

Mozkomíšní mok a další tělní tekutiny

Mozkomíšní mok, jeho tvorba a funkce

Mozkomíšní mok (*liquor cerebrospinalis*, *cerebrospinal fluid* = CSF) patří mezi *transcelulární* tekutiny. Je to čirá kapalina chudá na buňky, s malým obsahem bílkovin (oproti plazmě obsahuje asi 200x méně bílkovin), izoosmolální s plazmou, ale s jiným zastoupením iontů – v likvoru jsou nižší koncentrace iontů sodných, draselných a vápenatých, anorganických fosfátů a hydrogenuhličitanů a vyšší koncentrace hořečnatých a chloridových iontů. Iontové složení likvoru je stálé, mění se velmi málo i při velkém kolísání iontového složení plazmy a rovnováha se ustavuje pomalu.

Asi polovina likvoru se tvoří *ultrafiltrací plazmy* (dialyzát krve), druhá polovina vzniká *aktivní sekrecí* v cévní pleteni na mozkových plenách ve 3. a 4. komoře mozkové (60%) a přestupem intersticiální tekutiny mozkové tkáně (40%). Objem likvoru u dospělého člověka je 150 – 180 ml, asi 20% se nachází v mozkových komorách, zbytek okolo mozku a míchy. Denní produkce je 500 – 600 ml. Mozkomíšní mok je resorbován do žilního (80%) a lymfatického (20%) systému. Mezi tvorbou a resorpcí je rovnováha.

Podrobný popis komor včetně náčrtů lze nalézt na této adrese: <http://www.nan.upol.cz/neuro/cd925.html>

Zajímavý obrázek z oblasti MRI technologie: http://en.wikipedia.org/wiki/File:NPH_MRI_272_GILD.gif

Funkce likvoru jsou

- mechanická ochrana mozku a míchy
- ochrana proti invazi patogenů
- drenážní funkce nahrazující v CNS lymfatický oběh (odsun odpadních produktů – laktátu, oxidu uhličitého aj.)
- přísun živin, hormonů a neurotransmiterů
- udržování stálého objemu, tlaku, osmolality, pH a složení iontů (homeostatická funkce)

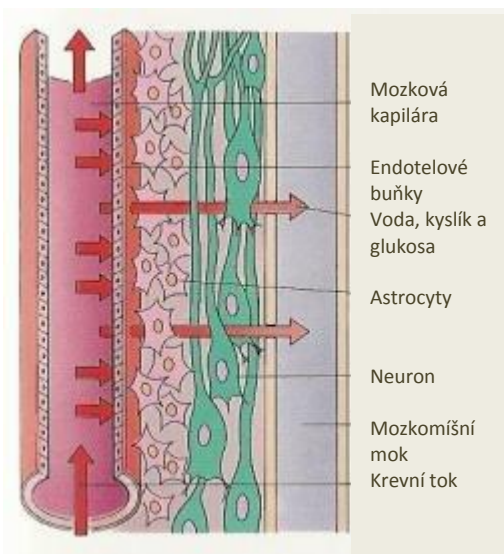
Hematoencefalická bariéra

Výměna látek mezi krví a CNS, mezi krví a likvorem a mezi likvorem a CNS je do značné míry omezena. Výsledkem jsou, mimo jiné, výše uvedené značné rozdíly v koncentracích látek v krvi a v likvoru. Tato regulace kinetiky přesunu látek z krve do tkáně CNS, z krve do likvoru a z likvoru do nervové tkáně a výstupů těchto látek z mozku do krve se nazývá *hematoencefalická bariéra*, (*blood-brain barrier, BBB*).

Pod pojem „hematoencefalická bariéra“ se obvykle zahrnují tři pojmy označující tři bariéry, založené na různém strukturálním podkladu.

Jsou to

- *Hematoencefalická bariéra*, jejíž podklad tvoří zejména struktura mozkových kapilár, která je jiná než u kapilár systémových; omezena je zejména možnost transportu přes kapilární stěnu; toto omezení je dáno především charakterem tzv. „těsných spojů“ (*tight junctions*) mezi endotelovými buňkami mozkových kapilár, takže výměna látek je umožněna v podstatě jenom pinocytózou (*viz* Kapitola 19, str. 19-17)). Důležitou roli ve funkčnosti hematoencefalické bariéry má i souhra mezi neurony, gliovými buňkami a endotelovými buňkami mozkových kapilár.
- *Hematolikorová bariéra*, tj. procesy probíhající v *plexus chorioideus* (což je párová cévní pletěň vyklenující se do prostoru čtvrté komory), je rovněž zejména fyzikálního charakteru, struktura kapilár je však obdobná struktuře systémových kapilár a těsné spoje jsou propustnější, než jak tomu je u kapilár mozkových; vzestup permeability je významný pro tvorbu likvoru právě v této oblasti, na druhé straně ale, bariéra zde může být poměrně snadno narušena.
- *Likvorencefalická bariéra*; ta je předmětem diskuse, její existence je sporná.



Hematoencefalická bariéra

Kromě popsaných fyzikálních *mechanických bariérových mechanismů*, které jsou dané charakterem kapilár, velmi obtížně propustných díky těsným spojením endotelových buněk kapilár a organizací neuroglií, se na regulaci výměny látek mezi krví a mozkomíšním mokem podílejí i *bariérové mechanismy enzymatické*,

tvořené různými transportními přenašeči a aktivními transportními systémy, které umožňují v mozkové tkáni koncentrovat různé metabolity (glukóza, některé aminokyseliny, puriny, prekurzory transmiterů aj.) a zbavovat se jiných látek (např. enzymatická inaktivace enkefalinů, peptidů, rychlá metabolizace serotoninu a acetylcholinu aj.). Tyto mechanismy bývají souhrnně zvány *biochemická bariéra*, případně *intra/extracelulární bariéra*. Takto jsou regulovány zejména látky rozpustné ve vodě a ionty, látky rozpustné v tucích a plyny mohou přes hematoencefalickou bariéru přecházet.

Hematoencefalická bariéra umožňuje selektivní průnik látek buď oběma směry, nebo jen jedním směrem. Selektivní průnik látek může být úplný, částečný nebo žádný. Bariéra ovlivňuje výměnu látek, která stále probíhá mezi krví, likvorem a mozkem. Neporušená hematoencefalická bariéra omezuje vstup většiny látek a zabraňuje přestupu patogenních buněk a imunokompetentních buněk. Díky této bariéře je složení likvoru poměrně stálé a z *případných změn v jeho složení, lze usuzovat na různé (patologické) děje v organismu.*

Změny ve složení likvoru odrážejí

- patologické děje nervové tkáně (metabolismus buněk, degradace buněk)
- imunitní reakci
- poruchu hematoencefalické bariéry

Závisejí na vzdálenosti patologického procesu od likvorových cest a na cirkulačních poměrech.

Z uvedeného vyplývají **indikace k vyšetření likvoru**, což jsou zejména

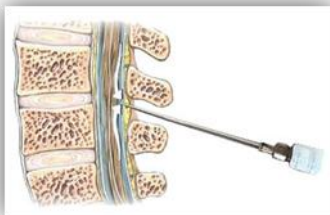
- zánětlivá onemocnění CNS, jako jsou meningitida, encefalitida, myelitida a zánětlivě-autoimunní demyelinizační onemocnění (roztroušená skleróza)
- onemocnění míchy
- systémová autoimunitní onemocnění (systémový lupus erythematos)
- náhlé příhody mozkové (zejména nitrolební krvácení) a úrazy
- degenerativní onemocnění (Alzheimerova a Parkinsonova choroba aj.)
- nádorová onemocnění
- jiná onemocnění, u kterých se může vyskytovat patologický nález v likvoru (epilepsie, psychiatrická onemocnění, sekundární postižení CNS zapříčiněné diabetes mellitus, hypotyreózou, selháním jater či ledvin, alkoholismem, deficitem vitamínů B₁, B₁₂ aj.).

Odběr likvoru

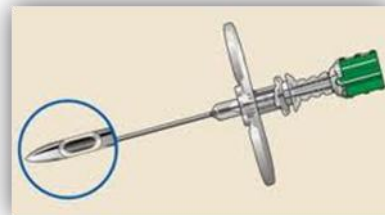
Odběr likvoru se provádí nejčastěji **lumbální punkcí**, tj. vpichem *atraumatické jehly* do páteřního kanálu v dolní části zad.



Poloha pacienta při odběru



Vpich do páteřního kanálu



Atraumatická jehla se zaobleným koncem a otvorem po straně

Krvavý likvor se odebírá postupně do 3 zkumavek po 1 – 2 ml. Vzhledem k vyššímu riziku arteficiální kontaminace krví u prvních zkumavek je doporučováno zaslat na cytobiochemické (a biochemické) vyšetření poslední zkumavku (poslední porci). Spektrofotometrii se doporučuje provést také (zejména) z poslední porce, avšak s ohledem na výše zmíněné riziko kontaminace prvních vzorků krví (obzvláště vzorku prvního) je vhodné vizuálně zhodnotit a porovnat první a poslední vzorek (mělo by být zřetelné projasňování) a spočítat v těchto vzorcích erythrocyty, počet erythrocytů by v poslední porci měl být nižší než v porci první. Krvavý likvor je nutno zcentrifugovat a odlít supernatant, který by měl být v případě arteficiálního krvácení bezbarvý.

Vzorek je nutno dopravit bezprostředně po odběru do laboratoře, cytologii a stanovení glukózy a laktátu je nutno provést nejpozději **do 1 hodiny po odběru**, centrifugace krvavého likvoru by měla proběhnout **ideálně do 15 minut od odběru**, což je v praxi často obtížně realizovatelné, nicméně časový interval od odběru k centrifugaci by neměl překročit jednu hodinu.

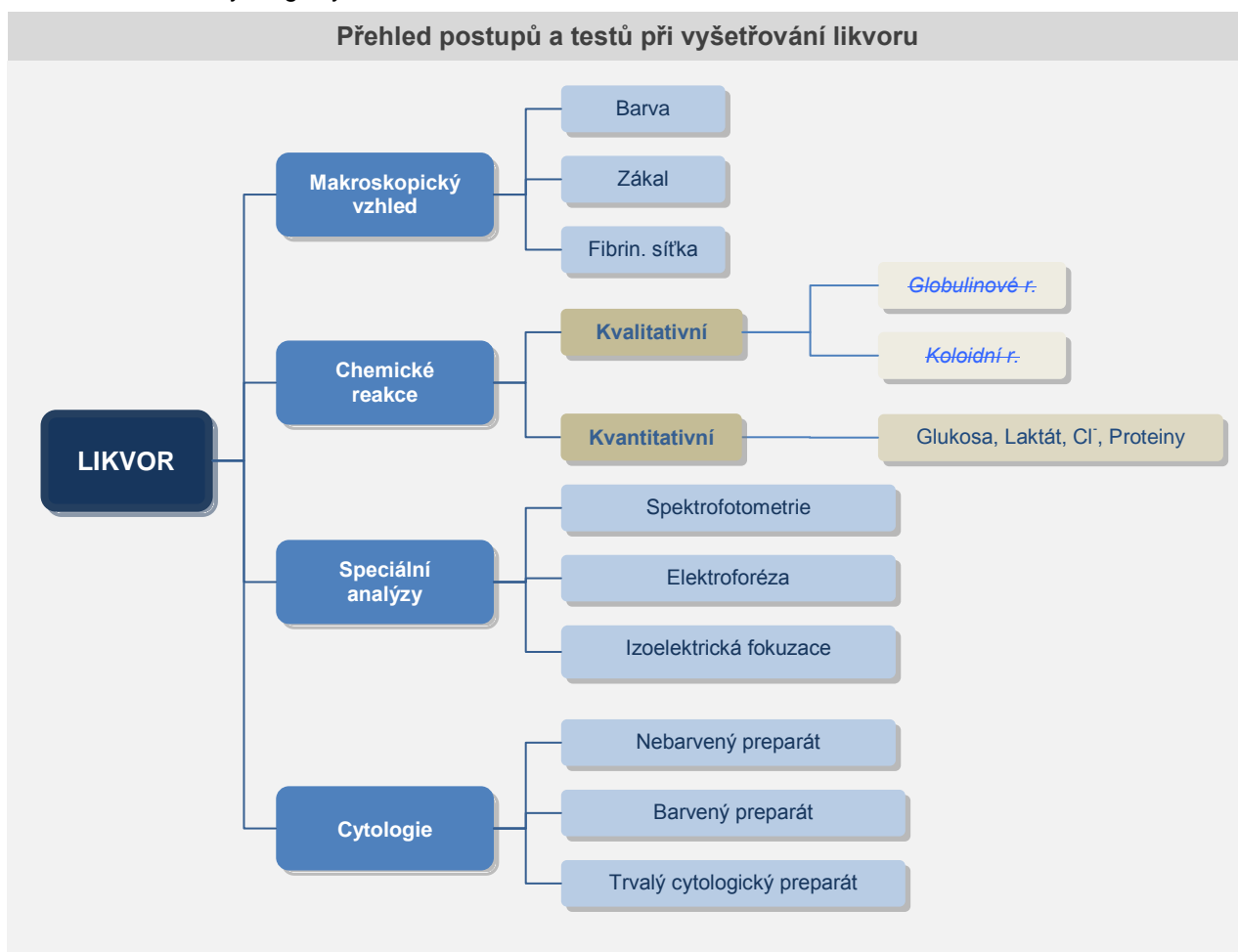
K hodnocení stavu hematoencefalické bariéry a *intratékální* syntézy imunoglobulinů je zapotřebí zaslat současně vzorek krve.

Intrathecalis [lat., *intra* uvnitř, *theca* pouzdro] = intratékální, uvnitř obalů (mozkomíšních), uvnitř stěny folikulu vaječniku

Vyšetřování likvoru

U odebraného likvoru

- se hodnotí makroskopický vzhled,
- provádějí se chemické reakce kvalitativní a kvantitativní,
- provádějí se případně i analýzy speciální a
- hodnotí se také cytologicky.



Makroskopické hodnocení vzhledu

Barva

- *bezbarvý a čirý* – normální nález
- *červené zabarvení* signalizuje krev – při zranění cév při punkci je supernatant po centrifugaci bezbarvý; je-li supernatant *žlutě zabarven (xantochromní)*, jedná se o krvácení do likvorového prostoru, které trvalo déle jak 3 hodiny (začíná se projevovat odbourání hemoglobinu na bilirubin), zabarvení přetrvává 2 – 3 týdny (jiné prameny uvádějí 3 – 4 týdny); je-li koncentrace bilirubinu v séru >170 μmol/l, může bilirubin přecházet ze séra do likvoru i při normální funkci BBB. *Xantochromní* likvor se může někdy vyskytnout i u novorozenců, kde se toto zbarvení dává do souvislosti např. s prací matky před porodem a nikoliv s nějakou nemocí.

Zákal

- způsobený krvácením
- způsobený přítomností leukocytů
 - lehký zákal je způsoben přítomností 100 – 300 buněk/μl (tuberkulózní meningitida, tj. *bazilární*)
 - silný zákal je způsoben přítomností 2000 - 10000 buněk/μl (hnisavá meningitida, tj. *purulentní*)

Fibrinová síťka

Způsobená zvýšením hladiny fibrinogenu v likvoru při těžší poruše BBB (těžší hnisavé záněty CNS) – po 24 hodinách se vytvoří síťka fibrinu, po zatřepání zkumavkou se z ní vytvoří sraženina. Fibrinová síťka je přítomna i u *Froinova [= kompresivního] syndromu* - pod překážkou dochází k těžké poruše BBB a do likvoru proniká albumin s navázaným bilirubinem a vysokomolekulární fibrinogen. Likvor je intenzivně xantochromní, místo fibrinové síťky může dojít až ke srážení huspeninové hmoty, nad kterou je několik kapek žlutého moku s bílkovinou a je téměř bez buněk.

Chemické analýzy

Kvalitativní zkoušky

Globulinové reakce

Jednoduché reakce, jejich pozitivita znamená zvýšení hladiny globulinu, často bývá zvýšena také celková bílkovina

- *Pandyho zkouška*: k 1 ml nasyceného roztoku fenolu ve vodě se přidá kapka likvoru; případný zákal se hodnotí na křížky
- *Ross-Jones* (vyslov *ros džouns*): 1 díl likvoru se převrství 1 dílem nasyceného roztoku síranu amonného; případný zákal se hodnotí na křížky
- *None-Appelt* (vyslov *non aplt*): po provedené zkoušce Ross-Jones se zatřepe obsahem zkumavky a zákal se hodnotí na křížky

Poznámka: tyto reakce se již neprovádějí, v běžné praxi ještě někde „přežívá“ *Pandyho reakce*, užitečnější je kvantitativně stanovit celkovou bílkovinu v likvoru a případně dále konkrétní bílkoviny.

Koloidní reakce

patologicky pozměněné bílkoviny likvoru způsobují posun stupně *disperzity koloidů*, což se projeví zákalem, změnou barvy nebo vyvločkováním. Nejužívanější bývala zkouška *zlatosolová*, kdy se hodnotila změna koloidního stavu *roztoku zlata* vlivem likvoru naředěného geometrickou řadou. Zkouška byla nahrazena elektroforézou a následně stanovením jednotlivých proteinů, případně izoelektrickou fokusací.

Kvantitativní zkoušky

Glukóza (glykorachie)

Enzymatické stanovení běžnými metodami (viz kreditní kurz Bílkoviny)

Referenční interval hodnot: 2,5 – 3,9 mmol/l

↑ hyperglykorachie: zvl. u encefalitid

↓ hypoglykorachie: zvl. u meningitid

Laktát

Stanovení např. enzymovou elektrodou na glukometru, nebo enzymovou reakcí, jejíž princip je totožný s principem stanovení katalytické koncentrace laktátdehydrogenázy (viz Kapitola 12, str.12-11).

Klinický význam má vyšší hladina laktátu k rozlišení bakteriální a virové meningitidy (anaerobní spotřeba glukózy bakteriemi). *Diskriminační hodnotou je 4,2 mmol/l* (u bakteriální meningitidy se nacházejí průměrně hodnoty kolem 7 mmol/l, ale i mnohem vyšší; jeho původ je především v metabolismu bakterií).

Referenční interval hodnot: 1,2 – 2,1 mmol/l

Hodnoty glukózy a laktátu se uplatňují při hodnocení **energetického metabolismu likvorového kompartmentu** výpočtem *koeficientu energetické bilance (KEB)*, který je definován

$$KEB = 38 - 18 \times \frac{CSf_{LAC}}{CSf_{GLU}}$$

Hodnota KEB při vyšší míře anaerobního metabolismu, např. u purulentní meningitidy, klesá výrazně i do záporných hodnot.

Chloridy

Stanovení pomocí ISE nebo coulometricky (viz např. kreditní kurz Voda, elektrolyty, acidobazická rovnováha a kyslík).

Referenční interval hodnot: 120 – 132 mmol/l

- ↓: snížené hodnoty se nacházejí obecně u meningitid
- ↓↓↓: velmi snížené hodnoty - tuberkulózní meningitida (bazilární), ukazuje na zánětlivé změny plen

Poznámka: Současné názory jsou takové, že význam stanovení chloridů v likvoru je malý. Obecně se mohou snížené hladiny chloridů nacházet u hnisavých zánětů (nejen tuberkulózních, jak se dříve předpokládalo).

Bílkoviny

Stanovení pyrogalolovou červení nebo turbidimetricky (viz kreditní kurz Bílkoviny)

Celkové bílkoviny (*proteinorachie*): hladina je za fyziologického stavu asi 200x nižší než v plazmě. Z celkového množství bílkovin v likvoru je asi 80% sérového původu (různé mechanismy přenosu přes BBB), narušená BBB (těžký zánět, pod obstrukcí) propouští bílkoviny ve větší míře.

Zbývajících asi 20% celkových bílkovin v likvoru je mozkového původu:

- dochází k syntéze proteinů (*imunoglobuliny*, β_2 -*mikroglobulin*), tzv. *intratékální syntéza*
- dále v likvorovém prostoru dochází k *modifikaci* sérových proteinů (*prealbuminu*, *transferinu*) a
- 2% tvoří *strukturní bílkoviny* (gliové buňky).

Klinický význam má hyperproteinorachie – způsobená

- poruchou BBB,
- intratékální syntézou při aktivaci imunitního systému
- nebo zvýšením koncentrace strukturních proteinů při poškození buněk CNS.

Zvýšené hodnoty celkových bílkovin mohou pocházet i z arteficiálního krvácení nebo z nádoru.

Referenční interval hodnot: 0,15 - 0,40 g/l

Diskriminační hodnota pro odlišení bakteriální meningitidy od serózní je 1,0 g CB/l.

Speciální chemická vyšetření

Spektrofotometrie likvoru

Registruje se absorpční křivka v rozsahu 350 – 600 nm, která se potom zpracovává (konstrukce tečny ze dvou bodů v oblastech 350-400 nm a 430-530 nm, odtud se odečtou hodnoty absorbancí a hodnotí se dle schématu). Provádí se při podezření na intermeningeální krvácení. (*Intermeningeální*, též zvané *subarachnoidální*, *SAK*; primárně se jedná o extracerebrální krvácení do likvorových cest mezi *arachnoideu* a *pia mater/omozečnicí*). Poskytuje přibližné údaje o stáří krvácení, slouží k průkazu protrahovaného či opakovaného krvácení.

Poznámka: Likvor musí být bezprostředně po odběru odstředěn a nelze užít korkovou zátku.

Elektroforéza bílkovin likvoru

Za fyziologického stavu je elektroforeogram likvoru odlišný od sérového. Čím těžší porucha BBB, tím více se elektroforeogram likvoru blíží sérovému.

Pro technické obtíže (zahuštění likvoru, případně speciální barvení jednotlivých frakcí) se od elektroforézy likvoru upouští.

Izoelektrická fokuzace bílkovin

Podrobnosti k metodě v hodinách instrumentální analýzy.

Používá se k průkazu *lokální syntézy imunoglobulinů*. Současně se analyzují likvor a sérum a hodnotí se tzv. „zrcadlový obraz“. Nález *oligoklonálních pruhů v likvoru, které chybějí v séru* svědčí o lokální syntéze imunoglobulinu. Tento obraz se nachází u roztroušené sklerózy a u různých infekčních chorob (spalničky, zarděnky, Lymská borelióza aj.),

Kvocient Q_x

Kvocient $Q_x = \frac{CSF_x}{S_x}$ vyjadřuje poměr nejdůležitějších látek v likvoru a v séru a je všeobecně přijímaným indikátorem funkce hematoencefalické bariéry
(CSF= cerebrospinal fluid, S = sérum, x = koncentrace bílkovin, glukosy, chloridů... v příslušném systému)

Např. pro albumin, bude rovnice ve tvaru: $Q_{Alb} = \frac{CSF_{Alb}}{S_{Alb}}$
Obvyklé hodnoty Q_x

Bílkoviny (Q_{prot})	0,002	0,2% (tj. 0,2% obsahu v likvoru vzhledem k séru)
Glukóza (Q_{gluk})	0,64	64%
Chloridy (Q_{cl})	1,14	114%

Jednotlivé bílkoviny v mozkomíšním moku

Albumin

Stanovení pomocí BCG (viz Kapitola 10, str.)

Hladinu albuminu lze použít jako měřítko funkčnosti BBB, zjišťuje se hodnota Q_{alb} (tj. poměr hodnot albuminu v likvoru a v séru):

BBB	mírně porušená	středně porušená	těžce porušená
Q_{ALB}	$7,3 - 10 \cdot 10^{-3}$	$10 - 20 \cdot 10^{-3}$	$> 20 \cdot 10^{-3}$

Albuminový kvocient se používá i k výpočtu intratékální syntézy imunoglobulinů (podle *Reiberova vztahu*, resp. *grafu*)

Referenční interval hodnot: 0,134 – 0,237 g albuminu/l

Imunoglobuliny

Zdrojem imunoglobulinů v likvoru je buď

- sérum (přechod přes porušenou BBB) nebo
- lokální syntéza v CNS (encefalitida, roztroušená skleróza, borelióza aj.).

Za fyziologickou hodnotu se považuje ještě 10% syntéza příslušného imunoglobulinu (IgG, IgA, IgM) a představuje fyziologickou imunitní reakci proti starým a poškozeným buňkám. Vyšší hodnota je považována za důkaz lokální syntézy příslušného imunoglobulinu přímo v CNS a získává se z *Reiberova diagramu* (nebo výpočtem z Reiberova vztahu – viz Reiberův graf na str. 8).

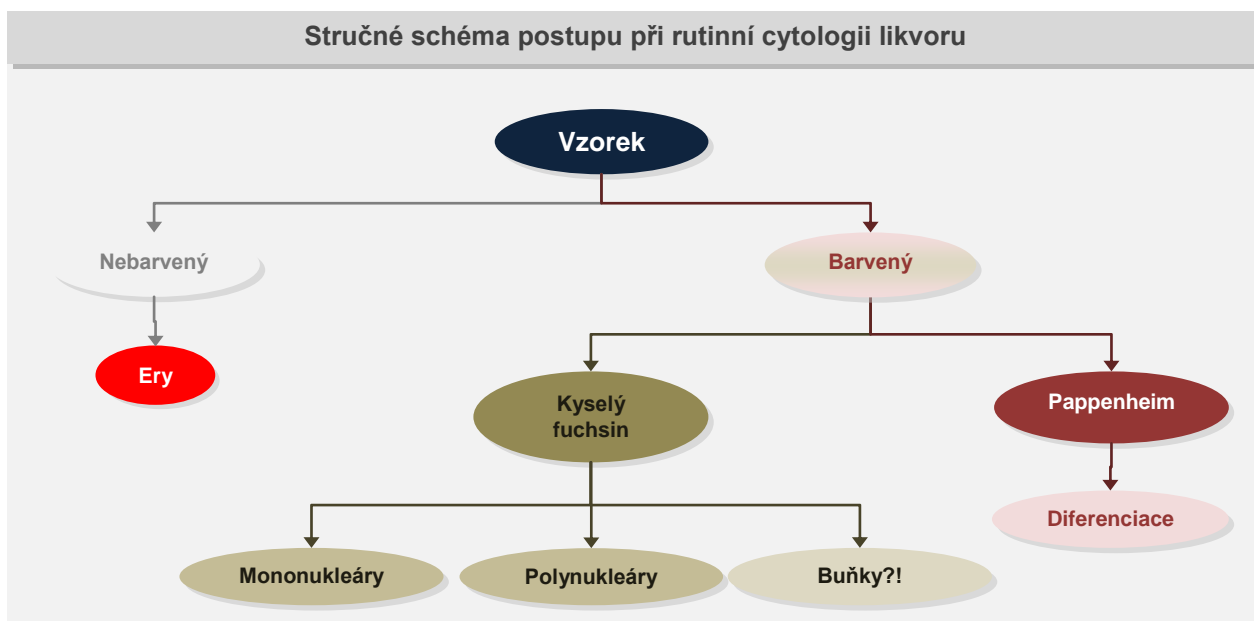
Imunoglobuliny se stanovují imunochemickými metodami, vzhledem k jejich koncentracím většinou metodikami v gelovém prostředí (imunodifúze), případně nefelometricky.

Referenční interval hodnot pro IgG: 0,05 – 0,061 g/l

Reaktanty akutní fáze (CRP, C3, C4, haptoglobin, prealbumin, transferin): chovají se jako *zánětlivé markery*; jsou syntetizovány jaterní buňkou, do likvoru se dostávají přes BBB, obraz se mění podle stupně poškození BBB (čím těžší porucha, tím větší molekuly se do likvoru dostanou).

Další bílkoviny: β_2 -mikroglobulin (aktivace imunitního systému, degenerativní procesy, cévní mozková příhoda – CMP, aj.), *markery tkáňové destrukce* (destrukce mozkové tkáně tvořené strukturálními lipidy – při nekrotizujících zánětech, degenerativních onemocněních, nádorech, CMP aj.) = *apolipoproteiny* (zvyšuje se jejich koncentrace; viz též Kapitola 11, str. 11-2).

Cytologie likvoru



Provádí se nejpozději **do 1 hodiny po odběru materiálu** (hrozí rozpad elementů) ve *Fuchsově-Rosenthalově komůrce*:

- v nebarveném preparátu se stanoví počet erytrocytů
- v barveném preparátu (kyselý fuchsin) se stanoví počet leukocytů, které se diferencují na *polynukleáry* (elementy se segmentovaným jádrem, „segmenty“) a *mononukleáry* (elementy bez segmentovaného jádra)
- sleduje se výskyt
 - buněk z výstelky likvorových cest
 - nádorových buněk
 - leukemických buněk

Referenční interval hodnot: 3 buňky/ μ l (hodnoty získané počítáním v komůrce představují hodnoty elementů ve 3 μ l, referenční interval hodnot pro toto vyjádření je 10/3, což znamená 10 buněk na 3 μ l) Novorozenci mají referenční interval hodnot 30/ μ l (90/3).

Počet elementů je závislý na *celkovém stavu imunitního systému*, na *typu imunitní reakce* a na *stadiu onemocnění*. Kromě počtu elementů je důležitá i *celulární skladba* (obsah jednotlivých typů buněk), která může být i při normálním počtu patologická.

- připraví se *trvalý cytologický preparát* (po předchozím zahuštění buď pomocí *cytocentrifugy*, nebo s využitím *cytosedimentace*, barvení podle *Pappenheima*): hodí se pro *diferenciaci* (nikoliv pro stanovení počtu buněk); vyšetření bývá doplněno
 - barvením na lipidy k průkazu lipofágů (průkaz úklidové reakce po destrukci nervové tkáně)
 - barvením na nukleoly k průkazu maligních buněk
 - průkazem Fe při podezření na krvácení

Referenční interval hodnot: v likvoru jsou normálně přítomny pouze *mononukleáry* (65-80% tvoří lymfocyty), ojediněle se mohou vyskytovat buňky výstelky likvorových cest.

Erytrocyty a segmenty se nacházejí při

- arteficiálním krvácení
- v novorozeneckém likvoru
- za patologických stavů.

Detailní cytologické zkoumání likvoru a z něho vyplývající závěry zde nebude popisováno. Cytologie často pomáhá při diferenciaci mezi *serózní (nehnisavou) meningitidou*, nejčastěji virového původu, a *meningitidou hnisavou (purulentní)*, obvykle bakteriální etiologie.



Cytocentrifuga

Charakteristické nálezy u serózní a purulentní meningitidy

Typ meningitidy	Převládající buňky [μl^{-1}]	Bílkovina [g/l]	Q _{glu}	Laktát [mmol/l]	Chloridy [mmol/l]
Serózní (virová)	Mononukleáry ($10^2 - 10^3$)	< 1,0	> 0,4	< 4,2	> 120
Hnisavá (bakteriální)	Polynukleáry ($10^3 - 10^4$)	> 1,0	< 0,4	> 4,2	< 120

Co píše o tuberkulosní meningitidě prof. MUDr. Vladimír Vondráček, DrSc., ve své knize *Lékař dále vzpomíná* (Avicenum, Praha 1977, str. 28): „*Basilární (tuberkulosní) meningitis byla choroba strašná, do objevu streptomycinu absolutně smrtelná. Byla tragická, až metafyzicky děsivá, začínala plíživě, trvala mnoho týdnů, kdy rodiče kolísali mezi špetkou naděje a zoufalstvím. Dítě zmiralo za značného utrpení působeného bolestmi hlavy, s výkřiky.*“

Vyšetření likvoru má stále klíčovou roli v diagnostice řady neurologických diagnóz, i když jeho indikace se zejména s nástupem *magnetické rezonance* zmenšila.

Doporučení ČSKB k vyšetřování mozkomíšního moku lze nalézt na adrese:

<http://www.cskb.cz/Doporuceni/likvor.htm>

Adresa skript *Základy obecné a klinické biochemie* s názorným popisem likvoru: <http://ukb.lf1.cuni.cz/skripta/kap436.pdf>

Další užitečný odkaz:

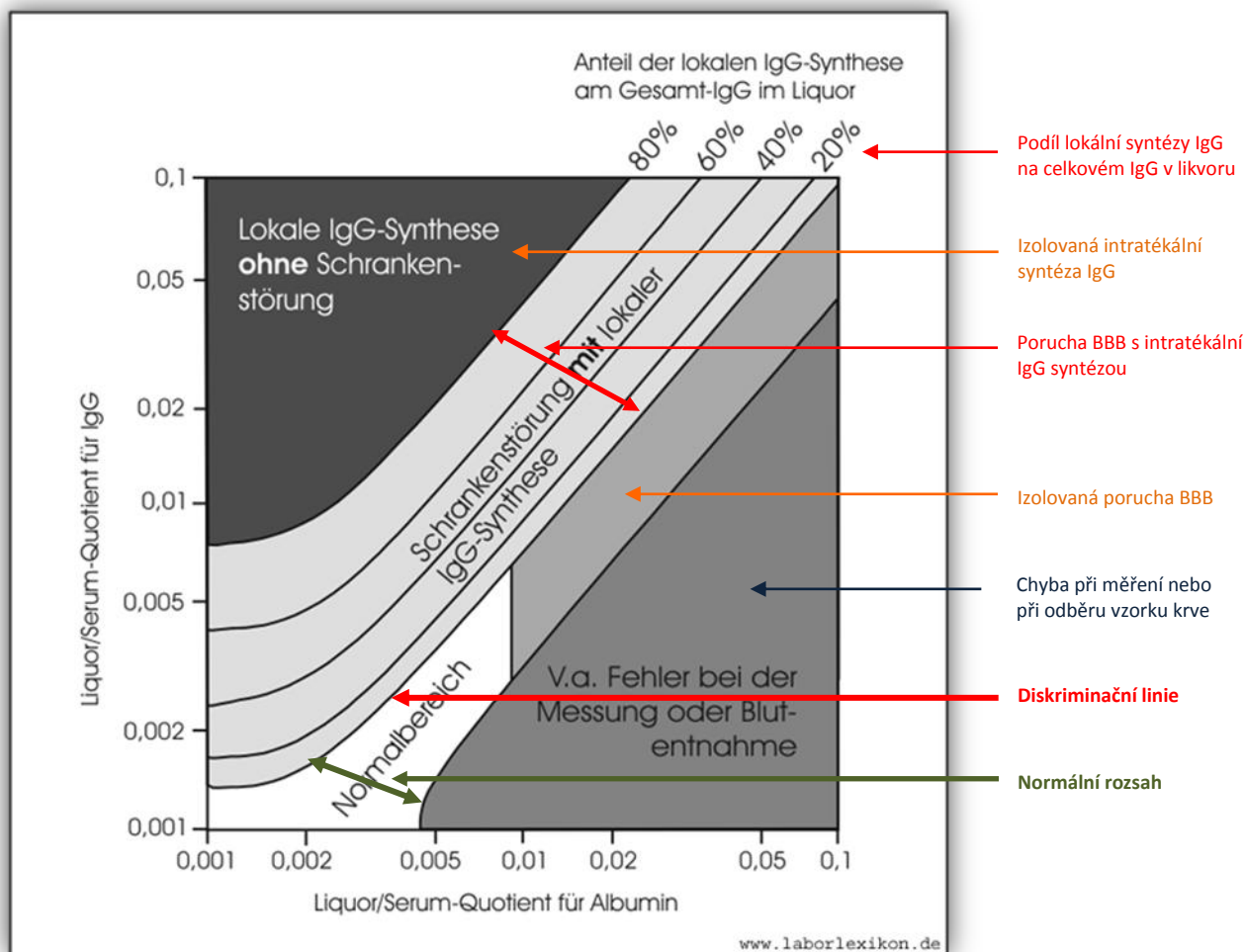
<http://www.fnplzen.cz/atlas/likvor.aspx?polozka=atlas&filtr=oligo>

Přehledný článek o speciální likvorologii:

<http://www.google.cz/url?sa=t&rct=j&q=intermeninge%C3%A1ln%C3%AD&source=web&cd=3&ved=0CFcQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.roche-diagnostics.cz%2Fdownload%2F0309%2Flikvor.pdf&ei=JHLhT8-gMdcj-gax77WfAw&usq=AFQjCNH6wBYgOt7Vs5oqDvzqZQPJJSyJ1w>

Dodatky k mozkomíšnímu moku

Reiberův graf, Reiberův diagram, „Reibergram“



Reiberův diagram pro IgG: Vztah mezi kvocientem Q_{IgG} a kvocientem Q_{Alb}

Graf vyjadřuje závislost Q_{Ig} na Q_{Alb} . Závislosti jednotlivých kvocientů v diagramu / grafu jsou hyperbolické funkce, které se dají matematicky vyjádřit a vypočítat. Vypočítávají se pro jednotlivé třídy imunoglobulinů. Výpočtem se určují normální meze, typ poruchy a kvantifikuje se intratékální syntéza příslušné třídy imunoglobulinů. Totéž lze (jednodušeji) odečíst z grafu.

Na obrázku je znázorněno grafické vyjádření závislosti Q_{IgG} na Q_{Alb} . Pokud bychom chtěli vycházet z rovnic a vydávat výsledky číselně, bylo by třeba vytvořit z těchto funkcí počítačový program, jinak by byl výpočet příliš zdlouhavý.

Referenční hodnoty jsou **záporné** či **nulové** (v grafu jsou *pod* diskriminační linií, resp. v oblasti normálních hodnot).

Pozitivní hodnoty (v grafu jsou *nad* diskriminační linií) jsou **průkazem intratékální syntézy imunoglobulinů**. Např. pacienti s diagnózou roztroušené sklerózy mají pozitivní nález u 60 až 80% případů (diagnostická senzitivita je 0,6 – 0,8).

Zájemce o hlubší poznání odkazují na práci

H. Reiber, J.B. Peter, *Journal of the Neurological Sciences* 184 (2001) 101 –122.

Lze ji najít na adrese: <http://www.horeiber.de/pdf/16.pdf> (ze které je i přetištěna „Výsledková zpráva“ na str. 15-11).

Následující dva obrázky ukazují jako dodatek k tématu program (v originále psaný v Excelu) pro zpracování nálezů CSF. Jedná se pochopitelně pouze o obrazovou dokumentaci a jednu z možností jak zpracovávat výsledky těchto vyšetření.

Výsledkový list vyšetření mozkomíšního moku

Zde napište název vašeho pracoviště:

Zde uveďte vedoucího laboratoře:

VYŠETŘENÍ MOZKOMÍŠNÍHO MOKU číslo:

Jméno:
 Klin. dg.:
 ODD:
 IČZ:

Rodné č.
 Datum:
 Odbornost:
 Var.sym.:

Vzhled: I.	CB-CSF	g/l (0,2-0,4)	Na-CSF	mmol/l (145-165)
II.	CB-S	g/l (65-80)	Na-S	mmol/l (136-148)
III.	Glukóza-CSF	mmol/l (2,2-4,2)	K-CSF	mmol/l (2,4-3,4)
IV.	Glukóza-S	mmol/l (3,8-5,6)	K-S	mmol/l (3,7-5)
	Laktát-CSF	mmol/l (1,2-2,1)	Cl-CSF	mmol/l (120-130)
	Laktát-S	mmol/l (0,7-1,8)	Cl-S	mmol/l (95-110)

Počet elementů: (do 10/3)
 Erythrocyty: (neg.)
 Pandy: (do +)

Spektrofotometrie:	Bilirubin:	OxiHb:	MetHb:
I.	nevyšetřeno	0	0
II.	0	0	0
III.	0	0	0
IV.	0	0	0

Cytologický závěr:**Biochemický závěr:**

Výsledkový list vyšetření proteinových frakcí likvoru

Zde запиšte název vašeho pracoviště:

Zde uveďte vedoucího laboratoře:

VYŠETŘENÍ PROTEINOVÝCH FRAKCI LIKVORU číslo: Jméno: Klin. dg: Odd.: IČZ: Rodné č.: Datum: Odbornost: 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:

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

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

Hodnocení proteinogramu:

Výsledková zpráva z Neurochemické laboratoře Univerzity v Göttingen

H. Reiber, J.B. Peter / Journal of the Neurological Sciences 184 (2001) 101–122

103

CSF Report

Client / Sender		Patient	
Tel:		XXXXXXX, YYYY * 5 / 7 / 63	
Differential diagnostic question		Punct. date: 6 / 5 / 99	
Inflammatory process?		Physician:	

Puncture			Visual inspection				Hgb			Vol.		TP (Pandy)		
LP	CP	VP	turbid	xanth.	bloody	artif. bl.	0	+	++	+++	6 mL	0	+	++

Cells

Cellcount	3	/mm ³	RBC	/mm ³
Lymphoc.	80	%	Mononucl.c.	20
			PMNR (n.)	%
			Plasmac.	few

Other Cells

Activ. B-Cells	% of Lymphocytes

Proteins

CSF		Serum		Q(CSF/Ser) · 10 ³		Intrathec. fraction	
Tot. Prot.	270	mg/L					
Albumin	111	mg/L	41.4	g/L	Q _{Alb} =	2.7	
IgG	56	mg/L	8.8	g/L	Q _{IgG} =	6.3	73 %
IgA	1.9	mg/L	2.2	g/L	Q _{IgA} =	0.9	%
IgM	2.1	mg/L	2.0	g/L	Q _{IgM} =	1.0	56 %

Oligoclonal IgG – Bands in CSF (Type 2)

Specific Antibodies

Measles-AI = 9.2	HIV-AI =	Borrel.-AI(IgG) =
Rubella-AI = 12.3	CMV-AI =	Borrel.-AI (IgM) =
VZV-AI = 8.1	Toxopl.-AI =-AI =
HSV-AI = 1.0-AI =-AI =

Lactate 1.6 mmol/L CSF

Interpretation

Normal CSF	<input type="checkbox"/>	Normal CSF proteins	<input type="checkbox"/>
B-CSF Barrier dysfunction	<input type="checkbox"/>	Cellcount increased	<input type="checkbox"/>
Inflammatory proc. in CNS	<input checked="" type="checkbox"/>	Spec. Ab-Synthesis in CNS	<input checked="" type="checkbox"/>

Comment:
Chronic inflammatory process. DD: Multiple sclerosis or autoimmune disease with involvement of CNS

Fig. 1. CSF Report of the Neurochemistry Laboratory, University Göttingen. The data pattern originates from a patient with definite multiple sclerosis. At time of first diagnostic puncture, the clinician suspected an inflammatory process. By CSF analysis, a normal cell count, few plasma cells, lack of barrier dysfunction, together with an intense intrathecal humoral immune response (IgG_{IF} = 73% and IgM_{IF} = 56%) and oligoclonal IgG (interpretation type 2) were observed in CSF. These basic data suggested testing further for MRZ antibodies. The observed polyspecific intrathecal immune response (intrathecal synthesis of measles, rubella and varicella-zoster antibodies, with AI values >1.5) support the interpretation as a chronic inflammatory process of autoimmune type, already at the time of first clinical symptoms or in monosymptomatic cases. This statement extends significantly the information possible to obtain from oligoclonal IgG in any acute and chronic inflammatory processes. As this polyspecific MRZ reaction is not specific for MS, the differential diagnostic discrimination between multiple sclerosis and an autoimmune disease with involvement of the CNS needs further analysis, e.g. for antinuclear antibodies in blood. This type of integrated CSF data report is implemented in the on-line evaluation program of Dade-Behring (DSS-COM) or in the CSF-Report of Beckman-Coulter (Germany).

Kontrolní otázky k části věnované mozkomíšnímu moku

1. Definujte, co si představujete pod pojmem *hematoencefalická bariéra*.
2. Víte co znamená zkratka *BBB*?
3. Uvědomte si, kde a jak se tvoří mozkomíšní mok
4. Jaké jsou funkce mozkomíšního moku?
5. Jaké je složení mozkomíšního moku, jak se liší složení moku od složení plazmy?
6. Mají klinický význam změny ve složení likvoru? Pokud ano, jaký?
7. Podle čeho se (zejména) pozná těžší porucha BBB?
8. Proč se provádějí/prováděly *globulinové reakce*? Které to jsou/byly?
9. Proč je v minulé otázce použit i minulý čas?
10. Co je to hyperproteinorachie? Jaký má klinický význam?
11. Co je to *intratékální syntéza* imunoglobulinu?
12. Do jaké míry je intratékální syntéza ještě fyziologická?
13. Jak se odebírá likvor? Kolik porcí?
14. Jak urgentně musí být vzorek likvoru dopraven ke zpracování do laboratoře?
15. Jak se zpracovává likvor, co se hodnotí?
16. Kdy se vzorek mozkomíšního moku centrifuguje?
17. Co je to *kvocient Q_x* ?
18. Kdy se vzorek barví? Co se hodnotí?
19. Kdy se vzorek nebarví? Co se hodnotí?
20. Co je to *Reibrův diagram*? Jaký má význam?

Transsudát a exsudát

Někdy je potřeba vyšetřit další tělní tekutinu získanou z různých tělních prostor, velmi často je na laboratorních pracovištích, aby určili, o jaký typ tekutiny se jedná. V principu se může jednat o

- **transsudát (transsudatum, lat., trans přes, sudare potit)**, jedná se o výpotek, nahromadění tekutiny v tělních dutinách při poruchách krevního oběhu nebo o
- **exsudát (exsudatus, lat., exsudare vypotit)**, v tomto případě jde o výpotek jiného původu, a to o zánětlivou tělní tekutinu

	Transsudát	Exsudát
Vznik	Porucha faktorů podílejících se na hospodaření s tekutinami, např. při <ul style="list-style-type: none"> • zvýšeném tlaku v cirkulaci • snížení koloidně osmotického tlaku plazmy aj. 	<ul style="list-style-type: none"> • Porucha sliznic patologickým procesem (⇒ zvýšená propustnost kapilár) • Ucpání lymfatických cév (např. nádorem)
Složení	Neliší se od složení plazmy kromě koncentrace bílkovin, která je < 15 g/l	Podstatným rozdílem od složení transsudátu je koncentrace bílkovin , která je > 30 g/l
Klinický význam	Není potřebná žádná další analýza	Může být původu zánětlivého, nádorového atd., proto je potřebná další diferenciální diagnostika speciálními biochemickými, cytologickými a bakteriologickými vyšetřeními

Metody vyšetřování transsudátů (T) a exsudátů (E):

Poznámka: vzhledem ke klinickému významu je rozhodující **rozlišení E a T**

Fyzikální vyšetření

Barva:

Zákal:

Viskozita:

Hustota:

Rivaltova zkouška:

většina **E** i **T** jsou **nažloutlé, červená** barva je způsobena příměsí krve
 přítomnost zákalu svědčí o **E**, rozlišení mezi chylózní tekutinou a **E** se provede centrifugací – chylózní tekutina se nerozdělí
 se vzrůstem viskozity tekutiny vzrůstá pravděpodobnost, že se jedná o **E**
 tekutiny s hustotou větší než 1015 kg/m³ jsou **E**
 po přidání kapky zředěné kyseliny octové do tekutiny se kolem kapky vytvoří obláček vysrážených bílkovin (denaturace bílkovin kyselinou octovou) – pozitivní reakci poskytují **E**

Chemické reakce

Bílkoviny:

LD:

Glukóza:

AMS:

pH:

Cholesterol:

kvantitativní stanovení pomáhá při rozlišení mezi **T** a **E**, u hraničních hodnot nestačí; počítá se i poměr protein z punktátu k proteinu sérovému, kde hodnoty >0,5 a <0,5 informují o pravděpodobnosti, že se jedná o exsudát, resp. transsudát

slouží rovněž k rozlišení **T** a **E**, zvýšené hodnoty celkové aktivity LD svědčí pro **E** (zvl. u **E** karcinomatózního)

stanovení hladiny glukózy má význam při diagnostikování původu **E** – snížené hladiny (u **E**) svědčí pro původ zánětlivý, např. parapneumonický, TBC, maligní nebo revmatoidní

zvýšená hladina se vyskytuje u některých pankreatitid, ruptury jícnu a nádorů

běžně se nestanovuje, význam má u zánětlivých (parapneumonických) **E**, kde hodnota nižší jak 7,2 signalizuje, že se **E** spontánně neresorbuje má význam pro diferenciální diagnostiku **E** (příkladem může být *chylothorax*, což je nahromadění lymfy/chylu v pohrudniční dutině při poškození hrudního mízovodu např. úrazem, poruše jeho odtoku např. při útlaku nádorem aj. chylo-; thorax chylózní – připomínající chylus).

Mikroskopická analýza

Posuzuje se přítomnost a druh buněčných elementů v pleurální tekutině

Ostatní vyšetření

Elektroforéza, stanovení mukoproteinů, případně imunoglobulinů, fibrinogenu, triacylglycerolů, laktátu, výpočet poměru hladiny celkových bílkovin ve výpotku a v séru

Přehled doporučených vyšetření a jejich hodnot pro rozlišení T a E

(podle Racka, některé hodnoty jsou mírně odlišné od výše uvedených)

Parametr	Transsudát	Exsudát
Vzhled	čirý, lehce nažloutlý	žlutý, často zakalený
Celková bílkovina [g/l]	< 30	> 30
Albumin [g/l]	< 12	> 12
Bílkovina ve výpotku/bílkovina v séru	< 0,5	> 0,5
Fibrinogen	negativní	pozitivní
Cholesterol [mmol/l]	< 1,15	> 1,15 *)
Triacylglyceroly [mmol/l]	< 0,5	> 0,5 *)
Hustota [kg/m ³]	< 1015	> 1015
pH	7,4	< 7,4
Glukóza [mmol/l]	jako v plazmě	< 1,7 **)
Laktát [mmol/l]	< 1,85	> 1,85
LD [μkat/l]	< 5,3	> 5,3
Buňky [počet/μl]	< 100 (lymfocyty, mezotelie)	> 100 (polynukleáry, nádorové buňky)

*) u nejtěžších zánětů se blíží hodnotě v plazmě

**) u nejtěžších zánětů se blíží 0

Kontrolní otázky k této stati

1. Jakými mechanismy se tvoří transsudát a exsudát?
2. Čím se vzájemně liší?
3. Co je to Rivaltova zkouška?
4. Které další zkoušky připadají v úvahu?

Plodová voda

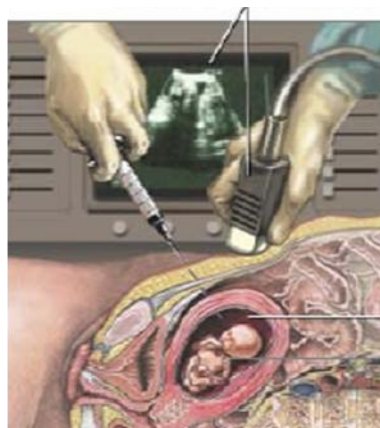
Plodová voda obklopuje vyvíjející se plod v plodovém vejci. Slouží jako nárazník proti mechanickým vlivům a podílí se na metabolismu plodu (výměna mezi plodem a plodovou vodou). V prvních měsících je její objem několik ml, v 38. týdnu až 1 litr (obvykle kolem 800 ml). Obsahuje vodu, aminokyseliny, bílkoviny, močovinu, kreatinin, kyselinu močovou, glukózu, minerály, enzymy, hormony a organické kyseliny. V průběhu těhotenství se složení plodové vody mění. Odebírá se *amniocentézou*, tj. vpichem přes břišní stěnu.

Analýza plodové vody

Analýzou plodové vody lze

- detekovat hemolytické onemocnění novorozence
- zjistit zralost plic plodu
- provést část screeningu závažných vrozených onemocnění

zařízení pro ultrazvukovou diagnostiku



plodová voda
plod (foetus)

Odběr plodové vody
(amniocentéza)

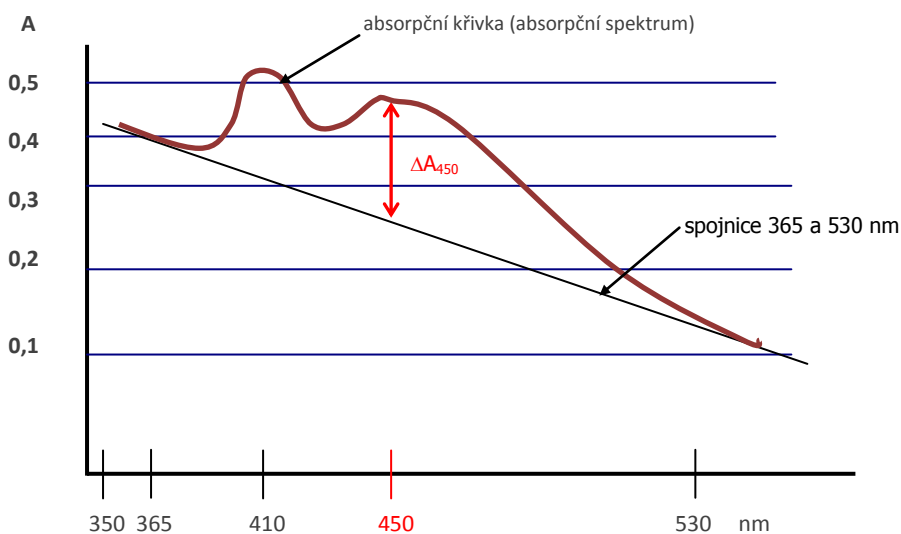
Detekce hemolytického onemocnění novorozence

Příčinou onemocnění jsou protilátky matky přecházející přes placentu do krevního oběhu plodu a způsobující hemolýzu jeho krvinek. Protilátky mohou být namířeny proti kterémukoliv povrchovému antigenu erytrocytů (*A, B, Rh, Kell, Duffy, Kidd a další*). Nejznámější příčinou bývá senzibilace Rh(D) negativní matky proti D antigenu v Rh systému Rh pozitivního plodu při předchozím těhotenství. Užitečným vyšetřením v těchto případech bývá stanovení *nekonjugovaného bilirubinu* v plodové vodě. Vzhledem k tomu, že koncentrace bilirubinu v plodové vodě je příliš nízká (asi 0,2 – 0,5 $\mu\text{mol/l}$) nelze jej stanovit běžnými metodami. Využívá se v tomto případě přímé spektrofotometrie při 450 nm.

Princip

Absorpční křivka (spektrum) plodové vody neobsahující významné množství bilirubinu je v oblasti 365 až 550 nm téměř exponenciální. V semilogaritmické stupnici je grafem prakticky přímka. Odchyłka od přímky při 450 nm (ΔA_{450}) je přímo úměrná množství bilirubinu v plodové vodě a odečítá se v Lileyho grafu, dělicím oblast (rozdílových) absorbancí na tři pásma podle ohrožení plodu, „1“ znamená nejmenší ohrožení (viz dále).

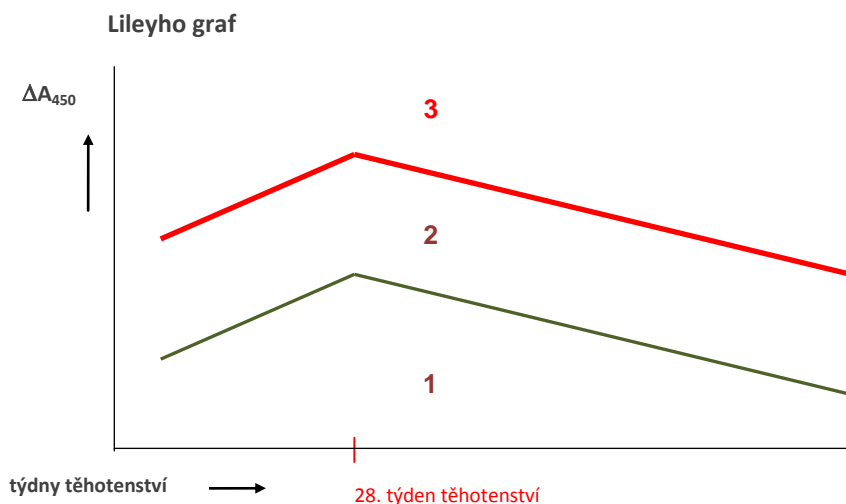
Absorpční křivka 365 – 550 nm



Provedení

- plodová voda se zcentrifuguje a proměří se absorpční křivka
- spojí se přímkou hodnoty absorbancí pro 365 a 550 nm
- spustí se kolmice z hodnoty absorbance při 450 nm na spojnici absorbancí 365 a 550 nm a změří se hodnota rozdílu ΔA_{450}
- v *Lileyho*^{*)} *grafu*^{**)} se zjistí, do které zóny pro příslušný týden těhotenství spadá hodnota ΔA_{450}

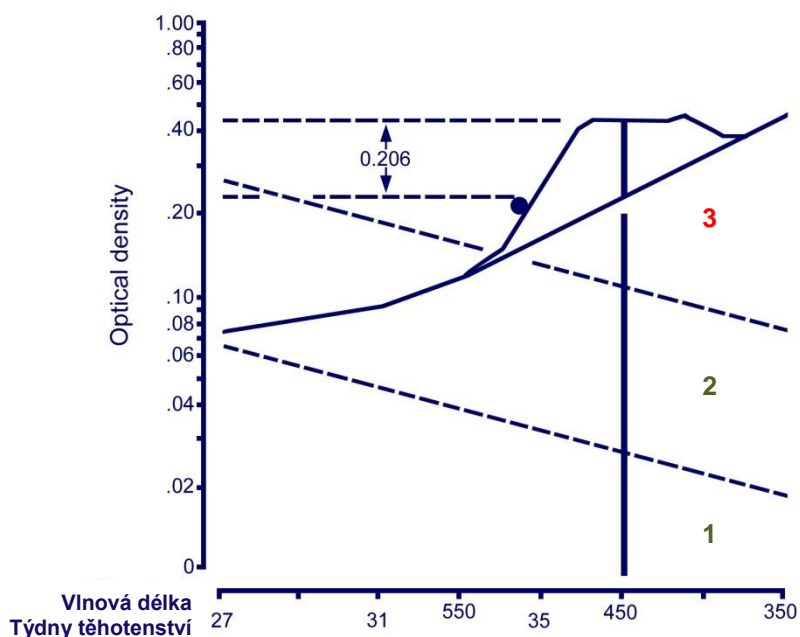
^{*)}výslovnost Liley = lajlj; angl. [lajlee]; ^{**)}viz str.17



Interpretace Lileyho grafu

Zhruba platí, že hodnoty ve spodní části grafu, v zóně „1“ resp. „2“, znamenají buď žádné, nebo malé ohrožení plodu, hodnoty v horní části grafu, v zóně „3“, pak znamenají, že plod nejspíš zemře; od 28. týdne těhotenství by hodnoty bilirubinu měly klesat, takže určitě nebezpečí (tj. známku hemolýzy) znamená i neklesající či narůstající hodnota ΔA_{450} i v „bezpečné“ zóně. Tato skutečnost je zřejmější z grafu podle Queenana^{***}) (viz str. 15-17).

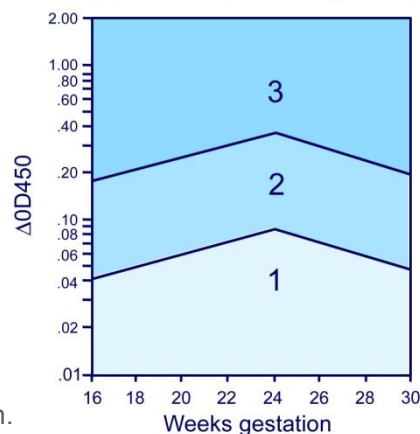
Příklad spektrofotometrické analýzy amniální tekutiny

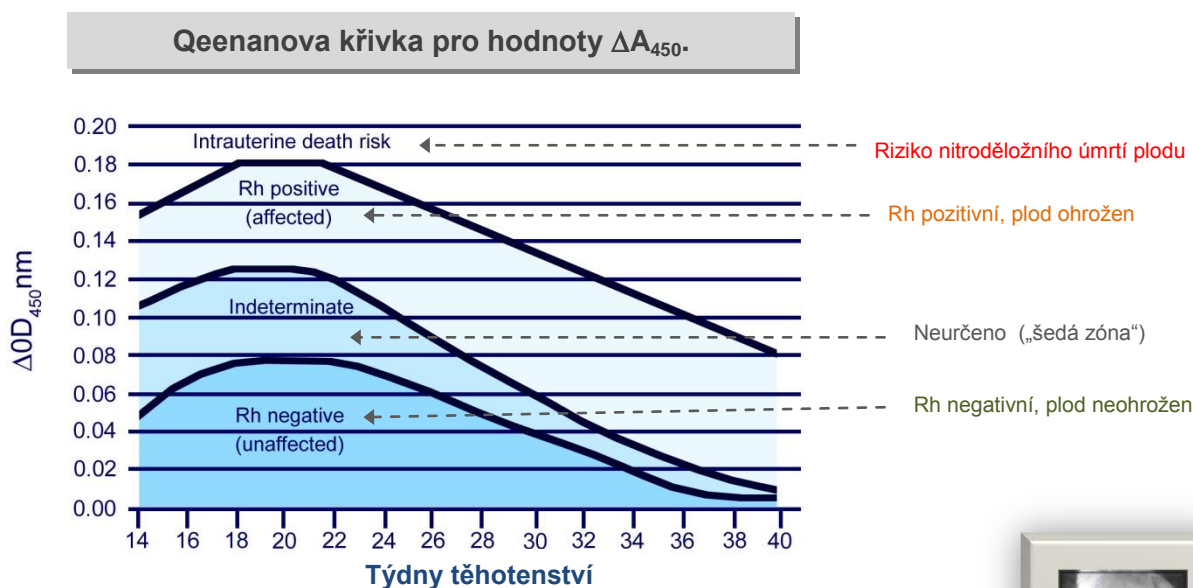


Analýza byla provedena v 35. týdnu těhotenství. Hodnota $\Delta A = 0,206$ spadá do zóny č. 3, což indikuje vážnou hemolytickou nemoc.

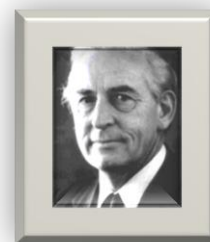
Hranice amniotických zón v Lileyho grafu
Modifikováno na délku těhotenství před 24. týdnem.

Liley amniotic zone boundaries
Modified before 24 weeks gestation





Sir **Albert William Liley** byl novozélandský chirurg, proslul svými snahami o vývoj technik podpodrýjících zdraví plodu v děloze; hodnocení plodové vody spektrofotometricky popsal v roce 1961 v práci *Liley AW. Liquor amnii analysis in management of pregnancy complicated by rhesus immunization. Am J Obstet Gynecol. 1961;82:1359-71.* V roce 1963 jako první provedl úspěšnou intrauterinní krevní transfuzi.



Albert William Liley

***^{*)} **John T. Queenan**, lékař z Rochesterské univerzity, modifikoval Lileyho graf v roce 1993, v práci *Queenan JT, Tomai TP, Ural SH, King JC. Deviation in amniotic fluid optical density at a wavelength of 450 nm in Rh-immunized pregnancies from 14 to 40 weeks' gestation: a proposal for clinical management. Am J Obstet Gynecol. May 1993;168(5):1370-6.*



John T. Queenan

Zralost plic plodu

V normálních plicích plodu je přítomen *plicní surfaktant (surfaktant faktor; viz dále)*, který pokrývá alveolární sliznici a snižuje napětí alveolární stěny během nádechu, což umožňuje objemové změny během nádechu. Je-li tohoto faktoru nedostatečné množství, mnohé alveoly kolabují a dochází k *fokální atelektase* (= ohniskové nevzdušnosti). Surfaktant faktor se také nazývá *antiatelektatický faktor*. Znalost stupně zralosti plic plodu může např. pomoci lékaři rozhodnout, zda plod bude lépe přežívat v děloze či v inkubátoru.

Surfaktant faktor je komplexní směs lipidů (90%) a bílkovin (10%) s obsahem maximálně 5% sacharidů. Většina z lipidů jsou fosfolipidy (85%) a největší část (85%) tvoří lecitiny (fosfatidylglycerol 10%, fosfatidyletanolamin 3%, fosfatidylinositol 2%).

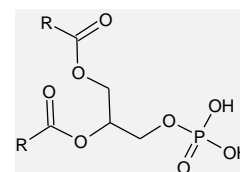
Lecitiny = fosfatidylcholin: kyselina fosfatidová esterifikovaná kvartérní amoniovou bazí – cholinem (vzorec na str. 15-18)

Kyselina fosfatidová = L-3-glycerofosforečná kyselina esterifikovaná dvěma mastnými kyselinami (= L-1,2-diacyl-3-glycerofosforečná kyselina)

Sfingomyelin = fosfosfingosid = sfingosinofosfatid, místo glycerolu obsahuje alkohol *sfingosin*

Asi 85% z těchto lecitinů obsahuje nasycené mastné kyseliny v obou pozicích, proto se hovoří o *disaturovaném* fosfatidylcholinu (DSPC = *disaturated phosphatidylcholine*, angl.). Hlavní sloučeninou DSPC je *dipalmitoylfosfatidylcholin*, dále jsou přítomny *fosfatidylglycerol*, *fosfatidylinositol* a *fosfatidyl dietanolamin*. *Sfingomyelin* je přítomen z asi 2% (viz též *Přehled lipidů* v kapitole 11).

Surfaktant faktor je produkován (*pneumocyty 2. typu*, čili *granulárními pneumocyty* či velkými *alveolárními buňkami*) od 24. týdne těhotenství, nejvíce však v posledních týdnech. Z plic plodu se dostává do plodové vody, kde může být stanoven.



Kyselina fosfatidová
R = mastné kyseliny
s dlouhým řetězcem

Metody měření plicního surfaktantu

Jedná se o stanovení:

1. Poměru lecitin/sfingomyelin (L/S poměr)
2. DSPC (disaturovaného fosfatidylcholinu)
3. Fosfatidylglycerolu
4. Indexu stability pěny
5. Fluorescenční polarizace
6. Počtu lamelárních tělísek tvořených fosfolipidy

1. Chromatografické stanovení poměru L/S a DSPC

Provedení

Příprava vzorku

- izolace fosfolipidů (etanol, chloroform, míchání, chlazení, centrifugace)
- stažení spodní chloroformové vrstvy a její odpaření do sucha
- precipitace povrchově aktivní frakce lecitinu ledovým acetonem
- odpar do sucha
- rozpuštění odparku v malém množství chloroformu

L/S poměr

- chromatografie připraveného vzorku na tenké vrstvě silikagelu (metanol, voda, chloroform = 25:4:65)
- detekce (tolidinová modř, karbonizace kyselinou sírovou)
- hodnocení (případně i denzitometrické)

Komerční preparát: např. *Fetal-Tek 200*, Helena Laboratories (TLC na bázi silikagelu), pro semikvantitativní stanovení poměru L/S

Hodnocení

LS > 2	zralé plíce
LS = 1 – 1,5	nezralé plíce
LS < 1	značně nezralé plíce

2. Stanovení disaturovaného fosfatidylcholinu (DSPC):

- do připraveného vzorku (viz výše) se přidá *oxid osmičelý*
- další postup je obdobný jak u stanovení poměru L/S (TLC chromatografie)

3. Stanovení fosfatidylglycerolu

Provádí se jako součást určení tzv. *plicního profilu*, tj. současného stanovení L/S poměru, fosfatidylglycerolu a fosfatidyl inositolu jako procentový obsah celkových fosfolipidů a DSPC jako procentový obsah celkového lecitinu. Stanovení se provádí chromatografií na tenké vrstvě (s použitím vhodných standardů)

4. Stanovení indexu stability pěny (bublínový test)

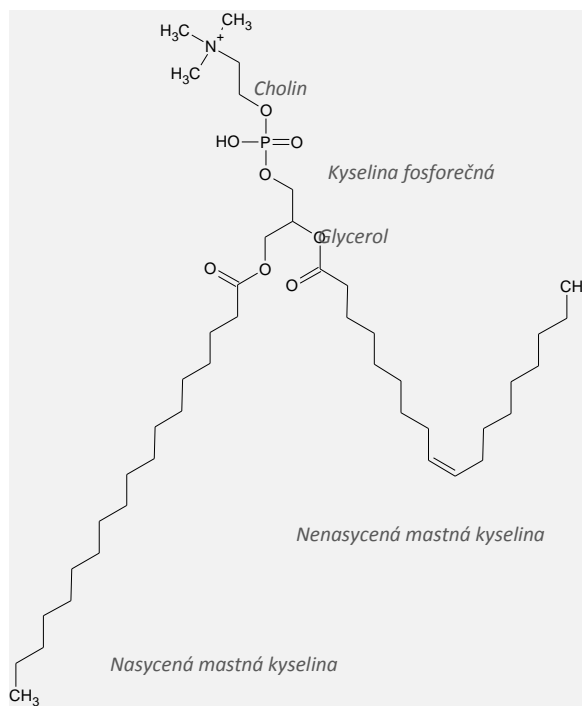
Princip testu vychází z vlastností surfaktant faktoru: je-li v plodové vodě dostatečná koncentrace faktoru, je plodová voda schopna tvořit vysoce stabilní povrchový film, který je vhodným podkladem pro pěnu. Tento film je na rozdíl od jiných pěnivých látek (jako jsou bílkoviny, žlučové kyseliny a volné mastné kyseliny) nesnadno ovlivnitelný etanolem.

Jedno z možných provedení:

1. Ředící řada: plodová voda – neředěná, ředěná v poměru 3:4, 1:2, 1:4, 1:5; vezme se po 1 ml tekutiny a přidá se 1 ml 95% etanolu
2. Protřepe se 15 sekund a nechá 15 minut stát

Hodnocení

výskyt bublinek v ředění 1:2, 1:4, 1:5	zralé plíce
výskyt bublinek jen v neředěné plodové vodě nebo v ředění 3:4	nezralé plíce



Lecitin

v β -poloze glycerolu je nenasycená mastná kyselina

5. Stanovení NBD-fosfatidylcholinu fluorescenční polarizací

NBD PC je fluorescenčně značená mastná kyselina (*1-palmitoyl-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine*), která se váže na albumin a surfaktant a výsledná polarizace fluorescence je funkcí poměru surfaktant/albumin. Tato metoda je alternativní ke stanovení poměru L/S a dává přesnější výsledky.

6. Stanovení počtu lamelárních tělísek:

Stanovuje se na počítačích částic (podobně jako krevní obraz, na stejných přístrojích)

Další testy na zralost plic

Byla navržena řada testů, z nichž některé, např. stanovení kreatininu, močoviny a lipidových charakteristik v plodové vodě jsou v souladu s věkem plodu, nikoliv však se stavem jeho plic. Testy měření turbidity plodové vody při různých vlnových délkách jsou ovlivněny i jinými složkami než pouze surfaktantem, a tudíž nedávají zcela spolehlivé výsledky, a proto se nedoporučují.

Jiné metody na zjištění stavu plodu (doplňek)

Screening závažných vrozených onemocnění

Ve druhém trimestru se provádí *screening závažných vrozených onemocnění*. Screeningu jsou podrobeny všechny těhotné ženy v 16. týdnu těhotenství. Nejčastěji se v séru těhotné ženy stanovují α_1 -fetoprotein (**AFP**), nekonjugovaný (= volný) estriol (**UE₃**), β -řetězec choriového gonadotropinu (**β -hCG**). V tomto období první dva parametry plynule rostou, β -hCG má klesající tendenci.

Referenční interval hodnot AFP: do 36. týdne až 300 $\mu\text{g/l}$, pak klesá

↑ Zvýšení hodnot AFP budí podezření na rozštěpové vady CNS (rachischiza = rachitické zuby, hypoplastické změny zejména stálých zubů s rachitickým původem v období vývoje tvrdých zubních tkání, anencefalie)

Při opakovaně nalázaných zvýšených hodnotách AFP v séru se stanoví *hodnoty AFP v plodové vodě a hodnoty acetylcholinesterázy (AChE) v plodové vodě* (zvýšené hodnoty AChE podporují diagnózu)

Stanovení acetylcholinesterázy: ELFO v polyakrylamidovém gelu se specifickým inhibitorem acetylcholinesterázy

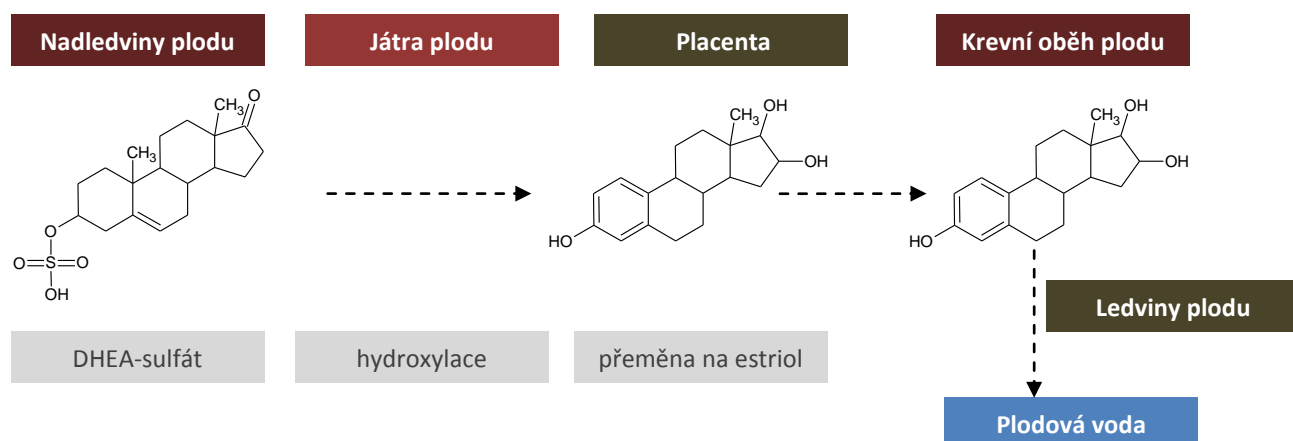
↓ Snížená hodnota AFP se nachází u matek, jejichž plod má *trisomie 21. chromozomu* (Downova choroba). Tato diagnóza se ověřuje chromosomálním vyšetřením buněk plodu získaných amniocentézou či biopsií choriových klků

Pro určení rizika rozštěpových vad CNS a Downova syndromu u plodu se využívají speciální programy, které pracují s hodnotami AFP, β -hCG a E₃ (nutné jsou především první dvě), počítají s délkou těhotenství, věkem a hmotností matky, rasou a případnou přítomností diabetu. Tyto programy poskytují spolehlivější výsledky než izolované stanovení a hodnocení, nicméně i zde musí následovat při zvýšeném riziku další vyšetření (ultrazvuk, chromozomové analýzy apod.)

Moderním neinvazivním testem pro zjištění trisomie (13, 18, 21) je tzv. **MaterniT21 Plus Test**, kterým se analyzují volné nukleové kyseliny (štěpy) plodu, nacházející se již od pátého týdne těhotenství v krvi těhotné ženy.

Stanovení **estriolu v krvi matky** slouží především k *detekci ohrožení života plodu*. Produkce estriolu je zajištěna několika na sebe navazujícími reakcemi, z nichž některé probíhají jen v *placentě*, jiné pak v *nadledvinách a játrech plodu*. Jeho tvorba tedy vyžaduje dobrou funkci placenty i zdravý plod – hovoří se o *fetoplacentární jednotce*. V nadledvinách plodu se tvoří DHEA-sulfát, ten se hydroxyluje v játrech plodu a přeměňuje na estriol (E3) v placentě, odkud se dostává do krevního oběhu plodu a ledvinami se vylučuje do **plodové vody**. Částečně proniká do oběhu matky, v játrech se konjuguje s glukuronátem a vylučuje se močí. Koncentrace během gravidity plynule stoupají, o ohrožení plodu je nutno uvažovat při zastavení nárůstu hodnot či dokonce při jejich poklesu (porucha fetoplacentární jednotky).

Fetoplacentární jednotka



Kontrolní otázky k části věnované amniální tekutině

1. Co je to amniální tekutina a jaký má význam?
2. Jak se odebírá?
3. Co se v ní hodnotí?
4. K čemu slouží Lileyho graf (a jeho modifikace)?
5. Co je to plicní surfaktant? Jaký má klinický význam?
6. V jakém vztahu k němu jsou lecitiny?
7. Jaké existují metody měření plicního surfaktantu?
8. Existují i jiné testy se stejným významem?
9. Co je to screening vrozených onemocnění?
10. K čemu slouží stanovení acetylcholinesterázy?
11. Co je to fetoplacentární jednotka? K čemu slouží? Jak se pozná její porucha?

OBSAH:

Mozkomíšní mok a další tělní tekutiny	1
Mozkomíšní mok, jeho tvorba a funkce	1
Hematoencefalická bariéra	1
Odběr likvoru.....	2
Vyšetřování likvoru	3
Makroskopické hodnocení vzhledu	3
Chemické analýzy	4
Kvalitativní zkoušky.....	4
Kvantitativní zkoušky.....	4
Speciální chemická vyšetření	5
Kvociet Qx	6
Jednotlivé bílkoviny v mozkomíšním moku.....	6
Cytologie likvoru	7
Charakteristické nálezy u serózní a purulentní meningitidy.....	8
Dodatky k mozkomíšnímu moku.....	9
Reiberův graf, Reiberův diagram, „Reibergram“	9
Výsledkový list vyšetření mozkomíšního moku	10
Výsledkový list vyšetření proteinových frakcí likvoru	11
Výsledková zpráva z Neurochemické laboratoře Univerzity v Göttingen.....	12
Kontrolní otázky k části věnované mozkomíšnímu moku	13
Transsudát a exsudát.....	14
Metody vyšetřování transsudátů (T) a exsudátů (E):.....	14
Fyzikální vyšetření	14
Chemické reakce.....	14
Mikroskopická analýza	15
Ostatní vyšetření	15
Přehled doporučených vyšetření a jejich hodnot pro rozlišení T a E	15
Kontrolní otázky k této stati.....	15
Plodová voda	16
Analýza plodové vody.....	16
Detekce hemolytického onemocnění novorozence.....	16
Zralost plic plodu	18
Metody měření plicního surfaktantu	19
Další testy na zralost plic	20
Jiné metody na zjištění stavu plodu (doplňk)	20
Screening závažných vrozených onemocnění	20
Kontrolní otázky k části věnované amniální tekutině.....	21