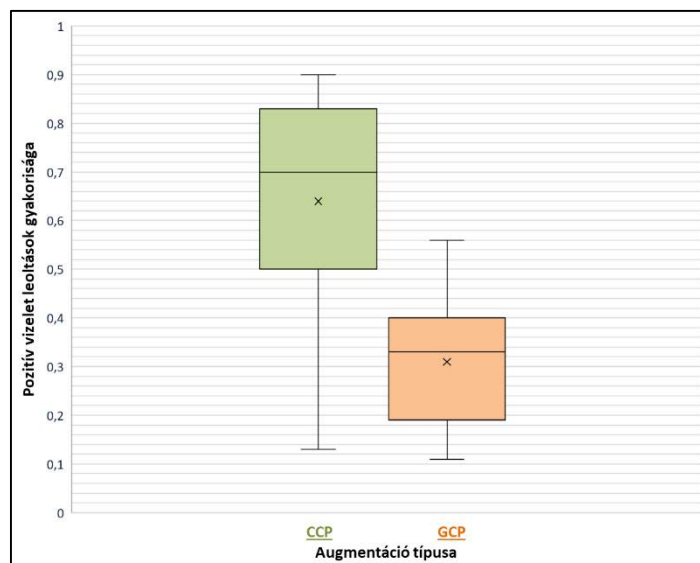
3.) Van-e változás a húgyúti fertőzések és a kövek gyakoriságában a korábbi, 2002-ben végzett vizsgálatok során találtakhoz képest?

A pozitív leoltások aránya egyik csoporton belül sem változott szignifikánsan 2002 óta. A vizsgált időszakban a hólyagköves epizódok száma azonban növekedett CCP-át követően (13 vs. 30). A 19 betegből 15-nek volt legalább egy alkalommal hólyagköve és 8 betegnél jelentkeztek többször is kövek vastagbéllel történt húgyhólyag-megnagyobbítást követően. Gastrocisztoplastika után egy betegben észleltünk a megnagyobbított hólyagban követ, amely az analízis alapján eredetileg vesekő volt.

4.) Van-e különbség a húgyúti fertőzések és a kövesség gyakoriságában a felhasznált gastrointestinalis szegmens, illetve az alapbetegség tekintetében?

A vizelet leoltás idején egyik betegben sem láttunk húgyúti fertőzésre utaló tünetet. Kolocisztoplastikát követően szignifikánsan nagyobb arányban voltak kimutathatók pozitív vizelet leoltások (64% vs. 31%, $p < 0,001$; 10. ábra). A hólyagkövesség CCP-át követően volt jellemzőbb.

A CCP csoporton belül a pozitív vizelet leoltások gyakorisága nem mutatott összefüggést a húgyhólyag diszfunkció okával (MMC vs. húgyhólyag exstrophia). A kövesség a húgyhólyag exstrophias betegekben nagyobb arányban fordult elő, mint az MMC-s betegekben (18 vs. 12).



10. ábra: Pozitív vizelet leoltások gyakorisága CCP-át (median: 0,7; átlag: 0,64) és GCP-át (median: 0,33; átlag: 0,31) követően ($p < 0,001$).

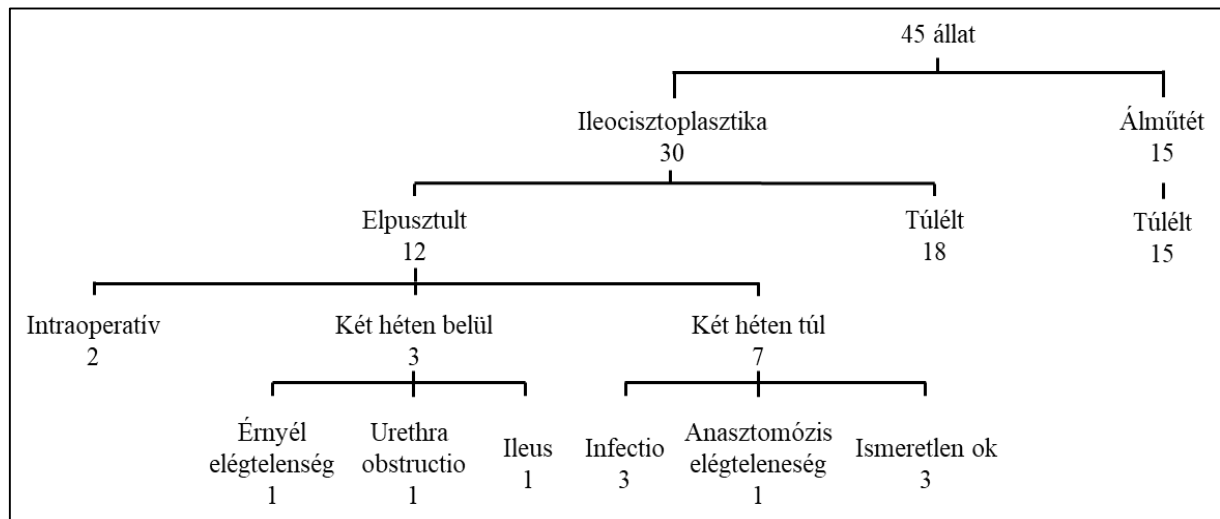
5.) *A húgyúti fertőzések gyakorisága korrelál-e a szövettani leletekkel?*

A szövettani elváltozás típusa egyik csoporton belül se mutatott összefüggést a pozitív vizelet leoltások gyakoriságával ($p > 0,05$).

IV.2. Állatkísérletek eredményei

I.) Ileocisztoplasztika (ICP) – A, B és C csoportok

A műtéti idő átlagosan 60 perc (45-90 perc) volt. A 30 ICP-án átesett állatból összesen 18 állat (60%) élte túl a tervezett utánkövetési időt. Az elhullások idejét és okait a 11. ábra részletezi.



11. ábra: Patkányokban vékonybéllel végzett húgyhólyag-megnagyobbítást követő közvetlen műtéti szövődmények összefoglalása.

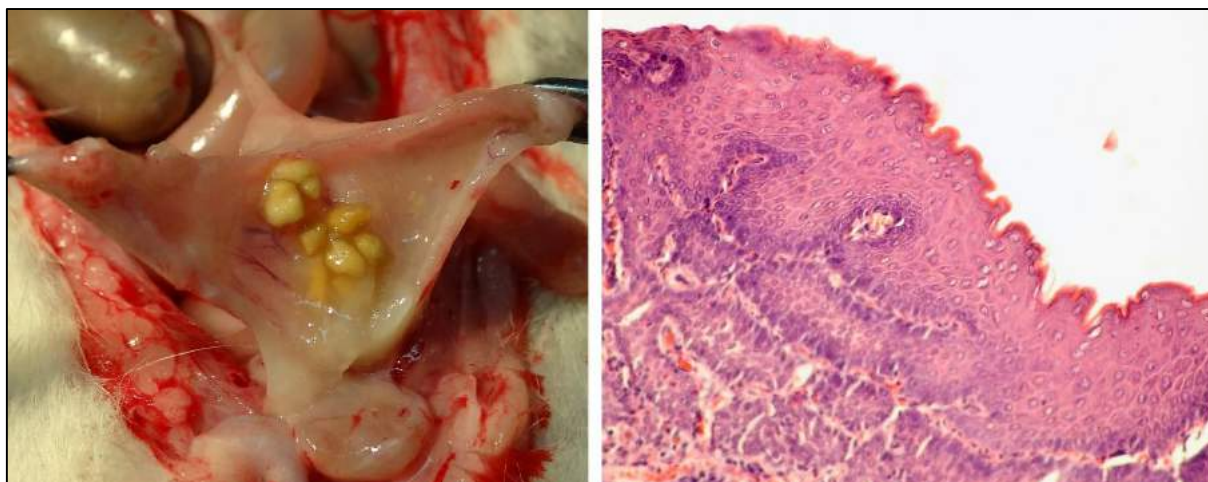
A túlélő 18 állatban minden esetben nyákos vizelettel kitöltött húgyhólyagot találtunk. A supravesicalis húgyutakat makroszkóposan megtekintve kóros elváltozást nem észleltünk. A további makro- és mikroszkópos megfigyeléseinket csoportonként részletezzük. Az összesített eredményeket a 6. táblázat foglalja össze.

	A csoport 12 hónap	B csoport 18 hónap	C csoport 24 hónap	D csoport kontroll
Állatok száma	6	6	6	6
Bélfám urotheliális differenciációja	+	++	+++	-
Hólyagkövek	2	0	0	0
Laphám metaplasia	1	0	0	0
Polyposus elváltozás	0	0	1	0
Malignitás	0	0	2	0

6. táblázat: Patkányokban vékonybéllel végzett húgyhólyag-megnagyobbítást követő makro-, és mikroszkópos elváltozások összefoglalása.

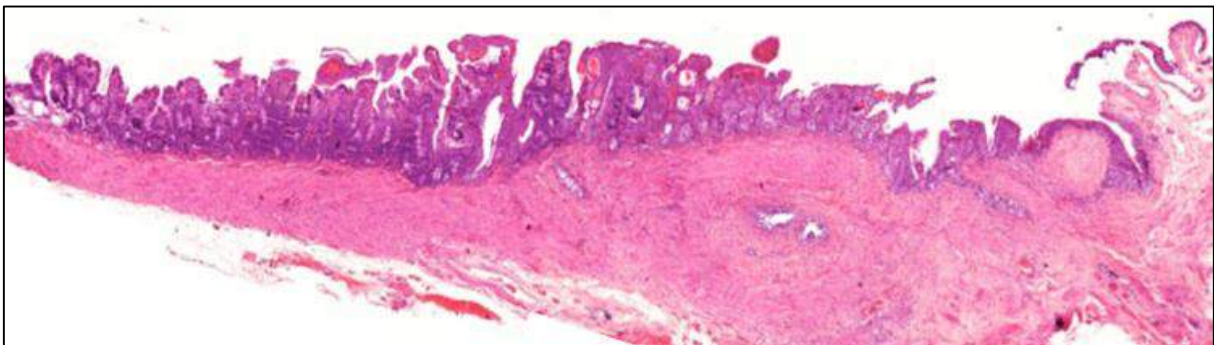
ICP, A csoport (12 hónapos nyomonkövetés)

Két patkányban hólyagköveket találtunk a húgyhólyagban. Az egyik állat esetén a hólyagkő mellett a natív húgyhólyag területén laphám metaplázia alakult ki (12. ábra).

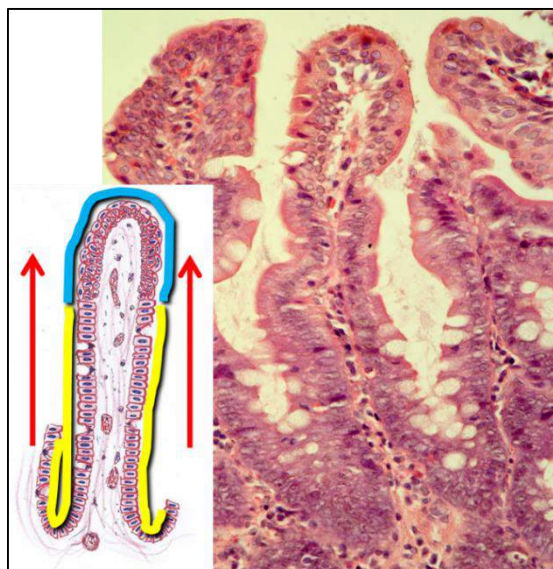


12. ábra: Hólyagkövek az augmentált húgyhólyagban patkányban végzett ICP-át követően 12 hónappal (bal oldali kép). Laphám metaplázia (HE, 10x nagyítás) az eredeti hólyag területéről, ugyanabból a megnagyobbított hólyag-preparátumból (jobb oldali kép)

Minden szövettani mintában megfigyelhető volt az urothelium megvastagodása és több sejtrétegűvé válása az anasztomózis vonalhoz közeledve. Az anasztomózis vonalban, illetve az ezzel szomszédos területeken lévő bélbolyhokon a bélhámot felváltva urothelium volt megfigyelhető. Az augmentáció helyétől távolodva az urothelium már csak helyenként, a vékonybélbolyhok csúcsi részén volt látható. Ezen heterogén villusok alatt a crypták hosszúsága is rövidülni látszott, ami szintén az anasztomózis vonalhoz közel volt a legkifejezettebb. Az ileumra „rákúszott új hám” morfológiailag már normális urothelium képét mutatta (13. és 14. ábra).



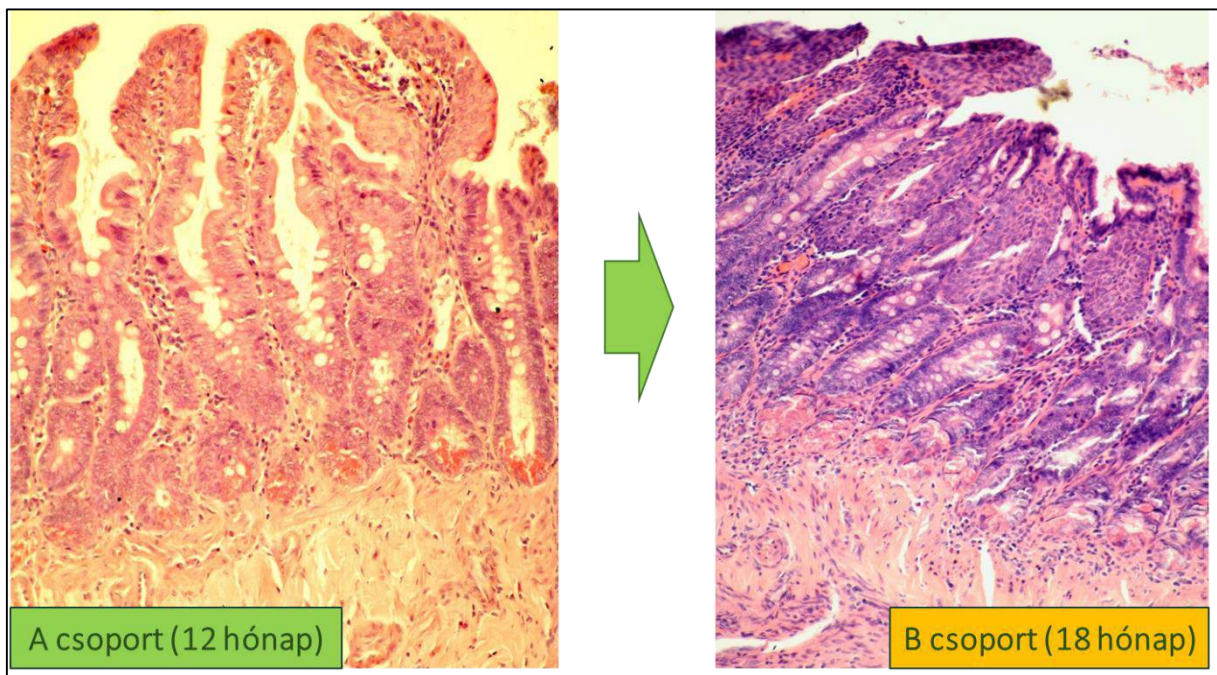
13. ábra: Patkányban, ICP-át követően 12 hónappal megfigyelt bélhám „urothelizáció” (HE, 6X nagyítás)



14. ábra: Patkányban, ICP-át követően megfigyelt hengerhámsejtek urothel sejtekké történő átalakulásának („urothelizáció”) sémás rajza és szövettani képe (HE, 60X nagyítás).

ICP, B csoport (18 hónapos nyomonkövetés)

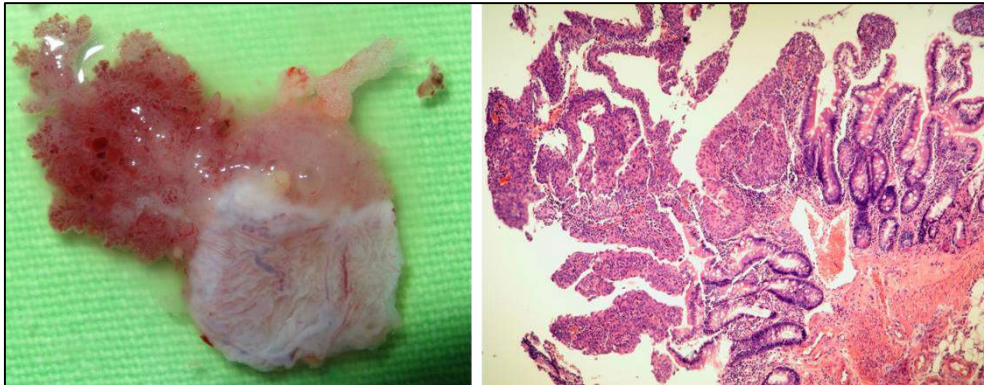
A nyák jelenlétén túl más makroszkópos elváltozást nem észleltünk. Mikroszkóposan vizsgálva a mintákat az „A” csoportban tapasztaltnál hasonló változásokat észleltünk, de nagyobb kiterjedésben volt megfigyelhető az „urothelizáció”. Az anasztomózis vonalától távolabbi területeken is észlelhető volt az urothelium térfoglalása, valamint a villusok hossz tengelye mentén is egyre mélyebbre hatolva foglalta el a bélhám helyét. Feltűnő volt továbbá, hogy a bélhámot felváltó átmeneti hám egyre jobban mutatta a hyperplasia jeleit, azaz az urothel sejtek nagyobb sejtmag/citoplazma aránnyal bírtak, magjaikban eukromatinizáció volt látható. Malignus sejtömeg kinézetét azonban nem mutatták (15. ábra).



15. ábra: Patkányban, ICP-át követően 18 hónappal (B csoport) megfigyelt bélhám kifejezettebb urotheliális transzformációt („urothelizációt”) mutat a 12 hónapig (A csoport) nyomonkövetett állatok szövettani mintáival összehasonlítva (HE, 10X nagyítás).

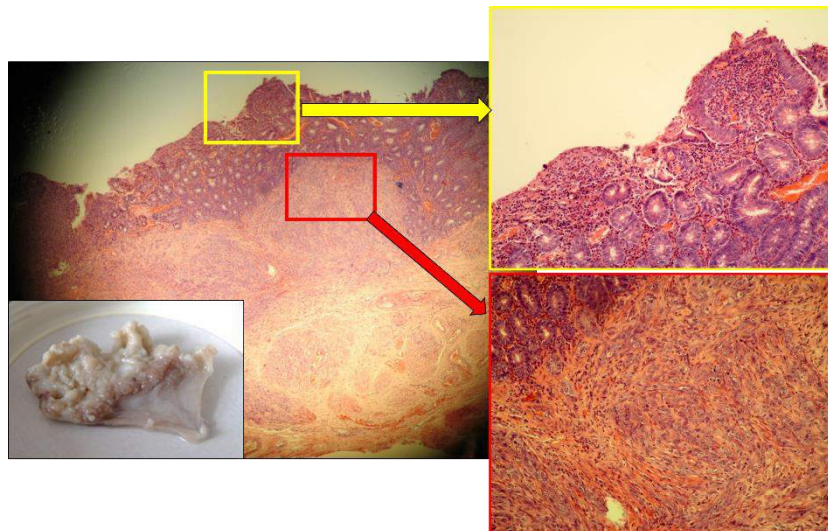
ICP, C csoport (24 hónapos nyomonkövetés)

Egy állatban a hólyag–vékonybél anasztomózis vonalban polyposus elváltozást észleltünk, mely szövettanilag hyperplasiás urotheliumnak bizonyult (16. ábra).



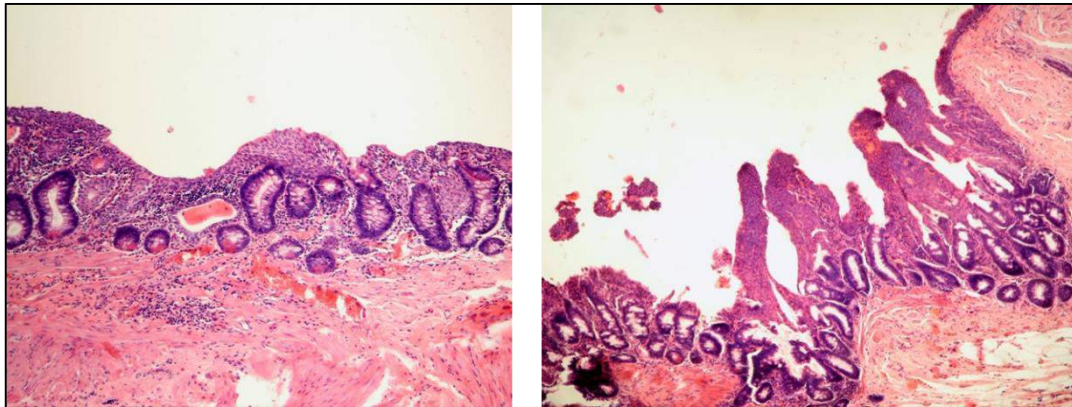
16. ábra: Patkányban, ICP-át követően 24 hónappal megfigyelt polypoid elváltozás makroszkópos és mikroszkópos (urotheliális hyperplasia) képe (HE, 10X nagyítás).

Két másik állatban az ileum nyálkahártyája jelentősen megvastagodott. A makroszkópos elváltozás a hám alatt is terjedő tranzicionális sejtes karcinómának felelt meg, párhuzamosan kiterjedt felszíni urothelizációs jelenség mellett (17. ábra).



17. ábra: Patkányban, ICP-át követően 24 hónappal megfigyelt bélhám makroszkópos képe (formalinos fixálás után), illetve a feldolgozást követően észlelt tranzicionális sejtes karcinóma (piros keretes inzert) és felszíni urothelizáció (sárga keretes inzert) szövettani megjelenése (HE, 6X és inzert 10x nagyítás).

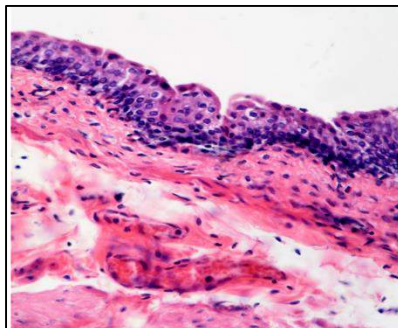
Minden mintában (6 állat) megfigyelhető volt, hogy a megnagyobbításra felhasznált ileum-szegmentumon a bélbolyhok szinte teljesen eltűntek, helyüket a crypták fölött egyeneműen hiperplastikus urothelium borította („teljes urothelizáció”). Az anasztomózis vonal szomszédságában csak a bélcrypták szilüettjei ábrázolódtak, melyeket urothel sejtek által alkotott fészkek béleltek ki (18. ábra). Egyedül ebben a csoportban észleltünk krónikus gyulladós jeleket.



18. ábra: Patkányban, ICP-át követően 24 hónappal megfigyelt bélhám csaknem teljes urotheliális transzformációja (HE, 10X nagyítás).

II.) Álműtét (sham operation) – D csoport

A 15 áloperáción átesett állat mindegyike túlélte az utánkövetési periódust (24 hónap). Egy esetben a varratvonalban egy apró diverticulumot észleltünk. Más makroszkópos vagy mikroszkópos elváltozást nem találtunk (19. ábra).



19. ábra: Patkányban, sham műtétet (sectio alta) követően 24 hónappal megfigyelt normális szövettani megjelenést mutató urothelium képe (HE, 40X nagyítás).

V. Megbeszélés

V.1. Klinikai vizsgálatok

A bélel vagy gyomorral megnagyobbított húgyhólyagban a tumorok kialakulása rendkívül ritka jelenség. Habár a közölt esetek száma évről-évre növekszik, a pontos prevalencia és a rizikófaktorok még mindig tisztázatlanok. Az ezzel kapcsolatos közlemények 1-12%-ra becsülik a tumorok kialakulásának kockázatát. A legtöbb közlemény átlagosan 4-5%-os előfordulással számol [56, 57, 78]. A hólyagmagnagyobbítás okaként szereplő alapbetegséget, ami legtöbbször meningomyelokele vagy húgyhólyag exstrophia nagy százalékban tekintik a fokozott rizikó egyik okának, hiszen augmentáció nélkül kb. ugyanolyan arányban alakulhat ki malignus elfajulás a húgyhólyagban, mint kolocisztoplastika vagy ileocisztoplastika után [78, 79, 125]. Ezzel szemben gasztrocisztoplastika esetén 2-3x nagyobb rizikóval kell számolni. Egyéb rizikófaktorok – mint például a vesetranszplantációt követő immunszuppresszió, dohányzás – is részben bizonyítottak [92]. A megnagyobbított húgyhólyagban adenocarcinoma és tranzicionális sejtes karcinóma alakul ki a legtöbb esetben. Az átlagos lappangási idő 19 és 39 év között mozog [57, 58]. Az augmentált hólyagban kialakult tumorok legtöbbször későn kerülnek felismerésre, rosszul differenciáltak, agresszív viselkedésűek és hamar áttétet adnak, ezért időben történő felismerésük fontos a betegek nyomonkövetése során [57, 59].

A továbbra is több munkacsoport által alkalmazott cisztoszkópos nyomonkövetésről az irodalom véleménye megoszlik. Az 90'-es években, illetve a 2000-es évek elején 10 éves nyomonkövetés után az évente vagy két évente végzett cisztoszkópia volt az egyik kulcsfontosságú vizsgálat a tumorok korai felismerésben. Hamid, illetve Higuchi és Husmann munkacsoportja közölte az első nagyobb betegszámú összehasonlító vizsgálatot a cisztoszkópos szűrővizsgálat alacsony hatékonyságáról [49, 75]. Ezek a munkacsoportok egy tünetorientált protokollt fogalmaztak meg, miszerint a cisztoszkópos vizsgálat csak abban az esetben javasolt, ha a betegnél visszatérő tünettől járó bakteriuria, haematuria, krónikus kismencedei fájdalom, vagy egyéb tumor jelenlétére gyanús tünet jelentkezik. Az ezt követő közleményekben már „Husmann-protokollként” említett kritériumrendszer hatékonysága azonban megkérdőjelezhető, mivel a mai napig nem található olyan közlemény, ahol ennek a

protokollnak a használatával a tumort még gyógyítható stádiumban sikerült volna detektálni. Fontos megjegyezni továbbá, hogy Husmann munkacsoportjának ajánlása csak ileo- és kolocisztoplastikára vonatkozott, a gyomorral történő húgyhólyag-megnagyobbításra nem. Legutóbb Boissier és munkatársai vizsgálták a gasztrocisztoplastikát követően fellépő tumorok kockázatát. Úgy találták, hogy GCP-t követően 2-3-szoros a malignitás kialakulásának esélye a korábbi közleményekben publikáltakhoz képest, ezért GCP esetén szoros cisztoszkópos nyomonkövetésre tettek javaslatot [80].

A cisztoszkópos nyomonkövetéssel kapcsolatos ellentmondásos irodalmi ajánlások több okra vezethetők vissza. Az augmentált húgyhólyagban kialakult tumorok rendkívül agresszív viselkedése miatt a malignitás korai felismerése rendkívül fontos lenne. A legjobb szűrőmódszernek napjainkban is a megnagyobbított húgyhólyag rendszeres endoszkópos áttekintése tűnik (a citológiai és a radiológiai módszerekkel összehasonlítva) [57]. A tumorok mellett más, gyakori szövődmények (pl. hólyagkövesség) is sok esetben lappangva alakulnak ki. Ezért a rendszeres cisztoszkópos vizsgálat bizonyos esetekben segítheti a korai diagnózist és az esetleges egyidejű endoszkópos ellátást. Az endoszkópos vizsgálat során lehetőségünk adódhat például olyan kisebb méretű hólyagkő eltávolítására is, ami még a hasi UH-on nem látszódott [49]. A cisztoszkópia mellett szól még, hogy minimálisan invazív módszer, illetve a kontinens urostomán keresztül mind az MMC-s, mind az exstrophias betegekben fájdalommentesen elvégezhető, ezért nagyobb gyermekekben és felnőttekben altatás nem szükséges hozzá. A cisztoszkópos diagnosztika során rendszeresen vett biopsziás minták részletes szövettani és molekuláris vizsgálata segítheti az augmentált hólyagban kialakuló tumorok pathogenezisének jobb megértését. Ugyanakkor ma már számos állatkísérletes modellt ismerünk, mellyel a tumorok kialakulását tudományos igényességgel vizsgálhatjuk [116]. Természetesen a cisztoszkópos vizsgálatnak, bár minimálisan invazív beavatkozásról van szó, is lehetnek szövődményei (pl. vérzés és húgycső vagy stoma sérülés). A kialakuló tumorok ritka előfordulása miatt az endoszkópos szűrés érzékenysége és költséghatékonyasága nagyon alacsony [126]. Husmann és munkatársainak tanulmánya alapján, ha a cisztoszkópia hatékonysága 100% lenne, közel ezer cisztoszkópos vizsgálatot kellene elvégezni, hogy egy tumort diagnosztizáljunk. A szűrő jelleggel elvégzett cisztoszkópia ellen szól, hogy a tumorok jelentős részében az invazív hólyagtumor felismerését megelőzően 4-18 hónappal normális makroszkópos megjelenést láttak [49] (7. táblázat).

<u>Pro</u>	<u>Kontra</u>
<ul style="list-style-type: none"> • Véletlenül talált praecancerosus elváltozások és tumorok • Klinikai tünetek (fájdalom) nehéz értékelése a spina bifidás betegeknél • Agresszív tumor viselkedés • Rizikófaktorok • (Humán tumorkutatás) 	<ul style="list-style-type: none"> • Alacsony incidencia • Invazivitás • Technikai nehézségek • Alacsony specificitás • Inkonzisztens szövettani leletek • Drága • Állatmodellek

7. táblázat: Pro- és kontra érvek az húgyhólyag-augmentációt követően kialakult tumorok cisztoszkópos szűrésével kapcsolatosan.

A Pécsi Gyermekgyógyászati Klinika, Sebészeti osztályán az augmentációt követő negyedik évtől kezdődően két évente, cisztoszkópos vizsgálaton esnek át a betegek [107]. A szkópia során biopsziás mintavétel történik az eredeti húgyhólyagból, a megnagyobbításra használt gastrointestinalis szegmensből és a kettő közötti anasztomózis vonalból. Mivel a tumorok kialakulásához a jelenlegi adatok szerint átlagosan 19 év szükséges, a szűrési protokollunk hatékonyságának vizsgálatához a korábbi közleményünkben szereplő, legrégebben operált betegek eredményeit dolgoztuk fel ismét. Az ileocisztoplastikán átesett betegeink átlagos nyomonkövetési ideje eddig 7,7 évnél tart, ezért ezeket a betegeket még nem követtük elég hosszan egy hosszútávú vizsgálat elvégzéséhez. A jelen tanulmányunk során a 2002-ben publikált közleményünkben kolocisztoplastikán és gasztrocisztoplastikán átesett betegeink azóta nyert újabb adatait dolgoztuk fel. Az akkor végzett vizsgálat során nyert biopsziás minták eredményeit vetettük össze a betegek vizeletfertőzéses és hólyagköves epizódjainak gyakoriságával. Az irodalomban kevés az olyan összehasonlító vizsgálat, ami ugyanazon betegek adatait dolgozza fel és értékeli újra. A lappangva kialakuló szövődmények miatt a klinikánkon prospektív módon végzett nyomonkövetés viszont lehetőséget adott arra, hogy munkacsoportunk ezt megtegye. Vizsgálatunk eredményeinek értékelését több tényező korlátozza. Egy részről a betegeink alacsony száma és csoportok egyenlőtlen eloszlása, más részről, hogy a vizsgálatba bevont betegek nem minden tervezett, prospektív nyomonkövetési időpontra jelentek meg.

Az eredményeink megbeszélését a célkitűzésekben felsorolt kérdések sorrendjében kívánom tárgyalni:

1.) Kialakult-e tumor kolocisztoplasztikán (CCP) és gasztrocisztoplasztikán (GCP) átesett betegen az elmúlt 16 évben (2002 és 2018 között)?

Sem az első, 2002-ben történt, sem a jelenlegi tanulmányunk során nem észleltük tumor kialakulását CCP-át és GCP-át követően (átlagosan 19,6 és 15 évvel). Az irodalmi adatokban szereplő legmagasabb incidenciát figyelembe véve, a fenti nyomonkövetési idő alatt, a CCP-s betegekben 1, a GCP-s betegekben 3 tumor kialakulását vártuk volna. A vizsgált 30 betegből 14-nél a nyomonkövetési idő kevesebb, mint 19 év volt [57, 58, 80, 92]. Tanszékünkön 1987-től napjainkig 106 húgyhólyag-augmentáció vagy hólyagpótlás történt. Megjegyzendő, hogy a cisztoszkópos nyomonkövetésünk során egy alkalommal, 11 évvel az augmentációt követően egy polypoid eltérést találtunk, ami szövettanilag in situ adenocarcinomának bizonyult [77]. Az említett betegen a CCP 2001-ben történt, ezért ezen beteg adatai nem szerepeltek az eredeti és ezáltal a jelenlegi vizsgálatban sem. Az endoszkópos polypectomiát követően a beteg jelenleg tumormentes.

2.) A felhasznált gastrointestinalis szegmens, vagy az alapbetegség (MMC és húgyhólyag exstrophia) mutat-e kapcsolatot a szövettani elváltozással?

A natív húgyhólyag, illetve a megnagyobbításra használt vastagbél és gyomor szegmens szövettani elváltozásai szignifikáns összefüggést mutattak a műtét típusával. A leggyakoribb szövettani elváltozások a krónikus gyulladás és a laphám metaplázia voltak. A gyulladásos szövettani jelek legkifejezettebben a vastagbél nyálkahártyán, legkevésbé a gyomornyálkahártyán voltak jelen. Ezzel szemben az urotheliumot és az anasztomózist nézve a gyulladásos és metaplasztikus elváltozások sokkal kifejezettebbek voltak gasztrocisztoplasztikát követően. A colon és gyomor mucosa nem mutatott metaplasztikus elváltozást. Az összefüggés magyarázható a gyomor nyálkahártya által termelt sav okozta krónikus urothelium irritációval is. A szövettani leletek alapján hosszú távon a gyomor nyálkahártya tűnik a „legellenállóbbnak”. A több gyulladásos elváltozás jelenléte CCP után valószínűleg a colon nyák elválasztásának, a bakteriális kolonizációnak és a kőképződés magasabb arányának köszönhető. A natív hólyag és az anasztomózis anatómiailag a vizelet reservoir legmélyebben fekvő részét képezik, ezért ezek szenvedik el a legnagyobb arányú

kémiai és mechanikai irritatív stimulust, ami a nagyobb arányú szövettani elváltozást is magyarázhatja. Tizenkét beteg szövettani mintáiban látott gyulladásos és metaplasztikus jelek nem jelentek meg minden szövettani vizsgálat során. Mindkét elváltozás reverzibilis, így ha a kiváltó ok éppen nincsen jelen (gyulladás, mechanikus irritáció, amit pl. kövesség, vagy a katéterezés okoz), akkor ezek a szövettani elváltozások visszafejlődhetnek [127].

A CCP-s betegekben a natív húgyhólyag és az anasztomózis vonal szövettani elváltozásai mutattak szignifikáns különbséget az alapbetegségtől függően (MMC kontra húgyhólyag exstrophia). Metaplasztikus elváltozás csak húgyhólyag exstrophiaát követően volt megfigyelhető a CCP-s betegekben. Ezek a megfigyeléseink azt a feltételezést támogatják, mely szerint az alapbetegség meghatározó lehet a szövettani elváltozások pathogenezisének szempontjából [78].

3.) Van-e változás a húgyúti fertőzések és a kövek gyakoriságában a korábbi, 2002-ben végzett vizsgálatok során találtakhoz képest? ; 4.) Van-e különbség a húgyúti fertőzések és a kövesség gyakoriságában a felhasznált gastrointestinalis szegmens, illetve az alapbetegség tekintetében? ; 5.) A húgyúti fertőzések gyakorisága korrelál-e a szövettani leletekkel?

A bakteriális kolonizáció oka, valamint, hogy milyen szerepet játszhat az augmentációt követően kialakult hólyagtumorok pathogenezisében még mindig nem tisztázott [57, 75, 81, 128]. A vizeletfertőzés értékelése az MMC-s betegekben nehéz, hiszen a szenzoros funkciók kiesése nehezíti a tünetes és tünetmentes vizeletfertőzés közötti különbségtételt. Ezen túl még nem ismert azon mikroorganizmusok (microbiom) szerepe sem, melyek oki tényezők lehetnek az egymással egyesített különböző szövetek egymásra hatásában [129]. Vizsgálatunkban nem találtunk szignifikáns összefüggést a pozitív vizelet leoltások és a szövettani eredmények között, ami az irodalom azon álláspontját erősíti, hogy a bakteriuria önmagában nem olyan hatásfokú tényező, mint azt korábban gondolták, illetve ahogy munkacsoportunk feltételezte. Ettől függetlenül, vizsgálatunk tovább erősítette azt a tényt, hogy a bakteriuria CCP-át követően jellemzőbb, mint GCP után [89]. Ez a megfigyelés összefüggésben állhat azzal is, hogy CCP után magasabb a kőképződés aránya, illetve, hogy ennek gyakorisága az idővel növekszik [130]. A krónikus mechanikus irritáció tumor kialakulást elősegítő hatásával kapcsolatban az eddigi klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a kövesség gyakorisága azonos volt a hólyagtumoros betegekben az augmentáció elvégzésétől függetlenül [81]. Mivel a vizsgált betegekben tumoros elváltozást nem észleltünk, ezért nem

tudtunk a tumor kialakulása, a bakteriuria gyakorisága és a köves epizódok száma között összefüggést találni.

6.) A biopsziás mintavétel (és a cisztoszkópia önmagában) alkalmas módszer-e a szövettani elváltozások kimutatására, illetve a vizsgálat segít-e a tumor kialakulásának előrejelzésében?

Az elmúlt 10 évben betegeink nyomonkövetése kapcsán összesen kb. 250 cisztoszkópiás vizsgálatot végeztünk. Ezek alkalmával kb. 1500 biopsziás mintavétel történt. A mintavételek során egy esetben sem találtunk malignus elváltozást a megnagyobbított húgyhólyagokban. Mind a cisztoszkópiáról, mind a biopsziás minták szövettani vizsgálatáról elmondható, hogy az adott vizsgálatra nézve az érzékenyséjük magas. Ha makroszkóposan találtunk egy elváltozást (pl. gyulladás), akkor azt a hisztológia is alátámasztotta. Az összes klinikai vizsgálómódszert tekintve azonban a cisztoszkópia és főként a random biopsziás mintavétel érzékenysége kicsi az esetlegesen már jelen levő premalignus, de makroszkóposan még nem látható elváltozások kimutatására. Ebből a szempontból a talán legaggasztóbb irodalmi adat az, hogy több alkalommal is úgy észlelték hólyagtumor kialakulását augmentáció után, hogy a diagnózist megelőzően egy éven belül történt állapotfelmérő endoszkópia negatív eredménnyel. A cisztoszkópos nyomonkövetés megítélését esetünkben tovább nehezítette, hogy betegeinkben nem észleltük malignus tumor kialakulását. A cisztoszkópos és biopsziás mintavételekkel történő szűrővizsgálat ellen szól továbbá az is, hogy technikailag sokszor nem egyszerűek. Ha a vizsgálatot például köldökstomán keresztül végezzük, akkor az augmentált hólyag csúcsi része merev eszközzel sokszor nem hozható teljesen látótérbe, ezért lehetnek ún. „vakfoltok” a vizsgálat során. További nehézség, hogy olykor az anasztomózis vonal nem teljesen ítélni meg egyértelműen, főként akkor, ha a vizelet kifejezetten nyákos. Az eddigi tapasztalatink és a jelenlegi vizsgálat eredményei alapján a Pécsi Gyermekgyógyászati Klinika nyomonkövetési protokolljának megváltoztatása mellett döntöttünk.

A Husmann és munkatársai által közölt protokollt alapul véve egy új, tünetorientált nyomonkövetési sémát dolgoztunk ki az augmentációt követően kialakuló hólyagtumorkok időben történő felismerésére (lásd 2. melléklet). A protokoll alapján cisztoszkópos beavatkozást csak a leírt kritériumok teljesülése esetén végzünk, biopsziás mintavétel pedig kizárólag tumorra gyanús makroszkópos elváltozásból történik.

V.2. Állatkísérletek

Az állatok hosszú távú (12, 18, 24 hó) túlélése (60%) tekintetében modellünk az irodalmi adatokkal megegyező (44-87%) volt [100, 108, 115, 116, 118, 120, 121]. A két altatással kapcsolatos intraoperatív, aneszteziológiai szövődmény a műtét „betanulási szakaszában” történt. Az intraabdominálisan futó érnél miatt kialakuló ileus megelőzésére egyes szerzők az érnél retroperitoneális rögzítését javasolják [108]. Ilyen szövődményt azonban mi nem tapasztaltunk. Egy esetben a mechanikus ileus okozója a vékonybél end-to-end anasztomózisának szűkülete volt. Az irodalmi adatok alapján az anasztomózis-elégtelenség az egyik leggyakoribb korai szövődmény. Az állatkísérletünkben egy patkánynál alakult ki ilyen komplikáció [115, 120]. A Bajory és munkatársai által leírt augmentátum keringési zavara okozta hólyagrupturát hosszú távú nyomonkövetésünk során sem észleltük [123]. Az infekció hátterében közvetlen okot nem találtunk. Hosszú távon számolnunk kell az időződő állatok öregkori elgyengülése okozta elhullással is. Kísérletünkben a műtéteket fiatal patkányokon végeztük, ezért az öregedéssel összefüggésbe hozható korai elhullással nem számoltunk. A leölt állatok feldolgozásakor észlelt makroszkópos elváltozások megegyeztek az irodalmi adatokkal. A hólyagkövesség, a nagyfokú nyákképződés, a hiperplasztikus, polyposus elváltozások jól ismert jelenségek [116, 117, 120, 122]. A felső húgyutak károsodása is potenciális szövődmények forrása lehet, de makroszkóposan ezt egy állatban sem észleltük [117, 120]. A más munkacsoportok által megfigyelt papilláris benignus elváltozások, laphám-metaplázia és tranzicionális sejtes karcinóma a mi kísérletünk során is kialakultak. Az irodalomban megjelent közlemények többségében a nyomonkövetési idő nem haladja meg az egy évet, ezért kevesebb a megfigyelt malignus transzformáció. Rosszindulatú elváltozást mi is csak a 24 hónap után feldolgozott állatokban láttunk. A két éves nyomonkövetés minden bizonnyal szükséges ahhoz, hogy a patkányban kialakuló malignus tumorok patogenezisét vizsgálni tudjuk [115, 116]. A két év patkányokban emberi léptékben kb. 60 évnek felel meg [131]. Az irodalomban fellelhető állatkísérletes modellekben szinte kivétel nélkül megfigyelték a bélhám „urothelizációját”. Mind a mai napig azonban nincs egységes ismeretünk arról, hogy ez a jelenség milyen mechanizmussal jön létre, igaz, a legtöbb esetben a vizsgálatok célja nem e jelenség részletes megfigyelése volt.

Először Guan és munkatársai említik az urothelizáció jelenségét, amit az urotheliumnak a bél nyálkahártyájára való „rákúszásaként” értelmeznek, miközben megfigyelésük alapján a bélhám intakt marad [108].

Arena és kutatócsoportja egy hónapos megfigyelést követően epithelialis hyperplasiát tapasztalt, mely az anasztomózis vonalból ered a vékonybél-szegmentum centrális része felé. Három hónappal a műtétet követően a bélszegmentum urothelizációját figyelték meg az anasztomózisból kiindulva és tovaterjedve a vékonybél-szegmentum központi része felé. Azt feltételezték, hogy az eredeti húgyhólyag urothel sejteinek bélhámra történő fokozatos migrációjáról van szó. Leírták az átmeneti hám megvastagodását, illetve a villusok hypotrophiáját is. Ugyanezen kísérlet során 6 hónap múlva vizsgálva a szövettani mintákat azt találták, hogy ennyi idő múltán a vékonybél hámjára teljes mértékben metaplasztikus, átmeneti hám „kúszott” rá. Az urothel körülvevő villusok hypotrophiások, deformáltak és laposak voltak [117]. Burgu és munkatársai 11 patkányon végeztek ileocisztoplasztikát. Az augmentációt követően hat hónappal vizsgálták a kapott eredményeket. A szövettani vizsgálatok során a bélhám urothelizációjáról számolnak be. Ezt a jelenséget az urotheliumnak a vékonybél-szegmentum nyálkahártyájára való rákúszásaként írják le az anasztomózis vonal területén e szerzők is. A környező urothelium hiperplasztikus és metaplasztikus elváltozásait a szerzők minden mintában észlelték [122]. Spencer és munkatársai már egy éves megfigyelési idő után vizsgálták a mintákat. Ők ugyan nem beszélnek urothelizációról, azonban a kapott eredmények megegyeznek a korábbi közleményekben leírtakkal. Tranzícionális sejtes és papilláris tumor mellett minden mintában megfigyeltek hiperplasztikus urothelialis elváltozást. Ezen elváltozás a húgyhólyag-bél anasztomózis mentén alakult ki. A hólyag és a bél laphám metaplasziája minden esetben krónikus gyulladással társult, amit saját tanulmányunkban nem figyeltünk meg [115].

Állatkísérletünk eredményei leginkább Little és munkatársai eredményeihez hasonlóak, akik szintén két éves nyomonkövetés után vizsgálták a patkányokat. Tizenegy patkányból háromban találtak papilláris karcinómát a bél-szegmentumon vagy közel az anasztomózis vonalhoz. Az anasztomózis vonal szomszédságában lévő átmeneti hámokban proliferatív és metaplasztikus elváltozásokat figyeltek meg. Úgy látták, hogy idővel az ileum villusai ellapulnak, a crypták rövidülnek és egyre inkább metaplasztikus urothelium jelenik meg a bél columnáris epithelijének helyén. Az elváltozások hátterében azt feltételezték, hogy

az eltérő hámszövetek közelségéből és egymásra gyakorolt hatásából adódóan különböző növekedési faktorok és indukciós szignálok jöhetnek létre. Ezek eredményeként pedig könnyen kialakulhat a proliferáció szabályozásának zavara, ami magyarázatot szolgáltat a kapott elváltozásokra. Gyulladásos elváltozásokat ez a munkacsoport is csupán elvétve észlelt [116].

A folyamat lefolyásával kapcsolatban Gitlin és munkatársainak közleménye is további adatokat szolgáltat. Ez a munkacsoport kutyákon vékonybél és gyomor-szegmentum felhasználásával végezett húgyhólyag-megnagyobbító műtétet. Szövetteni vizsgálataik során a rutin hematoxilin-eozin mellett alciankék és PAS festéssel is vizsgálták a mintákat. Utóbbi dupla festés segítségével kimutatható a sejtek mucintartalma, mely specifikus a bélhámra és normális esetben nem jelenik meg az urotheliumban. Mindemellett az urotheliumra specifikus az uroplakinok jelenléte. Ebben a kísérletben azonban azt találták, hogy nem csupán a bél, hanem a hiperplasztikus urothel sejtek is festődtek PAS-sal és alciankéekkel. Ez a hiperplasztikus átmeneti hám „ránőtt” a bélhámra és ez az elváltozás az entero-vesicalis anasztomózisban volt látható. Ezek a sejtek, amellett, hogy megtartották uroplakin tartalmukat, mucint is expresszáltak. A megfigyelésük alapján arra következettek, hogy az urothel sejtek glanduláris átalakuláson mentek keresztül. Mindezen megfigyeléseket összegezve, a szerzők a sejtek közti jelátvitel fontosságát hangsúlyozták. Feltételezésük szerint éppen ennek a mechanizmusnak a megváltozása eredményezhette az urothel sejtek metapláziáját és/vagy a későbbi benignus és malignus tumorok kialakulását. Ez a hipotézis részben magyarázná az általunk is megfigyelt jelenségeket, hiszen a két hámfajta sejtjeinek egymásba való átalakulását sikerült indirekten kimutatniuk. Gitlin és munkatársai azonban éppen az általunk tapasztaltakkal ellentétes feltételezést fogalmaznak meg: szerintük az urothel sejtekben jönnek létre differenciálódásukat érintő elváltozások [109].

A folyamat feltárása érdekében a szövettani mintavétel és a feldolgozás során törekedtünk arra, hogy a húgyhólyag és a vékonybél hámszövetét folyamatosan lehessen vizsgálni, különös tekintettel az anasztomózis területére. Összegzésképpen elmondható, hogy az ileum nyálkahártyáját az anasztomózis vonaltól kiindulva idővel egyre nagyobb területen borította urothelium. Ez mind az ileum szegmens felszíni területe, mind a bolyhok magassága mentén megfigyelhető volt. A látott mintázat két induktív faktort valószínűsít: az urothelium közelségét és a vizelet folyamatos hatását. Az urothelium az anasztomózis vonaltól távolodva

egyre csökkenő mértékben volt jelen az ileum nyálkahártyáján, vagyis az átmeneti hám szomszédsága fontos szerepet játszhat a tapasztalt jelenség kialakulásában. A vizelet bélhámot transzformáló hatására enged következtetni az a megfigyelés, hogy az urothelizáció a bélbolyhok csúcsán kezdődik, ahol a legkifejezettebb és innen terjed egyre mélyebbre, fokozatosan csökkenő mértékben, egészen a cryptáig. Vagyis minél hosszabb ideig érintkezik az adott bélszegmentum a vizelettel, annál inkább átalakulnak a hengerhámsejtek urothel sejtekké.

Természetesen a megfigyelt elváltozások magyarázatának és az átmeneti hám eredetének pontosabb tisztázása további vizsgálatokat igényel. Érdekes egybeesés, hogy a munkacsoportunk által korábban kolocisztoplastikán átesett betegek mintáiban a mucin sejtfelszíni glikoproteineket vizsgálva, a vastagbél nyálkahártyáján idővel a normálisan jelenlevő MUC-2 fehérje expressziója csökkent, míg az urotheliumra inkább jellemző MUC-1 expressziója pedig nőtt [77].

VI. Összefoglalás

A húgyhólyag-megnagyobbító műtéten átesett betegek hosszú távú nyomonkövetése a magas szövődmény arány miatt elengedhetetlen. Munkacsoportunk az ilyen műtéten gyermekkorban átesett betegek nyomonkövetését a 90-es évek elejétől kezdődően prospektív módon és országosan egyedülállóan végzi. A szóba jövő szövődmények közül a malignus elfajulás lehetősége a legsúlyosabb, és egyúttal legkevésbé ismert. A beteg életkorának előrehaladtával egyre nő a malignitás lehetősége, melynek időben történő felismerése egyre fontosabb kérdéssé válik a betegek gondozása során. Munkacsoportunk cisztoszkópos nyomonkövetési protokolljának a hatékonysága az elmúlt 10 év irodalmi adatai alapján megkérdőjeleződött. Ezért ennek a protokollnak felülvizsgálatát határoztuk el és dolgoztuk fel újra a legrégebben operált betegeink adatait. Összességében elmondható, hogy a cisztoszkópiával történő nyomonkövetés önmagában nem tudományosan megalapozott hatékonyságú módszer az augmentációt követően kialakuló premalignus elváltozások korai felismerésében. A cisztoszkópos szűrés tünetorientált indikációjától nagyobb eséllyel várható, hogy a kialakulóban levő tumorok időben felismerésre kerüljenek, ezért a tumorra gyanús tünetek keresése a nyomonkövetés során meghatározó jelentőségű.

Az augmentált hólyagban kialakuló szövettani változások patomechanizmusának feltérképezésére számos humán és állatkísérletes vizsgálat irányult. A megnagyobbításra használt gastrointestinalis szegmensben végbemenő urothelizációs jelenségét egyetlen szerző sem vizsgálta. Munkacsoportunk egy olyan állatkísérletes modellt kívánt létrehozni, ami alkalmas lehet ennek a folyamatnak a részletes megfigyelésére is.

VII. Az értekezés új eredményei és megállapításai

1. Munkacsoportunk, illetve Husmann és munkatársainak vizsgálatain kívül nem találunk az irodalomban olyan vizsgálatot, ami ugyanazon betegek többszöri, hasonló módszerrel történő állapotfelmérését végezte el és hasonlította volna össze.
2. Eredményeink arra utalnak, hogy az augmentáció típusa, illetve az alapbetegség meghatározó lehet a későbbi szövettani változások pathogenezisében.
3. A gyomor savszekréciója, a vastagbél nyáktermelése, illetve az augmentált húgyhólyag anatómiai felépítése szerepet játszik a hosszútávon kialakuló szövettani változásokban.
4. Húgyhólyag exstrophia esetén, kolocisztoplastikát követően nagyobb arányban észlelhető metaplasztikus elváltozás az eredeti hólyag nyálkahártyáján.
5. Az augmentált húgyhólyag bakteriális kolonizációja nincs kapcsolatban az adott időben megfigyelt szövettani változásokkal.
6. A kétévenként szűrő jelleggel végzett cisztoszkópia helyett tünetorientált indikáció javasolható a vizsgálat elvégzésére húgyhólyag-augmentációt követően.
7. Az urothelizáció hátterében az irodalomban eddig többnyire szereplő urotheliális migrációs elmélettel szemben, a patkányokon vékonybéllel történt húgyhólyag-megnagyobbító műtéteket követően, a bélhám urotheliális transzformálódása valószínűsíthető.
8. Az átalakulás mintázata egyrészt az urothelium közelségének, másrészt a vizelet folyamatos expozíciójának hatásaira enged következtetni.
9. Az alkalmazott patkánymodell és a szövettani preparálás módszere alkalmas az augmentált húgyhólyag átfogó, állati léptékben hosszú távú vizsgálatára.

VIII. A klinikai és állatkísérletes kutatás további tervei

A gyermekkorban történő húgyhólyag-megnagyobbítás szövődmények lappangva történő kialakulása miatt a betegek prospektív, kétévente történő, részletes állapotfelmérése folytatandó gyakorlat. A szövődmények magas rizikója gyakoribb állapotfelméréseket is szükségessé tehet. Betegeink nyomonkövetését azonban nehezíti, hogy a koruk növekedésével egyre inkább kikerülnek a Pécsi Gyermekgyógyászati Klinika munkacsoportjának látóköréből. A betegek megfelelő, a felnőtt ellátás felé történő tranzíciója és egy országos regiszter létrehozása a legfontosabb jövőbeni feladataink közé tartozik.

A betegek nyomonkövetésével párhuzamosan a szövettani változások és a tumorgenezis jobb megértése céljából a kidolgozott patkánymodell segítségével további vizsgálatok elvégzése szükséges. Az állatkísérletes eredményeinket a korábbi humán vizsgálataink során észlelt bél sejtfelszíni mucin glikoprotein változásokkal érdemes összevetni. A megfigyeléseinket további sejtpopuláció specifikus immun-hisztokémiai vizsgálatokkal kell kiegészítenünk.

- [1] Alan P, Craig P, Louis K, Roger D, Alan W. Campbell-Walsh-Wein Urology. 12th Edition ed.: Elsevier; 2020.
- [2] Austin PF, Bauer SB, Bower W, Chase J, Franco I, Hoebeke P, et al. The standardization of terminology of lower urinary tract function in children and adolescents: Update report from the standardization committee of the International Children's Continence Society. *Neurourol Urodyn* 2016;35(4):471-81.
- [3] McGuire EJ, Woodside JR, Borden TA, Weiss RM. Prognostic value of urodynamic testing in myelodysplastic patients. *J Urol* 1981;126(2):205-9.
- [4] Edwards AB, Jacobs M. Early Vs. Expectant Management of Spina Bifida Patients-Are We All Talking About a Risk Stratified Approach? *Curr Urol Rep* 2019;20(11):76.
- [5] Bowman RM, Boshnjaku V, McLone DG. The changing incidence of myelomeningocele and its impact on pediatric neurosurgery: a review from the Children's Memorial Hospital. *Childs Nerv Syst* 2009;25(7):801-6.
- [6] András DP. Gyermeksebészeti vezérfonal. II. ed.: Medicina Könyvkiadó Rt.; 2005.
- [7] Stein R, Bogaert G, Dogan HS, Hoen L, Kocvara R, Nijman RJM, et al. EAU/ESPU guidelines on the management of neurogenic bladder in children and adolescent part I diagnostics and conservative treatment. *Neurourol Urodyn* 2020;39(1):45-57.
- [8] Bauer SB, Nijman RJ, Drzewiecki BA, Sillen U, Hoebeke P. International Children's Continence Society standardization report on urodynamic studies of the lower urinary tract in children. *Neurourol Urodyn* 2015;34(7):640-7.
- [9] Veenboer PW, Bosch JL, van Asbeck FW, de Kort LM. Upper and lower urinary tract outcomes in adult myelomeningocele patients: a systematic review. *PLoS One* 2012;7(10):e48399.
- [10] Cervellione RM, Mantovani A, Gearhart J, Bogaert G, Gobet R, Caione P, et al. Prospective study on the incidence of bladder/cloacal exstrophy and epispadias in Europe. *J Pediatr Urol* 2015;11(6):337.e1-6.
- [11] Grady RW, Mitchell ME. Complete primary repair of exstrophy. *J Urol* 1999;162(4):1415-20.
- [12] Jeffs RD, Charrios R, Mnay M, et al: Primary closure of the exstrophied bladder. In Scott R, editor: *Current controversies in urologic management*, WB Saunders, p 235, 1972.

- [13] Baird AD, Nelson CP, Gearhart JP. Modern staged repair of bladder exstrophy: a contemporary series. *J Pediatr Urol* 2007;3(4):311-5.
- [14] Promm M, Roesch WH. Recent Trends in the Management of Bladder Exstrophy: The Gordian Knot Has Not Yet Been Cut. *Front Pediatr* 2019;7:110.
- [15] Gargollo PC, Borer JG, Diamond DA, Hendren WH, Rosoklija I, Grant R, et al. Prospective Followup in Patients After Complete Primary Repair of Bladder Exstrophy. *The Journal of Urology* 2008;180(4, Supplement):1665-70.
- [16] Franco I, Horowitz M, Grady R, Adams RC, de Jong TP, Lindert K, et al. Efficacy and safety of oxybutynin in children with detrusor hyperreflexia secondary to neurogenic bladder dysfunction. *J Urol* 2005;173(1):221-5.
- [17] Goessl C, Knispel HH, Fiedler U, Härle B, Steffen-Wilke K, Miller K. Urodynamic effects of oral oxybutynin chloride in children with myelomeningocele and detrusor hyperreflexia. *Urology* 1998;51(1):94-8.
- [18] Lehnert T, Weisser M, Till H, Rolle U. The effects of long-term medical treatment combined with clean intermittent catheterization in children with neurogenic detrusor overactivity. *Int Urol Nephrol* 2012;44(2):335-41.
- [19] Stein R, Bogaert G, Dogan HS, Hoen L, Kocvara R, Nijman RJM, et al. EAU/ESPU guidelines on the management of neurogenic bladder in children and adolescent part II operative management. *Neurourol Urodyn* 2020;39(2):498-506.
- [20] Boone TB, Roehrborn CG, Hurt G. Transurethral intravesical electrotherapy for neurogenic bladder dysfunction in children with myelodysplasia: a prospective, randomized clinical trial. *J Urol* 1992;148(2 Pt 2):550-4.
- [21] Sidi AA, Becher EF, Reddy PK, Dykstra DD. Augmentation enterocystoplasty for the management of voiding dysfunction in spinal cord injury patients. *J Urol* 1990;143(1):83-5.
- [22] Docimo SG. Bladder augmentation: current and future techniques IN: *The Kelalis–King–Belman Textbook of Clinical Pediatric Urology*, Fifth edition, Informa Healthcare UK Ltd. 2006.
- [23] Adams MC, Mitchell ME, Rink RC. Gastrocystoplasty: an alternative solution to the problem of urological reconstruction in the severely compromised patient. *J Urol* 1988;140(5 Pt 2):1152-6.

- [24] Sheldon CA, Gilbert A, Wacksman J, Lewis AG. Gastrocystoplasty: technical and metabolic characteristics of the most versatile childhood bladder augmentation modality. *J Pediatr Surg* 1995;30(2):283-7; discussion 7-8.
- [25] Duel BP, Gonzalez R, Barthold JS. Alternative techniques for augmentation cystoplasty. *J Urol* 1998;159(3):998-1005.
- [26] Cartwright PC, Snow BW. Bladder Autoaugmentation: Partial Detrusor Excision to Augment the Bladder without Use of Bowel. *The Journal of Urology* 1989;142(4):1050-3.
- [27] Gonzalez R, Buson H, Reid C, Reinberg Y. Seromuscular colocolocystoplasty lined with urothelium: experience with 16 patients. *Urology* 1995;45(1):124-9.
- [28] Dewan PA, Anderson P. Ureterocystoplasty: the latest developments. *BJU international* 2001;88:744-51.
- [29] Austin PF, Rink RC, Lockhart JL. The gastrointestinal composite urinary reservoir in patients with myelomeningocele and exstrophy: long-term metabolic followup. *J Urol* 1999;162(3 Pt 2):1126-8.
- [30] Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367(9518):1241-6.
- [31] Joseph DB, Borer JG, De Filippo RE, Hodges SJ, McLorie GA. Autologous cell seeded biodegradable scaffold for augmentation cystoplasty: phase II study in children and adolescents with spina bifida. *J Urol* 2014;191(5):1389-95.
- [32] Serrano-Aroca Á, Vera-Donoso CD, Moreno-Manzano V. Bioengineering Approaches for Bladder Regeneration. *Int J Mol Sci* 2018;19(6).
- [33] Lapidus J, Diokno AC, Silber SJ, Lowe BS. Clean, intermittent self-catheterization in the treatment of urinary tract disease. *J Urol* 1972;107(3):458-61.
- [34] Kari J, Al-Deek B, Elkhatib L, Salahudeen S, Mukhtar N, Al Ahmad R, et al. Is mitrofanoff a more socially accepted clean intermittent catheterization (CIC) route for children and their families? *Eur J Pediatr Surg* 2013;23(5):405-10.
- [35] Duckett JW, Snyder HM. Continent Urinary Diversion: Variations on the Mitrofanoff Principle. *The Journal of Urology* 1986;136(1, Part 1):58-62.
- [36] Mitrofanoff P. [Trans-appendicular continent cystostomy in the management of the neurogenic bladder]. *Chir Pediatr* 1980;21(4):297-305.

- [37] Monti PR, Lara RC, Dutra MA, de Carvalho JR. New techniques for construction of efferent conduits based on the Mitrofanoff principle. *Urology* 1997;49(1):112-5.
- [38] Rowland RG, Mitchell ME, Bihrlé R, Kahnoski RJ, Piser JE. Indiana continent urinary reservoir. *J Urol* 1987;137(6):1136-9.
- [39] Veeratterapillay R, Morton H, Thorpe AC, Harding C. Reconstructing the lower urinary tract: The Mitrofanoff principle. *Indian J Urol* 2013;29(4):316-21.
- [40] Rovner ES, Wein AJ. Treatment options for stress urinary incontinence. *Rev Urol* 2004;6 Suppl 3(Suppl 3):S29-47.
- [41] Kroll P. Pharmacotherapy for Pediatric Neurogenic Bladder. *Paediatr Drugs* 2017;19(5):463-78.
- [42] Kryger JV, González R, Barthold JS. Surgical management of urinary incontinence in children with neurogenic sphincteric incompetence. *J Urol* 2000;163(1):256-63.
- [43] Alova I, Margaryan M, Bernuy M, Lortat-Jacob S, Lottmann HB. Long-Term Effects of Endoscopic Injection of Dextranomer/Hyaluronic Acid Based Implants for Treatment of Urinary Incontinence in Children with Neurogenic Bladder. *The Journal of Urology* 2012;188(5):1905-9.
- [44] Ruiz E, Puigdevall J, Moldes J, Lobos P, Boer M, Ithurralde J, et al. 14 years of experience with the artificial urinary sphincter in children and adolescents without spina bifida. *J Urol* 2006;176(4 Pt 2):1821-5.
- [45] Leadbetter GW, Jr. SURGICAL CORRECTION OF TOTAL URINARY INCONTINENCE. *J Urol* 1964;91:261-6.
- [46] Salle JL, McLorie GA, Bägli DJ, Khoury AE. Urethral lengthening with anterior bladder wall flap (Pippi Salle procedure): modifications and extended indications of the technique. *J Urol* 1997;158(2):585-90.
- [47] Kavanagh A, Afshar K, Scott H, MacNeily AE. Bladder neck closure in conjunction with enterocystoplasty and Mitrofanoff diversion for complex incontinence: closing the door for good. *J Urol* 2012;188(4 Suppl):1561-5.
- [48] Kispal Z, Balogh D, Erdei O, Kehl D, Juhasz Z, Vastyán AM, et al. Complications after bladder augmentation or substitution in children: a prospective study of 86 patients. *BJU Int* 2011;108(2):282-9.

- [49] Higuchi TT, Fox JA, Husmann DA. Annual endoscopy and urine cytology for the surveillance of bladder tumors after enterocystoplasty for congenital bladder anomalies. *J Urol* 2011;186(5):1791-5.
- [50] Husmann DA, Spence HM. Current status of tumor of the bowel following ureterosigmoidostomy: a review. *J Urol* 1990;144(3):607-10.
- [51] Ragu R, Meurette G, Kim M, Le Normand L, Lehur PA. Carcinoma arising in enteric diversion or rectal neobladder for bladder exstrophy. *Tech Coloproctol* 2016;20(11):745-52.
- [52] Pettersson L, Tranberg J, Abrahamsson K, Pettersson S, Sillen U, Jonsson O. Half century of followup after ureterosigmoidostomy performed in early childhood. *J Urol* 2013;189(5):1870-5.
- [53] Filmer RB, Spencer JR. Malignancies in bladder augmentations and intestinal conduits. *J Urol* 1990;143(4):671-8.
- [54] Golomb J, Klutke CG, Lewin KJ, Goodwin WE, deKernion JB, Raz S. Bladder Neoplasms Associated with Augmentation Cystoplasty: Report of 2 Cases and Literature Review. *The Journal of Urology* 1989;142(2, Part 1):377-80.
- [55] Soergel TM, Cain MP, Misseri R, Gardner TA, Koch MO, Rink RC. Transitional cell carcinoma of the bladder following augmentation cystoplasty for the neuropathic bladder. *J Urol* 2004;172(4 Pt 2):1649-51; discussion 51-2.
- [56] Rove KO, Husmann DA, Wilcox DT, Vricella GJ, Higuchi TT. Systematic review of bladder cancer outcomes in patients with spina bifida. *J Pediatr Urol* 2017;13(5):456.e1-.e9.
- [57] Biardeau X, Chartier-Kastler E, Roupret M, Phe V. Risk of malignancy after augmentation cystoplasty: A systematic review. *Neurourol Urodyn* 2015.
- [58] Husmann DA. Mortality following augmentation cystoplasty: A transitional urologist's viewpoint. *J Pediatr Urol* 2017;13(4):358-64.
- [59] Williamson SR, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R, Cheng L. Unique clinicopathologic and molecular characteristics of urinary bladder tumors in children and young adults. *Urol Oncol* 2013;31(4):414-26.
- [60] Sung MT, Zhang S, Lopez-Beltran A, Montironi R, Wang M, Davidson DD, et al. Urothelial carcinoma following augmentation cystoplasty: an aggressive variant with distinct clinicopathological characteristics and molecular genetic alterations. *Histopathology* 2009;55(2):161-73.

- [61] Austen M, Kälble T. Secondary malignancies in different forms of urinary diversion using isolated gut. *J Urol* 2004;172(3):831-8.
- [62] Castellan M, Gosalbez R, Bar-Yosef Y, Labbie A. Complications after use of gastric segments for lower urinary tract reconstruction. *J Urol* 2012;187(5):1823-7.
- [63] Bruyneel M, Kain JP, Collart F. Extrapulmonary small cell carcinoma following augmentation enterocystoplasty. *Acta Clin Belg* 2004;59(2):106-8.
- [64] Hayashi Y, Shiyonagi S, Nagae I, Ishizaki T, Kasuya K, Katsumata K, et al. A case of tubular adenoma developing after bladder augmentation: Case report and literature review. *Int J Surg Case Rep* 2016;19:17-20.
- [65] Franke EI, Misseri R, Cain MP, Kaefer M, Meldrum KK, Fan R, et al. Nephrogenic adenoma in the augmented bladder. *J Urol* 2011;186(4 Suppl):1586-9.
- [66] Davis CP, Cohen MS, Hackett RL, Anderson MD, Warren MM. Urothelial hyperplasia and neoplasia. III. Detection of nitrosamine production with different bacterial genera in chronic urinary tract infections of rats. *J Urol* 1991;145(4):875-80.
- [67] Shands C, 3rd, McDougal WS, Wright EP. Prevention of cancer at the urothelial enteric anastomotic site. *J Urol* 1989;141(1):178-81.
- [68] Higgy NA, Verma AK, Ertürk E, Oberley TD, el-Aaser AA, el-Merzabani MM, et al. *Escherichia coli* infection of the urinary bladder: induction of tumours in rats receiving nitrosamine precursors and augmentation of bladder carcinogenesis by N-nitrosobutyl (4-hydroxybutyl)amine. *IARC Sci Publ* 1987(84):380-3.
- [69] Malone MJ, Izes JK, Hurley LJ. Carcinogenesis. The fate of intestinal segments used in urinary reconstruction. *Urol Clin North Am* 1997;24(4):723-8.
- [70] Weitzman SA, Weitberg AB, Clark EP, Stossel TP. Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. *Science* 1985;227(4691):1231-3.
- [71] Dixon BP, Chu A, Henry J, Kim R, Bissler JJ. Increased cancer risk of augmentation cystoplasty: possible role for hyperosmolal microenvironment on DNA damage recognition. *Mutat Res* 2009;670(1-2):88-95.
- [72] Herfs M, Yamamoto Y, Laury A, Wang X, Nucci MR, McLaughlin-Drubin ME, et al. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(26):10516-21.

- [73] Li Y, Liu W, Hayward SW, Cunha GR, Baskin LS. Plasticity of the urothelial phenotype: effects of gastro-intestinal mesenchyme/stroma and implications for urinary tract reconstruction. *Differentiation* 2000;66(2-3):126-35.
- [74] Appanna TC, Doak SH, Jenkins SA, Kynaston HG, Stephenson TP, Parry JM. Comparative genomic hybridization (CGH) of augmentation cystoplasties. *Int J Urol* 2007;14(6):539-44.
- [75] Hamid R, Greenwell TJ, Nethercliffe JM, Freeman A, Venn SN, Woodhouse CR. Routine surveillance cystoscopy for patients with augmentation and substitution cystoplasty for benign urological conditions: is it necessary? *BJU Int* 2009;104(3):392-5.
- [76] Ivil KD, Doak SH, Jenkins SA, Parry EM, Kynaston HG, Parry JM, et al. Fluorescence in-situ hybridisation on biopsies from clam ileocystoplasties and on a clam cancer. *Br J Cancer* 2006;94(6):891-5.
- [77] Kispal ZF, Kardos D, Jilling T, Kereskai L, Isaacs M, Balogh DL, et al. Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment. *J Pediatr Urol* 2015;11(6):349.e1-6.
- [78] Rove KO, Higuchi TT. Monitoring and malignancy concerns in patients with congenital bladder anomalies. *Curr Opin Urol* 2016;26(4):344-50.
- [79] Husmann DA. Malignancy after gastrointestinal augmentation in childhood. *Ther Adv Urol* 2009;1(1):5-11.
- [80] Boissier R, Di Crocco E, Faure A, Hery G, Delaporte V, Lechevallier E, et al. What is the outcome of paediatric gastrocystoplasty when the patients reach adulthood? *BJU Int* 2016;118(6):980-6.
- [81] Higuchi TT, Granberg CF, Fox JA, Husmann DA. Augmentation cystoplasty and risk of neoplasia: fact, fiction and controversy. *J Urol* 2010;184(6):2492-6.
- [82] Barrington JW, Jones A, James D, Smith S, Stephenson TP. Antioxidant deficiency following clam enterocystoplasty. *Br J Urol* 1997;80(2):238-42.
- [83] Beare JB, Tormey AR, Jr., Wattenberg CA. Exstrophy of the urinary bladder complicated by adenocarcinoma. *J Urol* 1956;76(5):583-94.
- [84] Smeulders N, Woodhouse CR. Neoplasia in adult exstrophy patients. *BJU Int* 2001;87(7):623-8.

- [85] Woodhouse CR, North AC, Gearhart JP. Standing the test of time: long-term outcome of reconstruction of the exstrophy bladder. *World J Urol* 2006;24(3):244-9.
- [86] Corica FA, Husmann DA, Churchill BM, Young RH, Pacelli A, Lopez-Beltran A, et al. Intestinal metaplasia is not a strong risk factor for bladder cancer: study of 53 cases with long-term follow-up. *Urology* 1997;50(3):427-31.
- [87] Veeratterapillay R, Thorpe AC, Harding C. Augmentation cystoplasty: Contemporary indications, techniques and complications. *Indian J Urol* 2013;29(4):322-7.
- [88] Greenwell TJ, Venn SN, Mundy AR. Augmentation cystoplasty. *BJU Int* 2001;88(6):511-25.
- [89] DeFoor W, Minevich E, Reeves D, Tackett L, Wacksman J, Sheldon C. Gastrocystoplasty: long-term followup. *J Urol* 2003;170(4 Pt 2):1647-9; discussion 9-50.
- [90] Husmann DA. Long-term complications following bladder augmentations in patients with spina bifida: bladder calculi, perforation of the augmented bladder and upper tract deterioration. *Transl Androl Urol* 2016;5(1):3-11.
- [91] Husmann DA. Lessons learned from the management of adults who have undergone augmentation for spina bifida and bladder exstrophy: Incidence and management of the non-lethal complications of bladder augmentation. *Int J Urol* 2018;25(2):94-101.
- [92] Husmann DA, Rathbun SR. Long-term follow up of enteric bladder augmentations: the risk for malignancy. *J Pediatr Urol* 2008;4(5):381-5; discussion 6.
- [93] Hooton TM, Bradley SF, Cardenas DD, Colgan R, Geerlings SE, Rice JC, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50(5):625-63.
- [94] Forster CS, Panchapakesan K, Stroud C, Banerjee P, Gordish-Dressman H, Hsieh MH. A cross-sectional analysis of the urine microbiome of children with neuropathic bladders. *Journal of Pediatric Urology* 2020.
- [95] Kispal ZF, Vajda P, Kardos D, Klymiuk I, Moissl-Eichinger C, Castellani C, et al. The local microbiome after pediatric bladder augmentation: intestinal segments and the native urinary bladder host similar mucosal microbiota. *J Pediatr Urol* 2019;15(1):30.e1-.e7.
- [96] Biers SM, Venn SN, Greenwell TJ. The past, present and future of augmentation cystoplasty. *BJU Int* 2012;109(9):1280-93.

- [97] Besarani D, Cranston D. Urological malignancy after renal transplantation. *BJU Int* 2007;100(3):502-5.
- [98] Castellan M, Gosalbez R, Perez-Brayfield M, Healey P, McDonald R, Labbie A, et al. Tumor in bladder reservoir after gastrocystoplasty. *J Urol* 2007;178(4 Pt 2):1771-4; discussion 4.
- [99] Lane T, Shah J. Carcinoma following augmentation ileocystoplasty. *Urol Int* 2000;64(1):31-2.
- [100] Buson H, Diaz DC, Manivel JC, Jessurun J, Dayanc M, Gonzalez R. The development of tumors in experimental gastroenterocystoplasty. *J Urol* 1993;150(2 Pt 2):730-3.
- [101] Docimo SG, Chow NH, Steiner G, Silver RI, Rodriguez R, Kinsman S, et al. Detection of adenocarcinoma by urinary microsatellite analysis after augmentation cystoplasty. *Urology* 1999;54(3):561.
- [102] Vemulakonda VM, Lendvay TS, Shnorhavorian M, Joyner BD, Kaplan H, Mitchell ME, et al. Metastatic adenocarcinoma after augmentation gastrocystoplasty. *J Urol* 2008;179(3):1094-6; discussion 7.
- [103] Mbeutcha A, Lucca I, Mathieu R, Lotan Y, Shariat SF. Current Status of Urinary Biomarkers for Detection and Surveillance of Bladder Cancer. *Urol Clin North Am* 2016;43(1):47-62.
- [104] Ali-El-Dein B, El-Tabey N, Abdel-Latif M, Abdel-Rahim M, El-Bahnasawy MS. Late uro-ileal cancer after incorporation of ileum into the urinary tract. *J Urol* 2002;167(1):84-8.
- [105] Kälble T, Hofmann I, Riedmiller H, Vergho D. Tumor growth in urinary diversion: a multicenter analysis. *Eur Urol* 2011;60(5):1081-6.
- [106] Mammadov E, Dervisoglu S, Elicevik M, Emir H, Soylet Y, Buyukunal SNC. Transition to adulthood with a bladder augmentation: histopathologic concerns. *Int Braz J Urol* 2017;43(6):1152-9.
- [107] Vajda P, Kaiser L, Magyarlaki T, Farkas A, Vastyan AM, Pinter AB. Histological findings after colocystoplasty and gastrocystoplasty. *J Urol* 2002;168(2):698-701; discussion
- [108] Guan ZC, Ricard G, Charest-Boule L, Neilson K, Kiruluta G. Augmentation cystoplasty in rats: development of an animal model. *J Urol* 1990;144(2 Pt 2):461-5; discussion 74.
- [109] Gitlin JS, Wu XR, Sun TT, Ritchey ML, Shapiro E. New concepts of histological changes in experimental augmentation cystoplasty: insights into the development of neoplastic

- transformation at the enterovesical and gastrovesical anastomosis. *J Urol* 1999;162(3 Pt 2):1096-100.
- [110] Braasch MR, Griffith TS, Cooper CS, Austin JC. Description of a novel murine model for ileocystoplasty and early histologic changes. *ScientificWorldJournal* 2011;11:1325-31.
- [111] Gill HS, Wein AJ, Ruggieri MR, Whitmore KE, Levin RM. Functional and biochemical alterations in the rabbit urinary bladder following ileocystoplasty. *J Urol* 1989;142(3):860-4.
- [112] Cserni T, Cervellione RM, Hajnal D, Varga G, Kubiak R, Rakoczy G, et al. Alternative ileal flap for bladder augmentation if mesentery is short. *J Pediatr Urol* 2015;11(2):64.e1-6.
- [113] Vastyán AM, Pinter AB, Farkas AP, Vajda P, Lantos J, Mehes G, et al. Seromuscular gastrocystoplasty in dogs. *Urol Int* 2003;71(2):215-8.
- [114] Vajda P, Pinter AB, Magyarlaki T, Vastyán AM, Juhasz Z, Oberritter Z, et al. Histologic findings after gastrocystoplasty in rabbits. *J Pediatr Surg* 2005;40(9):1470-4.
- [115] Spencer JR, Steckel J, May M, Marion D, Hernandez K, Vaughan ED, Jr. Histological and bacteriological findings in long-term ileocystoplasty and colcystoplasty in the rat. *J Urol* 1993;150(4):1321-5.
- [116] Little JS, Jr., Klee LW, Hoover DM, Rink RC. Long-term histopathological changes observed in rats subjected to augmentation cystoplasty. *J Urol* 1994;152(2 Pt 2):720-4.
- [117] Arena S, Arena F, Fazzari C, Minutoli L, Russo T, Altavilla D, et al. Ileocystoplasty in rats: metabolic, renal and enteropatch changes in a mid- and long-term follow-up. *Urol Int* 2011;87(1):87-93.
- [118] Makiura Y, Okada Y, Tomoyoshi T, Maeda T. Morphological analysis of ileal grafting following ileocystoplasty in the rat: a kinetic and ultrastructural study of the intestinal epithelium. *Int J Urol* 1994;1(2):143-50.
- [119] Miyake H, Hara S, Eto H, Kamidono S, Hara I. Global analysis of gene expression profiles in ileum in a rat bladder augmentation model using cDNA microarrays. *Int J Urol* 2004;11(11):1009-12.
- [120] Yamataka A, Wang K, Kato Y, Okada Y, Kobayashi H, Lane GJ, et al. Long-term outcome of bladder augmentation using living-related partial bladder transplantation in rats. *Pediatr Res* 2005;57(5 Pt 1):738-43.

- [121] Nakano Y, Fujisawa M, Matsui T, Arakawa S, Kamidono S. The significance of the difference in bacterial adherence between bladder and ileum using rat ileal augmented bladder. *J Urol* 1999;162(1):243-7.
- [122] Burgu B, Gokce MI, Aydogdu O, Suer E, Kankaya D, Soygur T. Combining gastric and ileal segments, does it overcome segment-related complications? An experimental study on rats. *Urol Res* 2011;39(1):39-44.
- [123] Bajory Z, Szabó A, Pajor L, Boros M. A bélhólyagruptura mikrokeringési okának modellezése állatkísérletben. *Magyar Urológia* 1999;XI(4):385-91.
- [124] Cetinel S, San T, Cetinel B, Uygun N, Hürdağ C. Early histological changes of ileal mucosa after augmentation cystoplasty. *Acta Histochem* 2001;103(3):335-46.
- [125] Austin JC, Elliott S, Cooper CS. Patients with spina bifida and bladder cancer: atypical presentation, advanced stage and poor survival. *J Urol* 2007;178(3 Pt 1):798-801.
- [126] Kokorowski PJ, Routh JC, Borer JG, Estrada CR, Bauer SB, Nelson CP. Screening for malignancy after augmentation cystoplasty in children with spina bifida: a decision analysis. *J Urol* 2011;186(4):1437-43.
- [127] Liang FX, Bosland MC, Huang H, Romih R, Baptiste S, Deng FM, et al. Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement. *J Cell Biol* 2005;171(5):835-44.
- [128] Michaud DS. Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol Oncol* 2007;25(3):260-8.
- [129] Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol* 2015;12(2):81-90.
- [130] Kaefer M, Hendren WH, Bauer SB, Goldenblatt P, Peters CA, Atala A, et al. Reservoir calculi: a comparison of reservoirs constructed from stomach and other enteric segments. *J Urol* 1998;160(6 Pt 1):2187-90.
- [131] Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* 2013;4(6):624-30.

Mellékletek

1. melléklet:

A húgyhólyag-megnagyobbításon átesett betegek jelenleg használt nyomonkövetési protokollja

Hólyag-augmentált (-pótol) betegek nyomon követési protokollja - ADATLAP -

I. Vizsgálatok

A.) Preoperatív vizsgálatok:

- UH
- Cystographia
- DMSA/DTPA/MAG3
- Manometria
- Labor + 24 órás vizeletgyűjtés (katéteres)
- DEXA
- Súly- és hosszpercentil
- Életminőségi kérdőív

MŰTÉT

Az augmentatio
módja: _____

SZÖVETTAN

Közvetlen post. op. szövödmények:

a.) Műtėti: _____

b.) Metabolikus: _____

c.) Infekciós: _____

B.) 3 hónapos kontroll:

- UH
- Manometria
- 24^h vizelet pH monitor (gastrocystopl.)
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés

C.) 6 hónapos kontroll:

- UH
- Cystographia (ha preop. reflux vagy noeimpl.)
- Manometria
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés

D.) 1 éves kontroll:

- UH
- Natív has
- Cystographia (mindig)
- DMSA/DTPA/MAG3
- Manometria
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés
- DEXA
- Életminőségi kérdőív

E.) 2 éves kontroll:

- UH
- Natív has
- Cystographia (ha UH v. klinikai kép indokolja)
- DMSA/DTPA/MAG3
- Manometria
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés
- DEXA
- Életminőségi kérdőív

Név: _____

Szül. idő: _____

TörzsN^o: _____

-

Jelen felv. időpontja: _____

Augm. időpontja: _____

3 hó kontr.: _____

6 hó kontr.: _____

1 éves kontr.: _____

2 éves kontr.: _____

3 éves kontr.: _____

4 éves kontr.: _____

5 éves kontr.: _____

F.) 3 éves kontroll:

- UH
- Natív has
- Cystographia (ha UH v. klinikai kép indokolja)
- DMSA/DTPA/MAG3
- Manometria
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés
- DEXA
- Életminőségi kérdőív

G.) 4 éves kontroll:

- UH
- Natív has
- Cystographia (mindig)
- DMSA/DTPA/MAG3
- Manometria
- SZÖVETTAN
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés
- DEXA
- Életminőségi kérdőív

H.)-J.) 6, 8, 10 éves kontroll:

- UH
- Natív has
- Cystographia (ha UH v. klinikai kép indokolja)
- DMSA/DTPA/MAG3
- Manometria
- SZÖVETTAN
- Labor + 24^h vizeletgyűjtés
- DEXA
- Életminőségi kérdőív

II. Szempontok

A.) Preoperatív szempontok:

A műtét indikációja: _____
Előző műtét / augmentatio: _____
A megelőző konzervatív th. hossza (hónap): _____ ill. _____-tól- _____-ig.
Konzerv. th. ("urológiai") jellege - ICC: _____ óránként.
Gyógysz. th.: Ditropan: _____ /die, Epherit: _____ /die.
Egyéb konzerv. th.: (hólyag training, konductor stb.) _____
Vizelet kontinencia: _____ Széklet kontinencia: _____
Hydrocephalus: + / - , Szmunt: + / -
"Mentális st." - milyen iskolába jár (norm, kiségitő, stb.)?: _____
Önálló mozgásképesség: Járás önállóan / segédeszközzel / tolókocsihoz kötött
Orth. mozgást javító műtét: + / -
Gyógyszerei: _____

ÉLETMINŐSÉGI (QoL) KÉRDŐÍV

B.) 3 hónapos kontroll:

GI panaszok megjelentek-e?: Súlyvesztés + / - , Diarrhoea + / - , Obstipatio + / - , Dyscomfort - Teltség érzés + / - , Hányinger + / - , Hányás + / - , GI vérzés + / - (jellege: _____) , Dumping + / - .
Gyógyszerei: Ditropan: _____ /die, Zantac: _____ /die.

C.) 6 hónapos kontroll:

Kontinencia: Javulás / Romlás / Változatlan. Spontán vizelet + / - , ICC: _____ óránként.
Katéterezhetőség: Könnyű / Nehéz. Katéter típusa: _____ Ch.
Szövődmények: Haematuria + / - , Dysuria + / - , Infekció - vizelet + / - ill. pyelonephritis + / - , Nyák + / -
GI panaszok megjelentek-e?: Súlyvesztés + / - , Diarrhoea + / - , Obstipatio + / - , Dyscomfort - Teltség érzés + / - , Hányinger + / - , Hányás + / - , GI vérzés + / - (jellege: _____) , Dumping + / - .
Gyógyszerei: Ditropan: _____ /die, Zantac: _____ /die.

D.) 1 éves - E.) 2 éves - F.) 3 éves - G.) 4 éves - H.)-J.) 6, 8 és 10 éves kontroll:

Az eredmény szubjektív megítélése: Javulás / Romlás / Változatlan
Kontinencia: Javulás / Romlás / Változatlan. Spontán vizelet + / - , ICC: _____ óránként.
Katéterezhetőség: Könnyű / Nehéz. Katéter típusa: _____ Ch.
Szövődmények: Haematuria + / - , Dysuria + / - , Infekció - vizelet + / - ill. pyelonephritis + / - , Nyák + / -
GI panaszok megjelentek-e?: Súlyvesztés + / - , Diarrhoea + / - , Obstipatio + / - , Dyscomfort - Teltség érzés + / - , Hányinger + / - , Hányás + / - , GI vérzés + / - (jellege: _____) , Dumping + / - .
Gyógyszerei: Ditropan: _____ /die, Zantac: _____ /die.

ÉLETMINŐSÉGI (QoL) KÉRDŐÍV

Laborvizsgálatok (minden kontroll esetén):

Testmagasság, Testsúly (percentil görbék) RR.

Vér: Vértkép (Hgb; Htk; Fvs; Vvt; MCH; MCV; MCHC), We, Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Fe, Transferrin, Ferritin, UN, Húgysav, Kreatinin, Összfehérje, Albumin, pH (astrup), Vércukor, Parathormon (SePTH), Alkalkikus foszfatáz (SeALP), CRP, Gastrin (ha gastrocystoplastica)

Vizelet: Vizelet rutin, Üledék, Bakt. + Rezisztencia, Mennyiség (ml/24é), Fajsúly, pH, Na, K, Ca, Cl, Mg, P, Húgysav, Vizelet kreatinin (PD, EKC, TPR).

2. melléklet

Protokoll húgyhólyag-megnagyobbítást követően kialakuló húgyhólyag tumoros elváltozás időben történő felismerésére (2021.)

- Az **állapotfelmérések gyakorisága** – Posztoperatív 3 hónap, 6 hónap, 1-2-3-4 év, majd két évente.
- Az **immunszuprimált** betegek és a **gasztrocisztoplasztikán átesettek fokozott rizikóval** rendelkező betegek – Posztoperatív **10 év után két évente cisztoszkópia**.
- A műtéttől eltelt időtől függetlenül **cisztoszkópiát** kell végezni az alábbi **kritériumok** alapján:
 - **Anamnézis:**
 - **4 vagy több tünettel járó UTI/év** (tünetekkel járó UTI definíciója: 10^5 cfu + 38,5 °C feletti láz/rossz általános állapot/hólyagtáji fájdalom/búzós zavaros vizelet, ami nem tisztul fel 48 órán belül fokozott folyadékbevitelre és katéterezésekre)
 - **Makroszkópos haematuria** v. 50 vvt/látótér feletti mikroszkópos haematuria, amikor nincs bizonyított tünetekkel járó vagy a nélküli UTI a haematuriával egyidejűleg
 - **Krónikus gáttáji, kismedencei vagy hólyag fájdalom**
 - **A hasi UH-on pathológia** (újkeletű hydronephrosis, hólyagkő, nyálkahártya növedék)
 - **Újkeletű inkontinencia**
 - **50 éves kor felett** minden **kolocisztoplasztikán átesett betegnél**
 - (Egyéb rizikótényezők: **kávé, dohányzás, kábítószer, alkohol fogyasztás**)
 - **Osztályos kivizsgálás során** cisztoszkópia indikációját jelenti:
 - **Makroszkópos haematuria** v. 50 vvt/látótér feletti mikroszkópos haematuria, amikor nincs bizonyított tünetekkel járó vagy a nélküli UTI a haematuriával egyidejűleg
 - **A hasi (vese és rezervoár) UH-on pathológia** (újkeletű hydronephrosis, hólyagkő, nyálkahártya növedék)

A **biopsziás mintavétel** csak akkor indokolt, ha a cisztoszkópia vagy valamilyen okból végzett nyitott műtét (pl. kőeltávolítás) esetén **makroszkópos elváltozás** észlelhető. **Céltott mintavételt** kell végezni.

A dolgozat alapjául szolgáló és egyéb közlemények, előadások jegyzéke

A dolgozat alapjául közvetlenül szolgáló közlemények:

Kardos D, Varadi B, Kispal Z, Kereskai L, Pinter A, Vajda P: *Patkánymodell ileocystoplasticát követő nyálkahártya-változások vizsgálatára*. Magyar Urológia 2016; XXVIII. évf., 1. sz.: 13–18.

Kardos D, Kereskai L, Tornoczky T, Farkas K, Davidovics A, Farkas A, Vastyan AM, †Pinter AB, Vajda P: *Re-evaluation of Histological Findings after Colocystoplasty and Gastrocystoplasty*. J Pediatr Urol, 2019;15 (6), 651.e1-651.e8 (IF: 1,578)

A dolgozat alapjául szolgáló további közlemények:

Kispal ZF, Kardos D, Jilling T, Kereskai L, Isaacs M, Balogh DL, Pinter AB, Till H, Vajda P: *Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment*. J Pediatr Urol 2015;11:349.e341-346. (IF: 1,17)

Kispal ZF, Vajda P, Kardos D, Klymiuk I, Moissl-Eichinger C, Castellani C, Singer G, Till H: *The local microbiome following pediatric bladder augmentation: Intestinal segments and the native urinary bladder host similar mucosal microbiota*. J Pediatr Urol 2019;15:30.e31-37. e8 (IF: 1,578)

A dolgozat témájában tartott előadások és kapcsolódó poszterek:

Kardos D, Vástyán A, Pintér A, Vajda P. *Ileocystoplastica patkányokban - állatkísérletes modell húgyhólyag megnagyobbítás után kialakuló malignitás tanulmányozására*. Magyar Sebész Társaság Kísérletes Sebészeti Szekció XXIV. Kongresszusa. Debrecen, 2013.

Kardos D, Vastyan A, Pinter A, Vajda P. *Ileocystoplasty In Rats – An Experimental Model*. 15th Congress of Hungarian Association of Pediatric Surgeons with International Participation. Debrecen, 2013.

Kardos D, Váradi B, Horváth J, Kereskai L, Pintér A, Vajda P. Mi történik a bélhámmal? – *Vékonybéllel végzett húgyhólyag-megnagyobbítást követő szövettani elváltozások vizsgálata patkányban*. Magyar Gyermeksebész Társaság 2015. évi Tavaszai Tudományos Ülése. Győr, 2015. - Fiatalok Fóruma I. helyezés ; Dan Young díj

Kardos D, Varadi B, Kereskai L, Horvath J, Pinter A, Vajda P. *What Happens With The Ileal Epithelium Following Ileocystoplasty In Rats? – Histological Findings*. 16th European Congress of Paediatric Surgery. Ljubljana, Slovenia, 2015.

Kardos D, Kispal Z, Pinter A, Vajda P. *Histological findings and frequency of urinary tract infections following urinary bladder augmentation in children – long-term follow-up*. 28th ESPU (European Society for Paediatric Urology) Congress. Barcelona, Spain, 2017.

Juhász Zs, Kispál Z, Kardos D, Vajda P, Pintér A. *Milyen tápcsatorna szegmentumot használjunk a húgyhólyag megnagyobbítására? – POSZTER*. Magyar Gyermeksebész Társaság 2014. évi Tavaszai Tudományos Ülése.

Kispal Z, Vajda P, Kardos D, Klymiuk I, Moissl-Eichinger C, Singer G, Till H. *The urinary bladder microbiome following augmentation in children – POSTER*. 28th ESPU (European Society for Paediatric Urology) Congress. Barcelona, Spain, 2017.

Egyéb, a dolgozat témájához nem kapcsolódó közlemények:

Davidovics K, Davidovics S, Farkas A, Benedek N, Tornoczki T, Kardos D, Davidovics A, Vajda P. *Urothelial Papilloma of the Urinary Bladder in Children: Report of Two Cases*. European J Pediatr Surg Rep. 2020 Jan;8(1):e23-e26.

Dotlacil V, Frybova B, Polívka N, Kardos D, Vajda P, Toczewski K, Pechanová R, Babala J, Rygl M, Patkowski D. *Current management of pediatric appendicitis: A Central European survey*. Adv Clin Exp Med. 2020 Jun;29(6):745-750. (IF: 1,514)

Schlégl ÁT, Pintér Z, Kovács A, Kopjár E, Varga P, Kardos D, Gasz B, Füzesi Z. *Teaching Basic Surgical Skills Using Homemade Tools in Response to COVID-19*. Acad Med. 2020 Jul 8:10.1097/ACM.0000000000003586. (IF: 5,354)

Varga M, Gáti N, Kalóz E, Bíró Zs, Szeverényi Cs, Kardos D, Józsa G. *Gyermekkori csuklótáji törések diagnosztikája ultrahanggal*. Orvosi Hetilap, 2017 Jun; 158 (24). pp. 944-948. (IF: **0,322**)

Józsa G, Kardos D, Oberitter Zs. *The Ishiguro technique for the treatment of mallet fingerfracture in adolescent*. *Novel techniques in arthritis and bone research*. 2017 Apr; 1(1):555552.

Pintér Z, Kardos D, Varga P, Kopjár E, Kovács A, Than P, Rendeki S, Czopf L, Füzesi Z, Schlégl ÁT. *Effectivity of near-peer teaching in training of basic surgical skills - a randomized controlled trial*. BMC Med Educ. 2021 Mar 12;21(1):156. (IF: **1,831**)

Egyéb, a dolgozat témájához nem kapcsolódó előadások és poszterek:

Kardos D, Abaligeti G, Vajda P. *Gyermekkorban végzett húgyhólyag-megnagyobbítást követő csontanyagcsere változások vizsgálata*. 2013. PTE ÁOK Házi TDK Konferencia. Pécs, 2013. – I. helyezés

Kardos D, Abaligeti G, Oberitter Zs, Pinter A, Vajda P. *Changes in bone metabolism after different types of urinary bladder augmentation performed in childhood and adolescence*. 14th European Congress of Paediatric Surgery. Leipzig, Germany, 2013.

Kardos D, Oberitter Zs, Fehér E, Farkas A. *Egy „melléklelet” gondolatébresztő ereje – Herlyn-Werner-Wunderlich szindróma*. Fiala Gyermekgyógyászok XIV. Országos Konferenciája, Szeged, 2015. - III. közönségdíjas előadás

Kardos D, Farkas A, Reglodi D, Horváth J. *A rare Mullerian-duct anomaly - a missing kidney illuminated the case*. Magyar Anatómus Társaság XIX. Kongresszusa. Szeged, 2015.

Kardos D, Józsa G, Juhász Zs, Farkas A. *Gyermekkori abruptio extensor ín sérülés kezelése Ishiguro szerint*. Magyar Gyermeksebész Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság XXII. Gyermektraumatológiai Vándorgyűlése. Tokaj, 2015.

Kardos D, Józsa G , Vajda P. *Tibia törések előfordulása és ellátása a pécsi Gyermekek Manuális Tanszéken*; Kardos D, Józsa G, Kassai T, Vajda P. *Szintetikus és homológ csontpótlás együttes alkalmazása femur csontciszta esetén – esetbemutató*. A Magyar Gyermekeksebész Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság közös Gyermeotraumatológiai Szekciójának XXIII. Vándorgyűlése. Győr, 2016.

Kardos D, Farkas A, Tárnok A. *Harc az elemekkel*. Fiatal Gyermekekgyógyászok XIV. Országos Konferenciája. Mór, 2017. - I. közönségszereplés előadás a gyermeksebészet szekcióban

Kardos D, Juhász Zs, Vajda P. *Bezárás után visszamaradt vendég*. Magyar Gyermekeksebész Társaság 2017. évi Tavaszi Tudományos Ülése. Budapest, 2017.

Kardos D, Horváth-Varga É, Vajda P. *„Duplizität der Fälle”– avagy az esetek párban járnak! Főleg, ha ritkák*. Fiatal Gyermekekgyógyászok XV. Országos Konferenciája. Pécs, 2018.

Kardos D, Molnar K, Juhasz Zs, Vajda P. *Story of a foreign body following a re-do pyeloplasty*. – POSTER. 16th Congress of Hungarian Association of Pediatric Surgeons with International Participation. Szeged, 2017.

Egyéb, a dolgozat témájához nem kapcsolódó könyvfejezet:

„Szövetegyeztetési Technikák” fejezet szerzője, a „KLINIKAI KÉSZSÉGEK OKTATÁSA SZIMULÁCIÓS KÖRNYEZETBEN” című egyetemi kézikönyvben, Szerkesztő: Dr. Schlégl Ádám, Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Központ 2019. ISBN: 978-963-429-443-6

Köszönetnyilvánítás

A PhD értekezésem elkészültéért sok embernek tartozom őszinte köszönettel:

Köszönöm Prof. Dr. Horváth Örs Péternek, majd Prof. Dr. Vereczkei Andrásnak, hogy PhD programjába kerülhettem.

Hálával tartozom mentoromnak és témavezetőmnek Dr. Vajda Péternek a szakmai, valamint tudományos támogatásáért és segítségéért. Szintén köszönöm a dolgozatom megírásában nyújtott segítségét társtémavezetőmnek, Dr. Vástyán Attilának.

Köszönet illeti Fábíán Ildikót és a PTE ÁOK Állatházának többi dolgozóját, akik az állatműtétek elvégzésében és az állatok szakszerű tartásában nyújtottak nélkülözhetetlen segítséget.

Köszönettel tartozom még Dr. Kereskai László klinikai főorvosnak a PTE ÁOK Patológiai Intézetéből a humán és állatminták szövettani elemzésében nyújtott segítségéért. Szintén köszönöm a segítségét Prof. Dr. Tornóczky Tamás intézetvezető professzor úrnak a humán minták elemzésével kapcsolatos szakmai együttműködésért.

Köszönöm az állatminták szövettani feldolgozásában nyújtott segítségét Dr. Horváth Judit egyetemi docensnek, valamint Kiss Anikó és Dittrich Erzsébet asszisztenseknek PTE ÁOK Anatómiai Intézetéből.

A statisztikai módszerek kidolgozásáért Dr. Farkas Kornélia egyetemi adjunktust, az angol nyeli fordításban nyújtott segítségéért Dávidovics Anna egyetemi tanársegédet illeti köszönet a PTE ÁOK Bioanalitikai Intézetéből, illetve PTE ÁOK Egészségügyi Nyelvi és Kommunikációs Intézetéből.

Köszönet illeti továbbá Dr. Kispál Zoltánt is az húgyhólyag-megnagyobbító műtéten átesett betegek korábbi nyomonkövetésében nyújtott segítségéért és a közös kutatások lebonyolításáért.

Köszönöm a PTE ÁOK PhD Iroda munkatársainak a PhD képzésben és fokozatszerzésben nyújtott nélkülözhetetlen segítségüket.

Köszönettel tartozom a PTE KK Gyermekgyógyászati Klinika Manuális Tanszék összes munkatársának a kutatómunkámban nyújtott támogatásukért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném hálámat kifejezni feleségemnek, aki nem csak türelmével és gondoskodásával, hanem szakmai tudásával is nagyban hozzájárult dolgozatom létrejöttéhez. Köszönöm továbbá gyermekeimnek, Borinak és Julinak, illetve családom többi tagjának a támogatásukat és türelmüket.

A dolgozatom nem jöhetett volna létre Prof. Dr. Pintér András (1937-2018) nélkül, aki szakmai, kritikus és egyben emberséges hozzáállásával mély elhivatottságot ébresztett bennem a gyermekurologia iránt. Dolgozatomat az Ő emlékének szeretném ajánlani.

Támogatás: PTE-AOK-KA-2013/28; EFOP 3.6.1-16.2016.00004; EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009



Re-evaluation of histological findings after colcystoplasty and gastrocystoplasty



^aDepartment of Paediatrics, Division of Paediatric Surgery, University of Pecs, Medical School, Hungary

^bDepartment of Pathology, University of Pecs, Medical School, Hungary

^cInstitute of Bioanalysis, University of Pecs, Medical School, Hungary

^dDepartment of Languages for Specific Purposes, University of Pecs, Medical School, Hungary

* Corresponding author. Division of Paediatric Surgery, Department of Paediatrics, University of Pecs, Medical School, 7 Jozsef Attila Street 7623 Pecs, Hungary. Tel.: +36 304945883.

Keywords

Enterocystoplasty; Surveillance cystoscopy; Histology; Bacteriuria; Bladder stone

Received 28 May 2019

Accepted 3 October 2019

Available online 15 October 2019

Daniel J. Kardos ^{a,*}, Laszlo Kereskai ^b, Tamas Tornoczky ^b, Kornelia Farkas ^c, Anna Davidovics ^d, Andrew Farkas ^a, Attila M. Vastyan ^a, Andrew B. Pinter ^a, Peter Vajda ^a

Summary

Introduction

The potential of malignant transformation and its risk factors after bladder augmentation performed in childhood are still unknown. The necessity of surveillance cystoscopies and biopsies has been questioned in the past decade.

Objective

In a previous study, the authors did not detect any malignancy after colcystoplasty (CCP) or gastrocystoplasty (GCP) during the short-term follow-up, however, various alterations of the mucosa were found. A correlation between the nature of histological changes and the frequency of bacterial colonization after CCP were also found. The authors hypothesized that a longer-term follow-up of their patients would reveal an increase in pathological change or show stronger association between the histological alteration, bacterial colonization, and/or stone formation.

Patients and methods

Thirty-five patients (20 cases of colcystoplasties – CCPs; 15 cases of gastrocystoplasties – GCPs) participated in the study published in 2002. All patients were followed biannually with endoscopic assessment and biopsies. Two independent pathologists, evaluated regular biopsies from the native bladder, from the segment used for augmentation and from the anastomosis line. Etiology, frequency of positive urine cultures, and stone events were recorded and compared with histological findings between groups and with the previously published results.

Results

Continuous surveillance allowed the follow-up of 30 patients (CCP 19/20, GCP 11/15) for 20 and 15 years. No malignancies were identified. Results of biopsies showed significant difference between groups (summarized in the tables). Chronic inflammatory changes were found following both types of augmentations, but they were more common in the urothelium following GCP and more common in the colonic mucosa following CCP. The rate of metaplastic lesions was higher after gastrocystoplasty (GCP). Significant association was found between the etiologic factor and the nature of histological change after CCP, as metaplastic lesions occurred only in patients with bladder exstrophy. Stones occurred more frequently in exstrophy patients as well. The nature of the histological changes did not correlate with positive urine cultures in either of the groups. Significantly higher incidence of bacterial colonization and stone occurrence were found after CCP.

Conclusions

Long-term follow-up of the patients failed to reveal an increase in pathological changes, and no malignancies were observed. According to the results of this study, etiology of bladder dysfunction and the type of augmentation might influence the histological alterations after augmentation cystoplasty. The efficiency of surveillance cystoscopies and biopsies are low. The present data suggest that surveillance cystoscopy and biopsy should not be routinely performed, and should be done only if the symptoms are suspicious for malignancy.

Summary Table

CCP	Urothelium (n = 55)	Anastomosis (n = 55)	Bowel mucosa (n = 55)
Normal	33 (60%)	28 (51%)	17 (31%)
Inflammation	19 (34%)	23 (42%)	38 (69%)
Metaplasia	3 (6%)	4 (7%)	0
GCP	Urothelium (n = 36)	Anastomosis (n = 36)	Gastric mucosa (n = 36)
Normal	10 (28%)	15 (42%)	27 (75%)
Inflammation	20 (55%)	16 (44%)	9 (25%)
Metaplasia	6 (17%)	5 (14%)	0

1. Introduction

Augmentation cystoplasty (AC) with full thickness enteral segment is still the gold standard method to increase bladder capacity in selected patients with congenital disorders [such as meningocele (MMC), bladder exstrophy (BE), and posterior urethral valves (PUVs)] or acquired urinary incontinence (e.g. due to tumors and injuries) [1]. Integration of enteral mucosa into the urinary system leads to numerous complications [2]. Increased potential for histological changes in the enteric or in the urothelial mucosa after bladder augmentation performed in childhood is still controversial [3].

Life-long follow-up of the patients is essential; however, there is still no standardized follow-up protocol that is widely accepted and applied. In the aspect of tumor formation, performing surveillance cystoscopy in case of enterocystoplasty is questionable [4]. This is due to, on one hand, the low rate of malignant transformation, lack of proven benefit and high cost; on the other hand, the tumors and precancerous lesions which were found more often incidentally. Furthermore, complicated interpretation of the clinical signs in the MMC patients aggravate the diagnosis at an early stage. During the last decade, many articles were published related to malignancies in the augmented urinary bladder [5].

In 2002, authors of this study published their data involving 20 colocolocystoplasty (CCP) and 15 gastrocystoplasty (GCP) patients. A significant correlation between the nature of histological changes and the frequency of bacterial colonization after CCP was found. Stone occurrence did not show any correlation with the type of histological changes. Sporadic mucosal alterations were found as squamous metaplasia, other metaplasia and, in one case, dysplastic lesion. Biannual screening for histological alterations beginning at 6–10 years following augmentation cystoplasty was recommended [6].

Most patients from the previously mentioned study underwent a continuous follow-up over the last 16 years. The aims of this study at hand were to answer the following questions:

- 1) Sixteen years later, has any malignancy developed after CCP or GCP in the same patients who had participated in the previous study?
- 2) Does the tissue used for augmentation or the etiologic factor of augmentation performed during childhood correlate with the histological changes over these 16 years?
- 3) Is there any significant change over time period of 16 years in the frequency of positive urine cultures or in the stone occurrence?
- 4) Is there any difference in the incidence of positive urine cultures and stone occurrence between CCP and GCP?
- 5) Are the results of urine cultures in relation to the histological findings?
- 6) Is random biopsy sampling a feasible method to detect and follow the histological alterations and predict tumor formation?

2. Materials and methods

In the original study, 35 patients were involved, who underwent CCP ($n = 20$) and GCP ($n = 15$) between 1988 and 2000. Patients were followed prospectively biannually. According to the protocol, published in the original article, initial biopsies were taken at the time of augmentation cystoplasty, then repeated cystoscopies were performed and biopsies were taken every 2 years postoperatively [6]. Two samples for histology were harvested from the mucosa of the native urinary bladder, from the colonic- or gastric-segment used for augmentation and from the anastomosis line. The method of mucosal biopsy was endoscopic or occasionally open surgery (in case of bladder stone removal). In both groups, representative sections were examined with routine hematoxylin and eosin (H&E) staining and evaluated by two independent pathologists. Permission for cystoscopic examinations and biopsies was obtained from all individuals. Consents to the clinical research and the processing method of the data were accepted by the Regional Research Ethics Committee (3043/2007).

The frequency of positive urine cultures representing significant ($>10^5$ colony-forming units (cfu)/ml) bacterial colonization and stone formation were regularly recorded.

Patients, who did not show up on any of the control examinations were questioned over the phone, but they were not included in the study.

Beside the descriptive analysis of the data, the following statistical tests were used, listed in the same order as the aims of the study:

Related to the nature of histological changes, the comparison between the CCP and GCP groups was done by Chi-squared test. Due to the nearly equal number of patients with meningocele (MMC) and bladder exstrophy (BE) in the colocolocystoplasty (CCP) group, comparison between the two etiologic factors of augmentation was done as well.

Within the CCP and gastrocystoplasty (GCP) groups, differences between the incidence of positive urine cultures in the previous evaluations and the evaluations done during this study were analyzed with Wilcoxon signed-rank test. In terms of stone occurrence, due to the nature of the data, only descriptive analysis was made.

The difference between the frequency of positive urine cultures in the two groups (CCP vs GCP) and etiologic factors (MMC vs BE) was analyzed with Mann–Whitney U test. The difference between the stone occurrence was depicted descriptively only.

Association between the histological findings and the results of the urine cultures within groups have been analyzed by Chi-squared test.

For statistical calculations IBM software, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Statistics version 25, has been used ($p < 0.05$ considered to be statistically significant).

3. Results

In summary, 19 patients from the CCP group and 11 patients from the GCP group were eligible for follow-up until 2018. Five patients were excluded from the study, as they

Table 1 Results of the re-evaluation after CCP (n = 19).

Pt. N° – Sex, Age at augm. (yrs.)	Years to last biopsy from augm.	Urothelial Mucosa	Anastomosis	Bowel Mucosa	Frequency of positive urine cultures ^b	Bladder stone(s) ^a
1 – F, 10	22	<u>Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	++	0
2 – F, 13	20	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	++	+
3 – M, 16	21	<u>Intact: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Chronic inflammation: 2</u>	++	++
4 – M, 21	24	<u>Intact: 3</u>	<u>Intact: 2, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 2</u>	+	++++
5 – M, 7	19	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	++	0
6 – M, 6	18	<u>Intact: 2, Squamous metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 2, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 2, Chronic inflammation: 1</u>	++	+++
7 – F, 13	27	<u>Chronic inflammation: 3</u>	<u>Chronic inflammation: 3</u>	<u>Chronic inflammation: 3</u>	++	+
8 – M, 6	12	<u>Chronic inflammation: 2</u>	<u>Chronic inflammation: 2</u>	<u>Chronic inflammation: 2</u>	++	+
9 – M, 7	22	<u>Intact: 2</u>	<u>Intact: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 1</u>	++	++
11 – M, 17	24	<u>Chronic inflammation: 7</u>	<u>Chronic inflammation: 7</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 6</u>	++	+
12 – M, 17	23	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	<u>Chronic inflammation: 1</u>	++	+
13 – M, 12	17	<u>Intact: 2, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 2</u>	<u>Chronic inflammation: 3</u>	++	++++
14 – M, 7	25	<u>Intact: 5, Chronic inflammation: 1, Colonic metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 5, Chronic inflammation: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 6</u>	++	+
15 – M, 11	17	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	+	+
16 – F, 9	16	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	<u>Intact: 1</u>	+	0
17 – M, 11	13	<u>Intact: 2</u>	<u>Intact: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 1</u>	++	0
18 – M, 7	20	<u>Intact: 4, Chronic inflammation: 3, Squamous metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 4, Squamous metaplasia: 3</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 7</u>	++	++
19 – M, 10	16	<u>Intact: 3</u>	<u>Intact: 3</u>	<u>Chronic inflammation: 3</u>	++	+++
20 – F, 11	17	<u>Intact: 3, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 3, Squamous metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 4</u>	+	++

Pt. N° – The number of patients indicates their number from the original study [6]. Note: Patient N°10 is missing. The number after the nature of histological change shows the total events of the alteration which was found. The results of the last biopsies are underlined. + – stone formation 1 time; ++ – stone formation 2 times; +++ – stone formation 3 times; ++++ – stone formation 4 times; +++++ – stone formation 5 times;; + – occasional positive urine cultures (1–49%); ++ – frequent positive urine cultures (50–99%); +++ – always positive urine cultures.

^a 0 – no stone formation.

^b 0 – No positive urine cultures.

Table 2 Results of the re-evaluation after GCP (n = 11).

Pt. N ^o – Sex, Age at augm. (yrs.)	Years to last biopsy from augm.	Histological Findings Following Gastrocystoplasty			Bladder stone(s) ^a
		Urothelial Mucosa	Anastomosis	Gastric Mucosa	
1 – M, 10	17	<u>Chronic inflammation: 2</u>	<u>Intact: 2</u>	<u>Intact: 2</u>	0
4 – M, 20	15	<u>Intact: 1</u>	<u>Chronic inflammation: 1</u>	<u>Chronic inflammation: 1</u>	0
5 – F, 6	20	<u>Intact: 3, Chronic inflammation: 1, Squamous metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 2, Chronic inflammation: 3</u>	<u>Intact: 3, Chronic inflammation: 2</u>	0
7 – M, 14	20	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 2</u>	<u>Intact: 2, Chronic inflammation: 1</u>	0
8 – M, 12	6	<u>Chronic inflammation: 1</u>	<u>Chronic inflammation: 1</u>	<u>Chronic inflammation: 1</u>	0
9 – M, 15	20	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 1, Colonic metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 2</u>	0
10 – F, 15	6	<u>Chronic inflammation: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 2</u>	0
11 – F, 11	20	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 3, Squamous metaplasia: 3, Intestinal metaplasia: 1</u>	<u>Intact: 3, Chronic inflammation: 3, Squamous metaplasia: 2</u>	<u>Intact: 6, Chronic inflammation: 2</u>	0
12 – M, 9	18	<u>Intact: 3, Chronic inflammation: 5</u>	<u>Intact: 4, Chronic inflammation: 4</u>	<u>Intact: 6, Chronic inflammation: 2</u>	0
14 – F, 17	11	<u>Chronic inflammation: 2</u>	<u>Intact: 1, Chronic inflammation: 1</u>	<u>Intact: 2</u>	0
15 – F, 13	12	<u>Chronic inflammation: 1, Squamous metaplasia: 1</u>	<u>Squamous metaplasia: 2</u>	<u>Intact: 2</u>	+ ^b

Pt. N^o – The number of patients indicates their number from the original study [6]. Note: Patient N^o2, 3, 6, 13 are missing. The number after the nature of histological change shows the total events of the alteration which was found. The results of the last biopsies are underlined. + – stone formation 1 time; + – occasional positive urine cultures (1–49%); ++ – frequent positive urine cultures (50–99%).

^a 0 – no stone formation.

^b Stone passed from the kidney.

^c 0 – No positive urine cultures.

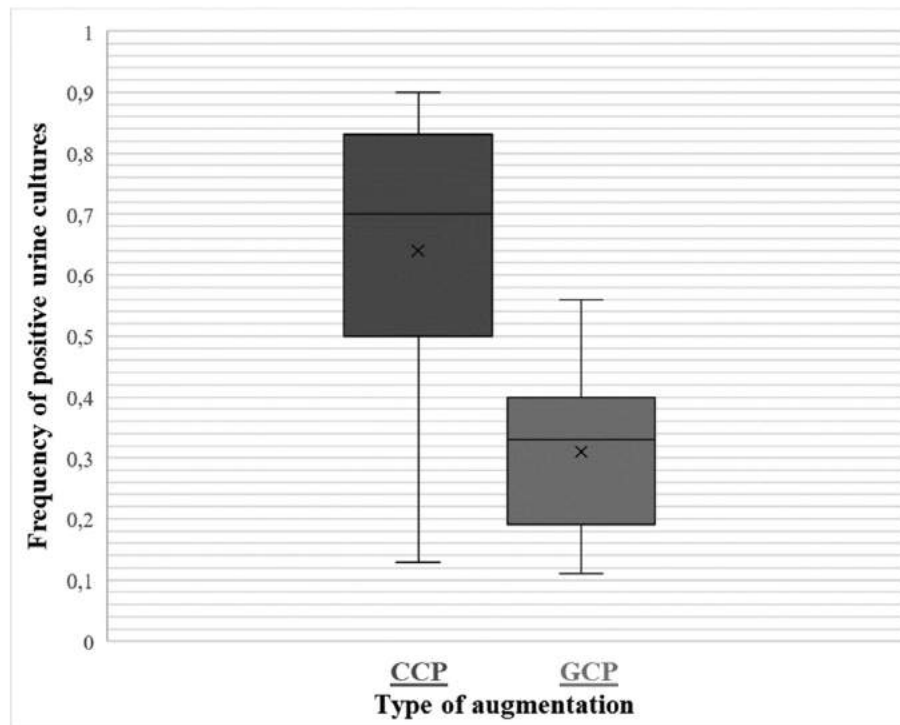


Fig. 1 Frequency of positive urine cultures after cololecystoplasty (median: 0.7, mean: 0.64) and gastrocystoplasty (median: 0.33, mean: 0.31). Significant difference was found ($p < 0.001$).

did not want to participate in any of the control examinations. According to their answers to our phone calls, none of them were diagnosed with cancer during the period of the study.

In the CCP group, 10 patients had BE and 9 had MMC. The GCP group consisted of patients with MMC. Mean patient age at operation was 11.8 (range 6–21) years. Average elapsed time between the evaluations was 11 years in both groups. The mean follow-up period of re-evaluation after CCP and GCP was 19.6 (range 13–27) and 15 (range 6–20) years. All patients were on clean intermittent catheterization, did regular bladder irrigation, and took prophylactic antibiotics as well.

Histological findings, incidence of bacterial colonization in the urine and stone occurrence of this study at hand are detailed in [Tables 1 and 2](#).

CCP, $n = 19$ (Table 1): One patient (Patient N° 10) was lost to follow-up. No macroscopic lesions were found. Normal mucosa was present in 48% of the samples. One patient did not have any changes over the follow-up period, and four patients had completely normal colonic and urothelial mucosa. One of these patients had metaplastic and dysplastic signs before, while the others showed signs of inflammation previously. Inflammation of the mucosa was found in 48% of the samples as well. The bowel epithelium showed the most significant signs of inflammation. Metaplastic changes in the urothelial cells were found in four patients and 4% of all samples, and it was seen only in the original bladder and the anastomosis line. Squamous cell metaplasia was found in two cases in the urothelial mucosa and in two cases at the anastomosis line. Two of these appeared intact over time. Colonic metaplasia was found in

one case, however, the latter samples of the same patient did not show this finding.

GCP, $n = 11$ (Table 2): Four patients (Patient N° 2, 3, 6 and 13) were lost to follow-up. Macroscopically no suspicious growth was noticed. The mucosa did not show any alterations in 48% of the samples. Chronic inflammation presented in 42% in this group, most affecting the urothelial mucosa. In contrast, the gastric mucosa showed the least signs of inflammation. Both the urothelial mucosa and the anastomosis showed 11 (10% of all samples) metaplastic changes in four patients. All of them were squamous metaplasia of the urothelium, except for one, which was a colonic metaplasia of the gastric mucosa at the anastomosis line. In two patients the metaplastic alterations did not show up in the subsequent biopsies.

Detailed results of the statistical analyses as listed according to the order of questions in the introduction section:

CCP vs GCP: No cases of malignancy were identified in either group during the follow-up. Data showed significant association between the type of augmentation and the nature of histological changes in the urothelial mucosa ($p = 0.003$) and in the colonic/gastric mucosa ($p < 0.001$). More frequent inflammatory and metaplastic changes were found on the urothelium over these years after GCP. The mucosa of the colon showed more inflammatory changes than the gastric mucosa.

MMC vs BE: Significant association was found between the etiologic factors and the nature of histological alterations in the urothelial mucosa ($p = 0.009$) and the anastomosis line ($p = 0.025$). Metaplastic lesions of the urothelium occurred only in patients with bladder

exstrophy (BE) who had undergone gastrocystoplasty for that condition in childhood. The colonic mucosa did not show any histological changes involving this connection.

The rate of bacterial colonization did not change significantly neither after CCP, nor GCP during the longer follow-up. The re-evaluation revealed more frequent stone formation within the CCP group than the previously published findings (13 vs 30). Out of the 19 patients, 15 had at least one stone, and eight patients had multiple stones. Only one bladder stone was identified in the GCP group, which originated from the kidney.

None of the patients presented signs of urinary tract infection (UTI) at the time when the samples were taken during this study. The overall mean frequency of positive urine cultures was 64% after CCP and 31% after GCP. Significant difference was found between the two groups (Fig. 1, $p < 0.001$). Stones mostly occurred after CCP.

Within the CCP group, the frequency of positive urine cultures did not depend on the etiological factor (MMC vs BE). Presence of stones was more common in BE patients (18 vs 12).

The nature of histological changes did not show any relation with the results of the urine cultures in either group.

4. Discussion

Malignancies related to augmentation cystoplasty in the augmented bladder are rare entities. Even though the number of reported cases is growing, the clear prevalence and risks are still not established. According to the latest and relevant studies, the estimated incidence of tumor formation in patients with congenital bladder anomalies after enterocystoplasty is between 1% and 5% [3,7]. Due to their inherent potential, MMC and BE both serve as risk factors for developing bladder tumors [8]. Almost the same incidence of tumor formation was found related to congenital bladder anomalies with or without bladder augmentation using the colon or the ileum [5,9]. In contrast, GCP is considered to have a 2–3 fold increased risk to develop tumor in the augmented bladder [10]. Miscellaneous risk factors, reported in the literature, include post-renal transplantation immunosuppression and environmental factors, such as significant tobacco use [11]. Bladder augmentation related cancers are mostly transitional cell tumors and adenocarcinoma. The average latency period after augmentation is between 19 and 39 years [7,10]. Tumors in the augmented bladder are usually aggressive, most of them are only recognized in the advanced stage, and have poor survival [7,12].

The evidence from the literature is still inconclusive regarding routine endoscopic surveillance for malignant or premalignant changes after bladder augmentation. In the 1990s and early 2000s the trend was to perform annual or biannual surveillance cystoscopies after a minimum of 10 years of follow-up [13]. Hamid, Higuchi and Husmann et al. published the first series about the low effectiveness of cystoscopy screening [14,15]. Husmann et al. suggested a protocol which indicates that cystoscopy is only recommended when recurrent symptomatic bacteriuria, gross hematuria, chronic pelvic pain or other suspicious

symptoms occur [4]. Until now, we have not found any publications where tumors could be found in the early stages, using the Husmann protocol. Gastrocystoplasty was not included in Husmann's studies. Most recently, Boissier et al. recommended regular endoscopic follow-up after GCP, because their investigation revealed a two to three-fold increase in the incidence of bladder cancer compared to previous reports [16].

The inconsistency regarding screening cystoscopy is based on several factors. An early diagnosis would be essential, due to the aggressive behavior of the tumors. Direct visualization of the augmented bladder is the most evident way to diagnose a tumor, compared to other methods such as urine cytology or radiographic imaging [7]. Other complications, like bladder stones can develop silently in almost one-third of the cases, thus cystoscopy can lead to earlier diagnosis, making it easier to provide treatment [15]. Cystoscopy through a continent urostomy or in patients with MMC is simple and painless. Although, it cannot be regarded as an indication, biopsies and their histological and molecular examinations lead us closer to the understanding of the nature of tumor formation in the augmented bladder. As an alternative, animal models already exist [17]. From the other aspect, cystoscopy is an invasive intervention and its cost-effectiveness is low as well [18]. The overall sensitivity of endoscopic screening is low, due to the low incidence of malignancies in the augmented bladder. According to Husmann et al., if cystoscopy was 100% sensitive, approximately 980 cystoscopies would have to be performed to diagnose one tumor. In addition, in a significant number of published cases, tumor formation after augmentation had normal cystoscopic findings 4 to 18 months before the invasive bladder tumor was diagnosed [15].

This study on hand focused on the histological alterations, urinary tract infections and stone occurrence in patients subjected to augmentation cystoplasty in childhood using colon or stomach with long-term follow-up. The patients had been evaluated 16 years ago and they were now reevaluated and screened for any changes. The limitations of our study include, the low and unequal number of patients, and the five patients who were lost to follow-up. We summarize our findings following the order of questions raised in the introduction section:

- 1) In the original study we did not find any malignancies, and the present study has shown that after CCP and GCP, at a mean of 19.6 and 15 years postoperatively, no malignant lesions have developed. According to the literature, considering the highest prevalence and the low number of our patients, we would expect one tumor after CCP and three tumors after GCP, however 14 patients altogether had less than 19 years of follow-up [7,10,11,16]. As of now, more than 100 bladder augmentations have been performed in our department. With the regular cystoscopies we found one *in situ* adenocarcinoma as a polypoid lesion, 11 years after CCP in a patient who was operated in 2001 [19]. After polypectomy, the patient has been tumor free for 7 years.
- 2) The histological alterations of the native bladder and the colonic or gastric segment showed significant difference

after CCP and GCP. The most common histological changes were chronic inflammation and squamous metaplasia. Signs of inflammation were detected mostly in the mucosa of the large bowel, and, to a lesser extent, in the gastric mucosa. In contrast, inflammatory and metaplastic changes in the urothelial cells were more common in the urothelial mucosa and anastomosis line after GCP. The mucosa of the colon or the stomach did not show metaplastic alterations. In relation to GCP, the urothelium is under a chronic acid stimulus, which may explain this finding. The gastric epithelium seems to be defensive against extrinsic stimuli many years after the operation. After CCP, due to mucus production, the higher incidence of bacterial colonization and stone occurrence can be the cause. As the native bladder forms the base of the reconstructed reservoir, it suffers the most from the mechanical and irritative stimulus, which might be an explanation for this observation. In 12 patients, signs of chronic inflammation or metaplastic lesions did not occur persistently. Currently squamous cell and colonic metaplasia of the urothelium are not considered as precancerous lesions. These alterations are reversible, as the triggering factors (inflammation or mechanical irritation, like stones or catheterization) disappear [20].

Within the CCP group, the histological changes of the native bladder and the anastomosis line showed significant difference between MMC and BE patients, however, there were no differences in the colonic mucosa. Metaplastic lesions showed up only after BE. These findings contribute to the data, that the etiologic factors of bladder reconstruction might influence the histological changes [5].

- 3) 4) and 5) Permanent bacterial colonization may be a significant factor for tumor formation, although, many clinical researches do not share that theory [14,21–23]. Evaluation of bacteriuria is challenging in the MMC population, where the sensory impairment influences the differentiation between symptomatic vs asymptomatic bacteriuria. Furthermore, yet unknown microorganisms from the urinary and alimentary tract – altered microbiome – might play a role in the interaction between the different tissues anastomosed together [24]. We did not find any association between the positive urine cultures and the histological results either, which supports the theory that bacterial presence in the urine is not as significant as previously thought. Nevertheless, we found that after CCP there is a significantly higher incidence of positive urine cultures vs GCP, both in short- and long-term [25]. It coincides with the findings that stone formation was significantly higher and progressed with time after CCP which is conclusive with the literature [26]. Despite the hypothetically increased risk, studies showed that stone occurrence is the same among patients who have bladder cancer with or without previous augmentation [21]. As no malignancy has been developed, no correlation could be calculated between the frequency of positive urine cultures, stone occurrence, and tumor formation.
- 6). Histological alterations of the mucosa in the augmented bladder can be followed by random sampling, but considering recent publications and this study, the

effectiveness of these surveillance cystoscopies and biopsies is low. Focusing more on the clinical symptoms might be a more efficient strategy both for the patients and for the medical environment.

5. Conclusions

The authors did not find any malignancies in their patients during the long-term follow-up of 15–20 years; however, various histological alterations (chronic inflammation, metaplasia) were observed following CCP and GCP. According to these findings, the type of augmentation and the etiologic factors of augmentation cystoplasty might influence the histological changes. The frequency of bacterial colonization and stone formation did not change with time after CCP and GCP, but patients from the former group, are affected more. No association was found between the presence of bacteria in the urine and the nature of histological appearance of the augmented bladder, although the long-term effect of chronic bacteriuria on malignant transformations cannot be excluded. The effectiveness of surveillance cystoscopies and biopsies are low, and the authors do not recommend these to be routinely performed, unless suspicious symptoms for malignancy occur. Life-long follow-up of patients and further studies are needed to evaluate the associations between the different complications and the potential development of a malignant transformation following bladder augmentation performed in childhood.

Author statements

Acknowledgments

Authors dedicate this paper to the memory of Professor Andrew Pinter (1937–2018).

The authors thank Professor M. Kaefer for his assistance in the preparation of the article.

Ethical approval

Permission for cystoscopic examinations and biopsies was obtained from all individuals. Consents to the clinical research and the processing method of the data were accepted by the Regional Research Ethics Committee (3043/2007).

Competing interests

The study was supported in the decision to submit the manuscript for publication by the tender of EFOP 3.6.1–16.2016.00004 and EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009, University of Pecs, Medical School, Hungary.

References

- [1] Biers SM, Venn SN, Greenwell TJ. The past, present and future of augmentation cystoplasty. *BJU Int* 2012;109(9):1280–93.

- [2] Stein R, Schroder A, Thuroff JW. Bladder augmentation and urinary diversion in patients with neurogenic bladder: surgical considerations. *J Pediatr Urol* 2012;8(2):153–61.
- [3] Rove KO, Husmann DA, Wilcox DT, Vricella GJ, Higuchi TT. Systematic review of bladder cancer outcomes in patients with spina bifida. *J Pediatr Urol* 2017;13(5):456. e1–e9.
- [4] Husmann D, Fox J, Higuchi T. Malignancy following bladder augmentation: recommendations for long-term follow-up and cancer screening. *AUA Update Ser* 2011;30(22):222–7.
- [5] Rove KO, Higuchi TT. Monitoring and malignancy concerns in patients with congenital bladder anomalies. *Curr Opin Urol* 2016;26(4):344–50.
- [6] Vajda P, Kaiser L, Magyarlaki T, Farkas A, Vastyan AM, Pinter AB. Histological findings after colocystoplasty and gastrocystoplasty. *J Urol* 2002;168(2):698–701 [discussion].
- [7] Biardeau X, Chartier-Kastler E, Roupret M, Phe V. Risk of malignancy after augmentation cystoplasty: a systematic review. *Neurourol Urodyn* 2016;35(6):675–82.
- [8] Husmann DA. Malignancy after gastrointestinal augmentation in childhood. *Ther Adv Urol* 2009;1(1):5–11.
- [9] Austin JC, Elliott S, Cooper CS. Patients with spina bifida and bladder cancer: atypical presentation, advanced stage and poor survival. *J Urol* 2007;178(3 Pt 1):798–801.
- [10] Husmann DA. Mortality following augmentation cystoplasty: a transitional urologist's viewpoint. *J Pediatr Urol* 2017;13(4):358–64.
- [11] Husmann DA, Rathbun SR. Long-term follow up of enteric bladder augmentations: the risk for malignancy. *J Pediatr Urol* 2008;4(5):381–5. discussion 6.
- [12] Williamson SR, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R, Cheng L. Unique clinicopathologic and molecular characteristics of urinary bladder tumors in children and young adults. *Urol Oncol* 2013;31(4):414–26.
- [13] Soergel TM, Cain MP, Misseri R, Gardner TA, Koch MO, Rink RC. Transitional cell carcinoma of the bladder following augmentation cystoplasty for the neuropathic bladder. *J Urol* 2004;172(4 Pt 2):1649–51. discussion 51-2.
- [14] Hamid R, Greenwell TJ, Nethercliffe JM, Freeman A, Venn SN, Woodhouse CR. Routine surveillance cystoscopy for patients with augmentation and substitution cystoplasty for benign urological conditions: is it necessary? *BJU Int* 2009;104(3):392–5.
- [15] Higuchi TT, Fox JA, Husmann DA. Annual endoscopy and urine cytology for the surveillance of bladder tumors after enterocystoplasty for congenital bladder anomalies. *J Urol* 2011;186(5):1791–5.
- [16] Boissier R, Di Crocco E, Faure A, Hery G, Delaporte V, Lechevallier E, et al. What is the outcome of paediatric gastrocystoplasty when the patients reach adulthood? *BJU Int* 2016;118(6):980–6.
- [17] Little Jr JS, Klee LW, Hoover DM, Rink RC. Long-term histopathological changes observed in rats subjected to augmentation cystoplasty. *J Urol* 1994;152(2 Pt 2):720–4.
- [18] Kokorowski PJ, Routh JC, Borer JG, Estrada CR, Bauer SB, Nelson CP. Screening for malignancy after augmentation cystoplasty in children with spina bifida: a decision analysis. *J Urol* 2011;186(4):1437–43.
- [19] Kispal ZF, Kardos D, Jilling T, Kereskai L, Isaacs M, Balogh DL, et al. Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment. *J Pediatr Urol* 2015;11(6):349. e1-6.
- [20] Liang FX, Bosland MC, Huang H, Romih R, Baptiste S, Deng FM, et al. Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement. *J Cell Biol* 2005;171(5):835–44.
- [21] Higuchi TT, Granberg CF, Fox JA, Husmann DA. Augmentation cystoplasty and risk of neoplasia: fact, fiction and controversy. *J Urol* 2010;184(6):2492–6.
- [22] Biardeau X, Chartier-Kastler E, Roupret M, Phe V. Risk of malignancy after augmentation cystoplasty: a systematic review. *Neurourol Urodyn* 2016;35(6):675–82.
- [23] Michaud DS. Chronic inflammation and bladder cancer. *Urol Oncol* 2007;25(3):260–8.
- [24] Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract—a role beyond infection. *Nat Rev Urol* 2015;12(2):81–90.
- [25] DeFoor W, Minevich E, Reeves D, Tackett L, Wacksman J, Sheldon C. Gastrocystoplasty: long-term followup. *J Urol* 2003;170(4 Pt 2):1647–9. discussion 9-50.
- [26] Kaefer M, Hendren WH, Bauer SB, Goldenblatt P, Peters CA, Atala A, et al. Reservoir calculi: a comparison of reservoirs constructed from stomach and other enteric segments. *J Urol* 1998;160(6 Pt 1):2187–90.

Patkánymodell ileocystoplasticát követő nyálkahártya-változások vizsgálatára

Kardos Dániel dr.¹, Váradi Bianka dr.¹, Kispál Zoltán dr.², Kereskai László dr.³, Pintér András dr.¹, Vajda Péter dr.¹

¹Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika, Sebészeti Osztály, Pécs (igazgató: Decsi Tamás dr.)

²Department of Paediatric and Adolescent Surgery-University of Graz (intézetvezető: Holger Till MD)

³Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Patológiai Intézet, Pécs (intézetvezető: Tornóczki Tamás dr.)

Levelezési cím:
Dr. Kardos Dániel
7623 Pécs, József Attila u. 7.
E-mail: kardos.daniel@pte.hu;
danielj.kardos@gmail.com

ÖSSZEFOGLALÁS

Bevezetés: A gyermekkorban végzett húgyhólyag-megnagyobbítás (augmentáció) műtéttel összefüggésbe hozható szövdményei közül a malignus elfajulás a legkevésbé ismert. Emberben a tumorgenezis – számos ok miatt – csak nehezen vizsgálható. A szövettani változások tanulmányozására a patkány az egyik legalkalmasabb állatmodell. A szerzők egy erre a célra kidolgozott patkánymodell segítségével vizsgálták hosszútávon az ileocystoplasticát követő szövettani elváltozásokat.

Anyag és módszerek: A szerzők 45 fiatal (3-5 hónapos), hím Wistar-patkányban végeztek műtétet (30 ileocystoplastica, 15 álműtét). Az állatokat 12, 18 és 24 hónapig követték nyomon. Az augmentált hólyag preparátumokat HE festett metszeteken vizsgálták.

Eredmények: A ileocystoplasticán átesett állatok 60%-a (18/30) élte túl a tervezett nyomonkövetési időt. Az elhullások okai többek között érnél-elégtelenség, urethra elzáródás, mechanikus ileus, anasztomózis-elégtelenség és infekció voltak. Tizenkét hónappal a műtét után két patkányban hólyagkövet, egyben közülük laphám-metapláziát találtak. Huszonnégy hónappal az augmentáció után egy állatban polyposus elváltozást, két állatban a bélnyálkahártya-hipertrófiás megvastagodását figyelték meg, amelyek szövettanilag hipertrófiás urotheliumnak és urotheliális karcinómának bizonyultak. Általános megfigyelés volt, hogy az idővel arányosan az ileum nyálkahártyáját egyre nagyobb mértékben váltotta fel urothelium. Az áloperált csoportban elhullás, makro-, vagy mikroszkópos elváltozás nem volt megfigyelhető.

Következtetések: A megfigyelt szövettani változások alapján idővel a vékonybél hámfájának urotheliális transzformációja következik be, melyben mind a vizelet konstans jelenléte, mind az urothelium közelsége egyaránt szerepet játszhat.

KULCSSZAVAK

ILEOCYSTOPLASTICA, PATKÁNY, ÁLLATKÍSÉRLETES MODELL, METAPLASIA

Alterations of the ileal mucosa after ilocystoplasty – animal model in rats

SUMMARY

Objective: To date, little is known about the long-term malignant transformations related to urinary bladder augmentation. Histological investigations of tumour genesis after ileocystoplasty in humans are difficult. Rats are commonly used models for this purpose. Based on the results of the literature, the authors adopted a rat model, in which the long-term kinetics of tumour genesis can be explored.

Materials and methods: Forty-five young, male Wistar rats were operated on (30 ileocystoplasty and 15 sham-operation). The animals were followed-up for 12, 18 and 24 months, then the bladder, after which the bladder was harvested. Histological examination of the native bladder mucosa, the mucosa of the ileal segment and the anastomotic line was undertaken.

Results: In the ileocystoplasty group 60% (18/30) of the animals, in the sham-operated group all of the animals survived the planned follow-up period. Among others the main complications were the failure of the vascular pedicle, urethral obstruction, ileus and anastomotic leakage. In 2 rats bladder stones developed after 12 months. In one of them squamous cell metaplasia was found. In 1 rat a polypoid-like overgrowth and in 2 rats hypertrophic overgrowth of the ileal mucosa were observed after 24 months. Microscopically these alterations were represented as hypertrophic urothelium and urothelial carcinoma. Generally we observed, that the columnar epithelium was replaced by urothelial cells progressively by time. In the 15 sham-operated animals, no complications were found.

Conclusion: According to our findings there are inductive factors, such as the constant presence of urine and the proximity of the urothelium, which might play role in the transformation of the ileal epithelium.

KEYWORDS

ILEOCYSTOPLASTY, RAT, ANIMAL EXPERIMENT, METAPLASIA

A húgyhólyag megnagyobbítása (augmentáció) gyermekkorban leggyakrabban veleszületett fejlődési rendelleneségek (meningomyelocele, extrophia vesicae), ritkábban szerzett okok (tumor, trauma, iatrogenia) következtében létrejövő vizeletinkontinencia miatt történik. Az augmentációra napjainkban leginkább vékonybél (ileum) szegmentumot használnak fel (ileocystoplastica). A húgyhólyag megnagyobbítását követően – a szövődmények megelőzése céljából – élethosszig tartó nyomonkövetésre van szükség (1). Ritka, de talán a legjelentősebb hosszútávon jelentkező szövődmény a megnagyobbított húgyhólyagban kialakuló malignitás. A tumor kialakulásának esélye a normál populációhoz képest évtizedenként kb. 1,5%-al nő a béllal megnagyobbított húgyhólyagban (2, 3). Az augmentációt követő premalignus és malignus folyamatok korai felismerése mindmáig megoldatlan kérdés. Ennek fő oka, hogy a megelőzési céllal klinikánkon is végzett cisztoszkópos vizsgálatok és mintavételek érzékenysége alacsony. További okok, hogy a beavatkozások költségesek és a betegek számára megterhelőek (4). Az állatkísérletes vizsgálatok ezért lehetőséget adnak az augmentált hólyagban létrejövő szövettani változások korai és részletesebb megismerésére.

Az elmúlt 25 évben, számos közlemény jelent meg patkányokban végzett ileocystoplasticáról (5–15). A hisztopatológiai vizsgálatok döntően tranzicionális sejtes karcinómát és laplham-metapláziát igazoltak (6, 7). A kutatócsoportok többsége azt is megfigyelte, hogy a hólyag megnagyobbítására használt ileum nyálkahártyáján urothelium jelenik meg, hasonlóan a mucosa-fosztott béllal történő hólyagmagnagyobbítást (seromuscularis enterocystoplastica) követő urothelizációhoz (8). Ezt a jelenséget egyes szerzők az urothelium bélhámra történő „rákúszásának”, migrációjának, mások a hyperplasticus urothelium bélhámra borulásának tulajdonítják (5, 7). Nem ismert, hogy ez milyen módon és milyen mintázatot követve jön létre (7, 9, 10). A közleményekben az állatok nyomonkövetési ideje az egy évet többnyire nem éri el és a szerzők nem az urothelizációra helyezik a hangsúlyt (7, 9). A legelterjedtebben használt laboratóriumi állatban, a patkányban, a hólyag-augmentációt követően, az állatok 2-2,5 éves életciklusa alatt, nagy valószínűséggel alakulhatnak ki tumorok. A szövettani feldolgozás technikailag könnyű és K.O. mutáns állatok is elérhetőek szubmikroszkópos elváltozások vizsgálatára.

A szerzők korábbi klinikai és állatkísérletes vizsgálataik során már találtak arra utaló molekuláris változásokat, hogy a megnagyobbításra használt vékonybél hámjának megváltozik az expressziós mintázata, mely analógiája lehet a patkányban megfigyelt szövettani jelenségeknek (16).

Célunk olyan patkánymodell létrehozása volt, mely alkalmas a vékonybéllal végzett húgyhólyag-magnagyobbítást követő urothelizációs jelenség hosszú távú vizsgálatára.

Anyag és módszer

Az állatkísérletek a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Állatkísérletes Laboratóriumának műtőjében, állatkísérleti engedély (BA02/2000-15/2012) birtokában zajlot-

tak. Vizsgálatunkat 45, 3-5 hónapos, 200-400 g súlyú, hím Wistar-patkányban végeztük (30 ileocystoplastica, 15 álműtét). A műtétek előtt az állatok 24 óráig csak folyadékot fogyaszthattak. Az altatás intraperitonealis diazepammal (Seduxen, D: 10 mg/kg) és ketaminnal (Calypsol, D: 50 mg/kg) történt. A két szert egymás után 10 perccel adtuk be. Minden műtétet perioperatív, három napig folytatott, intramuscularisan adott antibiotikum (cefuroxim – Zinacef, D: 50 mg/kg) védelemben végeztünk. A műtéteket hagyományos és mikrosebészeti eszközökkel, a bél-bél- és bél-hólyag-anasztomózis elkészítését 3,5-szeres lupe nagyítással végeztük.

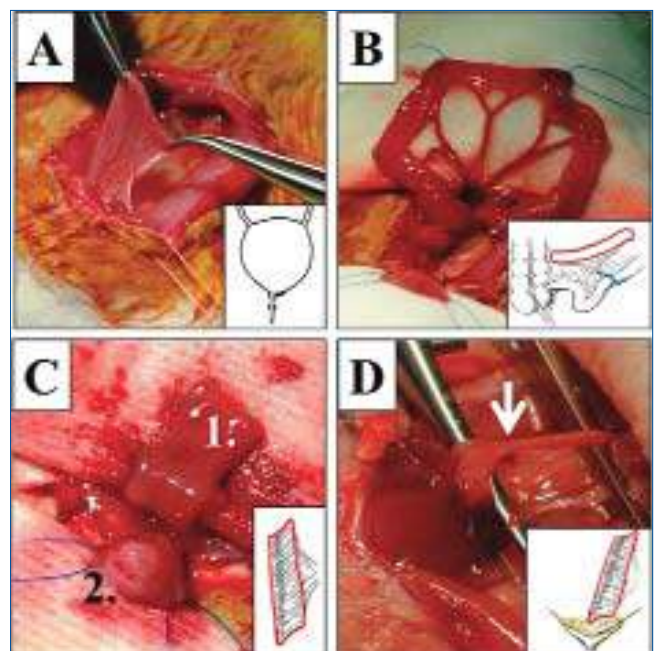
I.) Ileocystoplastica – 30 patkányban

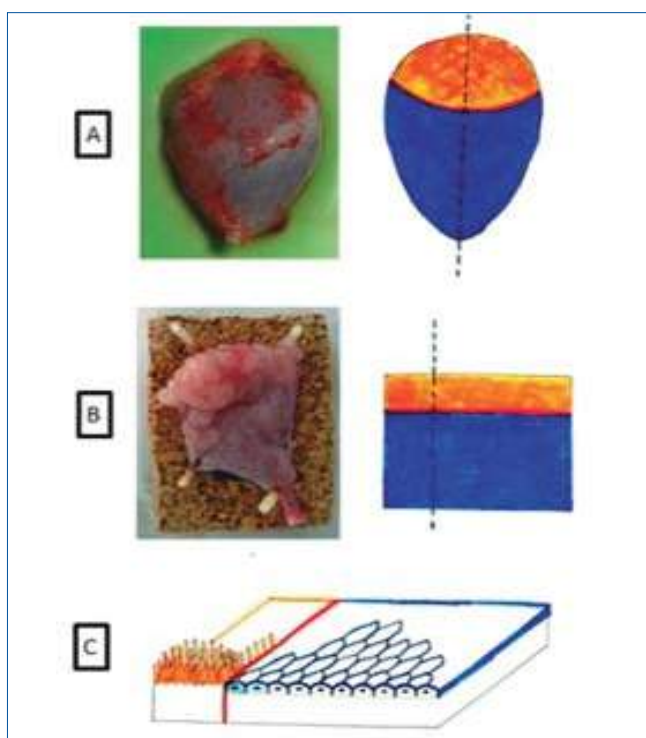
Az augmentációs technika részleteit a *Burgu és munkatársai* által kidolgozott módszer leírása és a szerzővel történt többszöri személyes egyeztetés szolgáltatta (14).

Az állat borotválását és lemosását követő median laparotomia után felkerestük a húgyhólyagot, melybe tartóölteket helyeztünk (1.A ábra).

A vékonybélben egy megfelelő hosszúságú érnyéllel rendelkező, kb. 15 mm hosszúságú szegmenst kerestünk fel (1.B ábra). Ezt követően a kiválasztott vékonybélszakaszhoz tartozó érnyelet óvatosan sceletizáltuk, majd a bélszegmenst orális és aborális végén átvágva iktattuk ki a béltraktusból. Az ileum folyamatosságát a szabad bélvégek end-to-end anasztomózissal, egyrétegű csomós öltésekkel állítottuk helyre, melyhez 6/0-ás sodrott, felszívódó fonalat használtunk. A kirekesztett ileumszakaszt anti-mesenterialis felhasítottuk (detubulari-

1. ÁBRA: ILEUMMAL VÉGZETT HÚGYHÓLYAG-MEGNAGYOBBÍTÁS EGYES LÉPÉSEI PATKÁNYBAN. A: HÚGYHÓLYAG FELKERESÉSE ÉS IDENTIKIFÁLÁSA; B: 12-15 MM HOSSZÚ ILEUM SZEGMENS KIVÁLASZTÁSA; C: DETUBULARIZÁLT ILEUM (1.) ÉS A NATÍV HÚGYHÓLYAG (2.); D: AZ AUGMENTÁLT HÚGYHÓLYAG AZ ILEUM SZEGMENS ÉRNYELÉVEL (FEHÉR NYÍL)





2. ÁBRA: ILEUMMAL VÉGZETT HÚGYHÓLYAG-MEGNAGYOBBÍTÁST KÖVETŐ FELDOLGOZÁS LÉPÉSEI PATKÁNYBAN.
A: EGYBEN ELTÁVOLÍTOTT HÚGYHÓLYAG; B: KITERÍTETT FÉL HÚGYHÓLYAG; JÓL LÁTSZIK A NATÍV HÓLYAG – KÉK – ÉS AZ ILEUM – SÁRGA – KÖZÖTTI ANASZTOMÓZIS VONAL – PIROS –; C: A SZÖVETTANI FELDOLGOZÁS SÍKJA

záltuk) és nyálkahártyáját fiziológias sóval mechanikusan tisztítottuk. Ezt követően a húgyhólyagot median-sagittális síkban megnyitottuk. A húgyhólyagot, valamint az augmentációra előkészített és 90 fokkal elforgatott ileum szegmentumot egyrétegű, felszívódó, tovaftató varratsorral egyesítettük. Ehhez az ugyancsak 6/0-ás felszívódó fonalat használtuk. Előbb a húgyhólyag hátsó falán, majd az elülsőn készítettük el az anasztomózist (1.C, D ábra).

A műtét alatt a szervek kiszáradásának és az állat hypothermiájának megelőzése céljából többször testmeleg fiziológias sócsepegtettünk a hasúri szervekre. A vékonybél-szegmentummal megnagyobbított húgyhólyag létrehozása után a hasüreget meleg fiziológias sóoldattal átöblítettük és a hasfalat két rétegben, tovaftató varratsorral, 3/0-ás felszívódó fonalat használva zártuk.

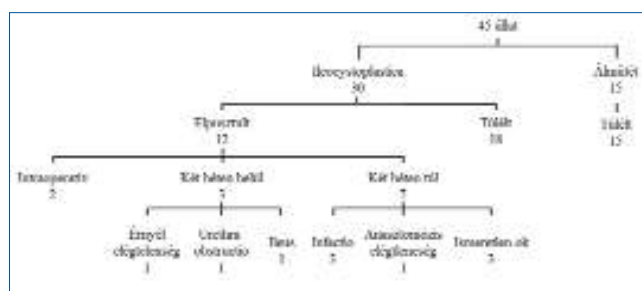
A beavatkozások után az állatok 24 órán át csak folyadékot kaptak. Fájdalomcsillapítás céljából az állatok vizébe egy héten át ketoprofent kevertünk.

A műtési idő átlagosan 60 perc (45–90 perc) volt.

Az állatokat 12 (A-csoport), 18 (B-csoport) és 24 (C-csoport) hónap után dolgoztuk fel.

II.) Álműtét – 15 patkányban

Ebben a csoportban augmentációra nem került sor, csupán a húgyhólyag megnyitása (sectio alta) és bezárása történt 6/0-



1. TÁBLÁZAT: PATKÁNYOKBAN VÉKONYBÉLLEL VÉGZETT HÚGYHÓLYAG-MEGNAGYOBBÍTÁST KÖVETŐ MŰTÉTI SZÖVŐDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

ás felszívódó, tovaftató varratsorral. Minden más tekintetben az ileocystoplasticánál leírtak szerint jártunk el. Mindegyik állatot 24 hónap után dolgoztuk fel (D-csoport).

Feldolgozás

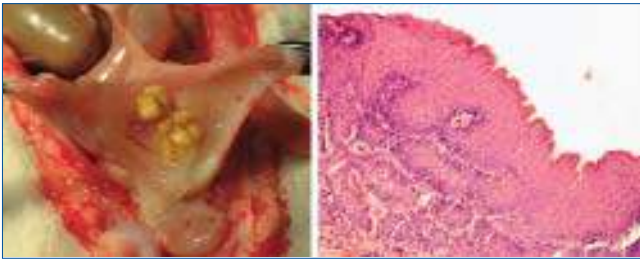
A műtét után a patkányokat az állattartási előírásoknak megfelelő körülmények között, a PTE ÁOK Állatházában tartottuk. A szöveti iszkémiás károsodás megelőzésére és a fájdalom minimalizálására, a megnagyobbított (és a kontroll) húgyhólyagok eltávolítását a műtési beavatkozásnál ismertetett altatásban végeztük. Median laparotómiát követően a hólyagon a hólyagnyakig preparáltunk, ahol azt átvágtuk. Ezt követően került sor az uréterek és végül az érnyél átvágására. A húgyhólyagot median-sagittálisan kettémetszettük, így kiterített „két fél” húgyhólyagot kaptunk, melyen jól láthatóak voltak a különböző típusú nyálkahártyák és a köztük lévő anasztomózis vonal. Makroszkóposan, illetve lupe alatt történő átvizsgálás után a megnagyobbított húgyhólyagot parafa lapon kiterítve 6%-os puffertolt formalinban fixáltuk. Az orientáció a minták feldolgozása során kulcsfontosságú volt. A kiterített helyzet lehetővé tette, hogy később egy metszeten vizsgálható legyen mind a hólyagmegnagyobbításra használt vékonybél, mind az anasztomózis, mind az eredeti hólyag nyálkahártyája (2. ábra). Az állatokat intrakardiális kálium-klorid adásával termináltuk. Az áloperált csoport feldolgozása is a fent ismertetett módon történt.

A formalin fixált mintákat paraffinba ágyaztuk, majd az anasztomózis vonalra merőlegesen, 5 µm-os metszeteket készítettünk. A preparátumokat hematoxilín-eozinnal festettük. A minták elemzéséhez független patológus segítségét is igénybe vettük.

Eredmények

I.) Ileocystoplastica

A 30 húgyhólyag megnagyobbításra átesett állatból összesen 18 állat (60%) élte túl a tervezett utánkövetési időt. Az elhullások idejét és okait táblázatban foglaltuk össze (1. táblázat). A túlélő 18 állatban minden esetben nyákos vizelettel kitöltött húgyhólyagot találtunk. A supravescalis húgyutak makroszkó-



3. ÁBRA: HÓLYAGKÖVEK PATKÁNYBAN VÉGZETT ILEOCYSTOPLASTICÁT KÖVETŐEN 12 HÓNAPPAL AZ AUGMENTÁLT HÚGYHÓLYAGBAN (BAL). LAPHÁM METAPLASIA(HE, 10X) AZ EREDETI HÓLYAG TERÜLETÉRŐL, UGYAN ABBÓL A PREPARÁTUMBÓL (JOBB)

posan megtekintve kórosat nem mutattak. A további makro- és mikroszkópos megfigyeléseinket az alábbiakban csoportként részletezzük.

A-csoport (12 hónap)

Két patkányban hólyagköveket találtunk a hólyagban. Az egyik állat esetén a hólyagkő mellett a natív hólyag területén laphám-metaplázia alakult ki (3. ábra). Minden mintában megfigyelhető volt az urothelium megvastagodása és több sejtrétegűvé válása az anasztomózis vonalhoz közeledve. Az anasztomózis vonalban, illetve az ezzel szomszédos területeken lévő bélbolyhokon, a bélhámot felváltva, urothelium volt megfigyelhető. Az augmentáció helyétől távolodva, az urothelium már csak helyenként, a bolyhok csúcsi részén volt látható. Ezen heterogén villusok alatt a crypták hosszúsága is rövidülni látszott, fordított arányban csökkenve az anasztomózistól mért távolsággal. Az ileum „új” háma morfológiailag normális urothelium képét mutatta.

B-csoport (18 hónap)

A nyákon túl más makroszkópos elváltozást nem észleltünk. Mikroszkóposan vizsgálva a mintákat, az „A” csoportban tapasztalható hasonló változásokat észleltünk, de nagyobb kiterjedésben. Az anasztomózistól távolabbi területeken is észlelhető volt az urothelium térfoglalása, illetve a villusok hossz-tengelye mentén is egyre mélyebbre hatolva foglalta el a bélhám helyét. Feltűnő volt továbbá, hogy a bélhámot felváltó átmeneti hám egyre jobban mutatta a hyperplasia jeleit (4. ábra).

C-csoport (24 hónap)

Egy állatban a hólyag–bél-anasztomózis vonalban polyposus elváltozást észleltünk, mely szövettanilag hyperplasiás urotheliumnak bizonyult (5. ábra). Két másik állatban az ileum nyálkahártyája hipertrófiásan megvastagodott. Ezek mikroszkóposan tranzicionális sejtes karcinómának feleltek meg (6. ábra). Minden mintában megfigyelhető volt, hogy a megnagyobbításra használt ileumon a bélbolyhok szinte teljesen eltűntek, helyüket a crypták fölött egyneműen hiperplastikus urothelium borította. Az anasztomózis vonal szomszédságában



4. ÁBRA: AZ ILEUM NYÁLKAHÁRTYÁJA PATKÁNYBAN VÉGZETT ILEOCYSTOPLASTICÁT KÖVETŐEN 18 HÓNAPPAL AZ ANASZTOMÓZIS VONALHOZ KÖZEL (HE, 10X). A BÉLBOLYHOK GYAKORLATILAG ELTŰNTEK, A LUMEN (L) FELÉ AZ ILEUM COLUMNARIS HÁMJÁT (I) HYPERPLASTICUS UROTHELIUM (FEKETE NYILAK) VÁLTJA FEL

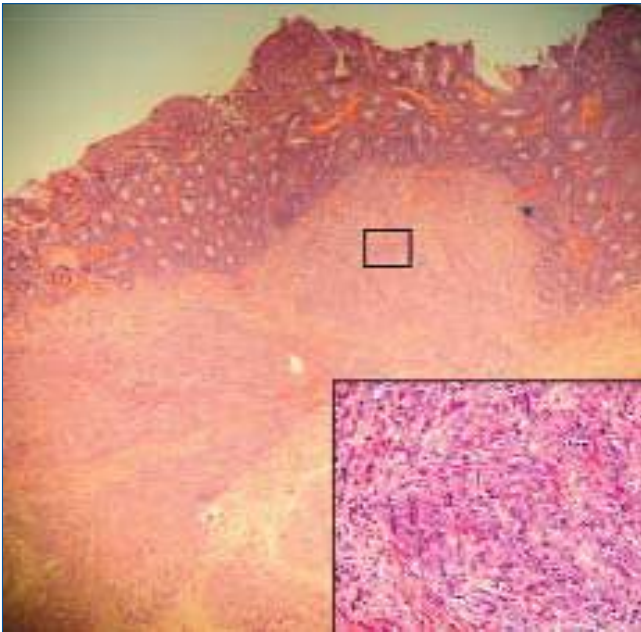
néhol a crypták szillettjei ábrázolódtak, melyeket urothel sejtek által alkotott fészkek béleltek ki. Egyedül ebben a csoportban észleltük krónikus gyulladás jeleit.

II.) Álműtét

A 15 áloperáción átesett állat mindegyike túlélte az utánkövétési periódust (24 hónap). Egy esetben, a varratvonalban egy apró diverticulumot észleltünk. Más makroszkópos vagy mikroszkópos elváltozást nem találtunk.

5. ÁBRA: POLYPOSUS ELVÁLTOZÁS A HÚGYHÓLYAG-ILEUM ANASZTOMÓZIS VONALÁBAN PATKÁNYBAN ILEUMMAL VÉGZETT HÚGYHÓLYAG MEGNAGYOBBÍTÁST KÖVETŐEN 24 HÓNAPPAL





6. ÁBRA: UROTHELIALIS KARCINÓMA PATKÁNYBAN VÉGZETT ILEOCYSTOPLASTICÁT KÖVETŐEN 24 HÓNAPPAL (HE, 6×). INSERT: DYSPLASTICUS SEJTEK A SUBMUCOSABAN (HE, 60×)

Megbeszélés

Az állatok hosszú távú (12, 18, 24 hó) túlélése (60%) tekintetében modellünk az irodalmi adatokkal megegyező (44-87%) volt (5-7, 9, 11-13).

A két altatással kapcsolatos intraopertatív, anaeszteziológiai szövődmény a műtét betanulási időszakában történt. Az intraabdominálisan futó érnél miatt kialakuló ileus megelőzésére egyes szerzők az érnél retroperitoneális rögzítését javasolják (5). Ilyen szövődményt mi nem tapasztaltunk. Egy esetben a mechanikus ileus okozója a vékonybél end-to-end anasztomózisának szűkülete volt. Az irodalmi adatok alapján az anasztomózis-elégtelenség az egyik leggyakoribb korai szövődmény. Eseteinkben 1 patkánynál alakult ki ilyen komplikáció (6, 11). A *Bajory* és *munkatársai* által vizsgált augmentátum keringési zavar okozta hólyagrupturát hosszú távon modellünkben nem észleltük (15). Az infekció hátterében közvetlen okot nem találtunk.

Hosszú távú nyomonkövetés esetén számolnunk kell az időődő állatok öregkori elgyengülése okozta elhullással is. Kísérletünkben a műtétet fiatal patkányokon végeztük, ezért az öregedéssel összefüggésbe hozható elhullások aránya elhanyagolható.

A leölt állatok feldolgozásakor észlelt makroszkópos elváltozások megegyeztek az irodalmi adatokkal. A hólyagkövesség, a nagyfokú nyákképződés, a hiperplasztikus, polyposus elváltozások jól ismert jelenségek (7, 8, 11, 14). A felső húgyutak károsodása is potenciális szövődmények forrása lehet, de makroszkóposan ezt egy állatban sem észleltük (8, 11).

A más munkacsoportok által megfigyelt papillaris benignus elváltozások, laphám-metaplázia és tranzicionális sejtes karci-

nóma a mi kísérletünk során is kialakultak. Az irodalomban megjelent közlemények többségében a nyomonkövetési idő nem haladja meg az egy évet, ezért kevesebb a megfigyelt malignus transzformáció. Rosszindulatú elváltozást mi is csak a 24 hónap után leölt állatokban láttunk. Valószínűleg kétéves nyomonkövetés szükséges ahhoz, hogy patkányban kialakuló malignus tumor patogenezisét vizsgálni tudjuk (6, 7).

Az irodalomban fellelhető állatkísérletes modellekben szinte kivétel nélkül megfigyelték a bélhám „urothelizációját”. Mind a mai napig nincs egységes ismeret arról, hogy ez a jelenség milyen mechanizmussal jön létre. Először *Guan és munkatársai* említik az urothelizáció jelenségét, melyet az urotheliumnak a bél nyálkahártyájára való rákúszásaként értelmeznek, miközben megfigyelésük szerint a bélhám intakt marad (5). Mások az eredeti húgyhólyag urothel sejteinek bélhámra történő fokozatos migrációját feltételezték a jelenség hátterében (8, 14). Kísérletünk eredményei leginkább *Little és munkatársai* eredményeihez hasonlóak, akik egyenként, szintén kétéves nyomonkövetés után vizsgálták a patkányokat. Ők is megfigyelték, hogy idővel az ileum villusai ellapulnak, a crypták rövidülnek és egyre inkább urothelium jelenik meg a bél columnaris epithelének helyén. Ezen szerzők a látott képet a bélhám metapláziájának vélték (7).

A folyamat feltárása érdekében a szövettani mintavétel és feldolgozás során törekedtünk arra, hogy a húgyhólyag és a vékonybél hámját folyamatában lehessen vizsgálni, különös tekintettel az anasztomózis területére. Összegzésképpen elmondható, hogy az ileum nyálkahártyáját az anasztomózis vonaltól kiindulóan idővel egyre nagyobb területen borította urothelium. Ez mind az ileum szegmens felszíni területe, mind a bolyhok magassága mentén megfigyelhető volt. A látott mintázat két induktív faktort valószínűsít: az urothelium közelségét és a vizelet folyamatos hatását. Az urothelium az anasztomózis vonaltól távolodva egyre csökkenő mértékben volt jelen az ileum nyálkahártyáján, vagyis az átmeneti hám szomszédsága fontos szerepet játszhat a tapasztalt jelenség kialakulásában. A vizelet bélhámot transzformáló hatására enged következtetni az a megfigyelés, hogy az urothelizáció a bélbolyhok csúcsán kezdődik. Itt a legkifejezettebb, és innen terjed egyre mélyebbre, fokozatosan csökkenő mértékben, egészen a cryptáig. Vagyis minél hosszabb ideig érintkezik az adott bélszegmentum a vizelettel, annál inkább átalakulnak a hengerhámsejtek urothel sejtekké.

Következtetések

Vizsgálataink alapján a vékonybél nyálkahártyáján megjelenő urotheliumot a vékonybél-nyálkahártya olyan metaplasztikus elváltozásának tartjuk, ami jól meghatározott mintázatot követve, egyfajta alkalmazkodási folyamat részeként jön létre. A hám átalakulása közben létrejött mutációk tehetők felelőssé a malignus tumorok fokozott kockázataért. A metaplasztikus hám eredetének tisztázására további immunhisztokémiai vizsgálatokat végzünk, melynek eredményeiről későbbi közleményben kívánunk beszámolni.

Amennyiben sikerül bebizonyítani a feltételezett folyamatot, az alapvető információt szolgáltatva a bélszegmenttel történő húgyhólyag megnagyobbítást követő malignus elváltozások megismerésében.

Támogatás

Az állatkísérletek a PTE-AOK-KA-2013/28 pályázat támogatásával történtek.

Köszönetnyilvánítás

A közlemény szerzői köszönetüket fejezik ki Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Állatkísérle-

tes Labor dolgozóinak az állatkísérletek végzésében nyújtott segítségükért.

Köszönet illeti a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai és Patológiai Intézetének munkatársait is, akik a szövettani mintavétel és feldolgozás metodikájában nyújtottak segítséget. A szerzők hálójukat fejezik ki továbbá Dr. Berk Burgu-nak (Ankara, Törökország) a műtét technikai részleteinek kidolgozásában nyújtott támogatásáért.

Jelen tudományos közleményt a szerzők a Pécsi Tudományegyetem alapításának 650. évfordulója emlékének szentelik.

Irodalom

- Kispal Z, Balogh D, Erdei O, et al. Complications after bladder augmentation or substitution in children: a prospective study of 86 patients. *BJU Int* 2011; 108: 282–289.
- Husmann DA. Malignancy after gastrointestinal augmentation in childhood. *Ther Adv Urol* 2009; 1: 5–11.
- Higuchi TT, Granberg CF, Fox JA, et al. Augmentation cystoplasty and risk of neoplasia: fact, fiction and controversy. *J Urol* 2010; 184: 2492–2496.
- Higuchi TT, Fox JA, Husmann DA. Annual endoscopy and urine cytology for the surveillance of bladder tumors after enterocystoplasty for congenital bladder anomalies. *J Urol* 2011; 186: 1791–1795.
- Guan ZC, Ricard G, Charest-Boule L, et al. Augmentation cystoplasty in rats: development of an animal model. *J Urol* 1990; 144: 461–465; discussion 474.
- Spencer JR, Steckel J, May M, et al. Histological and bacteriological findings in long-term ileocystoplasty and colcystoplasty in the rat. *J Urol* 1993; 150: 1321–1325.
- Little JS, Jr, Klee LW, Hoover DM, et al. Long-term histopathological changes observed in rats subjected to augmentation cystoplasty. *J Urol* 1994; 152: 720–724.
- Arena S, Arena F, Fazzari C et al. Ileocystoplasty in rats: metabolic, renal and enteropatch changes in a mid- and long-term follow-up. *Urol Int* 2011; 87: 87–93.
- Makiura Y, Okada Y, Tomoyoshi T, et al. Morphological analysis of ileal grafting following ileocystoplasty in the rat: a kinetic and ultrastructural study of the intestinal epithelium. *Int J Urol* 1994; 1: 143–150.
- Miyake H, Hara S, Eto H, et al. Global analysis of gene expression profiles in ileum in a rat bladder augmentation model using cDNA microarrays. *Int J Urol* 2004; 11: 1009–1012.
- Nakano Y, Wang K, Kato Y et al. Long-term outcome of bladder augmentation using living-related partial bladder transplantation in rats. *Pediatr Res* 2005; 57: 738–743.
- Nakano Y, Fujisawa M, Matsui T, et al. The significance of the difference in bacterial adherence between bladder and ileum using rat ileal augmented bladder. *J Urol* 1999; 162: 243–247.
- Buson H, Diaz DC, Manivel JC, et al. The development of tumors in experimental gastroenterocystoplasty. *J Urol* 1993; 150: 730–733.
- Burgu B, Gokce MI, Aydogdu O, et al. Combining gastric and ileal segments, does it overcome segment-related complications? An experimental study on rats. *Urol Res* 2011; 39: 39–44.
- Bajory Z, Szabó A, Pajor L, et al. A bélhólyagruptura mikrokingési okának modellezése állatkísérletben. *Magyar Urológia* 1999; 11: 385–391.
- Kispal ZF, Kardos D, Jilling T, et al. Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment. *J Pediatr Urol* 2015; 11: 349.e341–346.

MEGHÍVÓ

Az urethra sebészete monotémás továbbképző tudományos ülés, 2016. április 15.

HEIM PÁL GYERMEKKÓRHÁZ, G ÉPÜLET CZINNER TEREM (1089 BUDAPEST ÜLLŐI ÚT 86.)

Tisztelt Kollégák!

Nagy örömünkre szolgál, hogy a Magyar Urológus Társaság jeles képviselőivel karöltve olyan egynapos rendezvényt szervezhettünk, amelyre szándékunk szerint nagy jelentőséggel kerül sor. Jelentőségét nemcsak a téma, jelesül a felnőttkorra sok esetben messze-mentőleg kiható veleszületett és szerzett húgycső rendellenességek adják, de főleg az a lehetőség, hogy most, talán első ízben a két határterületi szakma képviselői, felnőtt urológusok és gyermeksebészek, illetve gyermekurologusok közös rendezvényen találkozhatnak. Mindkét oldal számos információval és tanulsággal szolgálhat, amelyeket nyilvánvalóan érdemes közösen megvitatni, és ennek mentén a betegek érdekében együttműködni.

Esetismertetés bejelentési határidő: 2016. március 15.

Jelentkezési határidő: 2016. április 1.

Részletes információ: sarkozy@freemail.hu

vagy a <http://www.heimpalkorhaz.hu/sebeszet/letoltesek/Urethra2016.html> weboldalon.

Szíves érdeklődésükre számítva, baráti üdvözléssel, a szervezők:

Dr. Sárközy Sándor

elnök, Magyar Gyermeksebész Társaság

Dr. Kiss András Pál

orvosigazgató, gyermekurologus, Heim Pál Gyermekkorház



Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment

^aSurgical Unit, Department of Paediatrics, University of Pécs, Hungary

^bThe Evanston Hospital, Northshore University Healthsystem, Evanston, IL, USA

^cDepartment of Pathology, University of Pécs, Hungary

^dDepartment of Paediatric and Adolescent Surgery-Medical University of Graz, Graz, Austria

Correspondence to:
Z.F. Kispal, Department of Paediatric and Adolescent Surgery-Medical University of Graz, Augenbruggerplatz 34, 8036 Graz, Austria

zachary22@gmail.com
(Z.F. Kispal)
kardos.daniel@pte.hu
(D. Kardos)
tjilling@peds.uab.edu
(T. Jilling)
laszlo.kereskai@aok.pte.hu
(L. Kereskai)
marlaissac2011@u.northwestern.edu
(M. Isaacs)
radibutz@gmail.com
(D.L. Balogh)
pinter.andras@pte.hu
(A.B. Pinter)
holger.till@medunigraz.at
(H. Till)
vajda.peter@pte.hu (P. Vajda)

Keywords

Urinary bladder augmentation; MUC genes; Neoplasia

Received 15 October 2014

Accepted 6 April 2015

Available online 26 June 2015

Zoltan Farkas Kispal ^{a,d}, Daniel Kardos ^a, Tamas Jilling ^{b,1}, Laszlo Kereskai ^c, Marla Isaacs ^b, Daniel L. Balogh ^a, Andrew B. Pinter ^a, Holger Till ^d, Peter Vajda ^a

Summary

Introduction

Bladder augmentation is widely used to treat otherwise unmanageable urinary incontinence. However, it is associated with a large number of complications, of which tumor formation is the most severe. Mucin proteins and MUC genes are linked, among others, to malignancies of the urinary bladder and the gastrointestinal system.

Objective

To investigate histological alterations as well as changes in expression of MUC1 and MUC2 genes and proteins following different types of urinary bladder augmentation or substitution performed in children and adolescents.

Patients and methods

Between 1988 and 2013, 91 patients underwent urinary bladder augmentation or substitution at the study institute. Patients were included on whom cystoplasty had been performed 4 years previously or earlier, and could have been followed-up prospectively. Thus, 54 patients were involved in the study. In eight patients gastrocystoplasty was performed, in 17 patients ileocystoplasty, and in 22 patients colcystoplasty. Seven patients underwent bladder substitution using a colonic-segment. Biopsies were taken via cystoscopy from the native bladder, from the gastrointestinal segment used for augmentation, and from the anastomotic line between these two. One part of the samples was fixed in formaldehyde for routine histological processing.

The other part of the biopsies was embedded into OCT medium, then cryosectioned and fluorescently double-immunostained for MUC1 and MUC2 proteins. Samples from the microscopically dysplastic lesions and from the 15-year-old or older biopsies were processed by laser capture microdissection, and then real-time PCR was done. Data were statistically analyzed by ANOVA and ordinary least squares regression tests.

Results

One adenocarcinoma was found in a female patient, 11 years after colcystoplasty. There were no significant changes in the level of MUC1 and MUC2 proteins and gene expression in the urothelium and in the gastrointestinal segment used for augmentation following ileocystoplasty and gastrocystoplasty. Significant increase in MUC1 and decrease in MUC2 protein levels were detected following colcystoplasty in the large bowel segment used for augmentation, both with qualitative and quantitative methods ($p < 0.05$) (Figure). The uroepithelium showed no significant change. RT-PCR revealed progressive increase in MUC1 gene expression and decrease in MUC2 gene expression after colcystoplasty in the course of time. It also showed highly increased MUC1 gene expression and decreased MUC2 gene expression in the samples of patients.

Conclusions

Alterations in gene expression of MUC1 and MUC2 might serve as promising markers for early detection of histological changes after colcystoplasty.

¹ Present address. Neonatology Faculty, Department of Paediatrics, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL, USA.

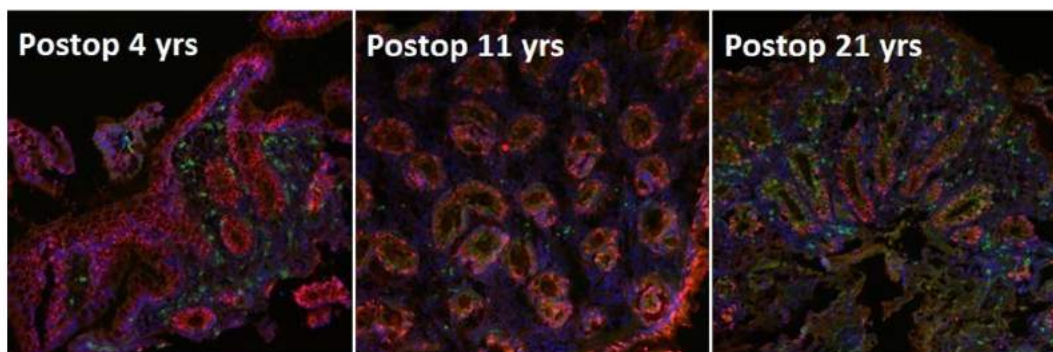


Figure Changes in MUC1 (green) and MUC2 (red) protein levels 4, 11, and 21 years after colcycloplasty. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Introduction

Urinary bladder augmentation is widely used for conservatively unmanageable urinary incontinence. However, to date, there is no evidence-based consensus in the literature as to which tissue type is the ideal for these operations. The uncertainty is caused by the fact, that after the increasing popularity of the technique in the 1980s and 1990s, long-term complications were identified, which were dependent on the type of the gastrointestinal segment used [1–3]. These can be grouped as metabolic and non-metabolic (mainly surgical) complications [2]. Malignancy is considered to be one of the most serious in the metabolic group [1,3]. Literature puts the incidence of bladder cancer at 1.5% per decade after colcycloplasty and 2.8% per decade after gastrocycloplasty [3].

Many factors are suspected to play a role in tumor formation following urinary bladder augmentation. Bacteria living in the urine may transform nitrates into potentially carcinogenic nitrosamines [4]. Urine may exert a direct toxic, DNA damaging effect on the gastrointestinal epithelium [5]. Aberrant signal mechanisms between the bladder mucosa and tissue used for augmentation may also play a role [1].

According to the literature, the average time elapsing between augmentation cystoplasty and first tumor detection is about 17 years [6]. Therefore, regular cystoscopies with mucosal biopsies are strongly recommended by many specialists for early cancer detection [2,3].

Mucins have been investigated widely in connection with malignancy of various tissues. They are high-molecular-weight glycoproteins containing at least 50% carbohydrate. Their oligosaccharide side chains, which are O-glycosidically linked to an apomucin core peptide, consist of N-acetylgalactosamine, galactose, fucose, N-acetylglucosamine, and sialic acid residues. The apomucin peptides are typically rich in serine, threonine, proline, alanine, and glycine [7,8]. To date, 19 types of mucin genes have been identified.

Every gastrointestinal epithelium (stomach, small- and large-intestine) has a unique mucin expression pattern, which may change in the case of malignancy [7]. There is evidence in adults that some of these changes in mucin expression happen very early in carcinogenesis. They may even precede the detectable morphological changes that are indicative of malignant transformation [9].

Changes in the levels of MUC1 and MUC2 proteins are associated with various malignancies in humans, as well as urothelial, intestinal, and gastric tumors [10]. MUC1 has barrier and cell signaling functions [11]. Overexpression or changes in glycosylation may result in carcinoma formation [12]. MUC2 protein is a secreted, gel forming protein. Its expression may decrease in colorectal carcinomas [13], and loss of its expression may predict recurrence or worse survival [14].

The aim of our study was to investigate histological changes and MUC1 and MUC2 protein levels and gene expression in the epithelium of the augmented urinary bladder following gastro-, ileo-, and colcycloplasty or bladder substitution.

Materials and methods

All investigations were performed with the approval of the university's local ethical committee and the National Ethical Committee in Hungary.

Between 1988 and 2013, 91 patients underwent urinary bladder augmentation and/or substitution at University of Pecs, Department of Paediatrics, Surgical Unit. We selected patients in whom augmentation had been performed at least 4 years previously, and who could come to control surveys regularly. Thus, 54 patients were recruited for the prospective study.

Indications for bladder augmentation and/or substitution augmentation were meningomyelocele in 28 cases, extrophy–epispadias complex in 16, neurogenic bladder in six, pelvic trauma in one, posterior urethral valve in one, spinal cord tumor in one, and bladder rhabdomyosarcoma in one.

Of these 54 patients, eight underwent gastrocycloplasty, 22 ileocycloplasty, 17 colcycloplasty, and seven had bladder substitution with a colonic segment. Mean age was 12 years (4.3–20.9 years) at the time of surgery. Mean elapsed time was 9 years (4–21 years) from augmentation/substitution to the time of the first cystoscopy and biopsy.

Tissue samples were harvested during cystoscopy in general anesthesia in younger patients or in sedation with midazolam in older and cooperative patients. The augmented bladder was accessed through the urethra or through the continent urinary stoma if the urethra was not available. Wherever it was possible, 4–4 samples from randomly selected locations were taken from the native

bladder, from the gastrointestinal segment used for augmentation, and from the anastomotic line between these two segments. Half of the samples were fixed in formaldehyde and sent for routine (hematoxylin and eosin) histological investigation. Histological records from previous cystoscopies from the same patients were also accessed and included in the study.

The other half of the samples were immediately embedded into Optimal Cutting Temperature (OCT) medium and stored at -80°C .

Immunohistological double staining was performed at The Evanston Hospital (Northshore University Health-systems, Chicago, IL, USA). The embedded samples were sectioned at -25°C . Slides were fixed in 4% formaldehyde solution, blocked in glycine-PBS solution, washed in PBS, and incubated in PBST solution, then blocked in 5% goat serum for an hour. Primary antibodies against MUC1 (Santa Cruz, Vu4H5 mouse) and MUC2 (Sigma Aldrich: HPA006197, rabbit) proteins were diluted 1:100 in blocking buffer. Samples were incubated overnight with the antibodies at 4°C . On the following day, unbound primary antibodies were washed out and secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 (goat anti mouse for MUC1) and 594 (goat anti rabbit for MUC2). Afterwards unbound secondary antibodies were washed off in PBST. For nuclear staining, diaminophenylindol (DAPI) was used. Images were collected using a cooled CCD camera mounted on a Leica epifluorescence microscope, equipped with fluorescence filters that allowed the separate visualization of green, red, and blue epifluorescence, corresponding to MUC1, MUC2, and nuclei. Digitalized images were relayed to a computer and analyzed using IPLab software. Areas of measurement were selected, based on the appropriate morphological criteria corresponding to urothelium, and to gastric-, ileal-, or colonic epithelium (Fig. 1). To measure the absolute value of MUC1, we quantified the green integrated intensity within at least three regions of interest per image, and divided the values with the corresponding integrated intensity in the blue wavelength, that is we normalized the MUC1 signal to the number of participating cells in the region of interest. Red/blue fluorescence ratios were calculated likewise to evaluate MUC2. To calculate MUC2/MUC1 ratios, the red-green ratios were measured. Measurement results were evaluated with the help of a statistician.

Laser Capture Microdissection was performed on the neoplastic samples and on those samples that showed a statistically significant change in expression of MUC1 and MUC2. Altogether, samples from 14 patients were processed. Cells were gathered from the mucosa, and RNA was isolated with a Picopure Tm kit, then complementary DNA (cDNA) was created. Real-time PCR (RT PCR) (Rotorgene) was run with S18 as a housekeeping gene and with MUC1 and MUC2 primers.

Statistical analysis was done with the help of a statistician. ANOVA and least squares regression tests were used. A value of $p < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Table 1 details the results of routine histology of the 54 patients. Metaplasia was found in three patients 8, 10, and

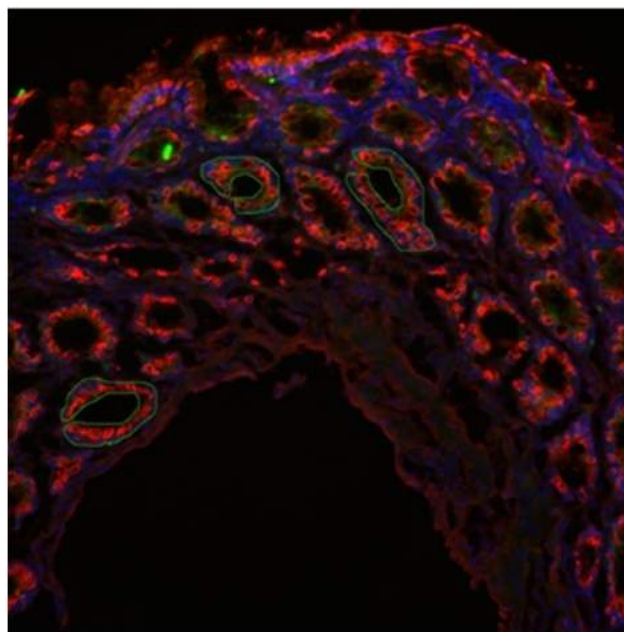


Figure 1 Immunofluorescently double stained colonic sample. The green line marks the area with the cells measured (10 \times magnification). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

14 years after augmentation. One metaplasia was found in the colonic segment used for augmentation, one in the original bladder part (Fig. 2), and one in the anastomotic line between the bladder and the colonic segment. Dysplasia was observed altogether in six cases, in three patients during their follow-up. Five cases were detected 4 years after bladder augmentation and one after 6 years. Changes were located mainly at the anastomotic site and at the original bladder.

One in situ adenocarcinoma was found in a female patient 11 years after colocystoplasty. During cystoscopy, the tumor was presented as a polypoid lesion on the mucosa of the colonic patch. Multiple samples were taken from the tumor and from the surrounding mucosa. The carcinoma showed an increased amount of glands with a relatively preserved structure with hematoxylin-eosin staining. There were no signs of invasion into the surrounding tissue.

No significant changes were found in either MUC1 or MUC2 protein levels in the tissues used for augmentation following gastrocystoplasty, ileocystoplasty, or bladder substitution with colon, or in the urothelium of these reservoirs.

The levels of MUC1 increased ($p < 0.001$) and MUC2 decreased ($p < 0.05$) significantly with time in the colonic mucosa following colocystoplasty (resulting in a corresponding decrease in MUC2/MUC1 ratios). There were no significant changes in the mucin protein levels in the gastrocystoplasty, ileocystoplasty, and bladder substitution groups in the transposed gastrointestinal tissues as well as in the urothelial mucosas in all groups (gastro-, ileo-, colocystoplasty, and bladder substitution with colon).

Real-time PCR showed that MUC1 gene expression gradually increased and MUC2 expression decreased with

Table 1 Results of human histological examinations in 54 patients, between 1988 and 2013.

Type of operation	Postoperative time																				
	4 years				6 years				8 years				10–12 years				14–16 years			18–20 years	
	N	I	M	D	N	I	M	D	N	I	M	D	N	I	M	CIS	N	I	M	N	I
Group A (ICP)																					
Original bladder	4	18	1	0	7	7	1	0	4	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Anastomosis	5	20	1	0	5	9	0	0	3	4	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Small intestine	13	13	1	0	8	5	0	0	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Group B (CCP)																					
Original bladder	3	11	2	0	2	2	0	0	3	6	0	0	1	3	3	0	0	2	0	1	4
Anastomosis	2	3	0	1	1	2	0	1	1	7	2	0	0	5	1	1	0	1	0	2	3
Large intestine	5	7	0	0	2	2	0	0	3	9	0	0	1	6	1	0	0	3	1	3	4
Group C (GCP)																					
Original bladder	2	7	0	1	1	2	0	0	2	1	1	0	3	1	2	0	0	2	2	0	0
Anastomosis	0	6	1	1	1	2	0	0	2	1	1	0	1	2	2	0	0	2	1	0	0
Stomach	1	11	0	2	1	2	0	0	3	1	0	0	5	0	0	0	3	2	1	0	0
Group D (Substitution)																					
Large intestine	1	3	0	0	0	3	0	0	1	3	1	0	2	1	0	0	1	1	0	2	1

The numbers represent the number of normal (N), inflammatory (I), metaplastic (M), carcinoma in situ (CIS), and displastic (D) samples. ICP is for ileocystoplasty, GCP for gastrocystoplasty, and CCP for colcystoplasty, and substitution is for bladder substitution with large intestine.

time. In the patient where the polyp was presented, the older samples showed slightly decreased MUC2 gene expression and increased MUC1 gene expression.

Tissue samples taken from the carcinoma and the surrounding tissue showed heavily increased MUC1 and decreased MUC2 protein levels (Fig. 3).

Discussion

The number of reports about tumors arising after urinary bladder augmentation or substitution is increasing [1–3,15]. Tumor formation is one of the most insidious

complications with many disputes to surveillance and treatment [2,3,15,16]. There are accepted options, which are currently in use for warning in case of bladder cancer in adults [16,17]. Because of the cancer risk after augmentation cystoplasty, regular cystoscopies are recommended [1–3,15]. However, an ideal, possibly non-invasive, cheap



Figure 2 Squamous cell metaplasia in the original bladder part following colcystoplasty 10 years after augmentation (10× magnification Hematoxylin-Eosine staining).

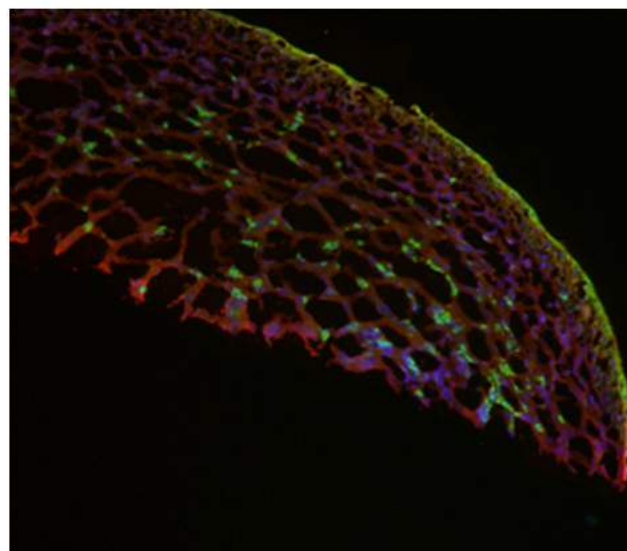


Figure 3 Immunofluorescent double staining of the in situ adenocarcinoma found in a female patient 11 years after colcystoplasty. Green staining indicates MUC1 protein and red staining indicates MUC2 protein. Nuclei are stained blue (10× magnification). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

method has not yet been established that is sensitive and specific enough to detect malignancy in the augmented/substituted bladder. In our study, we examined the histological changes occurring after bladder augmentation or substitution in children and adolescents. Our other objective was to define the role and possible use of MUC1 and MUC2 proteins and gene expressions as predictors of malignancy after augmentation.

Husmann reviewed malignancy arising after urinary bladder augmentation in children in the literature. He found that the risk of malignancy after colcystoplasty and ileocystoplasty is 1–3% [1]. In our patient material, only three metaplastic epithelia and one tumor were found. It is too early to make any statements about the risk of malignancy in our patients.

According to the literature, gastrocystoplasty is a risk factor in itself for malignancy [1]. In our patient material, we found only one metaplasia afterwards and no macroscopically detectable tumor to date, which is somewhat in discordance with this statement.

Literature puts the risk of malignancy to increase to 1.5% yearly after enterocystoplasty and 2.8% after gastrocystoplasty [18]. In our follow-up we encountered one solid tumor 11 years after colcystoplasty, and dysplasia in three patients (3.2%) in the first 6 years following augmentation, which is in accordance with this data.

N'Dow *et al.* examined the expression of various mucin genes in human tissue samples. They found a significant up-regulation of MUC1 in the ileal segments used for augmentation [8]. This is in discordance with our findings as we found no significant changes in our ileocystoplasty group. They also detected MUC1 in the transposed ileal segments just as we did. Their findings about MUC2 are discordant with our study, as they found strong MUC2 expression in the transposed intestinal segments, whereas we found no significant changes in our ileal samples.

Lau *et al.* examined the expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in various tumor tissues using immunohistochemistry. They found that MUC1 immunoreactivity was present in 93% of bladder cancers, in 67% of gastric carcinomas, and in only 55% of colonic tumors. They also found that MUC2 expression was present mostly in tumors of the gastrointestinal tract and some rare, non-GI tumors [7]. We examined only MUC1 and MUC2 expressions in our study and we did not concentrate on expression patterns because of our limited cancer tissue material. However, in the samples of the tumor patient, an increased MUC1 protein level and a decreased MUC2 protein level were found, which is in accordance with their findings.

Lee *et al.* examined the expression of mucins and cytokeratins in various gastrointestinal tumors. They found distinct differences in mucin expression patterns between tumors of various intestinal tissues, which they proposed to use later on in histological diagnostics [19]. We could not establish a pattern in our study because of the relatively small amount of material in each group and because we examined only two markers.

Zhang *et al.* examined the expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in colorectal adenocarcinoma and small intestinal adenomas [20]. They found increased expression of MUC1 in both groups, which is somewhat in accordance with

our findings as MUC1 expression was strongest in the malignant samples.

It is well known that most colon cancers react with antibodies detecting MUC1 proteins to a greater degree than the corresponding normal tissue [21]. Our findings are in accordance with this, as we found an increase in MUC1 protein levels in our colonic samples. The expression pattern of mucins changes in malignancy [22]. Abnormal mucin expression is usually associated with tracheobronchial tumors and neoplasias of the gastrointestinal tract [22]. It perfectly matches with our findings, as we found a decrease in MUC2 expression in our samples.

The value of our research is the long-term follow up and the relatively high number of patients. Cystoscopy with biopsying of the augmented bladder is performed from the fourth postoperative year biannually. In case of any histologically significant change, these patients are followed-up yearly. It enables us to prospectively study histological changes after augmentation as well as gather more data about changes in MUC1 and MUC2 protein levels, which will hopefully enable more accurate pinpointing of increased risk for malignancy.

It is difficult to predict the time at which malignant changes occur because of their complexity and variability. In our experience, any change in mucin protein expression should be considered as a potential warning sign and patients should be monitored closely.

In our patient material, malignancy was detected in only one patient, relatively early, 11 years following augmentation. However, with the increase in follow-up time we are counting on further detections of malignancy.

What is new in our research is that our results show a significant change in MUC1 and MUC2 proteins and gene expression after colcystoplasty. However, we did not detect any statistically significant changes after other forms of bladder augmentation or substitution. This may be because of the relatively small sample size (number of patients with gastrocystoplasty and bladder substitution) and because of other, as yet unknown, factors after ileocystoplasty.

These results suggest that MUC1 and MUC2 proteins may be good, promising markers for malignancy after (at least) colcystoplasty. We are planning to develop a cheap, easy to use, non-invasive detection method, which can substitute cystoscopy in the long term (e.g. detection of cells collected from urine). For better understanding of tumor formation following bladder augmentation or substitution, further studies are required.

Conclusion

Detection of changes in MUC1 and MUC2 gene expressions in colonic tissue samples are promising markers for early detection of malignancy in patients with colcystoplasty.

Conflict of interest

None.

Funding

This paper was supported by "PTE ÁOK-KA- 2013/28" (Research Fund for of University of Pécs, Medical School) and János Bolyai Research Scholarship of the Hungarian Academy of Sciences as well as the William J. Fulbright Scholarship.

Acknowledgment

The present scientific contribution is dedicated to the 650th anniversary of the founding of the University of Pécs, Hungary.

References

- [1] Husmann DA. Malignancy after gastrointestinal augmentation in childhood. *Ther Adv Urol* 2009;1:5–11.
- [2] Kispal Z, Balogh D, Erdei O, Kehl D, Juhasz Z, Vastyan AM, et al. Complications after bladder augmentation or substitution in children: a prospective study of 86 patients. *BJU Int* 2011;108(2):282–9.
- [3] Austin JC. Long-term risks of bladder augmentation in pediatric patients. *Curr Opin Urol* 2008;18:408–12.
- [4] Hamid R, Greenwell TJ, Nethercliffe JM, Freeman A, Venn NS, Woodhouse CRJ. Routine surveillance cystoscopy for patients with augmentation and substitution cystoplasty for benign urological conditions: is it necessary? *BJU Int* 2009;104:392–5.
- [5] Abdel-Rahim M, El-Bahnasawy M. Late uro-ileal cancer after incorporation of ileum into the urinary tract. *J Urol* 2002;167:87–92.
- [6] Williamson SR, Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R, Cheng L. Unique clinicopathologic and molecular characteristics of urinary bladder tumors in children and young adults. *Urol Oncol* 2013;31(4):414–26.
- [7] Lau SK, Weiss LM, Chu PG. Differential expression of MUC1, MUC2, and MUC5AC in carcinomas of various sites an Immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 2004;122:61–9.
- [8] N'Dow J, Pearson JP, Bennett MK, Nealand DE, Robson CN. Mucin gene expression in human urothelium and in intestinal segments transposed into the urinary tract. *J Urol* 2000;164:1398–404.
- [9] Castro MA, Ferreira U, Martins MH, Stoppiglia RM, Netto NJR. Histological and histochemical changes of the intestinal mucosa at the urothelial-enteric anastomotic site. *Int Braz J Urol* 2006;32:222–7.
- [10] Debusne H, Ceelen W. Mucinous differentiation in colorectal cancer: molecular, histological and clinical aspects. *Acta Chir Belg* 2013;113(6):385–90.
- [11] Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends Cell Biol* 2006;16(9):467–76.
- [12] Tolcher AW, Ochoa L, Hammond LA, Patnaik A, Edwards T, Takimoto C, et al. Cantuzumab mertansine, a maytansinoid immunoconjugate directed to the CanAg antigen: a phase I, pharmacokinetic, and biologic correlative study. *J Clin Oncol* 2003;21(2):211–22.
- [13] Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23(1–2):77–99.
- [14] Elzagheid A, Emaetig F, Buhmeida A, Laato M, El-Faitori O, Syrjänen K, et al. Loss of MUC2 expression predicts disease recurrence and poor outcome in colorectal carcinoma. *Tumour Biol* 2013;34(2):621–8.
- [15] Husmann DA, Rathbun SR. Long-term follow up of enteric augmentations: the risk for malignancy. *J Pediatr Urol* 2008;4:381–5.
- [16] Fradet Y. Screening for bladder cancer: the best opportunity to reduce mortality. *Can Urol Assoc J* 2009;3(6 Suppl. 4):180–3.
- [17] Lau P, Chin JL, Pautler S, Razvi H, Izawa IJ. NMP22 is predictive of recurrence in high-risk superficial bladder cancer patients. *Can Urol Assoc J* 2009;3:454–8.
- [18] Higuchi TT, Fox JA, Husmann DA. Annual endoscopy and urine cytology for the surveillance of bladder tumors after enterocystoplasty for congenital bladder anomalies. *J Urol* 2011;186:1791–5.
- [19] Lee MJ, Lee HS, Kim WH, Choi Y, Yang M. Expression of mucins and cytokeratins in primary carcinomas of the digestive system. *Mod Pathol* 2003;16:203–310.
- [20] Zhang MQ, Lin F, Hui P, Chen ZME, Ritter JH, Wang HL. Expression of mucins, SIMA, villin, and CDX2 in small-intestinal adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol* 2007;128:808–16.
- [21] Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994;17:153–80.
- [22] Devine PL, McKenzie IFC. Mucins: structure, function and association with malignancy. *Bioessays* 1992;14:619–25.



The local microbiome after pediatric bladder augmentation: intestinal segments and the native urinary bladder host similar mucosal microbiota

Z.F. Kispal ^a, P. Vajda ^b, D. Kardos ^b, I. Klymiuk ^c,
C. Moissl-Eichinger ^{d,e}, C. Castellani ^a, G. Singer ^{a,*}, H. Till ^a

^aDepartment of Pediatric and Adolescent Surgery, Medical University of Graz, Auenbruggerplatz 34, 8036 Graz, Austria

^bDepartment of Pediatrics, Surgical Division, University of Pecs, József A Str 7, 7623 Pecs, Hungary

^cCenter for Medical Research, Core Facility Molecular Biology, Medical University of Graz, Stiftingtalstraße 24, 8036 Graz, Austria

^dDepartment of Internal Medicine, Joint Facilities, Medical University of Graz, Stiftingtalstraße 24, 8036 Graz, Austria

^eBioTechMed, Mozartgasse 12/II, 8010 Graz, Austria

* Corresponding author. Department of Pediatric and Adolescent Surgery, Medical University of Graz, Auenbruggerplatz 34, 8036 Graz, Austria. Tel.: +43 316 385 13762; fax: +43 316 385 13775.

georg.singer@medunigraz.at (G. Singer)

Keywords

Bladder augmentation; Colocystoplasty; Ileocystoplasty; Intestinal segments; Microbiome; Urinary tract

Received 14 May 2018
Accepted 26 July 2018
Available online 8 August 2018

Summary

Introduction

Next-generation sequencing (NGS) techniques have provided novel insights into the microbiome of the urinary bladder (UB). In children after bladder augmentation using either ileum (ileocystoplasty, ICP) or colon (colocystoplasty, CCP), the fate of the mucosal microbiome introduced into the urinary tract remains unknown.

Objective

The aim was to compare the mucosal microbiome of the native UB vs the augmented intestinal segment (IS) using NGS.

Study design

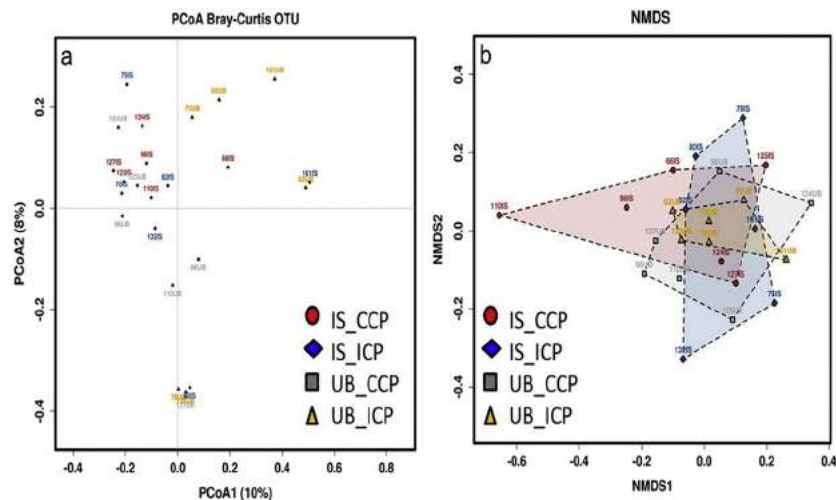
Twelve children after bladder augmentation (ICP $n = 6$, CCP $n = 6$) were included. Biopsies were taken during routine postoperative cystoscopy from the native UB and the IS. Specimens underwent whole-genome DNA extraction, 16S rRNA gene amplification, NGS, and Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) data analysis. Downstream statistical data analyses were performed in Calypso.

Results

Patients' median age at the time of surgery was 11 years (6–17 years), and the median interval between augmentation and sampling was 7 years (4–13 years). α -Diversity (Shannon diversity index) was not significantly different between IS vs UB, ICP vs CCP, and male vs female. No general differences in the overall bacterial pattern (β -diversity) were found between IS, UB, ICP, and CCP groups. The groups overlapped in principal coordinate analysis (PCoA) and non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis (Figure). Age at sampling had a statistically significant influence on β -diversity at the genus level. *Corynebacterium*, *Pseudoxanthomonas*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, and *Micrococcus* were the most dominating taxa detected over all samples. There was an obvious dominance of the genus *Corynebacterium* in the samples taken from the UB and IS in both ICP and CCP patients. Limitations of this study include the relatively small number of patients.

Conclusion

After bladder augmentation, the native UB and augmented ISs (ICP and CCP) host similar microbiota despite their distinct differences of originating mucosal anatomy.



Summary Figure On OTU Level, the IS and UB sample groups overlap in both ICP and CCP classification in PCoA (left panel) and NMDS (right panel).

<https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2018.07.028>

1477-5131/© 2018 Journal of Pediatric Urology Company. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The objective of bladder augmentation is to create a low-pressure storage reservoir of sufficient capacity to preserve upper urinary tract function and establish urinary continence when maximal medical therapy is unsuccessful [1]. Several techniques, including ileocystoplasty (ICP) or colocolostomy (CCP), have been described. However, it is well known that bladder augmentation can be associated with a variety of long-term complications, including excessive mucus production, electrolyte imbalances, metabolic acidosis, somatic growth retardation, vitamin B12 deficiency, and the formation of bladder calculi [2]. Histological changes and tumor formation in the augmented bladder are the most severe postoperative complications [3]. Furthermore, recurrent urinary tract infections (UTIs) represent a significant problem [2].

Next-generation sequencing (NGS) techniques have provided novel insights into the microbiome of the urinary bladder (UB) [4], which until now has been suspected to be sterile [5]. However, there is a growing body of evidence suggesting that even the healthy urinary tract harbors a variety of microbial species, termed the urinary microbiome [6]. Furthermore, disruptions of the microbiome of the UB have been demonstrated in urological disorders such as urgency urinary incontinence, overactive bladder, and urolithiasis [6,7].

Before bladder augmentation, the intestinal segments (ISs) host a dense and complex microbial ecosystem serving numerous immunological, metabolic, and defensive functions. Augmentation of the native UB with ISs exposes this alimentary microbiota to a completely different microenvironment. At present, however, little is known about the fate of the intestinal mucosal microbiome after bladder augmentation. The aim of the present long-term postoperative observational study was therefore to intra-individually compare the local bacterial microbiome of the native UB and the IS in children after bladder augmentation.

Patients and methods

Patients and study setup

After approval of the local ethics committee (5011-0/2010-1018EKU), 12 patients treated with bladder augmentation at the institution were included in the study. Six of these patients (3 female and 3 male) underwent ICP and six patients (3 female and 3 male) underwent CCP. Perioperatively, patients received antibiotic prophylaxis with metronidazole, cefuroxime, and gentamycin. Before bladder augmentation, sonography, cystomanometry, and cystography were performed. Additionally, laboratory investigations as well as 24-hour urine analysis were carried out.

The postoperative protocol involved bladder irrigations every second day with physiologic saline solution. A rigorous follow-up protocol was applied with regular visits in the first 3, 6, and 12 months, followed by visits performed yearly and later every 2 years. During these visits, sonography, cystomanometry, voiding cystourethrography, and laboratory and urine analysis were performed. The

antibiotic regime was then adapted according to antibiograms of urinary cultures.

Informed consent was obtained from the patients and/or parents or legal guardians before study inclusion. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

All of the study patients underwent routine cystoscopies with biopsies in 2-year intervals after bladder augmentation from the fourth postoperative year on. These were only performed after ruling out UTI by culture. Biopsies were taken under general anesthesia from the native UB and the IS used for augmentation under sterile conditions. From each patient, two samples were taken from the UB and two from the IS. Two samples (1 UB and 1 IS) were sent for routine histological examination. One sample from each region (1 UB and 1 IS) was immediately embedded in the operation theater using OCT compound (BioOptica, Milan, Italy), frozen, and stored at -80°C until further processing.

Total DNA isolation, 16S rRNA gene library preparation, and sequencing

The latest available samples (1 UB and 1 IS) were retrieved in sterile 1.5-mL Eppendorf tubes and spun in a centrifuge, and OCT was removed using a pipette. The biopsy was transferred to a MagNA Lyser Green Bead tube (Roche, Mannheim, Germany) and homogenized in 500 μL of bacterial lysis buffer from the MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III (Bacteria, Fungi) (Roche, Mannheim, Germany) four times at 6500 rpm for 30 s. Samples were incubated with 25 μL of lysozyme (100 mg/mL) at 37°C for 30 min and 43.4 μL Proteinase K (20 mg/mL) overnight for enzymatic digestion. DNA purification was performed according to the manufacturer's instructions with the MagNA Pure DNA isolation kit III (Bacteria, Fungi) on a MagNA Pure LC 2.0 Instrument (Roche, Mannheim, Germany) with 100 μL elution volume according to the manufacturer's instructions. For negative controls, empty tubes were run with each isolation batch. Target-specific polymerase chain reaction (PCR) amplification with 5 μL total DNA and target-specific primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 357R (5'-CTGCTGCCTYCCGTA-3') was performed with the FastStart High Fidelity PCR system (Sigma, Germany) for 33 amplification cycles according to the supplier's instructions in 25 μL triplicate reactions. After pooling the triplicates, normalization, indexing, and library preparation were performed as described by Klymiuk et al. [8]. The final library for NGS was quantified using the QuantiFluor ONE dsDNA dye on a Quantus Fluorometer (Promega, Mannheim, Germany), and quality was checked on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) using a high-sensitivity DNA chip. The final pool was diluted to 4 nm, and the library was run at 6 pM with 20% PhiX with v3 600 cycles chemistry on a MiSeq Desktop Sequencer (Illumina, Eindhoven, The Netherlands). FastQ files were used for data analysis.

Data analysis

A total of 9,649,860 raw reads were processed for data analysis. The compressed data were counted, and reads

Table 1 Metadata of the 12 patients included.

Patient ID	Method	Gender	Age at augmentation	Age at sampling	Antibiotics at sampling
110	CCP	m	7	19	S
124	CCP	m	7	19	Am
125	CCP	m	7	20	S
127	CCP	f	11	23	Ce
66	CCP	f	17	27	S
96	CCP	f	11	23	S
132	ICP	m	16	20	Ce
161	ICP	m	14	18	S
75	ICP	f	6	10	Ce
78	ICP	f	13	17	Am
80	ICP	f	11	15	Ce
82	ICP	m	10	14	M

CCP = colcystoplasty; ICP = ileocystoplasty; m = male; f = female; S = sumetrolim; Am = amoxicillin; Ce = cefuroxime; M = methenamine.

were joined using ea-utils, version 1.1.2 [9] with standard setting, followed by multiple split libraries from the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME 2.0) software [10]. During this step, sequencing reads were filtered according to standard settings. Adapter sequences were removed from the reads, and the detected chimeras were eliminated from the data set by UCHIME method in QIIME [11]. Remaining reads were degapped, deuniqued, and split into single fasta files per sample for further analysis in QIIME 2.0 [10]. After adding QIIME labels, reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) with a sequence similarity of 97% using UCLUST clustering method [12] in the open reference workflow, and sequences were mapped to the Greengenes database [13]. OTUs with less than six sequence reads, unclassified reads, and chloroplast reads were removed. All OTUs found in the negative controls (isolation control and non-template PCR control) were also removed from analysis. Downstream statistical analysis (principal coordinate analysis [PCoA]) was performed in Calypso, version 8.18 [14]. All FastQ raw data may be accessed through the study accession number PRJEB24640 at the European Nucleotide Archive.

Results

Patient data

The patients median age at the time of surgery was 11 years (range, 6–17 years) and was not significantly different between the two methods used (median ICP, 12 years [range, 6–16 years] vs median CCP, 9 years [range, 7–17 years]; $P = 0.589$). The patients' details are shown in Table 1. None of the included patients had an acute bladder infection at the time of sampling. Antibiotics at sampling as listed in Table 1 were given according to the resistance pattern of the last UTI.

The median interval between augmentation and sampling was 7 years (range, 4–13 years) for all included patients. Patients after ICP (all samples 4 years after augmentation) had a significantly shorter period between

augmentation and sampling than patients after CCP (median, 12 years; range, 10–13 years) ($P = 0.002$).

Bacterial pattern examination on OTU and genus level

The 16S rRNA gene amplicon-based bacterial analysis resulted in a mean number of 101,824 reads per sample (range, 1,117–349,873; standard deviation, 89,681.623 reads). From the complete OTU list with 1,467 OTUs, 589 bacterial OTUs were used for further analysis after application of the filtering steps described in the Methods section. The subsequent genus level analysis revealed 263 microbial genera that were again cleaned from genera with less than six sequence reads, unassigned reads, and chloroplast hits and all genera that were also found in any of the negative controls ending up with 153 bacterial genera.

α -Diversity: the effect of augmentation, tissue, and gender on Shannon diversity index

The microbial richness of the samples (12 patients, 2 samples each) ranged from 6 to 215 OTUs and 3 to 62 genera per sample. To analyze potential differences between augmentation method (ICP vs CCP), tissue (IS vs UB), and gender of the samples' α -diversity, Shannon diversity index values were used. However, no statistically significant differences were found for the comparison of IS vs UB samples (neither in the ICP nor the CCP group) ($P = 0.164$). Furthermore, α -diversity was not significantly different in the comparisons of the pooled samples IS vs UB ($P = 0.112$), CCP vs ICP ($P = 0.204$), and male vs female ($P = 0.16$). It shall be noted that sample 78 IS with only 200 reads was removed from all α -diversity calculations.

β -Diversity: the effect of augmentation on the microbial pattern

Adonis comparison on Bray–Curtis dissimilarity indices revealed no significant influence of the UB and the IS grouping on the overall bacterial pattern on OTU ($P = 0.53$)

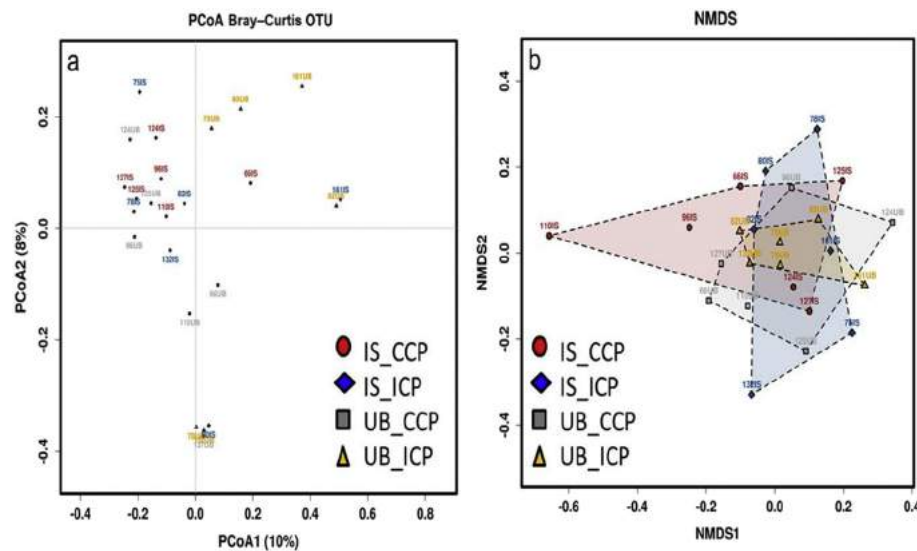


Fig. 1 On OTU level, the IS and UB sample groups overlap in principal coordinate analysis (PCoA) in both, ICP and CCP, classification ($P = 0.22$). Consistently, non-metric multidimensional scaling (NMDS) on OTU level did not result in statistically significant difference between the analyzed groups. CCP, colcystoplasty; ICP, ileocystoplasty; IS, intestinal segment; OTU, operational taxonomic unit; UB, urinary bladder.

and genus level ($P = 0.38$), respectively. Both the groups overlapped in PCoA and non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis (Fig. 1). Therefore, the overall microbiome was considered similar in biopsies taken from the UB and the IS.

The differences in β -diversity (Bray–Curtis and redundancy analysis) regarding the parameters gender, age of the patients at the time of augmentation, age at sampling, and tissue used are shown in Table 2. Most notably, age at sampling had a statistically significant influence on β -diversity at the genus level. Moreover, comparison of the IS vs the UB groups revealed no statistically significant differences (Table 2).

Genus and OTU pattern between the sample groups

To examine and visualize the most abundant genera for comparison between the IS and UB samples, bubble chart (Fig. 2) and bar chart (Supplementary Fig. S1) analyses were performed. In the UB group, the genera *Corynebacterium*, *Pseudoxanthomonas* (only dominant in 1 of 12

samples), *Flavobacterium*, and *Micrococcus* turned out to be the most abundant genera. In the IS group, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Nocardioideaceae*, and *Leucobacter* were the four most abundant taxa. Considering the reads detected over all samples regardless of the group, *Corynebacterium*, *Pseudoxanthomonas*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium*, and *Micrococcus* were the most dominating taxa again. The obvious differences of the microbial pattern between the IS and UB sample within single patients (e.g., patient 75, 80, 110, 124, and 161) (Fig. 2 and Supplementary Fig. S1), however, were not statistically significant.

Linear discriminant analysis effect size

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis over all hierarchical levels was performed to find taxa with statistically significant differences between the UB and IS groups. The analysis revealed *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Thermus*, and *Leucobacter* being significantly different in their relative abundances between the UB and the IS sample groups considering only the 100 most abundant taxa of all samples analyzed ($P < 0.05$) (Supplementary Fig. S2). Nevertheless, as the total-sum scaling (TSS)–normalized abundance of *Staphylococcus*, *Thermus*, and *Leucobacter* was below one percent (Fig. 3A), these taxa were not considered biologically relevant for further analysis.

Corynebacterium

There was an obvious dominance of the genus *Corynebacterium* sp. in the samples taken from the UB and IS in both ICP and CCP patients. Nevertheless, analysis of the relative abundance of the genus *Corynebacterium* in IS vs UB and CCP vs ICP, as well as in the comparison of all four groups,

Table 2 Adonis group-wise comparisons on Bray–Curtis dissimilarity indices and redundancy analysis (RDA) at both operational taxonomic unit (OTU) and genus level.

	Bray–Curtis		RDA	
	OTU	Genus	OTU	Genus
Gender	0.26	0.099	0.035	0.099
Age at augmentation	0.017	0.17	0.09	0.17
Age at sampling	0.13	0.037	0.221	0.037
IS_CCP/IS_ICP/UB_CCP/UB_ICP	0.22	0.21	0.046	0.21
UB vs IS	0.53	0.38	0.107	0.38

Statistically significant values are given in bold.

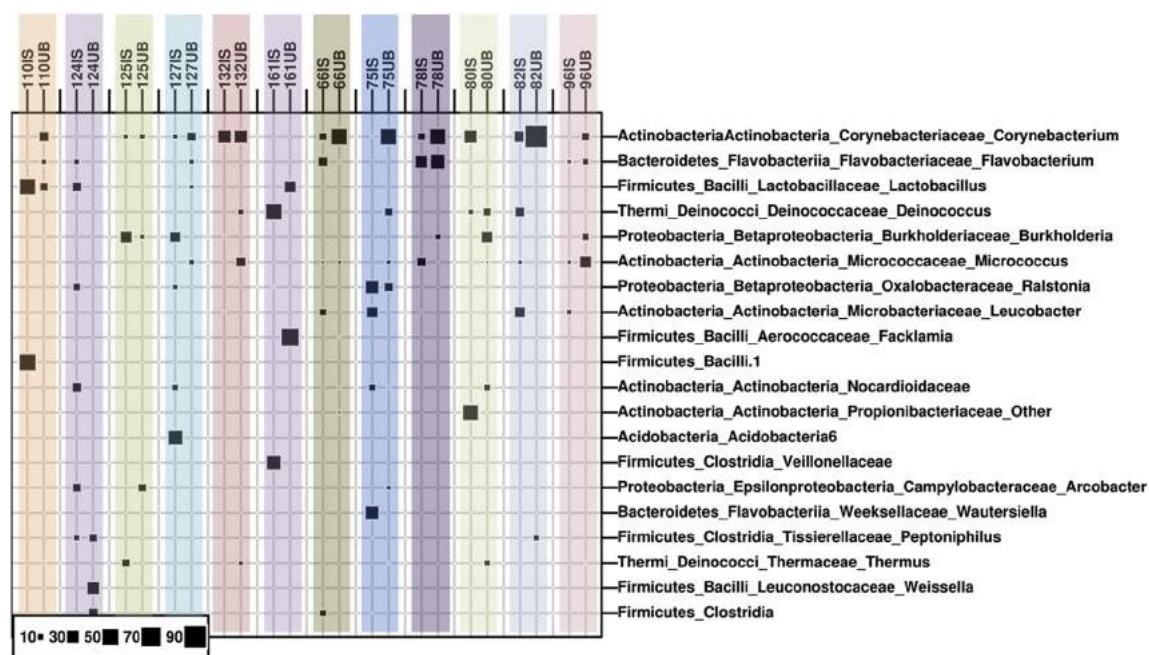


Fig. 2 Bubble plot for quantitative representation of the 50 most abundant taxa that differ between not only patients but also IS and UB samples within one patient. Each row represents an OTU, and each column, a patient. Squares indicate the TSS-normalized relative abundances. IS, intestinal segment; OTU, operational taxonomic unit; UB, urinary bladder.

did not result in statistically significant changes (Fig. 3B–D). The representative read of the *Corynebacterium* OTU was aligned against 16S rRNA databases (Green genes [13], silva [15], rdp [16]) but did not reveal species-level classification.

Discussion

In the present study, the microbiome of the UB of patients after bladder augmentation was examined with NGS-based 16S rRNA gene techniques for the first time. The most important finding was that the bacterial pattern did not statistically significantly differ between the native UB and the ISs introduced into the urinary tract.

The composition of the intestinal microbiome along the different sections of the intestinal tract differs considerably [17]. Environmental factors such as pH, dietary substrates, digestive enzymes, intestinal gases, bacterial fermentation, etc., have a direct impact on the luminal microbial diversity. Furthermore, the luminal microbiome differs from the mucosal microbiome even at the same site within the intestinal tract [17]. This difference may be largely influenced by the mucus itself, which is produced by goblet cells and serves as a rich source of energy for a subset of colonizing intestinal microbes [18]. Finally, the mucus layer serves as an important physical barrier limiting a direct contact between commensal intestinal microbes and the underlying epithelial cells [19]. In summary, each portion of the intestinal tract offers a unique microenvironment of luminal and mucosal factors for the distinct colonization with gastrointestinal microbes. This phenomenon is called the niche concept.

After bladder augmentation, the mucosal part of the ‘intestinal niche’ is introduced into the urinary tract [1]. Thus, the question arises whether or not the intestinal mucosa invites colonization of the native UB with gut microbes and be therefore responsible for the long-term complications after bladder augmentation. Additionally, it was unknown whether the local microbiome of the ISs remains different from the microbiome of the native urine bladder. In the present study, therefore, the local bacterial pattern from the original UB vs the introduced IS was intraindividually compared, and the finding that these two host similar bacterial microbiota despite the distinct differences of origin was described. It may consequently be speculated that the ‘niche concept’ mainly depends on microenvironmental factors such as liquid components, pH, or dietary substrates. It can be hypothesized that transferring the ISs from the environment of the gut to the urinary tract exposes the mucosa to a completely different environment and subsequently allows adaptation to an indigenous urinary microbial colonization, explaining the lack of differences between the microbiome of the ISs and the native UB found in the present study. One of the strengths of this study is the long-term observation period. A median time of 7 years between bladder augmentation and sampling seems long enough to observe any significant changes of the local microbiome. On the other hand, a momentary description of the local microbiome is presented. Future studies could concentrate on a longitudinal examination of the bladder microbiome and the introduced ISs, ideally also assessing the microbiome of the introduced ISs as well as the UB before introduction in the urinary tract.

Until now, data describing the mucosal microbiome of the urinary tract in patients who have undergone bladder

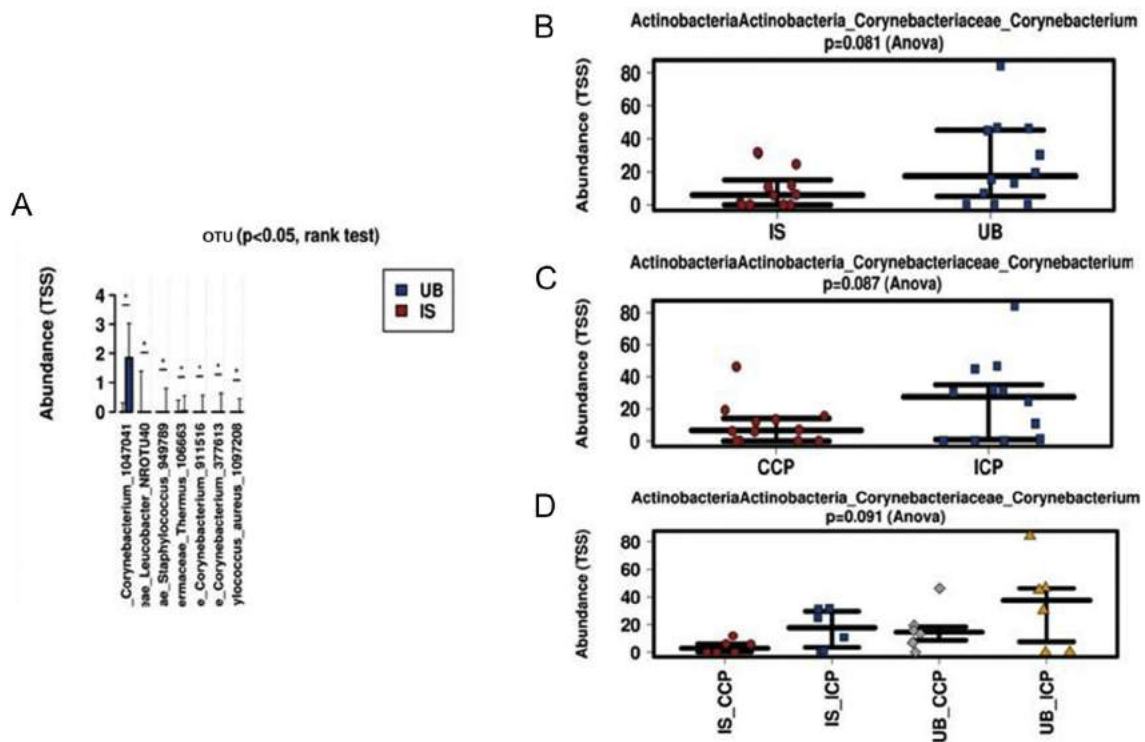


Fig. 3 (A) TSS-normalized relative abundance of taxa significantly altered during LEfSe analysis. Abundance calculation on OTU level by total-sum normalization revealed a statistically non-significant trend of increased *Corynebacterium* abundance (B) in the UB segment compared to the IS and (C) in ICP compared to CCP samples. (D) Additionally, UB_ICP samples showed an increased relative abundance of *Corynebacterium*. CCP, colcystoplasty; ICP, ileocystoplasty; IS, intestinal segment; OTU, operational taxonomic unit; UB, urinary bladder.

augmentation were not available. The literature regarding the specific species causing UTIs after bladder augmentation does not emphasize an overwhelming diversity of gastrointestinal bacteria based on culture-dependent approaches [20]. The NGS-based microbiome data derived from mucosal biopsies with low bacterial diversity seem in accordance with these clinical observations. Data in the literature about the differences of the male and the female urinary microbiome [21] confirm the study results identifying a trend toward difference on genus level between male and female patients (compare Table 2).

The striking presence of *Corynebacterium* in all samples without statistical significance comparing the UB and the IS group corresponds to already published reports on the presence of this bacterium in the human urinary tract [22–25]. Moreover, *Corynebacterium* has been shown to cause UTIs in patients with underlying urological diseases and stone formation [26,27]. Both are well-established complications of bladder augmentation [2]. Therefore, potential therapeutic approaches to decrease the abundance of *Corynebacterium* after bladder augmentation using, for instance, probiotics and their clinical benefits are subject for future studies.

Additionally, non-significant trends in the microbial differences between UB and IS need to be evaluated in a larger sample cohort. Accordingly, other genera found in the samples of this study correspond to published results on the human bladder microbiome [24]. A further question arising is whether or not the local microbiome plays any

role in histological and mucin alterations, particularly in premalignant or malignant transformation [28]. To answer this question, the authors are planning to correlate the microbial changes with the histological alterations in a larger prospective and multicenter study. Furthermore, characterization of especially the viral colonization pattern might be interesting in future projects because of the potential tumor formation in the augmented bladder.

Future studies will also have to address the influence of diet/nutrition on the bladder microbiome. Regarding the function of the urinary tract, colonization with various bacteria such as *Corynebacterium*, *Oligella*, *Staphylococcus*, and *Actinomyces* has been shown to be associated with urge urinary incontinence [6]. As there are presently no data regarding associations between the microbiome and the function of the urinary tract in patients after bladder augmentation, this issue will have to be addressed in future prospective studies.

One limitation of the present study is the small number of patients examined and its retrospective design. Additionally, it may be of interest to compare the microbiome between different regimes of antibiotic prophylaxis, but the number of patients included in this examination is too low to answer this question. Nevertheless, the study data provide the first deep insight into the bacterial microbiome of the UB of pediatric patients after bladder augmentation, a relatively uncommonly performed procedure, and make the first sequence data of patients after bladder augmentation available.

In conclusion, after bladder augmentation, the native UB and the augmented segments (both ICP and CCP) host similar bacterial microbiota despite their distinct differences of their originating mucosal anatomy.

Author statements

Ethical approval

This study was approved by the local ethics committee (5011-0/2010-1018EKU).

Competing interests

None declared.

Funding

None declared.

References

- [1] Kisku S, Sen S, Karl S, Mathai J, Thomas RJ, Barla R. Bladder calculi in the augmented bladder: a follow-up study of 160 children and adolescents. *J Pediatr Urol* 2015;11:66.e1–6.
- [2] van den Heijkant M, Haider N, Taylor C, Subramaniam R. Efficacy of bladder irrigation and surveillance program in prevention of urinary tract infections and bladder calculi in children with an ileocystoplasty and bladder neck repair. *Pediatr Surg Int* 2011;27:781–5.
- [3] Kispal Z, Balogh D, Erdei O, Kehl D, Juhasz Z, Vastyan AM, et al. Complications after bladder augmentation or substitution in children: a prospective study of 86 patients. *BJU Int* 2011;108:282–9.
- [4] Gottschick C, Deng ZL, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome* 2017;5:99.
- [5] Brubaker L, Wolfe AJ. The new world of the urinary microbiota in women. *Am J Obstet Gynecol* 2015;213:644–9.
- [6] Gerber D, Forster CS, Hsieh M. The role of the genitourinary microbiome in pediatric urology: a review. *Curr Urol Rep* 2018;19:13.
- [7] Karstens L, Asquith M, Davin S, Stauffer P, Fair D, Gregory WT, et al. Does the urinary microbiome play a role in urgency urinary incontinence and its severity? *Front Cell Infect Microbiol* 2016;6:78.
- [8] Klymiuk I, Bambach I, Patra V, Trajanoski S, Wolf P. 16S based microbiome analysis from healthy subjects' skin swabs stored for different storage periods reveal phylum to genus level changes. *Front Microbiol* 2016;7:2012.
- [9] Aronesty E. Comparison of sequencing utility programs. *Open Bioinf J* 2013;7:1–8.
- [10] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7:335–6.
- [11] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 2011;27:2194–200.
- [12] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 2010;26:2460–1.
- [13] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:5069–72.
- [14] Zakrzewski M, Proietti C, Ellis JJ, Hasan S, Brion MJ, Berger B, et al. Calypso: a user-friendly web-server for mining and visualizing microbiome-environment interactions. *Bioinformatics* 2017;33:782–3.
- [15] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013;41:D590–6.
- [16] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:5261–7.
- [17] Haange SB, Oberbach A, Schlichting N, Hugenholtz F, Smidt H, von Bergen M, et al. Metaproteome analysis and molecular genetics of rat intestinal microbiota reveals section and localization resolved species distribution and enzymatic functionalities. *J Proteome Res* 2012;11:5406–17.
- [18] Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003;62:67–72.
- [19] Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science* 2011;334:255–8.
- [20] Wullt B, Holst E, Steven K, Carstensen J, Pedersen J, Gustafsson E, et al. Microbial flora in ileal and colonic neobladders. *Eur Urol* 2004;45:233–9.
- [21] Kogan MI, Naboka YL, Ibishev KS, Gudima IA, Naber KG. Human urine is not sterile — shift of paradigm. *Urol Int* 2015;94:445–52.
- [22] Curtiss N, Balachandran A, Krska L, Peppiatt-Wildman C, Wildman S, Duckett J. A case controlled study examining the bladder microbiome in women with overactive bladder (OAB) and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017;214:31–5.
- [23] Greninger AL, Streithorst J, Chiu CY, Miller S. First complete genome sequence of *Corynebacterium riegliei*. *Genome Announc* 2017;5.
- [24] Thomas-White K, Brady M, Wolfe AJ, Mueller ER. The bladder is not sterile: history and current discoveries on the urinary microbiome. *Curr Bladd Dysfunct Repo* 2016;11:18–24.
- [25] Thomas-White KJ, Kliethermes S, Rickey L, Lukacz ES, Richter HE, Moalli P, et al. Evaluation of the urinary microbiota of women with uncomplicated stress urinary incontinence. *Am J Obstet Gynecol* 2017;216: 55 e1– e16.
- [26] Vedel G, Toussaint G, Riegel P, Fouilladieu JL, Billoet A, Poyart C. *Corynebacterium pseudogenitalium* urinary tract infection. *Emerg Infect Dis* 2006;12:355–6.
- [27] Soriano F, Tauch A. Microbiological and clinical features of *Corynebacterium urealyticum*: urinary tract stones and genomics as the Rosetta Stone. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:632–43.
- [28] Kispal ZF, Kardos D, Jilling T, Kereskai L, Isaacs M, Balogh DL, et al. Long-term histological and mucin alterations in the neobladder mucosa following urinary bladder augmentation or substitution with gastrointestinal segment. *J Pediatr Urol* 2015;11:349 e1–6.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.jpuro.2018.07.028>.