

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Cytologické nálezy v mozkomíšním moku

Rigorózní práce

Mgr. Kateřina Bučilová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Olomouc 2020

Konzultant práce: MUDr. Zuzana Rous, Ph.D.

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora:	Mgr. Kateřina Bučilová
Název práce:	Cytologické nálezy v mozkomíšním moku
Typ práce:	rigorózní
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Konzultant práce:	MUDr. Zuzana Rous, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Klíčová slova:	mozkomíšní mok, cytologie, mikroskopie
Počet stran:	63
Počet příloh:	0
Jazyk:	český

Souhrn

Mozkomíšní mok (cerebrospinal fluid, likvor) je tekutina, která obklopuje a chrání mozek a míchu a je získáván především lumbální punkcí. Analýza likvoru představuje důležitou součást diagnostiky řady chorob a je využívána napříč mnoha lékařskými obory. Změny probíhající v centrální nervové soustavě se odráží ve složení likvoru. Pro analýzu mozkomíšního moku je využívána celá řada laboratorních metod. Rigorózní práce podává přehled chorob, v jejichž diagnostice je analýza mozkomíšního moku významná. Experimentální část rigorózní práce je zaměřena na nejčastější cytologické nálezy. V této práci byly využity především metody kvantitativní a kvalitativní cytologie. Cílem této práce bylo poskytnout ucelený přehled cytologických nálezů, které jsou běžné v rutinní praxi v likvorové laboratoři Neurologické kliniky Lékařské fakulty Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice Olomouc.

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname:	Kateřina Bučilová
Title:	Cytological findings in cerebrospinal fluid
Type of thesis:	rigorous
Department:	Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc
Consultant:	MUDr. Zuzana Rous, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Keywords:	cerebrospinal fluid, cytology, microscopy
Number of pages:	63
Number of appendices:	0
Language:	Czech

Summary

Cerebrospinal fluid is a fluid that surrounds and protects the brain and spinal cord and is obtained primarily by lumbar puncture. Cerebrospinal fluid analysis is an important part of the diagnosis of many diseases and is used across many medical disciplines. The changes taking place in the central nervous system are reflected in the composition of the cerebrospinal fluid. A number of laboratory methods are used for the analysis of cerebrospinal fluid. Rigorous work provides an overview of diseases in the diagnosis of which the analysis of cerebrospinal fluid is important. The experimental part of my rigorous work is focused on the most common cytological findings. In my work I used mainly methods of quantitative and qualitative cytology. The aim of this work was to provide a comprehensive overview of cytological findings that are common in routine practice in the laboratory of the Department of Neurology, Faculty of Medicine, Palacký University and Olomouc University Hospital.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem rigorózní práci s názvem „Cytologické nálezy v mozkomíšním moku“ vypracovala samostatně na Neurologické klinice LF UP a FNOL za použití citované literatury.“

V Olomouci dne.....

.....

Mgr. Kateřina Bučilová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala panu prof. MUDr. Petru Kaňovskému, CSc. a kolektivu zaměstnanců Neurologické kliniky LF UP a FNOL. Děkuji také paní Jaroslavě Sklenářové za její cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovala při řešení dané problematiky. Mé poděkování patří také MUDr. Zuzaně Rous, Ph.D. za konzultace k této práci. V neposlední řadě děkuji také rodině za podporu.

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	Mozkomíšní mok	3
3.1.1	Historie	3
3.1.2	Fyziologie a funkce	4
3.2	Lumbální punkce	5
3.2.2	Indikace lumbální punkce.....	7
3.2.2.1	Purulentní záněty.....	7
3.2.2.2	Serózní záněty	8
3.2.2.3	Roztroušená skleróza	9
3.2.2.4	Subarachnoidální krvácení	9
3.2.3	Kontraindikace lumbální punkce.....	10
3.3	Algoritmus vyšetření mozkomíšního moku	10
3.4	Základní vyšetření mozkomíšního moku	11
3.4.1	Vzhled mozkomíšního moku.....	11
3.4.2	Cytologie mozkomíšního moku	14
3.4.2.1	Kvantitativní cytologie.....	14
3.4.2.2	Kvalitativní cytologie.....	15
3.5	Buněčné spektrum v mozkomíšním moku	15
3.5.1	Klasifikace cytologických likvorových nálezů	17
3.5.1.1	Fyziologický nález	18
3.5.1.2	Převažující výskyt neutrofilních granulocytů	18
3.5.1.3	Výskyt eosinofilních granulocytů	19
3.5.1.4	Převažující výskyt lymfocytárních elementů	19
3.5.1.5	Výskyt monocytárně – makrofágových elementů.....	19
3.5.1.6	Cytologický nález u subarachnoidálního krvácení	20
3.5.1.7	Cytologický nález u roztroušené sklerózy	20
3.5.1.8	Cytologie v diagnostice nádorů CNS	20
3.4.3	Stanovení celkové bílkoviny a glukózy	21
4	Materiál a metody.....	23
4.1	Biologický materiál	23
4.2	Chemikálie.....	23
4.3	Vybavení laboratoře	23
4.4	Software a programy	24
4.5	Soubor vzorků	24
4.6	Příprava vzorků pro kvantitativní cytologii.....	24
4.7	Příprava vzorků pro kvalitativní cytologii.....	25

4.8	Barvení May Grünwald Giemsa a mikroskopie	25
4.9	Stanovení celkové bílkoviny	25
4.10	Stanovení glukózy	26
5	VÝSLEDKY	27
5.1	Část I. Buněčné spektrum mozkomíšního moku.....	27
5.1.2	Elementy lymfocytární řady	28
5.1.3	Elementy monocytární řady	30
5.1.4	Elementy myeloidní řady	36
5.1.5	Buňky výstelky likvorových cest	37
5.1.6	Nádorové buňky, atypické buňky	38
5.2	Část II. Cytologické nálezy v mozkomíšním moku	41
5.2.1	Zánětlivá onemocnění	43
5.2.1.1	Purulentní (hnisavý) zánět.....	43
5.2.1.2	Serózní (nehnisavý) zánět	44
5.3	Subarachnoidální krvácení	46
5.3.1	Čerstvé krvácení.....	46
5.3.2	Starší krvácení	47
5.4	Nádorová onemocnění.....	48
5.5	Roztroušená skleróza.....	51
6	DISKUZE	53
7	ZÁVĚR	56
8	LITERATURA	57

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ADEM	akutní diseminovaná encefalomyelitida
BMI	body mass index
CNS	centrální nervová soustava
CSF	cerebrospinal fluid
FNOL	fakultní nemocnice Olomouc
L3/4	bederní obratle 3/4
L4/5	bederní obratle 4/5
LF	lékařská fakulta
MR	magnetická rezonance
NMO	neuromyelitis optica
PM	purulentní meningitida
PNS	paraneoplastické neurologické syndromy
RS	roztroušená skleróza
SAK	subarachnoidální krvácení
UP	Univerzita Palackého

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Lumbální punkce	6
Obrázek 2: Atraumatická jehla (vlevo), standardní jehla (vpravo)	6
Obrázek 3: Indikace k odběru mozkomíšního moku	7
Obrázek 4: Čirý, bezbarvý likvor	12
Obrázek 5: Sangvinolentní likvor	12
Obrázek 6: Xantochromní likvor	13
Obrázek 7: Zakalený likvor	13
Obrázek 8: Fuchs – Rosenthalova komůrka	14
Obrázek 9: Lymfocyt obklopený několika erytrocyty	28
Obrázek 10: Plazmocyt	29
Obrázek 11: Klidové a aktivované lymfocyty, uprostřed plazmocyt (archiv laboratoře)	29
Obrázek 12: Monocyt	30
Obrázek 13: Aktivované lymfocyty a monocyty	31
Obrázek 14: Aktivované lymfocyty a monocyty (archiv laboratoře)	31
Obrázek 15: Lipofág	32
Obrázek 16: Erytrofág	33
Obrázek 17: Erytrofág (archiv laboratoře)	33
Obrázek 18: Hemosiderofág s krystalem hematoidinu (archiv laboratoře)	34
Obrázek 19: Lymfofág (archiv laboratoře)	35
Obrázek 20: Neutrofilní granulocyty	36
Obrázek 21: Buňky výstelky likvorových cest	37
Obrázek 22: Buňka tvaru pečetního prstenu	38
Obrázek 23: Nádorová buňka (Diagnóza – tumor močového měchýře s generalizací do skeletu)	39
Obrázek 24: Nádorové buňky (Diagnóza – karcinom prsu, archiv laboratoře)	39
Obrázek 25: Nádorové buňky (Diagnóza – karcinom žaludku, archiv laboratoře) 40	
Obrázek 26: Nádorové buňky (Diagnóza – karcinom žaludku, archiv laboratoře) 40	
Obrázek 27: Obraz purulentní meningitidy	43
Obrázek 28: Obraz serózního zánětu (pacient č. 2)	45
Obrázek 29: Erytrofágy (pacient č. 3)	46
Obrázek 30: Hemosiderofág (pacient č. 4)	47
Obrázek 31: Shluk lymfocytů a monocytů s nepravidelným jádrem - syncytium (pacient č. 5)	49
Obrázek 32: Lymfocyty (pacient č.6)	49
Obrázek 33: Nádorové buňky (pacient č. 7)	50
Obrázek 34: Nádorové buňky (pacient č. 8)	50
Obrázek 35: Lymfocyt, monocyt (pacient č. 9)	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Laboratorní parametry v likvoru při purulentní meningitidě	8
Tabulka 2: Kontraindikace k odběru mozkomíšního moku.....	10
Tabulka 3: Buněčné spektrum v mozkomíšním moku.....	16
Tabulka 4: Pleocytóza	17
Tabulka 5: Patologická oligocytóza.....	18
Tabulka 6: Cytologická kritéria maligních buněk.....	21
Tabulka 7: Výsledky základního vyšetření	43
Tabulka 8: Výsledky základního vyšetření	44
Tabulka 9: Výsledky základního vyšetření	46
Tabulka 10: Výsledky základního vyšetření	47
Tabulka 11: Výsledky základního vyšetření	48
Tabulka 12: Výsledky základního vyšetření	51

1 ÚVOD

Analýza mozkomíšního moku má zásadní význam pro diagnostiku řady onemocnění centrálního nervového systému (CNS) a je využívána lékaři napříč většiny klinických oborů – neurologie, neurochirurgie, pediatrie, infekčního lékařství, onkologie a dalších. Představuje důležitou součást diagnostiky a její význam neustupuje ani před moderními zobrazovacími technikami.

Mozkomíšní mok je velmi vzácný biologický materiál, který vyžaduje specifický přístup zacházení. Limitace je především ve způsobu získávání tohoto materiálu, množství vzorku ve vztahu k požadovaným analýzám a v nutnosti rychlého zpracování. Patologické procesy probíhající v CNS se odrážejí ve změněném složení mozkomíšního moku. Vyšetření mozkomíšního moku se uplatňuje v diagnostice různých chorob např. u autoimunitních a neurodegenerativních onemocnění CNS, zánětlivých onemocnění mozku a míchy, u krvácení do CNS, a také při nádorových onemocnění.

Za účelem analýzy mozkomíšního moku se využívá celá řada laboratorních metod – cytologických, biochemických, imunologických, mikrobiologických. Ve své práci jsem se zaměřila na cytologickou analýzu mozkomíšního moku. Cílem práce bylo zdokumentovat nejčastější nálezy, se kterými jsem se během své praxe na Neurologické klinice LF UP a FNOL setkala. Kvantitativní a kvalitativní cytologie mozkomíšního moku může poskytnout důležité informace o možném postižení CNS. V cytologické laboratoři Neurologické kliniky LF UP a FNOL je za rok vyšetřeno cca 600 cytologických preparátů od pacientů různého věku a s různými diagnózami.

V této práci jsou prezentovány pouze ty cytologické nálezy, s nimiž jsem se v cytologické laboratoři setkala, tzn. že cytologický obraz není úplný, ale zahrnuje podstatné nálezy, které jsou významné v každodenní praxi.

2 CÍLE PRÁCE

- Praktické zvládnutí základního vyšetření mozkomíšního moku (kvantitativní cytologie, kvalitativní cytologie, stanovení celkové bílkoviny, glukózy).

- Pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 3.2 zaznamenat jednotlivé buňky nacházející se v likvoru a významné cytologické nálezy. U těchto nálezů následně provést korelaci s diagnózou pacienta.

- Porovnat výsledky kvalitativní cytologie s dalšími výsledky základního vyšetření.

- Poskytnout ucelený obraz cytologických nálezů, se kterými se setkáváme na Neurologické klinice LF UP a FNOL.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Mozkomíšní mok

Mozkomíšní mok nebo také likvor, anglicky cerebrospinal fluid (CSF), je čirá bezbarvá tekutina, obklopující mozek a míchu. Likvor patří do třídy transcelulárních tekutin. Více než polovina likvoru (60 – 70 %) vzniká aktivní chorioidální i extrachorioidální sekrecí, zbývající část (30 – 40 %) vzniká pasivní ultrafiltrací plazmy (tj. ultrafiltrát, resp. dialyzát plazmy). Likvor cirkuluje z postranních komor přes III. a IV. komoru, odtud do *cisterna cerebellomedullaris*. Z této cisterny likvor proudí přes bazální cisterny na konvexitu hemisfér, do interhemisferálního subarachnoidálního prostoru a do spinálního subarachnoidálního prostoru. Odtéká skrz arachnoidální klky do žilní krve. Tok CSF je započat od doby narození a maximální rychlosti dosahuje 4 měsíce po narození (Adam *et al.*, 2001). Jedná se o biologický materiál, který je získáván především lumbální punkcí. Práce s mozkomíšním mokem vyžaduje zkušenost, pečlivost a také rychlost. Následující kapitoly budou věnovány analýze, způsobu získávání, historii a funkci likvoru.

3.1.1 Historie

O existenci tekutiny, která obklopuje mozek, věděli lékaři již ve starověku, avšak první, kdo pravděpodobně objevil mozkomíšní mok, byl egyptský lékař Imhotep 3000 let př. n. l. V letech 460 - 375 př. n. l. popsal Hippokrates „vodu“ obklopující mozek. Zřejmě z důvodu specifického způsobu provádění pitvy neměli další lékaři možnost zkoumat mozkomíšní mok až do 16. století. Důkazy o existenci mozkomíšního moku jsou připisovány Emanuelu Swedenborgovi (1688 – 1772), který získal titul důlního inženýra na Univerzitě Upsala ve Švédsku. Swedenborg byl také učitel teologie a rozhodl se, že najde místo lidské duše. Jeho četná účast na pitvách ho vedla k přesvědčení, že právě mozek je pravděpodobné sídlo duše. Své poznatky a vyjádření shrnul v rukopise, pro který však nenašel vydavatele. Rukopis byl objeven ve Stockholmu o jeden a půl století později, obsahoval komentáře k subarachnoidálnímu prostoru a arachnoidální membráně. Swedenborg rozpoznal mozkovou kůru jako sídlo myšlenky

a zdroj senzomotorických funkcí končetin. Německý profesor Heinrich Ireneo Quincke (1842 – 1922) provedl lumbální punkci u pacienta s hydrocefalem. Zabýval se také složením mozkomíšního moku, kde stanovil počet buněk, celkovou bílkovinu a přítomnost bakterií. 21. září 1891 Quincke popsal lumbální punkci provedenou na pěti dětech a pěti dospělých. Walter Essex Wynter (1860 – 1945) provedl drenáž likvoru u čtyř dětí, které trpěli tuberkulózní meningitidou. Jeho postup zahrnoval malý řez v oblasti L2 (oblast druhého bederního obratle), poté vložil Southeyovu trubici a odstranil infikovanou tekutinu. Pacientům sice tento postup poskytl krátkodobou úlevu, všichni čtyři však následně zemřeli. Wynter tyto případy nenahlásil až do zveřejnění 2. května v časopise Lancet, proto je prvenství lumbální punkce připisováno Quinckemu, který uznal práci Wyntera na konferenci ve Wiesbadenu v roce 1891. První úplný popis chemického složení likvoru byl poskytnut v roce 1911, což bylo asi o 20 let později od prvního Quinckeho popisu, lékařem a chemikem Williamem Mestrezatem (1883 – 1928). První významná diagnostická hodnota biochemické analýzy likvoru byla navržena v roce 1893 Ludwigem Lichtheimem (1845 – 1928), který zaznamenal, že hladina glukózy je snižena u bakteriální a tuberkulózní meningitidy. Později s rozvojem mikrobiologie a zlepšováním technik barvení se diagnostika neustále vyvíjela (Cozanitis, 2012; Hajdu, 2003; Marsala *et al.*, 2015; Sourkers, 2002).

3.1.2 Fyziologie a funkce

Mozkomíšní mok je hlavní částí extracelulární tekutiny CNS a má řadu důležitých funkcí, kromě jiného chrání mozek a míchu před změnami tlaku a teplot a před patogenními organismy (Johanson, *et al.*, 2008). Funkce CSF spočívá v mechanické ochraně mozku a míchy, odtokové funkci CNS, přílivu živin, hormonů a neurotransmiterů a homeostatické funkci, která poskytuje optimální prostředí pro buňky CNS (Adam *et al.*, 2001). Likvor hraje také zásadní roli v homeostáze intersticiální tekutiny mozkového parenchymu a v regulaci fungování neuronů. Objem likvoru u dospělého člověka činí přibližně 135-150 ml, z čehož se cca 25 ml nachází v mozkových komorách a cca 125 ml v subarachnoidálním prostoru. Celkové množství likvoru vyprodukovaného za 24 hod je cca 500-600 ml, tzn. že celkový objem je nahrazen asi tři až čtyřikrát denně (Brown *et al.*, 2004; Sakka *et al.*, 2011; Pollay, 2010).

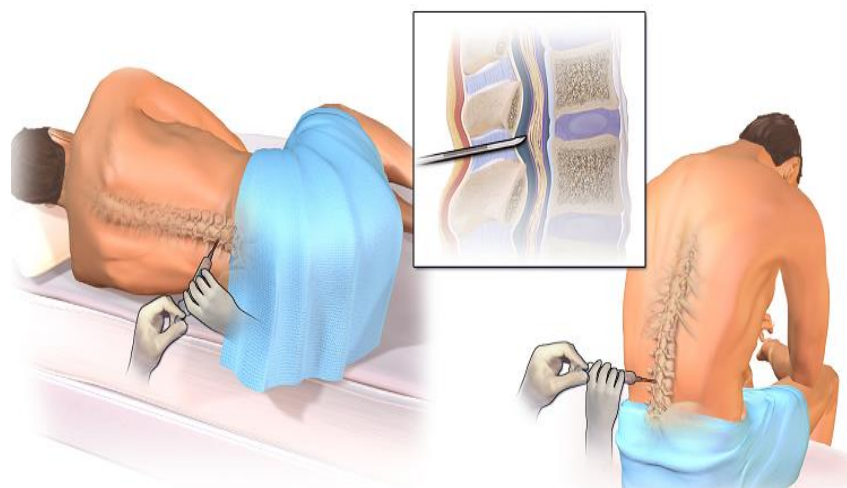
CSF je převážně produkován choroidními plexy, které jsou dobře přizpůsobeny pro produkci velkého objemu likvoru. Extrachoroidální sekrece z extracelulárních tekutin mozkových kapilár představuje pouze malý příspěvek k produkci likvoru (Puntis *et al.*, 2016). Mozkomíšní mok protéká komorami, cisternami a subarachnoidálním prostorem a je znovu absorbován do krve. Tato dodnes nezpochybnitelná a vědci uznávaná představa byla v roce 1926 objevena lékařem Harvey Cushingem (Brinker *et al.*, 2014; Maestro, 2007).

3.2 Lumbální punkce

Mozkomíšní mok se nejčastěji získává lumbální punkcí. Jedná se o zákrok, který je součástí rutinní klinické praxe (Pearson *et Fuller*, 2012). Lumbální punkce je bezpečný zákrok, který je proveden lékařem u pacienta, který je buď v poloze vsedě nebo vleže na boku (obrázek 1). Odběr mozkomíšního moku je obvykle proveden za účelem odhalení různých diagnóz postihujících CNS jako např. neuroinfekce, roztroušená skleróza, krvácení do CNS, nádorová onemocnění atd. (Morgan *et al.*, 2020). Pacienti před samotným výkonem podepisují informovaný souhlas s výkonem. Na Neurologické klinice LF UP a FNOL je standardně lumbální punkce provedena pomocí tzv. atraumatické jehly, která je na rozdíl od standardní jehly k pacientovi šetrnější (obrázek 2). Historie vývoje hrotu jehly byla komplikovaná a úplné porozumění vývoje designu hrotů jehel je obtížné získat. Počáteční nápady byly sice často publikovány, avšak přijímání či odmítání pro každodenní klinickou praxi se málokdy komentuje (Calthrope, 2004). Použitím atraumatické jehly se snižuje výskyt komplikací lumbální punkce, především se jedná o postpunkční syndrom s bolestmi hlavy a nevolností (Davis *et al.*, 2016). Provedení lumbální punkce je obtížnější u pacientů s vyšším BMI (Thomas *et al.*, 2000). Po zákroku pacient zůstává ještě několik hodin na lůžku.

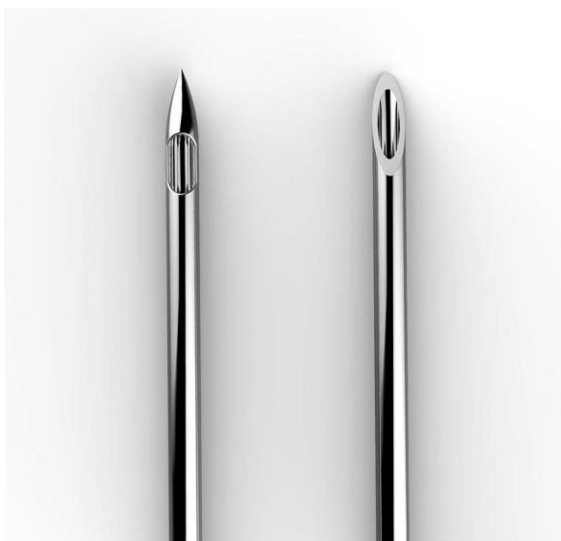
Likvor je odebrán z páteřního kanálu v prostoru L3/4, L4/5 u dospělého pacienta v množství 10 – 15 ml do zkumavek bez jakýchkoliv aditiv. Méně často se můžeme setkat s likvorem cisternálním, získaným punkcí *cisterna magna* a s likvorem komorovým získávaným komorovou punkcí (Dušková *et Sobek*, 2018). Cisternální mok je odebírán subokcipitální nebo laterocervikální punkcí (Kopková *et al.*, 2019) Složení mozkomíšního moku se liší podle místa odběru (Glosová, 1998). U dětských pacientů

s leukémií je lumbální punkce rutinně používána k hodnocení postižení CNS a k vnesení chemoterapie (Howard *et al.*, 2000). V některých případech může při lumbální punkci dojít ke kontaminaci vzorku krví. V takových případech dochází ke změnám počtu buněk, zvýšení hladiny bílkoviny a může také dojít ke zkreslení celkových výsledků (Howard *et al.* 2002). Lumbální punkce neslouží výhradně k diagnostickým účelům. Využívá se taky pro měření tlaku likvoru, aplikaci léčiva nebo kontrastní látky do páteřního kanálu (Mareš, 2019).



Obrázek 1: Lumbální punkce

(Převzato z https://www.mnof.cz/docs/okb_laboratorni_prirucka/HVEZDACADG.htm)

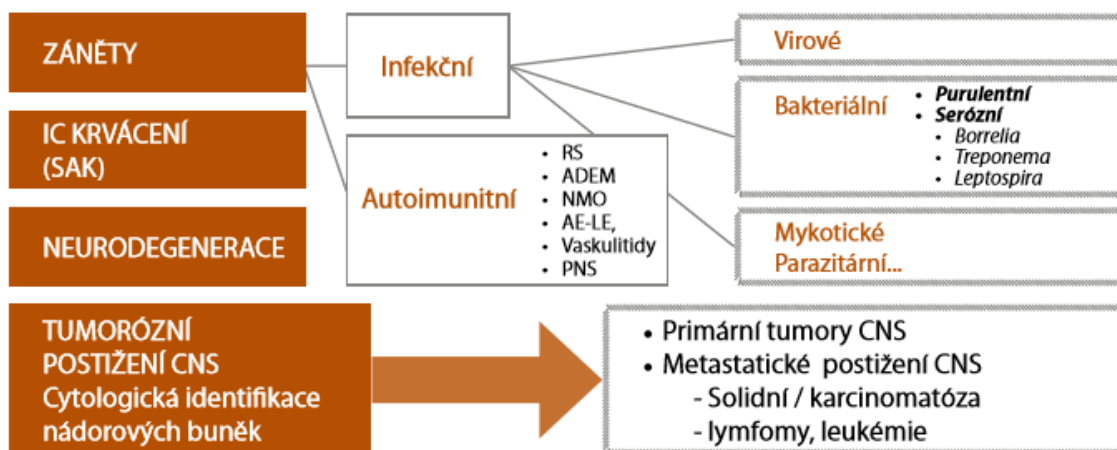


Obrázek 2: Atraumatická jehla (vlevo), standardní jehla (vpravo)

(Převzato z Davis *et al.*, 2016)

3.2.2 Indikace lumbální punkce

Mozkomíšní mok je biologický materiál, jehož odběr není snadný. Odebrané množství této tekutiny nebývá příliš velké, proto je nutné, aby byly stanoveny priority pro následné laboratorní analýzy s ohledem na omezené množství materiálu. Odběr mozkomíšního moku je indikován při podezření na určitá onemocnění (obrázek 3).



Obrázek 3: Indikace k odběru mozkomíšního moku

(Převzato z Dušková *et Sobek*, 2018)

3.2.2.1 Purulentní záněty

Purulentní meningitida (PM) je akutní infekční život ohrožující onemocnění CNS. Zavedením sulfonamidů a antibiotik do léčebné praxe dramaticky poklesla smrtnost tohoto onemocnění. Přesto 15 – 30 % pacientů má smrtelný průběh a přibližně stejný podíl pacientů je poznamenán trvalými následky. Incidence je 2 – 6 případů na 100 tisíc obyvatel. Mezi příznaky purulentní meningitidy patří bolest hlavy, horečky, zvracení, meningeální příznaky a porucha vědomí. K nejčastějším původcům se řadí *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* a *Haemophilus influenzae* typ b. Charakteristický nález v likvoru svědčící pro PM je shrnut v tabulce 1 (Džupová *et al.*, 2010; Havránek *et al.*, 2009). Diagnostický proces u PM musí být rychlý a empirická antibiotická léčba by měla být zahájena ihned při podezření na PM (Rožnovský, 2013). PM se zřídka vyskytuje také u nejmladších věkových skupin, u kterých dochází k častým

komplikacím a mortalita je vysoká. V případě přežití se setkáváme s trvalým neurologickým postižením jako je např. porucha hybnosti, hydrocefalus, psychomotorické postižení, poruchy sluchu atd. (Blechová, 2006).

Tabulka 1: Laboratorní parametry v likvoru při purulentní meningitidě

LABORATORNÍ PARAMETRY V LIKVORU PŘI PURULENTNÍ MENINGITIDĚ	
Vzhled likvoru	Opalescentní, zakalený
Pandyho reakce	Pozitivní
Proteinorachie	> 1g
Cytologický nález	Stovky, tisíce až desetitisíce polymorfonukleárů s cca 90% převahou nad mononukleáry
Glykorachie	snížená

(Upraveno podle Havránek *et al.*, 2009)

3.2.2.2 Serózní záněty

S nehnisavými neboli serózními záněty CNS se setkáváme častěji než s PM. Na rozdíl od PM nemají až na výjimky velkou úmrtnost, avšak následky mohou být také velmi závažné. Serózní i purulentní záněty rozdělujeme podle místa vzniku na záněty mozku – encefalitidy, záněty mozkových blan – meningitidy a záněty míchy – myelitidy. Většina nehnisavých zánětů je virového původu. Nejčastější serózní neuroinfekcí v ČR je klíšťová encefalitida. Průběh nehnisavých neuroinfekcí nebývá tak dramatický jako u hnisavých neuroinfekcí. Při laboratorním vyšetření likvoru se setkáváme s proteinocytologickou asociací, tj. zvýšení počtu buněk na desítky až stovky ve Fuchs - Rosenthalově komůrce. V cytologickém preparátu pozorujeme převahu monocytární řady. V základním vyšetření likvoru je většinou lehce zvýšená bílkovina, hladina glukózy je normální (Roháčová, 2006).

3.2.2.3 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické demyelinizační zánětlivé onemocnění CNS, u něhož dochází k demyelinizaci nervových vláken a k jejich následné ztrátě. Jedná se o autoimunitní onemocnění. RS postihuje převážně mladé dospělé, častěji ženy. V České republice se výskyt odhaduje na 170 – 200 pacientů na 100 tisíc obyvatel, kolem 17 – 20 tisíc nemocných. Diagnostika RS představuje komplexní proces. Ke klinickým projevům RS patří projevy zrakové, senzitivní, pyramidové, mozečkové, vestibulární a poruchy autonomní. Z ostatních příznaků pacienti popisují např. únavu, zhoršenou koncentraci a neuropatické bolesti (Horáková, 2011; Taláb, 2008; Sládková, 2015; Vališ *et al.*, 2005). Přestože jsou klinická data stále významná, nezastupitelnou roli v diagnostice RS hraje magnetická rezonance (MR) mozku a míchy a také vyšetření mozkomíšního moku (Vališ *et Pavelek*, 2015). Senzitivita MR v diagnostice RS je kolem 90 % (Feitová, 2002). V mozkomíšním moku je za účelem diagnostiky RS zjišťována izoelektrickou fokusací přítomnost oligoklonálních páسů (Poser *et al.*, 1983). Stále více studií se zabývá vyšetřením markerů v séru a likvoru za účelem zlepšení diagnostiky RS např. interleukin 6, interleukin 8, interleukin 10, beta – 2 – mikroglobulin, CXCL 13 atd. (Matejíčková *et al.*, 2015; Domingues *et al.*, 2017). Správné stanovení diagnózy a následné včasné zahájení léčby má významný vliv na další vývoj onemocnění (Piřha, 2015). Diagnostika RS se neobejde bez mezioborové spolupráce se specialisty v problematice neuroradiologie, likvorologie či elektrofyziologie. Důležitá je i role oftalmologa, psychologa a fyzioterapeuta (Piřha, 2014).

3.2.2.4 Subarachnoidální krvácení

Subarachnoidální krvácení (SAK) je život ohrožující stav, jehož nejčastější příčinou je ruptura aneurysmatu. K častým příznakům patří náhle vzniklá bolest hlavy a porucha vědomí. V analýze mozkomíšního moku je důležité odlišit SAK od arteficiální příměsi erytrocytů. Důležité je spektrofotomerické vyšetření, které musí být provedeno co nejrychleji po odběru. Orientační je v tomto případě vyšetření vzhledu likvoru. Při arteficiální příměsi krve je sangvinolentní likvor po centrifugaci čirý bezbarvý se sedimentem erytrocytů. V případě, že se však jedná o příliš čerstvé krvácení,

nacházíme stejný nález. Pokud se jedná o SAK, pozorujeme po centrifugaci sangvinolentního likvoru xantochromní zabarvení. Po 4 – 6 hod po průniku krve do subarachnoidálního prostoru dochází k aktivaci monocytů a následné fagocytóze erytrocytů. Nález erytrofágů v cytologickém preparátu svědčí pro recentní SAK. Následně makrofágy degradují hemoglobin na hemosiderin, který je přítomen od 4. – 5. dne od počátku SAK a může být přítomen i po několika týdnech. Hematogenní pigment hematoidin může být přítomen od 14. dne a tvoří typické žluté krystaly (Kalina, 2011; Brož *et al.*, 2013).

3.2.3 Kontraindikace lumbální punkce

Nejzásadnější kontraindikací lumbální punkce je přítomnost intrakraniální léze, v tomto případě může být lumbální punkce příčinou mozkové herniace a následně smrti. U pacientů před lumbální punkcí je doporučeno doplnit oční vyšetření k vyloučení edému papily nebo zobrazení mozku (MR nebo CT vyšetření). Další kontraindikací jsou zanícené rány v oblasti bederní páteře, kde je riziko zavlečení infekce, antikolagulace a trombocytopenie (tabulka 2) (Morgan *et al.*, 2020).

Tabulka 2: Kontraindikace k odběru mozkomíšního moku

KONTRAIKACE K ODBĚRU MOZKOMÍŠNÍHO MOKU
Intrakraniální neurologické onemocnění, zvýšený intrakraniální tlak, zmatenost
Potvrzená obstrukce průtoku likvoru
Kolagulopatie, trombocytopenie
Symptomy lokální infekce v místě vpichu

(Upraveno podle Morgan *et al.*, 2020)

3.3 Algoritmus vyšetření mozkomíšního moku

Vyšetření likvoru zahrnuje analýzu základních parametrů, tj. stanovení vzhledu likvoru, celkového počtu elementů včetně zhotovení trvalého cytologického preparátu, stanovení celkové bílkoviny, glukózy, laktátu a v indikovaných případech i spektrofotometrii likvoru. Mezi další vyšetření likvoru, které se běžně provádí, patří

stanovení koncentrace imunoglobulinů, albuminu se stanovením albuminového kvocientu, izoelektrická fokusace se specifickou imunodetekcí oligoklonálních páسů, stanovení autoprotilátek, zánětlivých a neurodegenerativních markerů, mikrobiologické vyšetření likvoru, detekce likvorey, atd. V případě, že se jedná o statim, je nutné, aby byl výsledek základního vyšetření vydán do 1 hodiny po přijetí materiálu do laboratoře (Mrázová *et al.*, 2017; Sobek *et al.*, 2012). Vzorky mozkomíšního moku mohou být uchovány dlouhodobě pro účely budoucího testování při teplotě - 80 °C v řádně označených zkumavkách. Vzorky je možné uchovávat i v tekutém dusíku (Tashjian *et al.*, 2019).

3.4 Základní vyšetření mozkomíšního moku

Základní vyšetření likvoru v laboratoři Neurologické kliniky LF UP a FNOL zahrnuje hodnocení vzhledu likvoru, kvantitativní a kvalitativní cytologii, orientační stanovení celkové bílkoviny a glukózy. Hodnocení vzhledu a cytologii likvoru budou věnovány následující kapitoly.

3.4.1 Vzhled mozkomíšního moku

Vzhled likvoru je první parametr, který můžeme zhodnotit po převzetí vzorku. Vyhodnocení vzhledu likvoru se provádí před a po centrifugaci (Mrázová *et al.*, 2017). Nejčastěji je likvor čirý, bezbarvý (obrázek 4), setkat se můžeme i s likvorem sangvinolentním (obrázek 5), xantochromním (obrázek 6) a zakaleným (obrázek 7) (Brož *et al.*, 2013; Williams, 2004).



Obrázek 4: Čirý, bezbarvý likvor

(Převzato z <https://slideplayer.cz/slide/3757330/>)



Obrázek 5: Sangvinolentní likvor

(Převzato z <https://slideplayer.cz/slide/3757330/>)



Obrázek 6: Xantochromní likvor

(Převzato z <https://slideplayer.cz/slide/3757330/>)



Obrázek 7: Zakalený likvor

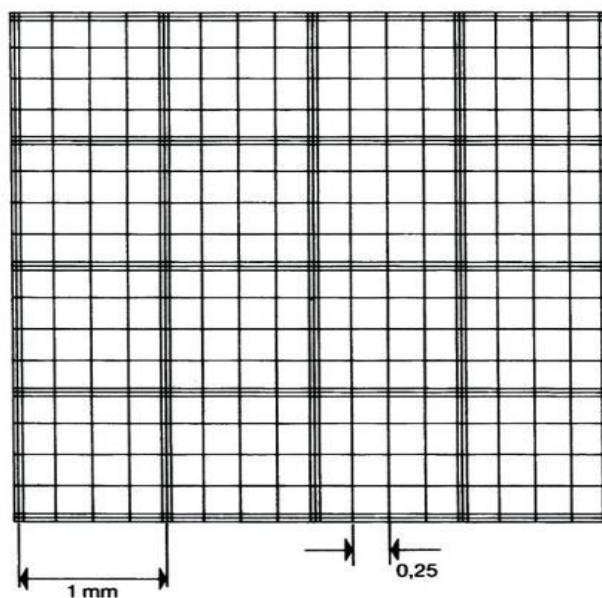
(Převzato z <https://slideplayer.cz/slide/3757330/>)

3.4.2 Cytologie mozkomíšního moku

Cytologii mozkomíšního moku rozdělujeme na kvalitativní a kvantitativní. Pro účely cytologie se vždy používá nativní necentrifugovaný likvor. Vzorek likvoru pro účely cytologie by měl být zpracován co nejrychleji, jelikož dochází k rozpadu buněk a při pozdějším hodnocení může být výsledek zkreslený. Zpracování likvoru pro cytologické vyšetření by mělo být provedeno do 2 - 3 hod po odběru (Dušková *et Sobek*, 2018). Citlivost cytologie je také ovlivněna objemem vzorku (Milburn-McNulty *et al.*, 2012).

3.4.2.1 Kvantitativní cytologie

Pro účely kvantitativní cytologie využíváme v cytologické laboratoři Fuchs – Rosenthalovu komůrku (obrázek 8). Komůrka je složena ze systému čtverců, kterých je celkem 256. Ve všech 256 čtvercích počítáme buněčné elementy. Při kvantitativní cytologii jsme schopni rozlišit pouze erythrocyty a buněčné elementy, které následně blíže rozlišíme pomocí cytologie kvalitativní.



Obrázek 8: Fuchs – Rosenthalova komůrka

(Převzato z <https://www.bdl.cz/laboratorni-pristroje-3k/opticke-pristroje-a-mikroskopy-20k/burkerovy-komurky-133k/pocitaci-komora-fuchs-rosenthal-291p>)

3.4.2.2 Kvalitativní cytologie

Cytologie kvalitativní umožňuje rozlišit jednotlivé buněčné elementy. Za účelem kvalitativní cytologie je nutná příprava cytologického preparátu, který v laboratoři připravujeme cytosedimentační technikou. Pokud laboratoř disponuje cytocentrifugou, je možné preparát připravit cytocentrifugací. Cytocentrifugační metoda je rychlejší a vyžaduje menší objem vzorku. Takto připravený preparát je následně obarven technikou May Grünwald Giemsa a hodnocen pod světelným mikroskopem za využití imerzního objektivu.

Další barvicí techniky, které mohou být použity, jsou hematoxylin eosin či barvení polychromem. Laboratoř cytopatologie využívá i další specifická barvení podle požadavků lékaře, např. barvení k identifikaci substrátů fagocytózy (barvení na železo, olejová červeň), barvení k identifikaci některých typů bakterií, např. Gramovo, Ziehl-Neelsenovo (Dušková *et* Sobek, 2018).

3.5 Buněčné spektrum v mozkomíšním moku

Spektrum buněk vyskytujících se v likvoru není velké (tabulka 3), v cytologické laboratoři se v 65 – 80 % setkáváme s lymfocyty a monocyty. Méně často pozorujeme nádorové buňky, eozinofilní a bazofilními granulocyty. Za fyziologických podmínek jsou v likvoru přítomné v malém množství klidové lymfocyty, monocyty, ojediněle buňky choroidálního plexu a ependymální buňky. Za patologických podmínek pozorujeme neutrofilní, eozinofilní, bazofilní granulocyty, aktivované lymfocyty, plazmocyty, aktivované monocyty, makrofágy, nádorové buňky a erytrocyty. Erytrocyty mohou být přítomné v likvoru i v důsledku traumatické kontaminace při odběru. Dále se ojediněle můžeme setkat s kontaminanty jako jsou metachromatické elementy chrupavky, dlaždicové epitelie, cylindrické buňky. Normální počet buněk v likvoru u dospělého člověka je do $5 \cdot 10^6/l$, u novorozenců do $10 \cdot 10^6/l$ (Glosová, 1998; Dušková *et* Sobek, 2018).

Tabulka 3: Buněčné spektrum v mozkomíšním moku

ELEMENTY LYMFOCYTÁRNÍ ŘADY	
Lymfocyt	8 – 10 μm , úzký plazmatický lem, kompaktní jádro vyplňuje téměř celou buňku
Aktivovaný lymfocyt	11 – 18 μm , výrazná bazofilní cytoplazma, velké jádro
Plazmocyt	21 μm , bazofilní cytoplazma, kulaté nebo oválné jádro s jadérky, perinukleární projasnění cytoplazmy
ELEMENTY MONOCYTÁRNÍ ŘADY	
Monocyt	15 – 30 μm , nepravidelný tvar jádra, cytoplazma světlejší než u lymfocytů
Aktivovaný monocyt	Větší velikost, vakualizovaná cytoplazma
Makrofág	Aktivovaný monocyt s pohlceným materiálem, např. erytrofág, hemosiderofág, lipofág
ELEMENTY MYELOIDNÍ ŘADY	
Neutrofilní granulocyty	35 μm , dělené jádro
Eozinofilní granulocyty	Jádro rozděleno na dvě části, v cytoplazmě množství načervenalých granulí, vzácné
Bazofilní granulocyty	10 μm , tmavá granula v cytoplazmě, velmi vzácné
NÁDOROVÉ BUŇKY	Mohou být dvoujaderné i vícejaderné, s výběžky cytoplazmy, vytvářejí shluky atd.

(Upraveno podle Glosová, 1998)

3.5.1 Klasifikace cytologických likvorových nálezů

Buněčnou skladbu ve vzorku likvoru stanovujeme mikroskopickým vyšetřením trvalého cytologického obrazu (Kelbich *et al.*, 2009). Klasifikace cytologických nálezů vychází z několika aspektů, hlavně z patologické početní převahy určité buněčné populace nebo známek aktivace buněk v této řadě. K dalším aspektům patří počet elementů, který byl zjištěn ve Fuchs – Rosenthalově komůrce. V tomto případě rozlišujeme oligocytózu – nízký počet celulárních elementů, v případě vícebuněčných likvorů se jedná o pleocytózu. Oligocelulární a pleocytární likvory lze na základě cytologické skladby rozdělit do několika skupin (tabulka 4, 5) (Adam *et al.*, 2009).

Tabulka 4: Pleocytóza

PLEOCYTÓZA	
GRANULOCYTÁRNÍ PLEOCYTÓZA	
Neutrofilní granulocyty	Zejména bakteriální neuroinfekce
Eozinofilní granulocyty	Parazitární a mykotická onemocnění, dále alergická a autoagresivní
MONONUKLEÁRNÍ PLEOCYTÓZA	
Lymfocytární	Aktivované elementy lymfocytární řady (serózní neuroinfekce) + plazmatické buňky – chronické neuroinfekce, RS (zde může být počet elementů i normální)
Monocytární	Kompresivní syndromy – výhřezy disku, tumory Systémové vaskulitidy CNS Mozkové ischemie Syndrom Guillan – Barré Terminální fáze neuroinfekcí s úklidovou reakcí
Tumorózní	Přítomnost maligních elementů

(Upraveno podle Adam *et al.*, 2009)

Tabulka 5: Patologická oligocytoza

PATOLOGICKÁ OLIGOCYTÓZA	
Lymfocytární	Aktivované lymfocytární formy, případné plazmatické buňky – chronické záněty, RS
Monocytární	Početní převaha monocytů či známky aktivace v monocytární řadě, případně fagocytóza – zpravidla nezáňtlivá či terminální fáze zánětů
Granulocytární	
<i>Neutrofilní</i>	Často obraz počínajícího zánětu
<i>Eozinofilní</i>	Vzácnější obraz, některá autoimunitní, chronická onemocnění
Tumorózní	Přítomnost maligních elementů

(Upraveno podle Adam et al., 2009)

3.5.1.1 Fyziologický nález

V normálním cytologickém obraze pozorujeme lymfocyty a monocyty v poměru 7:3 s tolerancí do 10 % aktivovaných lymfocytů. Výjimečně se v cytologickém preparátu nachází buňky výstelky likvorových cest (Kelbich *et al.*, 2009). V případě, že v CNS probíhá zánětlivý proces, obvykle se promítá do složení mozkomíšního moku. Naším cílem je tento proces analyzovat a určit jeho charakter, za účelem odhalení příčiny postižení CNS (Kelbich *et al.*, 2012).

3.5.1.2 Převažující výskyt neutrofilních granulocytů

Při akutním bakteriálním zánětu CNS nejčastěji pozorujeme neutrofilní granulocyty. U purulentní, hnisavé meningitidy nacházíme tisíce až desetitisíce neutrofilních granulocytů. Vzhled likvoru pacienta s purulentní meningitidou bývá zakalený, bělavý. Po nasazení léčby dochází k rychlé změně cytologického obrazu. Neutrofilní granulocyty mizí a objevují se aktivované lymfocyty a monocyty, které ale mohou být přítomné i v iniciálních stádiích purulentního zánětu (Glosová, 1998).

Biochemické parametry jsou u této diagnózy také výrazně změněny. Typickým biochemickým nálezem je výrazná hyperproteinorachie (nad 1 g/l), hypoglykorachie (často pod 2 mmol/l), elevace laktátu (Dušková *et Sobek*, 2018). Neutrofilní granulocyty se mohou objevit v menší míře také při virovém postižení CNS nebo při arteficiální příměsi krve (Kelbich *et al.*, 2011).

3.5.1.3 *Výskyt eosinofilních granulocytů*

Přítomnost eosinofilních granulocytů pozorujeme při reparaci a regeneraci tkáně po proběhlém postižení CNS. Dominující zastoupení těchto elementů v likvoru je však vzácné a může se vyskytnout při alergickém, autoimunitním či parazitárním postižení CNS (Kelbich *et al.*, 2009).

3.5.1.4 *Převažující výskyt lymfocytárních elementů*

S převažujícím výskytem lymfocytů se setkáváme v normálním cytologickém obraze. Patologicky převažující zvýšený výskyt lymfocytů se vyskytuje při serózních zánětech CNS, při RS (hlavně během relapsů) nebo také při zánětlivém procesu s oxidačním vzplanutím makrofágů (Kelbich *et al.*, 2009).

3.5.1.5 *Výskyt monocytárně – makrofágových elementů*

Monocytárně - makrofágový systém plní důležitou úlohu v organismu, umožňuje pohlcení různých částic. Při hodnocení cytologického preparátu, ve kterém jsou přítomny monocytárně - makrofagické elementy, není pozornost věnována primárně kvantitativnímu zastoupení těchto elementů, ale zaměřujeme se především na morfologické znaky. S těmito elementy se setkáváme v souvislosti s reaktivními změnami v likvorovém kompartmentu indukovaným periferně přítomným patologickým procesem, při úklidové reakci po prodělaném zánětu, při krvácení do likvorových cest nebo při tkáňové destrukci (Kelbich, *et al.*, 2011).

3.5.1.6 Cytologický nále z u subarachnoidálního krvácení

Kvalitativní cytologie likvoru představuje poměrně spolehlivou metodu při zjišťování stáří krvácení do likvorových cest. V časně fázi krvácení se v cytologickém preparátu setkáváme se záplavou erytrocytů a také s neutrofilními granulocyty (Glosová, 1998).

3.5.1.7 Cytologický nále z u roztroušené sklerózy

U pacientů s RS bývá přítomna lehká lymfo - monocytární pleocytóza 20 – 30. 10⁶/l. V cytologickém preparátu nacházíme kromě klidových forem lymfocytů a monocytů také tyto elementy se známkami aktivace, plazmatické buňky a buňky tvaru pečetiho prstenu. Plazmatické buňky jsou posledním stupněm vývoje B - lymfocytů produkujícím protilátky. V období ataky se můžeme setkat v menší míře i s neutrofilními a eozinofilními granulocyty. Diagnózu demyelinizace však nevyklučuje ani normální cytologický obraz (Bednářová *et* Adam, 2002; Sládková *et* Mareš, 2015).

Ve výzkumu Zeman *et al.*, 2001 byly zjištěny také další statisticky významné nálezy v cytologii u různých podskupin RS. Jednalo se například o vyšší prevalenci pěnových buněk a lymfocytů a nižší prevalenci pleocytózy v CSF u těžce postižených pacientů. U léčených pacientů byl nalezen nižší počet buněk, nižší prevalence pleocytózy v CSF, nižší poměr lymfocytů/monocytů. U pacientů RS s onemocněním delšího trvání byla vyšší prevalence zralých plazmatických buněk a lipofágů (Zeman *et al.*, 2001).

3.5.1.8 Cytologie v diagnostice nádorů CNS

Kvalitativní cytologie likvoru přispívá k časně diagnóze a následně léčbě nádorové infiltrace CNS. I přes rychlý rozvoj zobrazovacích metod má stanovení přítomnosti nádorových buněk v mozkomíšním moku svůj význam. Klasická morfologie bývá doplněna metodami imunocytologie a molekulární genetiky. Cytologické nálezy s nádorovými buňkami rozdělujeme na primární a metastazující nádory a dále nádorové metastazující buňky na metastázy solidních tumorů a metastázy hematologických

onemocnění. Schopnost nádorových buněk separovat se a migrovat do likvoru závisí na stupni malignity, na přítomnosti limitujících faktorů v transportních cestách a na lokálních podmínkách (Štourač *et al.*, 2009). Důležitá cytologická kritéria maligních buněk jsou shrnuta v tabulce 6.

K nádorům postihujícím CNS, kromě jiných řadíme primární lymfomy CNS, které tvoří 3 – 4 % všech mozkových nádorů a 1 – 2 % všech lymfomů. Jedná se o vzácné agresivní onemocnění, které zahrnuje postižení mozkového parenchymu, mozkových obalů, míchy a struktur oka. V uplynulých letech narůstá incidence tohoto onemocnění. Vyšetření mozkomíšního moku v diagnostice tohoto nádoru zahrnuje především kvalitativní cytologii a nález patologických buněčných elementů. Záchyt lymfomových buněk je 15 % (Hrudková *et al.*, 2015; Móciková, 2013). K poměrně vzácným nádorům se řadí také nádory choroidálního plexu, které tvoří 0,5 – 0,6 % ze všech primárních nádorů CNS (Pavelka *et Zitterbart*, 2010).

Tabulka 6: Cytologická kritéria maligních buněk

CYTOLOGICKÁ KRITÉRIA MALIGNÍCH BUNĚK
Abnormální velikost s polymorfními jádry
Viditelná jadérka
Atypická mitóza
Vysoký poměr jádro - plazma
Intenzivně bazofilní cytoplazma

(Upraveno podle Torzewski *et Lackner*, 2016)

3.4.3 Stanovení celkové bílkoviny a glukózy

K základním parametrům vyšetření mozkomíšního moku patří také stanovení koncentrace celkové bílkoviny a glukózy (Sobek, 2009). K orientačnímu stanovení bílkoviny se používá Pandyho zkouška. Do Pandyho činidla přidáme kapku likvoru a hodnotíme přítomnost či absenci zákalu. Celkovou bílkovinu lze stanovit několika způsoby např. turbidimetricky, nefelometricky, biuretovou metodou či reakcí vazby

na barviva. Referenční hodnoty celkové bílkoviny v likvoru jsou 0,20 – 0,45 g/l. V případě stanovení glukózy v mozkomíšním moku používáme metody, které jsou zcela shodné se stanovením v krvi, tzn. na principu hexokinasové nebo glukosaoxidasové reakce. Referenční hodnoty glukózy v mozkomíšním moku jsou 2,5 – 4,5 mmol/l (Zeman, 2018).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Mozkomíšní mok (10 ml)

4.2 Chemikálie

Barvivo May Grünwald (Penta)

Barvivo Giemsa (Penta)

Set na stanovení glukózy (Biovendor)

Set na celkovou bílkovinu (Biovendor)

Destilovaná voda

Imerzní olej (Olympus)

4.3 Vybavení laboratoře

Mikroskop CX33 (Olympus)

Fotoaparát k mikroskopu EOS 1300D (Canon)

Centrifuga 5702 R (Eppendorf)

Kolorimetr (Spekol 11) + kyvety

Lednice (4 – 8 °C)

Sedimentační komůrka (Medvik)

Filtrační papír (Verkon)

Automatické pipety (200 µl, 1000 µl, 5000 µl, Nichiryo) + špičky

Podložní sklo (Sysmex)

Krycí sklo (Sysmex)

Další laboratorní sklo (zkumavky, kádinky) (SIMAX)

4.4 Software a programy

Program na pořizování fotografií z mikroskopu QuickPHOTO CAMERA 3.2

4.5 Soubor vzorků

Během mého působení na Neurologické klinice LF UP a FNOL na pozici odborný pracovník v laboratorních metodách bylo pod odborným dohledem vyhodnoceno mnoho cytologických preparátů. Zajímavé nálezy v těchto preparátech byly následně zdokumentovány. Pro účely rigorózní práce byly vybrány fotografie jednotlivých buněk a cytologických nálezů, které byly následně rozděleny do jednotlivých skupin. První skupina fotografií obsahovala zastoupení jednotlivých buněk, se kterými se v cytologických preparátech více či méně často setkáváme v rámci cytologické praxe. Další skupina fotografií zahrnovala nálezy v mozkomíšním moku u jednotlivých diagnóz jako např. nádorová onemocnění, purulentní zánět, virový zánět, roztroušená skleróza a subarachnoidální krvácení. U pacientů bylo provedeno vyšetření mozkomíšního moku, které zahrnovalo kromě jiného, i kvantitativní a kvalitativní cytologii, stanovení celkové bílkoviny a glukózy.

4.6 Příprava vzorků pro kvantitativní cytologii

3 μ l necentrifugovaného, nebarveného likvoru byly nanесeny do Fusch - Rosenthalovy komůrky. Ve všech 256 čtvercích komůrky byly spočítány buněčné elementy. Vzorek byl hodnocen při 200x zvětšení.

4.7 Příprava vzorků pro kvalitativní cytologii

Podložní sklo bylo popsáno číslem vzorku a umístěno do sedimentační komůrky. Na sklo byl umístěn filtrační papír. Likvor byl napipetován (0,5 – 1 ml) a sedimentován 15 - 30 minut v komůrce, do zaschnutí sedimentu. Připravený preparát byl obarven May Grünwald Giemsa technikou.

4.8 Barvení May Grünwald Giemsa a mikroskopie

Podložní sklo společně se sedimentem bylo vodorovně umístěno na barvicí plochu. Na sklo byl napipetován 1 ml barvy May Grünwald, barvivo působilo 5 minut. Barva byla převrstvena 4 ml destilované vody na dobu 1 minuty, poté byla slita. Bylo naneseno 10 ml barvicího roztoku Giemsa na 30 minut, poté byl slit. Barva byla opláchnuta destilovanou vodou. Sklíčko bylo ponecháno k zaschnutí. Vzorek byl pozorován pod mikroskopem, imerzním objektivem s použitím imerzního oleje při zvětšení 1000x. Cytologické nálezy byly zpracovány v programu QuickPHOTO CAMERA 3.2.

4.9 Stanovení celkové bílkoviny

Do zkumavky bylo napipetováno 40 μ l likvoru a 1,5 ml naředěného činidla. Zkumavka byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byla měřena spektrofotometricky při 600 nm. Z naměřených hodnot absorbancí byla vypočtena koncentrace bílkoviny v likvoru, která se uvádí v g/l. Fyziologické hodnoty bílkoviny v likvoru jsou 0,15 - 0,45 g/l.

Rovnice pro výpočet koncentrace bílkoviny v likvoru

$$\text{BÍLKOVINA} = \frac{A_{ST}}{A_{VZ}} \cdot C_{ST}$$

$$C_{ST} = 0,498 \text{ g/l}$$

$$A_{ST} = 0,250$$

4.10 Stanovení glukózy

Do zkumavky bylo napipetováno 20 μ l likvoru a 2 ml oxochromní glukózy. Do další zkumavky bylo napipetováno 20 μ l standardu a 2 ml oxochromní glukózy. Zkumavky byly inkubovány 15 minut při 37 °C. Po inkubaci byly vzorky měřeny při 490 nm. Z naměřených hodnot absorbancí byla vypočtena koncentrace glukózy v likvoru, která se uvádí v jednotkách mmol/l. Fyziologické hodnoty glukózy v likvoru jsou 2,21 - 4,20 mmol/l.

Rovnice pro výpočet koncentrace glukózy v likvoru

$$GLU = \frac{A_{VZ}}{A_{ST}} \cdot 5 \quad \text{mmol/l}$$

A_{VZ} = absorbance vzorku

A_{ST} = absorbance standardu

C_{ST} = koncentrace standardu

5 VÝSLEDKY

V rámci působení na Neurologické klinice LF UP a FNOL byly zhodnoceny stovky cytologických preparátů, ze kterých byly pro účely této práce vybrány ty, které nejlépe odpovídají nálezům, se kterými se více či méně často setkáváme v rutinní praxi. Tyto nálezy byly rozděleny do dvou částí (viz níže).

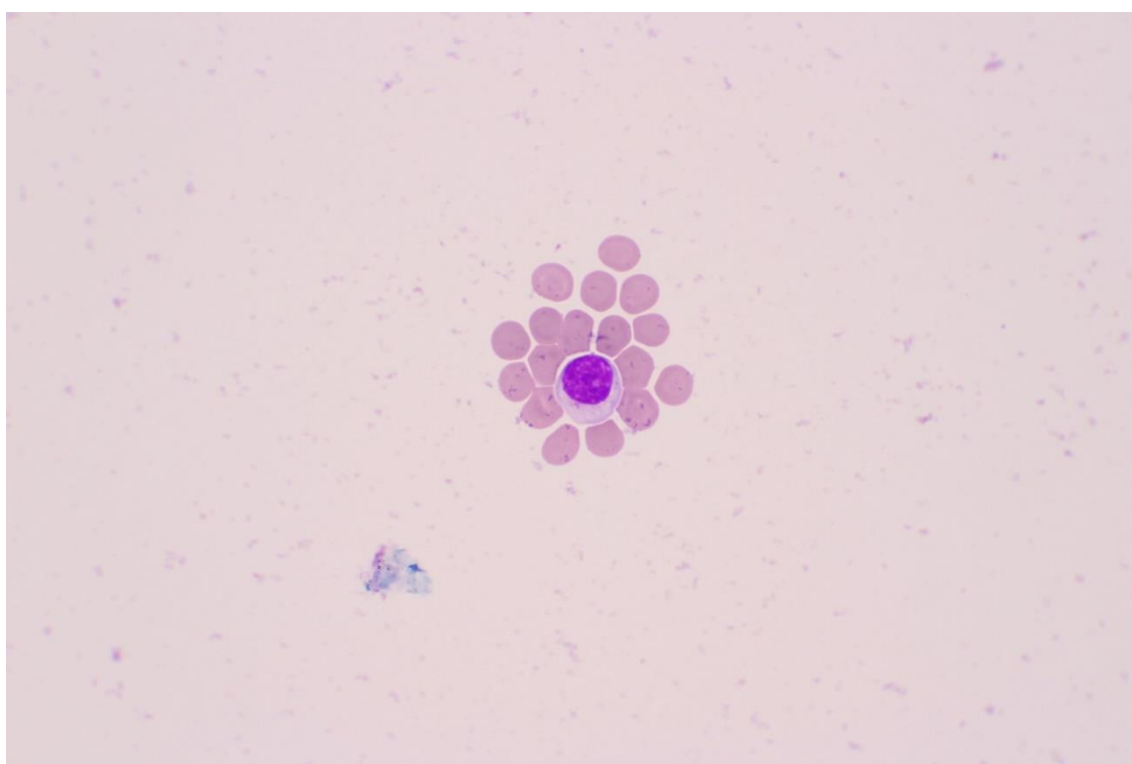
5.1 Část I. Buněčné spektrum mozkomíšního moku

První obrazová část zahrnuje buněčné spektrum mozkomíšního moku, tedy zastoupení jednotlivých buněk. Z elementů lymfocytární řady (lymfocyty, plazmocyty) jsou nejčastěji přítomny lymfocyty, jejichž velikost je 8 – 10 μm , jádro vyplňuje téměř celou buňku a cytoplazma představuje pouze úzký lem (obrázek 9). Méně často jsou pozorovány plazmocyty, jejichž velikost se pohybuje okolo 21 μm , mají bazofilní cytoplazmu s typickým perinukleárním projasněním a kulaté jádro (obrázek 10, 11). Z elementů monocytární řady (monocyty, makrofágy) se nejčastěji setkáváme s monocytami, které mají nepravidelný tvar jádra a jejich cytoplazma je kouřové barvy (obrázek 12). Často se také setkáváme s aktivací monocytů a lymfocytů, ke které dochází např. po reakci na infekční agens (obrázek 13, 14). Výjimečně můžeme v preparátech narazit také na makrofágy, např. lipofágy - buňky s pohlčenými kapkami tukových látek (obrázek 15) nebo erytrofágy - buňky s pohlčenými erytrocyty (obrázek 16, 17), se kterými se setkáváme především při čerstvém krvácení. Pro starší krvácení jsou typické hemosiderofágy (obrázek 18), obsahující zrnitý pigment hemosiderin, mohou se objevit i žluté krystaly hematoidinu. Vzácně se můžeme setkat také s lymfocytomem, tj. makrofág s pohlčeným lymfocytomem (obrázek 19). Z elementů myeloidní řady mohou být pozorovány neutrofilní granulocyty, které mají velikost 35 μm , růžovou rovnoměrně jemně granulovanou cytoplazmu a jejich jádro je segmentované (obrázek 20). Velmi sporadicky jsou přítomny buňky výstelky likvorových cest (obrázek 21). Ne příliš častým nálezem jsou buňky atypické či nádorové. Buňka tvaru pečetiho prstenu (obrázek 22) je přítomna např. u nádorových onemocnění zažívacího traktu. Nádorové buňky (obrázek

23, 24, 25, 26) jsou na první pohled odlišné svou abnormální velikostí, intenzivně bazofilní cytoplazmou či polymorfními jádry.

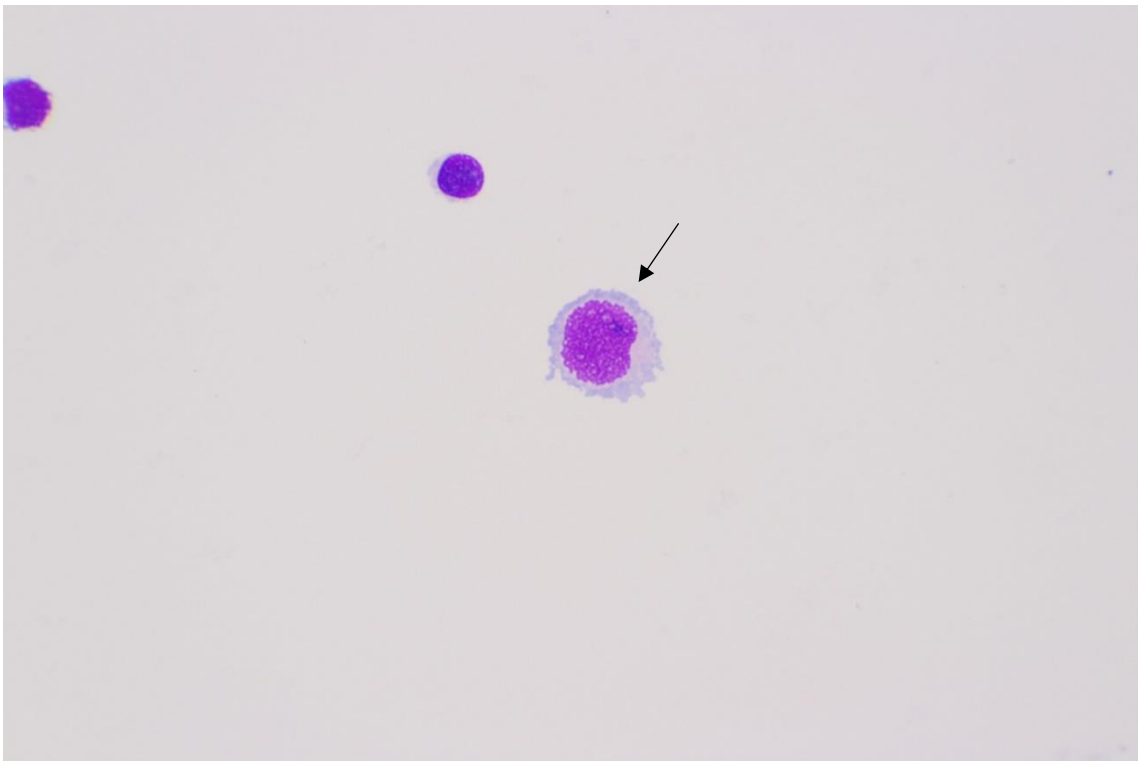
5.1.2 Elementy lymfocytární řady

Lymfocyt – velikost lymfocytu se pohybuje v rozmezí 8 – 10 μm , má úzký plazmatický lem. Jádro lymfocytu vyplňuje téměř celou buňku (obrázek 9).

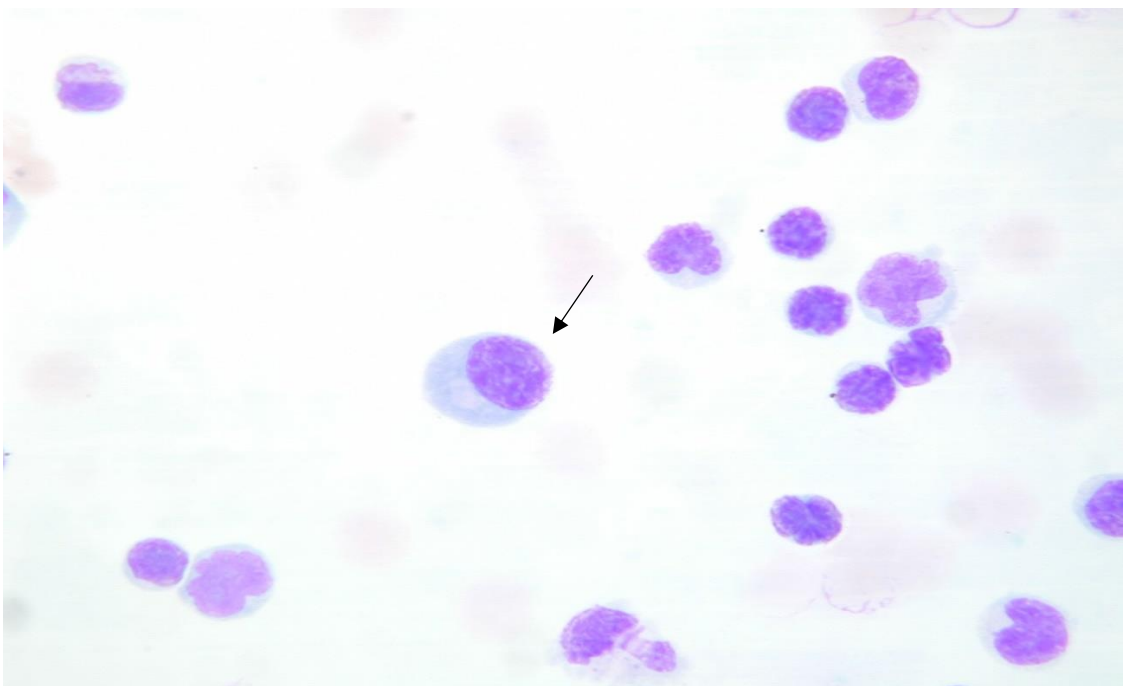


Obrázek 9: Lymfocyt obklopený několika erytrocyty

Plazmocyty – velikost plazmocyty je okolo 21 μm , bazofilní cytoplazma, okrouhlé jádro, excentricky uložené, perinukleární projasnění cytoplazmy (obrázek 10, 11).



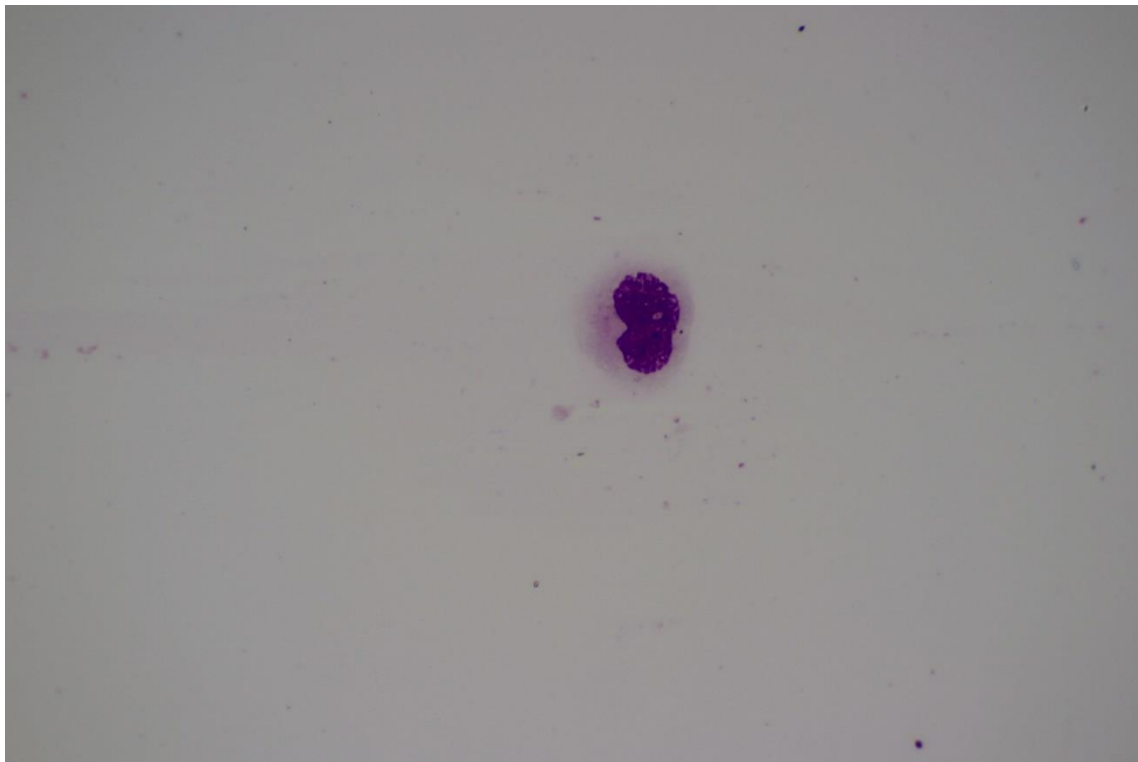
Obrázek 10: Plazmocyty



Obrázek 11: Klidové a aktivované lymfocyty, uprostřed plazmocyty (archiv laboratoře)

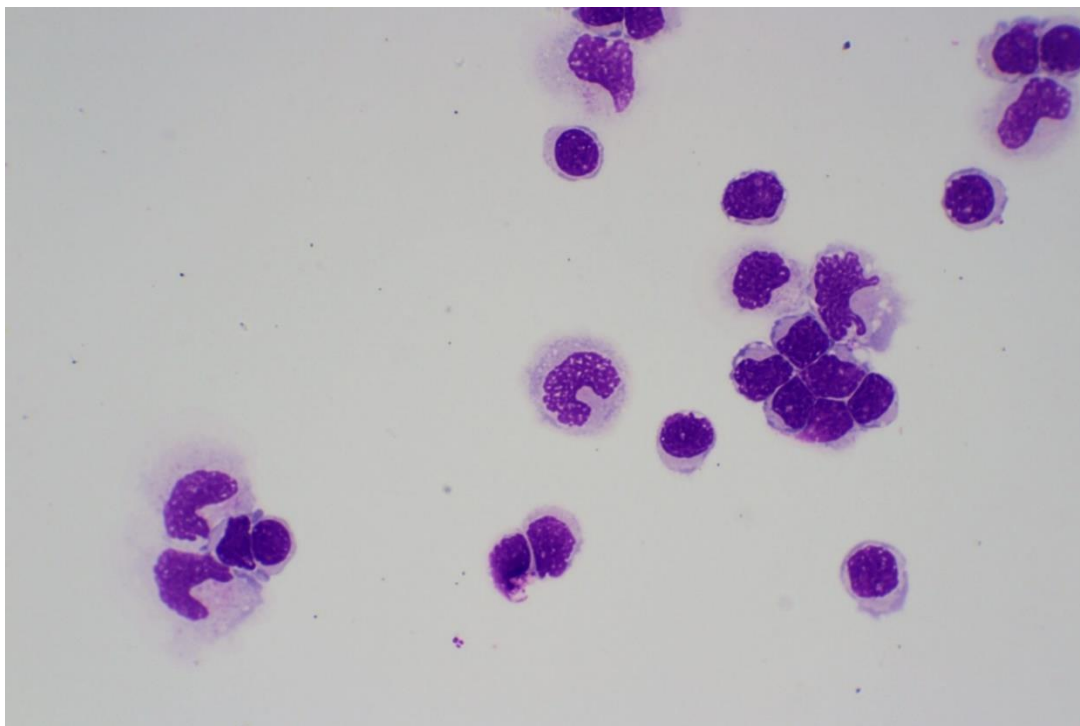
5.1.3 Elementy monocytární řady

Monocyt - nepravidelný tvar jádra, cytoplazma kouřová (obrázek 12).

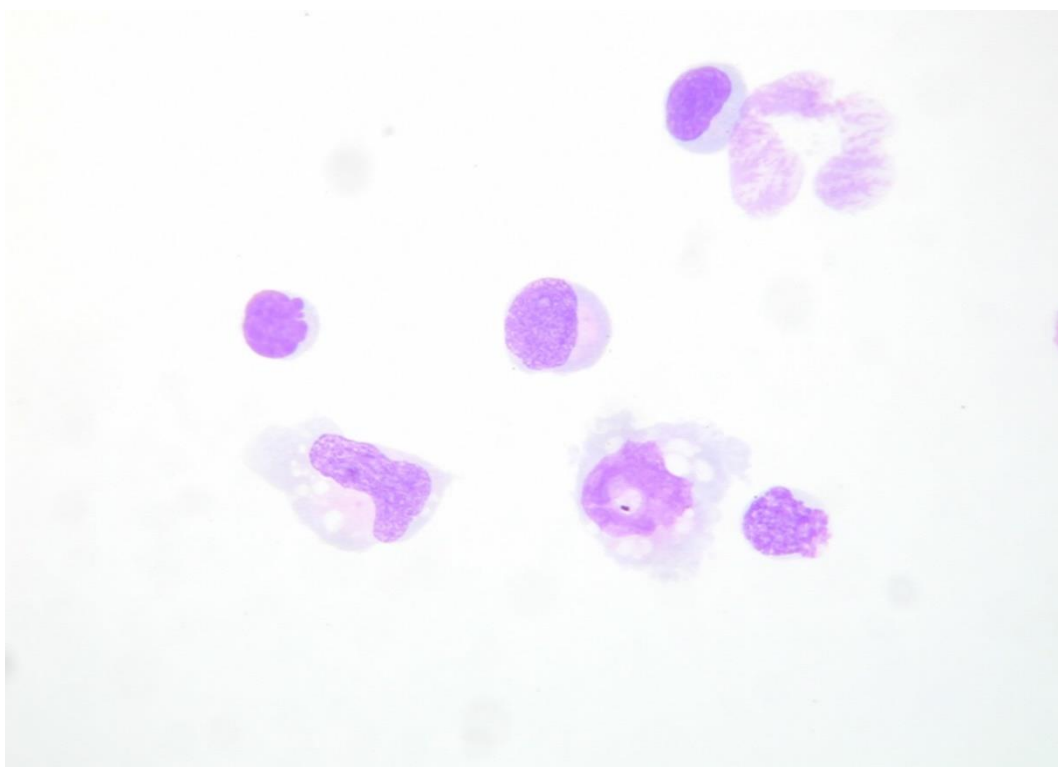


Obrázek 12: Monocyt

Aktivované monocyty, lymfocyty – lymfocyty, monocyty reagující na infekční agens (obrázek 13, 14).

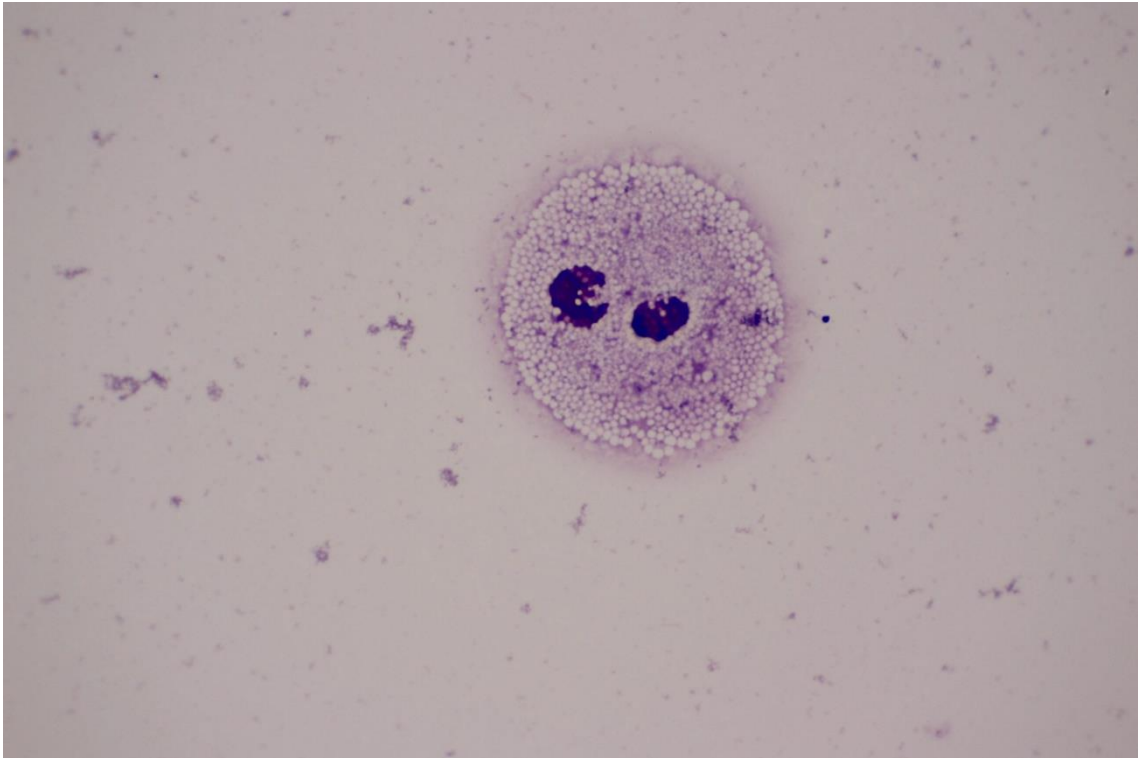


Obrázek 13: Aktivované lymfocyty a monocyty



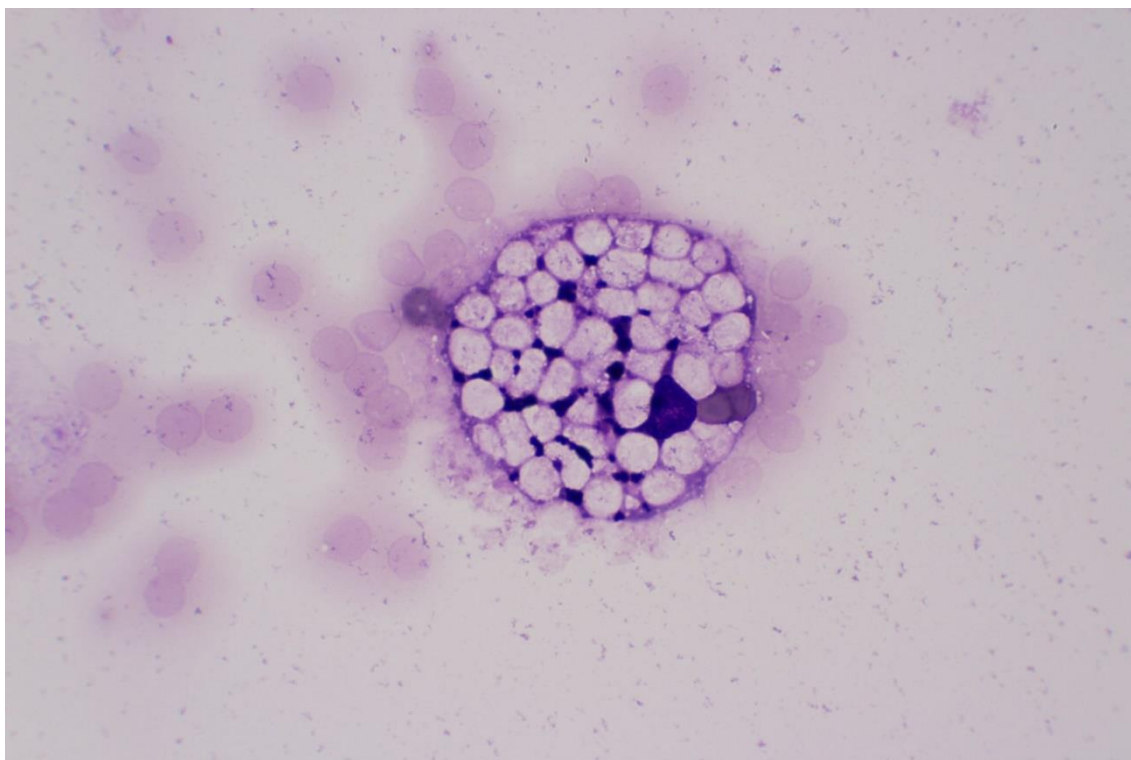
Obrázek 14: Aktivované lymfocyty a monocyty (archiv laboratoře)

Lipofág – buňka s fagocytovanými kapkami tukových látek (obrázek 15).

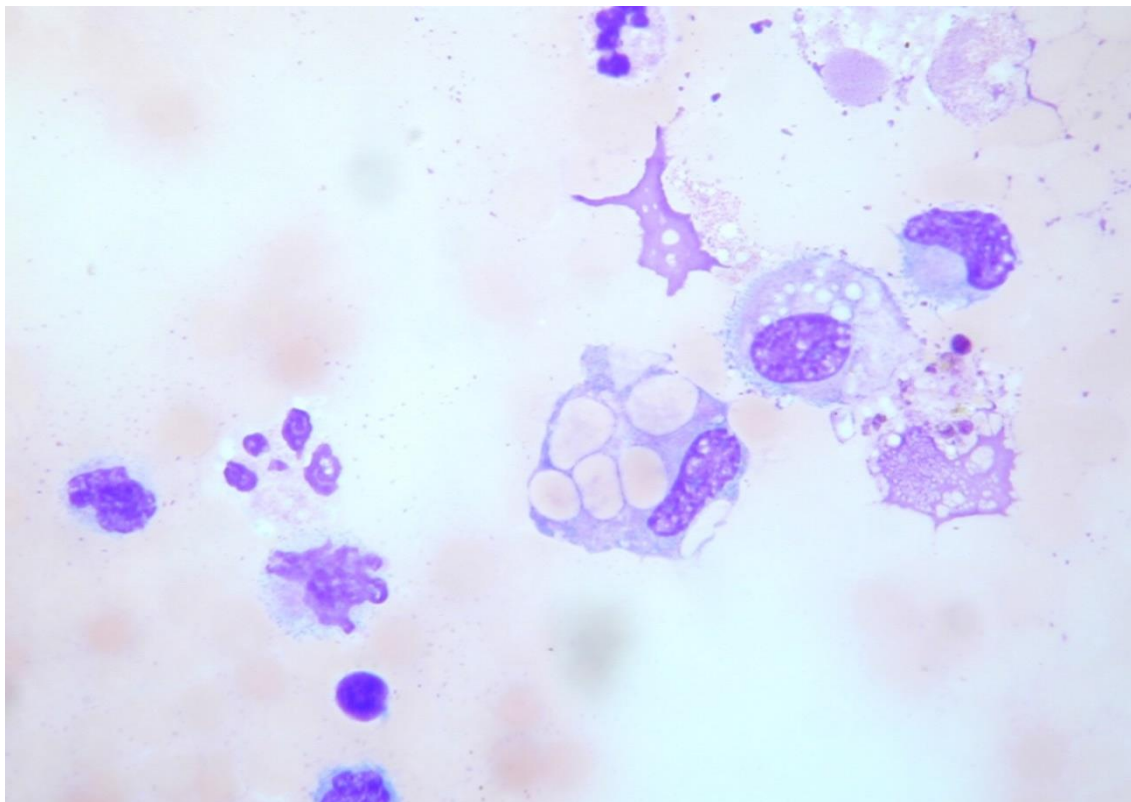


Obrázek 15: Lipofág

Erytrofág – makrofág s fagocytovanými erytrocyty (obrázek 16, 17).

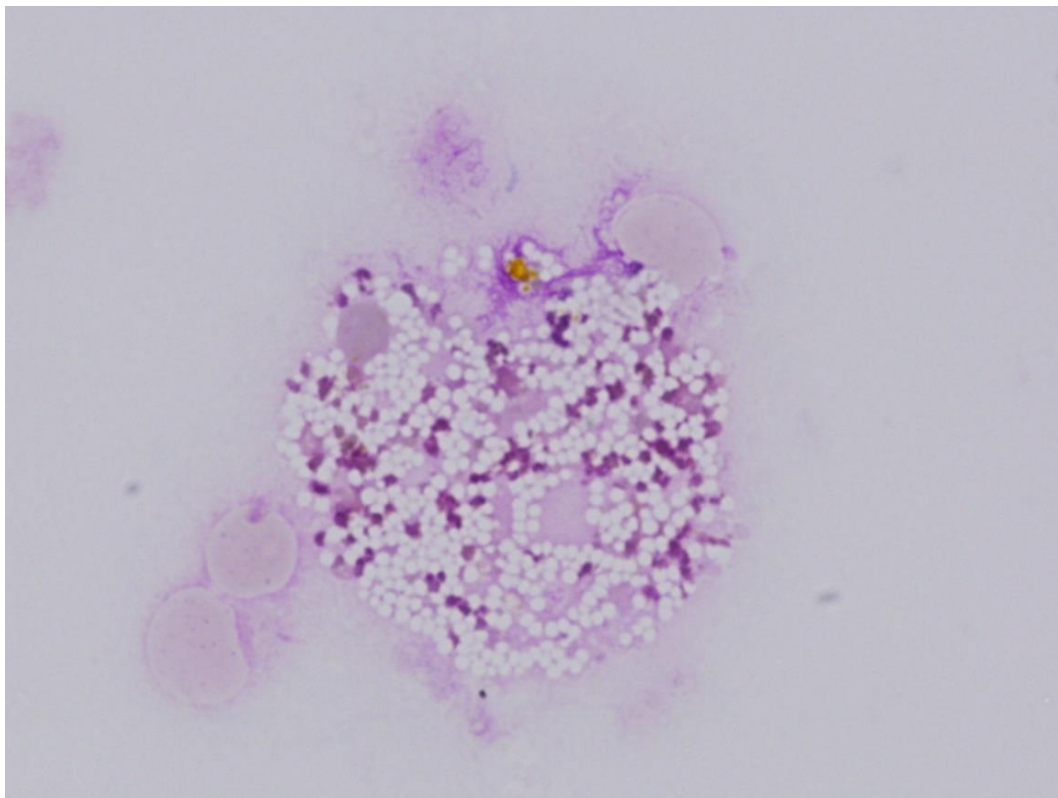


Obrázek 16: Erytrofág



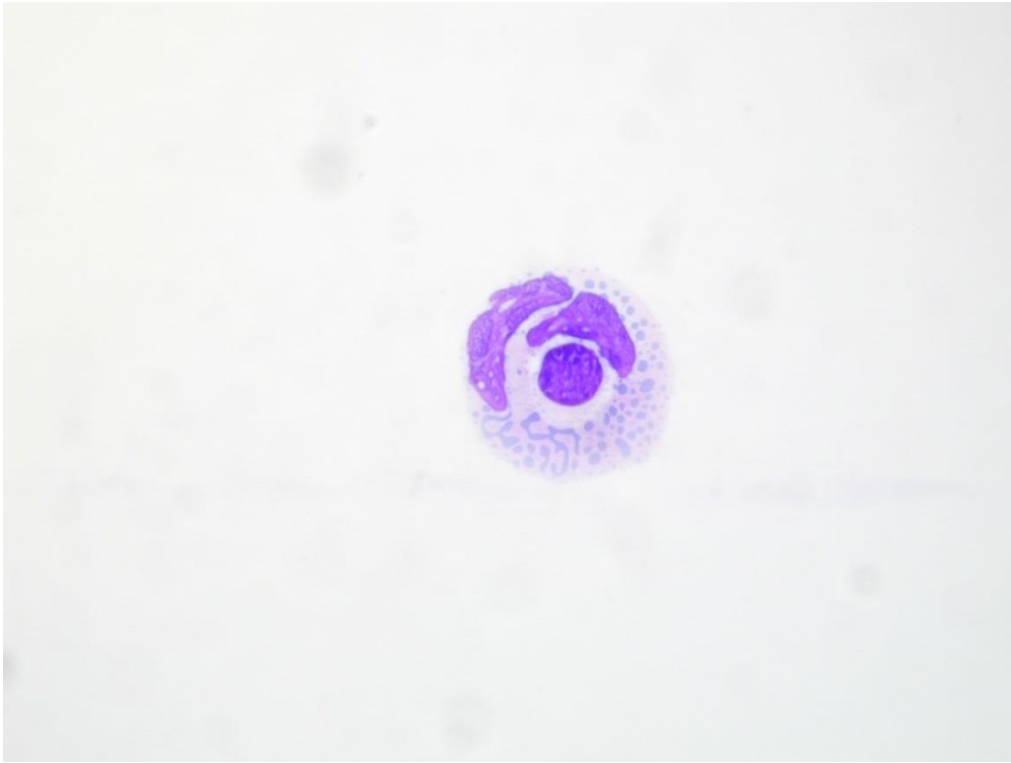
Obrázek 17: Erytrofág (archiv laboratoře)

Hemosiderofág – obsahuje zrnitý pigment hemosiderin (obrázek 18)



Obrázek 18: Hemosiderofág s krystalem hematoidinu (archiv laboratoře)

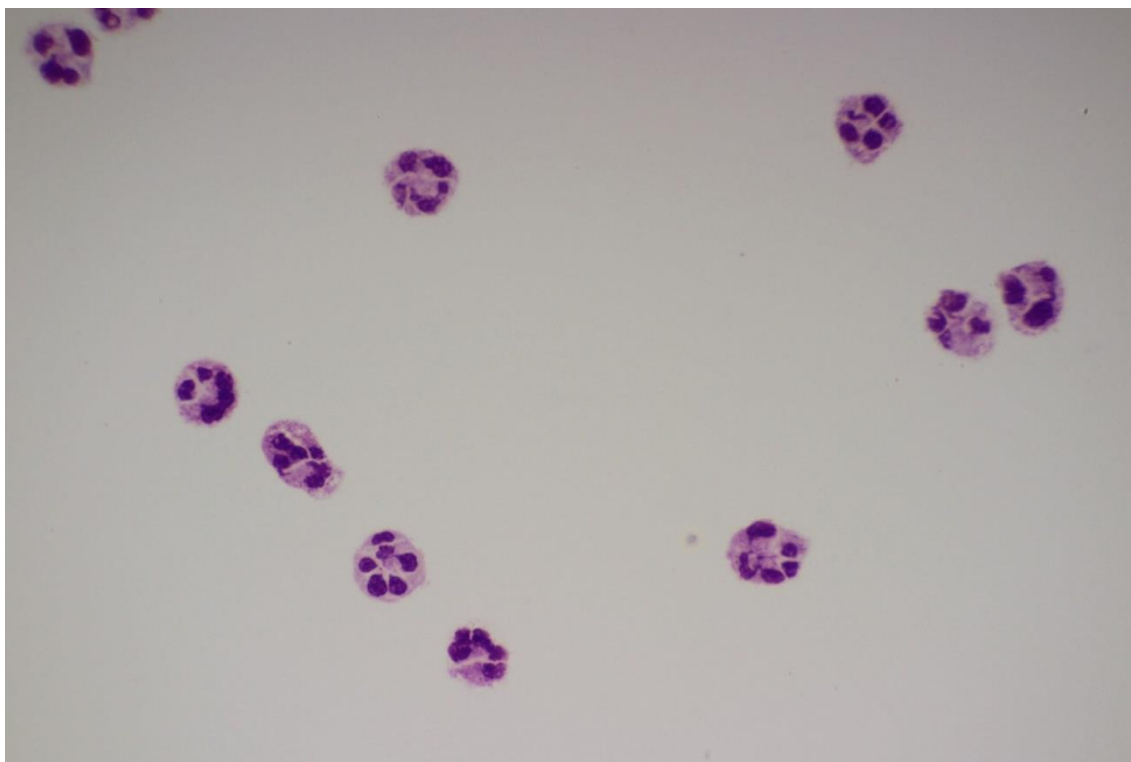
Lymfofág – makrofág s pohlceným lymfocytom (obrázek 19)



Obrázek 19: Lymfofág (archiv laboratoře)

5.1.4 Elementy myeloidní řady

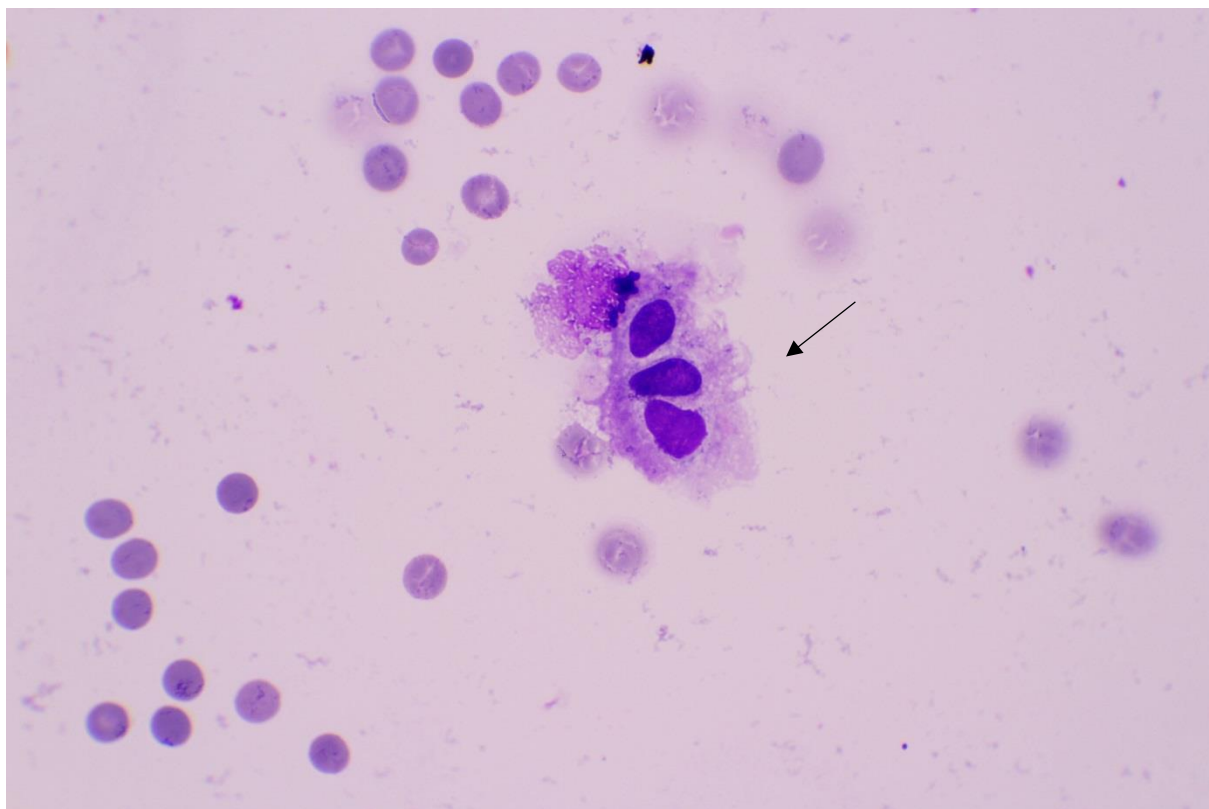
Neutrofilní granulocyt – 35 μm , segmentované jádro (obrázek 20).



Obrázek 20: Neutrofilní granulocyty

5.1.5 Buňky výstelky likvorových cest

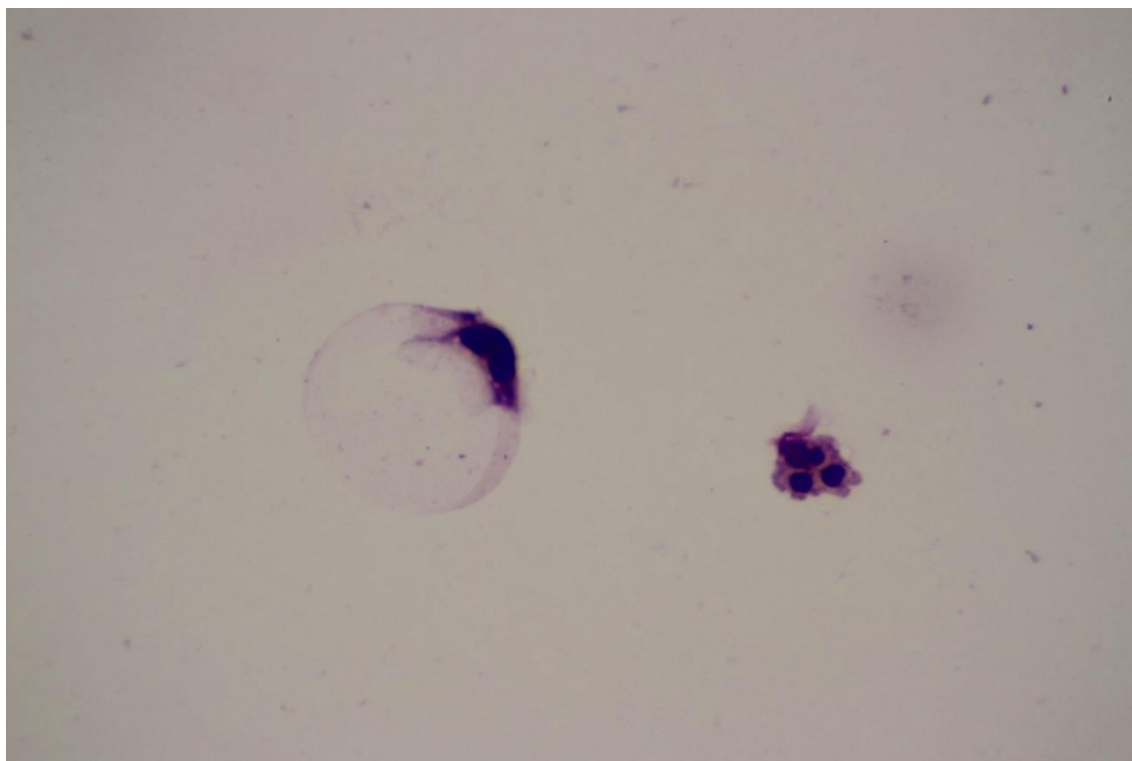
Buňky výstelky likvorových cest – fyziologický nález (obrázek 21)



Obrázek 21: Buňky výstelky likvorových cest

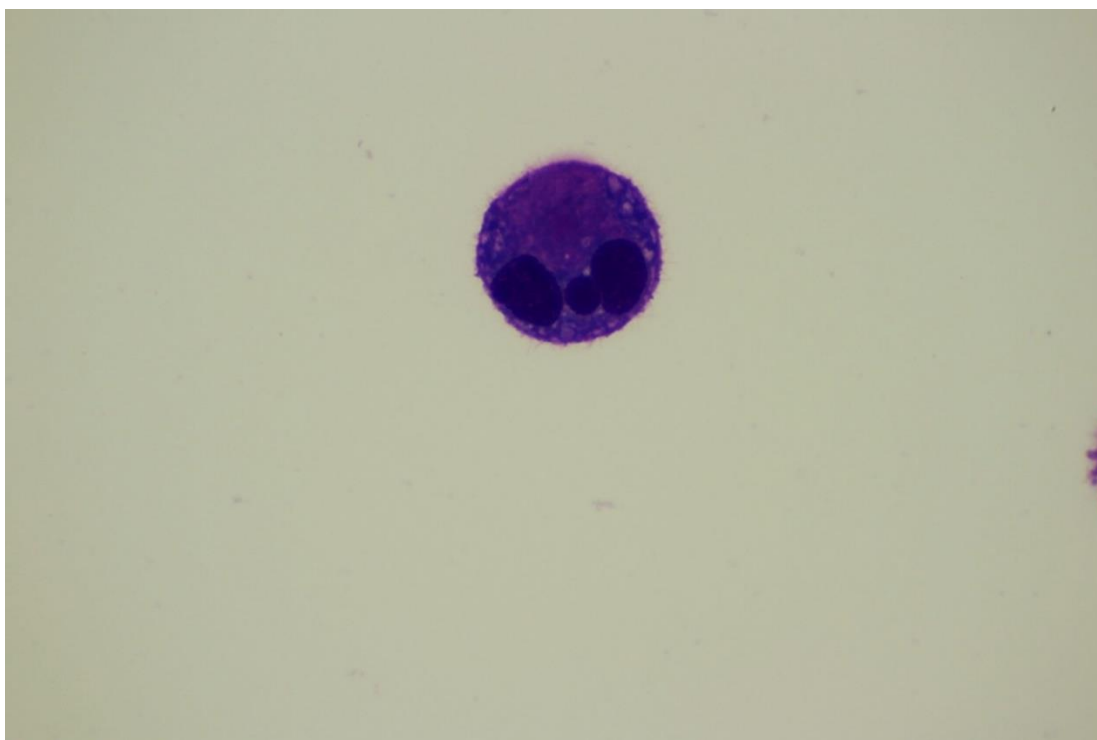
5.1.6 Nádorové buňky, atypické buňky

Buňka tvaru pečetního prstenu – může dosahovat velikosti až 100 μm , bazofilní lem, světlá cytoplazma a periferně uložené jádro (obrázek 22)

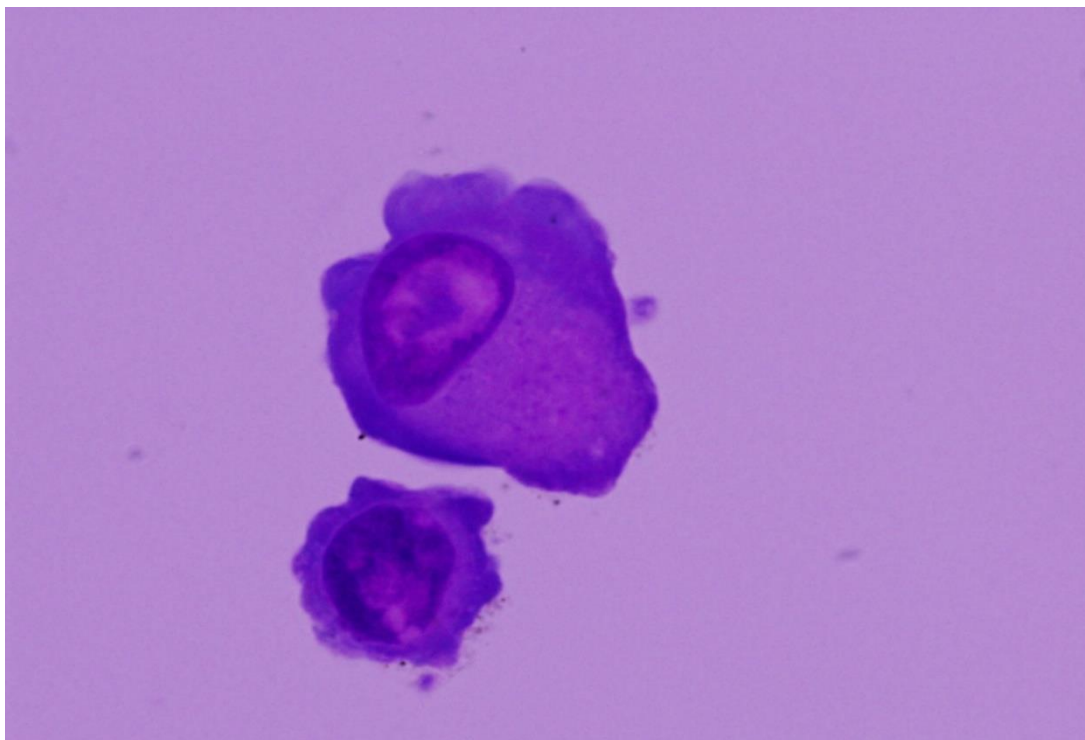


Obrázek 22: Buňka tvaru pečetního prstenu

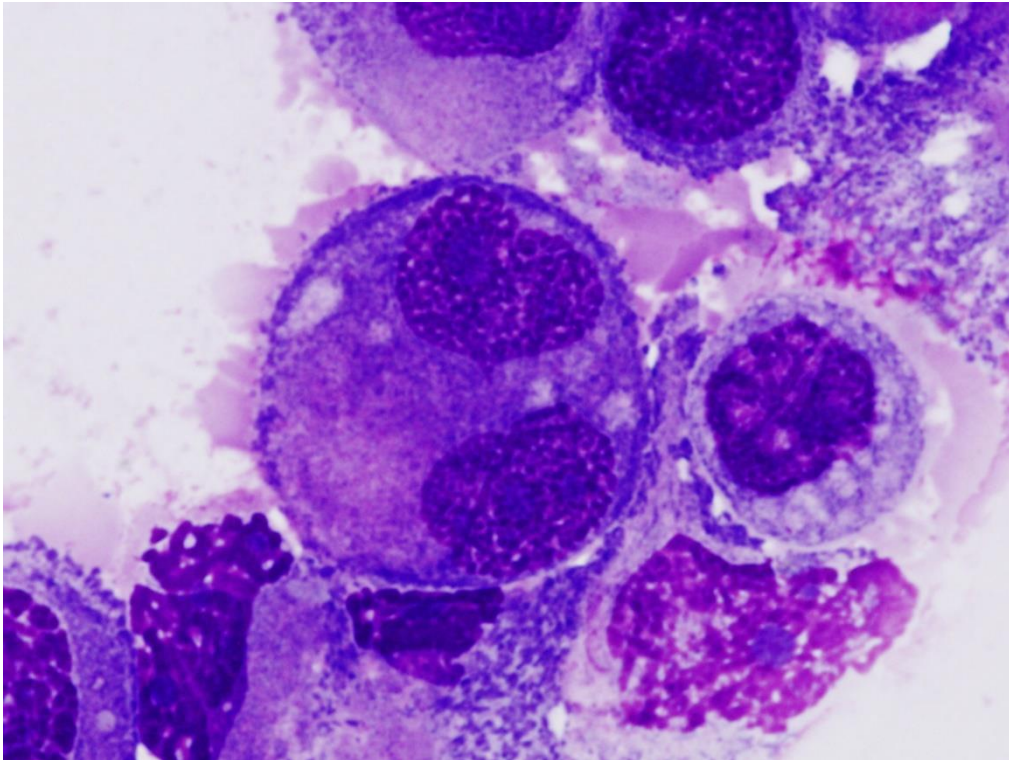
Nádorová buňka – abnormální velikost, intenzivně bazofilní cytoplazma jádro může být polymorfní a mohou vytvářet shluky (obrázek 23, 24, 25, 26)



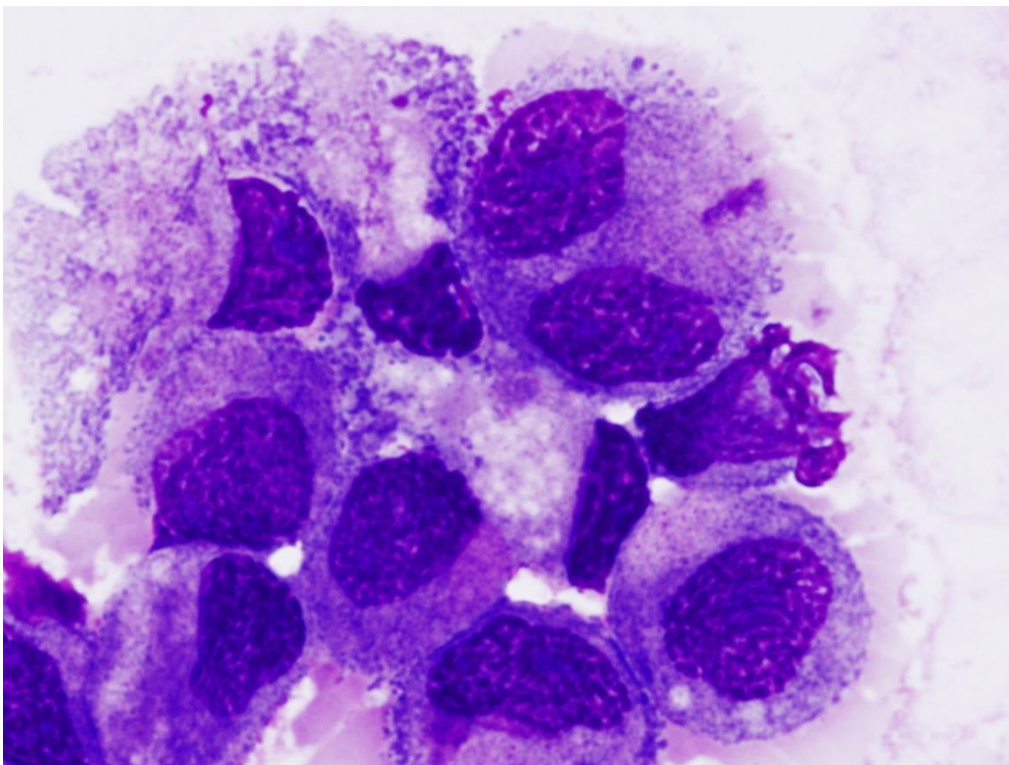
Obrázek 23: Nádorová buňka (Diagnóza – tumor močového měchýře s generalizací do skeletu)



Obrázek 24: Nádorové buňky (Diagnóza – karcinom prsu, archiv laboratoře)



Obrázek 25: Nádorové buňky (Diagnóza – karcinom žaludku, archiv laboratoře)



Obrázek 26: Nádorové buňky (Diagnóza – karcinom žaludku, archiv laboratoře)

5.2 Část II. Cytologické nálezy v mozkomíšním moku

Druhá obrazová část zahrnuje cytologické nálezy v mozkomíšním moku u různých diagnóz, včetně základních biochemických parametrů (koncentrace bílkoviny, glukózy). První skupina zahrnuje zánětlivá onemocnění, k nimž jsou řazeny záněty purulentní (hnisavé) a serózní (nehnisavé). U pacientů s purulentním zánětem (pacient č. 1, žena 73 let) byla v cytologickém preparátu pozorována typická záplava neutrofilních granulocytů (obrázek 27), vzorek likvoru byl zakalený, počet elementů byl vysoký (tabulka 7). Z důvodu nedostatečného množství vzorku zde nebyla stanovena hladina bílkoviny a glukózy, avšak u purulentních zánětů bývá hladina glukózy nízká, naopak hladina bílkoviny vysoká. U pacientů se serózním zánětem (pacienti č. 2, 10, 11, 12, 13, 14, 15; 6 mužů, 1 žena, průměrný věk 38,57) byl v cytologickém preparátu pozorován typicky zvýšený počet lymfocytů (obrázek 28). Vzhled likvoru byl čirý, bezbarvý (pacient č. 2, 10, 11, 13, 14, 15), pouze u pacienta č. 12 byl likvor velmi lehce sangvinolentní, což bylo pravděpodobně způsobeno arteficiální příměsí při lumbální punkci. U všech pacientů byl vysoký počet buněk a vysoká hladina bílkoviny. Hladina glukózy byla v normě (tabulka 8).

Cytologický nález u subarachnoidálního krvácení může odhalit stáří krvácení. V případě čerstvého krvácení (pacient č. 3, žena, 71 let) byly v cytologickém preparátu přítomny erytrofágy (obrázek 29). Vzhled likvoru byl xantochromní a počet elementů a erytrocytů byl vysoký. Hladina bílkoviny byla vysoká, hladina glukózy nízká (výsledky viz tabulka 9). U staršího krvácení (pacient č. 4, chlapec, 1 měsíc) byly v cytologickém preparátu přítomny hemosiderofágy (obrázek 30). Likvor byl hemolytický a hladina dalších parametrů nebyla z důvodu nedostatečného množství vzorku stanovena (tabulka 10).

U nádorových onemocnění se setkáváme s na první pohled netypickými buňkami (pacienti č. 5, 6, 7, 8). U pacienta č. 5 (muž, 69 let) s diagnostikovaným lymfomem byly v preparátu přítomny shluky lymfocytů a monocytů s nepravidelným jádrem (obrázek 31). Výsledky imunologického vyšetření svědčily pro výraznou infiltraci CNS. Počet buněk byl vysoký, vysoká proteinorachie a normální hladina glukózy (tabulka 11). U pacienta č. 6 (žena, 72 let) rovněž s diagnostikovaným lymfomem byly v cytologickém

preparátu přítomny lymfocyty (obrázek 32), extrémně vysoká proteinorachie a nízká glykorachie (tabulka 11). U pacienta č. 7 (žena, 78 let) s karcinomem prsu byly ve vysokém počtu zastoupeny rakovinové buňky atypické svým tvarem i velikostí (obrázek 33), lehce zvýšená bílkovina a normální glykorachie (tabulka 11). U pacienta č. 8 (muž, 71 let) s diagnózou tumoru močového měchýře s generalizací do skeletu byly nalezeny nádorové buňky, opět atypické svým tvarem, velikostí a zbarvením cytoplazmy (obrázek 34), další biochemické parametry byly v normě (tabulka 11).

Pacienti s RS (pacienti č. 9, 16, 17, 18, 19, 20, 21; 5 žen, 2 muži, průměrný věk 36,29) mají v hodnotách základního vyšetření pouze lehce zvýšený počet buněk (pacient č. 18, 20, 21). Proteinorachie je normální (pacienti č. 9, 18, 20, 21) či hraniční (pacienti č. 16, 17, 19) a hladina glukózy je zvýšená pouze u pacienta č. 19 (viz tabulka č. 12). V cytologických preparátech u pacientů s RS se setkáváme především s lymfocytární oligocytózou, vzácně s pleiocytózou (obrázek č. 35). Typická je přítomnost aktivovaných forem lymfocytární řady včetně plazmocytů.

5.2.1 Zánětlivá onemocnění

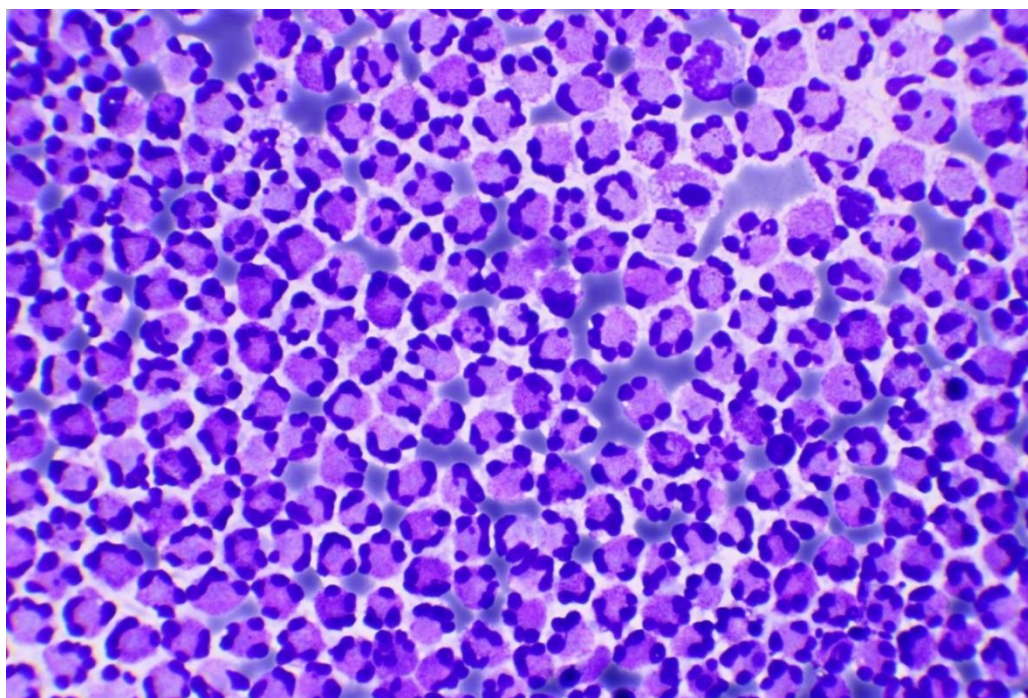
5.2.1.1 Purulentní (hnisavý) zánět

Tabulka 7: Výsledky základního vyšetření

Pacient č.	Pohlaví/ věk v době dg	Vzhled CSF	Počet elementů/ery	Celková bílkovina g/l	Glukóza mmol/l
1	Ž/73	zakalený	490,6/10	N	N

N – neměřeno, Ž – žena, dg – diagnóza, CSF – cerebrospinal fluid, ery - erythrocyty

Pacient č. 1: V cytologickém preparátu nalezena převaha neutrofilních granulocytů, ojediněle monocyty a shluky buněk. **Diagnóza** – meningitida NS (obrázek 27).



Obrázek 27: Obráz purulentní meningitidy

Tabulka 8: Výsledky základního vyšetření

Pacient č.	Pohlaví/ věk v době dg	Vzhled CSF	Počet elementů/ery	Celková bílkovina g/l	Glukóza mmol/l
2	M/41	Čirý, bezbarvý	133,3/0	0,90	2,80
10	M/19	Čirý, bezbarvý	186/32	1,40	3,95
11	M/26	Čirý, bezbarvý	174/32	0,45	2,95
12	M/65	1. zkumavka velmi lehce sangvinolentní, po centrifugaci čirý, bezbarvý; 2. zkumavka čirý, bezbarvý	82/213	1,93	4,74
13	M/27	Čirý, bezbarvý	212/5	3,06	1,05
14	Ž/24	Čirý, bezbarvý	19/0	0,26	2,99
15	M/68	Čirý, bezbarvý	48/29	0,81	2,7

M – muž, Ž – žena, dg – diagnóza, CSF – cerebrospinal fluid, ery - erythrocyty

Pacient č. 2: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,94 lymfocytů, 0,05 monocytů, 0,01 plasmocytů, patrná byla aktivace buněk, buněčné stíny a zbytky rozpadlých buněk. Lymfocytární pleocytóza, vysoká proteinorachie při normální glykorachii. Nález svědčí pro serózní neuroinfekci. **Diagnóza** – serózní neuroinfekce (obrázek 28).

Pacient č. 10: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,78 lymfocytů, 0,22 monocytů, 0,10 neutrofilních granulocytů. V základním vyšetření byl přítomen vysoký počet buněk, vysoká proteinorachie, obraz serózního zánětu nebo počínající purulentní meningitida. **Diagnóza** – serózní neuroinfekce.

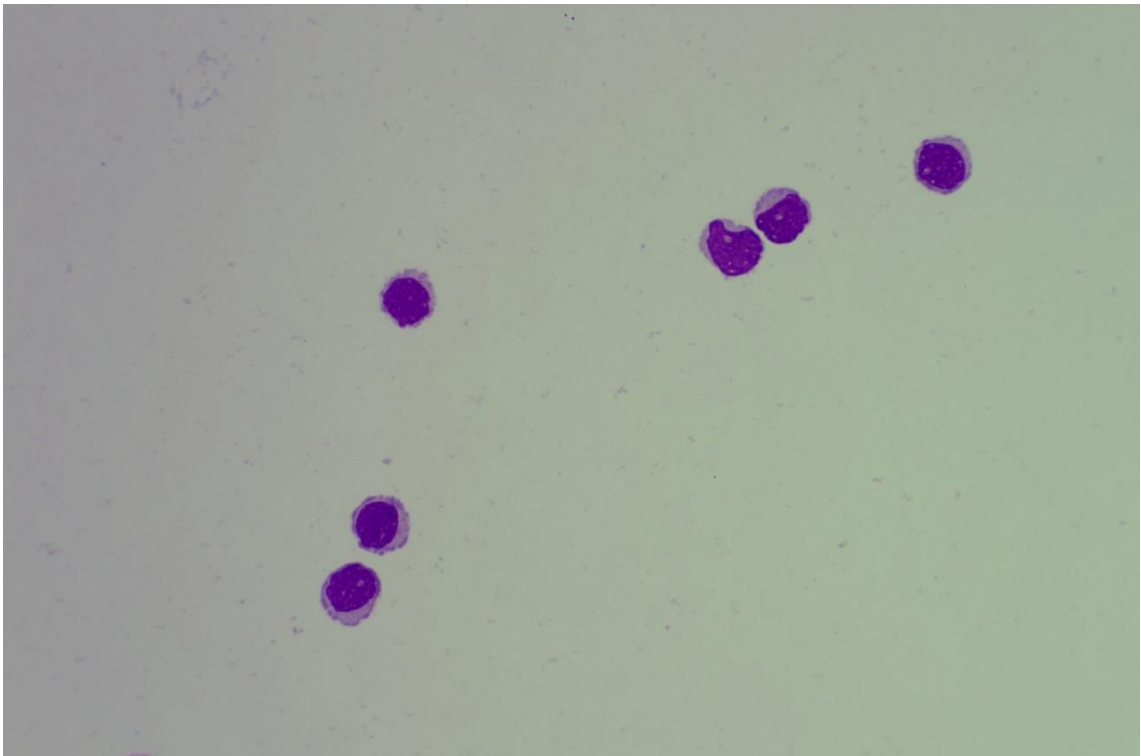
Pacient č. 11: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,70 lymfocytů, 0,22 monocytů, 0,04 plasmocytů, 0,01 neutrofilních granulocytů. V základním vyšetření byl přítomen vysoký počet buněk, hraniční bílkovina a obraz smíšené lymfo-monocytární pleocytózy, což odpovídá seróznímu zánětu. **Diagnóza** – serózní neuroinfekce.

Pacient č. 12: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,60 lymfocytů, 0,34 monocytů, 0,04 neutrofilních granulocytů, 0,02 plasmocytů, ?buněčné stíny, erythrocyty, aktivace a zbytky rozpadlých buněk?. V základním vyšetření byl přítomen vyšší počet buněk, vysoká proteinorachie, proteinocytologická asociace známky serózního zánětu. **Diagnóza** – serózní neuroinfekce.

Pacient č. 13: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,90 lymfocytů; 0,10 monocytů, aktivace a buněčné stíny. V základním vyšetření byl přítomen lehce zvýšený počet buněk, buňky se silnou aktivací a obraz serózního zánětu. **Diagnóza** – serózní neuroinfekce.

Pacient č. 14: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 45 lymfocytů, 10 monocytů, silná aktivace a zbytky rozpadlých buněk. V základním vyšetření byl přítomen lehce zvýšený počet buněk, buňky se silnou aktivací a obraz serózního zánětu. **Diagnóza** – serózní neuroinfekce.

Pacient č. 15: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,90 lymfocytů, 0,06 monocytů; 0,04 plasmocytů, erythrocyty. V základním vyšetření byla patrná proteinocytologická asociace, obraz serózního zánětu (obrázek 20). **Diagnóza** – serózní neuroinfekce.



Obrázek 28: Obraz serózního zánětu (pacient č. 2)

5.3 Subarachnoidální krvácení

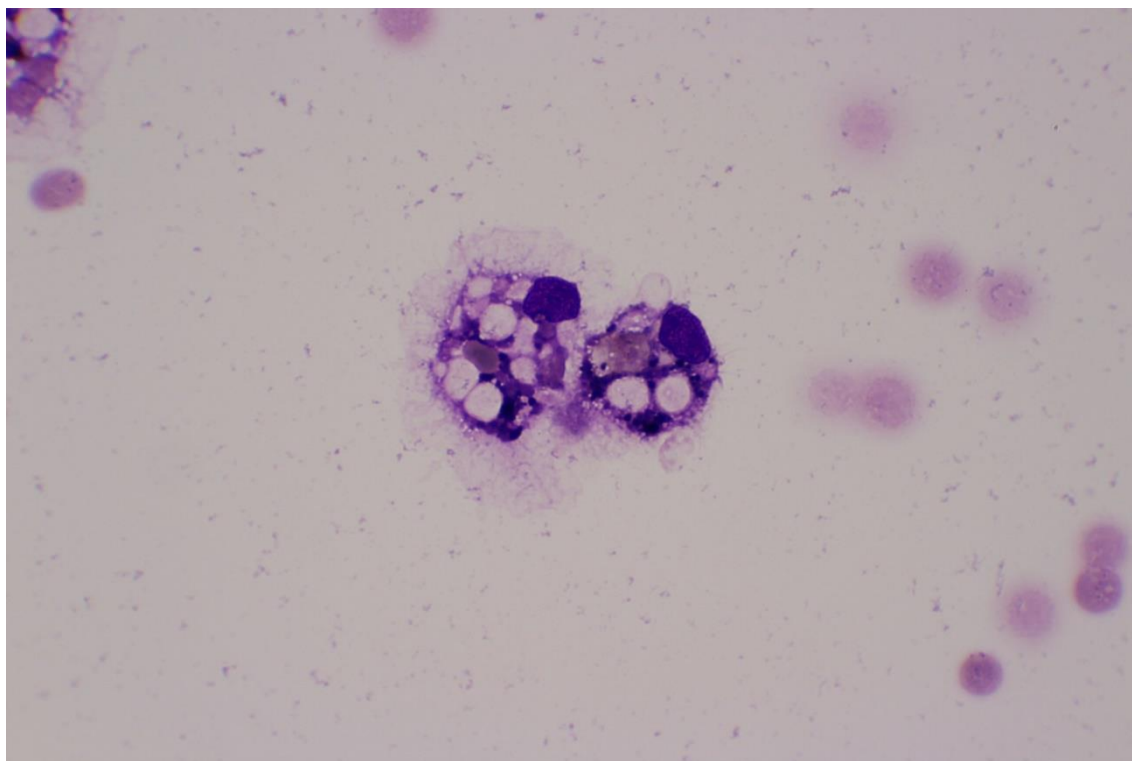
5.3.1 Čerstvé krvácení

Tabulka 9: Výsledky základního vyšetření

Pacient č.	Pohlaví/ věk v době dg	Vzhled CSF	Počet elementů/ery	Celková bílkovina g/l	Glukóza mmol/l
3	Ž/71	středně xantochromní po centrifugaci slabě xantochromní	46/1642	0,86	2,74

Ž – žena, dg – diagnóza, CSF – cerebrospinal fluid, ery - erythrocyty

Pacient č. 3: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,28 lymfocytů, 0,19 monocytů, 0,06 neutrofilních granulocytů, 0,42 erytrofágů (obrázek 21), 0,01 lymfocytů, erythrocyty a buněčné stíny. **Diagnóza** - subarachnoidální krvácení při ruptuře aneurysmatu (obrázek 29).



Obrázek 29: Erytrofágy (pacient č. 3)

5.3.2 Starší krvácení

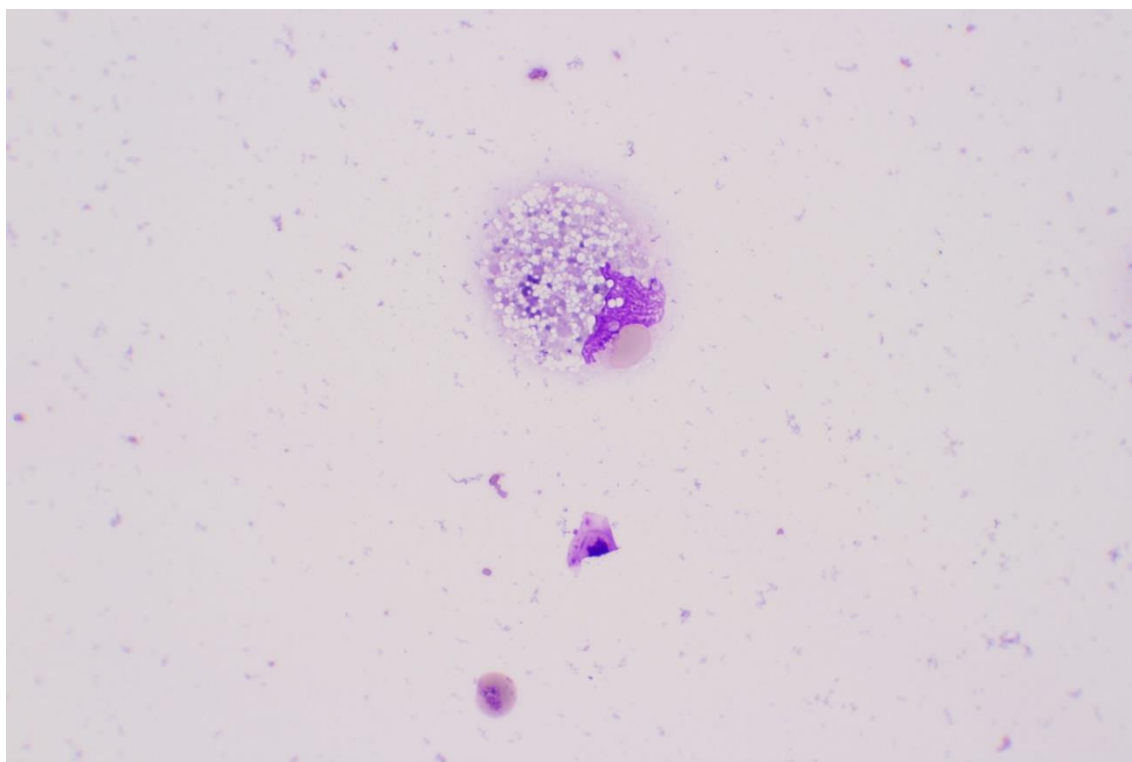
Tabulka 10: Výsledky základního vyšetření

Pacient č.	Pohlaví/ věk v době dg	Vzhled CSF	Počet elementů/ery	Celková bílkovina g/l	Glukóza mmol/l
4	M/1měsíc	lehce hemolytický	24,6/117	N	N

M – muž, dg – diagnóza, CSF – cerebrospinal fluid, ery - erythrocyty

Pacient č. 4: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,40 lymfocytů, 0,51 monocytů, 0,05 neutrofilních granulocytů, 0,02 eosinofilních granulocytů, 0,02 hemosiderofágů, aktivace buněk, dosti buněk poškozených, rozpadlých a zbytky rozpadlých buněk.

Diagnóza - intracerebrální krvácení (obrázek 30).



Obrázek 30: Hemosiderofág (pacient č. 4)

5.4 Nádorová onemocnění

Tabulka 11: Výsledky základního vyšetření

Pacient č.	Pohlaví/ věk v době dg	Vzhled CSF	Počet elementů/ery	Celková bílkovina g/l	Glukóza mmol/l
5	M/69	Čirý, bezbarvý	61,3/0	2,2	2,33
6	Ž/72	zakalený	11946,6/123	3,13	0,44
7	Ž/78	Čirý, bezbarvý	69,3/43	0,64	2,69
8	M/71	Čirý, bezbarvý	53,3/0	0,64	2,69

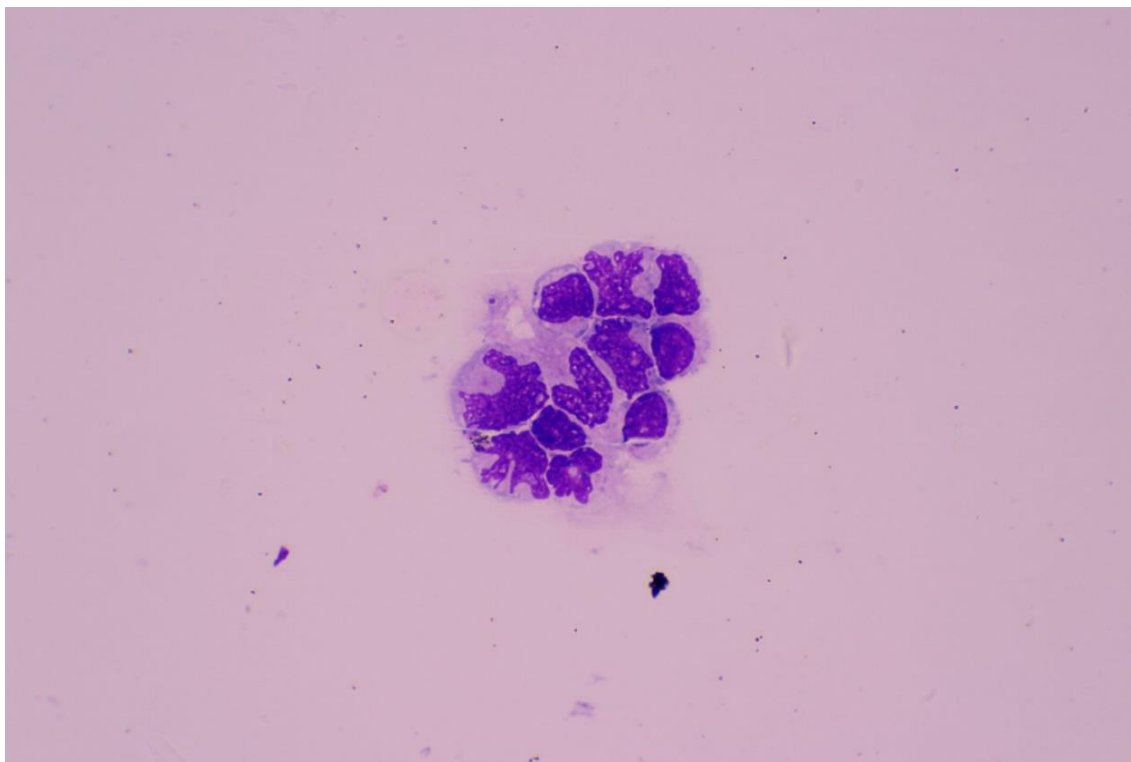
M – muž, Ž – žena, dg – diagnóza, CSF – cerebrospinal fluid, ery - erytrocyty

Pacient č. 5: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,94lymfocytů, 0,05monocytů, 0,01 neutrofilních granulocytů, buňky se silnou aktivací, některé buňky výrazně atypické, změna struktury a tvaru jádra, silná plasmatická reakce a zbytky rozpadlých buněk. **Diagnóza** – lymfom (obrázek 31).

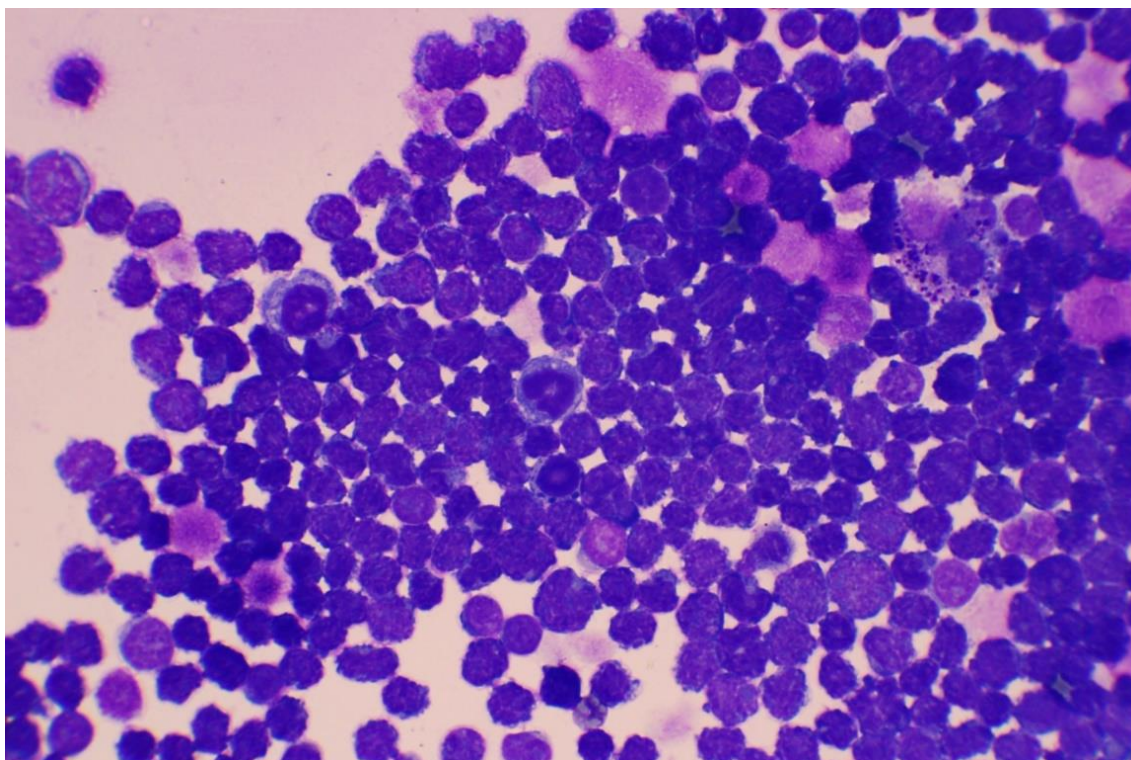
Pacient č. 6: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,98 lymfocytů, 0,01 monocytů 0,01 neutrofilních granulocytů, buňky se známkami silné aktivace, zbytky rozpadlých buněk, extrémně vysoká proteinorachie a nízká glykorachie. **Diagnóza** – lymfom (obrázek 32).

Pacient č. 7: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,35lymfocytů, 0,10 monocytů, 0,01dvoujaderných buněk., 0,54rakovinových buněk., velmi silná aktivace buněk, v jádru jádérka, vakuolizace a erytrocyty. **Diagnóza** - stav po exstirpaci tumoru v mozečku, dle biopsie svědčící pro sekundární ložisko karcinomu prsu (obrázek 33).

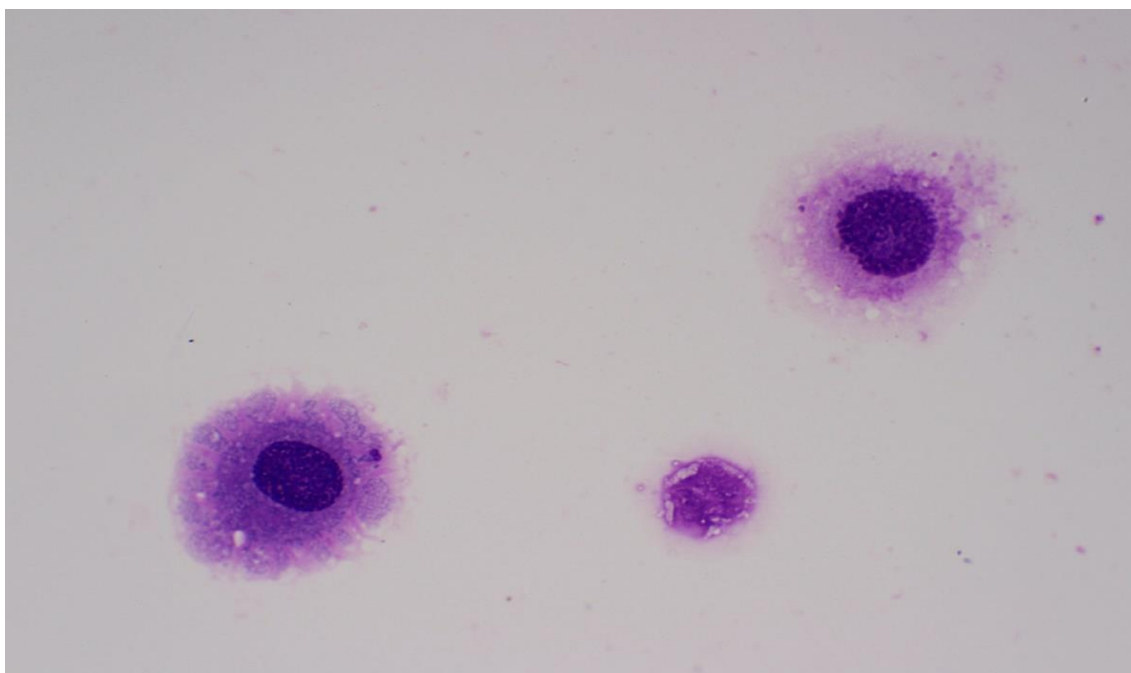
Pacient č. 8: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 0,32 monocytů, 0,22neutrofilních granulocytů, 0,40atypických buněk (obrovské s velmi tmavou cytoplazmou výběžkovitého tvaru s nepravidelným tvarem jádra, vyskytující se i ve shlucích. **Diagnóza** - tumor močového měchýře s generalizací do skeletu (obrázek 34).



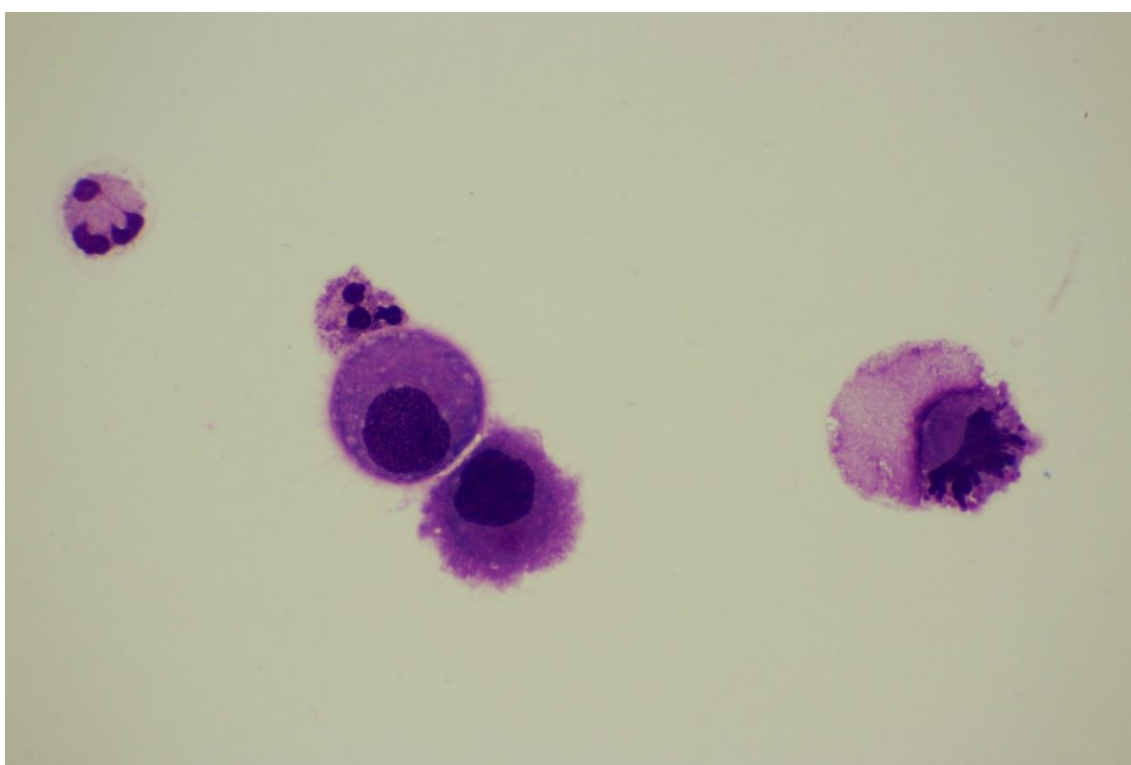
Obrázek 31: Shluk lymfocytů a monocytů s nepravidelným jádrem - syncytium (pacient č. 5)



Obrázek 32: Lymfocyty (pacient č.6)



Obrázek 33: Nádorové buňky (pacient č. 7)



Obrázek 34: Nádorové buňky (pacient č. 8)

5.5 Roztroušená skleróza

Tabulka 12: Výsledky základního vyšetření

Pacient č.	Pohlaví/ věk v době dg	Vzhled CSF	Počet elementů/ery	Celková bílkovina g/l	Glukóza mmol/l
9	M/40	Čirý, bezbarvý	5/21	0,36	3,11
16	Ž/43	Čirý, bezbarvý	1/0	0,43	2,84
17	Ž/43	Čirý, bezbarvý	4,3/10	0,44	3,7
18	Ž/43	Čirý, bezbarvý	6,30/266	0,33	2,96
19	M/35	Čirý, bezbarvý	1,60/1	0,56	6,14
20	Ž/25	Čirý, bezbarvý	7/0	0,32	2,81
21	Ž/25	Čirý, bezbarvý	7/0	0,16	3,62

M – muž, Ž – žena, dg – diagnóza, CSF – cerebrospinal fluid, ery - erythrocyty

Pacient č. 9: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 17 lymfocytů, 11 monocytů, buněčné stíny a zbytky rozpadlých buněk. **Diagnóza** – RS (obrázek 35).

Pacient č. 16: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 6 lymfocytů, 3 monocyty, lehká aktivace a ojediněle rozpadlé buňky. V základním vyšetření byl přítomen normální nález. **Diagnóza** – RS.

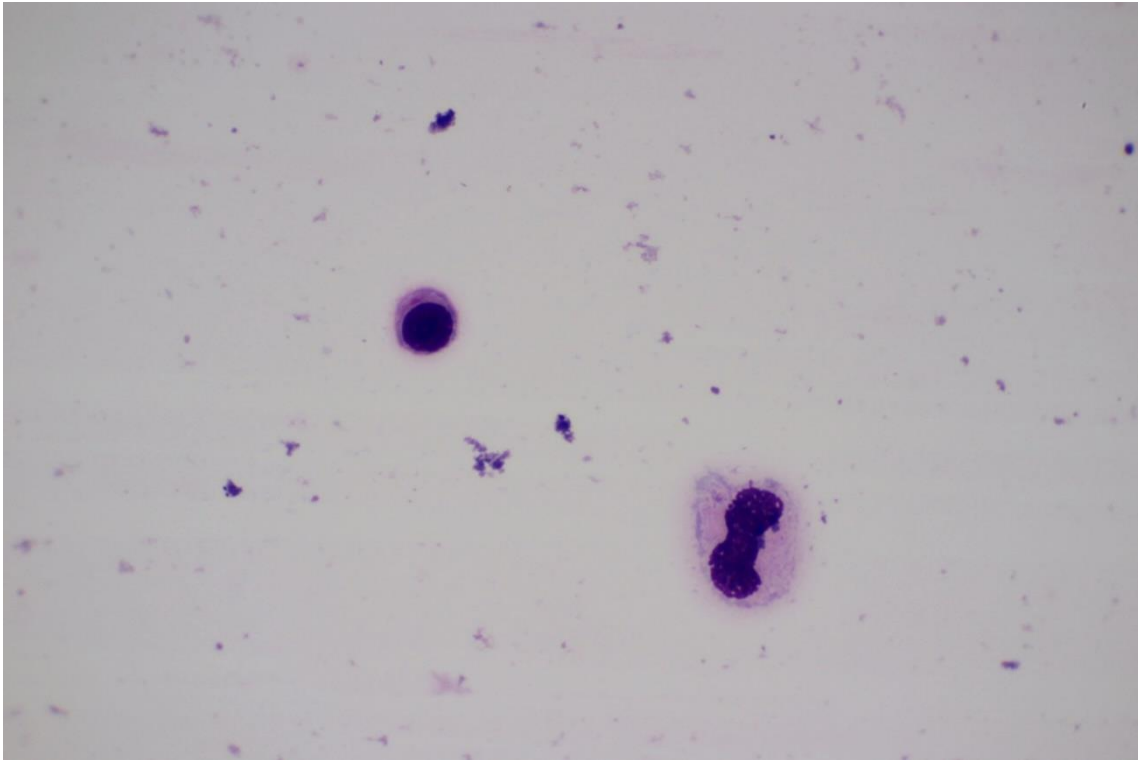
Pacient č. 17: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 12 lymfocytů, 6 monocytů, buňky se známkami aktivace, zbytky rozpadlých buněk a ojediněle erythrocyty. V základním vyšetření byla přítomná lymfocytární oligocytóza, jinak v normě. **Diagnóza** – RS.

Pacient č. 18: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 8 lymfocytů, 1 monocyt, aktivace a erythrocyty. V základním vyšetření byla přítomná hraniční lymfocytární pleocytóza, jinak základní vyšetření v normě. **Diagnóza** – RS.

Pacient č. 19: V cytologickém preparátu byl nalezen 1 lymfocyt, 2 monocyty a ojediněle zbytky rozpadlých buněk. V základním vyšetření byla přítomná vysoká glykorachie, jinak v normě. **Diagnóza** – RS.

Pacient č. 20: V cytologickém preparátu bylo nalezeno 5 lymfocytů, 3 monocyty, lehká aktivace, převaha buněčných stínů a zbytky rozpadlých buněk. V základním vyšetření byla přítomná hraniční pleocytóza lymfo-monocytární, jinak v normě. **Diagnóza** – RS.

Pacient č. 21: V cytologickém preparátu byl nalezen 1 lymfocyt a buněčné stíny. Základní vyšetření v normě. **Diagnóza** – RS.



Obrázek 35: Lymfocyt, monocyt (pacient č. 9)

6 DISKUZE

Analýza mozkomíšního moku má nezastupitelnou roli v diagnostice řady poruch CNS – od zánětů, autoimunitních onemocnění, subarachnoidálního krvácení až po nádorové infiltrace CNS. Kvalitativní a kvantitativní cytologie má svá specifika, především v preanalytické fázi, tj. zejména nutnost rychlého zpracování a limitovaný objem vzorku. Avšak při dodržení postupů a v kontextu s paralelním vyšetřením může zásadním způsobem přispět ke stanovení diagnózy patologických stavů v CNS.

Mozkomíšní mok je většinou málo buněčný biologický materiál, proto je mnohdy obtížné nalézt buněčné elementy. U diagnóz jako jsou serózní či purulentní záněty se naopak buňky vyskytují v hojném počtu. V cytologii likvoru se nejčastěji setkáváme s mononukleáry - lymfocyty a monocyty, které jsou přítomny až v 80 % případů. Jedná se o fyziologický nález, pokud je počet buněk ve Fuchs – Rosenthalově komůrce normální. Při arteficiální příměsi krve v likvoru pozorujeme v preparátu erytrocyty a granulocyty. Výjimečně pozorujeme i nádorové buňky, u kterých pouze ze základního barvení May Grünwald Giemsa nejsme schopni stanovit jejich původ.

U některých diagnóz, se kterými jsem se během praxe setkala, je cytologický obraz typický. Jedná se např. o purulentní (hnisavý) zánět, kde pozorujeme charakteristickou záplavu neutrofilních granulocytů. Počet buněk ve Fuchs – Rosenthalově komůrce je při této diagnóze vysoký. Z biochemických parametrů je pro tuto diagnózu typická vysoká proteinorachie a nízká glykorachie. U hnisavých zánětů je pro prognózu onemocnění stěžejní včasná diagnostika. Kromě výrazně zvýšených hodnot proteinorachie dochází také k výrazným metabolicko – energetickým změnám s rozvojem anaerobního metabolismu. U serózního zánětu pozorujeme v cytologickém preparátu velké množství lymfocytů. U ostatních biochemických parametrů se setkáváme pouze se zvýšenou proteinorachií, hodnoty glykorachie jsou normální.

Častými klienty neurologických pracovišť jsou pacienti s RS. U těchto pacientů se setkáváme s diskrétními zánětlivými změnami a nízkým stupněm zánětlivé celulózy. V cytologii pozorujeme lehkou lymfo-monocytární pleocytózu. Z biochemických parametrů se setkáváme s lehkou proteinorachií a hladiny glukózy bývají u této diagnózy

ve fyziologickém rozmezí. Stěžejním likvorovým vyšetřením při určení diagnózy RS je stanovení oligoklonálních páسů metodou izoelektrické fokusace.

Při subarachnoidálním krvácení se setkáváme s hemosiderofágy a erytrofágy, přičemž hemosiderofágy jsou typické pro starší krvácení. Pozorujeme produkty rozpadu hemoglobinu – typické fialové hrudky hemosiderinu a žluté útvary hematoidinu. U čerstvého krvácení pozorujeme typické erytrofágy, tedy makrofágy, které pohlcují přítomné erythrocyty. Důležitým vyšetřením pro analýzu krvácení je spektrofotometrie, kterou je nutné provést co nejrychleji po odběru, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Vyšetření vzhledu likvoru při podezření na krvácení má orientační charakter. Při této diagnóze může být likvor sangvinolentní. Rozhodující je pak jeho vzhled po centrifugaci. Pokud je po centrifugaci likvor xantochromní, může se jednat o krvácení. Opatrnost je však na místě tehdy, pokud se jedná o novorozence, u nichž se může xantochromní likvor vyskytovat fyziologicky nebo pokud byla příměs krve příliš velká, může být likvor také xantochromní a o krvácení se jednat nemusí.

Nádorová onemocnění představují jednoznačně nejnáročnější problematiku cytologie mozkomíšního moku. Pro následnou léčbu nádorového procesu je klíčové potvrzení nádorové buněčné populace v mozkomíšním moku. Méně než 10 % primárních nádorů CNS metastazují likvorovými cestami a způsobují neurologické příznaky (DeAngelis, 1998). Nádorové buňky jsou specifické. K obvykle uváděným kritériím patří především polymorfie buněk, polymorfie jader, četná jadérka, obří buňky, vícejaderné elementy, značná velikost jader oproti objemu cytoplazmy, časté mitózy, bazofilie cytoplazmy a tvorba syncytií. Maligní elementy se v likvoru objevují v přítomnosti metastáz do mozku či do páteřního kanálu. Méně častým nálezem jsou maligní elementy v likvoru u primárních nádorových procesů CNS. U některých karcinomů bez metastáz je také možné zachytit ojediněle nádorové buňky. Abychom zjistili, o jaký typ nádoru se jedná, musí být vzorek zaslán k dalšímu vyšetření za účelem specifické analýzy pro přesnější detekci. Bližší diagnostika je možná při použití specifických monoklonálních protilátek (Adam *et al.*, 2009).

V současné době se neustále stupňuje snaha o nalezení co nejvíce specifických markerů pro diagnostiku neurologických chorob. Kvantitativní a kvalitativní cytologie

má však svou nezastupitelnou roli a představuje zlatý standard pro diagnostiku některých onemocnění.

7 ZÁVĚR

Cytologie mozkomíšního moku umožňuje v poměrně krátkém časovém úseku s běžnými prostředky získat cenné informace o procesech odehrávajících se v CNS vyšetřovaného pacienta. Má svou nezastupitelnou roli v diagnostice některých onemocnění např. purulentní záněty při kterých se setkáváme s typickou záplavou neutrofilních granulocytů nebo typickým zmnožením lymfocytů u serózních zánětů. Kvalitativní i kvantitativní cytologie je jednoduchá a technicky nenáročná metoda, je však zapotřebí zkušeného cytologa. Cytologická analýza likvoru představuje zlatý standard každé likvorové laboratoře. Spolehlivá likvorová diagnostika však není postavena pouze na určení hodnot jednoho či více laboratorních parametrů, ale úspěšně ji lze provádět pouze na základě znalosti podstaty procesů odehrávajících se za příslušných okolností v CNS.

8 LITERATURA

Adam, P., Sobek, O., Doležil, D., Kelbich, P., Koudelková, M., Kasík, J., Hajduková, L., Hybel'ová, M., Adam, D. (2009): Speciální likvorologie. Diagnostické možnosti cytologie mozkomíšního moku. Návrh klasifikace cytologických nálezů, klinický přínos a meze používaných metodik. Labor Aktuell 3: 9 – 14.

Adam, P., Táborský, L., Sobek, O., Hildebrand T., Kelbich, P., Průcha, M., Hyánek, J. (2001): Cerebrospinal fluid. Adv Clin Chem 36: 1 – 62.

Bednářová, J., Adam, P. (2002): Likvorový profil u roztroušené sklerózy mozkomíšní. Neurol pro praxi 5: 249 – 251.

Blechová, Z. (2006): Hnisavé meningitidy nejmladších věkových skupin. Neurol. pro praxi 3: 131 – 133.

Brinker, T., Stopa, E., Morrison, J., Klinge, P. (2014): A new look at cerebrospinal fluid circulation. Fluids Barriers CNS 11(1): 10.

Brown, P. D., Davies, S. L., Speake, T., Millar, I. D. (2004): Molecular mechanism of cerebrospinal fluid production. Neuroscience 129(4): 957 – 970.

Brož, P., Ženková, J., Řezáčová, K. (2013): Vyšetření mozkomíšního moku v diagnostice subarachnoidálního krvácení. Klin Biochem Metab 21(42) 220 – 225.

Calthrope, N. (2004): The history of spinal needles: getting to the point. Anaesthesia 59(12): 1231 – 1241.

Cozanitis, D. A. (2012): Heinrich Irenaeus Quincke (1842 – 1922): The Nobel Prize but for the problem of age. Presse Med 42(4 Pt 1): 464 – 470.

Davis, A., Dobson, R., Kaninia, A., Giovannoni, G., Schmierer, K. (2015): Atraumatic needles for lumbar puncture: why haven't neurologists changed? *Pract neurol* 16(1): 18 – 22.

DeAngelis, L. M. (1998): Current diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis. *J Neurooncol* 38(2-3): 245 – 252.

Domingues, R. B., Fernandes, G. B. P., de Moura Leite, F. B. V., Tilbery, Ch. P., Thomaz, R. B., Silva, G. S., Manguiera, C. L. P., Soares, C. A. (2017): The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis: far beyond the bands. *Einstein* 15(1): 100 – 104.

Dušková, J., Sobek, O. (2018): Cytologické vyšetření mozkomíšního moku. *Česk Patol* 55(3): 145 – 157.

Džupová, O., Polívková, S., Smíšková, S., Beneš, J. (2010): Epidemiologické, klinické a laboratorní charakteristiky purulentní meningitidy u dospělých pacientů. *Klin Mikrobiol Inf Lek* 16(2): 61 – 67.

Feitová, V. (2002): Současné možnosti a význam vyšetření magnetickou rezonancí v diagnostice roztroušené sklerózy mozkomíšní. *Neurol. Pro Praxi* 5: 252 – 255.

Glosová, L. (1998): Cytologický atlas mozkomíšního moku. Galén, Praha.

Hajdu, S. I. (2003): A note from history: Discovery of the cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci* 33(3): 334 – 336.

Havránek, J., Schejbalová, M., Dedek, V., Fajt, M., Heinige, P., Polanecká, L., Brosch, K. (2009): Purulentní meningitidy v dětském věku. *Pediatr. pro praxi* 10(1): 20 – 24.

Horáková, D. (2011): Roztroušená skleróza – naše současné možnosti při diagnostice, stanovení prognózy nemoci a sledování efektivity léčby. *Neurol. pro praxi* 12(4): 265 – 269.

Howard, S. C., Gajjar, A., Ribeiro, R. C., Rivera, G. K., Rubnitz, J. E., Sandlund, J. T., Harrison, P. L., de Armendi, A., Dahl, G. V., Pui, Ch-H. (2000): Safety of lumbar puncture for children with acute lymphoblastic leukemia and trombocytopenia. *JAMA* 284(17): 2222 – 2224.

Howard, S. C., Gajjar, A., Cheng, Ch., Kritchevsky, S. B., Somes, G. W., Harrison, P. L., Ribeiro, R. C., Rivera, G. K., Rubnitz, J. E., Sandlund, J. T., de Armendi, A. J., Razzouk, B. I., Pui, Ch-H (2002): Risk factors for traumatic and bloody lumbal puncture in children with acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 288(16): 20001 – 2007.

Hrudková, M., Belada, D., Smolej, L., Žák, P., Malý, J. (2010): Primární lymfomy centrálního nervového systému. *Vnitř Lék* 56(8): 795 – 800.

Johanson, C. E., Duncan, J. A., Klinge, P. M., Brinker, T., Stopa, E. G., Silverberg, G. D. (2008): Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 5: 1 – 32.

Kalina, M (2011): Příčiny, klinický obraz a diferenciální diagnostika spontánního intracerebrálního krvácení. *Neurol praxi* 12(2): 80 – 83.

Kelbich, P., Adam, P., Sobek, O., Koudelková, M., Procházka, J., Hanuljaková, E., Válková, R., Tomaškovič, M., Krušina, M. (2009): Základní vyšetření likvoru v diagnostice postižení centrálního nervového systému. *Neurol pro praxi* 10(5): 285 – 289.

Kelbich, P., Procházka, J., Sameš, M., Hejčl, A., Vachata, P., Hušková, E., Peruthová, J., Hanuljaková, E., Špička, J. (2011): Principy a zvláštnosti neurochirurgické a

neurointenzivistické likvorologie (1. část: Úvod do problematiky). *Klin Biochem Metab* 19(40): 223 – 228.

Kelbich, P., Hejčl, A., Procházka, J., Hanuljaková, E., Peruthová, J., Špička, J. (2012): Cytologie a energetika jako důležité atributy vyšetření likvoru. *Klin Biochem Metab* 20(41): 17 – 24.

Kopková, A., Šána, J., Večeřa, M., Fadrus, P., Lipina, R., Smrčka, M., Lojová, M., Slabý, O. (2019): MikroRNA v mozkomíšním moku jako biomarkery u pacientů s nádory mozku. *Klin Onkol* 32(3): 181 – 186.

Maestro, R. (2007): Harvey Cushing: A life in surgery. *Can J Surg* 50(1): 70 – 71.

Mareš, (2019). Inspirante. [online] [navštíveno 15. 8. 2020] Dostupné z <https://inspirante.cz/index.php/2019/11/28/lumbalni-punkce-v-diagnostice-neurologickych-onemocneni/>

Marsala, S. Z., Gioulis, M., Pistacchi, M. (2015): Cerebrospinal fluid and lumbal puncture: the story of a necessary procedure in the history of medicine. *Neurol Sci* 36(6): 1011 – 10115.

Matejíčková, Z., Mareš, J., Příkrylová Vranová, H., Klosová, J., Sládková, V., Doláková, J., Zapletalová, J., Kaňovský, P. (2015): Cerebrospinal fluid inflammatory markers in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neural Transm* 122: 273 – 277.

Milburn-McNulty, P., Michael, B., Moxham, B., Fletcher, N., Crooks, D. (2012): How to do it: How to get the most out of cerebrospinal fluid cytology. *Pract Neurol* 12(4): 241 – 243.

Móciková, H. (2013): Primární lymfom centrální nervové soustavy. *Onkologie* 7(3): 127 – 128.

Morgan, C., Pearson, J., Fuller, G. (2020): Lumbal punctures and cerebrospinal fluid analysis. *Medicine* 44 (8): 504 – 507.

Mrázová, K., Zeman, D., Bořecká, K., Ženková, J., Brož, P., Mareš, J., Hanzalová, J., Král, V., Krbková, L. (2017): Doporučení k vyšetřování mozkomíšního moku. *Klin Biochem Metab* 25(46): 43 – 47.

Pavelka, Z., Zitterbart, K. (2010): Nádory plexus choroideus u dětí a adolescentů. 4(5): 315 – 317.

Pearson, J., Fuller, G. (2012): Lumbal punctures and cerebrospinal fluid analysis. *Medicine* 40(8): 459 – 462.

Pitřha, J. (2014): Mezioborová spolupráce při diagnostice a léčbě roztroušené sklerózy. *Neurol. Pro Praxi* 15(2): 89 – 91.

Pitřha, J. (2015): Chyby a omyly v diagnostice roztroušené sklerózy. *Neurol. Praxi* 16(3): 144 – 148.

Pollay, M. (2010): The function and structure of the cerebrospinal fluid outflow system. *Cerebrospinal Fluid Res* 7(1): 9.

Poser, Ch. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H., Tourtellotte, W. W. (1983): New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 13(3): 227 – 231.

Puntis, M., Reddy U., Hirsch, N. (2016): Cerebrospinal fluid and its physiology. *Anesth Intensive Care Med* 17(12): 611 – 612.

Roháčová, H. (2006): Hnisavé a nehnisavé záněty centrální nervové soustavy. 3: 128 – 130.

Rožnovský, L. (2013): Neuroinfekce v intenzivní péči. Neurol. praxi 14(5): 252 – 256.

Sakka, L., Coll, G., Chazal, J. (2011): Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis 128(6): 309 – 316.

Sládková, V. (2015): Diagnostika Roztroušené sklerózy, typické klinické příznaky. Med. praxi 12(5): 236 – 242.

Sládková, V., Mareš, J. (2015). ZAM zdravotnictví a medicína. [online] [navštíveno 10. 8. 2020] Dostupné z <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/likvorova-diagnostika-roztrousene-sklerozy-477767>

Sobek, O., Adam, P., Koudelková, M., Štourač, P., Mareš, J. (2012): Algoritmus vyšetření likvoru v návaznosti na doporučení Sekce neuroimunologie a likvorologie České neurologické společnosti JEP. Cesk Slov Neurol 75/108(2): 159 – 163.

Sourkers, T. L. (2002): William Mestrezat (1883 – 1928): Oenologist, physician, neurochemist. J Med Biogr 10(3): 141 – 145.

Štourač, P., Bednářová, J., Čermáková, Z. (2009): Význam cytologie mozkomíšního moku v diagnostice nádorových onemocnění nervového systému. Neurol pro Praxi 10(5): 294 – 296.

Taláb, R. (2008): Cesta ke spolehlivé diagnostice roztroušené sklerózy. Neurol. pro praxi 9(4): 210 – 214.

Tashjian, R. S., Vinters, H. V., Yong, W. H. (2019): Biobanking of cerebrospinal fluid. Methods Mol Biol 1897: 107 – 114.

Thomas, S. R., Jamieson, D. R., Muir, K. W. (2000): Randomised controlled trial of atraumatic versus standard needles for diagnostic lumbar puncture. *BMJ* 321(7267): 986 – 990.

Torzewski, M., Lackner, K. (2016): Cerebrospinal fluid cytology: a highly diagnostic method for the detection of diseases of the central nervous system. *Laboratoriums Medizin* 40(3): 1- 7.

Vališ, M., Taláb, R., Masopust, J. (2005): Únava u roztroušené sklerózy mozkomíšní a možnosti jejího ovlivnění v neurologické praxi. *Neurol. pro Praxi* 1: 40 – 41.

Vališ, M., Pavelek, Z. (2015): Základní diagnostika a léčba roztroušené sklerózy. *Via pract.* 15(4): 171 – 174.

Williams, A. (2004): Xanthochromia in the cerebrospinal fluid. *Practical Neurology* 4(3): 174 – 175.

Zeman, D., Adam, P., Kalistová, H., Sobek, O., Anděl, J., Anděl, M. (2001): Cerebrospinal fluid cytologic findings in multiple sclerosis. A comparison between patient subgroups. *Acta Cytologica* 45(1): 51 – 59.

Zeman, D. (2018): Praktický průvodce laboratorním vyšetřením likvoru. Univerzita Palackého v Olomouci.