

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Perifériás ideg *in vivo* intraoperatív epineurális metilénkék festése  
patkány modellben**

Dr. Szabó Tamás



Doktori Iskola: Elméleti Orvostudományok

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Program: Neuroendokrinológia és neurohisztológia

Témavezetők: Dr. Gaszner Balázs, Dr. Rékási Zoltán

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Traumatológiai és Kézsebészeti Klinika és Anatómiai Intézet**

**Pécs, 2022.**

<b>Tartalomjegyzék</b>	<b>2.</b>
<b>Rövidítések jegyzéke</b>	<b>4.</b>
<b>1. Bevezetés</b>	<b>5.</b>
1.1. Történelmi áttekintés	5.
1.2. Dupuytren kontraktúra prevalenciája, etiológiája	8.
1.3. Tenyér és kézujjak fascia rendszerének anatómiája	9.
1.4. A perifériás ideg szöveti szerkezetének áttekintése	11.
1.5. Dupuytren kontraktúra patho-anatómiája	13.
1.6. Terápiás lehetőségek	18.
1.7. Metilénkék és alkalmazása	21.
<b>2. Célkitűzések</b>	<b>23.</b>
<b>3. Anyagok és Módszerek</b>	<b>24.</b>
3.1. Kísérleti állatok	24.
3.2. Kísérleti elrendezés	24.
3.2.1. Kontroll kísérletek	24.
3.2.2. Kísérletek az epineurálisan injektált metilénkék festék hisztoanatómiai eloszlására és az optimális metilénkék koncentráció meghatározására	25.
3.2.3. Kísérlet 40 µl (1:80) epineurális metilénkék oldat injektálás hatásának vizsgálatára patkány nervus ischiadicusban	26.
3.2.4. Humán kadáver digitális ideg festése metilénkék oldattal	27.
3.3. Módszerek	27.
3.3.1. Műtéti technika	27.
3.3.2. Fájdalomküszöb mérés	29.
3.3.3. Eutanázia, szövetminta gyűjtés	30.
3.3.4. Szövetteni előkészítés, hematoxilín-eosin (HE) festés és natív preparátumok készítése	31.
3.3.5. Mikroszkópia, digitális képalkotás és morfometriai analízis	31.
3.3.6. Statisztika	32.

<b>4. Eredmények</b>	<b>33.</b>
4.1. A nervus ischiadicus disszekciója, az idegen végzett epineurális tűszúrás és fiziológiás sóoldat injekció nem okoz funkcionális és morfológiai károsodást	33.
4.2. Az idegbe adott metilénkék injekció az epineurális térben oszlik meg, mely az 1%-os törzsoldat nyolcvanszoros hígításával is jól felismerhető kék elszíneződést okoz	35.
4.3. Hígított metilénkék oldat epineurális injekciója biztonságosan alkalmazható az ideg <i>in vivo</i> megjelölésére	37.
4.4. Metilénkék oldattal végzett epineurális idegfestési eljárás sikeresen alkalmazható formalin fixáláson át nem esett kadáver digitális idegen	40.
<b>5. Megbeszélés</b>	<b>43.</b>
<b>6. Új eredmények összefoglalása</b>	<b>48.</b>
<b>7. Irodalomjegyzék</b>	<b>49.</b>
<b>8. Közlemények jegyzéke</b>	<b>55.</b>
<b>9. Köszönetnyilvánítás</b>	<b>60.</b>

## Rövidítések jegyzéke

ANOVA	variancia analízis
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -simaizom aktin
AZAN	azokármin-anilin kék
DPA	dinamikus plantáris aesthesiometer
GWAS	teljes genom asszociáció vizsgálat
HE	hematoxilin-eosin
MP	metacarpo-phalangeális
PAS	perjódsav+Schiff-reagens
PAS-H	perjódsav+Schiff-reagens+hematoxilin
PBS	foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat
PFA	paraformaldehid
PIP	proximális interphalangeális
SEM	az átlag standard hibája
TNF	tumor necrosis faktor

## **1. Bevezetés**

A Dupuytren kontraktúra a palmaris és digitális fasciát érintő progresszív fibroproliferatív betegség, melyben a kialakuló kóros hegszövet az érintett ujjak flexiós kontraktúráját okozva a kéz funkciójának károsodását és az életminőség romlását eredményezi (Michou et al. 2012, Wilburn et al. 2013, Mohan et al. 2014, Stirling et al. 2021). A betegség etiológiája még nem teljesen ismert, a háttérben genetikai, immunológiai és környezeti tényezők interakciója áll (Hindocha et al. 2006). A betegséget megelőzni jelen ismereteink szerint nem lehet, napjaink intenzív kutatásainak ellenére oki terápia még nem áll rendelkezésre (Nanchahal et al. 2018). A Dupuytren kontraktúra kezelése alapvetően sebészi. A kiterjedéstől, az érintett ujj ízületeiben kialakult flexiós kontraktúra jellegétől, nagyságától függően számos műtét típus jöhet szóba. A leggyakrabban végzett műtét a parciális aponeurektómia. Dupuytren kontraktúrában az ujjon megjelenő spirális és pretendinosus köteg a digitális ideg elhelyezkedését megváltoztathatja, az ideg az ujj középvonala felé diszlokálódhat és felületessé válhat. Aponeurektómia során a Dupuytren hegszövetbe ágyazott és megváltozott elhelyezkedésű digitális ideg disszekciója nehéz, az idegsérülés esélye nagy (Watson et al. 1991, Rayan 2007, Macey et al. 2018, Eberlin et al. 2018). Parciális aponeurektómia összesített komplikációs rátája magas, 24%-ot is elérheti (Denkler 2010, Crean et al. 2011). A digitális ideg iatrogén sérülésének gyakorisága primer műtéteknél elérheti a 3,4%-ot (Denkler 2010). A parciális aponeurektómián átesett betegek mintegy 20-30%-a számíthat recidívára (Chen et al. 2011, Soreide et al. 2018, Gruber et al. 2021), és az idegsérülés előfordulásának esélye revíziós műtéteknél tovább emelkedik (Watson et al. 1991, Denkler 2010, Cheung et al. 2015), mivel a digitális ideg megkímélése ilyen esetekben még a tapasztalt kézsebész számára is kihívás. Tekintettel arra, hogy a Dupuytren kontraktúra alapvetően nem okoz idegkárosodást, a iatrogén idegsérülés és recidíva esetén a beteg életminősége a preoperatív állapothoz képest jelentősen romolhat, mely elkeserítő a betegre nézve és jelentős kudarc a kézsebész számára.

### **1.1. Történelmi áttekintés**

Az első, feltételezhetően Dupuytren kontraktúrát tartalmazó antropológiai lelet 2009-ben Al'Asasifban (Luxor, Egyiptom) került elő. Monthemhat sírjának feltárásakor az egyik múmia paleo-pathológiai vizsgálatával Dupuytren kontraktúra jelenléte igazolódott. A leletet <sup>14</sup>C

izotópos kormeghatározással a Krisztus előtti 1010-820-as évekre datálták (Garcia-Guixé et al. 2009).

Megemlítendő azon érdekes feltételezés is, miszerint a keresztény kultúrában megjelenő “eskü-kéz” tartás háttérében Dupuytren kontraktúra állhat (Osterman et al. 2012). A római Domitilla katakomba (Kr.u. 2. század) utolsó vacsorát ábrázoló freskóján, Péter ábrázolásánál tűnik fel legelőször ez a jellegzetes kéztartás (1. ábra). A pápai áldás szimbólumává vált kéztartás háttérében valószínűsíthető azonban, hogy nervus ulnaris károsodás állhat (Futterman 2015).

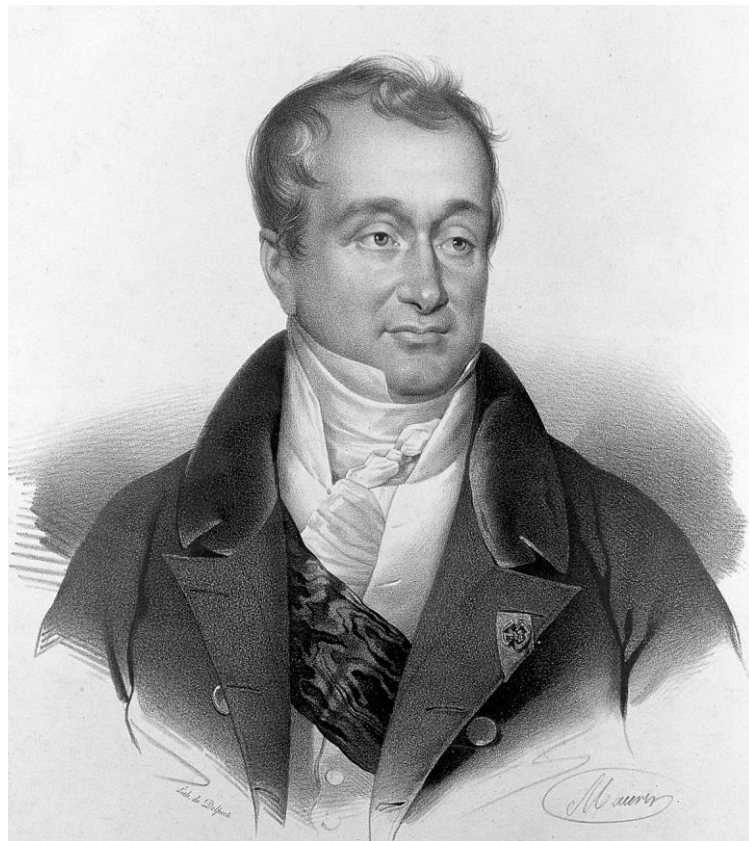


1. ábra. A Domitilla katakomba freskója. A képen bekeretezett jellegzetes kéztartás a bal felső sarokban nagyobb méretben is látható. (Módosítva, a kép forrása: Web Gallery of Art)

A skandináv országokban észlelt magas prevalencia adatokra alapozva terjedt el, és a mai napig tartja magát az a nézet, miszerint a Dupuytren betegség a vikingektől eredeztethető, valamint a viking hódítások járultak hozzá a betegség elterjedéséhez (Early 1962, Elliot 1999, Flatt 2001, McFarlane 2002). Szintén segítették e teória terjedését az Izland és az Orkney-szigetek mondavilágából származó történetek, melyek a Dupuytren kontraktúrával érintettek kezeinek csodás gyógyulásairól számolnak be (Whaley et al. 1993). A köznyelvben a Dupuytren betegséget még napjainkban is gyakran viking betegségnek nevezik. A csupán prevalencia értékekre alapozott “északi eredet” teória tudományosan azonban nem alátámasztott (Hindocha et al. 2009). Genetikai vizsgálatok eredményei a betegség esetleges viking eredetét határozottan cáfolják (Ng et al. 2020).

A kéz ujjait érintő flexiós deformitás első leírása Felix Plater (1536-1614) bázeli anatómus nevéhez fűződik. 1614-ben kiadott, anatómiai tanulmányait katalogizáló *Observationum in Hominis Affectibus* című könyvében számol be az aponeurosis palmarisból kiinduló subcutan hegkötegről, mely az érintett ujj hajlított helyzetben való rögzülését okozza (Belusa et al. 1995).

Henry Cline (1750-1826) a londoni St. Thomas' Hospital sebésze 1777-ben, kadáver kéz boncolásakor jegyezte fel, hogy a tenyéri fasciából kiinduló hegesedés a kézujjak kontraktúráját okozza. Terápiaként a hegköteg átmetszését javasolta, azonban műtéti beavatkozást az anesztézia és antiszeptikus feltételeinek hiánya miatt nem végzett. Henry Cline fia, 1808-as előadásában szintén említi, hogy az aponeurosis palmaris kötegeinek heges megvastagodása miatt az ujjakon kialakult kontraktúra a köteg átvágásával hatékonyan kezelhető. A londoni Guy's Hospital sebésze, Sir Astley Cooper (1768-1841) 1822-ben megjelent könyvében (*A Treatise on Dislocations and Fractures of the Joints*) javasolja a subcutan fasciotomiát. Említi azt is, hogy az ujj kontraktúrájának sebészi kezelése nem javasolt, amennyiben az hajlító ín vagy ínhüvely eredetű. Ezen utóbbi állítás abszolútizálása, tudatos és konzekvens rosszul idézése - miszerint a kézujj flexiós kontraktúrája sebészileg kezelhetetlen - vezethetett ahhoz, hogy a betegséget nem róla nevezték el (Osterman et al. 2012).



2. ábra. Baron Guillaume Dupuytren, (forrás: Wikipédia)

A párizsi Hotel-Dieu sebésze, Baron Guillaume Dupuytren (1777-1835) (2. ábra) 1831. december 5-én tartott előadásában - melyet szó szerint közöltek a *Journal Universel et Hebdomadaire de Médecine et de Chirurgie Pratiques et des Institutions Médicales* folyóiratban - számolt be egy betegéről, akinek az aponeurosis palmaris hegesedése miatt kialakult kis és gyűrűs ujj flexiós kontraktúráját sikeresen kezelte palmaris fasciotómiával. A fasciotómiát a disztális tenyéri redőben, az alapperc középső harmadában és a proximális interphalangealis (PIP) ízületi redőben ejtett haránt metszéseken keresztül végezte el, és a sebeket nyitva kezelte. Dupuytren szerint a flexiós kontraktúrát a palmaris aponeurosisból induló és az ujja terjedő hegesedés okozza. A betegség kiváltó okának a tenyeret ért krónikus repetitív traumát nevezte meg, és elvetette a hajlító ín és ínhüvely, valamint a kézujj ízületeinek kóroki szerepét, továbbá felvetette a betegség örökletes jellegét is. A betegség leírásáról 1834-ben jelent meg Dupuytren cikke a *Lancet* című folyóiratban (Dupuytren 1834). Az 1840-es években, Amerikában megjelenő éter anesztézia lehetővé tette az időigényes fasciektómia rutinszerű elvégzését (Elliot 1999, Osterman et al. 2012).

## **1.2. Dupuytren kontraktúra prevalenciája, etiológiája**

Földrajzi lokalizációtól függően a Dupuytren kontraktúra prevalencia értékei között jelentős eltérés tapasztalható (Hindocha et al. 2009). A betegség prevalenciája a 30%-ot is elérheti (Burge et al. 1997, Burge 1999, Hart et al. 2005, Lanting et al. 2014). Magas prevalencia érték észlelhető az észak-európai kaukázusi népcsoportoknál (Hindocha et al. 2009). A betegség 2,5-szer gyakoribb férfiaknál, mint nőknél, de ez az érték az életkor függvényében változik. 35 éves kor körül a Dupuytren kontraktúra közel 100%-ban a férfiakat érinti, az életkor előrehaladtával azonban a férfi-nő arány kiegyenlítődik, 85 éves kor körül a nem szerinti eloszlás már 1:1 (US census data, <http://www.census.gov/prod/cen2010/briefs/c2010br-03.pdf>).

Az intenzív kutatások ellenére, a Dupuytren kontraktúra pontos etiológiája nem ismert. A betegség kialakulásáért genetikai, immunológiai és környezeti tényezők interakciója tehető felelőssé. Genetikai okra utal a családon belüli halmozódás magas aránya is (Hindocha et al. 2006). Dán ikervizsgálatok eredményei igazolták, hogy a Dupuytren kontraktúra kialakulásának hátterében 80%-ban genetikai okok, míg 20%-ban környezeti hatások állnak (Larsen et al. 2015). A betegség autoszomális domináns öröklődésű, a gén expresszivitás és penetrancia mértéke változó (Michou et al. 2012). Teljes genom asszociációs vizsgálattal



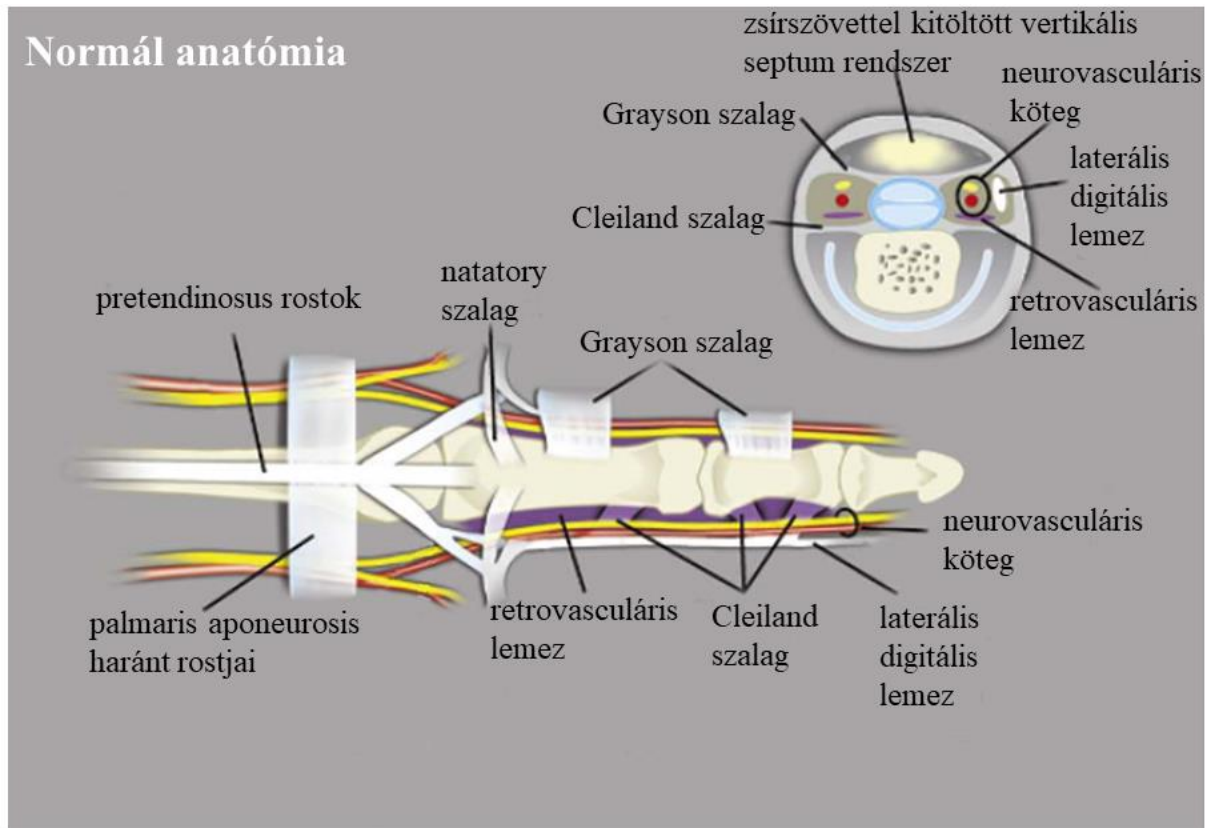
(GWAS) végzett kutatások identifikálták a Dupuytren kontraktúra kialakulásában szerepet játszó géneket, melyek a szöveti differenciálódást szabályozó Wnt jelátviteli út kóros működéséért felelősek és a patológiás extracelluláris matrix képződés hátterében állnak (Dolmans et al. 2011, Ng et al. 2017). A Dupuytren kontraktúra kialakulását számos nem genetikai, külső tényezővel is kapcsolatba hozták. Nem bizonyított, hogy szignifikáns összefüggés lenne a dohányzás, alkoholfogyasztás, hypercholesterinaemia, cukorbetegség, manuális munkavégzés, korábbi kézsérülés és a Dupuytren kontraktúra kialakulása között, azonban e faktorok a kezelés végeredményét, komplikációs rátáját negatívan befolyásolhatják (Geoghegan et al. 2021).

### **1.3. Tenyér és kézujjak fascia rendszerének anatómiája**

A tenyér és kézujjak fascia rendszerének anatómiai ismerete nélkülözhetetlen a Dupuytren kontraktúra pathomechanizmusának, kezelési elveinek megértéséhez (3. ábra). A kézhati bőr a kéz csontos vázához lazán rögzített, alapjáról könnyen elmozdítható. Ezzel ellentétben, a kéz tenyéri felszínén a bőr rögzülése feszes: a tárgyak biztos fogásának alapfeltétele a tenyéri bőr stabilitása, melyet az aponeurosis palmaris és az ujjak fascia rendszere biztosít. Az aponeurosis palmarisnak a tenyéri struktúrák stabilizálásán túl fontos szerepe van azok egymástól való elkülönítésében és védelmében. A tenyéri fascia felületet hosszanti lefutású, pretendinosus rostok alkotják, melyeket verticalis állású apró rostok kapcsolnak a bőrhöz. Ezen rétegtől mélyebben helyezkednek el a palmaris aponeurosis haránt kötegei, melynek disztális éle - a Legueu és Juvara septumokkal együtt - a hajlító inak legproximálisabb ínhüvely gyűrűjének is tekinthető (Manske et al. 1983, Doyle 1990). A tenyérben a neurovascularis kötegek a palmaris aponeurosis haránt rostjaitól dorzálisan helyezkednek el. A haránt rostoktól disztálisan az ínhüvelyszájadékhoz az aponeurosis hosszanti rostjai nem kapcsolódnak.

A palmaris aponeurosis haránt rostjaitól disztálisan és dorzálisan, az interdigitalis spatiumban helyezkednek el a Legueu és Juvara septumok. Ezen septumok rekeszeket alkotnak az interdigitális térben a hajlító inak, neurovascularis kötegek és a lumbricalis izmok számára. A septumok a palmaris aponeurosis haránt rostjaitól indulnak, majd disztál és dorzál felé haladva a metacarpo-phalangeális (MP) ízületek *palmar plate*-jéhez (ligamentum palmare), az *interpalmar plate*-hez, a hajlító ínhüvely A1-es gyűrűszalagjához, továbbá az extensor apparatus sagittális rostjaihoz kapcsolódnak (Legueu et al. 1892, Bilderback et al. 2004). Az interdigitális spatiumban helyezkednek el az angol szaknyelvben natatory ligament-nek

nevezett haránt állású, kötőszöveti rostok, melyek disztálisan a laterális digitális lemezhez kapcsolódnak. A kézujjak mindkét oldalán végighaladó, hosszanti rostokból álló vékony fascia réteget hívjuk laterális digitális lemeznek.



3. ábra. A tenyér és kézujj fascia rendszerének anatómiája. (módosítva, Green's Operative Hand Surgery alapján)

A kézujjak voláris oldalán a bőr rögzítését egy zsírszövettel kitöltött kötőszövetes verticalis septum rendszer, a *Cleiland* és *Grayson szalagok*, valamint a laterális digitális kötőszöveti lemezek biztosítják. Az alap és középpercc in hüvelyéről induló *Grayson szalag* egy vékony fascia hártya, mely a neurovascularis kötegektől volárisan elhelyezkedve az ujj laterális kötőszöveti lemezéhez kapcsolódik. A *Cleiland szalag* az alap és középpercc periosteumától indul, majd a neurovasculáris kötegtől dorzálisan haladva éri el a laterális kötőszöveti lemezt. A neurovascularis kötegek gyakorlatilag a *Cleiland*, a *Grayson szalag* és a laterális digitális lemez által határolt rekeszekben helyezkednek el.

#### 1.4. A perifériás ideg szöveti szerkezetének áttekintése

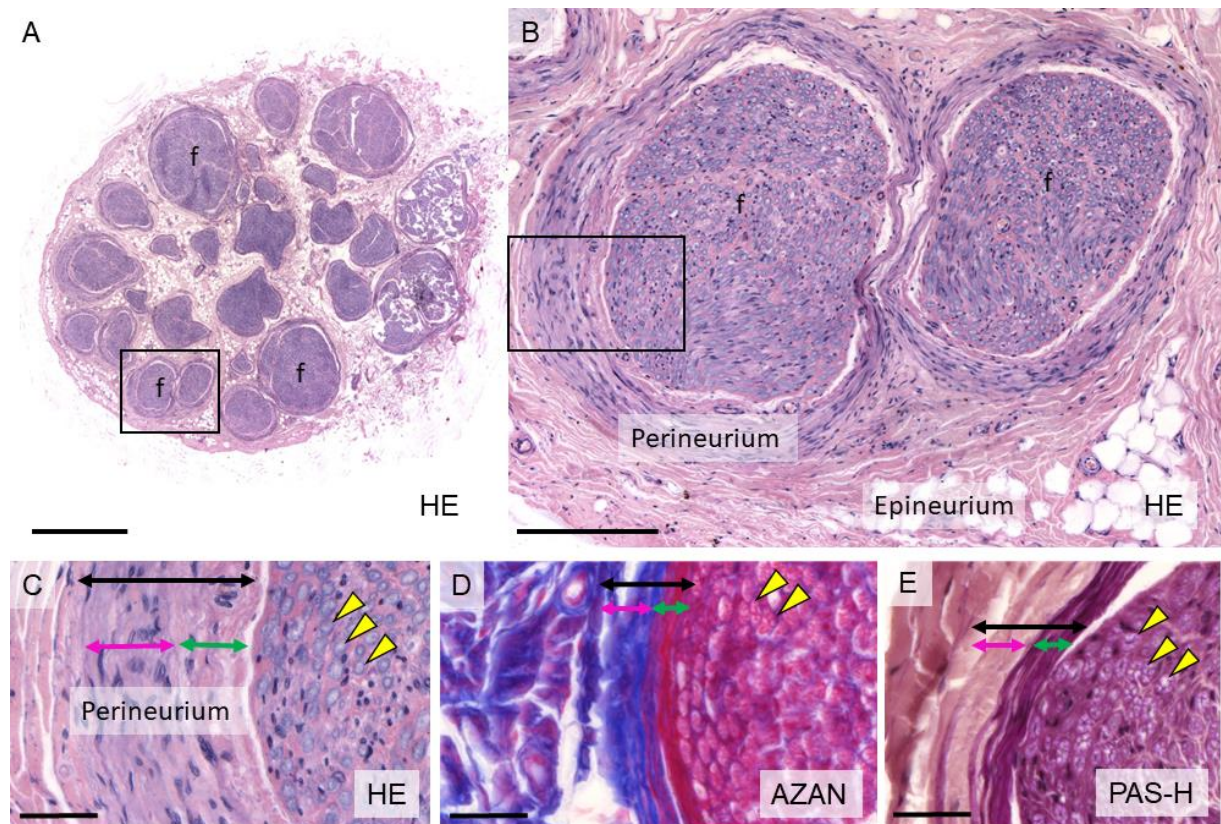
A tenyér és az ujjak fent tárgyalt anatómiai kompartmentjeiben elhelyezkedő idegek illetve a kísérleteinkben modellként alkalmazott ideg, a patkány nervus ischiadicus jelölése szempontjából elengedhetetlen az idegben található kötőszövetes térségek pontos ismerete, melyet röviden az alábbiakban foglalok össze (4. ábra).

A környéki idegrendszerben az idegrostok kötegekben futnak, melyet szövettani értelemben (perifériás) idegnek nevezünk. Az idegek szöveti szerkezetére jellemző, hogy az idegrost kötegeket (*fasciculus*) egy több rétegből álló kötőszöveti burokrendszer veszi körül. Jellemző, hogy a nagyobb méretű idegek belsejében több fasciculust is találunk, míg az apróbb idegekben ezek száma kisebb.

Az idegnek a környező szövetek felé tekintő felszínéből kiindulva az ideget kívülről borító kötőszöveti struktúra az epineurium, mely azonban nagyobb, több fasciculust tartalmazó idegek esetén betérjed az ideg belsejébe, és kitölti a fasciculusok közötti teret is. Ez a kötőszöveti réteg az idegeket a központi idegrendszerből történő ki- illetve belépésének helyéig követve a kemény agyhártyával folytonos. Az epineurium viszonylag laza szövetében a kötőszöveti sejtek közül fibrocyták, fibroblastok fordulnak elő nagy számban, melyek a réteg kollagénben és elasztikus rostokban gazdag extracelluláris mátrixát és az alapállományt termelik. Jellemző még zsírszövet jelenléte is ebben a rétegben, melyek között gyakran kis érkepek is megfigyelhetők.

Az idegen belül található fasciculusok felszínét egy kötőszövetes rostokban gazdag tömött réteg, a perineurium borítja (4. C-E ábra). Finomabb fénymikroszkópos vizsgálatokkal kimutatható, hogy a perineurium külső rétegében (*pars fibrosa*), a kötőszöveti rostok jelennek meg nagyobb arányban, köztük elszórtan fibroblast sejtek figyelhetők meg. Ezen belül, egy sejtekben gazdagabb réteg kövekezik, melyben módosult fibroblastok (myofibroblastok) találhatók nagyobb arányban. Elektronmikroszkópos vizsgálattal e sejtek között *tight junction* típusú kapcsolatok figyelhetők meg. A módosult fibroblastok ebből a szempontból hám jellegű tulajdonságokkal is bírnak, ezért ez a belső perineurium alréteg a *pars epithelialis* nevet viseli. A sejtek között PAS festéssel kimutatható egy kifejezett bazális membrán hálózat is. Jelen kutatás szempontjából is lényeges, hogy a *pars epithelialis* e két tulajdonsága is arra utal, hogy az egy hatékony kémiai barriert képez az idegrostokat tartalmazó tér felé, és az epineurium felől ezen a perineurális alrétegen keresztül az anyagáramlás nagymértékben kontrollált.

A perineurium által határolt idegrostkötegben, a fasciculusban található az idegrostok, az endoneurium laza, rácsrostokban gazdag kötőszövetébe ágyazottan, melyekben fibroblastok, macrophagok is előfordulnak.



4. ábra. A perifériás ideg szöveti szerkezetének áttekintése. Kis nagyítású felvételen egy nagyobb emberi ideg (A) keresztmetszete látható hematoxilin-eosin (HE) festéssel, mely számos fasciculust (f) tartalmaz az epineuriumba ágyazva. A fekete négyszög által jelölt terület látható nagyobb nagyítással a B panelen, ahol a fasciculust közvetlenül borító perineurium és azt körülvevő epineurium is látható. Tovább növelve a nagyítást (C-E) a perineurium (fekete kettős nyíl) pars fibrosa (rózsaszín kettős nyíl) pars epithelialis (zöld kettős nyíl) is elkülöníthető. Ez utóbbi az azokármín-anilin kék (AZAN) és perjódsvav Schiff-bázis hematoxilin (PAS-H) festésben (E) még kifejezettebben elkülönül piros illetve lila színben. A fasculus belsejében az endoneurium szövetébe ágyazottan idegrostok nagy számban figyelhetők meg (sárga nyílhegyek). Lépték: A: 1 mm, B: 250  $\mu$ m, C-E: 50  $\mu$ m. (A fotók a PTE Anatómiai Intézet digitális oktatási képanyag adatbázisából származnak.)

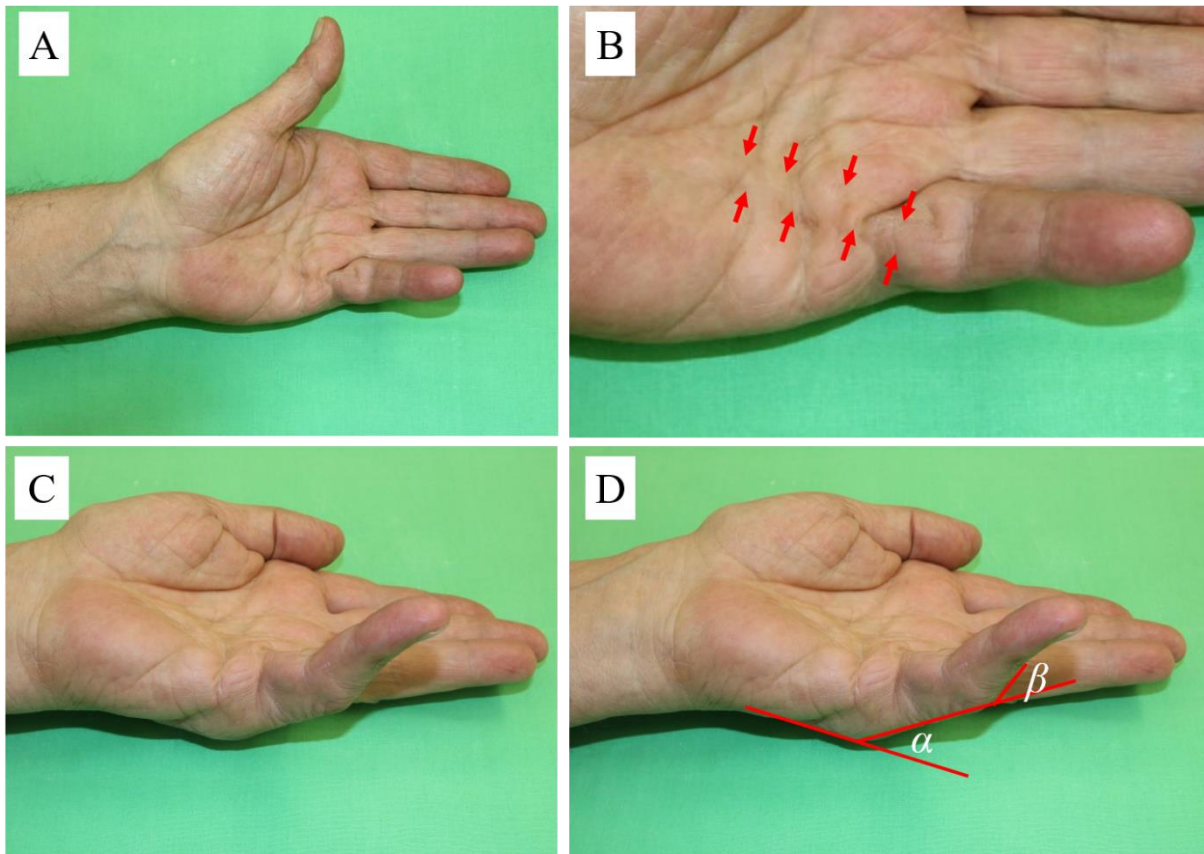
Az endoneuriumba ágyazott idegrostok között nagy számban fordulnak elő velőshüvellyel rendelkezők, de kisebb arányban velőtlen rostok is fellelhetők. Előbbi esetben az axonokat a Schwann sejtek sejtmembrán kettőzetének rétegei által képzett myelin hüvely borítja. A

velőtlen rostok esetében a Schwann sejtek egy, a sejtmembránjuk által képzett hüvelybe zárják az axont, de nem képeznek az axon körül felcsavarodó myelin hüvelyt. Mindkét fő rostféleség esetében a struktúrát az endoneurium felé egy, a Schwann sejtekhez tartozó lamina basalis zárja le.

A kutatás tárgyát képező, a Dupuytren betegségben érintett nervi digitales palmares proprii jórészt velőshüvellyel rendelkező érző idegrostokat szállítanak, de megtalálhatók bennük velőtlen rostok is, melyek egyrészt szimpatikus postganglionáris rostok a verejtékmirigyek beidegzésére, másrészt fájdalom és hő érző rostok. Mivel az emberi nervi digitales palmares proprii *in vivo* jelölését szeretnénk volna vizsgálni, az ehhez hasonló méretű patkány nervus ischiadicust választottuk modellnek. A két ideg szöveti szerkezete hasonló, de kiemelő, hogy a nervus ischiadicus az érző és szimpatikus rostok mellett tartalmaz mozgató rostokat is, melyek patkányban a hátsó végtag izomcsoportjainak motoros kontrollját végzik. Ez a neuroanatómiai helyzet azt is szükségessé és lehetővé tette, hogy a kísérleteink során végzett beavatkozások érző funkciót érintő hatása mellett a patkány nervus ischiadicus motoros funkcióját is vizsgáljuk, pontosabb képet kapva az esetleges idegkárosodásról.

### **1.5. Dupuytren kontraktúra patho-anatómiája**

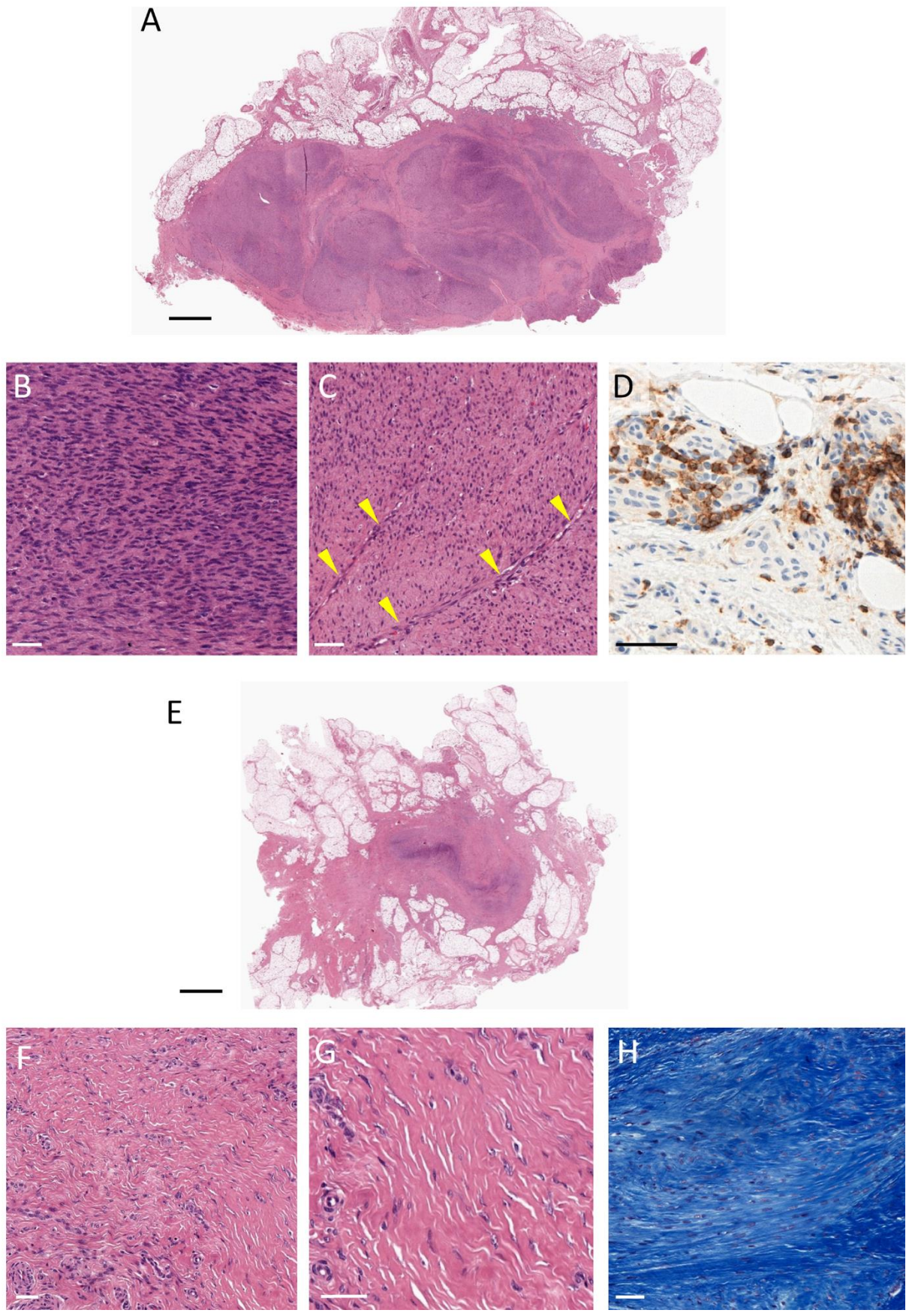
A betegség legelső klinikai megnyilvánulása egy tömött tapintatú csomó megjelenése az aponeurosis palmarisban, típusosan a gyűrűsujj sugarában (Rayan 1999) a disztális tenyéri redő magasságában. Dupuytren csomókból vett szövetminták sejttartalmának flow cytometriás analízise alapján a sejtek túlnyomó részét myofibroblastok ( $\approx 90\%$ ), és macrophagok ( $\approx 10\%$ ) alkotják (Verjee et al. 2013). A betegség progressziója során, a tenyér és kezujjak fascia rendszerét érintő fibroproliferáció indul meg, a macrophagok által termelt tumor necrosis faktor (TNF) hatására a Wnt jelátviteli úton keresztül a fibroblastok myofibroblastokká differenciálódnak. A fibroproliferáció során patológias kötegek alakulnak ki, melyek „érés folyamatoként” azok megvastagodása és rövidülése következik be, ezáltal flexiós kontraktúrát okozva az érintett ujjakon (5. ábra). A Dupuytren betegségben megjelenő kötegek zsugorodásáért a myofibroblastok által termelt  $\alpha$ -simaizom aktin ( $\alpha$ -SMA) fehérje filamentumok tehetősek felelőssé (Verjee et al. 2013).



5. ábra. Kisujj sugarat érintő Dupuytren kontraktúra

*PTE Balesetsebészeti és Kézsebészeti Klinikán kezelt 74 éves férfi beteg bal kezét érintő Dupuytren kontraktúra (A, C). A mesothenar magasságából induló, a kisujj sugarban elhelyezkedő, a kisujj proximális interphalangeális ízületi redőig érő pathológiás köteg (B). A metacarpo-phalangeális ízületben ( $\alpha$ ) és proximális interphalangeális ízületben ( $\beta$ ) kialakult extenziós elmaradás mértéke (D). (A fotók tudományos célú felhasználásához a beteg hozzájárult.)*

Hisztológiai szempontból (6. ábra) a Dupuytren betegségnek három stádiuma különíthető el. A *proliferatív* fázisban megjelenő Dupuytren csomókban fokozott fibroplasia figyelhető meg, a csomók nagy számban tartalmaznak myofibroblastokat. Az *involúciós* fázisban a Dupuytren csomókon belül a fibroblastok hosszanti lefutású kötegekbe rendeződnek. A myofibroblastok által termelt  $\alpha$ -SMA filamentumok miatt a kialakult pathológiás kötegek rövidülése következik be. A *reziduális* fázisban a kialakult húzóheg sejttartalma csökken, myofibroblast mentes, acelluláris hegszövet képére hasonlító szövet marad vissza (Verjee et al. 2013, Mayerl et al. 2016).



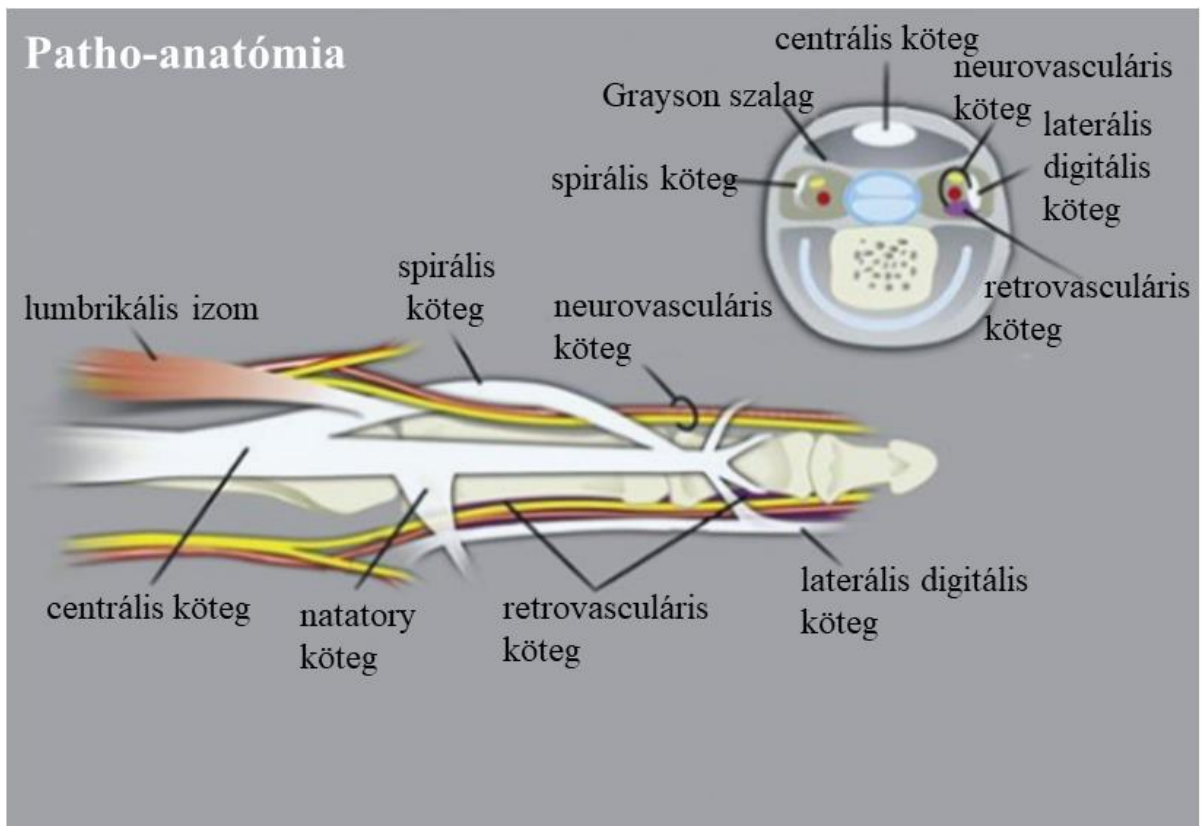
6. ábra. A Dupuytren betegség szövettani jellegzetességei.

*A proliferatív fázisban (A) fellépő superficialis fibromatosis egyforma, monoton nodularis vagy köteges elrendeződésű fibroblastokból áll (B), közöttük kollagéndús stroma van jelen változó arányban. A szövetben jellegzetes, résszerű erek jelennek meg (C, sárga nyílhegyek), és korai stádiumban a lézióban lymphocytás beszűrődés is jellemző (D, CD4 immunfestés, barna). A betegség reziduális fázisában (E) a szövet sejtszegénnyé válik (F), és a heg elsősorban kollagén rostokat tartalmaz (G), melyet a trikróm festés (H) is alátámaszt. (A fotókat Dr. Vida Livia, (PTE ÁOK Patológiai Intézet) bocsátotta rendelkezésünkre.) Lépték: az A és E panelen 2mm, a B-D és F-H fotókon 50µm.*

A pretendinosis rostokból valamint az ujj voláris felszínén lévő fasciából alakul ki a *pretendinosus köteg* illetve az ujjakon a *centrális köteg*, melyek általában kombinált MP és PIP ízületi flexiós kontraktúrát okoznak (5. ábra). A pretendinosus köteg az alapperc proximális harmadának vetületében a bőrhez, valamint ritkán a flexor ínhüvelyhez tapad, a Legueu és Juvara rostokon keresztül pedig a laterális digitális lemezhez. A centrális köteg a kézujj voláris bőrével szorosan összekapcsolódva, a PIP ízületől disztálisan gyakran két részre oszlik. Az egyik szár a hajlító ín ínhüvelyének két oldalához, valamint a középperc basisának periosteumához kapcsolódik, míg a másik szár a középperc magasságában a Grayson szalaghoz és a laterális digitális kötőszöveti lemezhez rögzül. A két szár között elhelyezkedő neurovasculáris köteg ezért a normál anatómiai helyéről az ujj középvonala felé diszlokálódhat. A neurovasculáris köteget spirálisan megkerülő *spirális köteg* a pretendinosus kötegtől indul (7. ábra). Disztális irányba - a neurovasculáris köteg dorzális oldala mentén - haladva éri el a laterális digitális lemezt (melynek hegesedésével a pathológiás *laterális digitális köteg* alakul ki), majd a digitális erek és idegek ventrális oldalára kerülve a Grayson szalagon keresztül éri el az ujj középvonalát, ahol a középperc magasságában a flexor ínhüvelyhez kapcsolódik. Ezen jellegzetes lefutású *spirális köteg* a PIP ízület magasságában a neurovasculáris kötegnek az ujj középvonala felé helyeződését és felületessé válását, valamint a PIP ízület flexiós kontraktúráját eredményezi (McFarlane 1974).

Az interdigitális térben elhelyezkedő kötőszöveti rostok hegesedéséből alakulhatnak ki a *natatory kötegek*, melyek az interdigitális spatiumot szűkítik, csökkentve ezáltal az ujjak abductiójának képességét.





7. ábra. A Dupuytren kontraktúra patho-anatómiája. (módosítva, Green's Operative Hand Surgery alapján)

Kisujj ulnaris oldalán kialakuló, a musculus abductor digiti minimi ín-izom átmenetének területéről eredő *abductor digiti minimi köteg* lefutása és a neurovasculáris képletekre gyakorolt hatása a spirális köteggel megegyező.

A leírt kötegek együttes jelenléte nem törvényszerű. A pathológias kötegek kombinációjával változatos MP és PIP ízület kontraktúra, valamint neurovasculáris köteg diszlokáció alakulhat ki.

A betegség változatos patho-anatómiai megjelenéséből adódóan, a Dupuytren kontraktúra optimális terápiájának meghatározásához segítségül szolgáló, a prognózist megbízhatóan előrejelző, a kézsebészek által egységesen elfogadott és használt stádiumbeosztás nem áll rendelkezésünkre. A legelterjedtebb az Iselin (1951) és Tubiana (1968) által javasolt beosztás, melyek a MP és PIP ízületekben kialakult flexiós kontraktúra mértékét veszik alapul (1. táblázat).

Stádium	Iselin beosztás	Tubiana beosztás
0/N	Dupuytren csomó	Dupuytren csomó a tenyérben, flexiós kontraktúra nincs
1	tenyérben csomók és kötegek, kezdődő MP ízületi kontraktúra	MP és PIP ízületben kialakult extenziós elmaradás összege: 0-45° között
2	MP ízületi kontraktúra 30° alatt, kezdődő PIP ízületi kontraktúra	45-90°
3	30° feletti PIP ízületi kontraktúra	90-135°
4	kézujj extrém fokú flexiós kontraktúrája, keringés és érzészavar az ujjon	135° felett

1. táblázat. A Dupuytren kontraktúra stádiumbeosztása Iselin (1951) és Tubiana (1968) szerint.

## 1.6. Terápiás lehetőségek

Dupuytren kontraktúra hatékony oki terápiája a mai napig nem áll rendelkezésre. A betegség kezdeti stádiumában alkalmazott nem sebészi kezelési módok repertoárja széles, azonban ezidáig nem születtek prospektív, randomizált, hosszú utánkövetésű, nagy esetszámot feldolgozó tanulmányok ezek hatékonyságának alátámasztására (Ball et al. 2016). Szintén nem bizonyított, hogy a nem sebészi kezelések a betegség progresszióját megállítani vagy akár hatékonyan lassítani tudnák. A keloidos hegek kezelésénél tapasztaltakra alapozva, a fibroproliferáció lassításának céljából intranodularisan/intralaesionalisan adott hidrokortizon, triamcinolon adásától a Dupuytren csomó és heg felpuhulása remélhető (Ketchum et al. 2000, McMillan et al. 2012). Az ultrahangos hegoldásnak, az MP és PIP ízületek flexiós kontraktúrájának csökkentése miatt végzett ízületi mobilizációs és nyújtó gyakorlatoknak, masszázs kezelésnek, E-vitamin tartalmú krém lokális használatának, az érintett ujjak extenziós helyzetben történő sínezésének a betegség progresszióját lassító hatása sem bizonyított (Ball et al. 2016). A fibroblastok mitotikus aktivitásának csökkentése céljából a betegség kezdeti stádiumában alkalmazott radioterápiáról sem jelenthető ki, hogy a progressziót szignifikánsan csökkentené, illetve a későbbi műtéti beavatkozást elkerülhetővé tenné (NICE 2016, Kadhum

et al. 2017). Bízthatóak a TNF $\alpha$  inhibitor (adalimumab) Dupuytren csomóba történő injekálásával végzett vizsgálatok, melyek jelenleg a klinikai kipróbálási fázisában vannak (Nanchahal et al. 2018).

A Dupuytren kontraktúra késői stádiumában a sebészi kezelési lehetőségek tárháza széles, fontos, hogy a megfelelő beavatkozást egyénre szabottan kell kiválasztani. Az optimális mütéti technika megválasztását befolyásolja a Dupuytren betegség kiterjedése, az MP és PIP ízület érintettségének mértéke és a kialakult flexiós kontraktúra jellege. Tekintettel arra, hogy a sebészi beavatkozások csak tüneti megoldásnak tekinthetők - magas szövődmény és recidívátával - a beteg preoperatív felvilágosítására kiemelt figyelem fordítandó, ezáltal megteremthető a beteg elvárásai és a várható eredmények közötti egészséges egyensúly.

Dokumentált progresszió esetén, mütéti beavatkozás indikált, ha az MP ízület flexiós kontraktúrája eléri vagy meghaladja a 30 fokot, a PIP ízületben a 20 fokot, illetve ha a kontraktúra funkciókárosodást okoz (Wolfe et al. 2010).

A napjainkban használt mütéti beavatkozások részletes mütétechnikai leírása meghaladná a dolgozat kereteit, azonban a főbb sebészi lehetőségek mindenképpen megemlítendőek: kollagenáz injekció, tú aponeurotómia, szegment aponeurektómia, parciális aponeurektómia és dermofasciektómia. Általánosságban elmondható, hogy nincs tökéletes sebészi megoldás, az egyes beavatkozások előnyeivel, korlátaival a betegnek is tisztában kell lennie.

Tú aponeurotómia (fasciotómia) során a flexiós kontraktúrát okozó pathológiás köteg átvágása túvel, percutan módon történik (NICE 2004), a beavatkozás minimal invazív, olcsó, helyi érzéstelenítésben elvégezhető.

A pathológiás köteget alkotó kollagén rostok Clostridium histolyticum baktériumból nyert kollagenáz enzimmel történő feloldása (Xiapex, Pfizer) egy szintén minimal invazív, ambuláns ellátás keretein belül végzett beavatkozás (Hurst et al. 2009), azonban a Xiapex injekció 2020 márciusa óta ez európai gyógyszerpiacon már nem érhető el (EMA).

Szegment aponeurektómia során a tenyérben elhelyezkedő pretendinosus köteg 1-2 cm-es szakaszának eltávolításával oldható a flexiós kontraktúra.

Agresszívan progrediáló, diffúz, a bőrt is involváló Dupuytren kontraktúra, valamint recidívát esetén alkalmazható mütéttípus a dermofasciektómia (Hueston 1969). Dermofasciektómia során az érintett bőr és fascia eltávolítását követően a keletkezett bőrdefectust teljes vastag bőr átültetésével fedjük.

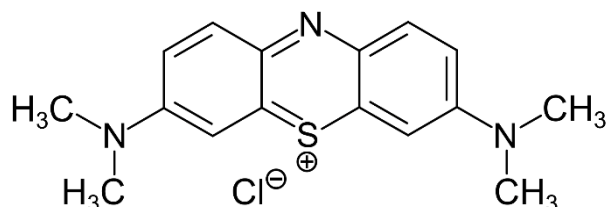
A leggyakrabban végzett műtéttípus a parciális aponeurektómia, melynek elvégzése gyakorlott kézsebészti igényel. Alapkövetelmény a digitális ideg integritásának megőrzése, és ez egyben a műtét nehézségének egyik fő forrása is. A tenyérben a *nervi digitales palmares communes* az aponeurosis palmaris haránt rostjai alatt helyezkednek el, melyek egyértelműen elválasztják a Dupuytren kontraktúrában megjelenő pretendinosus kötegektől a közös digitális idegeket. Ezen anatómiai sajátosság műtét közben “védelmet” nyújt az idegeknek, emiatt a tenyéri régióban a iatrogen idegsérülés veszélye alacsony. Az aponeurosis palmaris haránt rostjaitól disztálisan sajnos a nervus digitalis palmaris proprius már nem egy jól elkülönült és védett anatómiai kompartmentben helyezkedik el. Dupuytren kontraktúrában az ujjon megjelenő, a digitális ideget körülölelő spirális és pretendinosus köteg az ideg normál anatómiai pozícióját megváltoztathatja, így az ideg gyakran felületessé válik és az ujj középvonala felé irányába diszlokálódik. Az ujjon végzett aponeurektómia során az ideg ezen megváltozott pozíciója és a hegyszövetbe ágyazottsága az ideg disszekcióját jelentősen megnehezíti, sérülésének esélyét növeli (Watson et al. 1991, Rayan 2007, Eberlin et al. 2018, Macey et al. 2018).

A fent említett kezelési módok recidíva rátájának összehasonlítása nehéz, melynek alapvető oka, hogy nincs elfogadott konszenzus magáról a recidíva definíciójáról sem (Felici et al. 2014, Kan et al. 2017, Kan et al. 2019). Összességében azonban elmondható, hogy a beavatkozások invazivitása és a várható recidíva között fordított arányosság áll fenn.

A Dupuytren kontraktúra műtéti ellátásának egyik kihívását tehát a digitális ideg megóvásának fontossága és nehézsége adja. Egy egyszerűen kivitelezhető intraoperatív idegfestési eljárás használatával a hegyszövetbe ágyazott és megváltozott lefutású digitális ideg műtét közbeni lokalizálása és megóvása könnyebbé válna, ezáltal a iatrogén idegsérülés veszélye is minimalizálható lenne. Idegfestési kísérleteinkhez a metilénkék oldatot választottuk. A metilénkék hisztológiai felhasználása nagy múltra tekint vissza, napjaink orvostudományában számos területen eredményesen alkalmazzák (Hoffman et al. 2007, Oz et al. 2010, Schirmer et al. 2011, Lo et al. 2014, Vaiman et al. 2016, Mwangi et al. 2016, Zhang et al. 2017, Tucker et al. 2017, Sanchala et al. 2018, Müller et al. 2019, Piromchai et al. 2019, Porizka et al. 2020, Lee et al. 2021).

## 1.7. Metilénkék és alkalmazása

A metilénkéket 1876-ban Heinrich Caro szintetizálta textílfestés céljából a ludwigshafeni Badische Anilin und Soda Fabrik (BASF) kutatóintézetében.



8. ábra. A metilénkék szerkezeti képlete.

A metilénkék (tetramethylthionine chloride,  $C_{16}H_{18}ClN_3S$ ) egy heterocyclikus aromás thiazin festék (8. ábra), sötétkék, vízdékony, szagtalan kristály. Metilénkék oldatban a redukált (leuko-metilénkék) és az oxidált forma egyensúlyban van. A szintelen, redukált leuko metilénkék lipofil tulajdonságú, a sejtmembránon diffúzió útján könnyen átjut, majd a sejten belül  $O_2$  hatására oxidált (kék) metilénkékké alakul át. A metilénkék oldat szövetekre, élő szervezetekre kifejtett széleskörű hatása ezen oxidáló-redukáló (elektron donor-akceptor) képességének köszönhető (Oz et al. 2010). A textilipari felhasználása mellett Robert Koch és Paul Ehrlich munkássága által megindult a metilénkék orvostudomány területén történő alkalmazása is (Ehrlich et al. 1891).

A metilénkék az első szintetikus anyag, melynek antimikrobiális hatását bizonyították (Ehrlich et al. 1891). Methemoglobinémia kezelésére az elsődlegesen választandó szer, malária kezelésére napjainkban is alkalmazzák (Mwangi et al. 2016, Müller et al. 2019). Ifosfamid indukálta encephalopathia kezelésére onkohaematológiai protokollokban is szerepel (Euro Ewing 2012 protokoll). Biztató kutatási eredményekről számoltak be Alzheimer- és Parkinson-betegség, traumás és ischaemiás agykárosodás kezelésében kifejtett neuroprotektív hatásáról is (Tucker et al. 2017). *In vitro*, továbbá *in vivo* állatkísérletekben a metilénkék hatékonynak bizonyult tüdőtumor kezelésében is (Sanchala et al. 2018). Kutatások folynak disztributív *shock*-ban adjuváns terápiaként való alkalmazásáról (Jang et al. 2013, Lo et al. 2014, Porizka et al. 2020). Parotis sebészetében (Vaiman et al. 2016), pajzsmirigy (Piomchai et al. 2019), epeút (Hoffman et al. 2007), valamint nőgyógyászati onkológiai (Zhang et al. 2017) műtéteknél

a metilénkék oldatot már sikeresen használják splanchnicus perifériás idegek jelölésére. Ezen műtéteknél az oldatot intraductálisan (Hoffman et al. 2007, Vaiman et al. 2016), vagy a műtéti terület felületi festőanyagaként alkalmazzák (Zhang et al. 2017, Piromchai et al. 2019).

A metilénkék a legelső mesterségesen előállított, vitális festésre használt vegyület. Vitális festésnek az élő szövetek, sejtek festési eljárását nevezzük. Megkülönböztetünk supravitális és intravitális festést. A gazdaszevezetből kinyert, de még élő szövetek/sejtek festését supravitális, míg a gazdaszervezetben lévő szövetek festését intravitális festésnek nevezzük. A szakirodalom az intravitális és vitális festés kifejezést egymás szinonímjaként is használja. A vitális festésre használt vegyületek alapvető követelménye, hogy ne károsítsák a megfestett szövetet.

## 2. Célkitűzések

A Dupuytren kontraktúra műtéti ellátásának egyik kihívása a hegszövetbe ágyazott és megváltozott lefutású digitális ideg lokalizálása és megóvása. Egy intraoperatív idegjelölési technikával ez könnyebbé válna, ezáltal a iatrogén idegsérülés veszélye is minimalizálható lenne. Jelen ismereteink szerint a metilénkék oldatot perifériás ideg *in vivo* direkt jelölésére még nem alkalmazták, ezirányú felhasználási lehetőségét, hatékonyságát, biztonságosságát korábban nem tanulmányozták.

Kísérletsorozatunk céljai:

1. Intraoperatíván alkalmazható, perifériás ideg direkt festésére alkalmas eljárás kidolgozása.

Azt feltételeztük, hogy a perifériás ideg epineuriumába történő tűszúrás, és az oda történő volumen injekció nem okoz idegkárosodást, az oda beadott festék követve az ideg kötőszövetes rétegeit, lehetővé teszi az ideg hosszirányú láthatóvá tételét a környező szövetektől jól elkülönülő kék szín megjelenésével.

2. A metilénkék oldat *in vivo* idegfestési képességének állatmodellen történő vizsgálata.

Azt feltételeztük, hogy a metilénkék oldat ideális hígításban alkalmazható az élő patkány nervus ischiadicusának megjelölésére.

3. A megfesthető idegszakasz hosszának meghatározása patkány nervus ischiadicus modellen.

Feltételezésünk szerint az idegbe *in vivo* bejuttatott festék akár több centiméter hosszúságú idegszakaszt is képes láthatóvá tenni, mely értékes segítség lehet a Dupuytren betegség következtében nehezen preparálható idegek intraoperatív védelmében.

4. A metilénkék oldatnak az ideg struktúrájára és funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata patkányban.

Tekintettel a metilénkék szerteágazó orvosi alkalmazására, feltételeztük, hogy a metilénkék injekciónak nincs az ideg struktúráját és funkcióját károsító hatása.

5. Kadáver digitális ideg festésének elvégzése a technika jövőbeni humán alkalmazási lehetőségének vizsgálata céljából.

A patkány modellben gyűjtött tapasztalataink transzlációs jelentőségét is feltételeztük, ezért emberi digitális idegeket is teszteltünk, hogy megállapítsuk, a festési technika hasonló eredményre vezet-e emberi idegben is.

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1. Kísérleti állatok**

Perifériás ideg *in vivo* festéséhez 12 hetes hím Wistar patkányok nervus ischiadicusát használtuk modellnek, melynek átmérője (1-1,5 mm) megegyezik a humán nervus digitalis palmaris communis vastagságával (Suaid et al. 2016, Ortiz et al. 2019). Az állatokat az Animalab Kft. szállította, mely a Charles River laboratóriumi állatok tenyésztésével foglalkozó cég magyarországi hivatalos forgalmazója. A patkányokat a Pécsi Tudományegyetem Anatómiai Intézetének állatházában (a létesítmény működési engedélyszáma: ZOHU0104L07), állandó és folyamatosan ellenőrzött páratartalom és hőmérsékleti körülmények között, 400 × 250 × 200 mm nagyságú polikarbonát ketrecekben tartottuk, a nappali és éjszakai fényviszonyok 12 órás váltakozása mellett, 6 és 18 óra közötti megvilágítással. Egy ketrecekben két állat került elhelyezésre. Ivóvizet és rágcsálótápot *ad libitum* biztosítottunk. Az állatkísérleti etikai engedélyt a Baranya Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági és Földhivatali Főosztály Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Osztálya állította ki (engedélyszám: BA02/2000-42/2018), a Pécsi Tudományegyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság és az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács támogató határozata alapján.

#### **3.2. Kísérleti elrendezés**

Három állatkísérletes lépésben vizsgáltuk meg az *in vivo* idegjelölés hatását patkány nervus ischiadicus modellen, majd humán kadáver vizsgálatot végeztünk az idegjelölés hatékonyságának tesztelésére az alábbiak szerint.

##### **3.2.1. Kontroll kísérletek**

A direkt *in vivo* idegfestési eljárás során a potenciálisan idegkárosodást okozó technikai tényezőket, úgy mint a műtéti disszekciót, az ideg epineurális térségének megszúrását, illetve az ide történő folyadék injektálásának a hatását is megvizsgáltuk egy-egy kontroll kísérletben. Három, 5-5 állatot tartalmazó kísérleti csoportot alakítottunk ki. Ebben a kontroll kísérletben az egyik nervus ischiadicust kerestük fel, míg a másik oldalon nem végeztünk semmilyen beavatkozást. Az első csoportban a nervus ischiadicus műtéti feltárása történt annak vizsgálatára, hogy a műtét és az ideg felkeresése önmagában okozhat-e funkcionális és/vagy morfológiai károsodást. A második csoporton az ideg feltárását követően 29G-s injekciós tűvel az ideg epineurális térségének szúrását végeztük el, anélkül, hogy beadtunk volna valamit a tűn



keresztül. A kísérlet célja annak megítélése volt, hogy az epineurális térbe történő szúrás előidéz-e valamilyen funkcionális változást. A harmadik csoportban a nervus ischiadicusok kiproparálását követően az ideg epineuriuma alá 40 µl fiziológiás sóoldat injektálása történt azzal a céllal, hogy megállapítsuk, az epineurális tér volumen terhelése, és az ott esetlegesen fellépő rövid távú nyomásemelkedés okozhat-e idegi károsodást. Előkísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy 40 µl folyadék epineurális térbe történő injektálása során nem történt folyadék szivárgás a punkció helyéről, ezért választottuk ezt a volument. A beavatkozásokat követően az ideg szenzoros funkcióját a fájdalom köszöb mérése útján ítéltük meg, dinamikus plantáris aesthesiometer (DPA) segítségével. Az ideg mozgató funkcióját az állat járásképeinek és lábtartásának vizsgálata segítségével ítéltük meg. Végül az idegeken - azok strukturális integritásának vizsgálata céljából - szövettani vizsgálatokat végeztünk.

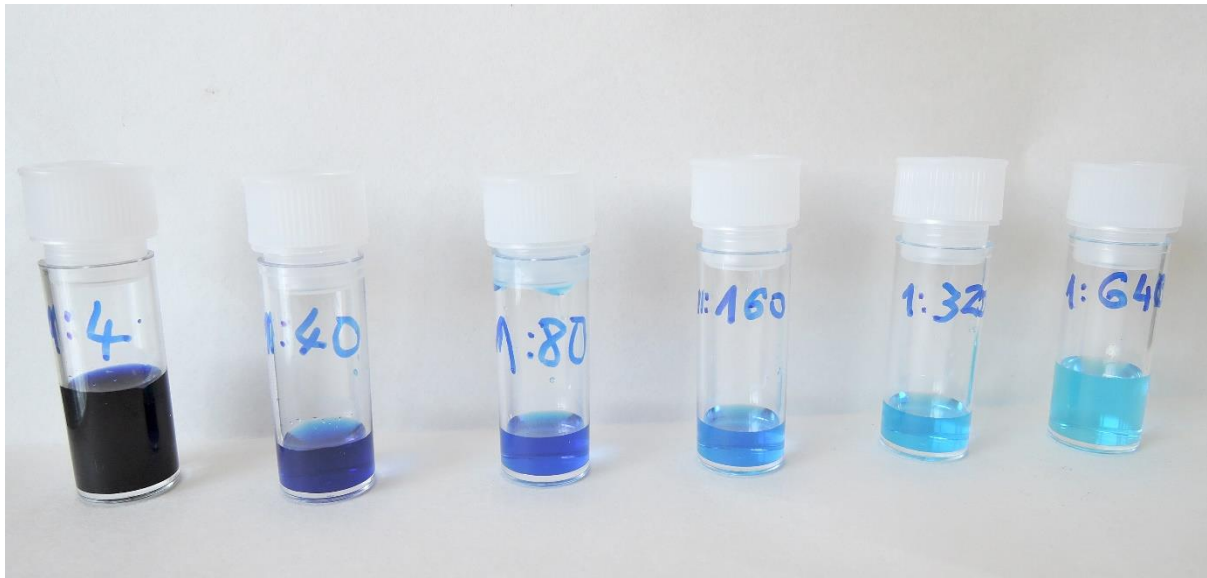
### **3.2.2. Kísérletek az epineurálisan injektált metilénkék festék hisztoanatómiai eloszlásának és az optimális metilénkék koncentráció meghatározására**

Első lépésként 6 db nervus ischiadicusba 40 µl 1m/m%-os metilénkék törzsoldatot injektáltunk azzal a céllal, hogy megállapítsuk, melyik szöveti kompartmentben oszlik meg a festék az idegen belül. Ehhez az *in vivo* megfestett idegeket a perfúziós fixáláson átesett állatokból a festés után azonnal eltávolítottuk és szövettani vizsgálatnak vetettük alá (ld. alább). Annak érdekében, hogy a szövettani metszeteken is látható legyen az *in vivo* alkalmazott festék színe, az 1%-os törzsoldatot kellett alkalmaznunk. A törzsoldat összetétele: 1m/m% methylthionin, az oldószer steril, csíramentes 0,9M NaCl oldat. Az oldat a Pécsi Tudományegyetem Gyógyszertárában készült. A törzsoldatot sötétbarna üvegben, szobahőmérsékleten tároltuk. A hígított oldatok közvetlenül a beavatkozások előtt készültek steril, csíramentes fiziológiás sóoldat hozzáadásával.

A szövettani eljárás során az *in vivo* adott festék jó része óhatatlanul kimosódik a mintákból, és a kék szín hígabb oldatok használata esetén mikroszkópiusan is láthatatlanná válhat. Ebben a kísérletben azt is megfigyeltük, hogy amennyiben a punkció helyén az idegből a tú eltávolítását követően némi metilénkék festék visszaszivárgott, akkor az az egész műtéti területen egy zavaróan élénk, kék elszíneződést okozott, mely az ideg azonosítását is megnehezítette.

Annak érdekében, hogy ennek a “háttérnek” az intenzitását csökkentsük, második lépésben az *in vivo* idegfestéshez használandó metilénkék oldat optimális koncentrációjának

meghatározására az 1%-os metilénkék törzsoldatból 1:4, 1:40, 1:80, és 1:160, 1:320 és 1:640 arányú hígítási sorozatot készítettünk (9. ábra) fiziológias sóoldat segítségével. Az oldatokat a töményebbtől a hígabb felé haladva teszteltük, 2-2 nervus ischiadicus festése útján. Mivel az 1:80 arányban hígított oldat még optimális festést adott, de az 1:160 arányú hígítás már csak halvány elszíneződést okozott, az ennél hígabb oldatok tesztelése során már nem várhattunk ideális jelet, ezért ezek előtesztelésére nem áldoztunk fel további állatokat.



9. ábra. Metilénkék oldat hígítási sorozata (1:4 - 1:640) Az ábrán látható oldatok *in vivo* tesztelése a töménytől a hígabb felé haladva történt. Az 1:80 arányú hígítás injekciója után fellépő kék elszíneződés még jól kivehető volt az idegen, és a punkció helyén esetleg szivárgó festék már nem okozott erős elszíneződést az idegen kívül. Az 1:160 hígítás az idegenben is már csak halvány elszíneződést okozott, ezért az ennél hígabb (1:320 és 1:640) oldatok teszteléséről állatetikai és tudományos megfontolások alapján lemondtunk.

### **3.2.3. Kísérlet 40 µl (1:80) epineurális metilénkék oldat injektálás hatásának vizsgálatára patkány nervus ischiadicusban**

Az optimális metilénkék oldat koncentrációjának meghatározása céljából indított kísérletünkben (ld. 3.2.2) kitűnt, hogy 40 µl 1:80 arányban hígított metilénkék oldat használata esetén a megfestett idegszakasz a környezetétől jól elkülönült. Annak érdekében, hogy a kezelés funkcionális és morfológiai hatását megítéljük, 6 állaton elvégeztük mindkét oldali nervus ischiadicus kipreparálását, majd a bal oldali idegekbe 40 µl fiziológias sóoldatot fecskendeztünk, míg a jobb oldali nervus ischiadicusba 40 µl hígított (1:80) metilénkék oldatot

injektáltunk. Megmértük a punkciós ponttól disztálisan a metilénkék oldattal megfestődő idegszakaszok hosszát. A beavatkozásokat követően a sebeket zártuk, majd az állatokat ketrecükbe visszahelyeztük. A műtét előtt két alkalommal, majd a 7. és 10. posztoperatív napon DPA méréseket végeztünk mindkét oldali hátsó végtagon. Az ideg mozgató funkcióját az állat járásképenek és lábtartásának vizsgálatával ítéltük meg. A 11. posztoperatív napon az állatok eutanáziáját követően a korábban megfestett ideg szegmentumokat eltávolítottuk, melyeken szövettani vizsgálatokat végeztünk.

#### **3.2.4. Humán kadáver digitális ideg festése metilénkék oldattal**

A perifériás idegek direkt festésére használt eljárás hatékonyságát vizsgáltuk kadáver kézen is a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével (engedély száma: PTE KK RIKEB No.: 6466, 43/2017).

Első kísérletünkben három formalinfixáláson átesett kadáver kézen, a disztális tenyéri redő, a proximális interphalangealis (PIP) ízületi redő, valamint az ujj midaxiális vonalai közti területen a bőrt eltávolítottuk. Négy *nervi digitales palmares proprii*-t kipreparáltunk, majd az 40 µl 1:80 hígítású metilénkék oldattal epineurális idegfestést végeztünk. Vizsgáltuk a festék idegen belüli terjedésének jellegét.

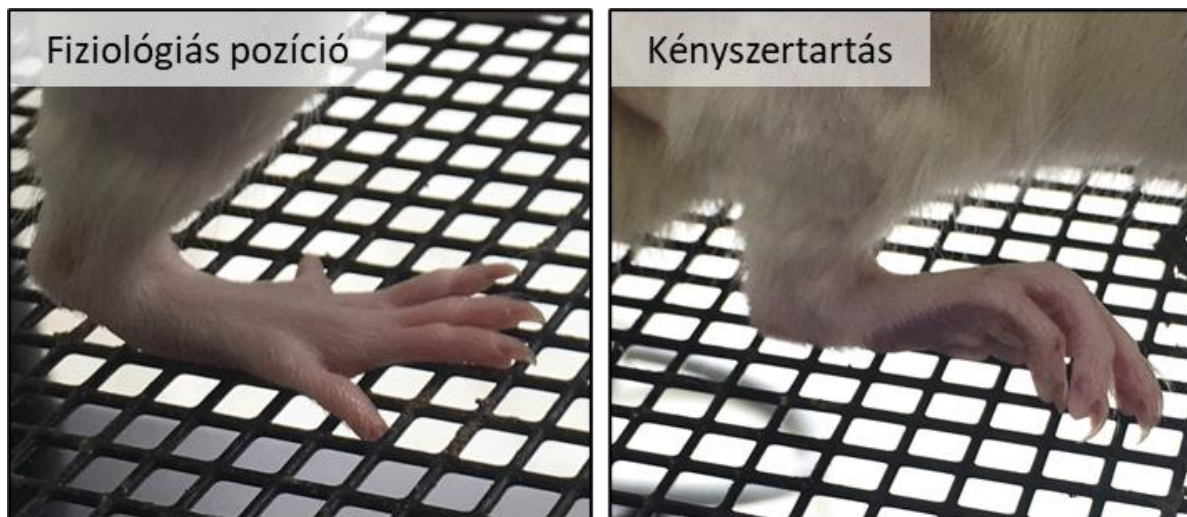
Második kísérletünkben Dupuytren kontraktúra tüneteit nem mutató, formalinfixáláson még át nem esett kadáver kéz mutató, középső, gyűrűs és kisujján, a disztális tenyéri redő és a PIP ízületi redő közötti szakaszokon a *nervi digitales palmares proprii*-t kipreparáltuk. Az aponeurosis palmaris haránt rostjaitól 1 cm-rel disztálisan, a digitális idegek epineuriuma alá vezettük a tűt, majd 6 ideget 40 µl, 2 ideget 200 µl metilénkék oldattal festettünk, és a megfestődött idegszakasz hosszát megmértük. Kadáver kísérleteinkben az idegfestés módszere megegyezett az állatkísérletben használt módszerünkkel (ld. 3.2.2 és 3.2.3.).

### **3.3 Módszerek**

#### **3.3.1. Műtéti technika**

A kísérleti állatok anesztéziáját intraperitonealisan beadott ketaminnal (78mg/kg) és xylazinnal (13mg/kg) végeztük. A műtéti terület borotválását, fertőtlenítését követően a nervus ischiadicus lefutásának vetületében 3 cm-es metszést ejtettünk, majd az izomzat szétválasztása után tompán a nervus ischiadicusig hatoltunk. A kontroll kísérlet csoportjaiban a) az ideg

feltárása, b) az ideg feltárása és az epineurium 29G-s injekciós tűvel történő punkciója, valamint c) az ideg feltárása, punkciója és 40 µl fiziológiás sóoldat epineurális térbe történő fecskendezése történt. Az ideg festésekor (ld. 3.2.2. és 3.2.3.) az epineurális térbe 40 µl metilénkék oldatot injektáltunk. A metilénkék oldatot tartalmazó 29G-s tűt egy metilénkék oldattal előtöltött polietilén cső közbeiktatásával egy 100 µl kapacitású fiziológiás sóoldattal feltöltött Hamilton mikrofecskendőhöz csatlakoztattuk. A metilénkék oldat és a fiziológiás sóoldat folyadéktereit a polietilén csőbe felszívott légbuborék választotta el egymástól. A metilénkék oldat epineurális térbe történő injektálását követően az ideg kékes elszíneződését észleltük a punkciótól disztálisan, és e szakasz hosszát regisztráltuk. A sebeket 4.0-ás felszívódó fonállal (Polysorb, Covidien) zártuk. A posztoperatív időszakban naponként ellenőriztük a sebgyógyulást. A Seltzer és munkatársai által leírt (1990) nervus ischiadicus károsodására utaló paramétereket szintén naponként ellenőriztük és dokumentáltuk. Az állatokat egyenként, a szabad mozgásukat nem korlátozó asztalon vizsgáltuk. Értékeltek a láb tartását, a járásképet, végtag használatának szimmetriáját, a talp nyalogatásának vagy harapdálásának jelenlétét. Seltzer állatmodelljén a nervus ischiadicus nagyfokú sérülése esetén jellegzetes kényszertartás látható (10. ábra), az állat a hátsó végtagját a testéhez emelve pronált helyzetben tartja, a lábujjak flectált helyzetben állnak, továbbá az állat a talpát nyalogatja, harapdálja. Izom paresis esetén sántítás jelentkezik.



10. ábra. Patkány fiziológiás lábtartása, illetve n. ischiadicus neuropáthiás károsodása esetén látható kényszertartás.

### 3.3.2. Fájdalomküszöb mérés

Dinamikus plantáris aesthesiometert (Ugo, Basile 37000, Comerio, Olaszország) használtunk (11. ábra) az esetleges idegkárosodás következményeként kialakuló hyperalgesia meghatározására (Helyes et al. 2003). Az ideg festését megelőzően egy szoktató mérés után két alkalommal történt kontroll mérés. A 7. és 10. posztoperatív napon végeztünk újabb méréseket, mivel addigra a bőrmetszés és varrás okozta sebfájdalom megszűnik, és már nem befolyásolja a mérés eredményeit, illetve az idegkárosodás kialakulása esetén szignifikáns fájdalomküszöb csökkenés az idegsérülést követő 7. naptól várható (Helyes et al. 2003, Thompson et al. 2018). A DPA vizsgálat megkezdése előtt az állatokat 15 percre akklimatizáció céljából a vizsgáló eszközbe helyeztük. A talp középső harmadában végeztük a méréseket, mivel a talp ezen területe a nervus ischiadicus érző végág rendszere által rendkívül jól innervált. A DPA vizsgálat során az állat talpát egy a fémháló padlón keresztül egyre növekvő erővel felemelkedő tompa fém tűvel érintettük meg. Az eszköz a tű talpra gyakorolt nyomását grammban kifejezve méri. A regisztráció automatikusan megtörténik, amikor a) az állat a lábát a tűtől védekezően elhúzza (a fájdalomküszöb elérésekor), b) a tű nyomásának ereje az 50 g-ot eléri, c) de legkésőbb 10 másodperccel a tűnek a talppal történő érintkezése után. 3-5 perces időintervallumban 3 alkalommal végeztük el a mérést, a kapott értékeket átlagolva megkaptuk a fájdalomküszöb értékét.



11. ábra. Dinamikus plantáris aesthesiometer (A). A kísérleti állatot 15 percre szoktatjuk a vizsgáló kamrához (B). A mérés során a kísérletező személy a mérőszközt az állat talpa alá irányítja. Ekkor a műszer a kamra rácsos aljzatán keresztül egy tompa tűt emel (C) fel, mely az állat talpához ér (D). Az állat a lábát védekezően elránthatja az eszköztől. A kijelzőn az az érték jelenik meg grammokban kifejezve, melynél az állat lábát elrántotta a tűtől. Három egymás után elvégzett mérés átlagból számoljuk a mechanonociceptív küszöb értéket.

### 3.3.3. Eutanázia, szövetminta gyűjtés

A patkányok eutanáziáját intraperitoneálisan beadott uretánnal végeztük (2,4 g/kg). Az állatok légzésének lelassulásakor a mellkas és a pericardium megnyitása után a bal kamra falán ejtett metszéssel keresztül a felszálló aorta proximális szakaszába egy tompa tűt vezetünk és

rögzítettük. A jobb pitvari fülcse megnyitása után az állat testét a nagy vércörön keresztül 50 ml jéghideg 0,1 M foszfát pufferelt fiziológiás sóoldattal (PBS; pH:7,4) áramoltattuk át, majd a szövetek transzkardiális perfúziós fixálása 600 ml jéghideg Millonig pufferben (pH:7,4) oldott 4%-os paraformaldehiddel (PFA) történt. Végül a nervus ischiadicusokat eltávolítottuk és szövettani vizsgálatra készítettük elő.

#### **3.3.4. Szövettani előkészítés, hematoxin-eosin festés és natív preparátumok készítése**

A nervus ischiadicus minták utófixálása 24 órán keresztül, szobahőmérsékleten 4%-os PFA oldatban történt. PBS mosásokat követően az idegeket felszálló alkohol sor (30%, 50%, 70%, 96% majd abszolút alkohol oldat, 5-5 percen át) segítségével dehidráltuk, majd paraffinba ágyasztuk. 5 µm-es metszeteket készítettünk mikrotóm (HM 430 Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével. A metszetek leszálló alkohol soron történő rehidrációja után hematoxin (5 perc), majd mosást követően eosin (5 perc) festést végeztünk. Sósavas alkohollal végzett differenciálás után újabb, dehidráló felszálló alkoholsor kezelést követően a metszeteket xilolban (2x20 perc) derítettük, majd Depex (Fluka, Heidelberg, Németország) lefedő szerrel fedtük.

Az optimális metilénkék hígítás meghatározása érdekében végzett kísérletben (3.2.2.) nyert idegminták szövettani feldolgozását szintén elvégeztük, de itt a hematoxin-eosin festésen túl natív preparátumokat is készítettünk, melyhez 50 µm-es metszeteket készítettünk az *in vivo* beadott metilénkék idegen belüli hisztoanatómiai lokalizációjának meghatározása céljából.

#### **3.3.5. Mikroszkópia, digitális képalkotás és morfometriai analízis**

Minden ideg négy darab hematoxin-eosin festett metszetéről felvételt készítettünk egy RT digitális kamerával felszerelt Nikon Microphot FXA mikroszkóp (Nikon, Tokió, Japán) segítségével. Az idegrostok számának meghatározását egy 40x-es nagyítású objektív lencse (Nikon ApoPlan 40, numerikus apertura: 0.95) által belátott területen végeztük az endoneurium területén. A számolást az Image J szoftver (version 1.42., NIH, Bethesda, MD) manuális számláló eszközével (multipoint tool) végeztük. Mivel az idegben a fasciculusok területén az idegrostok eloszlása nem mindenhol egyenletes, az adatok szórásának csökkentése érdekében az idegrostok számát a vizsgált területegységre vonatkoztatva vettük fel. Az egy területegységre (pixel) eső idegrostok számát a négy metszetben mért adatok átlagából számoltuk, ez az adat jellemzett egy ideget a statisztikai értékelés során.

### 3.3.6. Statisztika

Minden eredményt a csoportok átlagaként mutattunk be, és feltüntettük az átlag standard hibáját (SEM). Az adatsorok varianciájának homogenitását (Bartlett-féle  $\chi^2$  négyzet próba; Snedecor et al. 1989), valamint a normál eloszlását ellenőriztük (Shapiro-Wilk test; Shapiro et al. 1965). Egy esetben az adatok matematikai transzformációjára volt szükség négyzetgyök vonás segítségével, annak érdekében, hogy a normál eloszlást elérjük. A kontroll kísérletekben végzett fájdalomköszöb-mérések eredményeit minden időpont esetében egyutas variancia analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze, melyben a kezelés volt az a faktor, amelynek hatását teszteltük. Mivel a teszt nem mutatta ki egy esetben sem a kezelés szignifikáns főhatását, nem mutatjuk be a Tukey-féle *post hoc* tesztek (minden összehasonlításban negatív) számszerű eredményeit. Kétmintás Student-féle t-próbát alkadtunk a fájdalomküszöb mérések és az idegrost sűrűség mérés eredményeinek értékelésére, minden egyes mérési időpontban, abban a kísérletben, ahol 40  $\mu$ l metilénkék oldat (1:80) hatását vizsgáltuk patkány nervus ischiadicusban (ld. 3.2.3.). Az alfa értékét minden esetben 5%-ban határoztuk meg.

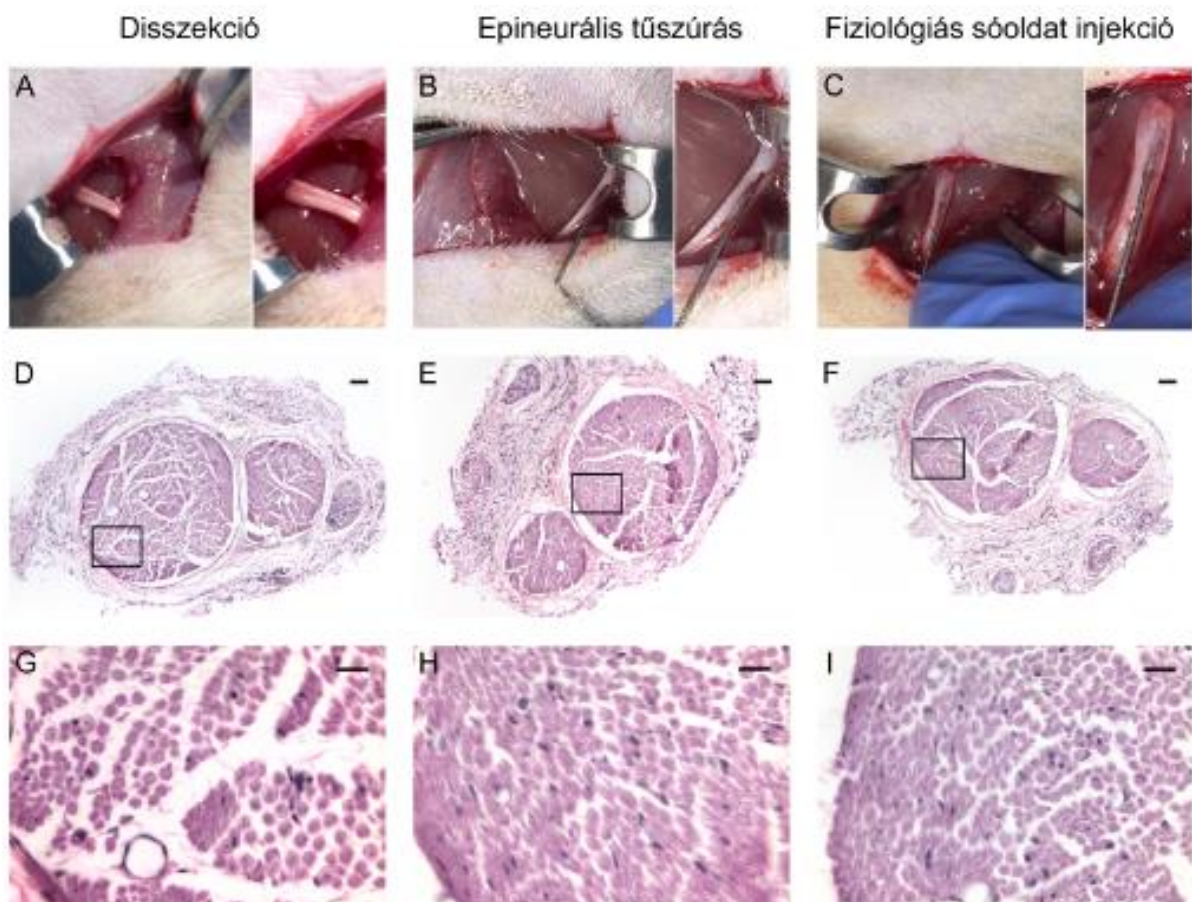
Mivel nem rendelkezünk előzetes tapasztattal a metilénkék esetleges idegkárosító tulajdonságát illetően, és mivel a vizsgálatunk alaphipotézise az volt, hogy a kezelés nem okoz mérhető idegkárosodást, nem volt lehetőségünk szabályszerű előzetes *power* analízist végezni a szükséges és elégséges mintaelemszám meghatározására. Ezért kísérleteinkben az irodalomban fellelhető, és neuropátia modellekben sikerrel alkalmazott elemszámokat vettük alapul, törekedve az önkontrollos kísérleti elrendezések előnyben részesítésére.



## 4. Eredmények

### 4.1. A nervus ischiadicus disszekciója, az idegen végzett epineurális tűszúrás és fiziológiás sóoldat injekció nem okoz funkcionális és morfológiai károsodást

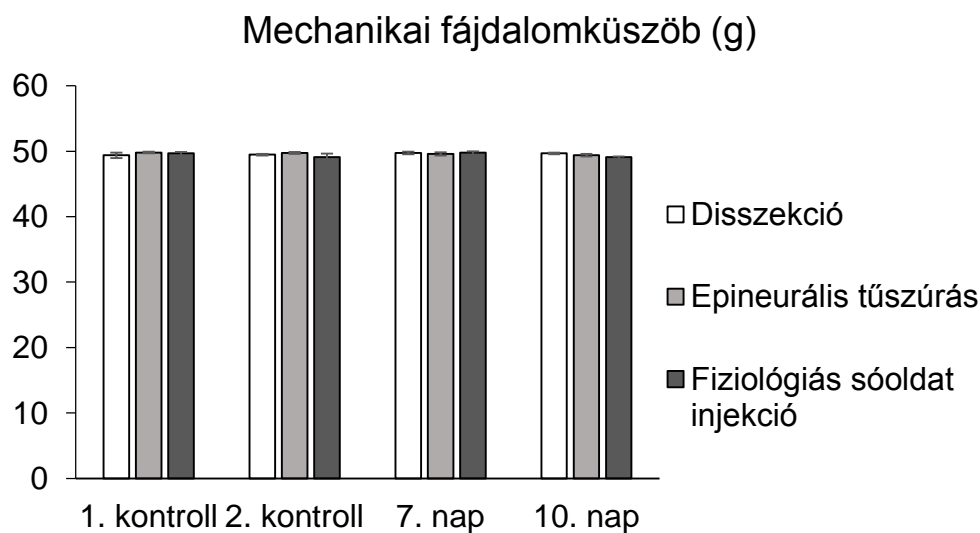
Kontroll kísérletünkben a nervus ischiadicus disszekciójának (12. A ábra), epineurális kanülálásának (12. B ábra) és 40 µl fiziológiás sóoldat injekciójának (12. C ábra) hatását hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy a szövettani vizsgálat nem igazolt morfológiai elváltozásokat az ideg területén egyik beavatkozás során sem (12. D-I ábra).



12. ábra. A kontroll kísérletek összefoglalása. Intraoperatív kép a nervus ischiadicus kiproparálásáról (A), az epineurális tér kanülálása befecskendezés nélkül (B), valamint az epineurális tér kanülálása 40 µl fiziológiás sóoldat befecskendezésével (C). A C panelben a nagyított képen megfigyelhető az ideg minimális mértékű megvastagodása a folyadék befecskendezése után. Az A, B és C paneleken látott idegekből készített HE festett metszetek kis nagyítású mikroszkópos képei (D-F), valamint az itt bekeretezett ideg részletek nagy nagyítású mikroszkópos képei (G, H, I) mutatják, hogy az ideg fasciculusban futó idegrostok

szerkezete minden esetben megtartott. ( $N=5$ ,  $p>0,05$ ). Lépték:  $100\ \mu\text{m}$  a D-F, és  $25\ \mu\text{m}$  a G-I paneleken.

DPA mérések segítségével a fájdalomküszöb változását mértük, és a preoperatív, kontroll mérések során (13. ábra) ahogy az várható volt, nem találtunk különbséget sem az első (ANOVA  $F_{2,12}=0.65$   $p=0.53$ ), sem a második (ANOVA  $F_{2,12}=0.93$   $p=0.42$ ) mérési időpontban az állatok operálandó és nem operálandó végtagjainak mechanonociceptív küszöb értékei között. Ez arra utal, hogy az állatok végtagjainak érző beidegzése a műtét előtt normális volt.



13. ábra. A mechanikai fájdalomküszöb változása a kontroll kísérlet során, DPA segítségével. A fájdalomküszöb értékeket grammban fejeztük ki. Kiemelendő, hogy a fájdalomküszöb mérés minden csoport (disszekció: fehér oszlopok; epineurális tűszúrás: világosszürke oszlopok; fiziológias sóoldat injekció: sötétészürke oszlopok) esetében normál értéket mutatott, és nem találtunk statisztikai különbséget a csoportok között ( $N=5$ ,  $p>0,05$ ).

A műtétek után végzett DPA vizsgálatok során nem találtunk statisztikailag szignifikáns fájdalomküszöb változást sem a 7. (ANOVA  $F_{2,12}=0,40$   $p=0.69$ ) sem a 10. (ANOVA  $F_{2,12}=3,40$   $p=0,06$ ) posztoperatív napon. Tekintettel arra, hogy az ANOVA teszt nem talált szignifikáns főhatást a kezelés tekintetében, a csoport párok közötti *post hoc* összehasonlításának nem volt meg a statisztikai alapja, így ezek eredményeit nem mutatjuk be. Mindez arra utal, hogy egyik beavatkozás sem (az ideg feltárása, az epineurium megszúrása és az ide adott fiziológias sóoldat injekció) okozott mérhető funkciókárosodást a patkány nervus ischiadicusban.

Megállapítottuk tehát, hogy az idegbe adott injekció önmagában nem károsítja az ideget, mely összhangban van az intakt morfológiát mutató szövettani eredményekkel.

Mivel a patkány nervus ischiadicus, a humán digitális idegekkel ellentétben mozgató rostokat is tartalmaz, megvizsgáltuk az állatok hátsó végtagjainak motoros működését is. A posztoperatív időszakban egyik állaton sem észleltünk sebgyógyulási zavart illetve a nervus ischiadicus motoros funkciójának károsodására utaló jeleket (aszimmetrikus terhelés, járászavar, kényszertartás, izom paresis, végtag paralysis), mely patkányoknál a láb pronációs kényszertartásában és sántításban nyilvánult volna meg (Seltzer et al. 1990).

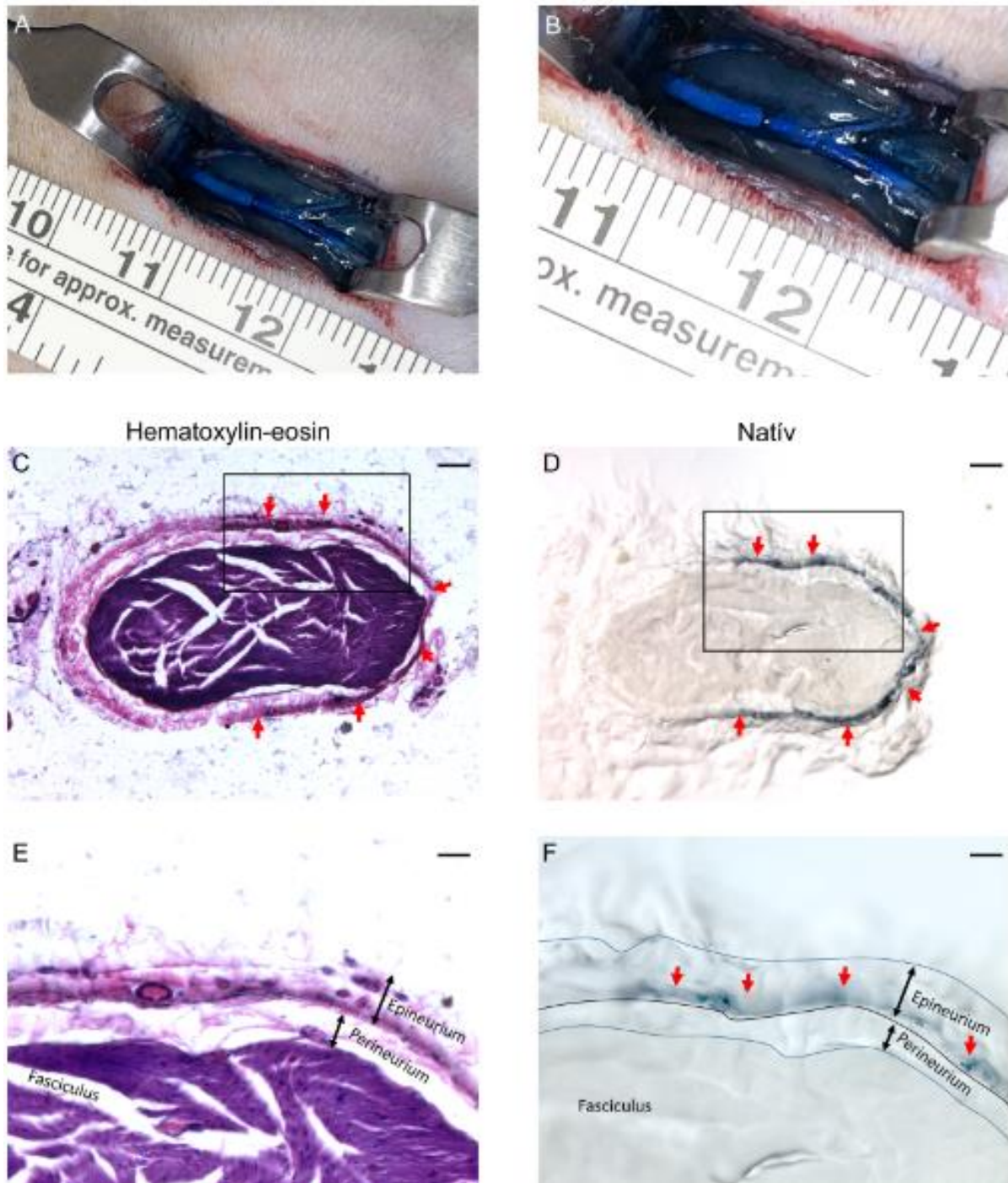
Kontroll kísérletünk eredményeit összefoglalva megállapítottuk, hogy sem az ideg feltárása, sem a punkciója, sem pedig 40 µl volumen befecskendezése nem okoz funkcionális vagy morfológiai károsodást patkány nervus ischiadicusán.

#### **4.2. Az idegbe adott metilénkék injekció az epineurális térben oszlik meg, mely az 1%-os törzsoldat nyolcvanszoros hígításával is jól felismerhető kék elszíneződést okoz**

Második kísérletünkben első lépésként 40 µl 1%-os metilénkék törzsoldattal végeztünk idegfestést. Az injekció a nervus ischiadicus intenzív kék elszíneződését okozta (14. A,B ábra). Annak érdekében hogy a festék idegen belüli *in vivo* terjedését hisztoanatómiailag meg tudjuk határozni, a megfestett idegszakaszok szomszédos 50 µm vastag sorozatmetszeteiből natív (14. D,F ábra) és HE festett preparátumokat is készítettünk (14. C,E ábra). A natív metszetek alkalmasnak bizonyultak a metilénkék idegen belüli elhelyezkedésének meghatározására (14. D,F ábra). Az ezen szeletekkel szomszédos metszetek HE festését követően a preparátumok összehasonlítása és a rétegek azonosítása révén bebizonyosodott, hogy a metilénkék az epineurális térben helyezkedik el. A fasciculusokon belüli térben festék nyomai nem voltak detektálhatóak, mely a perineurális barrier (pars epithelialis) intaktságára utalt.

Abban az esetben, ha az injekciózás alatt, vagy a tú eltávolítása után a metilénkék törzsoldat az idegből akár kis mennyiségben is kijutott, az ideg környezetében és a távolabbi műtéti területen is intenzív, zavaró kék elszíneződést okozott (14. A,B ábra). Annak érdekében, hogy ezt megelőzzük, a legkisebb töménységű, de még jó idegfestési képességekkel rendelkező metilénkék oldat koncentráció meghatározása céljából a metilénkék törzsoldatból 1:40, 1:80, és 1:160 arányú hígítási sorozatot készítettünk (9. ábra), majd ezekkel végeztünk idegfestést az egyes állatokon. Az eredményeink azt mutatták, hogy az 1:80 hígítású metilénkék oldat injekciója egy optimális hosszúságú szakaszon jól látható ideg festődést eredményezett.

Amennyiben a festék az idegen kívülre került a beavatkozás során, az nem okozott jelentős háttér elszíneződést a sebben, ezért az 1:80 arányban hígított oldattal végzett jelölés elfogadható kontrasztot adva segítette az ideg azonosítását (15. B ábra).



14. ábra. Epineurális metilénkék törzsoldat injekció szöveti eloszlása. Intraoperatív felvétel 40  $\mu$ l 1%-os metilénkék törzsoldattal festett nervus ischiadicusról (A, B). Kiemelendő, hogy a tömény metilénkék oldat injekció alatti szivárgása, vagy a tű eltávolítása utáni bekövetkező

visszacsorgása a műtéti terület jelentős mértékű kék háttérelszíneződéséhez vezetett. Metilénkéssel injektált nervus ischiadicus hematoxilin-eosin festett metszete (C), és egy ezzel szomszédos natív sorozatmetszet fotója (D). A piros nyilak a metilénkék által megfestett területeket mutatják a nervus ischiadicusban (C, D). A, C és D képekben bekeretezett részeit nagyobb nagyításban az (E) illetve (F) panelek mutatják. A hematoxilin-eosin festett preparátumban (E) azonosítható az ideg fasciculust borító perineurium és epineurium, mely rétegek határait a natív készítményben is kijelöltük. Megállapítható, hogy a metilénkék festék az epineurális térben oszlott meg. Sem a perineuriumban, sem azon belül nem figyeltünk meg kék elszíneződést. Lépték: 250  $\mu\text{m}$  a C és D, 100  $\mu\text{m}$  az E és F panelben.

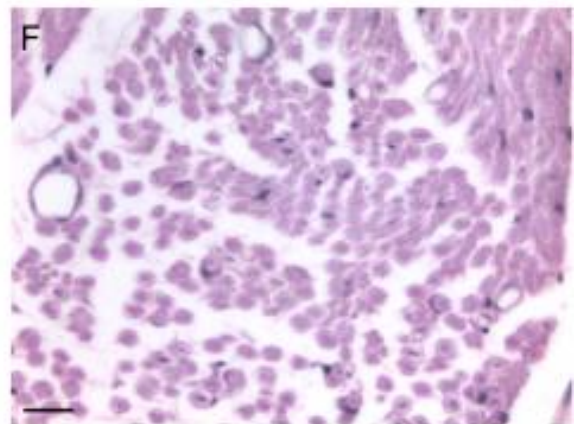
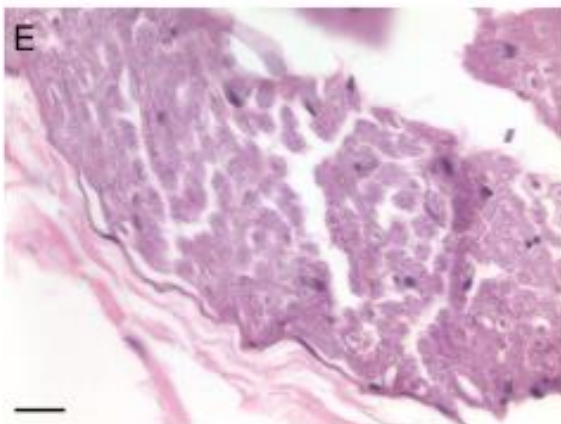
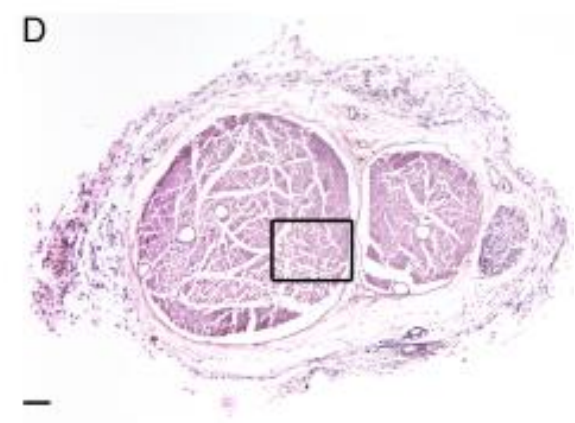
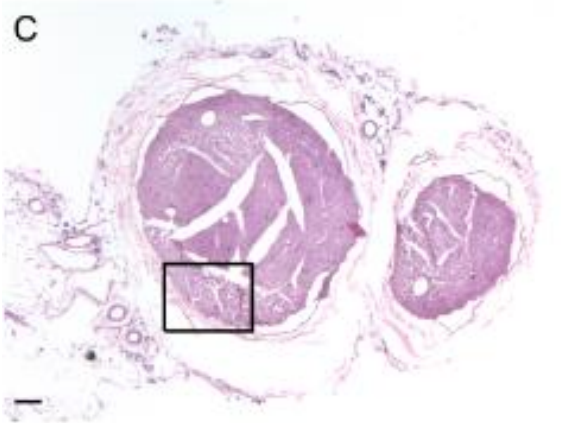
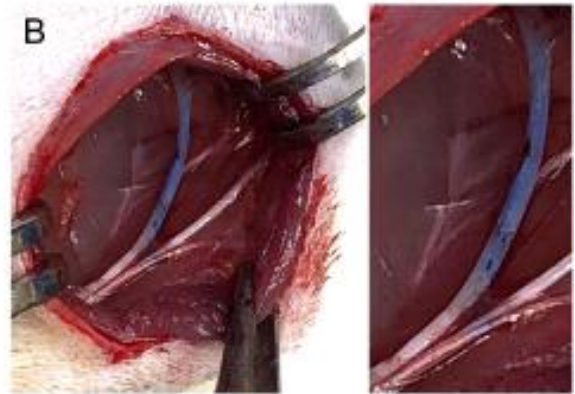
#### **4.3. Hígított metilénkék oldat epineurális injekciója biztonságosan alkalmazható az ideg *in vivo* megjelölésére**

Ebben a kísérletben 6 állaton mindkét oldali nervus ischiadicust kipreparáltuk. Ugyanazon állat egyik oldali nervus ischiadicusába 40  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatot fecskendeztünk, míg az ellenoldali ideget 40  $\mu\text{l}$  1:80 hígítású metilénkéssel festettük meg. A metilénkék oldat a punkció helyétől disztális irányban átlagosan 18,18 mm hosszúságú szakaszon festette meg az ideget, az elszíneződött szegmentum hossza 10,00 mm és 30,10 mm között változott (15. ábra).

### Fiziológiás sóoldat injekció

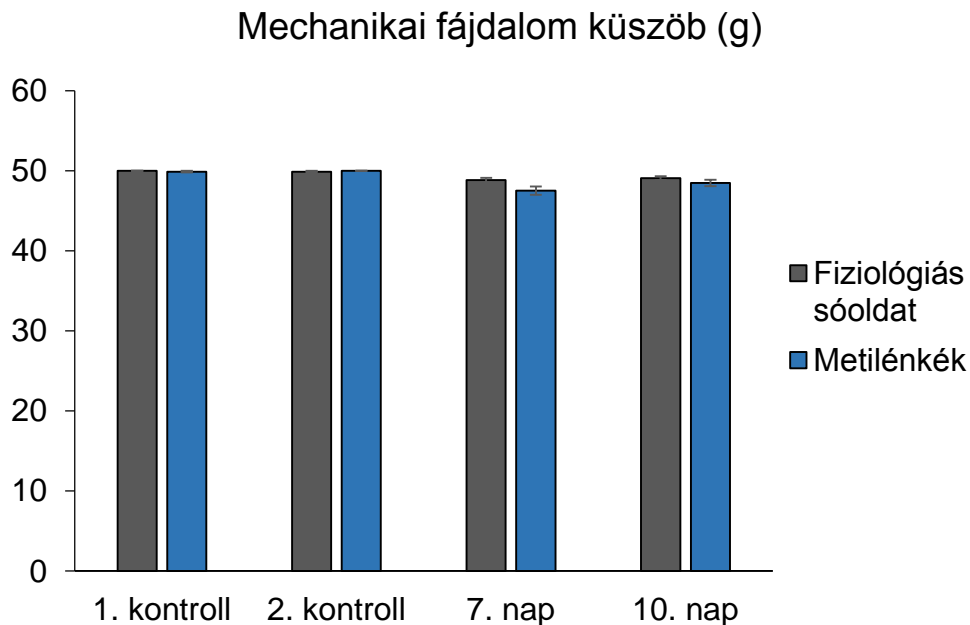


### Metilénkék injekció



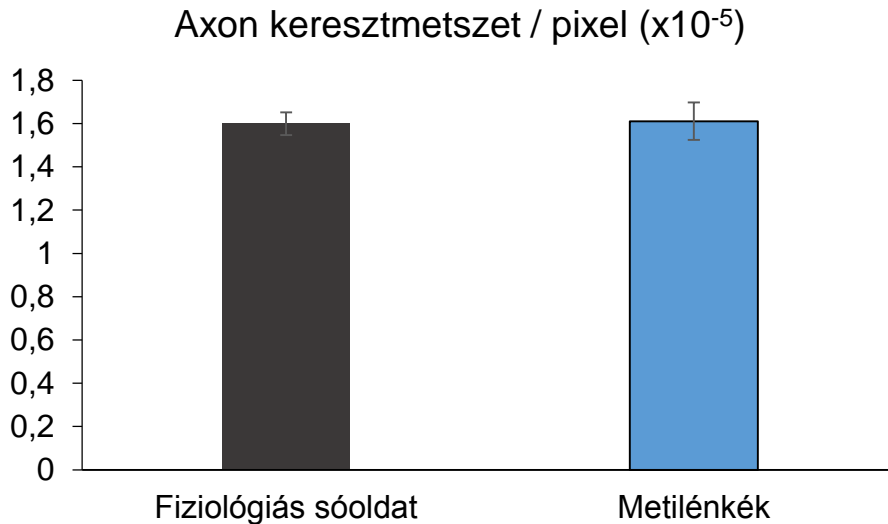
15. ábra. Fiziológiás sóoldat és hígított (1:80) metilénkék oldat epineurális injekciója. Intraoperatív kép 40  $\mu$ l fiziológiás sóoldat (A), illetve 40  $\mu$ l hígított (1:80) metilénkék oldat (B) epineurális térbe történő befecskendezését követően. A kis nagyítású felvételeken a hematoxilín-eosin festett készítményben megtartott szöveti struktúra látható (C, D kép). A fekete négyszögekkel jelölt területeket nagy nagyítással ábrázoló panelekben (E, F) ép idegrost struktúra látható, és az axonok száma is megtartott a beavatkozások után (lásd még 17. ábra). Lépték: 100  $\mu$ m a C és D, 25  $\mu$ m az E és F panelben.

Kontroll kísérleteinknek megfelelően, a beavatkozások előtti első (Student-féle t-próba:  $p=0.34$ ) és második (Student-féle t-próba:  $p=0.34$ ) kontroll DPA mérések azonos fájdalomküszöb értékeket mutattak. Kiemelendő, hogy a 7. (Student-féle t-próba:  $p=0.68$ ) és 10. (Student-féle t-próba:  $p=0.21$ ) posztoperatív napon mért értékek esetében sem tapasztaltunk szignifikáns fájdalomküszöb érték változást, mely az ideg változatlanul normális állapotú érző működésére utalt (16. ábra).



16. ábra: Mechanikai fájdalomküszöb értéke a preoperatív mérések és a fiziológias sóoldat illetve metilénkék injekció után. A hisztogram a grammban kifejezett fájdalomküszöb értékeket mutatja a fiziológias sóoldattal kezelt (szürke oszlopok) és a metilénkék festett idegeknek (kék oszlopok) megfelelő oldalon a kontroll, valamint a 7. és 10. posztoperatív mérési időpontokban. ( $N=6$ ,  $p>0.05$ )

A fiziológias sóoldattal kezelt idegből készített metszetekkel összehasonlítva, a metilénkék oldattal festett idegszakaszokból készített hematoxilin-eosinnal festett metszeteken (15. C-F ábra) nem alakultak ki idegkárosodásra utaló szövettani elváltozások. Az idegkárosodás hiányát szintén alátámasztotta, hogy a vizsgált csoportokban a 40x-es objektív által belátott endoneurális területen mért idegrost denzitás értékek között nem találtunk eltérést (17. ábra, Student-féle t-próba:  $p=0.91$ ).



17. ábra. A területegységre vonatkoztatott idegrostok száma a fiziológiás sóoldattal (fekete oszlop) és a metilénkéssel (kék oszlop) kezelt idegek összehasonlításában. ( $N=6$ ,  $p>0.05$ )

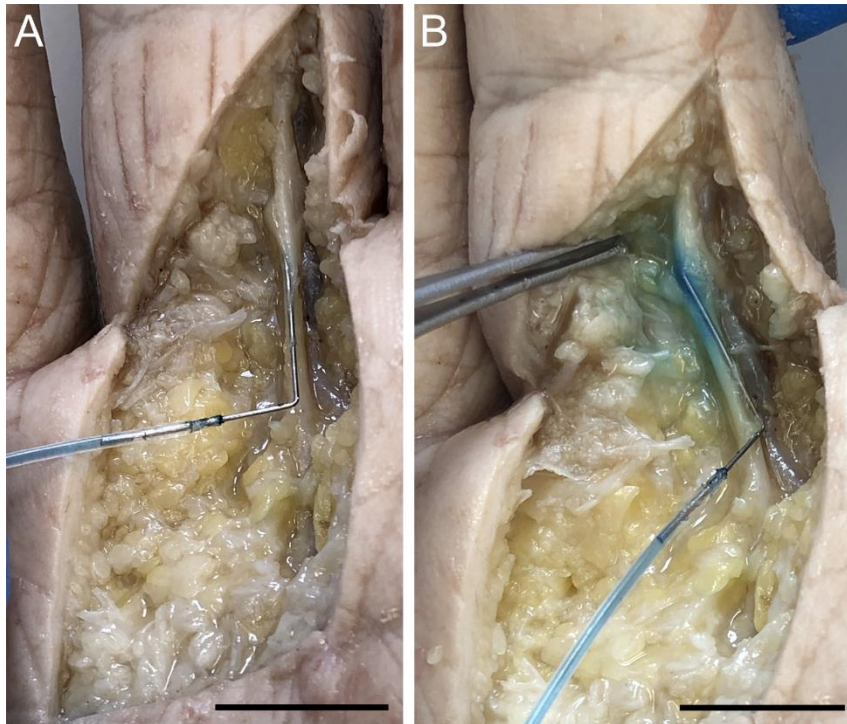
A nervus ischiadicus mozgató működésnek integritását megítélendő, a beavatkozást követő időszakban az állatok járásképét is megvizsgáltuk. Egyik állatnál sem alakult ki az ideg motoros funkciójának károsodására utaló kóros lábtartás, vagy olyan kontraktúra, ami az egyes izmok, izomcsoportok bénulására utalt volna.

#### 4.4. Metilénkék oldattal végzett epineurális idegfestési eljárás sikeresen alkalmazható formalin fixáláson át nem esett kadáver digitális idegen

Kísérleteinkben humán kadáver digitális idegek festését végeztük el metilénkék oldat használatával annak igazolására, hogy a patkány nervus ischiadicus modellben tesztelt technika az ember nervi digitales palmares proprii jelölésére is alkalmazható.

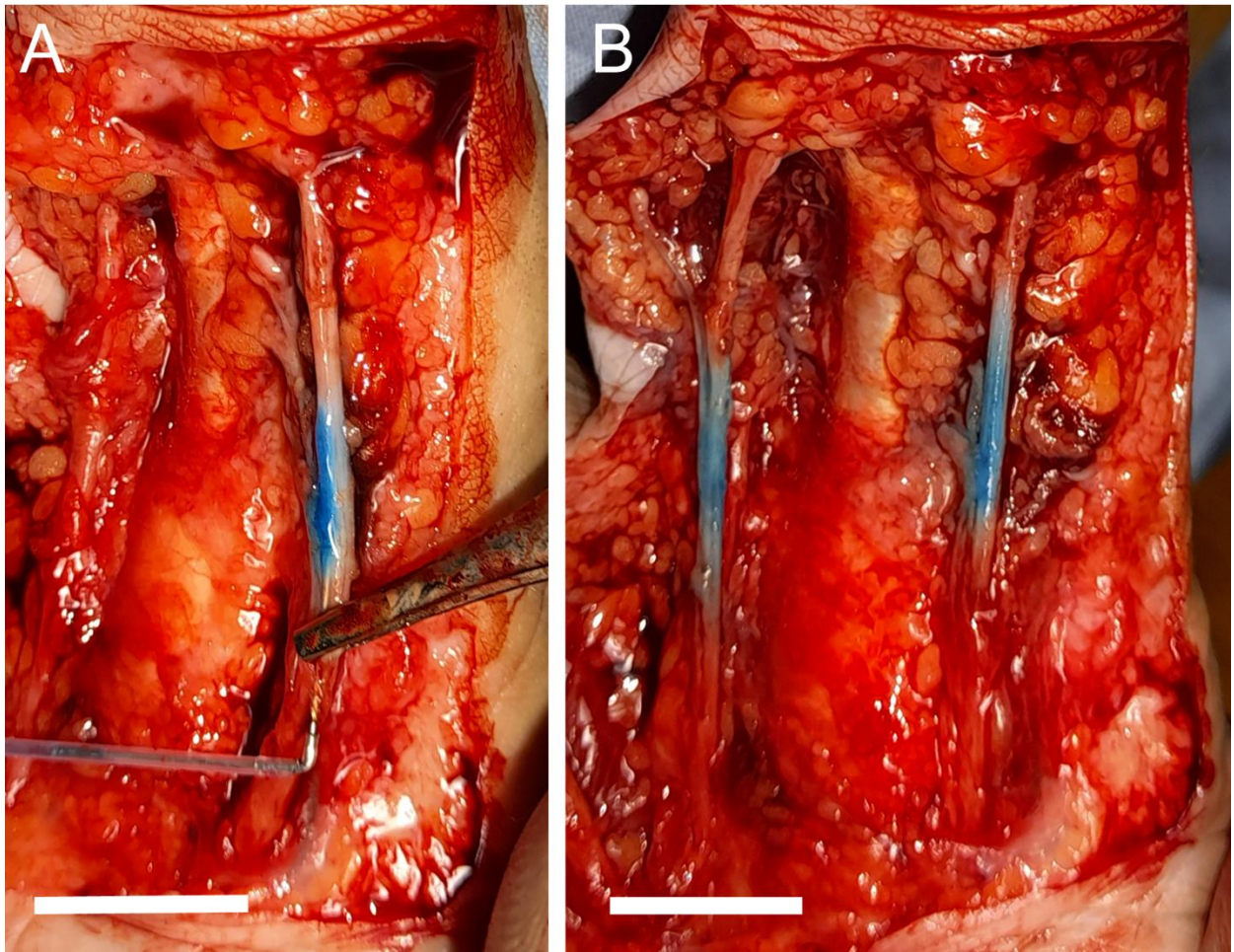
Első kadáver kísérletünkben formalinban fixált kezek digitális idegein végeztük a festést  $40 \mu\text{l}$  1:80 hígítású metilénkék oldattal. A vizsgálat során azt tapasztaltuk, hogy a metilénkék festék a tűszúrás helyétől nem terjedt jelentős mértékben disztális irányba, inkább azt láttuk, hogy a punkció helyétől proximális irányba visszaszivárgott (18. ábra).





18. ábra. Epineurális metilénkék injekció formalin fixált kadáver kézen, a nervus digitalis palmaris proprius-ban. Az epineuriumba vezetett kanül (A) mellett a festék injekciója során az elsősorban a tű mentén proximális irányba (B) színezte meg ideget, és nem terjedt jelentős mértékben a punkció helyétől disztális irányba. Lépték: 10mm.

A második kadáver kísérletünkhöz Dupuytren kontraktúra tüneteit nem mutató, formalin fixáláson még át nem esett kezét vizsgáltunk. Első lépésként 40 µl 1:80 hígítású metilénkék oldatot fecskendeztünk az epineurális térbe, ahol az injekció átlagosan 13 mm +/- 1,5 mm (19. ábra) idegszakaszt festett meg. A formalin fixált szöveten végzett első kísérletünkkel ellentétben tehát a festék az epineurális térben disztális irányba terjedt, de annak mértéke elmaradt a patkány nervus ischiadicusban megfigyelttől. Mivel az általunk használt polietilén csőhöz csatlakoztatott Hamilton fecskendővel a festék befecskendezésének nyomását nem volt lehetséges növelni anélkül, hogy a jelölő anyag az idegből vagy a csőből kiszivárgott volna, a befecskendezett metilénkék oldat mennyiségét emeltük a megfesthető idegszakasz növekedésének reményében. Ezért 200 µl metilénkék oldattal is elvégeztük az idegfestést. A megfestett idegszakasz hossza ekkor növekedett ugyan, a növekedés aránya azonban kisebb volt a festékvolumen növekedés mértékénél. A megnövelt volumennel megfesthető idegszakasz átlagos hossza ekkor 18 mm volt.



19. ábra. Epineurális metilénkék festés humán kadáver neri digitales palmares proprii-ben. Az A panel a digitális ideg epineuriuma alá helyezett kanült és az idegben terjedő kék festéket mutatja. A B panel két szomszédos digitális ideg festése utáni állapotot mutatja. Lépték: 10 mm.

## 5. Megbeszélés

Dupuytren kontraktúra miatt végzett parciális aponeurektómia során, valamint revíziós műtéteknél a digitális ideg disszekciója technikailag nehéz, a iatrogén idegsérülés kockázata magas. Feltételeztük, hogy az ideg intraoperatív festésével az ideg hegszövettől történő elkülönítése megkönnyíthető. Kísérlet-sorozatunkban igazoltuk, hogy a perifériás ideg metilénkék oldattal történő *in vivo* festése könnyen kivitelezhető, biztonságos, az ideg struktúráját és funkcióját nem károsító módszer, melynek kézsebészeti alkalmazása hasznos lehet.

Tanulmányunk első kontroll állatkísérletében az epineurális idegfestés biztonságosságának demonstrálása érdekében a perifériás ideg kireparálásának, az epineurium punkciójának, illetve az epineuriumba történő fiziológiás sóoldat injektálásának az ideg struktúrájára és funkciójára gyakorolt hatásait vizsgáltuk. Ebben a kísérletben igazoltuk, hogy sem az ideg kireparálása, sem a punkciója, sem pedig az epineurális tér fiziológiás sóoldattal történő feltöltése nem okoz mérhető károsodást az ideg érző vagy motoros funkciójának vonatkozásában. A szövettani vizsgálatok ezzel teljes mértékben egybehangzóan igazolták az idegszövet morfológiai változásának hiányát. Az idegfunkció károsodás, a neuropátia kimutatására a DPA egy megbízható, elterjedt állatkísérletes vizsgálómódszert alkalmaztuk (Helyes et al. 2003, Austin et al. 2012, Thompson et al. 2018). A Seltzer-féle neuropátia modellben a DPA vizsgálat kiválóan alkalmas a fájdalomküszöb csökkenés kimutatására (Seltzer et al. 1990), mely az idegfunkció károsodás legjobb indikátora. Meg kell említeni, hogy DPA az ideg érző funkciójának vizsgálatára optimális módszer, azonban, a kísérletünkben modellként használt patkány nervus ischiadicus szomatomotoros rostokat is tartalmaz. Ez jelentős különbség a humán digitális ideghez képest, melyek az érző rostokon túl csupán szimpatikus rostokat szállítanak. Ezért a kísérleti állat járásképe, illetve a láb tartásának folyamatos obszervációjával a nervus ischiadicus motoros funkciójának esetleges károsodását is vizsgáltuk. Azt láttuk, hogy az ideg jelölését követően nem alakult ki az ideg motoros funkciójának károsodására utaló járásképváltozás vagy flexiós-pronációs kényszertartás. Az intakt motoros és érző funkció mellett az ideg struktúrájában hisztomorfológiai eltéréseket sem láttunk. Ez azért is fontos eredmény, mert a Seltzer-féle neuropátia modellben (Seltzer et al. 1990) egy, a célzottnál nagyobb mértékű ideg ligatúra okán kialakuló nagyobb mértékű idegkárosodás esetén, az állat alszár és lábizmai gyakran megbénulnak. Ennek következtében a láb egy flexiós-pronációs kényszertartásba kerül (10. ábra), mely olyan mértékű, hogy a talpon végzendő DPA méréseket lehetetlenné teszi.

Kiemelendő, hogy ilyen állapotot sem a kontroll sem a hígított metilénkék oldattal végzett kezelés után sem figyeltünk meg a kísérleti állatainknál.

Miután igazoltuk, hogy a nervus ischiadicus epineuriumának punkciója, valamint az epineurális tér fiziológiás sóoldattal történő feltöltése nem okozott strukturális és funkcionális károsodást, a második kísérletünkben epineurális idegfestést végeztünk 1%-os metilénkék törzsoldattal. A metilénkék intraneurális lokalizációjának meghatározása céljából natív és hematoxilín-eosin festett metszeteket készítettünk a törzsoldattal festett idegszakaszokból. Azt találtuk, hogy a metilénkék az epineurális térben helyezkedett el, a fasciculusokon belüli endoneurális térben azonban nem jelent meg. Mivel az epineurális kötőszöveti tértől a fasciculusokban, az endoneuriumba ágyazott idegrostokat a perineurium választja el egymástól, e réteg integritása az idegrostok intaktsága szempontjából nagy jelentőségű. A perineurium fibrózus külső, epineuriummal szomszédos alrétegén belül egy módosult hám-jellegű tulajdonságokkal is bíró myofibroblastokból felépülő kémiai barrier található (4. ábra), melyet a sejtek közötti *tight junction* típusú kapcsolatok biztosítanak, ezért az epineurális térből az endoneurium felé az anyagok transzportja a parineurium által gátolt. A perineurium és a fasciculusok intaktságát, a későbbi kísérletekben elvégzett DPA mérések és hisztológiai vizsgálatok eredményei is igazolták.

A metilénkék 1%-os törzsoldattal végzett injekciók során észleltük, hogy ha akár csak néhány mikroliter mennyiségű metilénkék törzsoldat is a műtéti területre jutott az injekciózás közben, vagy a tú eltávolítás után, az a környező szövetek erőteljes kék elszíneződését okozta (14. A ábra, 14. B ábra). Annak érdekében, hogy a festési eljárás hatékonyságát növeljük és az ideg lokalizációját segítő kék szín kontrasztját emeljük a műtéti területen, elsősorban az erős kék "háttér" csökkentése útján, az idegfestésre használt metilénkék oldat koncentrációjának csökkentését tartottuk szükségesnek. Különböző hígítások tesztelése után az 1:80-as hígítású metilénkék oldat alkalmazása mellett döntöttünk, mert ez az ideget jól látható módon megfestette, ugyanakkor az injekciózás közben, vagy a tú eltávolításakor az idegből a punkció helyén keresztül esetlegesen visszaáramló festék nem okozott a műtéti területen zavaró mértékű elszíneződést.

Harmadik állatkísérletünkben az 1:80 hígítási arányú metilénkék és fiziológiás sóoldat ideg funkciójára és strukturájára gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg olyan módon, hogy ugyanazon állat jobb és bal nervus ischiadicusát használtuk kontroll illetve kezelt idegként. Az eredmények a kontroll kísérletek eredményeivel összhangban álltak: a fájdalomküszöb

változása nem volt kimutatható egyik oldalon sem, és az ideg motoros funkciója nem károsodott. A fájdalomküszöb értékek minden ideg esetében 46 g felettiéek voltak. A szakirodalomban a 40 g feletti DPA értékek normál (kontroll) értéknek tekintendők, mely az ideg szenzoros működésének intakt voltára utal (Thompson et al. 2018). Az állatok hátsó végtagi mozgásait illetően sem tapasztaltunk funkcionális károsodást, sántítást, vagy kényszertartást, mely arra utal, hogy a nervus ischiadicusban futó mozgató rostok sem károsodtak olyan mértékben, hogy az motoros zavart idézett volna elő. Ezzel összhangban, az idegfestés következtében nem alakult ki hisztomorfológiai elváltozás, és az idegrostok sűrűsége a fasciculusokban változatlan maradt.

Patkány modellben 40 µl hígított (1:80) metilénkék oldattal átlagosan mintegy 18,18 mm-es idegszakaszt sikerült megfestenünk. A Dupuytren kontraktúra miatt végzett parciális aponeurektómia során a hegszövettel körülvelt és diszlokált digitális ideg alapperc és PIP ízület magasságában történő disszekcióját ekkora megfestett idegszakasz jelentősen megkönnyítené. Abban az esetben, ha a megfestett idegszakasz kipreparálását követően az ideg még mindig az identifikációját megnehezítő hegszövettel van körülveve, az ideg festése ismételt elvégezhető lehet, mellyel a disztálisabb idegszakasz disszekciója ismét könnyebbé válhat. Felmerül annak a lehetősége, hogy az újabb festéskor a metilénkék oldat proximális irányba, tehát a már felszabadított idegszakasz irányába könnyebben terjed, mint a hegszövettel még körülvelt disztális rész irányába. E kérdés megválaszolására további vizsgálatokat tervezünk Dupuytren kontraktúrával érintett kadáver kezeken.

Kísérletsorozatunk eredményei alátámasztják a feltételezésünket, mely szerint a hígított metilénkék oldattal végzett *in vivo* idegfestési eljárás biztonságos, a megfestett ideg funkcióját és struktúráját nem károsítja. A metilénkék oldat használatának biztonságosságát támasztja alá a széleskörű orvosi felhasználása is (Schirmer et al. 2011, Oz et al. 2011, Jean et al. 2014, Mwangi et al. 2016, Sanchala et al. 2018, Porizka et al. 2020, Lee et al. 2021). Ma már csak történeti jelenetőségű, érdekes adat, hogy a metilénkék az első mesterségesen előállított antimikrobiális hatással rendelkező vegyület (Ehrlich et al. 1891). Ezzel ellentétben, methemoglobinémia kezelésére a mai napig az elsődlegesen választandó szer, és hatékonysága bizonyított malária kezelésében is (Mwangi et al. 2016, Müller et al. 2019). Biztató kutatási eredményekről számoltak be Alzheimer-kór és Parkinson-betegség, traumás és ischaemiás agykárosodás kezelésében kifejtett neuroprotektív hatásáról is (Tucker et al. 2017). Ifosfamid indukálta encephalopathia kezelésére az onkohaematológiai protokollokban is szerepel a metilénkék (Euro Ewing 2012 protokoll), de hatékonynak bizonyult tüdőtumor kezelésében *in*

*vitro*, és *in vivo* állatkísérletes modellekben is (Sanchala et al. 2018). Kutatások folynak disztributív sokkban adjuváns terápiaként való alkalmazásáról (Jang et al. 2013, Porizka et al. 2020).

Széleskörűek a sebészi szakmákban történő felhasználás lehetőségei is. Májátültetést követően esetenként előforduló, epeutak ischaemiás károsodásának detektálására cholangiographia során a mucosa felszínre juttatott metilénkék oldat megkönnyíti a necrotikus és életképes szövetek elkülönítését (Hofmann et al. 2007). A pajzsmirigy sebészetben, a metilénkék oldatot a műtéti területbe juttatva a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy elkülönítésében segít és így, utóbbi megkímélése leegyszerűsödik (Piomchai et al. 2019). Parotis tumorok sebészi ellátásánál a Stenon-vezetéken keresztül beadott metilénkék a tumorszövetet nem, míg a normális parotis szövetet megfestve megkönnyíti a tumor azonosítását és eltávolítását (Vaiman et al. 2016). Hysterektómia során a műtéti terület felületére történő metilénkék oldat juttatásával a plexus pelvicus jól megfestődik, ezáltal az idegágak detektálhatóak, és a műtét során hatékonyabban megkímélhetőek (Zhang et al. 2017).

A metilénkék biztonságos alkalmazhatóságát az is alátámasztja, hogy a szervezetből a veséken keresztül viszonylag gyorsan kiürül, mivel eliminációs féleletideje mindössze 24 óra (FDA). A metilénkék oldat szervezetből történő gyors kiürülését alátámasztják saját megfigyeléseink is. Több nappal az ideg festését követően nyert szövetmintákban a metilénkék jelenléte már sem makroszkópos, sem mikroszkópos megfigyeléssel nem volt kimutatható, és ezért hosszú távú károsító hatására sem számítunk. Ezt alátámasztja a harmadik állatkísérletünk is, ahol 10 nappal az ideg injekciója után sem figyeltünk meg funkcionális és strukturális elváltozást a korábban metilénkével festett idegekben.

Mindezen irodalmi adatok, illetve jelen kutatásunk eredményeink alapján úgy ítéljük meg, hogy állatmodellben a metilénkék *in vivo* ideg festésre biztonságosan alkalmazható, használata során mellékhatás hosszú távon sem várható.

Annak érdekében, hogy állatkísérleteink potenciális transzlációs értékét megvizsgáljuk, emberi holttesten is végeztünk ideg festést.

Formalin fixált kadáver kezekben végzett kísérletünkben nem sikerült elérni, hogy a metilénkék a tűszúrás helyétől az epineurális térben disztális irányba vándoroljon. Tekintettel arra, hogy a formalin fixálás jól ismert módon jelentős szöveti zsugorodással jár, az epineurális tér beszűkülése állhat a sikertelenség hátterében. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a

tú hosszabb szakaszának bevezetése után a festék a tű végétől proximális irányba terjedt, mivel az megnyitotta a fixálás következtében beszűkült epineurális teret (18. ábra).

Formalin fixáláson át nem esett kadáver kézen 40 µl hígított (1:80) metilénkék oldattal sikeresen megfestettük a digitális idegek egy átlagosan 13 mm hosszúságú szakaszát. Amennyiben 200 µl-re emeltük az alkalmazott oldat mennyiségét, ez a távolság 18 mm-re nőtt. Ez a hossz ideálisnak tűnik a módszer sikeres kézsebészeti alkalmazásához is. Természetesen, a kadáveren végzett vizsgálatunk eredményei óvatossággal értékelendők. Egyrészt a halál után gyorsan elinduló bomlási folyamatok a finom szöveti struktúra gyors destrukcióját idézik elő, mely különösen igaz az idegszövet esetében. Ezért, a tetemen végzett jelöléskor a *post mortem* idő függvényében mért idegjelölési távolság eltérhet attól, amit vitális szövetek esetén megfigyelhetnénk. Másrészt, az élő szövetben fennálló gyors anyagcsere folyamatok befolyásolhatják a festék eloszlását, különösen annak a szövetből történő gyors kimosódása révén, mely jelenségre holttestben nem számíthatunk. Mindazonáltal, figyelembe véve a limitációkat, állatkísérleteink eredményeire alapozva bizakodóak vagyunk abban a tekintetben, hogy hasonló eredménnyel tudnánk alkalmazni a technikát parciális aponeurektómia végzése közben is. További, nagyobb mintalemszámú kadáver tesztek tervezünk, és fontos jövőbeni célunk Dupuytren kontraktúrában érintett kadáver kézen történő idegjelölés annak érdekében, hogy a jövőbeni kézsebészeti alkalmazhatóságot esetleg egy *in vivo* klinikai vizsgálatban tesztelni tudjuk.

## 6. Új eredmények összefoglalása

1. Sikerrel dolgoztunk ki egy új, közvetlenül az epineurális térbe adott intraoperatívan alkalmazható perifériás idegfestési eljárást a metilénkék festék segítségével, mely megkönnyítheti az ideg elkülönítését a környező szövetektől.
2. Patkány nervus ischiadicus *in vivo* modellben sikerrel alkalmaztuk az epineurális idegfestési eljárást, és meghatároztuk az idegfestéshez szükséges ideális metilénkék oldat mennyiségét és a koncentrációját.
3. A megfesthető idegszakasz hossza patkány nervus ischiadicus modellben átlagosan 18,18 mm. Ekkora hosszúságú idegszakasz festésével a Dupuytren betegség esetén a nehezen preparálható idegek intraoperatív azonosítása könnyebbé válhat.
4. A 40 µl 1:80 hígítású metilénkék oldat epineurális injekciója nincs negatív hatással az ideg struktúrájára és funkciójára patkányban.
5. Kadáver digitális ideg festése során a patkány modellben tapasztaltakhoz hasonló eredményeket kaptunk, mely állatkísérletes eredményeink transzlációs jelentőségét bizonyítja.



## 7. Irodalomjegyzék

1. Austin PJ, Wu A, Moalem-Taylor G. Chronic constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. *J Vis Exp*. 2012 Mar;(61):3393.
2. Ball C, Izadi D, Verjee LS et al. Systematic review of non-surgical treatments for early Dupuytren's Disease. *BMC Musculoskelet Disord*. 2016 Aug;17(1):345.
3. Belusa L, Selzer AM, Partecke BD. Description of Dupuytren disease by the Basel physician and anatomist Felix Plater in 1614. *Handchir Mikrochir Plast Chir*. 1995 Sep;27(5):272–5.
4. Bilderback KK, Rayan GM. The septa of Legueu and Juvara: an anatomic study. *J Hand Surg Am*. 2004 May;29(3):494-9.
5. Burge P. Genetics of Dupuytren's disease. *Hand Clin*. 1999 Feb;15(1):63-71.
6. Burge P, Hoy G, Regan P et al. Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br*. 1997 Mar;79(2):206-10.
7. Chen NC, Srinivasan RC, Shauver MJ et al. A systematic review of outcomes of fasciotomy, aponeurotomy, and collagenase treatments for Dupuytren's contracture. *Hand (N Y)*. 2011 Sep;6(3):250-5.
8. Cheung K, Walley KC, Rozental TD. Management of complications of Dupuytren contracture. *Hand Clin*. 2015 May;31(2):345-54.
9. Crean SM, Gerber RA, Le Graverand MP et al. The efficacy and safety of fasciectomy and fasciotomy for Dupuytren's contracture in European patients: a structured review of published studies. *J Hand Surg Eur*. 2011 Jun;36(5):396–407.
10. Denkler K. Surgical complications associated with fasciectomy for Dupuytren's disease: A 20-Year Review of the English Literature. *Eplasty*. 2010;10:e15.
11. Dolmans GH, Werker PM, Hennies HC et al. Wnt signaling and Dupuytren's disease. *N Engl J Med*. 2011 Jul;28;365(4):307-17.
12. Doyle JR. Anatomy and function of the palmar aponeurosis pulley. *J Hand Surg*. 1990 Jan;15(1):78-82.
13. Dupuytren G. Permanent retraction of the fingers, produced by an affection of the palmar fascia. *Lancet*. 1834 Vol.2, 222-25.
14. Early PF. Population studies in Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg*. 1962;44B(3):602–13.

15. Eberlin KR, Mudgal CS. Complications of treatment for Dupuytren disease. *Hand Clin.* 2018 Aug;34(3):387-94.
16. Ehrlich P, Guttman P. Ueber die Wirkung des Methylenblau bei Malaria. *Berliner klinische Wochenschrift.* 1891 Sep;28:953-6.
17. Elliot D. The early history of Dupuytren's disease. *Hand Clin.* 1999 Feb;15(1):1-15.
18. Euro Ewing 2012 International randomised controlled trial for the treatment of newly diagnosed Ewing's sarcoma family of tumours. Eudra-CT number: 2012-002107-17.
19. European Medicines Agency, [https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-xiapex-withdrawal-marketing-authorisation-european-union\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/public-statement/public-statement-xiapex-withdrawal-marketing-authorisation-european-union_en.pdf)
20. FDA PROVAYBLUE® (methylene blue) Reference ID: 4201611 ([https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/204630s005lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/204630s005lbl.pdf))
21. Felici N, Marcoccio I, Giunta R et al. Dupuytren contracture recurrence project: reaching consensus on a definition of recurrence. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 2014 Dec;46(6):350-4.
22. Flatt AE. The Vikings and Baron Dupuytren's disease. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2001 Oct;14(4):378-84.
23. Futterman B. Analysis of the papal benediction sign: the ulnar neuropathy of St. Peter. *Clin Anat.* 2015 Sep;28(6):696–701.
24. Garcia-Guixé E, Fontaine V, Baxarias J et al. Estudio antropológico, paleopatológico y radiológico de las momias localizadas en El Almacén número 4 de la casa Americana (El Asasif, Luxor, Egypt): Proyecto Monthemhat 2009.
25. Geoghegan L, Man J, Jain A et al. Factors Associated with the development, progression, and outcome of Dupuytren disease treatment: A systematic review. *Plast Reconstr Surg.* 2021 Nov;148(5):753-763e.
26. Green's Operative Hand Surgery, sixth edition. Edited by Scott W. Wolfe et al. Elsevier Churchill Livingstone, 2010.
27. Gruber JS, Zhang D, Janssen SJ et al. Limited fasciectomy versus collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren contracture: A propensity score matched study of single digit treatment with minimum 5 years of telephone follow-up. *J Hand Surg Am.* 2021 Oct;46(10):888-95.
28. Hart MG, Hooper G. Clinical associations of Dupuytren's disease. *J Postgrad Med.* 2005 Jul;81(957):425-8.

29. Helyes Zs, Németh J, Thán M et al. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci.* 2003 Sep;73(18):2345-53.
30. Helyes Zs, Szabó Á, Németh J et al. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum.* 2004 May;50(5):1677-85.
31. Hindocha S, John S, Stanley JK et al. The heritability of Dupuytren's disease: familial aggregation and its clinical significance. *J Hand Surg Am.* 2006 Feb;31(2):204-10.
32. Hindocha S, McGrouther DA, Bayat A. Epidemiological evaluation of Dupuytren's disease incidence and prevalence rates in relation to etiology. *Hand (NY).* 2009 Feb;4(3):256-69.
33. Hoffman A, Kiesslich R, Moench C et al. Methylene blue-aided cholangioscopy unravels the endoscopic features of ischemic-type biliary lesions after liver transplantation. *Gastrointest Endosc.* 2007 Nov;66(5):1052-8.
34. Hueston J.T. The control of recurrent Dupuytren's contracture by skin replacement. *Br J Plast Surg.* 1969 Apr;22(2):152-6.
35. Hurst LC, Badalamente MA, Hentz VR et al. Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N Engl J Med.* 2009 Sep;361(10):968-79.
36. Iselin M, Dieckmann G. Our experiences in the treatment of Dupuytren's disease. *Mem Acad Chir.* 1951 Feb;77(8-9):251-5.
37. Jang DH, Nelson LS, Hoffman RS. Methylene blue for distributive shock: a potential new use of an old antidote. *J Med Toxicol.* 2013 Sep;9(3):242-9.
38. Kadhum M, Smock E, Khan A et al. Radiotherapy in Dupuytren's disease: a systematic review of the evidence. *J Hand Surg Eur Vol.* 2017 Sep;42(7):689-92.
39. Kan HJ, Verrijp FW, Hovius SER et al. Recurrence of Dupuytren's contracture: A consensus-based definition. *PLoS One.* 2017 May;12(5): e0164849.
40. Kan HJ, Verrijp FW, Hovius SER et al. Correction: Recurrence of Dupuytren's contracture: A consensus-based definition. *PLoS One* 2019 Apr;14(4):e0216313.
41. Ketchum LD, Donahue TK. The injection of nodules of Dupuytren's disease with triamcinolone acetonide. *J Hand Surg Am.* 2000 Nov;25(6):1157-62.
42. Lanting R, Broekstra DC, Werker PMN et al. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of Dupuytren disease in the general population of Western countries. *Plast Reconstr Surg.* 2014 Mar;133(3):593-603.

43. Larsen S, Krogsgaard DG, Aagaard Larsen L et al.: Genetic and environmental influences in Dupuytren's disease: a study of 30,330 Danish twin pairs. *J Hand Surg Eur Vol.* 2015 Feb;40(2):171–6.
44. Lee SW, Han HC. Methylene blue application to lessen pain: its analgesic effect and mechanism. *Front Neurosci.* 2021 May17;15:663650.
45. Legueu F, Juvara E. Des aponeurosis de la paume de la main. *Bull Soc Anat Paris.* 1892:383-400.
46. Lo JCY, Darracq MA, Clark RF. A review of methylene blue treatment for cardiovascular collapse. *J Emerg Med.* 2014 May;46(5):670-9.
47. Macey ARM, Thomas R. "The Serpentine Zone": A surgeon's guide to the surface anatomy of the digital neurovascular spiral in Dupuytren's contracture. *J Hand Microsurg.* 2018 Apr;10(1):54-6.
48. Manske PR, Lesker PA. Palmar aponeurosis pulley. *J Hand Surg.* 1983 May;8(3):259-63.
49. Mayerl C, Del Frari B, Parson W et al. Characterisation of the inflammatory response in Dupuytren's disease. *J Plast Surg Hand Surg.* 2016 Jun;50(3):171-9.
50. McFarlane RM. Patterns of the diseased fascia in the fingers in Dupuytren's contracture. *Plast Reconstr Surg.* 1974 Jul;54(1):31-44.
51. McFarlane RM. On the origin and spread of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am.* 2002 May;27(3):385-90.
52. McMillan C, Binhammer P. Steroid injection and needle aponeurotomy for Dupuytren contracture: A randomized, controlled study. *J Hand Surg Am.* 2012 Jul;37(7):1307–12.
53. Michou L, Lermusiaux J, Teyssedou J et al. Genetics of Dupuytren's disease. *Joint Bone Spine.* 2012 Jan;79(1):7-12.
54. Mohan A, Vadher J, Ismail H et al. The Southampton Dupuytren's Scoring Scheme. *J Plast Surg Hand Surg.* 2014 Feb;48(1):28-33.
55. Müller O, Lu G, Jahn A et al. How worthwhile is methylene blue as a treatment of malaria? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019 Jul;17(7):471-3.
56. Mwangi VI, Mumo RM, Kiboi DM et al. Methylene blue inhibits lumefantrine-resistant *Plasmodium Berghei*. *J Infect Dev Ctries.* 2016 Jun;10(6):635-42.
57. NICE, Interventional procedures guidance [IPG573], Radiation therapy for early Dupuytren's disease. 2016 Dec.
58. NICE, Interventional procedures guidance [IPG43], Needle fasciotomy for Dupuytren's contracture. 2004 Feb.

59. Nanchahal J, Ball C, Davidson D et al. Anti-tumour necrosis factor therapy for Dupuytren's Disease: A randomised dose response proof of concept Phase 2a clinical trial. *EBioMedicine*. 2018 Jul;6(33):282-8.
60. Ng M, Lawson DJ, Winney B et al. Is Dupuytren's disease really a 'disease of the Vikings'? *J Hand Surg Eur*. 2020 Mar;45(3):273-79.
61. Ng M, Thakkar D, Southam L et al. A genome-wide association study of Dupuytren disease reveals 17 additional variants implicated in fibrosis. *Am J Hum Genet*. 2017 Sep;101(3):417-27.
62. Ortiz R, Westenberg RF, Langhammer CG et al. Nerve diameter in the hand: a cadaveric study. *Plast Reconstr Surg Glob Open*. 2019 Mar;13;7(3):e2155.
63. Osterman AL, Murray PM, Pianta TJ. Cline's contracture: Dupuytren was a thief – a history of surgery for Dupuytren's contracture. In: Eaton C et al. *Dupuytren's disease and related hyperproliferative disorders*. Springer. 2012:195-205.
64. Oz M, Lorke DE, Hasan M et al. Cellular and molecular actions of methylene blue in the nervous system. *Med Res Rev*. 2010 Jan;31(1):93-117.
65. Piromchai P, Juengtrakool T, Laohasiriwong S et al. The sensitivity and specificity of methylene blue spray to identify the parathyroid gland during thyroidectomy. *Peer J*. 2019 Jan;7:e6376.
66. Porizka M, Kopecky P, Dvorakova H et al. Methylene blue administration in patients with refractory distributive shock – a retrospective study. *Sci Rep*. 2020 Feb;10(1):1828.
67. Rayan GM. Clinical presentation and types of Dupuytren's disease. *Hand Clin*. 1999 Feb;15(1):87-96.
68. Rayan GM. Dupuytren disease: Anatomy, pathology, presentation, and treatment. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Jan;89(1):189-98.
69. Sanchala D, Bhatt LK, Pethe P et al. Anticancer activity of methylene blue via inhibition of heat shock protein 70. *Biomed Pharmacother*. 2018 Nov;107:1037-45.
70. Schirmer RH, Adler H, Pickhardt M et al. "Lest we forget you--methylene blue...". *Neurobiol Aging*. 2011 Dec;32(12):2325.e7-16.
71. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990 Nov;43(2):205-18.
72. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*. 1965 Dec; 12(52):591-9.
73. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. Iowa State University Press. 1989.

74. Soreide E, Murad MH, Denbeigh JM et al. Treatment of Dupuytren's contracture: a systematic review. *Bone Joint J.* 2018 Sep;100-B(9):1138-45.
75. Stirling PHC, Jenkins PJ, Clement ND et al. Self-perceived hand normality before and after surgical treatment of Dupuytren contracture. *J Hand Surg Am.* 2021 May;46(5):403-8.
76. Suaid CA, Santos AP, Yamane FO et al. Aspects of the macro and microscopic anatomy of the sciatic nerve in Wistar rats. *Int J Morphol.* 2016 Sep;4(3):877-84.
77. Thompson SJ, Pitcher MH, Stone LS et al. Chronic neuropathic pain reduces opioid receptor availability with associated anhedonia in rat. *Pain.* 2018 Sep;159(9):1856-6.
78. Tubiana R, Michon J, Thomine JM. Scheme for the assessment of deformities in Dupuytren's disease. *Surg Clin North Am.* 1968 Oct;48(5):979-84.
79. Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From mitochondrial function to neuroprotection-an emerging role for methylene blue. *Mol Neurobiol.* 2018 Jun;55(6):5137-53.
80. US Census Data <http://www.census.gov/prod/cen2010/briefs/c2010br-03.pdf>
81. Vaiman M, Jabarin B, Abuita R. Methylene blue staining in the parotid surgery: Randomized trial, 144 patients. *Am J Otolaryngol.* 2016 Jan-Feb;37(1):22-6.
82. Verjee LS, Verhoekx JS, Chan JK et al. Unraveling the signaling pathways promoting fibrosis in Dupuytren's disease reveals TNF as a therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Mar 5;110(10):E928-37.
83. Watson HK, Fong D. Dystrophy, recurrence, and salvage procedures in Dupuytren's contracture. *Hand Clin.* 1991 Nov;7(4):745-55.
84. Whaley DC, Elliot D. Dupuytren's disease: a legacy of the north? *J Hand Surg Br.* 1993 Jun;18(3):363-7.
85. Wilburn J, McKenna S P, Perry-Hinsley D et al. The impact of Dupuytren disease on patient activity and quality of life. *J Hand Surg Am.* 2013 Jun;38(6):1209-14.
86. Zhang X, Jia L, Tao X, Ding J et al. Intraoperative nerve staining in nerve-sparing radical hysterectomy: a pilot study. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 Mar;295(3):737-4

## 8. Előadások és közlemények jegyzéke

### Lektorált közlemények, amelyek az értekezés alapját képezik:

**Szabó T**, Kormos V, Rékási Z, Gaszner B. Epineural Methylene Blue Injection May Aid Localization of Digital Nerves in Dupuytren's Surgery. Eur Surg Res. 2021 Oct 22:229-237. doi: 10.1159/000519666. PMID: 34689139. (IF: 1,114)

**Szabó T**, Kormos V, Gaszner B, Rékási Z. Perifériás ideg epineurális metilénkék festése kadáver kézen. Orv Hetil. 2022; 163(46): 1843-1848. (IF: 0,707, 2021)

### Citálható absztrakt az értekezés tárgyköréből:

**Tamás Szabó**, Viktória Kormos, Zoltán Rékási, Balázs Gaszner. Epineural methylene blue injection may aid localization of digital nerves in Dupuytren's surgery (e-poster). IFSSH, FSHT & FESSH Combined Congress London, 2022. június 6-10. London

### Egyéb publikációk:

**T. Szabó MD**, Sz. Kaviczki MD, G. Farkas MD, J. Nyárády Md, PhD med. habil. Experimental Examination of the Femoral Head (Circulation, Mechanical Condition). Proceedings of the Third Hungarian Conference On Biomechanics: 321-326, 2008 ISBN 978 963 06 4307 8

F. Toth, G. Cseh, G. Farkas, **T. Szabo**, Sz. Kaviczki, Z. Nyarady, A. Sebestyen, J. Nyarady. Osteoscopy for the assessment of femoral head circulation. Injury, Int. J. Care. Injured 42(2011)S3, S26

Nyarady J, Farkas G, Cseh G, **Szabo T**, Kaviczki S, Nyarady Z, Toth F. Osteoscopy for assessment of blood supply to the femoral head: a preliminary study. J Orthop Trauma. 2012 Apr;26(4):200-5. doi: 10.1097/BOT.0b013e31822c8376. PMID: 22011637.

Dr. Naumov István, **Dr. Szabó Tamás**. Carpal tunnel decompressiója után kialakult súlyos szeptikus szövődmény diabeteses betegnél. IME – Interdiszciplináris Magyar Egészségügy, XVII. Évfolyam 4. Szám. 2018. május

**Szabó Tamás**. Terápiás algoritmusok a combnyaktörések ellátásában. Magyar Traumatológia Ortopédia Kézsebészet Plasztikai Sebészet. Supplementum LIII. évfolyam 52. oldal. 2010

### **Előadások jegyzéke:**

Kovácsy Ákos, **Szabó Tamás**. Carpal tunnel szindróma kezelése klinikánk gyakorlatában. A Magyar Kézsebész Társaság 13. Kongresszusa és a Fiatal Kézsebészek Fóruma, 2006. május 25-27. Kecskemét

**Szabó Tamás**, Máthé Tibor, Kovácsy Ákos. A nervus ulnaris kompressziós szindrómái. A Magyar Kézsebész Társaság 13. Kongresszusa és a Fiatal Kézsebészek Fóruma, 2006. május 25-27. Kecskemét

**Szabó Tamás**, Vámhidy László. Ritka sérülés: CMC ízületi ficam. A Magyar Kézsebész Társaság 14. Kongresszusa és a Fiatal Kézsebészek Fóruma, 2007. szeptember 6-8. Hajdúszoboszló

**Szabó Tamás**, Kaviczki Szabolcs, Farkas Gábor, Nyárády József. A combfej biomechanikai struktúrájának meghatározása kísérletes körülmények között. III. Magyar Biomechanikai Konferencia, 2008. július 4-5. Budapest

**Szabó Tamás**, Naumov István. Nyílt lábszártörés+lágyrészdefectus=lebeny! A Magyar Traumatológus Társaság 2009. évi Kongresszusa és Fiatalok Fóruma, 2009. május 7-9. Tapolca

Naumov István, Vámhidy László, Wiegand Norbert, Bukvecz Tibor, Máthé Tibor, **Szabó Tamás**. Nyílt medencetörések. A Magyar Traumatológus Társaság 2009. évi Kongresszusa és Fiatalok Fóruma, 2009. május 7-9. Tapolca



**Tamas Szabo.** Multiplex open luxation and tendon sheath injury on the hand. Weill Cornell Seminar in Trauma and Emergency Surgery, 2009. január 18-24. Salzburg

Naumov István, Wiegand Norbert, Bukovecz Tibor, Patczai Balázs, Mintál Tibor, Koreny Tamás, **Szabó Tamás**, Vámhidy László. Acetabulum törések: megoldások, eredmények. A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi közös kongresszusa, 2010. június 17-19. Pécs

Nyárády József, Farkas Gábor, **Szabó Tamás**, Cseh Gellért, Tóth Ferenc. A combnyaktörés kutatásának hagyománya Magyarországon. A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi közös kongresszusa, 2010. június 17-19. Pécs

**Szabó Tamás.** Terápiás algoritmusok a combnyaktörések ellátásában. A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi közös kongresszusa, 2010. június 17-19. Pécs

Nyárády József, Szvacsek Ferenc, Farkas Gábor, **Szabó Tamás**, Cseh Gellért, Tóth Ferenc. Az osteoscope és annak kifejlesztése. A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi közös kongresszusa, 2010. június 17-19. Pécs

Farkas Gábor, Nyárády József, Kaviczki Szabolcs, **Szabó Tamás**, Cseh Gellért, Tóth Ferenc. Az osteoscopia diagnosztikus értékének vizsgálata állatkísérletes modellben. A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2010. évi közös kongresszusa, 2010. június 17-19. Pécs

**Szabó Tamás**, Naumov István. Csonthiánnyal járó lőtt kézsérülés ellátásának bemutatása. A Magyar Kézsebész Társaság 17. Kongresszusa és Fialal Kézsebészek Fóruma, 2010. szeptember 16-18. Nyíregyháza

**Szabó Tamás**, Vámhidy László. Synthes VCP lemezzel és Medimetal lemezzel kezelt rádius distális vég törések összehasonlítása. A Magyar Kézsebész Társaság 18. Kongresszusa és Fialal Kézsebészek Fóruma, 2011. szeptember 29 - október 1. Szeged

**Szabó Tamás**, Pankaczi Zsófia. Extensor ín sérülések ellátása a Verdan I-es zónában. A Magyar Kézsebész Társaság 20. Kongresszusa és Fialat Kézsebészek Fóruma, 2013. szeptember 26-27. Visegrád

**Szabó Tamás**, Naumov István. III fokban nyílt lábszártörés és a szövődmények ellátásának nehézségei. A Magyar Ortopéd Társaság és a Magyar Traumatológus Társaság 2014. évi közös Kongresszusa, 2014. június 22-24. Szeged

**Szabó Tamás**, Máthé Tibor, Járay-Vojcek Judit, Naumov István, Wiegand Norbert. Scapholunaris disszociáció kezelése módosított Brunelli műtéttel. A Magyar Kézsebész Társaság 21. Kongresszusa és Fialat Kézsebészek Fóruma, 2014. szeptember 11-12. Hajdúszoboszló

Máthé Tibor, **Szabó Tamás**, Móricz Ottó. Avaszkuláris csont nekrozissal járó sajkacsont álízület kezelése Mathoulin-Kuhlman lebény alkalmazásával. A Magyar Kézsebész Társaság 21. Kongresszusa és Fialat Kézsebészek Fóruma, 2014. szeptember 11-12. Hajdúszoboszló

Naumov István, **Szabó Tamás**, Patczai Balázs, Búcs Gábor, Bukovecz Tibor, Wiegand Norbert. Osteomyelitis – radicalis debridement – eredmények. XX. Dél-Magyarországi Traumatológus Kongresszus, 2015. május 15-16. Pécs-Harkány

**Szabó Tamás**, Somorai István. Gondolatok a csípőtáji töréssel kombinált időskori radius törések ellátásáról. XXII. Dél-Magyarországi Traumatológus Kongresszus, 2017. június 9-10. Szeged

Mr. Adam Sykes, Mr. Nicholas Riley, **Dr. Szabó Tamás**, Mr. Ian McNab, Mr. Christopher Little. Változás a sajkacsont törések epidemiológiájában. A Magyar Kézsebész Társaság 24. Kongresszusa és Fialat Kézsebészek Fóruma, 2017. szeptember 29-30. Lillafüred

Mr Adam Sykes, Mr Nicholas Riley, **Mr Tamas Szabo**, Mr Ian McNab, Mr Christopher Little. Scaphoid fractures not just for the young and reckless. A study of scaphoid fractures in the Oxford population. BSSH Scaphoid Fracture Presentation, BSSH Spring Scientific Meeting, 2018. május 3-4. Cardiff

**Szabó Tamás**, Weiling Zsolt. Carpalis alagút szindróma: a "beteg út" racionalizálásának lehetőségei. Magyar Kézsebész Társaság 26. Kongresszusa és Fialal Kézsebészek Fóruma, 2019. október 11-12. Pécs

**Szabó Tamás**, Gaszner Balázs, Kormos Viktória, Rékási Zoltán. Digitális ideg intraoperatív lokalizációjának elősegítése az epineuralis tér metilénkék oldattal történő festésével. A Magyar Kézsebész Társaság 27. Kongresszusa és Fialal Kézsebészek Fóruma, 2021. október 1-2. Balatonfüred

**Szabó Tamás**. Középső ujj középpercc bázis inveterált pilon törésének ellátása. A Magyar Kézsebész Társaság 28. Kongresszusa és Fialal Kézsebészek Fóruma, 2022. szeptember 15-16. Tokaj

## 9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani volt és jelenlegi munkahelyi vezetőimnek Prof. Dr. Nyárády Józsefnek, Dr. Vámhidy Lászlónak†, Prof. Dr. Wiegand Norbertnek, Dr. Naumov Istvánnak a traumatológia és kézsebészet rögzös, de megannyi szépséggel járó útján való elindításomért, támogatásaikért.

Köszönetet szeretnék mondani a dolgozatom létrejöttéhez nélkülözhetetlen segítséget és támogatást nyújtó Dr. Gaszner Balázsnak, Dr. Rékási Zoltánnak, Dr. Gasznerné Dr. Kormos Viktóriának. Az ő szaktudásuk, tapasztalatuk, energikusságuk, példamutató munkamoráljuk elengedhetetlen volt az eredményes munkához.

Köszönettel tartozom Orbán Izabellának és Dittrich Erzsébetnek a szövettani metszetek elkészítéséért, Dr. Vida Líviának a kórszövettani metszetek elkészítéséért, Hornyák Jánosnének és Hornyák Attilának a kísérleti állatok gondozásáért, valamint Zách Attilának, Jónás Ivettnek, Márton Róbertnek, Márton Zsoltnak és Encs Józsefnek a kadáver vizsgálatokhoz nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért.

Külön köszönet jár Mr. Chris Little-nek és Mr. Ian McNab-nek, akiknek a kézsebészeti szakmai tudásukat, látásmódjukat megismerhettem és azokat önzetlenül megosztották velem.

Hálás vagyok családomnak, akik segítsége, támogatása nélkül nem születhetett volna meg a dolgozatom. Köszönettel tartozom gyermekeimnek hogy türelmesen elviselték a tőlük távol töltött időt.

