proLékaře.cz | 22.11.2026

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 ať 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 cytospin preparations.
Key words: nucleolar morphometry in lymphocytes

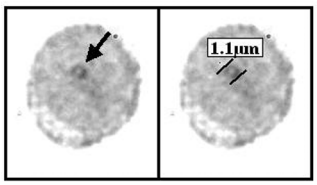
Transfuze Hematol. dnes, 16, 2010, No. 2, p. 89–91.

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 nejeví 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 modře McIlvainovým nárazníkem o pH 5,3, který obsahuje kyselinu citronovou (3, 4). Kyselé pH a kyselina citronová zabraňuje mj. extrakci RNA endogenní ribonukleázou a proto jsou nátěry a cytospiny 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 průměru 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.

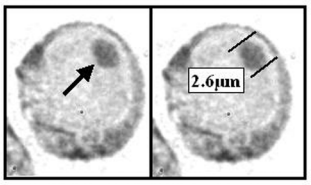
Průměr nukleolů může být měřen přímo měřítkem vloženým do okuláru mikroskopu po stanovení hodnoty dílků stupnice po jejich výpočtu srovnáním s dílky na objektivním mikrometru (6). V současné době průměr nukleolů lze určit nepřímo na obraze zachyceném digitální kamerou s následným měřením na obrazovce 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“ mikrofotografiích 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 nátěru či cytospinu může být užitečný. Průměr prsténčitých 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 nukleoly.

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

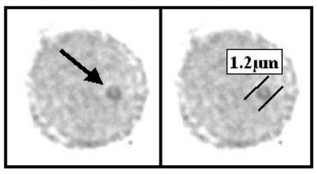
proLékaře.cz | 22.11.2026



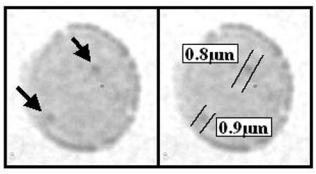
Obr. 1



Obr. 3



Obr. 2



Obr. 4

Obr. 1. Zralý lymfocyt s prsténčitým jadérkem (šipka). Periferní krev – dárce krve.
Obr. 2. Zralý lymfocyt s prsténčitým jadérkem (šipka). Periferní krve nemocného s B-CLL.
Obr. 3. Stimulovaný lymfocyt s velkým jadérkem (šipka) 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 µm. 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 µm. Podle histogramu průměr většiny nukleolů v lymfocytech (68,7 ± 6,3 %) by se opět pohyboval mezi 0,9 a 1,5 µm i když jejich zastoupení 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 µm 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 µm 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 µm a v dalších fázích buněčného cyklu dosahuje hodnot až nad 2 µm. Jestliže se pohyboval u nestimulovaných lymfocytů podle histogramu průměr většiny nukleolů mezi 0,9 až 1,5 µm, pak u stimulovaných lymfocytů přesahoval průměr většiny jader (78,5 ±1,5 %) 2 µm. Stimulované lymfocyty se transformující v blasty s velkými nukleoly, ve srovnání s klidovými buňkami s prsténčitými jadérky, jsou charakterizovány mnohonásobnou transkripcí rRNA (viz 2, 11, 12). Ostatně velikost nukleolů odpovídá jejich aktivitě (13).

Malé nukleoly – mikronukleoly – s průměrem menším než 0,9 µm na nátěrech, resp. 0,7 µm 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 satelitní 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 µm na digitalizovaném obraze na počítačové obrazovce za užití příslušného programu (kupř. ref. 5). U nemocných s různým typem chorob včetně leukemií může být průměr jadérek lymfocytů velmi odlišný v závislosti na chorobě a stavu nemocného. Je nezbytné míti 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 µm svědčící o nárůstu buněk v jiné fázi cyklu než G0/G1. Je také známo, že velikost nukleolů může být ovlivněna různými léky včetně cytostatik, ať 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

1. 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.
2. Busch H, Smetana K. The nucleolus. New York, Academic Press, 1970.
3. Ochs RL. Methods used to study structure and function of the nucleolus. Methods in Cell Biol 1998; 53: 303-321.
4. 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.
5. Smetana K, Jirásková I, Otevřelová P, Kalousek I. The RNA con-

proLékaře.cz | 22.11.2026

tent of nucleolar bodies is related to their size – a cytochemical study on human monocytes and lymphocytes in blood smears and blood cytospins. 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. Hauppage, 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 Cytobiol 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 autoradiograpic 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 Therap Exp 1983; 31: 481-487.
15. Malacarne P, Marzola M, Santini A, Nielsen I. Nucleologram 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 nucleologram. 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 nukleolů v krevních buňkách. Předložené pojednání bylo částečně podpořeno Min. zdrav. VZ 00023736O1.

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