

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

**VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU
PRO KLINICKÉ ÚČELY**

Bakalářská práce

Praha, 2008

Karla Bednářová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci citovány.

Děkuji Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi, CSc., za odborné vedení bakalářské práce. Rovněž děkuji Mgr. Jitce Šindelářové a paní Miladě Bolkové za cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Za podporu a inspiraci děkuji vrchní laborantce OKB FTNsP Ladislavě Oulické.

OBSAH

OBSAH	4
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 CHARAKTERISTIKA MOZKOMÍŠNÍHO MOKU	9
2.2 ODBĚR MOKU	10
2.3 CELULÁRNÍ SPEKTRUM V MOZKOMÍŠNÍM MOKU	11
2.3.1 BUŇKY LYMFOCYTÁRNÍ LINIE	12
2.3.2 BUŇKY MONOCYTÁRNÍ LINIE	13
2.3.3 BUŇKY MYELOIDNÍ LINIE – GRANULOCYTY	14
2.3.4 BUŇKY VÝSTELKY LIKVOROVÝCH CEST	15
2.3.5 NÁDOROVÉ BUŇKY	16
2.4 ZÁKLADNÍ CYTOLOGICKÉ OBRAZY	17
2.4.1 FYZIOLOGICKÝ NÁLEZ	17
2.4.2 TYPY PLEOCYTÓZY	18
3 PRAKTICKÁ ČÁST	20
3.1 FYZIKÁLNÍ VYŠETŘENÍ	20
3.1.1 ZABARVENÍ LIKVORU	20
3.1.2 ZÁKAL LIKVORU	20
3.2 CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ	21
3.2.1 POČÍTÁNÍ LIKVOROVÝCH ELEMENTŮ	21
3.2.2 TRVALÝ CYTOLOGICKÝ PREPARÁT	22
3.3 CHEMICKÉ VYŠETŘENÍ	23
3.3.1 STANOVENÍ BÍLKOVIN V LIKVORU	23
3.3.2 STANOVENÍ GLUKÓZY V LIKVORU	29
3.3.3 STANOVENÍ LAKTÁTU V LIKVORU	31
3.3.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU	33
4 ZÁVĚR	38
SOUHRN	36
SUMMARY	37
LITERATURA A PRAMENY	38
SEZNAM ZKRATEK	40
SEZNAM OBRÁZKŮ	41

1 ÚVOD

Pro normální činnost centrální nervové soustavy jsou nutné některé předpoklady. Jednou z mnoha takovýchto podmínek je prostá přítomnost likvoru, moku mozkomíšního, přičemž význam mozkomíšního moku je hned několikový. Zdravotnické učebnice (např. Fyziologie Prof. *Mourka*, 2005) popisují, že likvor představuje především základní mechanickou obranu mozku před otřesy, má ale i funkci nutritivní, spoluvytváří vnitřní prostředí centrální nervové soustavy a konečně má zřejmě i obranné funkce.

Za nejrůznějších patologických okolností dochází k četným onemocněním centrální nervové soustavy a ne vždy je okamžité určení správné diagnózy pro kliniku snadné. Z laboratorního vyšetření má zde obzvláštní důležitost především vyšetření mozkomíšního moku získaného nejčastěji lumbální punkcí.

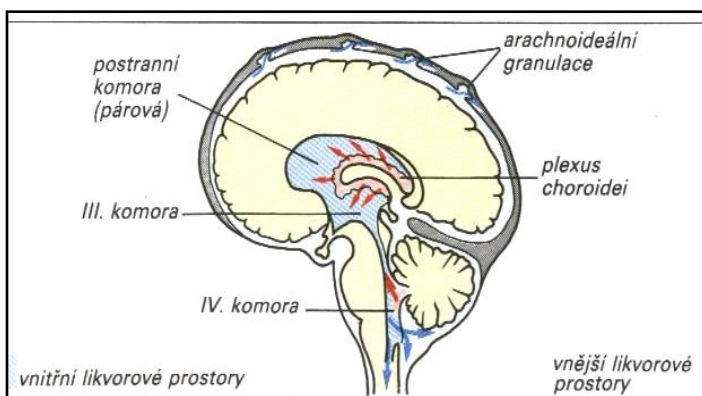
Jako historicky první lumbální punkci provedl Quinke roku 1891 u pacienta s hnisavou meningitidou. Komplexní laboratorní analýza likvoru se od té doby rozšířila opravdu značně. Soudě podle závěrů neurologů z různých publikací je relativně široké spektrum těchto vyšetření nenahraditelné zejména v diferenciální diagnostice neuroinfekcí, demyelinizačních onemocnění, dále při podezření na subarachnoidální krvácení a u nádorových onemocnění s infiltrací do likvorových prostorů; zpřesňuje ale i diagnostiku řady dalších onemocnění.

Tato práce s názvem „Vyšetření mozkomíšního moku pro klinické účely“ je prací rešeršní a kromě literaturou podložených teoretických faktů je zde uvedena i vlastní laboratorní práce s likvorem. Cílem práce je pokud možno přehledně shrnout poznatky v oblasti biochemického vyšetřování mozkomíšního moku a usnadnit jejich přehled především biochemikům – nelékařům, kteří s tímto výjimečným biologickým materiálem pracují.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 CHARAKTERISTIKA MOZKOMÍŠNÍHO MOKU

Likvor, mozkomíšní mok, je za fyziologických podmínek čirá a bezbarvá tekutina, která vyplňuje mozkové komory, subarachnoidální prostory a cisterny a vak plen v páteřním kanálu. O této kapalině se také někdy hovoří jako o „tekuté části centrálního nervového systému“. Celkový objem mozkomíšního moku je u dospělého člověka kolem 160 ml, u kojenců jde o množství zhruba



Obr. 1: Likvorové prostory mozku

(Silbernagl S., Despopoulos, A.: Atlas fyziologie člověka, 1993)

páteřního kanálu a centrálního kanálku míšního (Adam, 1995). U dospělého člověka dochází k denní produkci překvapivě velkého množství likvoru – a to až 600 ml moku. Likvor se vstřebává v Pacchionských granulacích, které vyúsťují do nitrolebních žilních splavů, a v perineutrálních štěrbinách mozkových a míšních nervů (Adam, 1995).

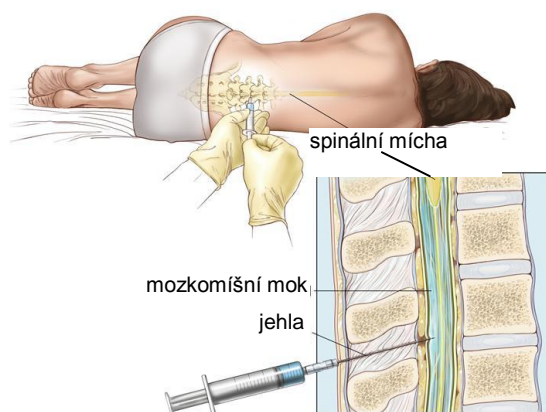
Mezi likvorem a okolními tkáněmi (jakož i krevní plazmou) probíhá intenzivní látková výměna, proto posouzení některých změn ve složení likvoru vyžaduje srovnání s poměry v krvi – jde např. o stanovení poměru albumin/IgG v séru a v likvoru (viz. dále). Propustnost bariéry mezi likvorem a krví se za patologických stavů mění.

Vyšetření mozkomíšního moku je pro stanovení diagnózy onemocnění nervového systému obzvláště důležité, neboť může přispět k odlišení zánětlivého procesu bakteriálního a virového, umožňuje sledovat účinnost terapie a do určité míry napomůže i odhadu prognózy onemocnění (Duniewicz, Adam, a kol., 1999).

50 ml.

K produkci likvoru dochází v chorioidálních plexech mozkových komor (viz. obr. 1), odtud likvor proniká přes Sylviov moko- vod do čtvrté komory, dále přes její strop na konvexitu hemisfér, do cisteren,

2.2 ODBĚR MOKU



Obr. 2: Provedení lumbální punkce

(dostupné z: http://www.cancer.gov/Templates/db_alpha.aspx?CdrID)

se zavede mezi obratli, obvykle mezi třetím a čtvrtým obratlem bederním. Vytékající likvor je jímán do zkumavky a poté se jehla z místa vpichu odstraní.

Splnění kritérií správné preanalytické fáze v oblasti odběru mozkomíšního moku vyžaduje užití přísně sterilních zkumavek bez jakýchkoliv činidel (Bořecká, 2006). Bezpodmínečně nutný je i včasný transport tohoto vzácného biologického materiálu do laboratoře – je známo, že např. počet buněk v likvoru je nutno stanovit nejpozději do jedné hodiny po odběru, neboť delším stáním se elementy rozpadají.

Z vlastní zkušenosti lze říci, že po odběru tekutiny mnohému napoví již posouzení příměsi krve v likvoru. Pro klinika je v některých případech důležité rozpoznat, zda se jedná o arteficiální příměs krve, způsobenou zraněním cév při nešetrné punkci, nebo o pravé krvácení do likvorových cest. Z tohoto důvodu by měl být mok odebírán do tří zkumavek – pokud se zbarvení postupně zmenšuje, jedná se o arteficiální příměs erytrocytů, naopak u pravého intermeningeálního krvácení zůstává intenzita červeného zbarvení neměnná.

Při samotné práci s mozkomíšním mokem je nutno v laboratoři postupovat obzvláště pečlivě a zodpovědně, neboť tuto vzácnou tekutinu, jejíž získání pomocí LP je nesporně invazivnější než rutinní venepunkce (především pro časté postpunkční obtíže u pacientů), není možno získat ani libovolně často ani v libovolně velkém množství.

2.3 CELULÁRNÍ SPEKTRUM V MOZKOMÍŠNÍM MOKU

Vyšetření mozkomíšního moku lze obecně rozdělit na vyšetření cytologické, biochemické, mikrobiologické a imunologické. Vzhledem k jeho velkému přínosu k diagnostice četných onemocnění různého charakteru by mělo být toto vyšetření pokud možno vždy kompletní.

Mozkomíšní mok je složen z části buněčné a tekuté, přičemž obě složky se analyzují pomocí nejrůznějších laboratorních metod. Rozmanitost buněčných typů, které se mohou v mozkomíšním moku za fyziologických i patologických okolností vyskytovat, není velká. Mezi likvorové elementy řadíme lymfocyty, monocyty, erytrocyty, granulocyty (neutrofilní, eozinofilní a bazofilní), makrofágy, buňky výstelky likvorových cest a buňky nádorové (*Glosová, 1998*).

Za normální situace se v moku vyskytují pouze tzv. **mononukleáry** – tedy jaderné elementy s nesegmentovanými jádry. Pod pojmem mononukleáry rozumíme celkem dvě populace buněk. Jde o elementy lymfocytární, zprostředkovávající imunobiologické děje na poli humorální i celulární imunitní odpovědi, a dále o elementy monocytární s jejich analogickými mezenchymálními formami, které jsou součástí monocyto-makrofagického systému, a jejichž úkolem je fagocytóza (*Duniewicz, Adam, a kol., 1999*).

Erytrocyty, jejichž zdrojem je měkká tkáň a žilní pleteně v páteřním kanálu, většinou nebývají početné. Důvodem jejich přítomnosti v likvoru je nevelké poranění tkáně při zavedení punkční jehly. Je-li příměs erytrocytů následkem nešetrně provedené LP masivnější, bývá doprovázena i průnikem granulocytů - především neutrofilů - do likvoru, neboť dle *Adama (2008)* v periferní krvi, která tímto do likvoru proniká, připadá na zhruba 700 erytrocytů 1 bílá krvinka.

Mimo arteficiální příměs krve je však přítomnost granulocytů vždy patologickým jevem (*Duniewicz, Adam, a kol., 1999*). Tyto leukocyty granulocytární řady jsou označovány pod souhrnným názvem **polynukleáry**, jsou děleny na neutrofilní, eozinofilní a bazofilní elementy se segmentovanými jádry, a za normálního stavu se tedy v likvoru nevyskytují.

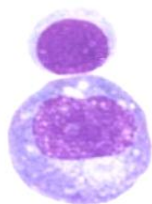
2.3.1 BUŇKY LYMFOCYTÁRNÍ LINIE

Elementy lymfocytární řady za fyziologického stavu tvoří nad ostatními elementy v likvoru početní převahu. Do této skupiny buněk řadíme lymfocyty, lymfoplazmocyty a plazmocyty. Obecně dochází za patologických okolností k aktivaci elementů lymfocytární řady ve velké lymfocyty, u buněk B-systému pak v lymfoplazmocyty a plazmocyty, jejichž úkolem je tvorba protilátek – v cytologických nálezech je tedy lze pozorovat zejména u chronických neuroinfekcí, u roztroušené sklerózy (dále jen RS), méně často i u jiných onemocnění (*Duniewicz, Adam, a kol., 1999*).

Malý lymfocyt je buňka o velikosti 8-10 μm s úzkým plazmatickým lemem a kompaktním jádrem, které vyplňuje většinu buňky (viz. obr. 3 nahoře). Tyto klidové formy buněk nacházíme v normálním mozkomíšním moku, ale abnormální záchyt malých lymfocytů v kvalitativním cytologickém obrazu při současně normálním počtu elementů v jednom mikrolitru likvoru bývá často u pacientů s chronickými záněty nervového systému a u demyelinizací (*Glosová, 1998*).

Aktivovaný lymfocyt (nebo také lymfoplazmocyt) je reaktivní lymfoidní buňka velká zhruba 13 - 18 μm s výraznou bazofilní plazmou a s velkým jádrem. Jejich nálezy bývají spjaté s akutním neurologickým onemocněním.

Plazmocyty jsou konečná stádia B-lymfocytů po aktivaci antigenem jsou největší lymfoidní buňky o velikosti až 21 μm (viz. obr. 3 dole). Plazmocyty mají rovněž bazofilní plazmu, jádro je většinou kulaté s patrnými jadérky a bývá uloženo excentricky (*Glosová, 1998*). Typické je u této buňky perinukleární projasnění plazmy.



Obr. 3: Malý lymfocyt
+ plazmocyt

(*Adam P., a kol.: Cytologie mozkomíšního moku, 2 000*)

Přítomnost a nálezy vysoce aktivovaných elementů B-systému (lymfoplazmocytů a plazmocytů), které se účastní tvorby protilátek a nemohou být zásadně v normálním likvoru přítomny, nutí vždy pomýšlet na chronicky probíhající zánětlivý či autoagresivní proces; při normálním počtu elementů nejčastěji u neuroboreliózy či RS (*Duniewicz, Adam, a spol., 1999*).

2.3.2 BUŇKY MONOCYTÁRNÍ LINIE

Elementy monocytární řady jsou funkční součástí monocyto-makrofágového systému. Je známo, že stejně jako jinde v organismu, je i v likvoru jejich úlohou fagocytóza s degradací pohlceného materiálu. Fyziologicky se v mozkomíšním moku vyskytují převážně klidové formy těchto buněk.

Mezi elementy monocytární řady zahrnujeme klidové monocyty, aktivované monocytární elementy, makrofágy a degenerativní formy elementů monocytární řady (Duniewicz, Adam, a spol., 1999).

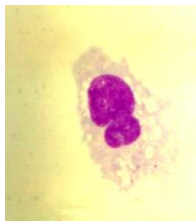
Monocyt (viz. obr. 4) je buňka o průměru 15-30 μm . Jádro je poměrně velké, uložené excentricky, tvaru podkovy, fazole, laloku nebo oválu. Cytoplazma je bohatá, šedomodrá, nebo kouřově zabarvená (Pecka, 2002). Okraj cytoplazmy bývá místy jakoby „vykousnutý“.



Obr. 4: Monocyt

(Adam P., a kol.: Cytologie mozkomíšního moku, 2 000)

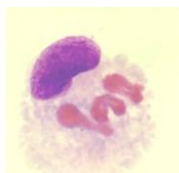
Aktivované monocyty (viz. obr. 5) jsou buňky s dobře viditelnou vakuolizovanou plazmou; mívají tendenci se shlukovat. Glosová (1998) se domnívá, že aktivaci monocytů může kromě antigenního podnětu stimulovat také například kontuze mozku, operační zásah, léková terapie či krvácení do mozku.



Obr. 5: Aktivovaný monocyt

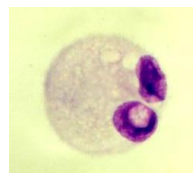
(Adam P., a kol.: Cytologie mozkomíšního moku, 2 000)

Makrofágy jsou aktivované monocyty s pohlceným materiálem. Dle fagocytovaného materiálu lze rozlišit různé typy makrofágů, např. erytrofágy u čerstvého intermeningeálního krvácení (viz. obr. 6), dále pak lipofágy – fagocytóza strukturálních lipidů CNS (viz. obr. 7), leukofágy u bakteriálních neuroinfekcí nebo tzv. „bakteriofágy“ – fagocytóza bakterií.



Obr. 6: Erytrofág

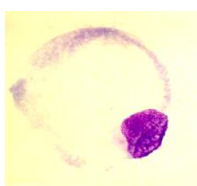
(Adam P., a kol.: Cytologie mozkomíšního moku, 2 000)



Obr. 7: Lipofág

(Adam P., a kol.: Cytologie mozkomíšního moku, 2 000)

Degenerativní formy elementů monocytární řady jsou buňky tvaru



pečetního prstenu (viz. obr. 8). Jde o elementy, jejichž velikost může dosahovat dokonce až 100 μm . Buňky mají bazofilní lem a jinak světlou cytoplazmu s periferně uloženým jádrem, které již bývá z části pyknotické.

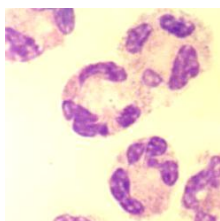
Obr. 8: Degenerativní forma monocytu

(Adam P., a kol.: *Cytologie mozkomíšního moku, 2 000*)

2.3.3 BUŇKY MYELOIDNÍ LINIE – GRANULOCYTY

Nález granulocytárních elementů v mozkomíšním moku je (kromě přítomnosti arteficiální příměsi krve v cytologických preparátech – viz. výše) vždy patologickým jevem. Mezi buňky myeloidní řady zahrnujeme granulocyty neutrofilní, eozinofilní a bazofilní.

Neutrofily jsou buňky o průměrné velikosti 30 μm (viz. obr. 9). Jádro je

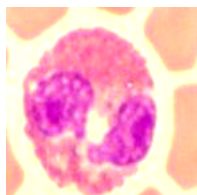


rozděleno na 2-5 částí = segmentů, které jsou spojeny můstky (Pecka, 2002). Tloušťka spojovacích vláken přitom nepřesahuje polovinu největší šířky jádra (rozišení segmentu od tyče). Cytoplazma těchto buněk je oxyfilní a jemně granulovaná (Pecka, 2002). Granulocyty mají také schopnost fagocytovat, např. bakterie. V mozkomíšním moku jsou z polynukleárů nejčastější a provázejí záněty především bakteriální etiologie.

Obr. 9: Neutrofil

(Adam P., a kol.:
Cytologie mozkomíšního moku, 2 000)

Eozinofily jsou o něco málo větší než neutrofilní segmenty. Jádro je

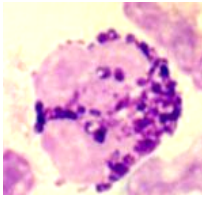


většinou rozděleno na 2 části (viz. obr. 10), které jsou spojeny nitkovitým můstkem. Cytoplazma je velmi světlá až bezbarvá a obsahuje eozinofilní zrna s bazickými proteiny (Pecka, 2002). V likvoru jsou tyto buňky poměrně vzácným nálezem; bývají uváděny nejčastěji u parazitárních onemocnění nervového systému.

Obr. 10: Eozinofil

(Adam P., a kol.:
Cytologie mozkomíšního moku, 2 000)

Bazofily jsou menší než oba předchozí segmenty. Jádro je nepravidelné až laločnaté, tvarem připomíná jetelový list (viz. obr. 11), cytoplazma má strukturu „plástve“. Výskyt těchto buněk je velmi vzácný a jejich význam pro diagnostiku neurologických onemocnění není dosud znám.



Obr. 11: Bazofil

(Adam P., a kol.: *Cytologie mozkomíšního moku*, 2 000)

2.3.4 BUŇKY VÝSTELKY LIKVOROVÝCH CEST

Nález buněk výstelky likvorových cest coby morfologicky dosti variabilních elementů ependymových, arachnotelových a buněk chorioidálních plexů (Duniewicz, Adam, a spol., 1999) je v likvoru poměrně častým nálezem, neboť zde dochází k jejich běžné obměně. Tyto buňky bývají v praxi těžko odlišitelné od buněk nádorových, jejich přesné určení proto vyžaduje dostatečnou zkušenost laboratorního pracovníka.

2.3.5 NÁDOROVÉ BUŇKY

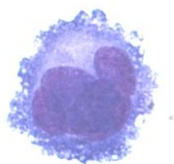
Nádorové buňky jsou v mozkomíšním moku bezesporu velmi významným nálezem. Pravděpodobnost výskytu nádorových buněk v likvoru záleží dle *Glosově (1998)* především na lokalizaci tumoru, jeho biologické povaze (benigní x maligní), na předchozí léčbě a v neposlední řadě také záleží na bezpečném odlišení maligních elementů od buněk nenádorové povahy.

Mezi všeobecně uznávaná kritéria malignity buněk v mozkomíšním moku patří především :

- značná velikost buněk
- tendence ke shlukování
- polymorfie jader
- hojně zastoupená velká jadérka
- časté dělení buněk
- objem plazmy je výrazně nižší než objem jádra.

Uvedená kritéria ovšem neplatí pro všechny typy nádorů současně a jsou tedy vždy jen vodítkem pro posuzování atypického cytologického nálezu (*Glosová, 1998*).

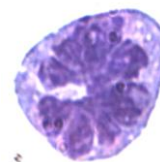
Duniewicz, Adam, a spol. (1999) popisují, že záchyt nádorových buněk bývá častý u hematologických malignit, při přítomnosti metastáz do mozku, v páteřním kanálu a při destrukci obratlových těl maligním procesem (viz. obr. 12 - 14). Podle nich mnohem častěji pocházejí nádorové buňky z extrakraniálních nádorů než z nádorů intrakraniálních.



Obr. 12: Maligní buňka
(Adam P., a kol.: *Cytologie mozkomíšního moku, 2 000*)



Obr. 13: Maligní meningeální infiltrace
(Adam P., a kol.: *Cytologie mozkomíšního moku, 2 000*)



Obr. 14: Maligní buňka hematogenní
(Adam P., a kol.: *Cytologie mozkomíšního moku, 2 000*)

2.4 ZÁKLADNÍ CYTOLOGICKÉ OBRAZY

Jak již bylo řečeno, skladba celulárního složení mozkomíšního moku za nefyziologických okolností umožňuje usuzovat na přítomnost chorobného stavu. Řada cytologických obrazů bývá pro konkrétní patologický proces často specifická, nezbytným předpokladem je však bezpečné odlišení jednotlivých buněk. Maximální eliminace potenciálního omylu tedy vyžaduje odborné a navýsost obezřetné hodnocení zkušeným pracovníkem laboratoře.

Pro kvantitativní vyhodnocení buněk v likvoru se v laboratořích klinické biochemie využívá zpravidla výhradně Fuchs-Rosenthalova komůrka, která je rozdělena trojitými čarami na 16 velkých čtverců, a má objem 3,2 μl . Počet buněk se běžně udává v 1 μl , tj. počet buněk v komůrce by se měl teoreticky vydělit třemi. To je však velmi nepraktické, protože ne vždy je celkový počet buněk takto dělitelný. Východiskem je vyjádření celkového počtu buněk pomocí zlomku (např. naší laboratoři uvedený údaj „18/3“ značí 18 buněk v celé komůrce a tedy 6 buněk v jednom μl). Za normální se považuje počet do 10-ti buněčných elementů v celé komůrce. Je-li zjištěný počet elementů vyšší, mluvíme o **pleocytóze** (zmnožení počtu buněk nad laboratorní normu), je-li naopak počet buněk menší, označuje se takový mok pojmem **oligocytární**. Při výskytu zcela normálního počtu buněk se současnou přítomností patologické skladby buněčných elementů se potom užívá název **patologická oligocytóza**.

2.4.1 FYZIOLOGICKÝ NÁLEZ

Normálnímu cytologickému obrazu odpovídá pouze několik lymfocytů, monocytů (zpravidla v klidové formě) a erytrocytů. Fyziologicky zde můžeme najít rovněž i buňky výstelky likvorových cest.

2.4.2 TYPY PLEOCYTÓZY

Přítomnost pleocytózy coby zvýšení počtu likvorových elementů lze v zásadě rozdělit dle toho, jsou-li v převaze elementy se segmentovanými či nesegmentovanými jádry, do dvou základních skupin – na pleocytózu mononukleární a na pleocytózu polynukleární. Mononukleární pleocytóza může být pak dále rozdělena dle převažujícího počtu typu mononukleárů na další dvě skupiny, a to na pleocytózu lymfocytární a pleocytózu monocytární.

- **Lymfocytární pleocytóza** je tvořena převážně elementy lymfocytárními s velmi často se vyskytujícími aktivovanými formami těchto elementů. Počet elementů zde dosahuje od několika desítek/3 do počtu okolo 1 000 buněk/3 – toto početní buněčné zastoupení v praxi vídáme nejčastěji. V případě nálezu tohoto typu pleocytózy lze podle *Duniewiczze, Adama, a spol. (1999)* v likvoru zaznamenat přítomnost plazmatických buněk, což svědčí o intratekální produkci imunoglobulinů – je tedy známkou chronicity přítomného zánětlivého procesu (např. chronické serózní neuroinfekce většinou virového původu, neuroborelióza, RS).
- **Monocytární pleocytóza** je vyznačována převahou elementů monocyto-makrofagického systému; lze zde tedy pozorovat jak klidové a aktivované elementy monocytární řady, tak i elementy makrofagické (buňky s pohlceným materiálem). Nenajdeme-li v cytologickém preparátu fagocytózu konkrétního materiálu, tento obraz bývá hodnotitelný obtížně. Monocytární pleocytóza se dle *Duniewiczze, Adama, a spol. (1999)* vyskytuje např. u onemocnění benigního charakteru (např. výhřezů meziobratlové ploténky), ale i tumorů postihujících CNS či páteřní kanál, u mozkových ischemií nebo po proběhlém intermeningeálním krvácení.

- **Polynukleární (granulocytární) pleocytóza** je nejčastěji tvořena převážným zastoupením neutrofilních granulocytů (segmentů). Tento nález je dosti specifický pro přítomnost bakteriálního zánětu (např. purulentní meningitidy). Celkový počet elementů je zde značný a dosahuje až několika desítek tisíc buněk/3. Daleko vzácnějším jevem je pleocytóza tvořená převahou eozinofilních granulocytů, kde ale bývá celkový počet elementů výrazně nižší. Takovýto obraz nacházíme nejčastěji u parazitárních nebo mykotických onemocnění.
Nález bazofilních granulocytů v likvoru je velmi výjimečný. Tyto elementy tedy nikdy netvoří převažující buněčnou populaci - obraz bazofilní pleocytózy není znám (*Adam, 1995*).
- O **smíšené pleocytóze** mluvíme tehdy, když početní převaha určité buněčné populace není až tak zřetelná. Bližší zařazení podobné pleocytózy bývá v praxi mnohdy dosti problematické.

Přítomnost patologické buněčné skladby likvoru při jinak normálním počtu likvorových elementů představuje tzv. **patologická oligocytóza**. Mezi typy patologické oligocytózy řadíme oligocytózu lymfocytární, monocytární, granulocytární a oligocytózu tumorózní. Určením převahy určité buněčné populace lze jednotlivé patologické oligocytózy určit, podrobný popis jednotlivých patologických oligocytóz však přesahuje obsahový rámec této práce.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Vyšetření mozkomíšního moku by mělo svým charakterem patřit do souboru statimových (akutních) vyšetření. Analýza likvoru na půdě biochemické zahrnuje zpravidla tzv. fyzikální zkoušky, zhotovení cytologických preparátů a dále chemické stanovení jednotlivých látek v moku.

3.1 FYZIKÁLNÍ VYŠETŘENÍ

Fyzikální vyšetření mozkomíšního moku znamená posouzení barvy a zákalu (*Doležalová, a kol., 1995*). Za fyziologických podmínek je likvor tekutina čirá a bezbarvá, připomínající svou konzistencí čistou vodu.

3.1.1 ZABARVENÍ LIKVORU

Příměs krve (arteficiální nebo při krvácení do likvorových cest) způsobuje narůžovělé až poměrně sytě červené zbarvení – erytrochromii. Zcela krvavý likvor nazýváme likvorem sanguinolentním. Odbouráváním hemoglobinu vzniká bilirubin, který zabarvuje likvor do žluta – tzv. xantochromie. Velmi vzácně lze pozorovat tmavošedivě zbarvený likvor (tzv. melanochromní) při metastázách maligního melanomu do CNS.

Vzhled barevného moku se hodnotí před i po jeho centrifugaci, stejně jako i zákal likvoru.

3.1.2 ZÁKAL LIKVORU

Při větším zmnožení buněčných elementů (pleocytóze) je v mozkomíšním moku patrný zákal různého stupně intenzity. Dle *Doležalové, a kol. (1995)* lze lehký zákal pozorovat například u tuberkulózní meningitidy, silný zákal potom například u meningitidy hnisavé. Mozkomíšní mok s takto značnou polynukleární pleocytózou bývá zakalený až bělavý a hustý.

3.2 CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

3.2.1 POČÍTÁNÍ LIVOROVÝCH ELEMENTŮ

Stanovení konkrétního počtu elementů v likvoru trvalý cytologický preparát nikdy neumožňuje. K tomuto účelu slouží příprava tzv. nativního preparátu. Na Oddělení klinické biochemie Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou (dále jen OKB FTNsP) provádíme zásadně zvlášť počítání erytrocytů v nativním nebarveném preparátu a zvlášť počítání jaderných elementů (mononukleárů a polynukleárů) v nativním preparátu obarveném. Je to proto, že roztok, který pro barvení užíváme, sice dobře znázorňuje jádra buněk, ale současně narušuje cytoplazmatické membrány erytrocytů. Tento barvicí roztok je směsí fuchsinu (2 g), fenolu (2 g), vody (2 ml) a 99%-ní kyseliny octové (90 ml), a pro naše potřeby je (stejně jako ostatní roztoky užívané k barvení – viz. dále) připravován interní nemocniční lékárnou.

Nativní preparát připravujeme smícháním 100 μ l nestočeného likvoru a 10 μ l roztoku kyselého fuchsinu ve zkumavce a opatrně protřepeme. Vzniklou směs necháme 10 minut stát a pipetou nanese do výše zmíněné Fuchs-Rosenthalovy (dále jen F-R) komůrky pod podložní sklíčko. Rozlišené mononukleáry (elementy s nesegmentovanými jádry) a polynukleáry (segmenty - elementy s jádry segmentovanými) jsou zkušeným laboratorním pracovníkem počítány vždy v celé komůrce pomocí mikroskopu značky CARL ZEISS - JENA (objektiv 20x = optický zoom 0,40 [20x / 0,40]).

Obdobně se ve F-R komůrce stanovuje i počet erytrocytů s tím rozdílem, že nenásilně promíchaný nativní likvor se pod podložní sklíčko F-R komůrky nanáší pipetou barevně neupravený.

3.2.2 TRVALÝ CYTOLOGICKÝ PREPARÁT

Zhotovení a vyhodnocení trvalého cytologického preparátu nás již velmi spolehlivě informuje o zastoupení jednotlivých buněčných populací (konkrétních typů buněk) v analyzovaném vzorku mozkomíšního moku.

Na OKB FTNsP je pracovní postup barvení cytologických preparátů takový, že určité množství nestočeného likvoru (toto množství mikrolitrů odvozujeme z celkového množství buněk ve F-R komůrce) napipetujeme do tzv. cytosedimentační komůrky, a necháme samovolně sedimentovat minimálně 15 - 20 minut. Po této době podložní sklíčko opatrně sejmete a takto připravený preparát přelijeme na dobu tří minut May-Grúnwaldovým barvivem (směs eosinu a methylenové modři – 1g, methanolu – 10 ml a glycerinu – 50 ml) s tím, že obsaženým methanolem je preparát zároveň i fixován. May-Grúnwaldův roztok ze sklíčka poté krátce převrstvíme cca 5 ml destilované vody a po zhruba jedné minutě vodu odstraníme nakloněním sklíčka. V druhé fázi preparát na 7 minut převrstvíme roztokem Giemsky-Romanowského, což je směs 5 ml destilované vody a zásobního roztoku (ten tvoří azurová směs bezvodá – 0,8 g, methanol – 250 ml a glycerin – 250 ml). Poté opět bohatě opláchneme destilovanou vodou a necháme důkladně oschnout. V konečné fázi řádně suchý preparát montujeme do bezvodého montovacího media – konkrétně do Entellanu (dodáván firmou Merck), který nejenže usnadňuje pozdější prohlížení buněk, ale umožňuje především i trvalé uchování preparátu.

Takto připravený cytologický preparát překryjeme krycím sklíčkem a prohlížíme v mikroskopu značky OLYMPUS BX 40 (objektiv 20x = optický zoom 0,40 [20x / 0,40] a objektiv 0,65 = [40x / 0,65]).

3.3 CHEMICKÉ VYŠETŘENÍ

3.3.1 STANOVENÍ BÍLKOVIN V LIKVORU

Kromě kvantitativního stanovení konkrétních bílkovin v mozkomíšním moku provádí OKB FTNsP také i kontrolní parametr - orientační globulinové zkoušky, a to reakcí Pandyho. Při této zkoušce odlijeme na hodinové sklíčko trochu Pandyho roztoku a do jejího středu pipetou kapku po kapce přidáváme celkem asi 100 μ l zcentrifugovaného likvoru. Pandyho roztokem, což je nasycený roztok fenolu ve vodě, jsou bílkoviny vysráženy. Dle intenzity vzniklého zákalu (způsobeného přítomností globulinů) potom zkoušku hodnotíme v arbitrárních jednotkách 0 - 4 takto :

- 0 : bez zákalové reakce
- 1 : slabý zákal
- 2 : silnější zákal
- 3 : silný bělavý zákal
- 4 : bílá sraženina (až tvarohovitého charakteru).

Při zmnožení globulinů bývá většinou zvýšena i koncentrace celkové bílkoviny v likvoru, neplatí to však absolutně (*Doležalová, a kol., 1995*).

Stanovení celkové bílkoviny

Ke zvýšení hladiny celkové bílkoviny v likvoru (dále jen CB) neboli proteinorachii dochází zásadně dvěma způsoby. Jde buď o přestup bílkovin ze séra při porušení hematolikvorové bariéry nebo k hyperproteino-rachii dochází vznikem alespoň některých složek (β , γ globulinů) přímo v CNS; tak je tomu např. u RS nebo u chronických neuroinfekcí. Za normální lze považovat u dospělého člověka hladinu CB v rozmezí 200 až 400 mg/l, u novorozenců je považována za fyziologickou ještě i hodnota 900 mg/l.

Stanovení proteinorachie provádíme na OKB FTNsP spektrofotometricky měřením absorpance (která je lineární funkcí koncentrace) likvoru předem zcentrifugovaného 10 minut při 3 000 otáčkách.

Principem reakce je metoda vazby barviva na bílkovinu, při které bílkoviny v likvoru tvoří s pyrogallolovou červení a molybdenanem sodným v kyselém prostředí červený komplex, vhodný k fotometrování při vlnové délce 600 nm.

Zcentrifugovaný likvor přemístíme do sterilní zkumavky; zde je nutné velmi šetrné odpipetování, aby nedošlo k opětovnému promíchání cíleně stočeného moku s jeho sedimentem, tj. jeho buněčnou částí. Ke stanovení používá naše laboratoř soupravu výrobce BioSystems. Množství mozkomíšního moku (CSF), destilované vody, kontroly a pyrogallolové červení (obojí je součástí setu) pipetujeme do zkumavek dle tabulky 1 :

Tab. 1: Stanovení CB

	blank	kontrola	CSF
destilovaná voda	20 µl	-	-
kontrola (standarda)	-	20 µl	-
CSF	-	-	20 µl
pyrogallolová červeně	1 ml	1 ml	1 ml

Po napipetování zkumavky dobře (avšak nenásilně) promícháme a necháme stát při laboratorní teplotě přesně 20 minut. Po této době vzorky ihned přemístíme do jednorázových plastových kyvet a provádíme měření absorbancí (dále jen A) tzv. „slepého pokusu“ – blanku, kontroly (o přesně známém množství stanovované látky) a samotného likvoru na spektrofotometru značky UNICAM HELIOS ve viditelné (dále jen VIS) oblasti elektromagnetického spektra.

Koncentraci celkové bílkoviny v jednotkách mg/l nakonec vypočítáme dle vztahu *koncentrace standardy* : $(A \text{ vzorku} / A \text{ standardy})$. Je třeba pracovat v přísně lineární závislosti, proto mozkomíšní mok, jehož koncentrace celkové bílkoviny překročí hodnotu 1 000 mg/l, ředíme v poměru 1 : 1 fyziologickým roztokem (0,9 %-ním) a výslednou koncentraci vynásobíme dvěma. Dle doporučení výrobce je maximální hodnotou CB v likvoru, kterou OKB FTNsP udává, koncentrace 2 500 mg/l.

Stanovení albuminu

Albumin je syntetizován výhradně mimo CNS a do likvoru se dostává přes hematolikvorovou bariéru i za fyziologických podmínek. Zvýšení jeho koncentrace v likvoru nad referenční mez, která se pohybuje v rozmezí 160 – 300 mg/l, však signalizuje poruchu funkce bariéry u nejrůznějších onemocnění CNS - dle *Doležalové, a kol. (1995)* např. u meningitid, encefalitid nebo tumorů. Pro posouzení porušené funkce hematolikvorové bariéry se obecně doporučuje využívat poměru albumin v likvoru/albumin v séru (viz dále).

Albumin v zcentrifugovaném mozkomíšním moku stanovujeme kvantitativně pomocí nefelometrického analyzátoru značky TURBOX. Principem reakce je imunoprecipitační reakce v kapalně fázi, kdy albumin (antigen - Ag) v likvoru reaguje s antisérem obsahujícím protilátku (Ab) proti albuminu za vzniku imunokomplexu dle schématu $Ag + Ab \longleftrightarrow [Ag-Ab]$. Výsledný rozptyl světla způsobený imunokomplexy je detegován nefelometricky a je přímo úměrný koncentraci albuminu ve vzorku.

Ke stanovení používáme komerční set výrobce Orion Diagnostica. Součástí setu je blankový roztok a kalibrátor (obojí již připraveno k použití) a dále roztok antiséra a pufr, které je nutno upravit smícháním. Mikrolitry biologického materiálu i chemikálií pipetujeme do kyvet dle tabulky 2 :

Tab. 2: Stanovení albuminu

	kalibrátor		CSF		kontrola	
	blank	test	blank	test	blank	test
CSF	-	-	20 µl	20 µl	-	-
kalibrátor	20 µl	20 µl	-	-	-	-
kontrola	-	-	-	-	20 µl	20 µl
blank/pufr	500 µl	-	500 µl	-	500 µl	-
antisérum	-	500 µl	-	500 µl	-	500 µl

Vzniklé roztoky důkladně promícháme, necháme stát při laboratorní teplotě 30 minut a provádíme vlastní měření.

Pokud je výsledná koncentrace likvorového albuminu vyšší než 160 mg/l, mozkomíšní mok ředíme 0,9 %-ním fyziologickým roztokem a výsledek vynásobíme násobkem odpovídajícím příslušnému ředění (ředíme maximálně do poměru 1 : 11).

Stanovení imunoglobulinů

Se zvýšením imunoglobulinů se setkáváme kromě porušené funkce hematoikvorové bariéry i u chronických neuroinfekcí nebo RS (intratekální syntéza). Zvýšení koncentrace imunoglobulinů v likvoru nad hodnotu 60 mg/l tedy může mít dvojí původ. Jde buď o lokální syntézu přímo v likvorovém prostoru, nebo je zdrojem zvýšení sérum, odkud imunoglobuliny při porušené hematoikvorové bariéře přecházejí. K určení zdroje původu imunoglobulinů se dá použít poměru imunoglobuliny v likvoru/imunoglobuliny v séru, - takto lze odlišit selektivní zvýšení imunoglobulinů jen v séru od selektivního zvýšení jen v likvoru (viz. dále). Za klinicky nejpřínosnější se obecně považuje stanovení imunoglobulinů třídy G (dále jen IgG), jejichž hladina se fyziologicky pohybuje v rozmezí 14 – 37 mg/l.

Obsah IgG stanovujeme rovněž pomocí nefelometru značky TURBOX. Principem reakce je tedy opět imunoprecipitační reakce v kapalně fázi, kdy IgG (antigen - Ag) v likvoru reaguje s antisérem obsahujícím protilátku (Ab) proti IgG za vzniku imunokomplexu dle schématu $Ag + Ab \longleftrightarrow [Ag-Ab]$. Výsledný rozptyl světla způsobený imunokomplexy je detegován nefelometricky a je přímo úměrný koncentraci IgG ve vzorku.

Ke stanovení používáme reagenční soupravu výrobce Orion Diagnostica, obsahující kalibrátor, blankový pufr, roztok antiséra a pufr. Chemikálie a vlastní vzorek (likvor - CSF) do měřících kyvet pipetujeme dle tabulky 3 :

Tab. 3: Stanovení IgG

	kalibrátor		CSF		kontrola	
	blank	test	blank	test	blank	test
CSF	-	-	50 µl	50 µl	-	-
kalibrátor	20 µl	20 µl	-	-	-	-
kontrola	-	-	-	-	20 µl	20 µl
blank/pufr	500 µl	-	500 µl	-	500 µl	-
antisérum	-	500 µl	-	500 µl	-	500 µl

Roztoky necháme inkubovat při laboratorní teplotě 30 minut a po této době provádíme vlastní měření. Pokud je výsledná koncentrace IgG v likvoru vyšší než 30 g/l, likvor ředíme v poměru 1 : 2 fyziologickým roztokem.

Poměr albumin / IgG

Odhad intratekální produkce IgG a funkčnost hemato-likvorové bariéry se dříve zjišťovaly na OKB FTNsP graficky. Nyní je zjišťujeme numericky výpočtem dle tzv. Reiberovy rovnice, a to na základě naměřených hodnot albuminu a IgG v séru a likvoru pomocí speciálního počítačového programu. Ten určí, zda je bariéra funkční či ne, a zda je přítomna intratekální syntéza IgG v mg/l (viz. obr. 15).

VYŠETŘENÍ PROTEINOVÝCH FRAKČÍ LIKVORU číslo:									
Jméno:					Rodné č.:				
Klin. dg:					Datum:				
Odd.:					Odbornost:				
IČZ:					Var. sym.:				
	CSF	stav	CSF(mg/l)	S(P)	stav	S(g/l)	Q(CSF/S)	hodnoty	stav
Imunoglobuliny	IgG		(12-40)		-	(7-15)		1,89 - 2,84	
	IgA		(0,2-3)		-	(0,8-4)		0,53 - 0,80	
	IgM		(0,2-2,5)		-	(0,4-2,6)		0,72 - 1,08	
Zánětlivé markery	CRP		(0-50)		N	(0-10)		0,16 - 0,24	
	Haptoglobin		(0,5-2,0)		-	(0,2-5)		0,56 - 0,84	
	Transferrin		(7-22)		-	(1,9-3,8)		4,07 - 6,11	
	Prealbumin		(12-27)		-	(0,1-0,4)		62,40 - 93,60	
Tu-markery	Orosomukoid		(1,5-4,5)		-	(0,3-1,3)		3,00 - 4,50	
Kompresivní markery	Albumin		(120-300)		-	(35-50)		5,92 - 7,40	
	Fibrinogen		(1,0-4,5)		-	(3-6)		0,68 - 1,02	
Markery tkáňové destrukce	Apo A-I		(1,5-3)		-	(1-2)		1,30 - 1,96	
	Apo B		(0,5-2)		-	(0,8-1,17)		1,02 - 1,52	
Komplement	C3		(0,5-3,5)		-	(1,2-2,3)		0,91 - 1,37	
	C4		(0,8-2,5)		-	(0,2-0,4)		3,77 - 5,66	
Inhibitory proteináz	Antitrypsin		(6-15)		-	(1,1-2,3)		4,94 - 7,41	
	Antithrombin III		(1-7)		-	(0,2-0,4)		10,67 - 16,00	

U CRP jsou hodnoty uvedeny v séru v mg/l a v CSF v µg/l

I. Funkce bariéry hemato-likvorové:

Q = Alb.(CSF) / Alb.(S):

II. Výpočet intratekální oligoklonální syntézy imunoglobulinů dle Reibera:

$$\text{IgX(loc)} = (\text{IgX(CSF/S)} - a/b * ((\text{Alb(CSF/S)}^2 + b^2)^{(1/2)} + c)) * \text{IgX(S)}$$

IgG(loc) = ??? mg/l, t.j. ??? %
 IgA(loc) = ??? mg/l, t.j. ??? %
 IgM(loc) = ??? mg/l, t.j. ??? %

III. Hodnocení: Pokud je výsledek 0, syntéza imunoglobulinu není přítomna

Obr. 15: Vzor vyhodnocení dle Reibera

Stanovení transferinu

Proteiny akutní fáze obecně přecházejí do likvoru ze séra. Tyto bílkovinné frakce jsou integrální součástí systému humorální imunity a za jejich produkci jsou odpovědné interleukiny, které mohou stimulovat jaterní buňky k jejich tvorbě. Po stránce funkční se jedná o mediátory zánětlivé reakce (*Duniewicz, Adam, a spol., 1999*). Na OKB FTNsP stanovujeme v mozkomíšním moku coby reaktant akutní fáze koncentraci transferinu.

Obsah transferinu v likvoru se za normálních okolností pohybuje v rozmezí 7 – 22 mg/l. Koncentraci stanovujeme stejně jako albumin a IgG na TURBOXu. Principem reakce je imunoprecipitační reakce v kapalně fázi, kdy transferin (antigen - Ag) v likvoru reaguje s antisérem obsahujícím protilátku (Ab) proti transferinu za vzniku imunokomplexu dle schématu $Ag + Ab \longleftrightarrow [Ag-Ab]$. Výsledný rozptyl světla způsobený imunokomplexy je detegován nefelometricky a je přímo úměrný koncentraci transferinu ve vzorku.

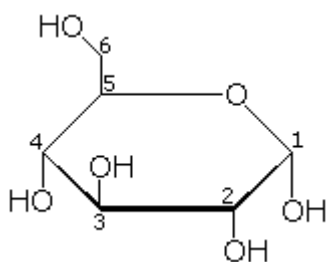
Mozkomíšní mok (CSF) s originálními reagensy výrobce Orion Diagnostica tedy obdobně jako u výše uvedených stanovení pipetujeme dle tabulky 4 :

Tab. 4: Stanovení transferinu

	kalibrátor		CSF		kontrola	
	blank	test	blank	test	blank	test
CSF	-	-	50 µl	50 µl	-	-
kalibrátor	25 µl	25 µl	-	-	-	-
kontrola	-	-	-	-	25 µl	25 µl
blank/pufr	500 µl	-	500 µl	-	500 µl	-
antisérum	-	500 µl	-	500 µl	-	500 µl

Kyvety necháme stát 30 minut při laboratorní teplotě a po této inkubaci provedeme měření na principu nefelometrie. U koncentrací transferinu vyšších než 7 g/l mozkomíšní mok ředíme v poměru 1 : 2 fyziologickým roztokem.

3.3.2 STANOVENÍ GLUKÓZY V LIKVORU



Obr. 16: Vzorec glukózy

Koncentrace glukózy (vzorec viz. obr. 16) v mozkomíšním moku - glykorachie - dosahuje za normálních okolností hodnot 2,5 – 4,0 mmol/l. Glykorachie závisí značně na glykémii, proto zvýšenou hladinu logicky nacházíme u diabetiků, a někdy též u virových neuroinfekcí (kde však může být hladina glukózy i lehce snižena – viz další odstavec), neboť vlivem virové infekce může dojít dle *Adama (2008)* k částečnému poškození hypothalamických center regulujících glykémii a tím ovlivňujících i glykorachii. V obou případech glukóza přestupuje přes hematolivorovou bariéru ze séra.

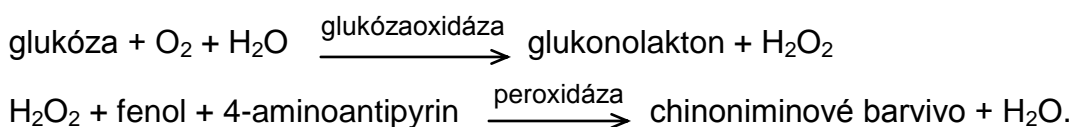
Hlavní diagnostický význam však spočívá ve stanovení nízkého obsahu glukózy v likvoru; hypoglykorachii obecně zjišťujeme zejména u neuroinfekcí. Infekce CNS jsou dle *Kelbicha, a spol. (2007)* doprovázeny vysokým energetickým nárokem aktivovaného imunitního systému, který vede k intenzivnější přeměně glukózy při současně zvýšené spotřebě kyslíku. Úbytek kyslíku v likvoru má tak podle něj za následek různě závažné odklonění od aerobního metabolismu; systém se dostává do energetické deprese (dodávka glukózy z krve již zdaleka nestačí pokrývat její spotřebu) a v konečném důsledku takto dochází ke snížení koncentrace glukózy v likvoru. V případě serózních infekčních zánětů (nejčastěji virové etiologie) nacházíme v praxi pokles glykorachie zpravidla jen mírný.

Někdy až nulová hodnota glykorachie naopak bývá charakteristickou známkou purulentních infekčních zánětů (zpravidla bakteriálního původu), neboť se zde na vysoké spotřebě kyslíku kromě výše uvedených mechanismů navíc zásadně podílejí i neutrofilní granulocyty procesem tzv. „oxidačního vzplanutí“.

Oxidační vzplanutí se odvíjí od interakce receptorů neutrofilů s opsonizovanými bakteriemi. Následně dochází k aktivaci membránového enzymu neutrofilů NADPH-oxidázy (*Kelbich, a spol., 2007*). Ve sledu řady reakcí, jak dále popisuje *Kelbich, a spol. (2007)*, posléze vznikají produkty jakožto

velmi reaktivní oxidační činidla narušující strukturu mikroorganismů. Právě tento proces je u hnisavých neuroinfekcí enormně náročný na spotřebu kyslíku a vede ke značně intenzivnímu rozvoji anaerobního metabolismu v likvoru.

Glykorachii stanovujeme spektrofotometricky měřením A ve VIS oblasti spektra. Principem reakce je enzymatické stanovení glukózy v likvoru dle schématu :



Intenzitu vzniklého růžového zbarvení chinoniminového barviva, které je přímo úměrné koncentraci glukózy v likvoru, měříme na spektrofotometru značky UNICAM HELIOS při vlnové délce 500 nm.

Ke stanovení používá naše laboratoř soupravu výrobce Bio-La-test. Zcentrifugovaný likvor přemístíme do sterilní zkumavky odpipetováním a dané množství mozkomíšního moku (CSF), destilované vody, kontroly a činidla pipetujeme do čistých zkumavek dle tabulky 5 :

Tab. 5.: Stanovení glukózy

	blank	kontrola	CSF
destilovaná voda	20 µl	-	-
kontrola (standarda)	-	20 µl	-
CSF	-	-	20 µl
činidlo	2 ml	2 ml	2 ml

Po promíchání složek a 20-ti minutové inkubaci vzorky přemístíme do jednorázových plastových kyvet a provádíme vlastní měření absorbancí blanku, kontroly (o přesně známém množství stanovované látky) a samotného likvoru.

Koncentraci glukózy v jednotkách mmol/l nakonec vypočítáme dle vztahu :
koncentrace standardy · (A vzorku / A standardy).

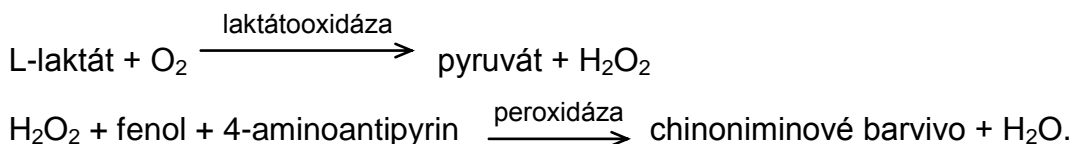
3.3.3 STANOVENÍ LAKTÁTU V LIKVORU

Laktátdehydrogenáza (dále jen LD) je cytoplazmatický enzym katalyzující reakci anaerobní glykolýzy, kterou je reverzibilní přeměna pyruvátu na laktát.

Malé množství enzymu se nachází v mozkomíšním moku i fyziologicky – toto množství odpovídá přestupu LD do likvoru ze séra a rovněž jejímu uvolnění z odumírajících buněk nervové tkáně; zejména z buněk gliových (Kelbich, a spol., 2007).

Při poruchách cévního mozkového zásobení, při infekčních zánětech CNS (a jiných stavech) dochází v likvoru ke zvýšené produkci laktátu v důsledku intenzivního rozvoje anaerobního metabolismu. Nadměrné hodnoty laktátu v mozkomíšním moku jsou velmi významným ukazatelem purulentní bakteriální neuroinfekce, kde se na zablokování aerobní větve velkou měrou podílí i oxidační vzplanutí neutrofilů (podrobně je tento proces popsán u stanovení glukózy, str. 26 - 27).

Laktátorachii stanovujeme spektrofotometricky měřením A ve VIS oblasti spektra. Principem reakce je stanovení laktátu v likvoru využitím reakční sekvence laktát oxidáza - peroxidáza - chromogen :



Intenzitu vzniklého růžového zbarvení chinoniminového barviva, které je úměrné koncentraci laktátu v likvoru, měříme na spektrofotometru značky UNICAM HELIOS při vlnové délce 505 nm.

Ke stanovení koncentrace laktátu používáme komerční set výrobce BioMérieux. Určité množství mozkomíšního moku (CSF), destilované vody, kontroly a reagenčního činidla (které připravujeme dle návodu výrobce smícháním lahviček REAGENT 2 a REAGENT 3) pipetujeme do čistých zkumavek dle tabulky 6 :

Tab. 6: Stanovení laktátu

	blank	kontrola	CSF
destilovaná voda	20 µl	-	-
kontrola (standarda)	-	20 µl	-
CSF	-	-	20 µl
reagenční činidlo	2 ml	2 ml	2 ml

Po napipetování zkumavky dobře promícháme a necháme stát při laboratorní teplotě 5 minut. Po této době vzorky přemístíme do jednorázových plastových kyvet a provádíme měření A blanku, kontroly (o přesně známém množství stanovované látky) a samotného likvoru.

Absorbance je lineární funkcí koncentrace, proto množství laktátu v likvoru v jednotkách mmol/l nakonec můžeme vypočítat dle vztahu : *koncentrace standardy · (A vzorku / A standardy)*.

3.3.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ VYŠETŘENÍ LIKVORU

Spektrofotometrické vyšetření likvoru lékaře informuje o přítomnosti hematogenních pigmentů v mozkomíšním moku. Po průniku erytrocytů do likvoru dochází k jejich rozpadu, který se u proměřované spektrofotometrické křivky projeví přítomností pigmentů – derivátů hemoglobinu. Profil křivky potom podává neurologům cenné informace o stupni a stádiu krvácení do likvorových cest. Jeho největší význam je dle *Duniewiczze, Adama, a spol. (1999)* u hemoragických příhod – např. u subarachnoidálního krvácení, intraparenchymového mozkového hematomu nebo u prokrvácených mozkových tumorů.

Na OKB FTNsP identifikujeme trojici hematogenních pigmentů : oxyhemoglobin, bilirubin a methemoglobin. Přítomnost pigmentů lze takto prokázat i v na první pohled bezbarvém likvoru, neboť spektrofotometrické stanovení je přibližně 10x citlivější než zrak.

Oxyhemoglobin

Oxyhemoglobin je prvním pigmentem, který lze detekovat zhruba již za dvě hodiny po proniknutí krve do likvorových cest. Koncentrace oxyhemoglobinu dosahuje vrcholu zhruba za 36 hodin, pak zvolna klesá, a po 7 – 10. dnech vymizí zcela. Izolovaná přítomnost oxyhemoglobinu je nazývána oxy-Hb typ křivky. Vyskytuje se u čerstvých intermeningeálních krvácení.

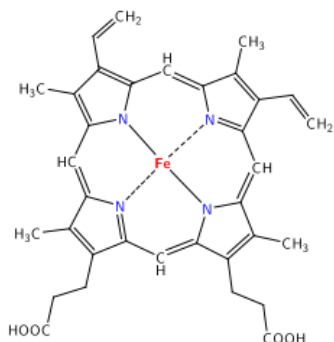
Bilirubin

Katalytickým působením hemoxygenázy na oxyhemoglobin vzniká v buňkách mozkových a míšních obalů bilirubin, který se potom dostává do likvorového prostoru. V likvoru se bilirubin začne objevovat zhruba 10 hodin po vzniku krvácení, maxima dosahuje za 48 hodin (za 2 – 3 dny se již objevuje tzv. xantochromie – žlutavé zbarvení likvoru) a přetrvává 2 – 4 týdny po krvácení. Dle dvou absorpčních maxim lze rozlišit dvě bilirubinové frakce :

- LB-frakce : tzv. „dlouhý“ (long) bilirubin má absorpční maximum při 460 nm a je vždy patologickým nálezem, neboť se kromě intermeningeálního krvácení může vyskytovat při zvýšené přítomnosti nekonjugovaného bilirubinu v séru, např. u hemolytických anémií. U novorozenců je ho možno pozorovat takřka pravidelně z důvodu neplně funkční hematoliquorové bariéry.
- SB-frakce : tzv. „krátký“ (short) bilirubin je bilirubin konjugovaný (přímý) a jeho absorpční maximum je při 430 nm. V likvoru ho pozorujeme při zvýšení hladiny konjugovaného bilirubinu v séru, např. při obstrukčním ikteru (*Duniewicz, Adam, a spol., 1999*).

Přítomnost čistého bilirubinu v likvoru je nazývána Bi-typ křivky; spíše častěji ale bývá v mozkomíšním moku identifikován ve smíšených křivkách.

Methemoglobin



Obr. 17: Struktura hemu

(dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>)

Krevní barvivo hemoglobin je tetramerní molekula, která se skládá ze čtyřech globinových řetězců a čtyřech hemů (viz. obr. 17). Oxidací dvojmocného železa Fe^{2+} v hemoglobinu na Fe^{3+} vzniká methemoglobin neboli hemoglobin. Trojmocné železo Fe^{3+} v takto vzniklém methemoglobinu již není schopno uvolňovat navázaný kyslík tkáním.

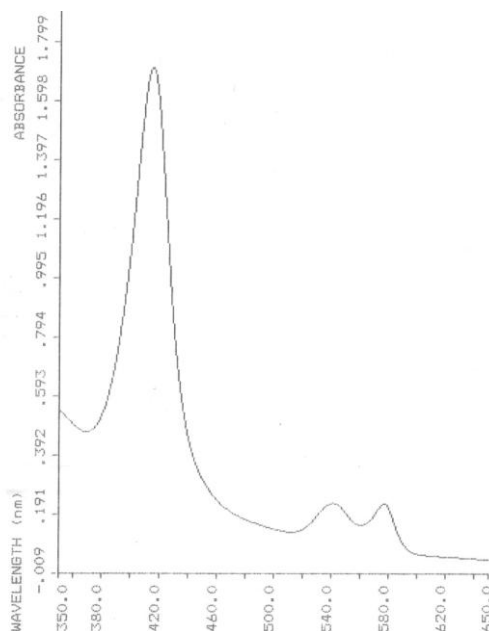
Záchyt izolovaného methemoglobinu v likvoru se nazývá Hi-typem křivky, ale takto samostatně se methemoglobin vyskytuje velmi vzácně, spíše bývá součástí smíšených křivek. Methemoglobin se vyskytuje u krvácení do ohraničených uzavřených prostor v CNS, např. při epidurálním či subdurálním hematomu. Dle *Adama (2008)* jsou tyto hematomy mechanicky izolované, a proto se zde neuplatňují mechanismy redukující methemoglobin na hemoglobin, jak je tomu v periferní krvi – jde o účinek NADH methemoglobinreduktázy nebo redukovaného glutathionu/NADPH.

Při požadavku na spektrofotometrické vyšetření mozkomíšního moku je zásadní podmínkou likvor nejpozději 30 minut po punkci zcentrifugovat 10 minut při 3 000 otáčkách z důvodu hypoonkotického prostředí likvoru, který vede k nízké rezistenci membrán biologicky starých erytrocytů (Adam, 2008).

Prakticky provádíme spektrofotometrické stanovení všech tří pigmentů na spektrofotometru značky EPSON PERKIN ELMER LAMBDA 6 proměřením vzorku likvoru ve viditelné oblasti spektra v rozmezí 350 – 650 nm ve skleněné kyvetě. Výsledkem měření je záznam křivky, která je u „normálního“ likvoru plochá. Bez záchytu hematogenních pigmentů je za fyziologickou považována křivka do $A = 0,04$ v absorpčním maximu oxyhemoglobinu a $0,02$ v maximu bilirubinu.

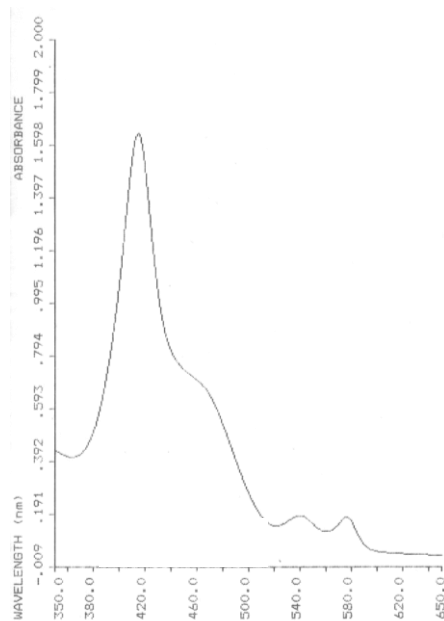
U spektrofotometrického stanovení se můžeme setkat s několika typy spektrofotometrických křivek. Mezi základní typy patří :

- **Oxy-Hb typ křivky** : přítomnost oxyhemoglobinu se projeví nárůstem absorbance v podobě vysokého ostrého píku při vlnové délce 415 nm (odpovídající jeho absorpčnímu maximu) a dále dvěma malými vedlejšími píky při 540 a 575 nm, jak je vidět na obr. 18.



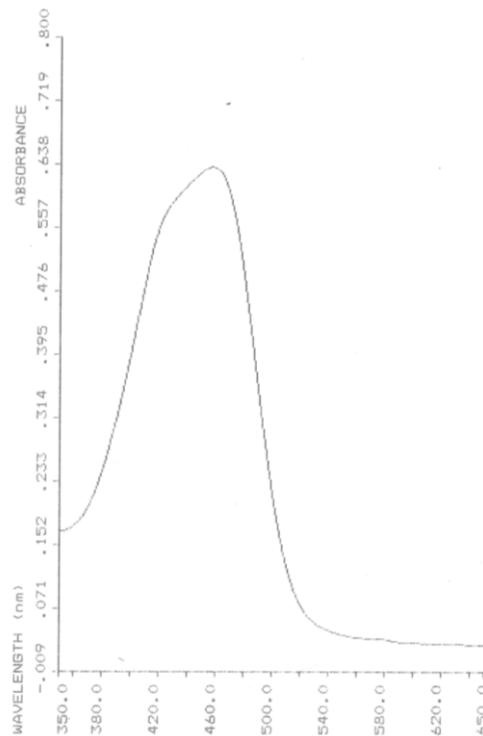
Obr. 18: Oxy-Hb typ křivky
(Záznam spektra pacienta z OKB FTNsP)

- **S typ křivky** : název je odvozen od esovitého charakteru křivky. Převažuje zde oxyhemoglobin v oblasti 415 nm, ale na sestupném rameni se již tvoří bilirubin v oblasti kolem 460 nm (viz. obr. 19).



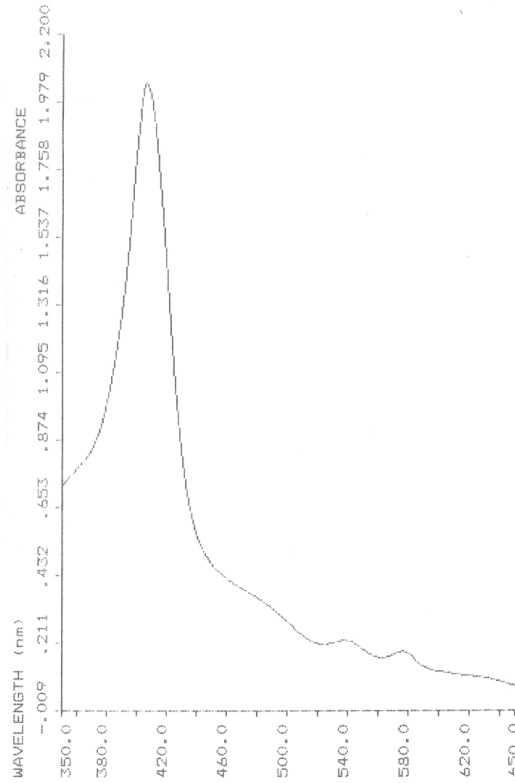
Obr. 19: S typ křivky (Záznam spektra pacienta z OKB FTNsP)

- **Bi typ křivky** : U Bi typu křivky jde o čistý bilirubin s jeho absorpčními maximy při 430 a 460 nm, které leží v těsné blízkosti (viz. obr. 20).



Obr. 20: Bi typ křivky (Záznam spektra pacienta z OKB FTNsP)

- **Hi typ křivky** : jde o izolovaný methemoglobin (nebo také hemoglobin). Má hlavní ostrý pík v oblasti 405 – 408 nm, a tři malé píky při 540, 575 a 620 nm (viz. obr. 21).



Obr. 21: Hi typ křivky
(Záznam spektra pacienta z OKB FTNsP)

4 ZÁVĚR

Tato práce s názvem „Vyšetření mozkomíšního moku pro klinické účely“ byla záměrně rozdělena na dvě hlavní části – teoretickou a praktickou.

V části teoretické je kromě obecné charakteristiky a způsobu odběru mozkomíšního moku uveden výčet buněčných spekter, které se v mozkomíšním moku mohou vyskytovat, včetně podrobnějšího popisu nevelkého počtu elementů jednotlivých buněčných řad. Nezbytně zde musely být uvedeny rovněž alespoň základní cytologické obrazy (a to jak obraz fyziologický, tak zejména i různé typy pleocytózy), neboť sestava buněčného složení mozkomíšního moku za nefyziologických okolností umožňuje usuzovat na přítomnost chorobného stavu - a to tím spíše, že řada cytologických nálezů bývá pro jednotlivá onemocnění často specifická.

V praktické části jsou oproti tomu popsány metodiky a pracovní postupy konkrétních stanovení jednotlivých složek likvoru, které na Oddělení klinické biochemie Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou provádíme v režimu rutinním i statimovém pohotovostním. Obecně jde o vyšetření fyzikální, cytologické a chemické.

Cílem této rešeršní práce bylo shrnout odborné teoretické a praktické poznatky v oblasti biochemického vyšetřování mozkomíšního moku a usnadnit jejich přehled především biochemikům – nelékařům, kteří s tímto vzácným biologickým materiálem pracují, nebo projevují o danou problematiku čistě jen prostý zájem. Tento původní záměr se splnit (s notným přispěním odborných konzultantů) snad podařilo alespoň z části.

SOUHRN

Každé postižení centrálního nervového systému, tj. ústřední nervové soustavy tvořené mozkiem a míchou, znamená pro pacienta potenciálně vážné ohrožení prakticky vždy. K určení diagnózy napomáhá v první řadě dobře stanovená anamnéza, podrobné vyšetření nemocného lékařem a vyšetření laboratorní – obzvláštní důležitost má zde především vyšetření mozkomíšního moku získaného nejčastěji lumbální punkcí.

Laboratorní analýza likvoru, moku mozkomíšního, velkou měrou přispívá zejména k odlišení zánětlivého procesu bakteriálního a virového a do určité míry napomáhá laboratorní výsledek i odhadu prognózy daného onemocnění. Opakování biochemického vyšetření mozkomíšního moku navíc přináší závažné informace o dynamice onemocnění a úspěšnosti či nedostatečnosti léčebného ovlivnění.

Tato práce je pomyslně rozdělena na dvě hlavní části – a to na část teoretickou a část praktickou. Práce si klade za cíl shrnout v logickém a přehledném sledu odborné teoretické i praktické poznatky vyšetřování mozkomíšního moku v oblasti biochemické analýzy z pohledu biochemického laboranta se záměrem usnadnit jejich přehled především nelékařským pracovníkům laboratoří klinické biochemie.

SUMMARY

Each infliction of central nervous system, i.e. system of brain and spinal chord, means potential serious exposure in practically every case. Correctly defined anamnesis, detailed checkup, and laboratory measurements are useful for assignment of diagnosis in such cases. Investigation of cerebrospinal fluid (CSF) obtained most frequently by lumbal punction is of special importance.

Laboratory analysis of liquor significantly contributes to differentiation of bacterial or viral inflammation process and partially helps to estimation of disease prognosis. Repeating of biochemical investigation of cerebrospinal fluid moreover brings important information about dynamic of desease and about success or inadequacy of treatment.

This document is divided into 2 main parts – theoretical and practical. The document tends to aim to summarize in logical and transparent succesion professional theoretic and practical knowledge about liquor investigation in biochemical analysis area. This is done from point of view of biochemical analysts with goal to simplify them especially for non-medical workers.

LITERATURA A PRAMENY

ADAM, Pavel: ústní sdělení, 2008.

ADAM, Pavel. *Cytologie likvoru*. 1. vyd. Pardubice: Stapro, 1995. 53 s.

ADAM, Pavel, a kol. *Cytologie mozkomíšního moku* [CD-ROM]. Praha: SEKK, 2000. Editor: Jiří Bulan ml. Speciální část: obrazová příloha.

BOŘECKÁ, Klára. *Laboratorní příručka – přehled laboratorních vyšetření, referenčních mezí a doporučení*. 1. vyd. Praha: Agemo, 2006. 126 s.

DOLEŽALOVÁ, Věra, a kol. *Principy biochemických vyšetřovacích metod, II. část*. 2. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. 231 s. ISBN 80-7013-206-X.

DUNIEWICZ, Milan, ADAM, Pavel, a kol. *Neuroinfekce*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 1999. 309 s. ISBN 80-85800-72-1.

GLOSOVÁ, Libuše. *Cytologický atlas mozkomíšního moku*. 1. vyd. Praha: Galén, 1998. 95 s. ISBN 80-85824-70-1.

IVANOVÁ, Kateřina, JURÍČKOVÁ, Lubica. *Písemné práce na vysokých školách se zdravotnickým zaměřením*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2005. 98 s. ISBN 80-244-0992-5.

KELBICH, Petr, a kol. *Význam urgentního vyšetření mozkomíšního moku pro včasnou diagnostiku neuroinfekcí* [on line]. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007: přehledový článek, cit.: 28. 3. 2008. Dostupné z: <http://kmil.trios.cz/kmil07013c.htm>.

MAČÁK, Jiří, MAČÁKOVÁ, Jana. *Patologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2004. 347 s. ISBN 80-247-0785-3.

MOUREK, Jindřich. *Fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2005. 204 s. ISBN 80-247-1190-7.

PECKA, Miroslav. *Laboratorní hematologie v přehledu – buňka a krevtvorba*. 1. vyd. Český Těšín: Finidr, 2002. 160 s. ISBN 80-86682-01-3.

SILBERNAGL, Stefan, DESPOPOULOS, Agamemnon. *Atlas fyziologie člověka*. 2. vyd. Praha: Grada Publishing, 1993. 352 s. ISBN 80-85623-79-X.

<http://www.cancer.gov/Templates/db_alpha.aspx?CdrID=46303> [on line], cit. obr. 2: 23. 3. 2008.

<<http://cs.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin>> [on line], cit. obr. 17: 1. 4. 2008.

SEZNAM ZKRATEK

A	absorbance
CB	celková bílkovina
CNS	centrální nervový systém
CSF	mozkomíšní mok
F-R	Fuchs-Rosenthalova komůrka
IgG	imunoglobulin třídy G
LD	laktátdehydrogenáza
LP	lumbální punkce
OKB FTNsP	Oddělení klinické biochemie Fakultní Thomayerovy nemocnice s poliklinikou
RS	roztroušená skleróza
VIS	viditelná oblast elektromagnetického spektra

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 – Likvorové prostory mozku.....	6
Obrázek č. 2 – Provedení lumbální punkce	7
Obrázek č. 3 – Malý lymfocyt + plazmocyt	9
Obrázek č. 4 – Monocyt	10
Obrázek č. 5 – Aktivovaný monocyt	10
Obrázek č. 6 – Erytrofág	10
Obrázek č. 7 – Lipofág	10
Obrázek č. 8 – Degenerativní forma monocytu.....	11
Obrázek č. 9 – Neutrofil	11
Obrázek č. 10 – Eozinofil	11
Obrázek č. 11 – Bazofil	12
Obrázek č. 12 – Maligní buňka	13
Obrázek č. 13 – Maligní meningeální infiltrace	13
Obrázek č. 14 – Maligní buňka hematogenní	13
Obrázek č. 15 – Vzor vyhodnocení dle Reibera	24
Obrázek č. 16 – Vzorec glukózy	26
Obrázek č. 17 – Struktura hemu	31
Obrázek č. 18 – Oxy-Hb typ křivky	32
Obrázek č. 19 – S typ křivky	33
Obrázek č. 20 – Bi typ křivky	33
Obrázek č. 21 – Hi typ křivky	34