

# Stručné morfometrické poznámky k heterogenitě lymfocytů periferní krve („minireview“ s vlastními výsledky)

**Smetana K.**

Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha

## Souhrn

Morfometrie nukleolů v lymfocytech at' již měřená, či odhadem, v kombinaci s cytochemickými a moderními morfologickými metodami, by mohla mít i v současné době svůj význam při posuzování stavu vyšetřovaných buněk *in situ*, tj. i lymfocytů na roztěrových, či cytospinových preparátech. U roztěrových a cytospinových preparátů jsou však měřené hodnoty rozdílné v závislosti na rozprostření vyšetřovaných buněk.

**Klíčová slova:** morfometrie nukleolů v lymfocytech

## Summary

**Smetana K.** Short morphometric notes to the heterogeneity of lymphocytes in the peripheral blood („a minireview“ with own original results)

At present, both estimated or exactly measured nucleolar morphometry combined with cytochemical and up-to-day morphological procedures might be very useful for evaluating the state of investigated cells such as lymphocytes *in situ*. However, depending on the cell spreading, the measured values may be different in smear and cytopspin preparations.

**Key words:** nucleolar morphometry in lymphocytes

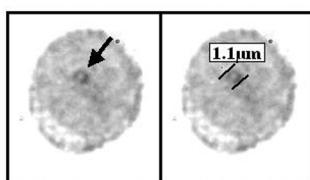
*Transfuze Hematol. dnes, 16, 2010, No. 2, p. 89–91.*

Morfologická i funkční heterogenita lymfocytů lidské periferní krve je obecně známa a je nejen dána jejich původem, ale i stupněm jejich diferenciace a maturace. Na druhé straně je méně známo, že může být i podmíněna stadiem jejich buněčného cyklu (1) i když při hodnocení na krevních nátěrech a cytospinech po panoptickém barvení se lymfocyty v různé fázi buněčného cyklu nejvíce příliš odlišně. Nukleoly jsou jedním ze spolehlivých ukazatelů lymfocytární aktivity, který není příliš závislý na roztěrové technice díky jejich relativně vysoké mechanické odolnosti pro vysoký obsah nukleových kyselin a proteinů při zhotovování roztěrových a cytospinových preparátů (2). Nevýhodou je však to, že ve zralých lymfocytech, na panopticky barvených krevních roztěrech nejsou nukleoly zpravidla viditelné, neboť jsou většinou překryty jadernou chromatinovou strukturou. Tato nevýhoda je snadno odstranitelná vizualizací nukleolů jednoduchou cytochemickou metodou pro demonstraci RNA silně zředěným roztokem methylenové, či toluidinové modré McIlvainovým nárazníkem o pH 5,3, který obsahuje kyselinu citronovou (3, 4). Kyselé pH a kyselina citronová zabírá mj. extrakci RNA endogenní ribonukleázou a proto jsou náčery a cytoplasy po uschnutí barveny bez předchozí fixace. Při této příležitosti je nutné poznamenat, že chromatin (DNA) není zbarven a z nukleolů pozitivitu dávají jen nukleolární těla (nucleolar bodies) bez perinukleolárního chromatinu (obr. 1–4). Tato technika také umožňuje lehké zbarvení jádra jako pozadí nukleolů. Může však být užita jen na suchých krevních nátěrech a cytospinech do 24 hodin po jejich zhotovení. Na takto zpracovaných nátěrech je zcela postačující měření průmě-

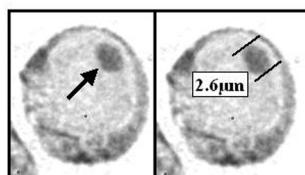
ru nukleolů, resp. nukleolárních těl bez dalších výpočtů jejich objemu (5). V následujícím pojednání pro snadný přehled bude užíván termín nukleoly i když ve skutečnosti bude pojednáváno o nukleolárních tělech bez perinukleolárního chromatinu.

Průměr nukleolů může být měřen přímo měřítkem vloženým do okuláru mikroskopu po stanovení hodnoty délky stupnice po jejich výpočtu srovnáním s délkou na objektivním mikrometru (6). V současné době průměr nukleolů lze určit nepřímo na obraze zachyceném digitální kamerou s následným měřením na obrazovce počítače vybaveného příslušným programem (kupř. ref. 5). Tento poslední typ měření je optimální a to zvláště jestliže je obraz buňky, resp. nukleolu, dostatečně zvětšen. Měření na „klasických“ mikrofotografích již není prakticky užíváno. Je totiž zatíženo několika možnými chybami při pořizování negativu s následným kopírováním obrázku z negativu. Na druhé straně je však vhodné poznamenat, že i odhad velikosti zkušeným hodnotitelem náčelu či cytoplasmu může být užitečný. Průměr prsténitých nukleolů ve zralých lymfocytech se totiž pohybuje kolem 1 µm (viz níže, obr. 1, 2) a slouží jako základ pro srovnávání s většími či menšími nukleolami.

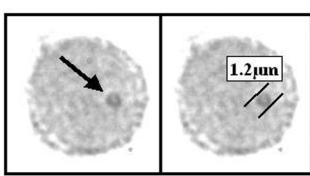
Na roztěrových preparátech je střední hodnota průměru nukleolů v lymfocytech zdravých osob, tj. dárců krve  $1,2 \pm 0,1$  µm (5). Histogram pak ukázal, že průměr největšího počtu nukleolů ( $77,4 \pm 5,1$  %) se pohybuje mezi 0,9 a 1,5 µm. Střední hodnota nukleolů v lymfocytech na cytospinových preparátech je však nižší ( $1,0 \pm 0,2$  µm), i když byly tyto buňky měřeny na jejich periferii, která se blíží rozprostřením roztěrovým preparátům. Podle his-



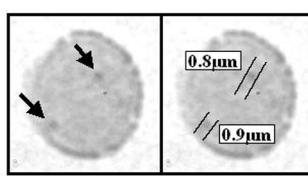
Obr. 1



Obr. 3



Obr. 2



Obr. 4

**Obr. 1.** Zralý lymfocyt s prsténčitým jadérkem (šípka). Periferní krev – dárce krve.  
**Obr. 2.** Zralý lymfocyt s prsténčitým jadérkem (šípka). Periferní krve nemocného s B-CLL.

**Obr. 3.** Stimulovaný lymfocyt s velkým jadérkem (šípka) v blastické transformaci fytohemaglutininem.

**Obr. 4.** Zralý lymfocyt s mikronukleoly (šipky). Periferní krev nemocného s B-CLL.

togramů průměr většiny nukleolů se pohyboval mezi 0,7 a 1,1  $\mu\text{m}$ . Při provedené korekci přičtením rozdílu mezi průměrnými hodnotami na roztěrových a cytospinových preparátech se však rozdíl vyrovnává a střední hodnota průměru by opět činila 1,2  $\mu\text{m}$ . Podle histogramu průměr většiny nukleolů v lymfocytech ( $68,7 \pm 6,3 \%$ ) by se opět pohyboval mezi 0,9 a 1,5  $\mu\text{m}$  i když jejich zašroupení na roztěrových a cytospinových preparátech je rozdílné.

Heterogenita „zralých lymfocytů“ s hrubou chromatinovou strukturou by mohla být podmíněna i rozdílem jejich stavu v buněčném cyklu. Většina lymfocytů s nukleolárním průměrem mezi 0,9–1,5  $\mu\text{m}$  je patrně v G0/G1 fázi buněčného cyklu. Podle předchozích studií takové buňky v této fázi buněčného cyklu obsahují jen malé nukleoly (1, 7). Nadto tyto nukleoly bez ohledu zda jsou v T, či B lymfocytech, mají prsténčitý charakter (obr. 1, 2) a jsou odrazem snížené transkripce RNA (viz 8, 9). Větší nukleoly s průměrem nad 1,5  $\mu\text{m}$  pak jsou charakteristické pro stimulované lymfocyty v dalších fázích buněčného cyklu, tj. v pozdní G1, S a G2 fázi (kupř. ref. 10). Takové nukleoly ztrácí také prsténčitý charakter (obr. 3) a jejich průměr se zvyšuje. Kupř. 6 hodin po stimulaci T lymfocytů fytohemaglutininem (časná G1 fáze) jejich průměr je 1,7  $\mu\text{m}$  a v dalších fázích buněčného cyklu dosahuje hodnot až nad 2  $\mu\text{m}$ . Jestliže se pohyboval u nestimulovaných lymfocytů podle histogramu průměr většiny nukleolů mezi 0,9 až 1,5  $\mu\text{m}$ , pak u stimulovaných lymfocytů přesahoval průměr většiny jadérek ( $78,5 \pm 1,5 \%$ ) 2  $\mu\text{m}$ . Stimulované lymfocyty se transformují v blasty s velkými nukleoly, ve srovnání s klidovými buňkami s prsténčitými jadéry, jsou charakterizovány mnohonásobnou transkripcí rRNA (viz 2, 11, 12). Ostatně velikost nukleolů odpovídá jejich aktivity (13).

Malé nukleoly – mikronukleoly – s průměrem menším než 0,9  $\mu\text{m}$  na nátěrech, resp. 0,7  $\mu\text{m}$  na cytospinech, jsou charakteristické pro terminální lymfocyty (8) za předpokladu, že jsou jediným typem nukleolů v těchto buňkách (obr. 4). V mikronukleolech je transkripce RNA zastavena. Procento mikronukleolů v lymfocytech zpravidla nepřesahuje 15 %. Mikronukleoly přítomné v jádrech lymfocytů vedle větších prsténčitých jadérek, nebo ještě větších jadérek s relativně uniformní distribucí RNA, představují satalitní nukleoly. Ty představují „reverzibilně odložené“ nukleolární organizátory mimo hlavní jadérko (8).

Z předchozího vyplývá, že velikost nukleolů může být užitečným vodítkem při posuzování lymfocytů na nátěrech či cytosinech, a to nejen u zdravých osob, ale i za patologických stavů. Může napovědět, zda a kolik lymfocytů je v klidovém či „aktivovaném“ stavu včetně proliferace. Důležité je také to, že lze hodnotit i jednotlivé buňky. Metoda k vizualizaci jadérek je velmi jednoduchá a lehce zvládnutelná. K hodnocení jejich velikosti často postačí i velmi jednoduchý metodický přístup bez potřeby vyjadřování v absolutních hodnotách, resp. jednotkách. Je však samozřejmé, že optimální je měření přímo v  $\mu\text{m}$  na digitálně zpracovaném obrazu na počítačové obrazovce za užití příslušného programu (kupř. ref. 5). U nemocných s různým typem chorob včetně leukemí může být průměr jadérek lymfocytů velmi odlišný v závislosti na chorobě a stavu nemocného. Je nezbytné mít na paměti, že vystihuje stav nukleolární transkripce a tím i jednotlivých lymfocytů bez ohledu na jejich původ. Kupříkladu u nemocného s B-CLL bez cytostatické léčby při přijetí k hospitalizaci, střední hodnota průměru nukleolů v lymfocytech byla jen lehce zvýšená, avšak histogram ukázal snížení procenta nukleolů s průměrem 0,9–1,5  $\mu\text{m}$  svědčící o nárustu buněk v jiné fázi cyklu než G0/G1. Je také známo, že velikost nukleolů může být ovlivněna různými léky včetně cytostatik, at' již jde o leukemické, či neleukemické lymfocyty (14–18). Není bez zajímavosti, že velikost nukleolů v lymfocytech se také mění v závislosti na cirkadiánním rytmu (19).

## Literatura

- Gani R. The nucleoli of cultured human lymphocytes I. Nucleolar morphology in relation to transformation and the DNA cycle. *Exp Cell Res* 1976; 97: 249–258.
- Busch H, Smetana K. The nucleolus. New York, Academic Press, 1970.
- Ochs RL. Methods used to study structure and function of the nucleolus. *Methods in Cell Biol* 1998; 53: 303–321.
- Smetana K, Lejnar J, Potměšil M. A further contribution to the demonstration of RNA and nucleoli of blood cells in smear preparations. *Folia Haematol* 1969; 91: 381–384.
- Smetana K, Jirásková I, Otevřelová P, Kalousek I. The RNA con-

- tent of nucleolar bodies is related to their size – a cytochemical study on human monocytes and lymphocytes in blood smears and blood cytopsins. *Folia Biol* 2008; 54: 130-133.
6. Wolf J. Mikroskopická technika. Praha, SZN, 1954.
  7. Schnedel W, Schnedel M. Nuckleoluszahl und grösse während des Zellzyklus. *Z Zellforsch* 1972; 126: 374-382.
  8. Smetana K. Nucleoli in blood cells of hematologic malignancies (structure, cytochemistry of nucleoli in leukemic, lymphoma and myeloma cells. In: Romero R.M. Trends in Leukemia Research. Hauppauge, Nova Science Publishers, 2005; 155-179.
  9. Smetana K, Lejnar J, Šálková J. Studies on nucleoli in rosetting T and B lymphocytes of the human peripheral blood. *Folia Haematol* 1980; 107: 720-727.
  10. Smetana K, Jirásková I, Otevřelová P, Kalousek I. On the nucleolar and cytoplasmic RNA density during cell dedifferentiation represented by blastic transformation of human mature T lymphocytes – a cytochemical study. *Folia Histochem Cytopiol* 2008; 46: 429-432.
  11. Rubin A. Defective control of ribosomal RNA processing in stimulated leukemic lymphocytes. *J Clin Inv* 1971; 50: 2485-2497.
  12. Torelli U, Quaglino D, Artusi T, Emilia G, Ferrari G, Mauri C. An autoradiographic study of the RNA and protein metabolism of normal plasma cells and phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes. *Exp Cell Res* 1966; 42: 1-9.
  13. Derenzini M, Farabegoli F, Trére D. Relationship between interphase AgNOR distribution and nucleolar size in cancer cells. *Histochem J* 1992; 24: 951-956.
  14. Kopeč J, Sitarska E, Laszko B. Nucleoli in peripheral blood lymphocytes of patients with chronic lymphocytic leukemia treated with cytostatic drugs. *Arch Immunol Ther Exp* 1983; 31: 481-487.
  15. Malacarne P, Marzola M, Santini A, Nielsen I. Nucleogram variations in circulating lymphocytes after chemotherapy. *Folia Biol* 1986; 32: 349-353.
  16. Malacarne P, Marzola M, Santini A, Indelli M. Effects of two different hydrocortisone doses on human peripheral blood lymphocyte nucleogram. *Folia Biol* 1989; 35: 13-18.
  17. Matějková E, Vlastiborová A. Qualitative and quantitative changes of nucleoli in lymphocytes of cancer patients during cytembena or cyclophosphamide treatment. *Neoplasma* 1973; 20: 517-523.
  18. Smetana K, Rosa L, Šubrtová H, Ochs R. Further studies on satellite nucleoli of lymphocytes of patients suffering from B chronic lymphocytic leukemia. *Int J Tissue Reac* 1994; 16: 181-185.
  19. Berger J, Berger Z. Circadian rhythm of the lymphocyte nucleolar area. *Comp Clin Path* 2004; 12: 187-190.

**Poděkování**

*Autor by chtěl vyjádřit poděkování všem, kteří umožnili soustavná studia nukleoli v krevních buňkách. Předložené pojednání bylo částečně podpořeno Min. zdrav. VZ 0002373601.*

*Prof. MUDr. Karel Smetana, DrSc.  
Ústav hematologie a krevní transfuze  
U nemocnice 1  
128 20 Praha 2  
e-mail: karel.smetana@uhkt.cz*

*Doručeno do redakce: 15. 12. 2009*

*Přijato po recenzi: 18. 1. 2010*

## Vzdělávací akce IPVZ

Subkatedra hematologie a transfuzního lékařství

ÚHKT, U Nemocnice 1, 128 08 Praha 2

Vedoucí: doc. MUDr. Jaroslav Čermák, CSc., tel. 224 962 839, fax 224 962 857, e-mail: jaroslav.cermak@uhkt.cz

### Subkatedra hematologie a transfuzního lékařství

#### 209202103 Kombinovaná specializační odborná stáž a kurz v hematologii a transfuzní službě

Určeno pro lékaře ve specializační přípravě k atestaci v oboru hematologie a transfuzní služba.

Program: Základy oboru v rozsahu potřebném k atestaci.

Zaměření na speciální problematiku, která není běžně dostupná v terénní praxi.

Novinky v oboru. Praktický výcvik kombinovaný s tematicky vázanými semináři.

Školitel: doc. MUDr. J. Čermák, CSc.,

MUDr. H. Klamová, CSc.

Místo konání: Praha 2, U Nemocnice 1, ÚHKT

Předpokládaná cena: 10 000 Kč

11. 10. 2010 – 22. 10. 2010