

616.713—018.46—076

DIAGNOSTICKÝ VÝZNAM HISTOLOGICKÉHO VYŠETŘENÍ KOSTNÍ DŘENĚ ZÍSKANÉ ASPIRACÍ ZE STERNA

Milan BLÁHA, Jaroslav VAŇÁSEK, Jaroslav MAZÁK, František MATĚJA

Vojenský lékařský výzkumný a doškolovací ústav JEP (náčelník: plk. doc. MUDr. J. Vaňásek, CSc.)
interní oddělení OÚNZ Rychnov nad Kněžnou (přednosta: prim. MUDr. F. Matěja)

Úvod

Přesná a rychlá klinická diagnostika poruch činnosti kostní dřeně má velký význam pro vojenskou medicínu. Patologické stavy, vzniklé jako následek poruchy funkce kostní dřeně po zasažení jadernými zbraněmi, by jistě byly v eventuelním válečném konfliktu časté. Diagnostika těchto poruch má ovšem význam i v míru.

O významu **histologického** vyšetření kostní dřeně pro diagnostiku řady chorob není jistě pochyb (Oettgen — 1958, Chasanova — 1962, Osmanlijev — 1962, Hunstein a Wendt — 1962, Bartelheimer a Papageorgiu — 1963, Duhamel a Marchal — 1964, Burkhardt — 1971 a další). Ještě širšímu uplatnění tohoto vyšetření však bránil požadavek maximální šetrnosti při vyšetřování nemocného. Zde hraje důležitou roli technika odběru vzorku.

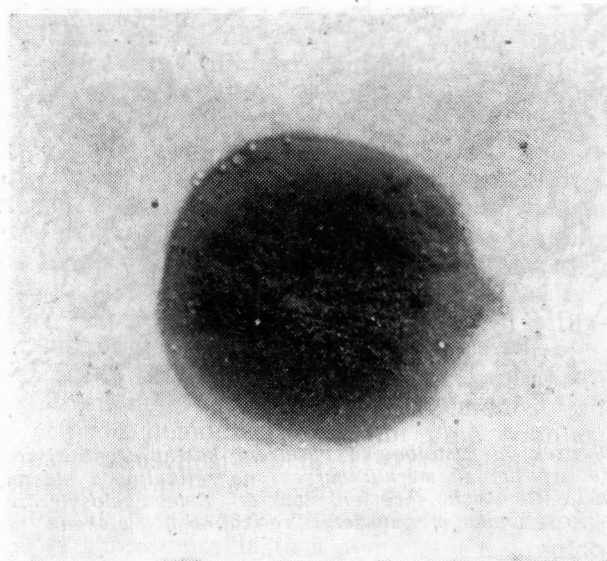
Technická stránka má svoji historii (Mazák a Vaňásek — 1968). Zprvu byla prováděna biopsie kostní dřeně chirurgy v místním znecitlivění. Velkým pokrokem byla trepanobiopsie, prováděná již jednodušeji. Ale často také zde byl a i dnes je volán na pomoc chirurg, používá se elektrických fréz (Hunstein a Wendt — 1962, Burkhardt — 1971), zavádění trepanu pomocí chirurgického kladívka, dále odběr pomocí Silvermanovy jehly (Hirte a Cunningham — 1963) a podobně. Technicky velmi jednoduchá, rychlá a šetrná je metoda odběru kostní dřeně aspirací ze sternu podle

Waitze (Waitz a spol. — 1954, 1962, 1964). Odběr kostní dřeně se technicky prakticky neliší od běžné sternální punkce. Za výhodu pokládáme také to, že její provedení i vyhodnocení provádějí lékaři bezprostředně léčící nemocného a znalí celého klinického obrazu choroby.

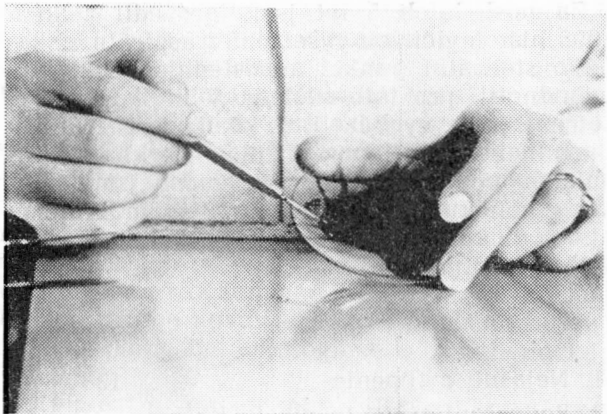
Popis metodiky práce

Odběr kostní dřeně provádíme zcela stejnou technikou, kterou získáváme ze sternu materiál pro cytologické vyšetření. Používáme u nás běžné sternální jehly. Aspirací získaná kostní dřeň se vystříkne na hodinové sklíčko, které není silikonované, a jehož průměr je asi 10 cm. Kývavými rotačními pohyby se dřeň rozprostře po větší ploše sklíčka (obr. 1). Tekutá krev se sleje na další sklíčko a drobné částičky kostní dřeně se kopíčkem jemně shromáždí uprostřed prvního sklíčka a pak se přenesou na podložní sklíčko. Celý tento postup musí být dostatečně rychlý, dříve než krev koaguluje (obr. 2). Na podložním sklíčku se z hromádky dřeně pomocí filtračního papíru odsaje co nejvíce krve. Jakmile zbývající krev koaguluje, je hromádka přilepena k podložnímu sklu a s ním se přenesou do fixační tekutiny (obr. 3).

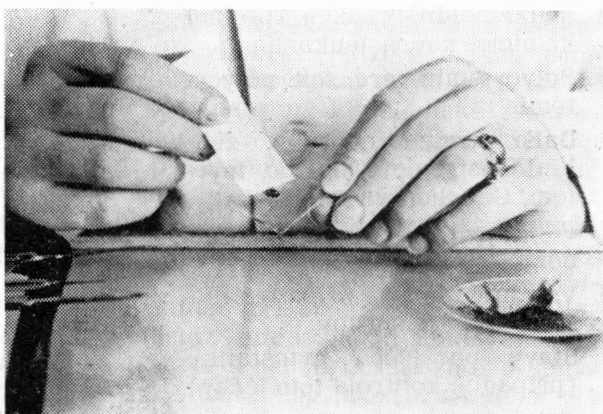
Z našich autorů navrhli vyšetřování punktátu kostní dřeně metodou histologických řezů v r. 1950 Donner a Mazanec. Jejich technika spočívala v tom, že punktát kostní dřeně



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

se vystříkl na parafinové podložní sklíčko do kapky heparinu, aby se zabránilo tvorbě fibrinu. Při Waitzově metodě se naopak nebrání tvorbě fibrinu, ten se využije jako materiál, který spojí navzájem jednotlivé kousky kostní dřeně ve větší, lépe zpracovatelný vzorek. Dojde-li ke koagulaci krve na hodinovém sklíčku

dříve, než se podařilo přenést kousky dřeně na podložní sklo, pak je možné kopíčkem oddíznout vrstvu koagula okolo částíček dřeně a ty přenést na podložní sklo tak, že se jemnou pinzetou uchopí koagulum, nikoliv částice dřeně.

Jako fixační tekutiny používáme roztok Hollandův v modifikaci Cazalové:

Destilovaná voda	890 ml
Alkohol 70 %	100 ml
Sublimát (nasyc. roztok)	10 ml
Octan měďnatý	25 g
Kyselina pikrová	40 g
Formol 40 %	100 ml
Kyselina octová konc.	15 ml

Příprava roztoku: 890 ml destilované vody se smísí se 100 ml 70% alkoholu a 10 ml sublimátu. V tomto roztoku se rozpustí 25 g octanu měďnatého. Když je octan asi z poloviny rozpuštěn, přidá se 40 g kyseliny pikrové a roztok se nechá úplně rozpustit po dobu 24 hodin. Pak se přidá 100 ml formolu a 15 ml kyseliny octové. Tento roztok dobře uchovává tvar krevních buněk.

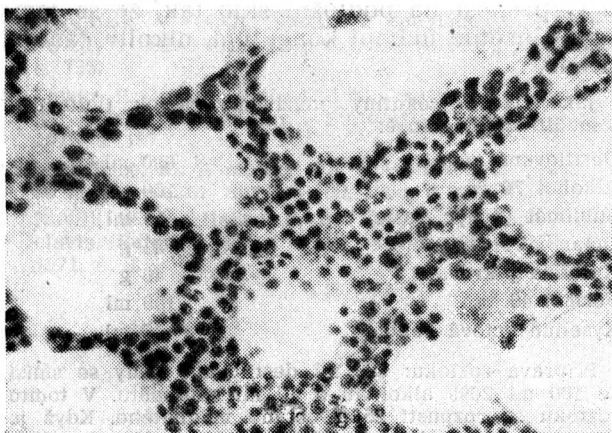
Kostní dřeň potom proplachujeme v tekoucí vodě, odvodňujeme alkoholem a butylalkoholem, zalejeme do parafinu a z bločků krájíme řezy. Zprvu jsme se spokojili s řezy silnými 7 nebo dokonce 10 mikronů, nyní používáme k diagnostice řezů 4 mikrony tlustých. Burkhardt (1971) doporučuje ještě tenší řezy — 2—3 mikrony.

Jak plyne z výše uvedeného, je celá technika zpracovávání obdobná zhotovování jiných histologických řezů. Fixaci provádíme 1 den, proplachování v tekoucí vodě 2 dny, odvodňování 1 den a po nařezání necháme řezy zaschnout na sklíčku předem potřeném glycerinem s bílkem po 24 hodin. Po odparafinování — zhruba za 5 dní po odběru — je tedy preparát připraven k odečtení. Vyšetření je kratší o 4 dny než vyšetření z biopsie, získané trepanem z hřebenu lopaty kyčelní kosti (Mazák a Vaňásek — 1968), protože zde nemusíme provádět dekalcinaci a také fixace je o 1 den kratší. Tento čas je dostatečný při klinické diagnostice ve většině případů. Rychlejší metodiku, ale poněkud technicky náročnější, popsal Ronald (1972). Řezy jsou připraveny k odečtení asi za 24 hodin. Morgenstren a spol. (1973) popsali metodiku zhotovení ultratenkých řezů na zmrazovacím mikrotomu. Preparát je připraven dokonce za 20—30 minut k odečtení elektronmikroskopicky i ke zkoumání cytochemickými metodami.

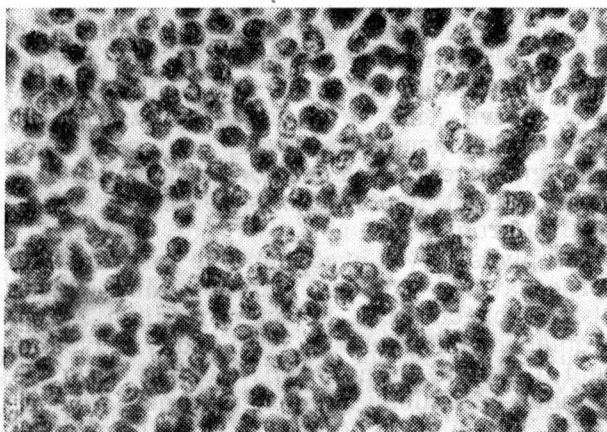
Řezy lze barvit hematoxylinem — eozinem, trichromem podle Massona, metodou podle Malloryho na kolagen, či Gömöryho metodou na retikulinová vlákna. Po určitých zkušenostech provádíme nyní standardně barvení hematoxylinem-eozinem a Gömöryho metodou. Nabarvené řezy zamontujeme do kanadského balzámu.

V normální kostní dřeni zaujímají tukové buňky asi 1/3 plochy. Lze dobře pozorovat krvetvorbu, buňky jednotlivých linií je možno vidět v podobě malých ostrůvků granulocytár-

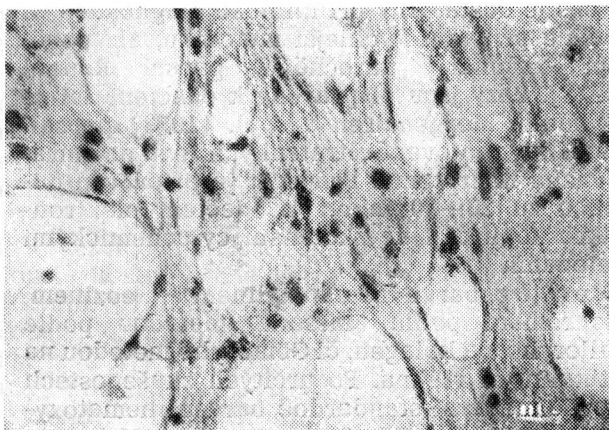
ní nebo erytrocytární řady. Megakaryocyty jsou v normální dřeni umístěny jednotlivě (viz obr. 4).



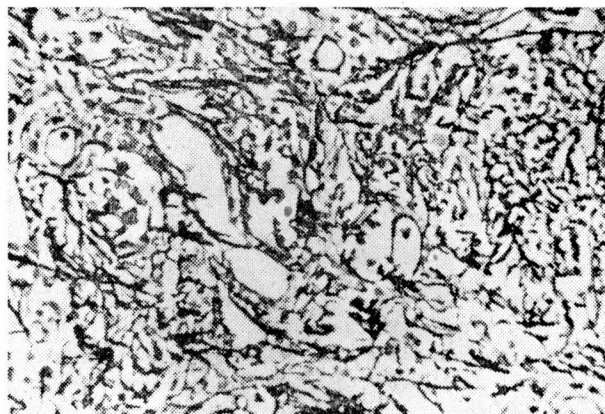
Obrázek 4. Histologické vyšetření aspirátu kostní dřene ze sternu, barvení hematoxylin-eozin, zvětšení 240krát. Normální nález



Obrázek 5. Histologické vyšetření aspirátu kostní dřene ze sternu, barvení hematoxylin-eozin, zvětšení 360krát. Chronická lymfatická leukémie; velmi bohatá buněčnost, úplně vymizení tukových vakuol, z buněk absolutně převažují elementy lymforetikulární řady, zvl. lymfocyty, většinou dobře vyvrážděné. Mladých forem je poměrně málo



Obrázek 6. Histologické vyšetření kostní dřene získané aspirací ze sternu; barvení hematoxylin-eozin, zvětšení 360krát. Dřeňová aplazie; výrazné snížení buněčnosti, na obrázku je vidět jen několik buněk krvetvorných řad, dále pouze vazivo



Obrázek 7. Histologické vyšetření kostní dřene získané aspirací ze sternu; barvení na retikulínová vlákna podle Gömöryho, zvětšení 360krát. Osteomyeloskleróza se značným zmožením retikulínových vláken

Vlastní zkušenosti, výsledky a diskuse

Za posledních 5 let jsme provedli celkem 1098 histologických vyšetření z aspirátu získaného sternální punkcí a posledních 500 jsme vyhodnotili pro toto sdělení. V indikaci k vyšetření jsme vycházeli ze zkušeností Waitze, Bartelheimera, Papageorgiua, Burkhardta a dalších, podle vlastních zkušeností jsme indikace poněkud upřesňovali. Nyní indikujeme histologické vyšetření aspirací ze sternu v těchto případech:

	Počet vyšetření
1. Nejasné cytopenie	138
2. Podezření na osteomyelosklerózu	18
3. Retikulózy	53
4. Leukemoidní reakce, preleukemické stavy, leukémie	84
5. Polycytémia vera, sek. polycytémie	32
6. Další krevní choroby, zvl. Waldenströмова nemoc, myelom, Gaucheroва nemoc aj.	50
7. Podezření na difúzní karcinózu kostry	14
8. Všechny nejasné případy zvětšení jater a sleziny	21
9. Stavy po léčbě cytostatiky (případně kontrola této léčby)	15
10. Ostatní:	
— vysoká sedimentace, klinicky jinak neobjasněná	75
— bolesti v kostech nevysvětlené klinickým vyšetřením	
— závažné změny ve skladbě krevních proteinů apod.	

Celkem 500

Dosud provedená vyšetření v těchto indikačních plně potvrdila názor autorů, kteří diagnostický význam této metody velmi oceňují (Agress — 1957, Block — 1968, Pettlet a spol. — 1955, Liao — 1971). Burkhardt — 1971 hodnotil význam histologického vyšetření kostní dřevě na sestavě 866 vyšetření, získaných ovšem trepanobiopsií. Nemocné rozdělil podle diagnóz do 15 skupin a zjistil, že v 11 skupinách bylo cytologické vyšetření kostní dřevě více než v 50 % případů diagnostiky netypické, zatímco histologické vyšetření bylo typické u více než 50 % případů v 8 skupinách. Cytologické vyšetření mělo zřetelně větší významnost jen v případě hemoblastóz. S tím plně souhlasí i naše zkušenosti. Liao [1971] shledal při zhodnocení 1016 vyšetření stern. punkátu cytologicky a současně histologicky, že histologie je přínosem zvláště v případech maligních lymfomů a metastáz maligních nádorů do kostní dřevě. Zde zvětší záchytnost i počínajících fází chorob a vede ke zpřesnění diagnózy. Doporučuje histologické vyšetření jako rutinní diagnostickou metodu v hematologii.

Histologické vyšetření kostní dřevě dobře umožňuje především sledovat bohatost krve tvorby, podíl krve tvorné tkáně oproti tukové a množství kolagenních a retikulinových vláken. Řezy jsou natolik tenké, že při větším zvětšení umožní dále dostatečné rozlišení jednotlivých buněčných řad a buněk. V některých detailech se ovšem musíme opírat o cytologii, ev. cytochemické vyšetření. V případech infiltrace kostní dřevě hemoblastózou se ukázalo cennějším cytologické a cytochemické vyšetření.

Předností histologického vyšetření oproti cytologii je i posouzení dalších detailů: dají se zjistit a byly popsány např. změny v kostní dřevě u miliární tuberkulózy, Boeckova sarkoidu a u některých reaktivních změn retikulární tkáně (Burkhardt — 1971). Sami jsme někdy pozorovali edematózní prosáknutí kostní dřevě. Velký význam má histologické vyšetření kostní dřevě pro časnou diagnostiku chorob. Histologické změny u myelosklerózy mohou předcházet splenomegalii až o 10 let (Wyatt a Sommers — 1950, Demmler a Burkhardt — 1970).

Velký význam má histologické vyšetření aspirované dřevě také při sledování léčby maligních hemoblastóz. Intenzivní kombinovaná cytostatická terapie s sebou nese riziko předávkování a tím nebezpečí pro nemocného při sekundárním dřevěném útlumu. Požadavek intenzivní léčby ale vyžaduje, aby bylo použito velké dávky léků a v případě jejich nutného vysazení pro navozený dřevěný útlum se musíme snažit o včasné další nasazení léčby. Naše zkušenosti ukazují, že to je umožněno lépe za použití histologického vyšetření kostní dřevě. V mnoha případech (33,1 % našich pacientů) neodpovídá cytologický nálezní histologii. Po vysazení léčby nacházíme v cytologickém nátěru ještě velmi chudou buněčnost, ale v histo-

logickém preparátu jsou již ložiska bohaté krve tvorby, což nám umožní bez váhání nasadit znovu léčbu. Nacházeli jsme i případy opačné — při poměrně málo snížené buněčnosti cytologického nátěru bylo v histologickém preparátu již málo ostrůvků dobře zachovalé krve tvorby, což nás vedlo ke včasnému snížení nebo vysazení léčby cytostatiky.

Některé naše výsledky jsou shrnuty v tabulce 1.

Tabulka 1

Celkový počet hodnocených vyšetření:		500	tj. 100 %
Z toho „suchých“ punkcí:		125	25 %
Počet preparátů s hodnotitelným náleznem:		375	75 %
Z hodnotitelných preparátů:	nález typický pro dg.:	132	tj. 35,2 %
	nález důvodně suspektní:	77	20,7 %
	nález nediagnostický:	166	44,2 %

Histologické vyšetření kostní dřevě, získané aspirací ze sternu, má ovšem také svoje nevýhody. Jsou případy, kde nelze aspirací získat dostatečné množství vzorku pro hodnocení. Zvláště u nemocných pokročilejších osteomyelosklerózou a u dřevěných útlumů je to obvyklým jevem. V tom případě není jiné východisko, než se uchýlit k trepanobiopsii kostní dřevě z lopaty kyčelní kosti. V naší sestavě jsme se s touto situací setkali ve 25 % případů a v 7,2 % z nich jsme provedli trepanobiopsii. Avšak i u některých případů **bohaté** patologické krve tvorby se nepodaří aspirační technikou získat hodnotitelný vzorek. Jde nejčastěji o „řídkou“, fragilní dřevě, např. u intenzivní infiltrace leukemické nebo u myelomu. Při posuzování vzorku získaného aspirací nelze posuzovat charakter kostní tkáně a poruchy kostní, což trepanobiopsické vyšetření umožňuje.

Závěrem lze říci, že metoda histologického vyšetření kostní dřevě získané aspirací ze sternu je pro klinické využití v diagnostice a sledování léčby výše uvedených chorob velmi vhodným vyšetřením. Pro svou jednoduchost a dostupnost by měla být šířeji využívána. Jsme přesvědčeni, že za určitých podmínek by měla uplatnění i v některých našich vojenských nemocnicích, kde by přispěla ke kvalitnější a rychlejší diagnostice.

Souhrn

Histologické vyšetření kostní dřevě získané aspirací ze sternu je cennou diagnostickou vyšetřovací metodou, která má význam pro vo-

jenskou medicínu. V práci je popsána metodika vyšetření a hodnocení zkušenosti autorů po 1098 vyšetřeních, z nichž bylo posledních 500 vyhodnoceno.

Metodika se ukázala být cennou v klinické diagnostice pro svou jednoduchost, nenáročnost a rychlost. V řadě případů je její přínos pro diagnostiku značný. Komplikace a nevýhody této metody nejsou závažné. Proto jsou autoři pro širší používání metody v diagnostice a ve sledování léčby uvedených chorob.

Literatura

1. Agress, H.: Comparative study of spreads and sections of bone marrow. *Amer. J. Clin. Path.*, 27, 1957, s. 282.
2. Bartelheimer, H., Papageorgiou, A.: Die Knochenmarkbiopsie als Methode in der Hematologie. *Dtsch. Med. Wschr.*, 88, 1963, s. 358.
3. Block, M.: Histopatologic basis for evaluation of prognosis and response to therapy of the lymphocytic lymphomas. In: *The Lymphocyte and Lymphocytic Tissue*, J. W. Rebeck, Ed. New York, Paul B. Hoeber, Inc., 1960, s. 202.
4. Burkhardt, R.: Bone Marrow and Bone Tissue. Eds.: Berlin-Heidelberg, Springer Verlag, 1971, s. 115.
5. Demmler, K., Burkhardt, R.: Milzgröße und Knochenmark-Fibrose. 14. Tagg. Dtsch. Ges. Hemat., Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag 1970.
6. Donner, L., Mazanec, K.: Vyšetřování punktátu kostní dřevě v histologických řezech. *Čas. Lék. čes.*, 89, 1950, s. 756.
7. Duhamel, G., Marchal, G.: Valeur pronostique comparée de la ponction sternale et de la biopsie médullaire dans l'étude clinique et hématologique de 52 cas d'insuffisance médullaire N. *Rev. Fr. d'Hémat.*, 4, 1964, s. 319.
8. Hirte, W. H., Cunningham, T. A.: Bone marrow biopsies with a Silverman Needle. *Canad. Med. As. J.*, 89, 1963, s. 203.
9. Hunstein, W., Wendt, F.: Die Knochenbiopsie nach Turkel und Bethel. *Folia hemat. N. F.*, 2, 1958, s. 377.
10. Chasanova, K. A.: K citologické charakteristice systémnej mieloproliferacijsi pri osteoskleróze i mieloskleróze. *Probl. gemat.*, 7, 1962, s. 21.
11. Liao, K. T.: The superiority of histologic sections of aspirated bone marrow in malignant lymphomas. *Cancer*, 27, 1971, s. 618.
12. Mazák, J., Vaňásek, J.: Trepanobiopsie kostní dřevě v hematologické diagnostice. *Vnitř. Lék.*, 14, 1968, s. 667.
13. Morgenstern, E., Werner, G., Neumann, K., Hufnagl, D.: Gefrier-Ultramikrotomie des Knochenmarkes. *Blut*, 26, 1973, s. 250.
14. Osmanlijev, P. D.: Prižizněnoje issledovanie kostnogo mozga i kostnoj tkani pri osteo- i mielopoetičeskoj displaziji. *Probl. gemat.*, 7, 1962, s. 14.
15. Pettlet, J. D., Pease, G. L., Cooper, T.: An evaluation of paraffin sections of aspirated bone marrow in malignant lymphomas. *Blood*, 1955, s. 820.
16. Pribilla, W., Oettgen, H. F.: Die Knochenbiopsie als diagnostische Methode bei generalisierten Markkrankungen. *Folia hemat. N. F.*, 2, 1958, s. 377.
17. Ronald, W. A.: A simple rapid method for the preparation of paraffin sections of bone marrow aspirate. *Can. J. Med. Technol.*, 33, 1971, s. 71.
18. Waitz, R., Mayer, S., Mayer, G.: Aspects histologiques des myéloscléroses. *Semaine des Hôp.*, 38, 1962, s. 2758.
19. Waitz, R., Mayer, G., Mayer, S.: La moelle osseuse dans les lymphoses subleucémiques. *Rev. Belge Pathol. et Méd. Exper.*, 24, 1954, s. 395.
20. Waitz, R., Mayer, S., Mayer, G.: Les aplasies médullaires de l'adulte. *Semaine des Hôp.*, 40, 1964, s. 163.
21. Wyatt, J. P., Sommers, Sh. C.: Chronic marrow failure, myelosclerosis and extramedullary hematopoiesis. *Blood*, 5, 1950, s. 329.