

# Vyšetření mozkomíšního moku

## 1. Základní anatomické a fyziologické poznatky

### 1.1. Úvod

Vyšetření mozkomíšního moku patří v neurologii k základním vyšetřovacím metodám. Význam likvorologického vyšetření neustupuje ani před moderními zobrazovacími technikami a v řadě indikací představuje nepostradatelnou diagnostickou metodu. O existenci mozkomíšního moku věděli již staří Egypťané a Řekové, ale odběr mozkomíšního moku čekal na své objevení 2000 let. Za objevitele a průkopníka lumbální punkce je považován německý profesor vnitřního lékařství Heinrich Quincke. Jeho odborné sdělení o tomto výkonu je z roku 1891. Provádění lumbální punkce se však ještě dlouhou dobu nestalo rutinním vyšetřením a řada lékařů před ním varovala. Teprve po několika desetiletích se objevují v literatuře pochvalná sdělení, která Quinckeho objev docenila.

### 1.2. Anatomie a fyziologie

Mozkomíšní mok je čirá bezbarvá tekutina, která vyplňuje mozkové komory a subarachnoidální prostor mozku a míchy (Obr. 1). Tvoří se v krevních cévách chorioidálního plexu mozkových komor (50-70%) a dále ultrafiltrací krevní plazmy z cév pia mater a přestupem z mozkových buněk. Mok za normálních podmínek odtéká z postranních komor mozkových přes foramen Monroi do třetí komory mozkové a přes aqueductus Sylvii do čtvrté komory mozkové. Ze čtvrté komory vytéká Magendieovým otvorem a dvěma Luschkeho otvory do subarachnoideálního prostoru. Subarachnoidální prostor je ohraničen měkkou plenou mozkovou (pia mater), která pokrývá mozkovou tkáň, je cévnatá a sleduje mozkové závitě a arachnoideou, která je prakticky bezcévnatá (Obr. 2). Část likvoru obtéká mozkový kmen a míchu. Celkové množství likvoru je u dospělého člověka 120-180 ml. Je produkován rychlostí 500-600 ml za 24 hod. Vstřebává se převážně do velkých nitrolebečních venózních sinusů (uloženy v tvrdé pleni mozkové) přes arachnoidální klky a Pacchionské granulace (Obr. 3) Durální vény a sinusy umožňují přechod mozkomíšního moku přímo do venózní krve.

### 1.3. Funkce

Mozkomíšní mok obklopuje mozek a míchu ze všech stran a tím jej chrání před nárazy a otřesy. Podílí se na udržování homeostázy, zajišťuje optimální prostředí pro buňky CNS (stálé složení iontů, pH, osmolality). V mozkomíšním moku probíhají imunologické reakce při zánětech nebo postižení CNS.

### 1.4. Bariéry

Stálý transport látek mezi krví, mozkomíšním mokem a mozkovými buňkami je závislý na funkci bariér, které tvoří rozhraní mezi třemi systémy.

Hematoencefalická bariéra zahrnuje rozhraní mezi krví a mozkovou tkání. Zabezpečuje optimální prostředí pro funkci mozku, chrání mozek před škodlivými látkami a umožňuje zásobování mozku látkami potřebnými pro jeho metabolismus, kontroluje obsah intersticiální tekutiny v mozkové tkáni. Anatomicky je tvořena

endotelem cévní stěny kapilár, bazální membránou a z mozkové strany vrstvou astrocytů (Obr. č. 4). Endotelové buňky mozkových kapilár jsou spojeny těsnými kontakty. Přestup látek z krve do mozku se uskutečňuje na podkladě jejich rozpustnosti v tucích nebo pomocí přenašečových systémů. Snadno prostupuje voda a látky dobře rozpustné v lipidech (např. etanol, nikotin, plyny - O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O). Hydrofilní látky jsou přenášeny pomocí specifických transportních systémů (např. glukóza).

Hematolivorová bariéra odděluje krev a mozkomíšni mok. Je tvořena endotelem chorioidálních plexů a jemnou sítí kapilár v měkké bláně mozkové (Obr. č. 5). Spojení mezi epitelovými buňkami je těsné, ale prostupnější než v mozkových kapilárách. V chorioidálním plexu přechází látky do likvoru difuzí a aktivním transportem. Hematolivorová bariéra je permeabilnější a umožňuje přestup proteinů z plazmy do likvoru. Porucha hematolivorové bariéry se projeví zvýšenými koncentracemi proteinů v likvoru.

## **2. Indikace vyšetření likvoru, odběr**

Vyšetření mozkomíšního moku je důležitou součástí diagnostiky onemocnění centrálního nervového systému. Je indikována jak u akutních stavů, tak u onemocnění s chronickým průběhem. Můžeme je rozdělit do čtyř hlavních kategorií.

- Infekční onemocnění, jako je zánět mozkových blan (meningitis) a zánět mozku (encephalitis) – vyšetření pomáhá určit původ onemocnění – bakteriální, virový, tuberkulózní nebo způsobený kvasinkami.
- Onemocnění, která způsobují zánět neinfekční, tzv. autoimunitní, např. sclerosis multiplex, při kterém dochází k poškození myelinových obalů. Dále je to např. Guillain-Barré syndrom, při kterém dochází k poškození periferních nervů.
- Subarachnoideální krvácení, které není prokazatelné jinými zobrazovacími metodami.
- Onkologická onemocnění centrálního nervového systému nebo průkaz metastáz.

Likvor se nejčastěji k vyšetření získává lumbální punkcí v místě bederní páteře, v neurochirurgii také punkcí postranní komory mozkové, tzv. ventrikulární punkcí.

### **2.1. Lumbální punkce**

Nemocný je při lumbální punkci buď v poloze vsedě s flektovanou páteří, nebo v poloze vleže na boku s maximální flexí páteře (Obr. 6). Maximální flexe celé páteře napomůže docílit oddálení obratlových trnů a usnadní tak přístup do páteřního kanálu. Provedení punkce je všeobecně doporučováno v meziobratlových prostorech L3-L4 nebo L4-L5. Pacient musí být o výkonu náležitě poučen. Místo vpichu se dezinfikuje a znecitliví. K odběru se používají speciální jehly, výhody vykazují tzv. jehly atraumatické, jejichž použití snižuje komplikace po odběru likvoru. Nedochozí také k většímu poranění okolních struktur a zpětné prosakování likvoru po odběru je minimální. Po zavedení jehly do subarachnoidálního prostoru a vytažení mandrénu z jehly se nechá se likvor odkapávat do několika zkumavek. Množství odebíraného likvoru by mělo být co nejmenší, maximálně 3 - 4 ml. Po provedení lumbální punkce

je doporučován klid na lůžku, u nekomplikovaných odběrů je doporučován klid 4-8 hodin po punkci.

### **2.1.1. Komplikace lumbální punkce**

Suchá punkce může být způsobena nesprávnou polohou jehly např. u obézních pacientů nebo v důsledku anatomických odchylek – spondylartrózy, kyfoslózy, stenózy páteřního kanálu.

Jako traumatická lumbální punkce se značí stav, kdy jehla poraní epidurální žilní pletěň a v následně získaném likvoru je příměs krve. Krví kontaminovaný mozkomíšní mok přináší řadu těžkostí při dalším zpracování. Je obtížné stanovit stupeň pleocytózy při předpokládané meningitidě. K alespoň přibližnému odhadu množství buněk pocházejících z krve slouží různé metody. Vycházejí z předpokladu, že poměr leukocytů a erytrocytů u zdravého člověka je v periferní krvi 1:500-800. Traumatická lumbální punkce může komplikovat stanovení diagnózy subarachnoideálního krvácení.

### **2.1.2. Kontraindikace lumbální punkce**

Provedení lumbální punkce je kontraindikováno u nemocných s hemokoagulačními poruchami, dále u nemocných se zánětlivými afekcemi kůže nebo dekubity v oblasti bederní páteře.

### **2.2. Zevní komorová drenáž**

Likvor je při zevní komorové drenáži odváděn přímo z mozkových komor (Obr. 7). Tímto výkonem se řeší většinou akutní městnání likvoru v komorovém systému, které může vznikat z různých příčin (např. při krvácení, po úrazech, přítomnosti nádorů). Zavedení zevní komorové drenáže patří mezi nejčastější neurochirurgické operace. Po trepanaci kosti lebeční se zavádí katetr do čelního rohu nedominantní mozkové komory, na katetr se napojí uzavřený sběrný systém. Pacient vyžaduje intenzivní monitorování životních funkcí. Denní cytologická, biochemická a bakteriologická vyšetření slouží k záchytu infekčních komplikací.

### **2.3. Ventrikuloperitoneální drenáž, ventrikuloatriální drenáž**

Principem této drenáže je vytvoření obchvatu, který spojuje místo s patologicky zvýšeným množstvím mozkomíšního moku s místem jeho vstřebávání (Obr. 8). Pomocí katetru se tekutina odvádí podkožím na určené místo. Nejčastěji je to dutina břišní, kde velká plocha pobřišnice vstřebává likvor zpět do krevního oběhu. Při ventrikuloatriální drenáži se likvor odvádí přes žilní systém do pravé srdeční síně. Aby byl odtok likvoru kontrolován, je v průběhu drenáže napojen jednocestný ventil, který může mít pevně nastavenou hodnotu otevíracího tlaku nebo se dá hodnota tlaku programovat. Součástí drenáží bývá i rezervoár a v případě potřeby lze z této komůrky odebrat likvor punkcí přes kůži.

### **2.4. Odběr z Ommaya rezervoáru**

Ommaya rezervoár je druh nitrokomorového katetru, který se používá jak pro přímou a opakovanou intratekální aplikaci léků (např. chemoterapie) do mozkomíšního

moku, tak pro odsávání mozkomíšního moku (Obr. 9). Zařízení tak pacienta šetří od opakovaných lumbálních punkcí. Skládá se z katetru, který vede z laterální mozkové komory, do rezervoáru, který je implantován do podkoží hlavy. Samotná aplikace ommaya rezervoáru je prováděna chirurgicky.

### 3. Vyšetření mozkomíšního moku

K základnímu vyšetření likvoru patří cytologické vyšetření, biochemické vyšetření celkové bílkoviny, glukózy a laktátu. K dalším doporučeným vyšetřením patří stanovení albuminu a imunoglobulinů s vyšetřením funkce hematolikorové bariéry a určením intratékální syntézy imunoglobulinů. Při podezření na subarachnoideální krvácení se provádí spektrofotometrická křivka likvoru. Další speciální analýzy zahrnují vyšetření neuronálních protilátek, specifických protilátek a průkaz neurotrofních patogenních agens.

#### 3.1. Vzhled likvoru

Normální likvor je čirý a bezbarvý. Sangvinolentní (krvavý) likvor vzniká arteficiální nebo patologickou příměsí krve. Xantochromní (nažloutlý) likvor může být známkou staršího krvácení do likvorových cest nebo se vyskytuje při poruše hematolikorové bariéry. Zkalený likvor nacházíme u purulentních meningitid.

### 4. Cytologické vyšetření

#### 4.1. Kvantitativní cytologie

Počet buněk je nutno určit neprodleně po dodání materiálu. Buňky mají v likvoru nízkou životnost a mohou lyzovat již během první hodiny od odběru. Kvantitativní stanovení počtu elementů v mozkomíšním moku se provádí ve Fuchs-Rosenthalově komůrce (Obr. 10). Fuchs-Rosenthalova komůrka je tvořena speciálním sklem velikosti podložního sklíčka, kde jsou na dvou oddělených ploškách mikroskopické vrypy, které tvoří mřížku složenou z velkých a malých čtverců. Objem komůrky nad plochou vymezenou vrypy je 3 ul. Nejprve pipetujeme 20 ul nativního neobarveného likvoru do jedné z komůrek. Kapilární síly zajistí, že je mozkomíšní mok automaticky natažen do komůrky. V nativním neobarveném likvoru počítáme erytrocyty a jaderné elementy. Jejich rozlišování zde neprovádíme, nemusí být snadné, zvláště pokud jsou červené krvinky minimálně probarveny nebo již nemají svůj charakteristický vzhled (Obr. 11). Do druhé části komůrky pipetujeme nativní obarvený likvor. Jako barvicí roztok používáme kyselou metylvioleť. Na dno hodinového sklíčka se pipetuje 5 ul kyselého metylvioleti, přidá se 50 ul likvoru, pečlivě se promíchá a opatrně pipetuje do komůrky. Barvicí roztok, kromě toho, že dobře znázorní jádra buněk, působí lýzu erytrocytů. (Obr. 12). Likvor je tekutina chudá na buňky, za normálních okolností je zde do 3 buněk/ul, to znamená, že v celé komůrce najdeme nejvíce 9 buněk. V tomto případě meandrovitě prohlédneme a spočítáme celý obsah komůrky (Obr. 13). Buňky počítáme při 200 násobném zvětšení. Pokud je likvor buněčný, jako bývá např. při zánětlivých onemocněních, při krvácení nebo při nádorové infiltraci, počítáme buňky pouze v části komůrky a výsledek vynásobíme

příslušným faktorem (Obr. 14). V nativním preparátu se stanoví počet všech buněk, po obarvení počet jaderných buněk. Z rozdílu se vypočte počet erytrocytů. Za normální nález se považuje 0-3 leukocyty/ul. Diferenciace leukocytů na mononukleáry a polynukleáry je ve Fuchs-Rosenthalově komůrce málo spolehlivá a nedoporučuje se provádět.

## 4.2. Kvalitativní cytologie

Vzhledem k relativně malému počtu buněčných elementů v likvoru je nutné pro cytomorfologické vyšetření likvor zahustit – tzn. získat buňky z většího objemu likvoru. K tomu slouží příprava mikroskopického preparátu pomocí šetrné cytocentrifugace. Likvor napipetovaný do speciálního nástavce je odstředivou silou tlačěn proti podložnímu sklíčku. Kapalná část likvoru se vsakuje do přiloženého filtračního papíru a přítomné buněčné elementy zůstávají v kruhovém terčíku na skle. Cílem je získat preparát s optimální výtěžností buněk. Všechny populace buněk obsažené v mozkomíšním moku musí být v preparátu přítomny, aniž by se měnily jejich poměry a morfologie. Zkoncentrování mozkomíšního moku je obzvláště významné pro zamezení přehlédnutí nádorových buněk. Trvalý cytologický preparát slouží k přesnější diferenciaci elementů a ke stanovení cytologického závěru. Po skončení centrifugace se držák s nádobkou a mikroskopickým podložním sklem vyjme z centrifugy, nádobka s filtračním papírem se odstraní a cytologický preparát v podobě kruhového terčíku se nechá zaschnout a následuje barvení. Základní barvicí metodou v likvorologii je barvení podle Pappenheima, mohou se použít i modifikace tohoto barvení, např. barvicí set Diff Quick, jehož výhodou je rychlost, barvení preparátu je hotové asi za 15 vteřin. Podložní sklíčko se 5x ponoří na jednu sekundu do fixačního roztoku s metanolem. Při přechodu do další lázně se sklíčko osuší buničitou vatou. Následuje opět 5x ponoření do barvicího roztoku, který obsahuje eosin ve fosfátovém pufru a jako poslední se 4x ponoří do barvy, která obsahuje thiaminovou modř ve fosfátovém pufru. Po obarvení v posledním barvicím roztoku se sklíčko s preparátem důkladně opláchne deionizovanou vodou. Po tomto barvení jsou eosinofilní složky v různých odstínech růžové a červené a bazofilní složky v různých odstínech světlemodré a tmavomodré. Podle vzoru si vyznačíme na sklíčku oblast záchytu buněk a preparát je připraven k rychlému mikroskopickému zhodnocení.

### Typy buněk v mozkomíšním moku

**Lymfocyt** (klidový) je buňka o velikosti 8-10 $\mu$ m, má úzký plazmatický lem a kompaktní jádro, které vyplňuje téměř celou buňku (Obr. 15). Tyto buňky najdeme v normálním mozkomíšním moku. Lymfoidní buňky se po setkání s antigenem transformují a jejich vzhled se mění. Aktivovaný lymfocyt (reaktivní) je lymfoidní buňka 11-18  $\mu$ m s výraznou bazofilní cytoplazmou a s velkým jádrem (Obr. 16). Vývojová řada T-lymfocytů končí u lymfoidních buněk, v plazmocyty se vyvíjejí pouze B-lymfocyty. T-lymfocyty jsou odpovědné za cytolyzu a aktivaci makrofágů. Plazmocyty jsou největší lymfoidní buňky o velikosti až 21  $\mu$ m s bazofilní plazmou. Kulaté nebo oválné jádro s patrnými jádérky bývá uloženo excentricky. Typické je perinukleární projasnění plazmy (Obr. 17). Plazmocyty jsou konečným stadiem B-lymfocytů po imunologické stimulaci a produkují imunoglobuliny. Vyskytují se patologicky v mozkomíšním moku, nejčastěji u pacientů se záněty virového původu.

**Monocyty** jsou buňky velké 15-30  $\mu$ m. Jádro mívá nepravidelný tvar, nejčastěji podkovy nebo fazole. Plazma se barví světleji než u lymfocytů (Obr. 18). Jsou to buňky morfologicky velmi proměnlivé. Aktivované monocyty se odlišují od monocytů větší velikostí a

vakualizovanou plazmou. Jsou schopny fagocytózy jiných buněk nebo nebuněčných částic. Aktivované monocyty s pohlceným materiálem se nazývají makrofágy. Podle fagocytovaného materiálu lze rozlišit různé typy, např. erytrofágy, hemosiderofágy, lipofágy apod. Monocyty jsou součástí normálního buněčného obrazu, aktivované monocyty nebo makrofágy však svědčí pro patologický děj.

**Neutrofilní polymorfonukleáry** jsou buňky o průměrné velikosti 12-15  $\mu\text{m}$ . Charakteristická morfologie s děleným jádrem a granuly v plazmě odpovídá krevním neutrofilům ( Obr.19 ). Za normálních okolností nejsou přítomny v mozkomíšním moku, k jejich zmožení dochází při akutních zánětech, zejména bakteriálních. Výjimkou jsou novorozenci, pro nezralost hematolivorové bariéry je u nich počet buněk zvýšený (do 15 buněk/ul) jsou přítomny i granulocyty. Granulocyty mají také schopnost fagocytózy, pohlcují např. bakterie. Nejsou však schopny fagocytovat jiné leukocyty nebo erytrocyty. Eosinofilní granulocyty jsou o něco větší než neutrofilů. Jádro bývá nejčastěji rozděleno na dvě části a v plazmě je množství načervenalých granulí. V mozkomíšním moku jsou spíše vzácným nálezem – jejich výskyt může svědčit pro chronicitu procesu, dále je můžeme vidět u parazitárních onemocnění.

**Nádorové buňky** v mozkomíšním moku mnohem častěji pochází z extrakraniálních nádorů než intrakraniálních. Cytologické vyšetření mozkomíšního moku a pátrání po nádorových buňkách je významné zejména u pacientů s metastatickými tumory, u leukémií, lymfomů, primárních mozkových nádorů a u meningeálního dráždění neznámého původu. Mezi všeobecně uznávaná kritéria malignity buněk patří vysoký nukleoplazmový posun ve prospěch jádra, velká jadérka, časté dělení buněk, značná velikost buněk, tendence k buněčným shlukům (Obr.20).

#### **Typy cytologických likvorových nálezů:**

Podle početně převažující řady dělíme pleocytózu nebo patologickou oligocytózu na granulocytární, lymfocytární, monocytární nebo tumorózní.

- **Granulocytární pleocytóza** s převahou neutrofilů se vyskytuje u hnisavých zánětů, výskyt eosinofilů je častý u onemocnění parazitárních, mykotických nebo u chronických patologických procesů (Obr.21)
- **Granulocytární oligocytóza** je častá v počáteční fázi nehnisavých zánětů nebo mozkové ischemie.
- **Lymfocytární pleocytóza** se vyskytuje u nehnisavých zánětlivých onemocnění (infekce virové, dále infekce způsobené borreliemi, leptospirami nebo bacily tuberkulózy) Obr.22
- **Lymfocytární oligocytóza** se často nachází v počáteční fázi roztroušené sklerózy.
- **Monocytární pleocytóza** nebo **oligocytóza** s nálezem aktivovaných monocytů je nespecifickým nálezem charakteristickým pro neinfekční onemocnění – kompresivní syndrom, autoimunitní onemocnění. Nález je také charakteristický pro konečnou fázi zánětu.
- **Tumorózní pleocytóza** nebo **oligocytóza** svědčí pro maligní onemocnění.

Normální cytologický nález v likvoru znamená, že počet buněk nepřekračuje normu, tzn 3-5/ul, jsou přítomny lymfocyty, monocyty, aktivované formy do 10%.

## 5. Biochemické vyšetření

### 5.1. Základní biochemické vyšetření

Celková bílkovina - hladina celkové bílkoviny je za normálního stavu asi 200x nižší než v séru. Za normálních okolností je 80% celkové bílkoviny sérového původu, zbývajících 20% je mozkového původu. Fyziologická hodnota celkové bílkoviny je při lumbální punkci 0.15-0.40 g/l. V mozkových komorách je hodnota celkové bílkoviny výrazně nižší. Novorozenci mají v likvoru vyšší hodnotu celkové bílkoviny pro nezralost hematolikorové bariéry. Nejvyšší podíl v zastoupení celkové bílkoviny má albumin, v likvorovém prostoru jsou modifikovány dále některé sérové proteiny – např. prealbumin, transferin. Imunoglobuliny přestupují do likvoru z krve nebo vznikají intratékální syntézou v likvorových prostorách. K zánětlivým markerům dále patří haptoglobin, C-reaktivní protein, C3 a C4 složky komplementu, antitrombin III a  $\alpha$ 1-antitrypsin. K tumorovým markerům řadíme orosomukoid.

Klinický význam má zvýšení celkové bílkoviny, které nastává u zánětů (u bakteriálních zánětů výrazné zvýšení až na desítky gramů), poruchách cirkulace likvoru nebo u intratékální syntézy imunoglobulinů při aktivaci imunitního systému. **Glukóza** je základním energetickým zdrojem pro nervovou tkáň, hladina glukózy v likvoru závisí na hladině glukózy v séru, tvoří asi 60% sérové hodnoty. Vyšší výpovědní hodnotu má poměr CSF glukóza/S glukóza, který je za normálních poměrů 0,6. Klinický význam má snížení hladiny glukózy v likvoru nebo poměru glukózy v likvoru a séru. Doprovází bakteriální záněty, nádorové meningeální infiltrace, subarachnoideální krvácení.

**Laktát** – hladina laktátu v likvoru nezávisí na plazmatické koncentraci, laktát prakticky neprochází přes hematolikorovou bariéru. Fyziologická hodnota laktátu je 1.2-2.1 mmol/l. Laktát vzniká při metabolismu glukózy bez přístupu kyslíku, klinický význam má jeho zvýšená hladina. Ke zvýšení dochází u zánětů, lehké zvýšení doprovází virové nebo tuberkulózní meningitidy. Výrazné zvýšení nastává u bakteriálních zánětů. Diskriminační hodnota pro rozlišení typu meningitidy je asi 4 mmol/l. Koncentrace laktátu bývá zvýšena u ischemických vaskulárních lézí.

**Chloridy** – fyziologická hladina je 120-132 mmol/l, od jejich stanovení se upouští. Ke snížení chloridů dochází u výraznějších poruch hematolikorové bariéry zejména u specifických zánětů jako je tuberkulózní meningitis

### 5.2. Speciální biochemické vyšetření

#### 5.2.1. Albumin

Albumin je syntetizován v játrech, do likvoru se dostává jedině přestupem přes hematolikorovou bariéru. Slouží k posouzení funkčnosti této bariéry. Pro vyhodnocení poruchy funkce hematolikorové bariéry má koncentrační kvocient CSF/sérum albumin vyšší senzitivitu než absolutní koncentrace albuminu v likvoru.

Z koncentrace albuminu v likvoru a séru vypočítáváme tzv. albuminový kvocient  $Q_{\text{alb.}} = \text{CSF}_{\text{alb.}} / S_{\text{alb.}}$ . Hodnoty albuminového kvocientu závisí nejen na „propustnosti“ (permeabilitě) bariéry v užším slova smyslu, ale i na obratu (cirkulaci) likvoru. Závisí také na věku. Po narození je jeho hodnota zvýšená a postupně klesá asi do 3 měsíců věku a potom s věkem mírně stoupá. Normální hodnota  $Q_{\text{albuminu}}$  je ve věkové kategorii 40 let asi  $7,0 \cdot 10^{-3}$ . Mírně porušenou bariéru (což je vzestup  $Q_{\text{albuminu}}$  asi  $0,5 \cdot 10^{-3}$ ) nacházíme u chronických neuroinfekcí nebo roztroušené sklerózy. Střední poruchu bariéry (zvýšení hodnoty  $Q_{\text{albuminu}}$  do dvojnásobku normální hodnoty) můžeme vidět např. u virových infekcí a těžká porucha bariéry (vyšší než dvojnásobek), je typická pro bakteriální meningitidy, polyradikuloneuritidu Guillain-Barrého typu, maligní meningeální infiltrace nebo herpetické encefalitidy. I při velmi vysokých hodnotách  $Q_{\text{albuminu}}$  si hematolikorová bariéra zachovává část své funkčnosti. Přestává plnit svou funkci až při metabolickém a energetickém rozvratu na úrovni membrán, tedy při stavech neslučitelných se životem.

### 5.2.2. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny – zdrojem imunoglobulinů v likvoru je plazma, odkud imunoglobuliny přecházejí při poruše bariéry nebo intratékální syntéza v likvorovém prostoru při onemocnění CNS spojeném s imunitní reakcí.

### 5.2.3. Intratékální syntéza imunoglobulinů

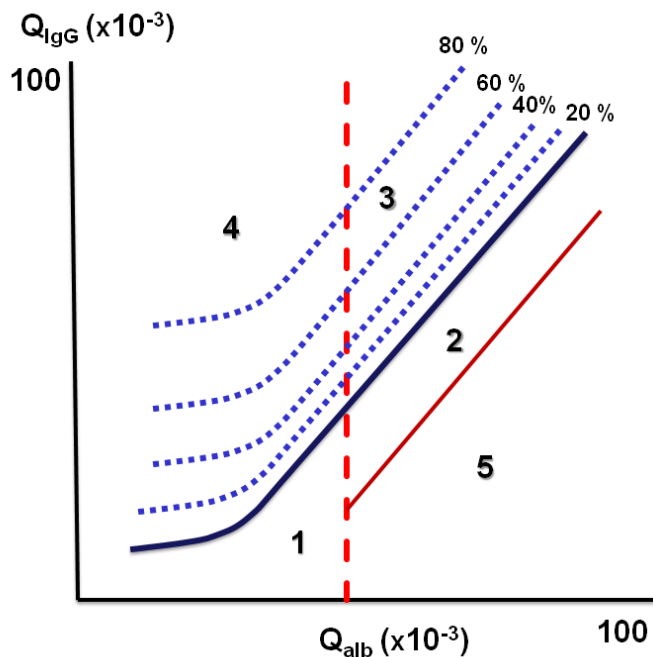
Intratékální syntéza protilátek v centrálním nervovém systému pochází z perivaskulárních infiltrátů lymfocytů B, které lokálně proliferují, dozrávají v plazmocyty a produkují příslušné protilátky. Na rozdíl od známé a charakteristické reakce v séru, kde dochází k přechodu z protilátkové tvorby ve třídě IgM do třídy IgG v subakutní nebo chronické fázi nemoci, není takový přechod v intratékální syntéze přítomen. Tvorba protilátek ve třídě IgG/IgM/IgA je přítomna již na počátku onemocnění a zůstává relativně konstantní. Intratékální protilátková odpověď nemusí znamenat vždy akutní onemocnění, ale může být přítomna u zánětlivého onemocnění CNS, které se manifestuje zvýšeným počtem buněk v likvoru, dále u zbytkové intratékální syntézy po proběhlém onemocnění nebo u chronického zánětlivého autoimunitního procesu v CNS. Moderní likvorová diagnostika roztroušené sklerózy je dnes založena především na průkazu intratékální syntézy imunoglobulinů.

### 5.2.4. Kvantitativní určení intratékální syntézy imunoglobulinů

Zvýšení koncentrace imunoglobulinů v likvoru může být důsledkem jejich zvýšené koncentrace v séru, poruchy hematolikorové bariéry nebo obou těchto faktorů. Dominantním transportním mechanismem přes hematolikorovou bariéru je difúze proteinů ze séra do likvoru. Dle fyzikálních zákonů difúze prostupují větší molekuly pomaleji (např. IgM) než menší molekuly (např. IgG a albumin). Důsledkem zvýšení koncentrace určitého sérového proteinu je zvýšení koncentrace téhož proteinu v likvoru, avšak gradient vyjádřený poměrem koncentrace proteinu v likvoru a séru zůstává konstantní. Při porušené hematolikorové bariéře dochází k patologickému zvýšení koncentrace proteinu v likvoru, proto je třeba stanovit albumin a příslušné



imunoglobuliny současně v séru i v likvoru. Pro klinickou diagnostiku má nejvyšší význam stanovení intratékální syntézy IgG, IgM a IgA. K průkazu intratékální syntézy imunoglobulinů se v současné době doporučuje používat rovnici dle Reibera (2001), která popisuje vztah mezi  $Q$  albuminu a  $Q$  příslušného imunoglobulinu. Tento vztah není lineární, ale hyperbolický. Hranice mezi lokální syntézou imunoglobulinů a jejich pasivním přestupem je znázorněna modrou čarou. Hodnoty nad touto linií znamenají intratékální syntézu a rozsah je vyznačen přerušovanou čarou a vyjádřen v procentech. Vertikální přerušovaná čára odděluje normální a porušenou hematolikvorovou bariéru.



Reibrův diagram

**Interpretace patologických nálezů s ohledem na funkci hematolikvorové bariéry a intratékální syntézu:**

- Oblast 1 – normální nález
- Oblast 2 – porucha funkce HLB bez intratékální syntézy
- Oblast 3 – porucha funkce HLB s intratékální syntézou imunoglobulinů
- Oblast 4 – intratékální syntéza se zachováním funkce HLB
- Oblast 5 – oblast analytických chyb

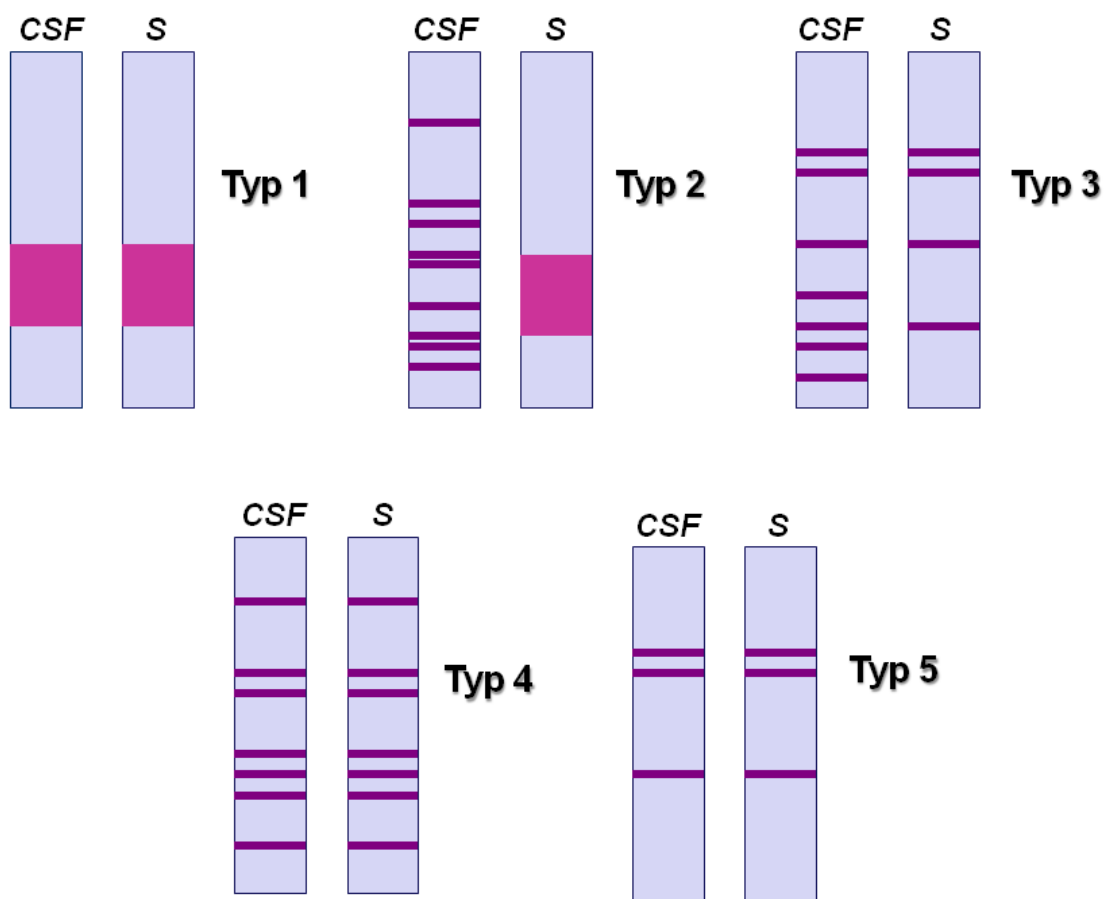
**Z diagnostického hlediska lze na základě přítomnosti intratékální syntézy jednotlivých imunoglobulinů rozlišovat stavy**

- bez průkazu intratékální syntézy Ig: časná bakteriální a virová meningitida, Guillainův-Barrého syndrom
- Intratékální syntéza s převahou IgG: roztroušená skleróza, neurolyues, chronická HIV encefalitida.
- Intratékální syntéza s převahou IgA: neurotuberkulóza, mozkový absces
- Intratékální syntéza s převahou IgM: neuroborrelióza

### 5.2.5. Kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů

Kvalitativní průkaz intratékální syntézy imunoglobulinů se provádí pomocí izoelektrické fokuzace (IEF) a následné imunochemické detekce imunoglobulinu třídy IgG. Současně je analogickým způsobem vyšetřeno sérum. Metoda izoelektrické fokuzace slouží k rozdělení látek amfoterní povahy (mají kyselé i bazické skupiny) a dělí se v gradientu pH podle svého izoelektrického bodu. Izoelektrický bod je pH, při kterém má bílkovina nulový náboj. Na základě mezinárodního konsensu je stanoveno pět typů rozdělení při IEF likvoru a séra.

1. typ: normální stav bez průkazu oligoklonálních pásů (OP)
2. typ: OP v likvoru, které nejsou v séru (zejména u roztroušené sklerózy)
3. typ: OP v obou materiálech navíc OP přítomné v likvoru (neuroborrelióza, mozkomíšni skleróza)
4. typ: identické OP v likvoru a séru (paraneoplastické syndromy, SLE)
5. typ: identické OP v likvoru a séru v úzkém gradientu (monoklonální gamapatie)



Základní typy rozdělení při IEF

U pacientů s diagnózou roztroušené sklerózy je stanovení oligoklonálních pásů pozitivní až v 98%. Oligoklonální pásy nacházíme i u infekčních procesů, u autoimunitních nebo systémových onemocněních.

### 5.2.6. Intratékální produkce specifických protilátek

Molekuly imunoglobulinů přecházejí z periferní krve do likvorových prostor i za fyziologických podmínek při neporušené funkci hematolikorové bariéry. Porovnáním stanovení koncentrací celkového nespecifického imunoglobulinu v likvoru a séru s koncentracemi specifického imunoglobulinu (např. antiherpetického, antispalničkového, antiborreliového imunoglobulinu určité třídy) můžeme zjistit, zda koncentrační kvocient je u specifického imunoglobulinu stejný jako u celkového nespecifického IgG, nebo zda je vyšší. Pokud je vyšší, znamená to, že dochází k intratékální produkci specifických protilátek – tzn. vytváří se specifické protilátky přímo v CNS. Poměr těchto kvocientů se nazývá protilátkový index (AI) a za normální hodnoty se považují hodnoty 0,7-1,3. Hodnoty nad 1,4 jsou patologické a indikují intratékální syntézu specifických protilátek.

Významné výsledky v likvorové diagnostice roztroušené sklerózy přineslo zavedení specifické reakce MZR (morbilli, rubeola a varicella zoster), která umožňuje detekovat některá chronická onemocnění CNS již v době prvních klinických příznaků. Jako reakce MZR se označuje intratékální syntéza specifických protilátek třídy IgG proti neurotropním virům spalniček, zarděnek a planých neštovic. Přítomnost reakce MZR je vysvětlována moderní teorií imunitní sítě, ve které každá imunologická reakce indukovaná konkrétním antigenem postihuje celou imunitní síť. Kromě specifických protilátek proti vyvolávajícímu agens je zvýšena produkce mnoha dalších protilátek a autoprotiátek – tzv. polyspecifická imunitní odpověď. Koncentrace jednotlivých specifických protilátek v séru a likvoru jsou měřeny a vyjadřují se matematicky tzv. protilátkovým indexem (AI).

## 6. Spektrofotometrie likvoru

Provádí se při podezření na intermeningeální krvácení. Je přínosné v časných stádiích, kdy ještě nejsou změny v cytologickém obrazu. Spektrofotometrie je 10x citlivější než lidské oko, pozitivní nález můžeme získat i u napohled bezbarvého likvoru. Provádí se registrací absorbance v oblasti viditelného světla (380 – 700 nm), detekuje se přítomnost oxyhemoglobinu a bilirubinu (Obr.23).

Nález oxyhemoglobinu může značit čerstvé krvácení – objevuje se za 4-8 hod po začátku krvácení. Maximum absorbance má při 415 nm, 2 minoritní vrcholy jsou při 540nm a 580 nm. U bilirubinu je maxima dosaženo 3.den po začátku krvácení, přetrvává 3 týdny, maximum absorbance je při 450 nm.

## 7. Mikrobiologické vyšetření a detekce patogenních agens

Mezi základní postupy patří kultivace se stanovením citlivosti, mikroskopické a bakteriologické vyšetření nátěru. Specifické protilátky se vyšetřují v séru i v likvoru, prokazuje se jejich intratékální syntéza. Specifickou a velmi citlivou metodu představuje polymerázová řetězová reakce (PCR) pro průkaz detekce

DNA patogenních agens (nejčastěji se používá pro stanovení borrelií a herpetických virů).

## 8. Perspektivy vývoje likvorologického vyšetření

V současnosti se obrací zájem k novým možnostem v diagnostice degenerativních a metabolických onemocnění centrálního nervového systému a také prionových infekcí. Zatím se jedná spíše o experimentální výzkum. Např. pro diagnostiku Creutzfeldtovy-Jakobovy choroby svědčí zvýšená koncentrace **14-3-3 proteinu** v likvoru, který je v současné době považován v likvoru za obecný marker značné tkáňové destrukce. Likvorová diagnostika Alzheimerovy choroby se opírá o stanovení  **$\beta$ -amyloidu,  $\tau$ -proteinu a fosfo-  $\tau$ -proteinu**. Protein  $\beta$ -amyloid je součástí amyloidových plak, které se akumulují v mozku. Protein  $\tau$  se vyskytuje v cytoskeletu CNS. U Alzheimerovy choroby se nachází snížené hodnoty  $\beta$ -amyloidu a zvýšené hodnoty  $\tau$ -proteinu. Dále se hodnotí jejich vzájemný poměr, index  $\tau/\beta$ -amyloid, který bývá zvýšený. Dalším parametrem, který může přispět k diagnostice neurodegenerativních onemocnění, je cystatin C. **Cystatin C** patří mezi inhibitory cysteinových proteáz, v systémovém oběhu je poměrně stabilní a v klinické praxi je znám jako ukazatel odhadu glomerulární filtrace. U pacientů s neurodegenerativními chorobami CNS nacházíme zvýšené hodnoty cystatinu C v likvoru. Strukturální protein **S-100** patří do rodiny proteinů vázících vápník. Zvýšená hodnota S100 může svědčit pro poruchu hematolivorové bariéry a často je známkou neuronového poškození.  **$\beta$ 2 mikroglobulin** patří k proteinům, které jsou přítomny ve všech tělních tekutinách. Vzestup jeho koncentrace v likvoru nacházíme u stavů obecně spojených s aktivací a množstvím lymfocytárních a makrofagických elementů. U pacientů s roztroušenou sklerózou byla zkoumána přítomnost neuronálních protilátek – v likvoru byly nalezeny protilátky proti molekulám myelinového obalu. Jde především o **myelinový bazický protein (MBP)** ze skupiny strukturálních proteinů, který je základem myelinu. Protilátky proti MBP odrážejí míru myelinové destrukce.

## 9. Průkaz likvorey

Někdy je důležité určit, zda u pacienta po úrazu hlavy je sekret vytékající z nosu jen zánětlivý exsudát z nosní sliznice nebo mozkomíšní mok. V tomto případě se jedná o závažný stav s komunikací likvorových cest a nosní dutiny, ohrožující pacienta přestupem bakteriální flóry na meningy. Detekce likvoru je možná stanovením parametru specifického pro likvor. K dispozici je stanovení **beta trace proteinu** – enzymu, který je syntetizován v buňkách chorioideálního plexu. V likvoru se nachází v koncentracích 20-30x vyšších než v séru. Dalším parametrem je  **$\beta$ 2 transferin**. Ze sérového transferinu se v likvorových prostorách odštěpí zbytky kyseliny sialové (mozkovou neuraminidázou), vzniká asialotransferin, který lze detekovat pomocí elektroforézy s imunofixací v  $\beta$ 2 zóně globulinů (Obr. 24)

