

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Perifériás ideg *in vivo* intraoperatív epineurális metilénkék festése

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.

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. A betegség prevalenciája a 30%-ot is elérheti, azonban földrajzi lokalizációtól függően az értékek között jelentős eltérés tapasztalható. A betegség etiológiája még nem teljesen ismert, a háttérben genetikai, immunológiai és környezeti tényezők interakciója áll. A betegség autoszomális domináns öröklődésű, a gén expresszivitás és penetrancia mértéke változó. 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 háttérében állnak.

Napjaink intenzív kutatásainak ellenére az oki terápia még nem áll rendelkezésre, a betegség kezelése alapvetően sebészi, a leggyakrabban végzett műtét a parciális aponeurektómia. A digitális ideg iatrogén sérülésének gyakorisága parciális aponeurektómia során elérheti a 3,4%-ot, ez az érték revíziós műtéteknél tovább emelkedik. A műtét egyik nehézségét az adja, hogy a betegség során megjelenő patológus kötegek a digitális ideg elhelyezkedését megváltoztathatják, ezáltal megnehezítve annak lokalizálását és a műtét közbeni megóvását. Parciális aponeurektómián átesett betegek mintegy 20-30%-a számíthat recidivára. Revíziós műtéteknél az ideg lokalizálása és megóvása a primer műtét után kialakult hegszövet, a recidív Dupuytren szövet, illetve a digitális ideg megváltozott anatómiai elhelyezkedése miatt még nehezebb.

Egy egyszerűen kivitelezhető intraoperatív idegfestési eljárás használatával a hegszövetbe 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. Jelen ismereteink szerint a metilénkék oldatot periférás ideg *in vivo* direkt jelölésére még nem alkalmazták, ezirányú felhasználási lehetőségét, hatékonyságát, biztonságosságát korábban nem tanulmányozták.

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.

Kísérletsorozatunk céljai:

1. Intraoperatívan alkalmazható, perifériás ideg direkt festésére alkalmas eljárás kidolgozása.
Azt feltételeztük, hogy a perifériás ideg epineuriumának megszúrása, 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, elősegítve ezáltal az ideg disszekcióját.
2. A metilénkék oldat, mint *in vivo* idegfesték hatékonyságának vizsgálata állatmodellen.
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. Anyag és módszer

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 proprius vastagságával. A patkányokat 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 ketrecben 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 vizsgálatokat végeztünk az idegjelölés hatékonyságának tesztelésére.

3.2.1. 1. számú kísérlet

A direkt *in vivo* idegfestési eljárás során a potenciálisan idegkárosodást okozó technikai tényezőket, úgy, mint a műtéti disszekciót, az ideg epineurális térségének megszurását, illetve az ide történő folyadék injektálásának a hatását is megvizsgáltuk egy-egy kontroll kísérletben. Három, 5-5 állatot tartalmazó kísérleti csoportot alakítottunk ki. Az első csoportban csak a nervus ischiadicus műtéti feltárása történt, a második csoporton az ideg feltárását követően 29G-s injekciós tűvel az ideg epineurális térségének szurását végeztük el, míg a harmadik csoportban a nervus ischiadicusok kiperarálását és megszurását követően az ideg epineuriuma alá 40 µl fiziológiás sóoldatot injektáltunk. A beavatkozásokat követően az ideg szenzoros funkcióját a fájdalomköszöb mérése útján ítéltük meg, dinamikus plantáris aesthesiometer (DPA) segítségével. Az ideg mozgató funkcióját az állat járásképe és lábtartásának

vizsgálata segítségével ellenőriztük. Végül az idegeken - azok strukturális integritásának vizsgálata céljából - szövettani vizsgálatokat végeztünk.

3.2.2. 2. számú kísérlet

Első lépésként hat darab 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.

Második lépésben az *in vivo* idegfestéshez használandó metilénkék oldat optimális koncentrációjának meghatározására az 1%-os metilénkék törzsoldatból 1:40, 1:80, és 1:160 arányú hígítási sorozatot készítettünk fizioiógias sóoldat segítségével. Az oldatokat a töményebbtől a hígabb felé haladva teszteltük, 2-2 nervus ischiadicus festése útján. Megfigyeltük, hogy 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldat optimális festést adott.

3.2.3. 3. számú kísérlet

Annak érdekében, hogy az idegfestés funkcionális és morfológiai hatását megítéljük, hat állaton elvégeztük mindkét oldali nervus ischiadicus kipreparálását, majd a bal oldali idegekbe 40 µl fizioiógias 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 műtét előtt két alkalommal, majd a 7. és 10. posztoperatív napon DPA méréseket végeztünk mindkét oldali hátsó végtagon. Az ideg mozgató funkcióját az állat járásképeinek 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 kadáver kézen végzett perifériás idegfestéseket a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottságának engedélyével végeztük el (engedély száma: PTE KK RIKEB No.: 6466, 43/2017).

Első kísérletünkben formalin fixáláson átesett kadáver kézen, négy *nervi digitales palmares proprii*-t kipreparáltunk, az idegekbe 40 µl 1:80 hígítású metilénkék oldatot fecskendeztünk.

Vizsgáltuk a festék idegen belüli terjedésének jellegét, továbbá regisztráltuk a megfestődő idegszakaszok hosszát.

Második kísérletünkben Dupuytren kontraktúra, illetve egyéb kézbetegség tüneteit sem mutató, formalin fixáláson át nem esett kadáver kézen az aponeurosis palmaris haránt rostjaitól 1 cm-rel disztálisan végeztük hat ideg festését 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldattal. A megfesthető idegszakasz növelésének céljából két digitális idegen 200 µl metilénkék oldattal is elvégeztük az idegfestést. Vizsgáltuk a metilénkék idegen belüli terjedésének képességét, majd itt is megmértük a megfestődött idegszakaszok hosszát.

3.3. Műtéti technika

A kísérleti állatok anesztéziáját intraperitonealisan beadott ketaminnal (78mg/kg) és xylazinnal (13mg/kg) végeztük. Az első kísérletünk 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. Második kísérletünkben az ideg festésekor az epineurális térbe 40 µl 1m/m%-os metilénkék törzsoldatot injektáltunk, továbbá 40 µl 1:40, 1:80, és 1:160 arányban hígított metilénkék oldatokkal is végeztünk festést. Harmadik kísérletünkben 40 µl fiziológiás sóoldattal és 40 µl 1:80 hígítású metilénkék oldattal végeztük el az idegfestést. 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 epineurális térbe történő injektálását követően az ideg kékes elszíneződését észleltük a punkciótól disztálisan. A sebeket 4.0-ás felszívódó fonállal zártuk. A posztoperatív időszakban naponként ellenőriztük a sebgyógyulást. A Seltzer és munkatársai által leírt nervus ischiadicus károsodására utaló paramétereket szintén naponként ellenőriztük és dokumentáltuk. Értékeljük 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, 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.

3.4. Fájdalomküszöb mérés

Dinamikus plantáris aesthesiometert (Ugo, Basile 37000, Comerio, Olaszország) használtunk az esetleges idegkárosodás következményeként kialakuló hyperalgesia meghatározására. Az ideg festését megelőzően szoktató mérések után, a 7. és 10. posztoperatív napon végeztünk méréseket. A DPA vizsgálat során az állat talpát egy 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 három alkalommal végeztük el a mérést, a kapott értékeket átlagolva megkaptuk a fájdalomküszöb értékét.

3.5 Eutanázia, szövetminta gyűjtés

A patkányok eutanáziáját intraperitoneálisan beadott uretánnal végeztük (2,4 g/kg). Az állatok testét a nagy vércsőn 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 Millionig pufferben (pH:7,4) oldott 4%-os paraformaldehiddel történt. Végül a nervus ischiadicusokat eltávolítottuk és szövettani vizsgálatra készítettük elő.

3.6 Mikroszkópia, digitális képalkotás és morfometriai analízis

Minden ideg négy darab hematoxilin-eosin (HE) 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) 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. Az egy területegységre (pixel) eső idegrostok számát a négy metszetben mért adatok átlagából számoltuk, ez az adat jellemzett egy ideget a statisztikai értékelés során.

3.7. Statisztikai módszerek

Minden eredményt a csoportok átlagaként mutattunk be, és feltüntettük az átlag standard hibáját (SEM). Az adatsorok varianciájának homogenitását (Bartlett-féle χ^2 négyzet próba), valamint a normál eloszlását ellenőriztük (Shapiro-Wilk test). A kontroll kísérletekben végzett fájdalomküszöb-mérések eredményeit minden időpont esetében egyutas variancia analízissel (ANOVA) hasonlítottuk össze, melyben a kezelés volt az a faktor, amelynek hatását teszteltük. Harmadik kísérletünknel kétmintás Student-féle t-próbát alkalmaztunk a fájdalomküszöb mérések és az idegrost sűrűség mérés eredményeinek értékelésére. Az alfa értékét minden esetben 5%-ban határoztuk meg.

4. Eredmények

4.1. 1. számú kísérlet

Kontroll kísérletünkben a nervus ischiadicus disszekciójának, epineurális kanülálásának és 40 μ l fiziológiás sóoldat injekciójának hatását hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy a szövettani vizsgálat nem igazolt morfológiai elváltozásokat az ideg területén egyik beavatkozás során sem.

A preoperatív, kontroll DPA mérések során 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. 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.

A posztoperatív időszakban egyik állaton sem észleltünk sebgyógyulási zavart illetve a nervus ischiadicus motoros funkciójának károsodására utaló jeleket.

4.2. 2. számú kísérlet

Második kísérletünkben első lépésként 40 μ l 1%-os metilénkék törzsoldattal végeztünk idegfestést. Az injekció a nervus ischiadicus intenzív kék elszíneződését okozta. A natív metszetek alkalmasnak bizonyultak a metilénkék idegen belüli elhelyezkedésének meghatározására, 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 injektálás alatt, vagy a tű 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. Annak érdekében, hogy ezt megelőzzük, a legkisebb töménységű, de még jó idegfestési képességekkel rendelkező metilénkék oldat koncentráció meghatározása céljából a metilénkék törzsoldatból hígítási sorozatot készítettünk, 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. Az 1:80 arányban hígított oldattal végzett jelölés elfogadható kontrasztot adva segítette az ideg azonosítását.

4.3. 3. számú kísérlet

Ebben a kísérletben hat állaton mindkét oldali nervus ischiadicust kipreparáltuk. Ugyanazon állat egyik oldali nervus ischiadicusába 40 µl fiziológias sóoldatot fecskendeztünk, míg az ellenoldali ideget 40 µl 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.

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 változatlan érző működésére utalt.

A fiziológias sóoldattal kezelt idegből készített metszetekkel összehasonlítva, a metilénkék oldattal festett idegszakaszokból készített hematoxin-eosinnal festett metszeteken nem alakultak ki idegkárosodásra utaló szövettani elváltozások. Az idegkárosodás hiányát szintén alátámasztotta, hogy a vizsgált csoportokban az idegrost denzitás értékek között nem találtunk eltérést (Student-féle t-próba: $p=0.91$).

A nervus ischiadicus mozgató működésnek integritását megítélendő, a beavatkozást követő időszakban az állatok járásképlet 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. Kadáver digitális ideg festése metilénkék oldattal

Annak igazolására, hogy a patkány nervus ischiadicus festésére alkalmazott technika az ember nervi digitales palmares proprii jelölésére is alkalmazható, 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldatot fecskendeztünk kadáver digitális ideg epineurális terébe.

Első kadáver kísérletünkben formalinban fixált kéz digitalis idegein végeztünk festést 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldattal. A formalinnal történt fixálás következtében kialakult szövetkárosodás miatt a digitalis idegek epi- és perineurium közti szöveti tér zsugorodása következik be, emiatt a metilénkék oldat érdemi progresszióját nem észleltük.

Második kadáver kísérletünkhöz Dupuytren kontraktúra tüneteit nem mutató, formalin fixáláson még át nem esett kezét használtunk, 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldatot fecskendeztünk az epineurális terébe. Az injekció átlagosan 13 mm +/- 1,5 mm idegszakaszt festett meg. 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.

5. Megbeszélés

Dupuytren kontraktúra miatt végzett parciális aponeurektómia során is, különösen azonban a revíziós műtétknél, 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 állatkísérletében az epineurális idegfestés biztonságosságának demonstrálása érdekében a perifériás ideg kipreparálásának, 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 kipreparálása, 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 idegkárosodás kimutatására használt DPA egy megbízható, elterjedt állatkísérletes vizsgálómódszer. Seltzer-féle neuropátia modellben a DPA vizsgálat kiválóan alkalmas a fájdalomküszöb csökkenés kimutatására, mely az idegfunkció károsodás legjobb indikátora. Az intakt motoros és érző funkció mellett az ideg struktúrájában sem láttunk hisztomorfológiai eltéréseket.

Második kísérletünkben epineurális idegfestést végeztünk 1%-os metilénkék törzsoldattal. A metilénkék intraneurális lokalizációjának meghatározása céljából natív és hematoxin-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. A perineurium és a fasciculusok intaktságát, a későbbi kísérletekben elvégzett DPA mérések és hisztológiai vizsgálatok eredményei is igazolták.

A metilénkék 1%-os törzsoldatával végzett injekciók során észleltük, hogy ha akár csak néhány mikroliter mennyiségű metilénkék törzsoldat is a műtéti területre jutott az injektálás közben, vagy a tű eltávolítása után, az a környező szövetek erőteljes kék elszíneződését okozta. Különböző hígítások tesztelése után azt találtuk, hogy az 1:80-as hígítású metilénkék oldat alkalmazásakor az ideg jól látható módon megfestetődött, ugyanakkor az injektálás közben, vagy a tű 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 fiziológias sóoldat ideg funkciójára és strukturájára gyakorolt hatásait vizsgáltuk meg. 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 gramm felettiak voltak. A szakirodalomban a 40 gramm feletti DPA értékek normál (kontroll) értéknek tekintendők, mely az ideg szenzoros működésének intakt voltára utal. Az állatok hátsó végtagi mozgásait illetően sem tapasztaltunk funkcionális károsodást. 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 primer és revíziós műtéteinél a hegyszövettel körülvett és diszlokált digitális ideg disszekcióját ekkora megfestett idegszakasz jelentősen megkönnyítené. Abban az esetben, ha a megfestett idegszakasz kipreparálását követően az ideg még mindig az identifikációját megnehezítő szövettel van körülvéve, 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 hegyszövettel még körülvett 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 strukturáját nem károsítja.

Annak érdekében, hogy állatkísérleteink potenciális transzlációs értékét megvizsgáljuk, kadáver digitális idegeken is elvégeztük az idegfestést.

Az első lépésben formalin fixált kezeken 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.

Annak érdekében, hogy ezt a technikai nehézséget kiküszöböljük, második vizsgálatunkat formalin fixáláson át nem esett kadáveren végeztük el. Ebben az esetben a 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldattal sikeresen megfestettük a digitális idegek egy átlagosan 13 mm hosszúságú szakaszát. Mivel a patkány nervus ischiadicusban látott mintegy 18 mm-es szegmensnél ez lényegesen rövidebb szakaszt jelent, 200 µl-re emeltük az alkalmazott oldat mennyiségét, és ezzel a kékre színeződő szakasz 18 mm-re nőtt. Megjegyzendő, hogy a beadott térfogat és a

megfestett szakasz hosszának növekedése nem állt egyenes arányban: az ötszörös beadott volumen csak mintegy 30%-kal növelte a megfestett távolságot. Mindazonáltal ez a hossz ideálisnak tűnik a módszer sikeres kézsebészeti intraoperatív alkalmazásához is.

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a perifériás ideg metilénkék oldattal történő *in vivo* festése egy könnyen kivitelezhető, biztonságos eljárás, mely az ideg struktúráját és funkcióját nem károsítja. Az idegfestési eljárás használatával a digitális ideg műtét közbeni lokalizálása és megóvása könnyebbé válna. Fontos jövőbeni célunk Dupuytren kontraktúrával érintett kadáver kézen történő idegjelölés vizsgálat elvégzése annak érdekében, hogy a jövőbeni kézsebészeti alkalmazhatóságot esetleg egy *in vivo* klinikai vizsgálatban is tesztelni tudjuk.

6. Eredmények összefoglalása

1. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy perifériás ideg *in vivo* epineurális terének szúrása, annak 40 µl volumen terhelése nem okoz idegkárosodást. Az epineurális térbe adott metilénkék oldat az epineurális tér határait követve lehetővé teszi az ideg hosszirányú láthatóvá tételét a környező szövetektől jól elkülönülő kék szín megjelenésével.
2. 1:80-as hígítású metilénkék oldattal az élő patkány nervus ischiadicusa megjelölhető.
3. 40 µl 1:80-as hígítású metilénkék oldattal a patkány nervus ischiadicusának 18 mm-es szakasza megfesthető.
4. Hígított metilénkék oldat patkány nervus ischiadicusának epineurális terébe történő fecskendezésének nincs az ideg struktúráját és funkcióját károsító hatása.
5. A technika alkalmas formalin fixáláson át nem esett humán kadáver digitális ideg festésére.

7. Közlemények az értekezés tárgyköréből:

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)

8. Poszter 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, IFSHT & FESSH Combined Congress London, 2022. június 6-10. London

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 segítségével, támogatása nélkül nem születhetett volna meg a dolgozatom. Köszönettel tartozom gyermekeimnek hogy türelmesen elviselték a tőlük távol töltött időt.