

Miniinvazivní odběr spongiózních štěpů v traumatologické indikaci – experimentální část studie

Minimally Invasive Cancellous Bone Graft Harvesting in Trauma Indication – Experimental Part of the Study

P. LÁTAL¹, Z. ŠTIKOVÁ², Z. TRÍSKA¹, J. ŠPERL¹, M. KLOUB¹

¹ Oddělení úrazové chirurgie Nemocnice České Budějovice, a.s.

² Patologické oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s.

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

Our experimental study presents a set of bone grafts harvested by a minimally invasive procedure from selected deceased donors. Our objective was to compare the concentration of red bone marrow in the cancellous bone harvested in this way from selected regions with the reference harvesting from the iliac crest. Thus, the potential of grafts to heal complicated fractures or non-unions is assessed.

MATERIAL AND METHODS

The Hospital Department of Pathology provided 10 cadaver preparations – 7 male and 3 female for the experiment. In the process of selection, the age limit was 18–50 years, the other exclusion criteria were severe injuries and burning to death as mechanisms affecting the condition of the skeletal system, bone diseases except for osteoporosis, and malignant diseases. From each preparation, a total of 12 samples of cancellous bone tissue were harvested from pre-defined 6 harvest sites bilaterally – proximal humerus, proximal ulna, greater trochanter of proximal femur, distal femur, proximal tibia and from the reference region of the iliac wing. The grafts were harvested using a 10 mm bone cutter. In total, 120 samples of cancellous bone of the determined diameter and uniform length of 30 mm were obtained. The obtained preparations were laboratory processed, fixed, decalcified and hematoxylin-eosin stained. The samples were assessed microscopically. The share of the bone tissue and cancellous bone was expressed as a percentage. Determined as a healing potential parameter was the concentration of red bone marrow and its ratio to the yellow bone marrow was stated. The hypothesis was tested using the ANOVA analysis of variance.

RESULTS

The highest concentration of red bone marrow was observed in cancellous grafts harvested from the iliac wing with 34.95%, followed by greater trochanter of proximal femur with 31.7%, distal femur with 26.9% and proximal humerus with 21.9%. Its concentration was negligible in proximal tibia with 2.55% and proximal ulna with 0.15%.

By ANOVA statistical method the values of reference samples from the iliac wing and greater trochanter of the femur, distal femur and proximal humerus were compared. The differences are not statistically significant – P 0.60, 0.48 and 0.34 ($p < 0.05$). No significant differences were found in the concentration of red bone marrow. Statistically compared were also the values of reference samples from the iliac wing and proximal tibia, proximal ulna. This difference is statistically significant – P 0.0008 and 0.0002 ($p < 0.05$). Thus, the difference in the concentration of red bone marrow is obvious.

DISCUSSION

The aforementioned results suggest that the greatest potential to heal will be achieved with the use of bone grafts from the iliac wing region, followed by greater trochanter of the femur, distal femur and proximal humerus. When testing the hypothesis by the ANOVA method, the detected differences between the selected harvest regions are not statistically significant. Therefore, the iliac wing grafts can be used in practice just as the material from greater trochanter of the femur, distal femur or proximal humerus, which is of equal quality. The other regions, proximal tibia and ulna, contain only minimum concentration of red bone marrow.

CONCLUSIONS

The experimental study comparing the concentration of red bone marrow in grafts harvested using a minimally invasive procedure from the region of greater trochanter, distal femur and proximal humerus concluded that these samples are comparable with the grafts from the iliac wing.

The grafts harvested from proximal tibia and proximal ulna show only negligible concentration of red bone marrow and their use in clinical practice is disputable.

The benefits of our experimental study for treatment shall be further evaluated in a clinical study.

Key words: bone marrow, stem cells, bone healing/orthobiologics, new technology assessment, autograft harvesting.

ÚVOD

Spongiózní kostní tkáň slouží jako důležitá substance pro výplň kostního defektu u komplikovaných zlomenin a při operaci pakloubů. Kostní štěpy se standardně odebírají z hřebenu lopaty kosti kyčelní, kdy odkládáme kortikalis a spongiózu odebíráme speciálním dlátkem. U získaných kostních štěpů je podstatný jejich potenciál k hojení, aby byla vlastní spongioplastika efektivní.

Na našem oddělení jsme začali od března 2012 používat novou techniku miniinvazivního odběru spongiózní kostní tkáně spočívající ve využití speciálních fréz k získání válce kostní tkáně, který je následně upravován. Techniku jsme začali používat ve snaze minimalizovat pooperační bolesti pacienta v oblasti odběrového místa a urychlit vlastní operační výkon. Válce jsme odebírali z různých anatomických lokalit – proximálního humeru, proximální ulny, proximálního a distálního femuru, proximální tibie. Otázkou bylo, zda je takto odebraná tkáň stejně kvalitní jako v případě standardního odběru z lopaty kosti kyčelní. Rozhodli jsme se proto zkoumat zastoupení červené kostní dřevě obsahující kmenové buňky v takto odebraných válcích kostní tkáně (4). Tímto faktorem se zabýval také Schottel, zkoumal aspirát kostní dřevě při hojení pakloubů (8). Jednoznačně vymezuje důležitost aktivity červené kostní dřevě. Ta obsahuje mezenchymové kmenové buňky diferencující se v osteoblasty, osteocyty, adipocyty a chondrocyty. Ostatní parametry, například kostní trávce či vlastní architektura tkání, nebyly pro naši studii podstatné. Nehodnotili jsme pevnost kosti, ale schopnost remodelace.

Cílem našeho experimentu je srovnání zastoupení červené kostní dřevě u miniinvazivně odebraných kostních štěpů z kadaverózních preparátů ze zvolených oblastí s referenčním odběrem z hřebenu lopaty kosti kyčelní.

MATERIÁL A METODIKA

Soubor

Z patologického oddělení nemocnice bylo pro experiment získáno 10 kadaverózních preparátů – 7 mužského a 3 ženského pohlaví. Při jejich výběru byl věk omezen na 18–50 let, dalšími vylučujícími kritérii byly těžké úrazy a uhoření jako mechanismy mající vliv na stav opěrné soustavy, kostní choroby kromě osteoporózy a maligní onemocnění.

Vlastní odběr vzorků ze zemřelého dárce

Odběr byl proveden do 6 hodin od úmrtí pacienta. Od každého dárce jsme odebrali celkem 12 vzorků spongiózní kostní tkáně z předem definovaných 5 odběrových míst oboustranně – proximálního humeru (PH), proximální ulny (PU), velkého trochanteru proximálního femuru (VT), distálního femuru (DF) a proximální tibie (PT) a oboustranně z lopaty kosti kyčelní (LKK), kterou jsme definovali jako referenční oblast. V případě proximálního humeru jsme vrtali dva centimetry pod vrcholem velkého hrbolu horizontálně, u proximální ulny z apexu okovce v ose kosti. U dolní končetiny jsme cílili

z oblasti apexu velkého trochanteru proximálního femuru šikmo kaudálně, odběrová oblast z distálního femuru se nacházela laterálně 5 cm nad kloubem, z proximální tibie pak 5 cm pod kolenním kloubem.

K odběru štěpů jsme použili frézu o průměru 10 mm, kterou jsme zaváděli po vodicím drátu s olivkou. Takto získané válečky spongiózní kosti jsme pomocí skalpelu zkrátali seříznutím přebývajících spongiózy na jednotnou délku 30 mm (obr. 1).

Laboratorní zpracování vzorků

Materiál jsme fixovali v neutrálním 5% formolu po dobu 24 hodin a odvápili jsme jej směsí kyseliny mravenčí, chlorovodíkové a destilované vody. Materiál jsme uzavřeli do očíslovaných krabiček, které jsme prali v tekoucí vodě po dobu dvou hodin, zpracovali autotechnikou (neutrální 5% formol, odvodnění 96% etanolem, 2x lázně s xylenem a 4x lázně s parafínem) a zalili parafínem do tkáňových bločků. Vlastní bločky jsme nakrájeli na mikrotomu. Tyto tkáňové řezy jsme pak naplnili na hladině teplé destilované vody s želatinou a nalepili na podložní sklíčko odmaštěné alkoholem. Materiál jsme sušili při 56 °C po dobu 30 minut. Pak jsme řezy odparafinovali (xylen 20 minut, zavodnění etanolem, promytí ve vodě). Na závěr jsme vzorky nabarvili hematoxylinem-eosinem, přiložili je na podložní sklíčko a sušili po dobu 30 minut.

Zhodnocení připravených vzorků

Jednotlivé vzorky jsme hodnotili mikroskopicky. U každého vzorku jsme procentuálně stanovili zastoupení kostní tkáně a spongiózy. Jako parametr potenciálu hojivosti jsme stanovili zastoupení červené kostní dřevě a vyjádřili jsme její poměr k dřevu žluté. Jiné hodnocení a zpracování vzorků nebylo technicky možné. Jednalo se o větší části tkání, což přináší potřebu delšího procesu odvápňování. Tím dochází k znehodnocování materiálu k případnému imunohistochemickému vyšetření (5).

Porovnali jsme jednotlivé oblasti odběru mezi sebou a s referenčním odběrovým místem z lopaty kosti kyčelní. Pravá a levá strana jednotlivých kadáverů byly pro toto srovnání průměrovány. Pro kontinuální proměnné jsme stanovili průměr. Pro testování hypotézy jsme použili metodu analýzy rozptylu ANOVA (1).

VÝSLEDKY

Největší zastoupení červené kostní dřevě měly spongiózní štěpy odebrané z lopaty kosti kyčelní 34,95 %, dále velkého trochanteru proximálního femuru 31,7 %, distálního femuru 26,9 % a proximálního humeru 21,9 %. Její zastoupení bylo zanedbatelné v případě proximální tibie (2,55 %) a proximální ulny (0,15 %).

Nejprve jsme statistickou metodou ANOVA porovnali hodnoty referenčních vzorků lopaty kosti kyčelní a velkého trochanteru (tab. 1). F hodnota testovaného kritéria byla 0,28 a P hodnota 0,60. Výsledek není statisticky signifikantní ($p < 0,05$). Dále jsme srovnali odběry z lopaty kosti kyčelní a z distálního femuru. F hodnota testovaného kritéria byla 0,51 a P hodnota 0,48. Výsle-

Tab. 1. Statistické porovnání podílu červené kostní dřeně referenčních vzorků LKK a ostatních odběrových míst / Table 1. Statistical comparison of the concentration of red bone marrow with the reference samples from the iliac wing and other harvest sites

Dárce	LKK (Σ %)	VT (Σ %)	DF (Σ %)	PH (Σ %)	PT (Σ %)	PU (Σ %)
1	60	54	58	42	0	0
2	26	32	18	25	0	0
3	71	65	68	58	0	0
4	25	21	15	6	0	0
5	80	95	72	78	0	0
6	85	68	62	38	8	0
7	97	80	69	40	0	1
8	58	47	61	40	0	0
9	107	85	39	55	43	0
10	90	87	76	56	0	2
Průměr	34,95 %	31,7 %	26,9 %	21,9 %	2,55 %	0,15 %
P	1,00	0,60	0,48	0,34	0,0008	0,0002

LKK – lopata kosti kyčelní, VT – velký trochanter proximálního femuru, DF – distální femur, PH – proximální humerus, PT – proximální tibia, PU – proximální ulna

dek není opět signifikantní ($p < 0,05$). Statistickou metodou rozptylu jsme porovnali odběr z lopaty kosti kyčelní a proximálního humeru. F hodnota testovaného kritéria nám vyšla 0,93 a P hodnota 0,34. Výsledek není opět statisticky významný při hladině významnosti $p < 0,05$. Na závěr jsme takto statisticky srovnali referenční vzorky s materiálem z proximální tibie a proximální ulny. Zde je již patrný statisticky významný rozdíl mezi referenčním odběrem z lopaty kosti kyčelní a proximální tibíí (F 14,61, P 0,0008) a proximální ulnou (F 19,05, P 0,0002), hladina významnosti $p < 0,05$.

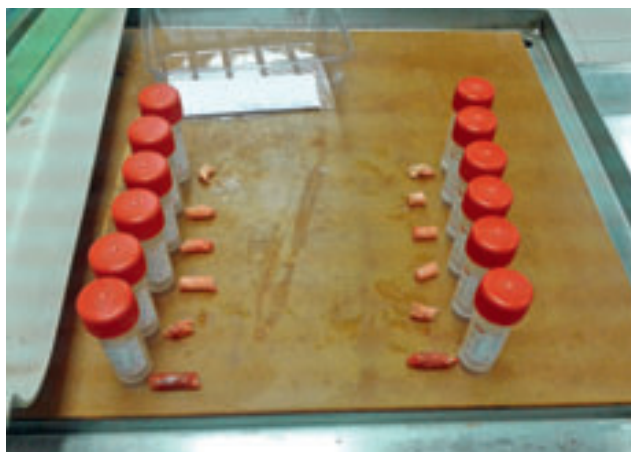
DISKUSE

V literatuře jsme neobjevili žádnou práci, která by se daným tématem v tomto rozsahu zabývala. Z uvedených výsledků plyne, že lze v praxi použít v rámci plánované spongioplastiky štěpy z lopaty kosti kyčelní, stejně tak ale i kvalitou rovnocenné štěpy z oblasti velkého tro-

chanteru, distálního femuru nebo proximálního humeru. Je patrný významný rozdíl mezi referenční lopatou kosti kyčelní a proximální tibíí či proximální ulnou. K diskusi se nabízí, čím může být způsoben výrazný rozdíl v zastoupení červené kosti dřeně oblasti proximální tibie a ulny. Z klinické části studie totiž víme, že hlavně štěpy z oblasti proximální tibie vykazují příznivé parametry hojení. V případě proximální tibie se domníváme, že nebylo zcela správně zvoleno odběrové místo, neboť předpokládáme větší množství červené spongiózy kranálněji, směrem k plateau tibie. To mohlo mít vliv na výsledky. Dalším důležitým faktorem může ale také být výrazný pokles tvorby kostních buněk této oblasti po 18. roku života, po dokončení růstu. V případě proximální ulny mohly být výsledky ovlivněny technickým faktorem. Tedy poměrně silnou kortikalis v této oblasti a vlastním technicky obtížným odběrem (poloha lokte, cílení).

S kadaverózními dárči pracuje ve své studii Lim (6). Zabýval se miniinvazivním odběrem kostních štěpů z proximální tibie. Vyšetřuje stabilitu proximální tibie během fyziologického zatížení a maximální možný bezpečný průměr odebraného válce. Celkem pracuje s jednácti těly. Používá frézy 11 a 25 mm. Nezaznamenal rozdíl v použití fréz v rámci běžného fyziologického zatížení. Získané množství štěpů je podle Lima srovnatelné s množstvím štěpů získaných standardním odběrem z lopaty kosti kyčelní. Nicméně jedná se spíše o biomechanickou studii. Nehodnotí kvalitu odebraných štěpů, nezpracoval jejich histologii.

Engelstad srovnává zisky možných objemů kostní tkáně z 3 různých odběrových lokalit u jednoho kadaverózního dárce (2). Zkoumá oblasti SIAS, SIAP (*spina iliaca ant. superior a posterior*) a proximální tibii. Využívá 10 kadáverů. Největší objem tkáně získal překvapivě z oblasti proximální tibie. Ale opět se nezabýval potenciálem materiálu k hojení. My jsme u našich vzorků používali standardizovaný objem válce 2,36 cm³.



Obr. 1. Odebrané vzorky spongiózy od jednoho dárce oboustranně. / Fig. 1. Samples of spongiotic bone harvested from a single donor bilaterally.

Patterson zkoumá v své práci rozdíl kvality, zastoupení osteogenních progenitorů, štěpů z lopaty kosti kyčelní získaných aspirací a klasickým odběrem (7). Má soubor celkem 33 pacientů. Používá k hodnocení aspirát a tri-kortikální štěp. U klasického štěpu odděluje skupinu buněk tzv. trabekulárního prostoru a vlastní kostní dřevě. Z výsledků uvádí jako nejvyšší podíl osteogenních progenitorů buněk z trabekulárního prostoru. Jejich aktivita je v rámci srovnání aspirátu a standardního spongiózního štěpu 3x nižší. Aspirát kostní dřevě jsme v naší studii nehodnotili, neboť nemá pro naši operační praxi význam.

Guarnieri zkoumá v histologické a histomorfometrické analýze kvalitu anorganické minerální boviní matrix. Sleduje její schopnost degradace (3). Novotvořená kost vykazuje různé zrající četné osteocyty, přičemž je jich větší podíl blíže k charakteru štěpu. Histomorfometrie ukazuje průměrné hodnoty novotvořené kosti 40,84 %, 33,58 % rezidua štěpu a 1,69 % osteoidní tkáně. Klasifikuje tyto štěpy jako dlouhodobě degradovatelné. Naše studie neměla možnost v určených laboratorních podmínkách histomorfometrickou analýzu využít (metoda umožňuje kvantitativní hodnocení bioptických vzorků kosti, např. pro objem osteoidu, šířky trabekul).

ZÁVĚR

Na základě experimentální studie porovnávající zastoupení červené kostní dřevě u miniinvasivně odebraných štěpů z oblastí velkého trochanteru, distálního femuru a proximálního humeru jsou tyto vzorky srovnatelné se štěpy z lopaty kosti kyčelní. Štěpy odebrané z proximální tibie a proximální ulny vykazují mizivé

zastoupení červené kostní dřevě a pro klinickou praxi je jejich použití sporné. Přínos naší experimentální studie pro léčbu je nutné zhodnotit v studii klinické.

Literatura

1. Anděl J. Matematická statistika. Nakladatelství technické literatury, Praha, 1985.
2. Engelstad ME, Morse T. Anterior iliac crest, posterior iliac crest and proximal tibia donor sites: a comparison of cancellous bone volumes in fresh cadavers. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68:3015-3021.
3. Guarnieri R, Belleggia F, Devillier P, Testarelli L. Histologic and histomorfometric analysis of bone regeneration with bovine grafting material after 24 months of healing. A case report. *J Funct Biomater.* 2018;9:48.
4. Jelínek R. Histologie, embryologie. Oddělení histologie a embryologie 3. lékařské fakulty UK v Praze, Praha, 2013.
5. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology text and atlas. 11th Edition. Appleton & Lange, New York, 2005.
6. Lim CT, Ng DQ, Tan KJ, Ramruttun AK, Wang W, Chong DY. A biomechanical study of proximal tibia bone grafting through the lateral approach. *Injury.* 2016;47:2407-2414.
7. Patterson TE, Boehm C, Nakamoto C, Rozic R, Walker E, Muschler GF. The efficiency of bone marrow aspiration for harvest of connective tissue progenitors from the human iliac crest. *J Bone Joint Surg Am.* 2017;99:1673-1682.
8. Schottel PC, Warner SJ. Role of bone marrow aspirate in orthopedic trauma. *Orthop Clin North Am.* 2017;48:311-321.

Korespondující autor:

MUDr. Pavel Látal
U Lučního jezu 1712/6B
370 01 České Budějovice,
E-mail: p.latal33@seznam.cz