



УКРАЇНА

(19) UA (11) 18996 (13) U  
(51) МПК (2006)  
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЗРІЛОСТІ ТИМУСА ПЛОДІВ ТА НОВОНАРОДЖЕНИХ ВІД МАТЕРІВ, ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ І ТИПУ

1

(21) u200607540

(22) 06.07.2006

(24) 15.11.2006

(46) 15.11.2006, Бюл. № 11, 2006 р.

(72) Сорокіна Ірина Вікторівна, Купріянова Лариса Сергіївна

(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб оцінки зрілості тимуса плодів і новонароджених від матерів, хворих на цукровий діабет I типу, що включає визначення відносного об'єму лімфоїдного компонента тимуса з наступним обчисленням коефіцієнта зрілості тимуса, який **відрізняється** тим, що додатково визначають кількість клітин, експресуючих поверхневі рецептори до CD3 (зрілі тимоцити) та клітин, експресуючих

2

поверхневі рецептори до Thy-1 (незрілі тимоцити), а коефіцієнт зрілості обчислюють за формулою:

$K3 = (nThy-1 : nCD3) V$ ,

де K3 - коефіцієнт зрілості тимуса;

nThy-1 - кількість незрілих тимоцитів;

nCD3 - кількість зрілих тимоцитів;

V - відносний об'єм лімфоїдного компонента,

отримані дані порівнюють із нормою - показником коефіцієнта зрілості для середньовагових плодів (від 2,2 до 6,7) та, при збільшенні значень щодо неї, діагностують незрілість тимуса плодів та новонароджених, причому збільшення показника від 6,8 до 15,8 відповідає великим плодам, уродженим від матерів, що хворіють на цукровий діабет I типу, а збільшення показника від 15,9 до 29,8 і більше відповідає плодам із зниженою масою.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до патологічної анатомії і може бути використана для оцінки зрілості тимуса плодів та новонароджених від матерів, хворих на цукровий діабет I типу.

До числа захворювань, що несприятливо впливають на плин вагітності й пологів, відноситься цукровий діабет (ЦД). Проблема ЦД в усім світі є проблемою XXI століття й перебуває в центрі уваги не тільки ендокринологів, але й акушерів-гінекологів, неонатологів і педіатрів. Із всіх ендокринних екстрагенітальних захворювань ЦД найбільш несприятливо впливає на здоров'я матері, плода й новонародженого [Луцькіна О.М., Антипкин Ю.Г., Гутман Л.Б. Сахарный диабет у беременных как причина перинатальной патологии и нарушения здоровья детей. // Ж. АМНУ. - 2000. - Т.6. - №3. - С.52-59]. Соціальна значимість проблеми сполучення ЦД і вагітності визначається їх взаємообумовлюючим впливом: високою частотою несприятливого результату вагітності для плода. При вагітності на тлі ЦД у плода формується синдром, позначуваний як "діабетична ембріопатія" (ДЕ). Захворювання плода в пізньому фетальному періоді у відповідь на дію материнського діабету визначається терміном "діабетична фетопатія"

(ДФ) [Федорова М.В. Сахарный диабет, беременность и диабетическая фетопатия / Федорова М.В., Краснопольский В.И., Петрухин В.А. - Москва: Медицина, 2001. - 288с.]. За даними літератури у матерів із ЦД народжується тільки до 50% дітей з нормальною масою тіла, а залежно від ступеня важкості плин, тривалості захворювання й прояву судинних ускладнень маса тіла новонародженого змінюється [Солонец Н.И. Течение беременности, родов, состояние плода и новорожденного у больных сахарным диабетом. // Ж. Материнство и детство. -1992. - Т.37. - №4-5. - С.73-77]. Встановлено залежність маси тіла плода від тривалості захворювання у вагітної: маса плода збільшується (макросомія) при легкому й середньому ступені важкості плин захворювання ЦД терміном не більше 5 років; у жінок, що страждають ЦД із раннього віку, народжуються немовлята зі зниженою масою тіла (гіпотрофіки). Зміни тимуса плодів також будуть варіювати.

Вилочкова залоза (тимус) - центральний орган лімфоцитопоезу й імуногенезу. Будучи з однієї сторони джерелом гормонів і гормоноподібних речовин, а з іншого боку - центральним органом імунітету, тимус займає особливе місце в організмі людини. Мікрооточення вилочної залози і виді-

(19) UA (11) 18996 (13) U

лювані нею гуморальні фактори викликають проліферацію й диференціювання Т-лімфоцитів, а гормони вилочкової залози, які поступають в кров, обумовлюють подальше їхнє дозрівання в периферійних лімфоїдних органах (селезінці, лімфатичних вузлах). Лімфоцити тимусного походження здійснюють функцію розпізнавання свого й чужого, разом з макрофагами включають Т-клітки в проліферацію, диференціювання й таким чином забезпечують продукцію антитіл до відповідного антигену. Будучи джерелом всіх субпопуляцій Т-клітин і забезпечуючи їх диференціювання, вилочкова залоза в такий спосіб контролює всі форми імунного реагування. Вона здійснює свою функцію протягом всього життя але особливо велика її роль в антенатальному й ранньому постнатальному періодах. Вилочкова залоза також є джерелом ряду гормонів і гормоноподібних субстанцій, що роблять вплив на обмін речовин, гемопоєз, ріст, статеве дозрівання [Хлыстова З.С. Становление системы иммуногенеза плода человека. - Москва: Медицина. - 1987. - 256с.]. До моменту народження вилочкова залоза у доношеного плода структурно й функціонально сформована повністю, тому доцільно вважати, що формування патології вилочкової залози пов'язане з порушенням її ембріогенеза під дією різних патологічних факторів, до яких ставляться й захворювання матері [Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. - СПб, СОТИС. - 1996. - 270с.].

Відомий спосіб оцінки ступеня зрілості ендокринної системи плода й новонародженого [Патент № 50556А], згідно з яким оцінку ступеня зрілості ендокринної системи плодів і новонароджених виконують, оцінюючи стан залізистої паренхіми епіфіза мозку по площі, займаної ділянками різного типу будови, при цьому 100% площі, займаної первинною мезенхімальною стромою й паренхімою, оцінюють в 1 бал; 100% площі, займаної псевдотрабекулярними структурами, оцінюють в 2 бали, 100% площі, займаної целлюлярними структурами, оцінюють в 3 бали, з наступним визначенням коефіцієнта зрілості за формулою. І якщо його значення дорівнює величині  $0,06 \pm 0,008$ , то ступінь зрілості епіфіза відповідає терміну гестації, при більш низьких значеннях цього показника має місце вповільнення темпів внутрішньоутробного розвитку епіфіза, при більш високих, навпаки, прискорення.

Відомий також спосіб оцінки зрілості тимуса доношених середньовісних, великих та плодів з ознаками затримки внутрішньоутробного розвитку від матерів, вагітність яких протікала фізіологічно [А.Ф. Яковцова, И.В. Сорокина, И.Е. Алещенко. Имунная система плода человека при крупноплодии и ЗВРП. - Харьков, 2004. - С.34-60].

Установлено, що зрілий сформований тимус середньовісного плода складається із часточок різної величини й форми, у яких чітко помітні всі зони. Відносний об'єм лімфоїдного компонента становить  $41,2 \pm 3,79\%$ . У структурі лімфоїдної популяції імуноморфологічно виділяють: одиничні незрілі пре-Т-лімфоцити з Thy-1-антигеном, зрілі тимоцити, що мають маркери зрілих лімфоцитів CD3, CD4, CD5, CD8. При затримці внутрішньоут-

робного розвитку плода (ЗВРП) (плоди зі зниженою масою тіла - гіпотрофіки) відносний об'єм лімфоїдного компоненту досягає  $43,1 \pm 1,9\%$ . Лімфоїдна популяція представлена значною кількістю незрілих пре-Т-лімфоцитів, а відповідно зменшенням кількості зрілих клітин. У тимусах великих плодів на частку лімфоїдного компонента доводиться  $42,7 \pm 3,6\%$ . У складі лімфоїдної популяції виділяється помірна кількість незрілих пре-Т-лімфоцитів, а, отже, перевага зрілих форм лімфоцитів. Авторами встановлено, що в умовах патологічного впливу з боку матері протягом вагітності змінюється питома вага лімфоїдного компонента, у структурі якого переважають незрілі форми лімфоцитів.

Даний спосіб оцінки зрілості тимуса плодів і новонароджених є найбільш близьким по суті й результату, що може бути отриманим, до того, що заявляється.

Однак найближчий аналог не дає точної оцінки ступеню зрілості тимуса, тому що враховують лише процентне співвідношення лімфоїдного компонента в структурі тимуса; не вказуючи кількості зрілих і незрілих клітин у лімфоїдній популяції тимуса. Крім того, не визначають вплив на структуру тимуса конкретного захворювання матері.

У зв'язку з вищевказаним, в основу корисної моделі покладено задачу підвищення точності визначення ступеня зрілості тимуса плодів і новонароджених від матерів, що страждають цукровим діабетом І типу.

Задачу, покладену в основу корисної моделі вирішують тим, що у відомому способі оцінки зрілості тимуса плодів і новонароджених, що включає визначення відносного об'єму лімфоїдного компонента тимуса з наступним обчисленням коефіцієнта зрілості тимуса, згідно з корисною моделлю, додатково визначають кількість клітин, експресуючих поверхневі рецептори до CD3 (зрілі тимоцити) та клітин, експресуючих поверхневі рецептори до Thy-1 (незрілі тимоцити), а коефіцієнт зрілості обчислюють по формулі:

$$K3 = (nThy-1 : nCD3) V,$$

де K3 - коефіцієнт зрілості тимуса;

nThy - 1 - кількість незрілих тимоцитів;

nCD3 - кількість зрілих тимоцитів;

V - відносний об'єм лімфоїдного компонента,

отримані дані порівнюють із нормою - показником коефіцієнта зрілості для середньовагових плодів (від 2,2 до 6,7) та при збільшенні значень щодо неї діагностують незрілість тимуса плодів та новонароджених, при чому збільшення показника від 6,8 до 15,8 відповідає великим плодам, уродженим від матерів, що хворі цукровим діабетом І типу; а збільшення показника від 15,9 до 29,8 і більше відповідає плодам із зниженою масою.

Позитивний ефект корисної моделі полягає в тому, що представляється можливим більш достовірно оцінити зрілість тимуса плодів та новонароджених від матерів, які страждають на ЦД І типу та визначити кореляційний зв'язок між зрілістю тимуса і масою плоду та новонародженого.

Спосіб виконують наступним чином: зі шматочків тимусів (після фіксації в 10% нейтральному формаліні спиртової проводки й заливання в целлоїдин - парафін) виготовляють серійні зрізи тов-

щиною 5-6мкм. Зрізи фарбують гематоксиліном - еозином та досліджують імуногістохімічним непрямим методом Кунса в модифікації M. Brosman [Brosman M. Immunofluorescencne vysetrovanie formal - parafinovego materialu. // Cs. Patol. - 1979. - 15. -4. -с.215-220]. Імунні клітини диференціюють за допомогою моноклональних антитіл (МКА) до CD3, CD4, CD7, CD8, CD22, CD38, а також МКА ІКО-10 (антиген Thy-1) [Janossy G., Bofill M., Treidosiewicz L. Et. Al. Cellular differentiation of lymphoid subpopulations and their microenvironments in the human thymus. In human thymus. Ed. by H. Muller- Hermelink. Berlin ect., 1986. - P.89-125]. Препарати вивчають в люмінесцентному мікроскопі МЛ - 2 з використанням світлофільтрів: ФС-1-2, СЗС-24, БС-8-2, УФС-6-3. Морфометрію виконують на серійних зрізах на мікроскопі Olimpus. На зрізах, оброблених МКА, на обмеженій за допомогою сітки Г.Г. Автанділова площі зрізу, визначають відносні об'єми основних клонів імунних клітин. Статистичний аналіз проводять за допомогою стандартного пакету програм Statgraphics.

Спосіб ілюструють наступні приклади:

Приклад 1. Плід строком гестації 36 тижнів від матері, вагітність у якої протікала фізіологічно, загинув інтранатально. За допомогою стандартної програми «Statgraphics» на серійному зрізі тимуса встановлено, що відносний об'єм лімфоїдного компонента становить 80. Кількість зрілих тимоцитів досягає 35, а незрілих 3.  $K3=(3:35)-80=6,85$ .

Порівнюючи отриманий результат із середнім значенням КЗ для середньовагових плодів від ма-

терів із фізіологічним перебігом вагітності (2,2-6,7), встановлюють, що тимус даного плоду зрілий.

Приклад 2. Плід строком гестації 36 тижнів від матері, що страждає цукровим діабетом І типу, загинув інтранатально. За допомогою стандартної програми «Statgraphics» на серійному зрізі тимуса встановлено, що відносний об'єм лімфоїдного компонента становить 86,5. Кількість зрілих тимоцитів досягає 47, а незрілих 8.

$$K3=(8:47)-86,5=14,7.$$

Порівнюючи отриманий результат із середнім значенням КЗ для плодів від матерів з фізіологічним плином вагітності (2,2-6,7), прийшли до висновку, що незрілість тимуса даного плода відповідає групі великих плодів від матерів, що страждають цукровим діабетом І типу.

Приклад 3. Плід строком гестації 36 тижнів від матері, що страждає цукровим діабетом І типу, загинув інтранатально. За допомогою стандартної програми «Statgraphics» на серійному зрізі тимуса встановлено, що відносний об'єм лімфоїдного компонента становить 85. Кількість зрілих тимоцитів досягає 22, а незрілих 8.

$$K3=(8:22)-85=30,9.$$

Порівнюючи отриманий результат із середнім значенням КЗ для плодів від матерів з фізіологічним плином вагітності (2,2-6,7), прийшли до висновку, що незрілість тимуса даного плода відповідає групі плодів зі зниженою масою тіла, з ознаками затримки внутрішньоутробного розвитку від матерів, що страждають цукровим діабетом І типу.