

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ»**

Кафедра клинической лабораторной диагностики

**ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В
ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ
НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

Учебно-методическое пособие

Минск, БелМАПО
2023

УДК 616-008.848.2(075.8)

ББК 56.12-4я78

И 88

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
НМС Государственного учреждения образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»
протокол № 5 от 02.06.2023

Авторы:

Шилейко И.Д., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО, к.м.н.
Батуревич Л.В., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО,
к.м.н., доцент

Анисько Л.А., главный внештатный специалист по лабораторной диагностике комитета по
здравоохранению Мингорисполкома, заведующий клинико-диагностической
лабораторией УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска, к.м.н.,
доцент

Камышников В.С., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики
БелМАПО, д.м.н., профессор

Алехнович Л.И., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО,
к.м.н., доцент

Кузьменко А.Т., доцент кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО,
к.м.н., доцент

Русак А.А., руководитель проекта лабораторных систем и инноваций УП «Белреамед»

Рецензенты:

Державец Л.А., заведующий клинико-диагностической лабораторией ГУ «РНПЦ
онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова», д.б.н.

*Кафедра инфекционных болезней УО «Белорусский государственный медицинский
университет»*

И 88

Исследование цереброспинальной жидкости в диагностике заболеваний
центральной нервной системы / И.Д. Шилейко [и др.] – Минск: БелМАПО,
2023. – 34 с.

ISBN 978-985-584-886-9

В учебно-методическом пособии описаны основные принципы и методы клинико-лабораторного исследования цереброспинальной жидкости. Отражены правила преаналитического этапа лабораторного исследования в части отбора цереброспинальной жидкости. Особое внимание уделено общеклиническим методам исследования: оценке макроскопических свойств ликвора, определению цитоза и морфологической дифференциации клеточных элементов. Описаны основные биохимические показатели цереброспинальной жидкости в норме и при патологии. Отдельный раздел посвящен автоматизации исследования клеточных элементов ликвора. Изложены вопросы интерпретации данных, полученных в ходе лабораторного исследования цереброспинальной жидкости. Кратко описаны синдромы патологического ликвора. Учебно-методическое пособие предназначено для слушателей, осваивающих содержание образовательных программ переподготовки по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» (дисциплина «Общеклинические методы исследования»), повышения квалификации врачей клинической лабораторной диагностики.

УДК 616-008.848.2(075.8)

ББК 56.12-4я78

ISBN 978-985-584-886-9

© Шилейко И.Д. [и др.], 2023

© Оформление БелМАПО, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ. ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ	4
2. ПРАВИЛА ВЗЯТИЯ И ДОСТАВКИ МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ. 5	
3. ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ	6
3.1. Макроскопическое исследование	8
3.2. Микроскопическое исследование.....	11
3.2.1. Определение цитоза	12
3.2.2. Автоматизация подсчета клеток цереброспинальной жидкости	16
3.2.3. Интерпретация результата подсчета клеточных элементов	18
3.2.4. Морфология клеточных элементов	21
3.3. Биохимические исследования.....	27
4. СИНДРОМЫ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЛИКВОРА.....	31
ЛИТЕРАТУРА	33

1. ВВЕДЕНИЕ. ОБЩЕЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЕ О ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Цереброспинальная жидкость (ЦСЖ) – биологическая жидкость, циркулирующая в полостях и пространствах центральной нервной системы (ЦНС), необходимая для функционирования мозговой ткани. Ее биохимический и клеточный состав изменяется при патологических процессах, происходящих в ЦНС, поэтому при многих заболеваниях центральной нервной системы лабораторное исследование ЦСЖ играет ключевую роль в постановке диагноза. Оценка изменения лабораторных показателей цереброспинальной жидкости позволяет определить характер патологического процесса, оценить тяжесть состояния пациента и прогноз заболевания, а также осуществить контроль за эффективностью лечения.

ЦСЖ (ликвор) секретируется сосудистыми сплетениями желудочков головного мозга путем ультрафильтрации плазмы крови. В течение суток у взрослого человека образуется в среднем около 500 мл ЦСЖ (от 350 до 1150 мл). В зависимости от потребности организма ликворообразование происходит со скоростью от 0,2 до 0,8 мл/мин (в среднем – 0,35 мл/мин), полное обновление ЦСЖ в организме происходит за 6-8 часов.

Оттекает ЦСЖ из субарахноидального пространства в субдуральное, после чего всасывается венозными капиллярами твердой мозговой оболочки в ток крови.

Ликвор заполняет субарахноидальное пространство головного мозга, полости желудочков мозга, спинномозговой канал, периваскулярное и перичеселлюлярное пространства. Объем циркулирующего в организме ликвора у взрослых составляет 90-150 мл, у детей – 10-60 мл. При этом 20% общего объема ликвора содержится в межклеточных пространствах мозговой ткани. У взрослого человека в боковых желудочках содержится 20-30 мл, в III и IV желудочках – 3-5 мл, в подпаутинном пространстве головного мозга – 20-30 мл, а в спинномозговом канале – 50-70 мл.

В организме человека ликвор обеспечивает жизненно важные функции, необходимые для нормального функционирования ЦНС: формирует гидростатическую водяную подушку, предохраняя мозговую ткань от механических воздействий, поддерживает постоянство внутричерепного давления и водно-электролитного гомеостаза, осуществляет обмен веществами между мозгом и кровью, способствует удалению конечных продуктов метаболизма мозговой ткани. ЦСЖ участвует в формировании иммунологического барьера мозга, обеспечивая взаимодействие иммуноглобулинов и факторов клеточного иммунитета с генетически чужеродными веществами, участвует в нейрогуморальной регуляции.

Состав ЦСЖ регулируется избирательной проницаемостью гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который обеспечивает двусторонний селективный обмен различных молекул между ликвором и мозгом. ГЭБ является активным физиологическим механизмом, регулирующим состав и свойства внутренней среды нервной системы и защищающим ее от вредных физико-химических воздействий. Анатомическими субстратами ГЭБ являются эндотелий и базальная мембрана капилляров мозга, нейроны и отростки нейроглии, эпендима желудочков мозга, сосудистые сплетения, оболочки мозга.

Состав ЦСЖ в норме характеризуется:

- относительным постоянством;
- относительно невысоким содержанием белка;
- достаточно большим содержанием воды и солей (особенно Cl и Mg);
- относительно высоким содержанием глюкозы (около 60% от уровня глюкозы крови);
- наличием единичных клеточных элементов.

Химический состав ЦСЖ сходен с составом сыворотки крови: 89-90% составляет вода и 10-11% – сухой остаток, состоящий из органических и неорганических веществ, принимающих участие в метаболизме мозга. Органические вещества представлены белками, аминокислотами, углеводами, мочевиной, гликопротеинами и липопротеинами; неорганические – электролитами и микроэлементами. Белок ликвора в норме представлен альбумином (56-76 %) и различными фракциями глобулинов. В сравнении с плазмой крови в ликворе отмечается более высокое содержание хлоридов и магния, но меньшее – глюкозы, калия, кальция, фосфора и мочевины.

2. ПРАВИЛА ВЗЯТИЯ И ДОСТАВКИ МАТЕРИАЛА В ЛАБОРАТОРИЮ

Ликвор получают чаще всего путем люмбальной, реже – субокципитальной пункции, во время оперативного вмешательства получают вентрикулярный ликвор.

Спинномозговой канал пунктируют у взрослых между остистыми отростками III и IV или IV и V поясничных позвонков, у детей – между отростками IV и V позвонков. Люмбальная пункция и взятие ликвора проводится врачом, получившим специальную подготовку, с соблюдением всех правил асептики. С помощью люмбальной пункции без вреда для пациента можно извлечь у взрослого человека – 8-10 мл ЦСЖ, у детей – 5-7

мл, у детей грудного возраста – 2-3 мл. Ликвор, полученный путем спинномозговой пункции, называют *спинномозговой жидкостью* (СМЖ).

При взятии СМЖ обязательно следует удалить первые 3-5 капель для того, чтобы освободиться от примеси так называемой «путевой» (артефактной) крови, которая попадает в порцию ликвора в результате повреждения иглой кровеносных сосудов, расположенных в области эпидурального пространства. Строгое соблюдение правил получения ликвора очень важно, поскольку СМЖ, содержащая «путевую» кровь, не пригодна для микроскопического и биохимического исследования: наличие крови в образце будет приводить к получению заведомо недостоверного (чаще в сторону завышения) результата определения уровня белка и глюкозы, а также подсчета клеточных элементов, тем самым будет существенно затруднена интерпретация результата.

При отборе СМЖ распределяется в 3 или 2 последовательно маркированные стерильные пробирки (по 3-5 мл в каждую). Первую пробирку с ликвором используют для выполнения биохимического и иммунологического исследований. Вторая пробирка с аликвотой СМЖ используется для микробиологического исследования, третья – для микроскопии клеточных элементов. В случае, когда отсутствует необходимость микробиологического исследования, для микроскопии используется вторая порция ликвора. Если в ходе отбора получено небольшое количество ликвора, то приоритетную цель исследования определяет лечащий врач. При необходимости проведения специальных исследований (ПЦР-исследования, определение интратекальных антител, криптококков и др.) ликвор собирается в дополнительные стерильные пробирки.

Собранный ликвор необходимо доставлять в лабораторию незамедлительно (не позднее 30 мин). Клинико-биохимическое исследование ЦСЖ всегда срочное. Задержка исследования может приводить к получению неточных результатов, что связано с цитолитическими свойствами ликвора, приводящими к разрушению клеточных элементов.

3. ЛАБОРАТОРНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ

Показаниями к исследованию ЦСЖ являются подозрения на наличие патологического процесса в ЦНС (нейроинфекции, кровоизлияние, воспалительные, дегенеративные, демиелинизирующие заболевания и др.).

Исследование ЦСЖ позволяет получить объективную информацию при следующих условиях:

– ЦСЖ получена одинаковым путем взятия (состав ликвора различается в зависимости от того, из какого отдела мозга он получен: из поясничного мешка, из мозжечково-мозговой цистерны или из желудочков мозга);

– пункция должна производиться в одно и то же время, что связано с влиянием циркадных ритмов на объем, состав и свойства ликвора;

– ЦСЖ исследуется в кратчайшие сроки после пункции (в течение 30 мин);

– микроскопическое исследование ликвора включает как определение общего количества клеток, так и оценку их морфологии.

Основными этапами лабораторного исследования ликвора являются:

– макроскопическое исследование (определение цвета, прозрачности, наличия фибриновой пленки);

– микроскопическое исследование (определение цитоза и исследование цитограммы);

– биохимическое исследование (определение содержания общего белка, глюкозы и др.);

– бактериологическое и бактериоскопическое исследование (проводится по показаниям).

При необходимости выполняются специальные лабораторные исследования: молекулярно-биологические с использованием ПЦР (на геном бактериальных, грибковых либо вирусных возбудителей), иммунологические (определение иммуноглобулинов, выявление и установление содержания специфических антигенов и/или антител), определение опухолевых маркеров и др. Лабораторные показатели СМЖ у взрослых в норме представлены в таблице 1.

Таблица 1. Референсные показатели СМЖ у взрослых (люмбальный ликвор)

<i>Лабораторные показатели</i>	<i>Нормальные значения</i>
Цвет	бесцветный
Прозрачность	прозрачный
Плотность	1,006 – 1,007
Реакция	слабо щелочная; pH 7,4 – 7,6
Общий белок	0,15 – 0,45 г/л
Глюкоза	2,8 – 3,9 ммоль/л
Хлориды	120 – 130 ммоль/л
Лактат	1,1 – 1,8 ммоль/л
Цитоз	0 – 5 клеток/мкл (0 – 5×10 ⁶ /л)

3.1. Макроскопическое исследование

В ходе макроскопического исследования ликвора описывают его прозрачность, цвет, выраженность ксантохромии (при наличии), указывают доставленное количество, наличие или отсутствие фибриновой пленки.

Нормальная ЦСЖ прозрачная и бесцветная, вязкость ее аналогична вязкости воды.

Прозрачность ликвора оценивают путем сравнения с прозрачностью дистиллированной воды: в пробирку из бесцветного прозрачного материала, имеющую тот же диаметр и толщину, что и пробирка с СМЖ, наливают дистиллированную воду и сравнивают цвет в обеих пробирках, располагая их на уровне глаз на темном фоне. Если ликвор прозрачен так же, как и дистиллированная вода, его описывают как прозрачный, в ином случае отмечается характер изменений: опалесцирующий, слегка мутноватый, мутный, резко мутный.

Мутность ЦСЖ может быть обусловлена присутствием в ней большого количества клеточных элементов (лейкоцитов, эритроцитов, тканевых клеточных элементов), бактерий, грибов, а также повышенным содержанием белка. Легкое помутнение СМЖ наблюдается при количестве лейкоцитов более $200 \times 10^6/\text{л}$, эритроцитов – более $400 \times 10^6/\text{л}$, общего белка – более 3 г/л. Мутность, устранимая после центрифугирования, обусловлена наличием клеточных элементов, а сохраняющаяся после центрифугирования – микрофлорой. При повышении содержания фибриногена в ликворе отмечается изменение прозрачности в виде легкой опалесценции.

Цвет СМЖ определяется аналогично оценке прозрачности путем сравнения ликвора с дистиллированной водой, но на белом фоне. Оценить цвет ликвора (в основном для выявления ксантохромии) можно также методом спектрофотометрии – путем измерения оптической плотности исследуемого образца ликвора по отношению к воде. По разности оптической плотности судят о степени ксантохромии.

В норме ликвор бесцветен, но при патологических процессах его цвет может изменяться.

Красный цвет (*эритроцитархия* или *эритроархия*), как правило, обусловлен примесью неизменной крови. Выделяют следующие виды эритроцитархии:

– «путевая» (*артефактная*) – вызвана попаданием в ликвор крови при повреждении во время пункции кровеносных сосудов;

– *истинная* – выявляется при кровоизлияниях в ликворные пространства вследствие разрыва кровеносных сосудов, например, при

геморрагическом инсульте, опухолях мозга, черепно-мозговых травмах (ЧМТ).

Для получения достоверных результатов лабораторного исследования необходимо установить, является ли примесь крови в СМЖ артефактной или патологической. Определить наличие «путевой» крови не сложно при условии, если ликвор собран в 3 пробирки: наличие в ликворе примеси крови только в первой пробирке свидетельствует об артефактной эритроцитархии, в то время как окрашивание всех трех порций ликвора в красный цвет с одинаковой интенсивностью характерно для истинной эритроцитархии (рисунок 1).



Рисунок 1. Варианты окраски ликвора при истинной (А) и «путевой» (Б) эритроцитархии

Для дифференциации истинной и «путевой» эритроцитархии существует ряд критериев, которые представлены в таблице 2.

Таблица 2. Критерии отличия истинной эритроцитархии от «путевой»

<i>Истинная эритроцитархия</i>	<i>«Путевая» эритроцитархия</i>
Все порции ЦСЖ окрашены одинаково	Первая порция ЦСЖ окрашена, в остальных окраска убывает
Количество эритроцитов во всех порциях одинаковое	Различное количество эритроцитов в разных пробирках
Эритроциты в ЦСЖ оседают медленно (после 2 ч)	Эритроциты оседают быстро (в течение 15 – 20 мин)
Кровь в кровянистом ликворе не свертывается	При попадании в ликвор > 1 мл крови она свертывается в течение 30 – 40 мин
После центрифугирования надсадочный ликвор розовый, оранжевый или желтый	Надсадочный ликвор бесцветный
Ликворограмма отражает патологический процесс	Цитоз в ЦСЖ соответствует лейкоформуле крови
В окрашенных препаратах морфология эритроцитов изменена	В окрашенных препаратах морфологически эритроциты не изменены

Кроме того, для дифференциации «путевой» крови можно использовать *двойной протеино-ликворный тест*, но лишь в том случае, если ликвор собран в 3 пробирки. Определяют концентрацию общего белка в первой и третьей порциях. При примеси «путевой» крови концентрация белка в первой порции ликвора будет выше, чем в последней, в то время как при истинной эритроцитархии уровень белка в первой и последней порциях остается без изменения, поскольку кровь, попавшая в ликвор, например, при травме, распределяется во всех порциях равномерно.

Ксантохромная окраска (*ксантохромия* или *билирубинархия*) – розовая, оранжевая, желтая, желто-коричневая или бурая – обусловленная присутствием пигментов оксигемоглобина, метгемоглобина и билирубина, которые являются производными гемоглобина эритроцитов. Ксантохромия наблюдается при субарахноидальном кровоизлиянии, опухолях ЦНС, некоторых формах менингита, травмах, при туберкулезном поражении головного мозга, внутричерепных гематомах. Желтый цвет ЦСЖ может приобретать также при гипербилирубинемии, когда содержание билирубина в крови составляет более 170 мкмоль/л.

Розовая окраска ликвора обусловлена присутствием оксигемоглобина, освободившегося из лизированных эритроцитов. Билирубин, образовавшийся из оксигемоглобина, а также гемоглобин, придают ликвору оранжевую окраску, а билирубин, образовавшийся из гемоглобина – желтую. Метгемоглобин и метальбумин, появляющиеся в ликворе при наличии инкапсулированных гематом и геморрагий, придают ЦСЖ окраску от темно-желтой до коричневой. Зеленая окраска наблюдается при выраженной билирубинархии в результате окисления билирубина в биливердин, а также при наличии примеси гноя, например, при гнойном менингите или прорыве абсцесса мозга в субарахноидальное пространство, но в таких случаях кроме изменения окраски будет отмечаться и резкое помутнение ликвора.

Различают ксантохромную геморрагическую, застойную и физиологическую.

Геморрагическая ксантохромия (билирубинархия) вызвана попаданием крови в ликворные пространства. В результате распада гемоглобина эритроцитов ликвор окрашивается в розовый, оранжевый, желтый цвет, может приобретать кофейно-желтую, бурую или коричневую окраску.

Застойная ксантохромия (билирубинархия) является результатом нарушения гемодинамики в сосудах мозга, что приводит к повышению проницаемости стенок сосудов и поступлению окрашенной в желтый цвет плазмы крови в ЦСЖ. Такая билирубинархия, как правило сопровождается гиперпротеинарией (увеличением содержания белка в ЦСЖ).

Физиологическая ксантохромия (билирубинария) встречается у новорожденных и почти у всех недоношенных и обусловлена повышенной проницаемостью ГЭБ по отношению к билирубину плазмы крови.

При наличии в ликворе липохромов или некоторых лекарственных веществ, например, пенициллина возможна *ложная ксантохромия*, при которой макроскопически наблюдается желтая окраска ликвора, но реакция на билирубин будет отрицательной.

Степень выраженности ксантохромии оценивают визуально по 4-плюсовой системе: 4+ – резко выраженная; 3+ – выраженная; 2+ – умеренно выраженная; 1+ – слабо выраженная.

Фибриновая (фибринозная) пленка в ЦСЖ в норме отсутствует, так как в ликворе практически не содержится фибриногена, молекулы которого в связи с большой молекулярной массой не способны проникать через ГЭБ. Появление фибриногена в ЦСЖ обусловлено заболеваниями ЦНС, следствием которых является нарушение проницаемости ГЭБ. Образование фибринозной пленки *in vitro* вызвано переходом растворимого фибриногена в нерастворимый фибрин. Аномально высокое количество фибриногена в ЦСЖ может приводить к образованию сгустков, но чаще всего образование сгустков связано с чрезмерно травматичной пункцией, при которой белки плазмы крови попадают в СМЖ.

Фибринозная пленка наблюдается в ликворе при ряде патологических состояний: серозных и гнойных менингитах, туберкулезном менингите, опухолях ЦНС, мозговом кровоизлиянии, компрессии головного мозга и др.

В ликворе фибриновая пленка может иметь вид нежной едва заметной сеточки или пленки на стенках пробирки; мешочка, содержащего клеточные элементы, или желеобразного сгустка на дне пробирки. При микроскопии в фибриновом сгустке нередко можно видеть клеточные элементы, а при туберкулезном менингите возможно обнаружение кислотоустойчивых микобактерий после окраски по Циль-Нильсону.

Образование фибриновой пленки может происходить сразу после получения ликвора, как, например, при синдроме Nonne-Froin, характеризующемся полной блокадой ликворного пространства, когда уровень общего белка в ликворе может превышать 15 г/л. В некоторых случаях фибринозная пленка образуется спустя некоторое время после получения ЦСЖ – от 30 мин до 10 и более часов.

3.2. Микроскопическое исследование

Микроскопическое исследование ЦСЖ имеет важное значение для диагностики ряда воспалительных заболеваний нервной системы, инсультов,

опухолей и других патологических процессов ЦНС и включает в себя подсчет клеток (определение цитоза) и оценку их морфологии.

СМЖ в норме содержит небольшое количество клеточных элементов (до 5 клеток в 1 мкл). Основные популяции клеток ликвора – это лимфоциты, количество которых в норме в СМЖ взрослого человека составляет 2-4 клетки/мкл, и моноциты – их количество не превышает 1-3 клетки/мкл. В ликворе детей число лейкоцитов может составлять до 10 клеток/мкл, а у новорожденных - может достигать до 30 клеток/мкл с преобладанием моноцитов.

Эритроциты в нормальном ликворе отсутствуют. Их наличие в СМЖ чаще всего обусловлено попаданием крови в ходе люмбальной пункции, хотя иногда эритроциты появляются вследствие субарахноидального или внутримозгового кровоизлияния.

Для получения достоверных результатов микроскопическое исследование СМЖ следует производить в течение 30 мин (не позднее 60 мин) после извлечения ликвора, поскольку при комнатной температуре около 40% лейкоцитов лизируется в течение 2 часов. Это обусловлено низкой концентрацией в ликворе белков, стабилизирующих клеточные мембраны.

Микроскопическое исследование ЦСЖ включает:

- определение цитоза – количества лейкоцитов в 1 л ($\times 10^6$) ликвора;
- исследование цитограммы (лейкограммы) – дифференциацию и оценку соотношения лейкоцитов разного вида (лимфоциты, нейтрофилы, эозинофилы и др.).

3.2.1. Определение цитоза

Принцип определения цитоза ликвора заключается в подсчете числа лейкоцитов под микроскопом в специальной камере после разрушения эритроцитов.

Для подсчета лейкоцитов необходимы:

- микроскоп (увеличение $\times 400$);
- камера Фукс-Розенталя (объем – 3,2 мкл, глубина – 0,2 мм, камера состоит из 16 больших квадратов, которые расчерчены на 16 малых, всего 256 квадратов);
- реактивы для окрашивания ядер лейкоцитов и гемолиза эритроцитов (реактив Самсона или 10% раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиловым фиолетовым).

Окрашивание ядер позволяет не только производить подсчет лейкоцитов, но и дифференцировать их как мононуклеары (клетки с несегментированными ядрами) и полинуклеары (сегментоядерные

лейкоциты), что дает начальное представление о типах присутствующих клеток, но детально оценить их морфологию не позволяет (рисунок 2).

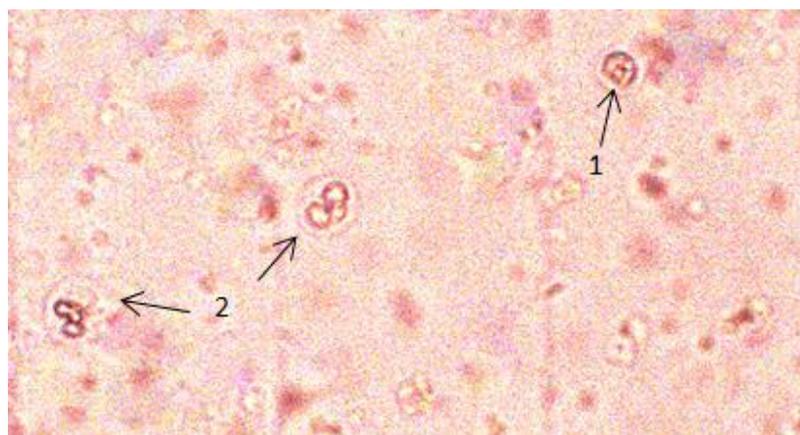


Рисунок 2. Лейкоциты в ликворе: мононуклеар (1) и полинуклеары (2) – окраска реактивом Самсона (x400)

Для разрушения эритроцитов, а также стабилизации и окрашивания лейкоцитов наиболее часто используется *реактив Самсона*, в состав которого входят:

- спиртовой раствор фуксина (1:10) – 2,5 мл (окрашивает цитоплазму и ядра клеток),
- ледяная уксусная к-та – 30 мл (лизирует эритроциты),
- концентрированная карболовая кислота – 2,0 мл (консервирует клетки до 2-3 ч при комнатной температуре),
- вода – до 100 мл.

При использовании реактива Самсона для получения высококачественного окрашивания необходима экспозиция 10-15 минут. Раствор Самсона дает отчетливую микроскопическую картину за счет эффективного окрашивания клеточных ядер, поэтому наиболее часто применяется для подсчета клеточных элементов в ликворе. Клетки сохраняются в нем без изменений в течение 2-3 ч.

Для окрашивания ядер клеток можно использовать в том числе и *10% раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиловым фиолетовым*, в состав которого входит:

- ледяная уксусная кислота – 5 мл,
- вода – до 50 мл,
- метиловый фиолетовый – 0,1 мл.

Время, необходимое для окрашивания клеточных ядер этим раствором, составляет 2-3 мин.

Метод определения цитоза:

1. Подсчет клеток в камере Фукс-Розенталя

Перед исследованием пробирку с СМЖ тщательно перемешивают вращательными движениями между ладонями, после чего из нее в отдельную пробирку отбирают порцию ликвора и добавляют к ней реактив Самсона в соотношении 10:1 (10 частей ликвора и 1 часть реактива Самсона). Полученную смесь тщательно и аккуратно перемешивают вращением пробирки между ладонями. По истечении 10-15 мин заполняют камеру Фукс-Розенталя. Лейкоциты считают и дифференцируют по всей площади сетки камеры с помощью счетчика лейкограммы. При очень большом количестве клеток допускается их подсчет в половине сетки: при этом результат следует умножить на 2.

Расчет цитоза проводится по формуле:

$$X = \frac{A}{3,2} \times \frac{11}{10}$$

где:

X – количество лейкоцитов в 1 мкл,

A – количество подсчитанных в камере клеток,

3,2 – объем камеры Фукс-Розенталя,

$\frac{11}{10}$ – степень разведения

На практике объем камеры округляют до 3 мкл и не учитывают разведение:

$$X = \frac{A}{3}$$

Для перевода в единицы СИ результат умножают на 10^6 .

Результат подсчета цитоза может быть представлен как количество клеток в 1 мкл или в единицах СИ (количество клеток в 1 л).

Например, при подсчете клеточных элементов в камере Фукс-Розенталя было обнаружено 15 лейкоцитов. Тогда результат исследования, рассчитанный по указанной выше формуле, может быть представлен как 5 клеток/мкл или 5×10^6 /л.

В настоящее время полученный результат принято представлять в единицах СИ.

При заведомо ожидаемом высоком цитозе, например, при подозрении на бактериальный менингит, можно использовать метод подсчета лейкоцитов с разведением ликвора в 3 раза. Для этого в пробирку необходимо внести 200 мкл реактива Самсона, добавить 100 мкл ликвора, тщательно и аккуратно перемешать (вращением между ладонями), оставить на 5-10 мин, заполнить камеру Фукс-Розенталя. Лейкоциты подсчитывают и дифференцируют по всей площади сетки камеры. Подсчитанное число лейкоцитов отражает

количество клеток в 1 мкл, поскольку при указанном способе СМЖ разводится в 3 раза, и, следовательно, приведенная выше формула расчета цитоза будет иметь вид:

$$X = A$$

Результаты определения цитоза отражают как общее количество лейкоцитов во всей камере ($\times 10^6/\text{л}$), так и число отдельных форм лейкоцитов (мононуклеары и полинуклеары), причем если цитоз меньше $100 \times 10^6/\text{л}$ клеток, то число отдельных форм лейкоцитов можно указывать в абсолютных значениях, а, если лейкоцитов более $100 \times 10^6/\text{л}$ – в процентах.

2. Подсчет клеток в камере Горяева

При отсутствии камеры Фукса-Розенталя для подсчета цитоза можно воспользоваться камерой Горяева, но так как емкость этой камеры значительно меньше (0,9 мкл), следует просчитать не менее 3-х камер и, взяв среднее арифметическое, определить количество клеток в 1 мкл по формуле:

$$X = \frac{\text{Аср.}}{0,9} \times \frac{11}{10}$$

или

$$X = \text{Аср.} \times 1,2$$

3. Определения коррегированного цитоза геморрагического ликвора

При наличии в исследуемой СМЖ «путевой» крови необходима корректировка количества лейкоцитов путем подсчета собственного цитоза (истинного или коррегированного) ликвора.

Для этого одну часть СМЖ перемешивают с реактивом Самсона (в соотношении 10:1), заполняют камеру Фукс-Розенталя и подсчитывают общее количество лейкоцитов. Другую часть ликвора смешивают с изотоническим раствором хлорида натрия (также в соотношении 10:1), заполняют камеру и считают общее количество эритроцитов.

Для расчета истинного цитоза дополнительно необходимы данные исследования общего анализа крови (количество лейкоцитов и эритроцитов), что позволит определить, какое количество эритроцитов в периферической крови конкретного пациента приходится на 1 лейкоцит.

Пример расчета. В 1 мкл ликвора содержатся 40 лейкоцитов и 3000 эритроцитов. В 1 мкл периферической крови пациента – $4,5 \times 10^6$ эритроцитов и $7,5 \times 10^3$ лейкоцитов. Следует установить, сколько эритроцитов приходится на каждый лейкоцит периферической крови:

$$4500000 : 7500 = 600 \text{ эритроцитов (на 1 лейкоцит).}$$

Исходя из пропорции:

на 1 лейкоцит – 600 эритроцитов,

на X лейкоцитов – 3000 эритроцитов,

получаем $3000 : 600 = 5$ лейкоцитов.

Таким образом, из 40 подсчитанных в ликворе лейкоцитов 5 попало в ЦСЖ с «путевой» кровью, поэтому истинный цитоз ликвора составит: $40 - 5 = 35 \times 10^6/\text{л}$.

Следует отметить, что приведенный способ расчета можно использовать только в случаях небольшой примеси крови к СМЖ. При попадании большого количества крови в ликвор, а также при высоком лейкоцитозе или анемии у пациента расчет «истинного» цитоза будет неточен.

3.2.2. Автоматизация подсчета клеток cerebrospinalной жидкости

Автоматизация анализа биологических жидкостей обеспечивает большую точность исследования и существенно сокращает время анализа. В последние годы в практику клинической лабораторной диагностики внедряются автоматизированные системы, оснащенные функцией подсчета количества клеток в биологических жидкостях, в том числе ЦСЖ. Для исследования ликвора применяются автоматические гематологические анализаторы или анализаторы осадка мочи, принцип работы которых основан на кондуктометрическом методе анализа, а также на методе проточной цитометрии и цитофлуориметрии. Также для детальной оценки морфологии клеток ликвора в последнее время активно применяются системы цифрового анализа изображений с использованием нейросети. Международное общество стандартизации в гематологии выпустило отдельные рекомендации относительно верификации и правил выполнения анализа биологических жидкостей на автоматических системах.

Благодаря реализации в автоматических системах принципов, обеспечивающих высокую специфичность методов анализа, основанных в том числе и на оценке концентрации нуклеиновых кислот в клетке, достигается:

- высокая аналитическая чувствительность и диапазон детекции. Так, автоматические анализаторы, основанные на проточной цитофлуориметрии обнаруживают от 2-5 лейкоцитов в мкл с линейностью до 12 тыс. клеток;

- полная стандартизация аналитической процедуры, что исключает или сводит к минимуму техническую ошибку выполнения тестирования и обеспечивает клинически достаточную воспроизводимость результата. Так, для автоматических систем, основанных на методе проточной цитофлуориметрии CV (коэффициент вариации) для определения цитоза в ликворе составляет около 10%;

- существенное сокращение времени анализа: автоматические системы позволяют получить клинически достаточный и аналитически надежный результат менее, чем за 2 минуты;

- возможность включения исследования ЦСЖ в полноценный внутрилабораторный и внешний контроль качества. Для автоматических систем разработаны двухуровневые контрольные материалы, которые позволяют контролировать большинство из измеряемых показателей.

Кроме указанных выше преимуществ автоматические анализаторы позволяют расширить спектр получаемых показателей. Так, помимо стандартного цитоза, оценки числа лейкоцитов и эритроцитов, определения характера цитоза (абсолютное и относительно количество полинуклеарных клеток и мононуклеарных клеток с возможностью более детальной дифференцировки на нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты, моноциты), автоматизированные системы, благодаря применению проточной цитофлуориметрии, могут сигнализировать о возможном присутствии в исследуемом образце клеток с признаками атипичности. Например, параметр HF-VF отражает содержание в ликворе клеток с высокой флуоресценцией, которые морфологически характеризуются высоким соотношением «ядро-цитоплазма» и высоким содержанием нуклеиновых кислот. К таким клеткам могут относиться как атипичные клетки, так и без признаков атипичности, например, макрофаги или мезотелиоциты. Обнаружение в ликворе HF-VF является триггером для оценки морфологии в мазке методом микроскопии.

Некоторые автоматизированные системы позволяют обнаруживать в цереброспинальной жидкости бактерии. За счет специального канала и применения специального флуорисцентного красителя достигается высокая чувствительность и специфичность анализа: аналитическая чувствительность составляет 1 бактериальная клетка в мкл.

На сегодняшний день имеется достаточная доказательная база для широкого практического применения автоматического анализа цереброспинальной жидкости. Однако, несмотря на ряд преимуществ автоанализаторов, следует помнить, что с их помощью невозможно проводить детальную морфологическую характеристику и дифференциацию клеток или идентификацию патологических (например, опухолевых) клеток. Таким образом, автоматические анализаторы не могут в настоящий момент полностью заменить микроскопическую оценку морфологии клеток. В связи с этим автоматический и мануальный метод эффективно дополняют друг друга в определенных клинических ситуациях. В тоже время в практику морфологического анализа активно внедряются системы цифровой визуализации с анализом изображений при помощи нейронных систем. Такие

подходы активно применяются в гематологии и оценке морфологии мазков биологических жидкостей. Однако даже при использовании цифровых систем валидация результата специалистом является обязательным заключительным этапом анализа.

3.2.3. Интерпретация результата подсчета клеточных элементов

В норме у взрослого человека цитоз ЦСЖ (*нормоцитоз*) составляет до $3-5 \times 10^6$ /л лейкоцитов, которые чаще представлены мононуклеарами (лимфоцитами и моноцитами). У новорожденных и грудных детей в связи с несформированным ГЭБ количество лейкоцитов в нормальном ликворе значительно выше, чем у взрослых. СМЖ новорожденных отличается также и лейкоцитарной формулой, в которой преобладают моноциты. Данные об общем количестве и качественном составе клеток в ликворе в зависимости от возраста отражены в таблицах 3, 4, 5.

Таблица 3. Нормоцитоз в СМЖ у детей в зависимости от возраста (по Е.А. Кост, 1968)

Возраст	Количество клеток в 1 л
0 до 3 мес.	$20 - 23 \times 10^6$
3 мес. – 1 год	$14 - 15 \times 10^6$
1 – 2 года	$11 - 14 \times 10^6$
2 – 5 лет	$10 - 12 \times 10^6$
5 – 7 лет	$8 - 10 \times 10^6$
7 – 10 лет	$6 - 8 \times 10^6$
старше 10 лет	$4 - 6 \times 10^6$

Таблица 4. Нормоцитоз в СМЖ

(по Н. Тиц, 1997)

Возраст	Количество клеток в 1 л
Новорожденные (< 1 года)	$0 - 30 \times 10^6$
1 – 4 года	$0 - 20 \times 10^6$
5 – 18 лет	$0 - 10 \times 10^6$
взрослые	$0 - 5 \times 10^6$

Таблица 5. Лейкоцитарная формула ликвора в зависимости от возраста

<i>Вид клеток</i>	<i>Процент от общего количества лейкоцитов</i>	
	<i>новорожденные</i>	<i>взрослые</i>
лимфоциты	5 – 35%	40 – 80%
моноциты	50 – 90%	15 – 45%
нейтрофилы	0 – 8%	0 – 6%

Увеличение количества лейкоцитов в ликворе носит название **плеоцитоз** и является признаком поражения ЦНС. В большинстве случаев плеоцитоз бывает нейтрофильный или лимфоцитарный и классифицируется по степени выраженности:

- слабый – от 6 до $70 \times 10^6/\text{л}$;
- умеренный – от 70 до $250 \times 10^6/\text{л}$;
- выраженный – от 250 до $1000 \times 10^6/\text{л}$;
- резко выраженный – более $1000 \times 10^6/\text{л}$.

Выраженный плеоцитоз с преобладанием нейтрофилов наблюдается при острых бактериальных менингитах различной этиологии, вызванных чаще менингококком, пневмококком или гемофильной палочкой, а также при абсцессах мозга и актиномикозе.

Лимфоцитарный плеоцитоз характерен для менингитов и менингоэнцефалитов вирусной этиологии, а также для нейросифилиса, рассеянного склероза, реактивного асептического менингита, туберкулезного менингита, хронического воспалительного процесса оболочек мозга, в том числе в послеоперационном периоде (спустя несколько дней после операции вслед за нейтрофильным плеоцитозом).

Умеренный или слабый плеоцитоз наблюдается при церебральном сифилисе, туберкулезном менингите, энцефалитах, рассеянном склерозе, опухолях ЦНС, травмах позвоночника и головного мозга и др.

Слабый плеоцитоз с преобладанием лимфоцитов характерен для серозного менингита, прогрессивного паралича, церебрального сифилиса, энцефалита, рассеянного склероза, эпилепсии, опухолей ЦНС, травм позвоночника и головного мозга.

При различной патологии ЦНС изменяется не только количество клеток, но и лейкоцитарная формула ликвора. В таблице 6 представлены основные доминирующие типы клеток в зависимости от причин плеоцитоза в СМЖ.

Таблица 6. Преобладающие типы клеток в зависимости от причин плеоцитоза

<i>Доминирующий тип клеток</i>	<i>Инфекционные причины</i>	<i>Неинфекционные причины</i>
Лимфоциты	- менингиты: • вирусный • туберкулезный • грибковый - нейросифилис - ВИЧ-инфекция и СПИД	- паразитарные инвазии - рассеянный склероз - синдром Гийена-Барре - лимфома
Моноциты	- менингиты: • туберкулезный • грибковый	- опухоли ЦНС
Нейтрофилы	- менингиты: • бактериальный • туберкулезный • грибковый - амебный энцефаломиелит - церебральный абсцесс	- кровотечения: • субарахноидальное • внутримозговое - инфаркт ЦНС - опухоли ЦНС - повторная люмбальная пункция - интратекральные лечебные мероприятия (напр., миелография)
Плазматические клетки	- менингиты: • вирусный • туберкулезный • грибковый - нейросифилис	- рассеянный склероз - синдром Гийена-Барре
Эозинофилы	- паразитарные инвазии - грибковые инфекции - идиопатический эозинофильный менингит	- опухоли ЦНС - лекарственная интоксикация - субарахноидальные кровоизлияния - лимфома, лейкоз
Макрофаги	- менингиты: • туберкулезный • грибковый	- кровоизлияния - абсцессы, ушибы, инфаркт головного мозга - опухоли ЦНС - послеоперационный период
Эпителиальные клетки		- новообразования оболочек мозга - воспалительные процессы
Бласты, опухолевые клетки		- злокачественные новообразования в ЦНС - метастазирование опухолей в ЦНС

3.2.4. Морфология клеточных элементов

Морфологическая дифференциация клеток ЦСЖ дает важную диагностическую информацию, особенно при высоком цитозе. Для изучения морфологии клеток готовится мазок ликвора, окрашивается азур-эозином (по Романовскому-Гимзе) и микроскопируется на иммерсии при увеличении $\times 1000$. В ходе исследования проводят дифференциацию видов клеток, оценивают их процентное соотношение и морфологические особенности (наличие зернистости, признаков атипии и др.).

Клеточные элементы, которые можно обнаружить в ликворе в норме и при патологических состояниях, различаются в зависимости от происхождения:

– гематогенное происхождение имеют лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, плазматические клетки, бласты;

– гистиогенное (гистиоидные элементы) – это макрофаги, арахноидальные клетки, клетки эпендимы, клетки злокачественных новообразований собственно ЦНС и метастазирующих из других органов и тканей.

Лимфоциты в окрашенных препаратах ликвора представляют собой клетки округлой формы с круглым гиперхромным ядром, занимающим почти всю цитоплазму. Цитоплазма базофильная, без включений, иногда имеет вид узкого ободка, поэтому клетки могут выглядеть «голаядерными» (рисунок 3).

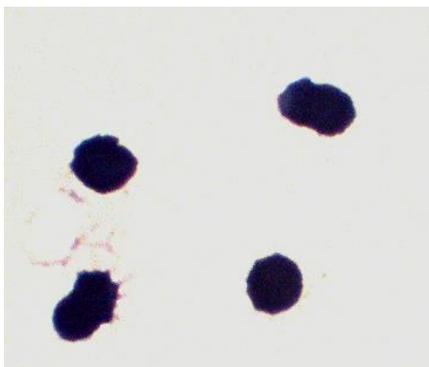


Рисунок 3. «Голаядерные» лимфоциты в ликворе – окраска азур-эозином ($\times 1000$)

Активация лимфоцитов в ЦСЖ может происходить таким же образом, как и в периферической крови, поэтому в ликворе может выявляться большое разнообразие клеток лимфоидного ряда – от небольших типичных лимфоцитов до крупных клеток с широкой базофильной цитоплазмой (реактивные лимфоциты). Реактивные лимфоциты можно оценить количественно или отметить их наличие в ликворе.

Повышенное число лимфоцитов в ЦСЖ чаще всего связано с вирусным, туберкулезным, грибковым или сифилитическим менингитом. При этих состояниях в начале процесса может наблюдаться полиморфная картина, представленная различными типами клеток (нейтрофилами, лимфоцитами, моноцитами и плазматическими клетками), но на более поздних стадиях доминируют лимфоциты. Преобладание лимфоцитов в клеточном составе ликвора отмечается обычно в послеоперационном периоде, когда нейтрофильный плеоцитоз, имеющий место в первые сутки после операции, постепенно приобретает лимфоидный характер.

Моноциты в окрашенных препаратах СМЖ ничем не отличаются от таковых в периферической крови. В ликворе они быстрее подвергаются дистрофии, чем лимфоциты.

Количество моноцитов в ЦСЖ может быть высоким, но преобладают они редко. Моноцитарная реакция чаще неспецифична и обнаруживается как часть «смешанной клеточной реакции», включающей увеличение количества нейтрофилов, лимфоцитов и плазматических клеток. Увеличенное количества моноцитов, как правило наблюдается при хронических вялотекущих процессах в ЦНС. Обнаружение моноцитов в ликворе после оперативного вмешательства на ЦНС в сочетании с плазматическими клетками и полным отсутствием макрофагов свидетельствует о вялотекущем заживлении послеоперационной раны.

Нейтрофильные гранулоциты в ЦСЖ здорового человека практически не встречаются. Наличие или преобладание их в ликворе наблюдается в следующих случаях:

- при попадании в ликвор крови,
- при воспалительных заболеваниях ЦНС,
- после операций на ЦНС.

Обнаружение в СМЖ, не содержащей крови, нейтрофильных гранулоцитов наиболее часто свидетельствует о воспалительной реакции со стороны мозговых оболочек. При бактериальных менингитах до 90% лейкоцитов, присутствующих в СМЖ, представлены нейтрофилами. Повышенное количество нейтрофильных гранулоцитов может отмечаться также при субарахноидальном или внутримозговом кровоизлияниях.

Плазматические клетки выявляются в ЦСЖ только при патологических процессах в ЦНС. В окрашенных препаратах они по размерам крупнее лимфоцитов, имеют округлую форму, иногда могут быть овальной или неправильной формы, имеют круглые, гиперхромные, глыбчатые ядра, которые часто расположены эксцентрично, иногда просматривается зона просветления цитоплазмы вокруг ядра. Размеры клеток

колеблются от 6 до 12 мкм. Встречаются двухъядерные формы. Цитоплазма базофильная, иногда просматриваются единичные вакуоли.

В ликворе плазматические клетки обнаруживаются при длительно текущих воспалительных процессах в головном, спинном мозге и в мозговых оболочках, также характерно присутствие плазматических клеток в ликворе у больных рассеянным склерозом и гиперкинетическим прогрессирующим панэнцефалитом. При хронических формах нейросифилиса плазмоцитоз сочетается с нормоцитозом или незначительным плеоцитозом. Появление плазматических клеток в СМЖ в послеоперационном периоде свидетельствует о вялом течении процессов заживления. Значительное количество плазматических клеток может наблюдаться при опухолевом процессе в ЦНС.

Эозинофильные гранулоциты в СМЖ здоровых людей не встречаются. Их появление расценивается как реакция сосудов соединительной ткани субарахноидального пространства на чужеродные белки. Эозинофилы в ликворе фагоцитируют бактерии, споры грибов и комплексы антиген-антитело.

В камере Фукс-Розенталя эозинофилы можно выявить по характерной равномерной блестящей зернистости, но выдавать заключение об их наличии можно только после исследования окрашенных препаратов ликвора. Эозинофильные гранулоциты в ЦСЖ по своим морфологическим особенностям не отличаются от таких же клеток периферической крови, имеют ту же величину и оранжево-красную, четкую, довольно крупную и равномерную зернистость в цитоплазме.

Обнаруживаются эозинофилы главным образом при паразитарном поражении головного мозга: цистицеркозе, эхинококкозе, трихинеллезе, токсоплазмозе. В небольшом количестве (до 2–3 %) появляются в ликворе при туберкулезном менингите, внутримозговых кровоизлияниях, могут обнаруживаться при опухолях мозга, гидроцефалии, лекарственной интоксикации, субарахноидальных кровоизлияниях.

Макрофаги у здорового человека в ЦСЖ не встречаются. В окрашенных препаратах ликвора представляют собой крупные клетки округлой формы величиной от 7 до 17 мкм, иногда - до 20-30 мкм; могут иметь ядра различной формы, чаще расположенные на периферии клеток, цитоплазма содержит включения и вакуоли (бактерии, вирусы, кристаллы, капли жира и др.). Если в цитоплазме расположена крупная вакуоль, то ядро оттесняется ею к периферии, и клетка принимает форму перстня (перстневидная клетка).

Функцией макрофагов является активное поглощение и переваривание клеточных и других элементов, присутствующих в СМЖ, т.е. ее очищение. Наличие макрофагов в ликворограмме при нормальном цитозе говорит об имевшем место кровотечении или воспалительном процессе в ЦНС. Макрофаги всегда обнаруживаются в ликворе пациентов с опухолями мозга, растущими в просвет желудочков. В послеоперационном периоде наличие большого количества макрофагов в ликворе имеет благоприятное прогностическое значение, в то время как их полное отсутствие или наличие в количестве 1-2% на фоне плеоцитоза является плохим прогностическим признаком.

Базофилы в ликворе при окраске азур-эозином выглядят так же, как и в мазках крови, обнаруживаются при тяжело протекающих нейроинфекциях, особенно у детей.

Бласты. У пациентов с острыми лейкозами при вовлечении в процесс оболочек мозга развивается лейкозный менингит – *нейролейкемия*. При этом состоянии обычно количество клеток в СМЖ варьирует от 100 до $300 \times 10^6/\text{л}$. Плеоцитоз может быть и более высоким – до $5000 \times 10^6/\text{л}$ и более. При острых лейкозах у 5-42% пациентов бласты могут выявляться и на фоне нормоцитоза. Морфология бластов при окраске азур-эозином соответствует их морфологии в мазках периферической крови и костного мозга (рисунок 4).

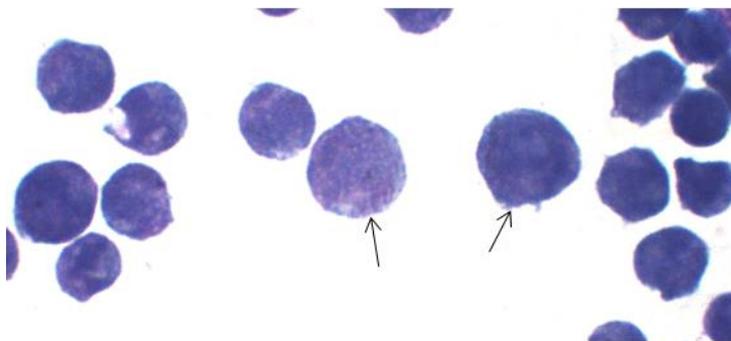
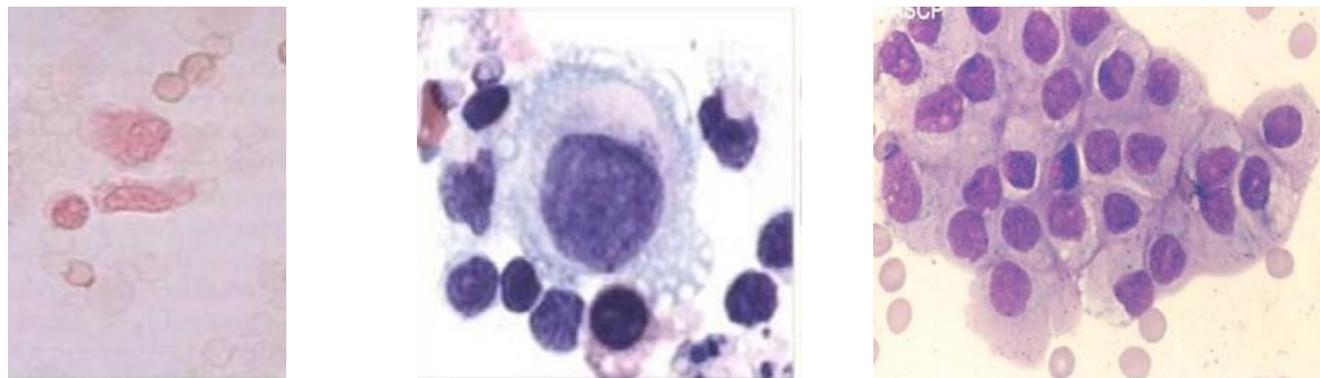


Рисунок 4. Бластные клетки в ликворе (отмечены стрелками) – окраска азур-эозином ($\times 1000$)

Эпендимоциты (эпендимальные клетки, клетки эпендимы) – это клетки однослойного кубического эпителия, который выстилает желудочки мозга. Эпендимальные клетки выполняют трофическую и метаболическую функции, участвуют в синтезе и секреции ЦСЖ, обеспечивают формирование ГЭБ. В норме эпендимоциты в ликворе практически не встречаются.

В препарате с реактивом Самсона клетки эпендимы выглядят как нежные, большие, бледно окрашенные овальной, многоугольной или кубической формы. Соотношение ядра и цитоплазмы в клетках поровну или

сдвинуто в сторону цитоплазмы. Ядра овальной формы или слегка «помятые», заостренные на полюсах, структура мелкозернистая, окраска бледно-вишневая. Цитоплазма обильная, бесструктурная и почти бесцветная. В препаратах могут присутствовать только овальные бледно окрашенные ядра эпендимальных клеток. При окраске азур-эозином ядра клеток окрашиваются в красновато-фиолетовый цвет, а цитоплазма – в бледно-серый или серо-голубой (рисунок 5).



А

Б

С

Рисунок 5. Эпендимальные клетки в ликворе:

А – окраска реактивом Самсона ($\times 400$),

Б и С – окраска азур-эозином ($\times 1000$)

Клетки арахноэндотелия (арахноидальные или арахноэндотелиальные клетки) относятся к клеткам однослойного эпителия эпендимального происхождения, который морфологически сходен с мезотелием и выстилает все пространства ЦНС, заполненные ликвором, за исключением желудочков головного мозга.

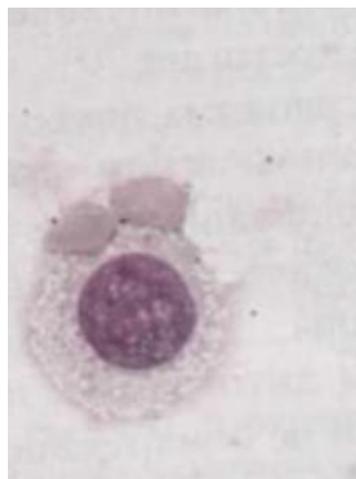
В ликворе здоровых людей арахноэндотелиальные клетки не встречаются. Обнаруживаются у пациентов с опухолью мозга, ЧМТ или в послеоперационном периоде.

В препаратах, окрашенных реактивом Самсона, клетки арахноэндотелия – крупные клетки размером до 25-40 мкм в диаметре, округлой или полигональной формы. Ядра их окрашиваются в вишневый цвет, цитоплазма – в светло-розовый. Ядерно-цитоплазматическое соотношение зависит от зрелости клетки: в молодых арахноэндотелиальных клетках ядро занимает большую часть, в зрелых – меньшую.

В препаратах, окрашенных азур-эозином, клетки арахноэндотелия по размерам и окраске соответствуют мезотелиальным клеткам (рисунок 6).



А



Б

Рисунок 6. Арахноэндотелиальные клетки в ликворе:

А – окраска реактивом Самсона (×400), Б – азур-эозином (×1000)

Клетки с признаками атипии. Злокачественные клетки могут попадать в ЦСЖ из первичных опухолей ЦНС (например, медуллобластомы) или метастазов. В препаратах такие клетки могут располагаться как поодиночке, так и пластами (рисунок 7, 8). При наличии скоплений клеток важно дифференцировать их с пластами эпителиоподобных клеток (например, эпендимоцитов). Морфология клеток и наличие признаков атипии оцениваются в окрашенном препарате. В случае выявления клеток с признаками атипии ликвор в обязательном порядке направляется на цитологическое исследование.

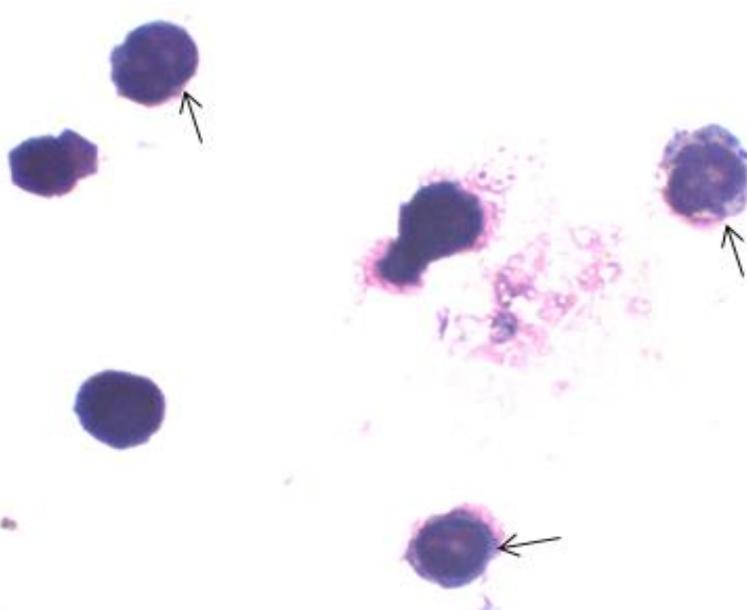


Рисунок 7. Клетки с признаками атипии в ликворе (отмечены стрелками) – окраска азур-эозином (×1000). Диагноз: В-клеточная лимфома

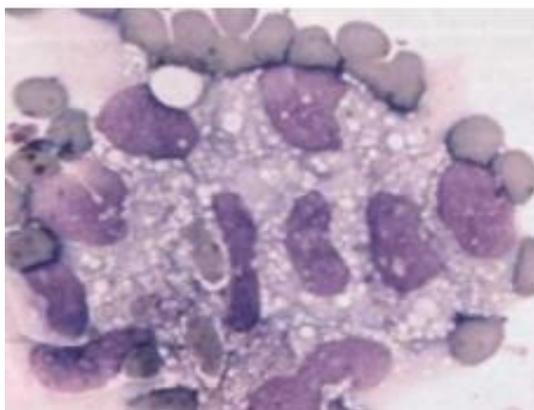


Рисунок 8. Клетки с признаками атипичии в ликворе – окраска азур-эозином ($\times 1000$). Диагноз: глиобластома

3.3. Биохимические исследования

Обязательными биохимическими показателями при исследовании ЦСЖ являются общий белок и глюкоза.

Общий белок. Совокупное содержание веществ белковой природы в ликворе – важный показатель, который изменяется при различной патологии ЦНС. Более 80% веществ белковой природы поступает в ЦСЖ из плазмы путем ее ультрафильтрации. В норме в люмбальном ликворе общее содержание белка составляет 0,15 – 0,45 г/л. У новорожденных в связи с недостаточно развитым ГЭБ содержание белка выше, чем у взрослых – до 0,6 – 0,9 г/л, к концу 1-го года жизни его содержание снижается.

В лабораторной практике для количественного определения белка в СМЖ используют два метода:

- колориметрический, основанный на учете реакции образования окрашенного комплекса белков с красителем пирогалолловым красным;
- турбидиметрический метод, основанный на определении степени мутности после добавления СМЖ к раствору сульфосалициловой кислоты.

Концентрация белка в ликворе прямо пропорциональна интенсивности окраски или степени помутнения исследуемого раствора.

Следует отметить, что референсные значения содержания белка в ЦСЖ зависят от используемого лабораторного метода и составляют при колориметрическом методе (с пирогалолловым красным) – 0,15-0,45 г/л; при турбидиметрическом (с сульфосалициловой кислотой) – 0,22-0,33 г/л. Это связано с принципиальными различиями указанных методов. Так в основе турбидиметрического метода лежит процесс денатурации молекул белков под воздействием сульфосалициловой кислоты, в результате чего происходит помутнение реакционной смеси и, как следствие, – изменение ее светопропускания. В результате регистрируется изменение интенсивности потока световой энергии, прошедшего через дисперсную систему. Однако,

отдельные молекулы белка в связи с малыми размерами рассеивают видимый свет очень слабо, поэтому не могут быть детектированы методом турбидиметрии.

Колориметрический метод (с применением пирогаллолового красного) позволяет определять общее количество белка в ликворе, поскольку все белковые молекулы вступают в реакцию с компонентами набора, образуя окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого регистрируется фотометрически.

Изменение содержания белка в ЦСЖ обозначают термином **протеинархия**. При различной патологии ЦНС содержание белка в ликворе изменяется как в сторону повышения, так и снижения.

Гипопротеинархия (гидроцефальный ликвор) – снижение концентрации белка ниже референсных значений. Наблюдается при гидроцефалии, гипертиреозе, ускоренном ликворообразовании, при нарушении целостности твердой мозговой оболочки в результате травмы или оперативного вмешательства. Развивается в результате уменьшения поступления сывороточного белка в ликвор или увеличения скорости обмена ликвора.

Гиперпротеинархия – повышение концентрации белка ЦСЖ выше референсных значений является показателем патологического процесса. Наиболее часто наблюдается при острых и хронических воспалительных заболеваниях ЦНС: туберкулезном, бактериальном менингитах, энцефалитах, абсцессах и опухолях мозга, после операций на головном мозге. Классической причиной увеличения общего белка и выраженного плеоцитоза в ликворе является острый бактериальный менингит. Гиперпротеинархия отмечается и при наличии в ликворе «путевой» крови.

Механизм увеличения концентрации белка в ЦСЖ может быть обусловлен:

- нарушением проницаемости ГЭБ в результате травмы, острого или хронического инфекционного поражения;
- нарушением обратного всасывания белка из ликвора клетками субарахноидальной оболочки, вызванным инфекционными поражениями, механическим блоком оттока ликвора опухолью, абсцессом или спайками;
- увеличением синтеза иммуноглобулинов лимфоцитами или плазматическими клетками в ЦНС (например, при рассеянном склерозе).

Альбумин. Белок ЦСЖ представлен альбумином (на 56-76%) и глобулинами. Отношение альбумина к глобулинам колеблется в пределах 2-3. Альбумин является индикатором проницаемости ГЭБ, поэтому в ряде случаев определение его содержания в СМЖ имеет клиническое значение.

Для более точной оценки степени нарушения проницаемости ГЭБ следует параллельно определять уровень альбумина в ликворе и сыворотке крови. На основании полученных данных рассчитывают показатель – *альбуминовый индекс* (А) по следующей формуле:

$$= \frac{\text{концентрации альбумина СМЖ (г/л)}}{\text{концентрации альбумина плазмы крови (г/л)}} \cdot 100$$

В норме альбуминовый индекс должен составлять не более 9, значения от 9 до 14 расценивают как умеренное повреждение ГЭБ, от 14 до 30 – заметное, от 30 до 100 – тяжелое и более 100 – полное поражение ГЭБ.

Глюкоза. Концентрация глюкозы в ЦСЖ находится в динамическом равновесии с уровнем глюкозы в плазме крови. В ликворе содержание глюкозы примерно на 40% меньше, чем в плазме крови. В субокципитальном и вентрикулярном ликворе содержание глюкозы на 12-15% выше, чем в люмбальном. Содержание глюкозы в ЦСЖ у новорожденных и недоношенных детей несколько выше, чем у взрослых. В норме концентрация глюкозы в СМЖ у взрослых составляет 2,8–3,9 ммоль/л. Уровень глюкозы в ликворе является важным индикатором функции ГЭБ.

Референтным методом для определения концентрации глюкозы в ликворе и других биологических жидкостях признан ферментативный, принцип которого основан на биохимических реакциях превращения глюкозы под действием ферментов с появлением характерного окрашивания. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации глюкозы.

Для корректной оценки уровня глюкозы в ликворе рекомендуется одновременно определять ее уровень в сыворотке крови – через 4-6 ч после приема пищи. При нормальном уровне глюкозы в крови ее концентрация в люмбальном ликворе составляет примерно 60% уровня в сыворотке крови. Соотношение уровня глюкозы в ликворе к уровню глюкозы в сыворотке крови в норме составляет от 0,5 до 0,7.

Клинически значимым является снижение содержания глюкозы в ликворе (*гипогликоархия*) и соотношения «глюкоза в ликворе/глюкоза в крови». Выделяют следующие механизмы гипогликоархии:

- нарушение транспорта глюкозы в ЦНС,
- увеличение гликолитической активности в ЦНС,
- рост потребления глюкозы лейкоцитами и микроорганизмами, присутствующими в ЦСЖ.

Гипогликоархия характерна для бактериальных менингитов (особенно вызванных микобактериями туберкулеза), что связано с гликолитической активностью микроорганизмов. Уменьшение соотношения «глюкоза в ликворе/глюкоза в крови» менее 0,3 наблюдается более чем в 70 % случаев бактериального менингита, причем показатель менее 0,2 свидетельствует о неблагоприятном прогнозе течения инфекционного процесса. Снижение уровня глюкозы в ликворе также может наблюдаться при опухолевых процессах в мозге и его оболочках, реже – при субарахноидальном кровоизлиянии, герпетической инфекции.

Увеличение содержания глюкозы в ликворе (*гипергликоархия*) встречается относительно редко, может наблюдаться при сахарном диабете, острых энцефалитах, некоторых опухолях, ишемических нарушениях кровообращения, столбняке. Следует отметить, что при гипергликемии до 40 ммоль/л (предел насыщения систем транспорта глюкозы через ГЭБ) наблюдается увеличение уровня глюкозы в ликворе на фоне нормального соотношения «глюкоза в ликворе/глюкоза в крови». При повышении глюкозы в крови более 40 ммоль/л данный показатель будет уменьшаться. Повышенный уровень глюкозы в ЦСЖ будет отмечаться при наличии примеси «путевой» крови.

Лактат. Источником лактата в ЦСЖ является мозговая ткань, лейкоциты и бактерии, его уровень в ликворе связан с уровнем в плазме крови. В норме концентрация лактата в СМЖ составляет 1,1-2,4 ммоль/л. Повышается содержание лактата в ликворе при анаэробном метаболизме в клетках ЦНС из-за гипоксии или пониженной оксигенации головного мозга при таких состояниях, как инфаркт головного мозга, церебральный артериосклероз, внутричерепное кровоизлияние, гидроцефалия, черепно-мозговая травма, отек головного мозга, менингит.

Концентрация лактата в ЦСЖ может служить одним из признаков дифференциальной диагностики бактериальных и вирусных менингитов: при вирусном менингите уровень его, как правило, не превышает 2,78-3,33 ммоль/л, при бактериальных менингитах концентрация лактата составляет более 3,89 ммоль/л.

Следует отметить, что повышение уровня лактата в ликворе коррелирует со снижением концентрации глюкозы, поэтому совместное исследование этих показателей является хорошим диагностическим признаком бактериальных менингитов.

4. СИНДРОМЫ ПАТОЛОГИЧЕСКОГО ЛИКВОРА

По соотношению содержания белка и клеточных элементов в ЦСЖ различают белково-клеточную и клеточно-белковую диссоциацию.

Белково-клеточная диссоциация может носить абсолютный или относительный характер.

Абсолютная белково-клеточная диссоциация характеризуется значительным повышением концентрации белка при нормальном количестве клеточных элементов. В большинстве случаев определяется ксантохромия ликвора. Наблюдается данный синдром при нарушении нормальной циркуляции в ликворных пространствах (спинальном, цистернальном блоках) или в сосудистой системе, особенно в венах и синусах мозга. Другими причинами абсолютной белково-клеточной диссоциации могут быть деструктивные процессы в мозге (размягчение или демиелинизация), а также органические изменения сосудистых стенок, нарушающие их проницаемость, или длительное повышение венозного давления.

Крайним проявлением абсолютной белково-клеточной диссоциации является *синдром Nonne-Froin*, который развивается при полной или неполной блокаде ликвора опухолями спинного мозга, абсцессами, а также вследствие арахноидитов или костных компрессий, и характеризуется ксантохромией, высоким содержанием белка и спонтанной коагуляцией ликвора.

Относительная белково-клеточная диссоциация характеризуется высоким содержанием белка и незначительным увеличением количества клеточных элементов и может быть обусловлена застойными явлениями в венах и ЦСЖ в сочетании с воспалительными явлениями в мозге и оболочках при условии, что воспаление носит ограниченный и не резко выраженный характер (например, туберкулезный или сифилитический менингит). Другой причиной относительной белково-клеточной диссоциации является распространенный дегенеративный процесс в ткани мозга при невыраженной реакции со стороны мозговых оболочек. Относительная белково-клеточная диссоциация наблюдается при поздних формах нейросифилиса, рассеянном склерозе, при менингоградикулитах.

Клеточно-белковая диссоциация характеризуется выраженным плеоцитозом при нормальном или незначительно повышенном содержании белка. Характерна для воспалительных заболеваний ЦНС (арахноидиты, менингиты, энцефалиты).

В таблице 7 отражены показатели основных синдромов патологического ликвора.

Таблица 7. Основные синдромы патологического ликвора

<i>Показатели</i>	<i>Синдром серозного ликвора</i>	<i>Синдром гнойного ликвора</i>	<i>Синдром геморрагического ликвора</i>
Физические свойства	прозрачный, бесцветный, может быть сероватый (при туберкулезном менингите – формирование фибриновой пленки)	мутный, желтый, желтовато-зеленоватый	в первые 24 ч прозрачный, затем ксантохромный
Цитологическая картина	цитоз до $1000 \times 10^6/\text{л}$ с преобладанием лейкоцитов	цитоз от $1000 \times 10^6/\text{л}$ до $5000 \times 10^6/\text{л}$ с преобладанием нейтрофильных гранулоцитов	обнаруживаются эритроциты от $1 \times 10^{12}/\text{л}$ до $3 \times 10^{12}/\text{л}$
Уровень белка	от незначительного повышения до 1 г/л (при туберкулезном менингите может быть выше 1 г/л)	от 1 до 3 г/л	от 1 до 21 г/л
Уровень глюкозы	в норме (при туберкулезном менингите резко снижен)	снижен	в норме
Возможные заболевания	серозный менингит, туберкулезный менингит, опухоли мозга и др.	гнойный менингит, менингококковый вторичный менингит и др.	закрытая ЧМТ различной тяжести, геморрагический инсульт др.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бранзел Н.А. Клинико-лабораторный анализ мочи и биологических жидкостей : пер. с англ. / Н.А. Бранзел. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 600 с.
2. Ким Ю.В. Что мы измеряем в моче сульфосалициловым методом? [Электронный ресурс] / Ю.В. Ким [и др.] // Лабораторная медицина. – 2003. – № 6. Режим доступа: <http://www.ramld.ru/articles/article.php?id=42>. – Дата доступа: 14.04.2023.
3. Кишкун А.А. Руководство по лабораторным методам диагностики / А.А. Кишкун. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 760 с.
4. Клинико-лабораторное исследование цереброспинальной жидкости : учеб.-метод. пособие / Т.А. Рогачева [и др.]. – Минск : БГМУ, 2018. – 23 с.
5. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / под ред. проф. В.С. Камышникова. – М. : МЕДпресс-информ, 2023. – 720 с.
6. Медицинские лабораторные технологии руководство по клинической лабораторной диагностике : в 2 т. / В.В. Алексеев [и др.] : под ред. проф. А.И. Карпищенко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. – Т. 1. – 472 с.
7. Миронова И.И. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, мокрота, синовиальная жидкость / И.И. Миронова, Л.А. Романова, В.В. Долгов. – М. : Триада, 2021. – 496 с.
8. Спинномозговая жидкость, лабораторные методы исследования и их клинико-диагностическое значение : учеб. пособие / С.Г. Марданлы, Ю.В. Первушин, В.Н. Иванова. — Электрогорск: ЗАО «ЭКОлаб», 2011. — 72 с.
9. Ходюкова А.Б. Лабораторное исследование цереброспинальной жидкости / А.Б. Ходюкова, Т.С. Дальнова, С.Г. Василиу-Светлицкая // Медицинские новости. – 2012. – № 1. – С. 36-40.
10. Alcaide, M. Automated cell count in body fluids: a review / M. Alcaide [et al] // *Avances en Medicina de Laboratorio*. – 2021. – Vol. 2. – P. 149 – 161.
11. Brown M., Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology / M. Brown, C. Wittwer // *Clinical Chemistry*. – 2000. – Vol. 46, iss. 8. – P. 1221–1229.
12. Body Fluid Analysis for Cellular Composition : Proposed Guideline / CLSI. – USA, 2005.
13. Bourner, G. International Committee for Standardization in Hematology (ICSH). ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids / G. Bourner [et al] // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2014. – Vol. 36, № 6. – P. 598-612.
14. Fleming, C. Clinical relevance and contemporary methods for counting blood cells in body fluids suspected of inflammatory disease / C. Fleming [et al] // *Clin. Chem. Lab. Med.* – 2015. – Vol. 53, № 11. – P. 1689-1706.

Учебное издание

Шилейко Ирина Дмитриевна
Батуревич Лариса Викторовна
Анисько Людмила Александровна
Камышников Владимир Семенович
Алехнович Лариса Игоревна
Кузьменко Андрей Тимофеевич
Русак Андрей Александрович

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕРЕБРОСПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 02.06.2023. Формат 60x84/16. Бумага «Снегурочка».

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 2,13. Уч.- изд. л. 1,77. Тираж 120 экз. Заказ 133.

Издатель и полиграфическое исполнение –
государственное учреждение образования «Белорусская медицинская
академия последипломного образования».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 3/1275 от 23.05.2016.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корп.3.