

# Hematologické analyzátoři Advia® a myeloperoxidázová reakce

J. Šebek

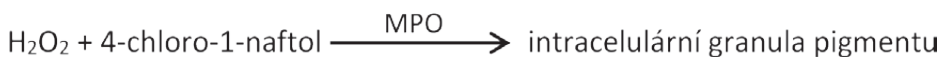
Analyzátoři krevních buněk Advia® řady 120, 2120, 2120i se oproti jiným vyznačují nekonvenčním přístupem v měření diferenciálního rozpočtu leukocytů. U přístroje na určení jednotlivých subpopulací vedle cytometrického proměřování buněk navíc participuje myeloperoxidáza (MPO) potažmo myeloperoxidázová reakce, díky které dokáže krvinky s jejím obsahem bezpečně odlišit od ostatních. Přesněji řečeno jde o neutrofilní granulocyty. Enzym totiž nutně potřebují k degradaci pohlceného materiálu. Tomu však nejdříve předchází jeho aktivace označovaná jako oxidativní vzplanutí, k níž dochází ihned po ingesci. Jen pro představu, literatura běžně uvádí, že přibližně 5 % hmotnosti neutrofilů bez započtení obsahu vody má na svědomí právě myeloperoxidáza a naopak troj až čtyřnásobně menším množstvím se vyznačují monocyty periferní krve. V lymfocytech již prakticky obsažena není.

Uvědomíme-li si, že příslušné typy leukocytů u některých pacientů nevykazují dostatečnou aktivitu tohoto enzymu, kterou by za fyziologických okolností měly mít, nabízí se nám hned dvě základní otázky. Jakým způsobem vlastně hematologický analyzátor atypické buňky respektive granulocyty vyhodnocuje. Zároveň je velkou neznámou, jaké patofyziologické mechanismy jev doprovází, jestli dokonce nejde o projevy buněčně podmíněného imunodeficitního stavu na podkladě defektu myeloperoxidázy. Právě takovým souvislostem budeme věnovat pozornost. Přesněji řečeno budeme věnovat pozornost takovým vzorkům, u nichž kvůli neproběhlé reakci přístroj v podstatě neutrofilní granulocyty falešně zařadil do populace velkých nebarvených buněk. Následná mikroskopická confirmace rozpočtu ovšem výsledky z automatu vyvrátila a naopak potvrdila, že buňky jsou z kvantitativního i kvalitativního hlediska až na případnou hypogranulaci cytoplazmy zcela ve fyziologických mezích.

## Princip měření diferenciálního rozpočtu

Než začneme problematiku myeloperoxidázové reakce podrobněji rozebírat, je zapotřebí si více přiblížit princip měření. Přístroj napřed celkový počet bílých krvinek vyhodnotí metodou bazofilů/lobularity. Buňky vyjma bazofilních granulocytů jsou příslušným činidlem zbarveny cytoplazmy, načež prochází průtokovou kvyetou, kde detektory díky sledování změn laserového paprsku ve dvou úhlech analyzují množství jader i počet nepozměněných bazofilů. Součet částic pak koresponduje s celkovým množstvím leukocytů ve vzorku.

Analyzátoři Advia® však v případě diferenciálního rozpočtu podrobnější informace o všech buněčných subtypech leukocytární řady získávají dalším proměřováním, a to jak fyzikálních, tak chemických parametrů krvinek. Nejprve v komůrce PEROX dochází k myeloperoxidázové reakci, při níž v reagentii obsažený 4-chlor-1-naftol za přítomnosti našeho enzymu evokuje vznik tmavě hnědého intracelulárního pigmentu, můžeme říci sraženiny. Její množství se přímou úměrou odvíjí od intracelulární aktivity enzymu (obr. 1). Následně vzorek zbarvený ostatními krvinkami putuje z komůrky do průtokové kvyety. Optickou část kvyety protíná světelný paprsek z halogenové žárovky, takže během průchodu jednotlivých buněk detektory sledují jeho úbytek současně s rozptylem. Právě rozptyl je nejvíce ovlivněn přítomností tmavých granul vzniklých myeloperoxidázovou reakcí, přičemž největší hodnotu rozptylu pak mají na svědomí neutrofilové. Eozinofily, které enzymem ve značné míře taktéž obsahují, zase korespondují s největším úbytkem světla. Zbylé mononukleární buňky systém již vyhodnocuje klasickou cytometrickou analýzou. Nicméně monocyty přeci jen nějakou MPO aktivitu vykazují, což s výhodou poslouží k jejich vyčlenění od populace lymfocytů. Nesmíme ale opomenout, že mezi lymfocyty jsou započítány i bazofily. Proto definitivní počet lymfocytů analyzátor zjistí teprve až po odečtení bazofilních granulocytů, které současně změřil kanálem bazofilů/lobularity, jak bylo uvedeno výše. Když všechny zmiňované parametry změří a dopočítá, získáme výsledky diferenciálního rozpočtu leukocytů. Současně hodnoty vynese do několika cytogramů s předem definovanými oblastmi čili gaty zohledňujícími velikost, morfologii



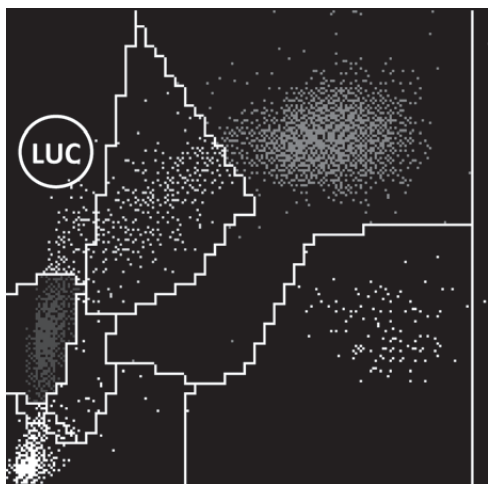
Obrázek 1: Chemická rovnice myeloperoxidázové reakce

i enzymatickou aktivitu buněk. V našem případě je pak směrodatný cytogram PEROX, neboť nejvíce koresponduje s průběhem myeloperoxidázové reakce (obr. 2).



**Obrázek 2: Cytogram perox s vyznačenými gaty (1-lymfocyty a bazofily, 2-monocyty, 3-neutrofilny, 4-eozinofily)**

Z principu nám tedy vyplývá, že ve všech případech, kdy selže myeloperoxidázová reakce ze strany buněk, přístroj musí nutně neutrofilní granulocyty vyhodnotit jako velké leukocyty s absencí granule potažmo MPO reakce. Proto jsou analyzátozem zařazeny do populace atypických buněk, kterým souhrnně říkáme velké nebarvené buňky (obr. 3). Taktéž nesou označení LUC podle původního termínu Large Unstained Cells. V podstatě jde o přímo



**Obrázek 3: Cytogram perox s vyznačeným gatem pro LUC**

měřený kanál, díky němuž analyzátor objektivně kvantifikuje přítomnost jakýchkoliv nestandardních krvinek ve vzorku. Pro úplnost informací si uvedeme obecně platný horní limit. Fyziologicky by neměly převyšovat 4 až 5 % z celkového počtu leukocytů.

### Parametry ke sledování aktivity MPO a jejich interpretace

Ač geneticky podmíněný defekt v syntéze myeloperoxidázy vykazuje poměrně nízkou prevalenci (tab. 1), nedostatečnost reakce při zpracování krevních obrazů paradoxně není tak vzácná, jak bychom se zprvu mohli domnívat. V subklinické formě, kdy u pacientů nepozorujeme žádné projevy imunodeficitního stavu, bývají enzymatické defekty dosti frekventované.

**Tabulka 1: Údaje o prevalenci geneticky podmíněného deficitu MPO**

Geografická oblast	Prevalence
Severní Amerika	1:2000
Evropa	1:4000
Asie a zvláště Japonsko	Několikanásobně vzácnější

Několik dohledatelných studií z přelomu osmdesátých a devadesátých let dokládá, že reakce standardně neprobíhá u jednoho z pětiset vyšetřovaných probandů. Avšak započítávají se sem i případy zprvu hůře rozpoznatelné respektive lehce opomenutelné. Právě abychom dokázali všechny sledovat, musíme věnovat pozornost nejen množství špatně klasifikovaných granulocytů čili hodnotě LUC a to nejlépe v absolutních počtech, ale také myeloperoxidázovému indexu neboli MPXi, jenž se zdá být mnohem užitečnějším ukazatelem. Prakticky vypovídá o reálné intenzitě reakce naměřené u vzorku. Index, který je bezrozměrným číslem, přístroj vyhodnocuje jakožto doprovodný parametr automaticky a vypočítává jej podle následujícího vzorce (obr. 4). Hodnota označovaná jako aktivita MPO u neutrofilů koresponduje s reálně naměřenou aktivitou enzymu v gatě pro neutrofilní granulocyty, přičemž nepřímě vychází z údaje kanálu NEUT X. Očekávaný index barvení dosazovaný do výpočtu je zase konstantou, která byla zjištěna výrobcem po dlouhodobém sledování intenzity kanálu NEUT X, ale u vzorků zdravých osob. Bohužel český ani anglický manuál nepopisuje vzorec nejpřesněji. Dokonce nabádá k dojmě, že první hodnota ve výpočtu souvisí jen s počtem neutrofilních granulocytů ve vzorku a ne s naměřenou intenzitou reakce.

$$\text{MPXi} = \frac{\text{aktivita MPO u neutrofilů} - \text{očekávaný index barvení}}{\text{očekávaný index barvení}} \times 100$$

**Obrázek 4:** Vzorec pro výpočet myeloperoxidázového indexu

Parametrem MPXi se ke konci devadesátých let zabýval dr. Dolphe Kutter z Lucemburska, kde v místní nemocnici sledoval nahodile sestavenou skupinu pacientů. Přesněji řečeno jich bylo přes 170. Všem stanovil index a zároveň mikroskopicky skóroval myeloperoxidázovou aktivitu neutrofilů konvenční cytochemickou metodou. Z grafického vyjádření výsledků pak můžeme vyčíst skutečnost, že hodnota indexu opravdu koresponduje s reálným obsahem MPO (graf. 1). Dokonce byl stanoven i referenční interval indexu neparametrickou metodou díky skupině čítající přes 41 000 pacientů. Rozmezí MPXi se pohybuje od -10 do +10. Nicméně o patologicky významnějším snížení hovoříme spíše tehdy, pokud hodnota klesne alespoň pod -20 eventuálně ještě pod -30. Existují totiž dva způsoby klasifikace deficitu MPO, přičemž jeden za patologickou hodnotu pokládá výsledek od -20 a druhý teprve až od -30. Nicméně v podstatě jsou vzájemně analogické s minimálními rozdíly. Dokonce rozlišují čtyři stejné stupně enzymatického deficitu (tab. 2).

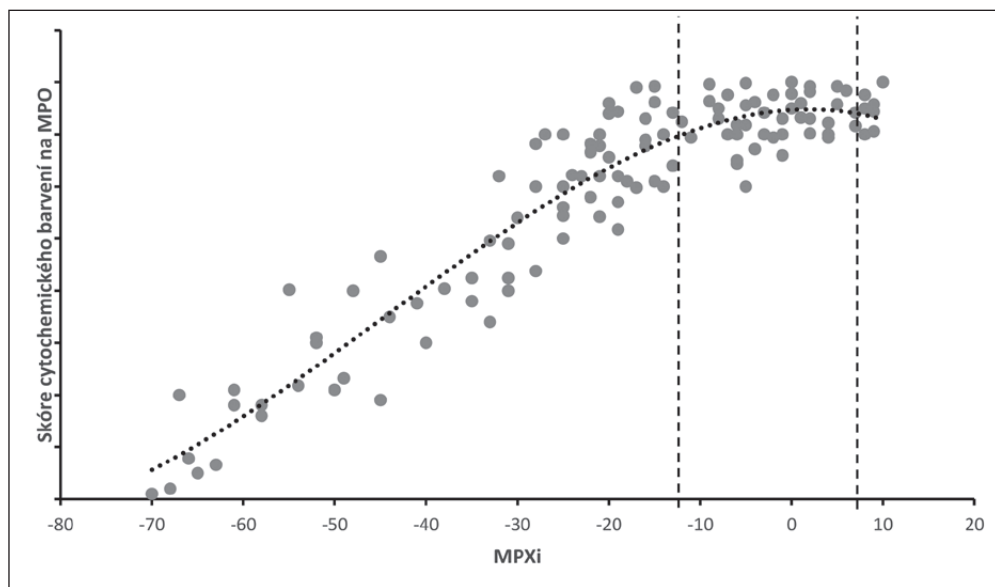
Co se týče interpretace, tak bychom si měli uvědomit několik následujících skutečností. Počty chybně zařazených neutrofilních granulocytů mezi velké nebarvené buňky prakticky tolik nesouvisí s myeloperoxidázovým indexem jakožto jediným

signifikantním ukazatelem aktivity našeho enzymu v neutrofilech. Snížené hodnoty MPXi u vzorků totiž nemusí být vůbec doprovázeny výrazněji zvýšenými počty LUC a přesně naopak. Imunodeficitní onemocnění na úrovni poškození mechanismů oxidativního vzplanutí, kdy připadá v úvahu subtotální nebo dokonce totální deficit MPO, bývá asociováno pouze s těmi nejnižšími hodnotami indexu. Ve všech ostatních případech fenomén falešně vysoké populace LUC nebo nižšího MPXi, řekněme až do -50, můžeme nahodile zjistit u široké škály pacientů napříč spektrem běžných chorob nehematologického původu nebo i u jinak zdravých osob.

### Příčiny buněčně determinovaného deficitu MPO

Přesvědčili jsme se, že výskyt nějaké formy parciálního potažmo subtotálního deficitu našeho enzymu, který obecně považujeme spíše za získaný, respektive sekundární než primární, je u pacientů poměrně častým jevem. Existují studie, které zmiňovanou skutečnost připisují na vrub několika hlavním faktorům. Uvedeme si jen ty více či méně prokázané.

Obvykle v patogenezi procesu zásadní roli sehrává buď autoimunitní onemocnění na podkladě zvýšeného titru autoprotilátek typu MPO-ANCA vůči



**Graf 1:** Hodnota MPXi v korespondenci s cytochemickým barvením na MPO

**Tabulka 2: Interpretace deficitu MPO podle hodnoty MPXi (oba způsoby interpretace)**

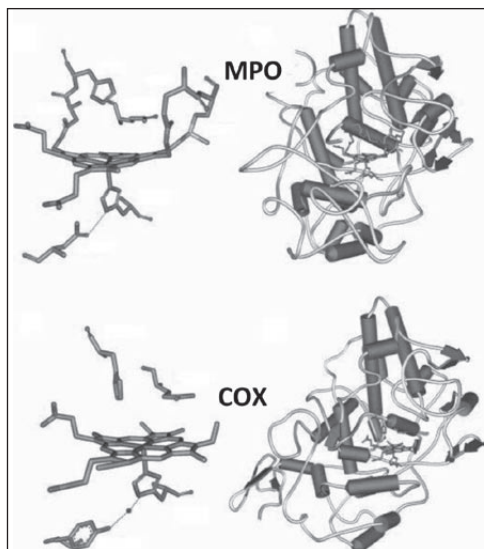
Interpretace	MPXi	MPXi
Lehký deficit	-11 až -20	-11 až -30
Parciální deficit	-21 až -50	-31 až -54
Subtotální deficit	-51 až -60	-55 až -60
Totální deficit	-61 a méně	-61 a méně

cytoplazmě neutrofilů, nebo když dochází k expozici organismu rozličným xenobiotikům zvláště pak určitým lékům při jejich systémové aplikaci. Nespecifickou interferenci myeloperoxidázy můžeme pozorovat především u antimetabolitů ze skupiny konvenčních cytostatik či virostatik. Také glukokortikoidy ve smyslu prednisonu nebo dexamethasonu, antibiotika tetracyklinového typu, eventuálně ještě preparáty k léčbě epilepsie (lamotrigin) mohou indukovat sekundární deficit myeloperoxidázy. Zatímco u těchto léčiv mechanismus působení není úplně objasněn, na buněčných modelech byla prokázána zcela specifická interference MPO vyvolaná nesteroidními antiflogistiky taktéž NSA (tab. 3).

**Tabulka 3: Léky ze skupiny NSA nejčastěji inhibující MPO**

Generický název	Obchodní název
Acetylsalicylová kyselina	Acylpyrin®, Aspirin®
Indometacin	Indometacin Berlin-Chemie®
Meloxicam	Artrilom®, Melocox®, Movalis®
Nimesulid	Aulin®, Nimesil®

Do vazby s naším enzymem totiž vstupují poměrně snadno. Sice primárně fungují jako antagonisté vůči cyklooxygenáze typu 1 případně 2 (COX-1, COX-2), nicméně oba enzymy mají s myeloperoxidázou velmi podobnou strukturu, jak dokládá ilustrace (obr. 5). Proto určitá frakce terapeutických molekul inhibuje současně i nějaké malé množství MPO. Takový vedlejší efekt je pak znatelnější u antagonistů pro COX-2. Jen pro úplnost informací si uvedeme, že cyklooxygenázy nesou odpovědnost za tvorbu prozánětlivých mediátorů z kyseliny arachidonové během rozvoje zánětu. Standardně se vyskytuje ve všech jaderných buňkách COX-1, ovšem při stresu dochází u buněk k indukované produkci COX-2, jejíž aktivita výrazněji prohlubuje patofyziologický proces v postižené tkáni.



**Obrázek 5: Porovnání molekulární struktury enzymů MPO a COX. Zdroj: www.researchgate.net**

## Literatura

- TESFA, Daniel, Marianne KEISU a Jan PALMBLAD. Idiosyncratic drug-induced agranulocytosis: Possible mechanisms and management. *American journal of hematology*. USA, 2009, 84(7), 428-434. DOI: 10.1002/ajh.21433.
- SMITH, William, David DEWITT a Michael GARAVITO. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. *Annual Review of Biochemistry*. USA, 2000, 69, 145-182. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.145.
- SIEMENS, Sektor Healthcare. Hematologické systémy Advia: Přehled technologií. 2008, 8 s.
- SIEMENS, Healthcare Diagnostics Inc. Advia 2120/Advia 2120i Hematology system: Příručka operátora. 2008, 489 s. 067D0270-01.
- PETRIDES, Petro a William NAUSEEF. The peroxidase multigene family of enzymes: Biochemical basis and clinical applications. Springer Science, 2000, 193 s. ISBN 3-540-67154-4.

- PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ. Hematologie a transfuzní lékařství I: Hematologie. Praha: Grada Publishing, 2011, 421 s. ISBN 978-80-247-3459-0.
- MURRAY, Robert K. Harperova Biochemie. 4. české vydání. Jinočany: H+H, 2002, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- LÜLLMANN, Heinz, Klaus MOHR a Lutz HEIN. Barevný atlas farmakologie. 3. vyd. Praha: Grada, 2007, 372 s. ISBN 978-80-247-1672-5.
- LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. Základní a aplikovaná farmakologie. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007, 672 s. ISBN 978-80-7262-373-0.
- KUTTER, Dolphe. Prevalence of myeloperoxidase deficiency: Population studies using Bayer-Technicon automated hematology. *Journal of Molecular Medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1998, (76), 669-675. DOI: 10.1007/s001090050266. Dostupné také z: <http://link.springer.com>
- KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. Barevný atlas biochemie. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012, 498 s. ISBN 978-802-4729-770.
- KETTLE, Anthony a Christine WINTERBOUM. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*. 1991, 41(10), 1485-1492. DOI: 10.1016/0006-2952(91)90565-M. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com>
- KAMAKSHI, Rao. Chapter 24.: Drug-Induced Hematologic Disorders. DIPIRO, Joseph a Robert TALBERT. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. 9. USA: McGraw-Hill Education, 2014, s. 359-374. ISBN 978-0-07-180053-2.
- JAROSLAV, Ráček. Myeloperoxidáza. *Klinická biochemie a metabolismus*. Česká lékařská společnost J. E. Purkyně, 2008, (4), 222-227. ISSN 1210-7921. Dostupné také z: <http://www.cskb.cz>
- HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005, 279 s. ISBN 80-725-4686-4.
- GIBBS, Graham. *Advia hematology systems: A guide to cytogram interpretation*. Second edition. USA: Lulu Press, 2014, 144 s. ISBN 978-1-291-93740-4.
- ANDREWS, Patricia a Norman KRINSKY. The reductive cleavage of myeloperoxidase in half: Producing enzymically. *The journal of biological chemistry*. 1981, (256), 4211-4218. ISSN 1083-351X.