



УКРАЇНА

(19) UA (11) 30186 (13) U
(51) МПК (2006)
A61B 10/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ СТУПЕНЯ АТРОФІЇ ТИМУСА ПЛОДІВ ТА НОВОНАРОДЖЕНИХ

1

(21) u200712836

(22) 19.11.2007

(24) 11.02.2008

(72) ШЕРСТЮКА СЕРГІЙ ОЛЕКСІЙОВИЧ, UA,
СОРОКІНА ІРИНА ВІКТОРІВНА, UA(73) ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ, UA

(56)

(57) Спосіб оцінки атрофії тимуса плодів та новонароджених, що включає визначення відносних обсягів стромального, лімфоїдного, епітеліального компонентів та незрілих пре-Т-лімфоцитів органа, який **відрізняється** тим, що

2

додатково враховують співвідношення цих обсягів та розраховують величину цього співвідношення

за формулою: $\frac{V_s}{V_l + V_e} \times V_{thy-1}$, де V_s - відноснийобсяг строми, $V_l + V_e$ - відносний обсяг лімфоїдного та епітеліального компонентів, V_{thy-1} - відносний обсяг незрілих пре-Т-лімфоцитів, і якщо вона знаходиться в границях 1,5-3,0 % - атрофію оцінюють як I ступеня, якщо в границях 3,1-4,5 % - як II ступеня, якщо величина співвідношення 4,6 та більше - атрофію оцінюють як III ступеня.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме до патологічної анатомії, і може бути використаною для оцінки ступеня атрофії тимуса плодів та новонароджених.

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 вилочкової залози і виділювані нею гуморальні фактори викликають проліферацію й диференціювання Т-лімфоцитів, а гормони вилочкової залози, які поступають з 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-клітини 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, які впливають 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 ембріогенезу під дією різних патологічних факторів (Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. - СПб.: СОТИС, 1996. - 270с.).

Атрофія тимуса або зменшення його маси це постійно наростаючий процес пригнічення активності функціонування органа під впливом ендогенних та екзогенних факторів, які діють на організм матері.

Процес пригнічення активного функціонування органа аж до виникнення його атрофії рівнозначний для дитини стану постнатально набутого синдрому імунodefіциту (Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. - СПб.: СОТИС, 1996. - 270с.), тому оцінка ступеня атрофії тимуса плодів та новонароджених є актуальною задачею, вирішення якої дасть змогу уточнити не тільки патогенез цього процесу, а й дати практичні рекомендації щодо ведення вагітності.

Відомий спосіб оцінки ступеня зрілості тимуса плодів та новонароджених, який включає морфoфункціональне дослідження органа та

(19) UA (11) 30186 (13) U

визначення відносних обсягів стромального, лімфоїдного, епітеліального компонентів та незрілих пре-Т-лімфоцитів. В залежності від структурних зрушень атрофію тимуса ділять на три фази-ступеня (Ивановская Т.Е., Зайратьянц О.В., Леонова Л.В., Волощук И.Н. Патология тимуса у детей. - СПб.: СОТИС, 1996. - 270с.).

Даний спосіб оцінки ступеня атрофії плодів та новонароджених є найбільш близьким до того, що заявляється, по технічній суті та результату, який може бути досягнутим, тому його обрано в якості прототипу.

Основним недоліком способу-прототипу є його недостатня точність, так як ступінь атрофії оцінюють, використовуючи тільки структурні зрушення шляхом врахування відносних обсягів компонентів не враховуючи при цьому співвідношення цих обсягів.

У зв'язку з вищевикладеним, в основу корисної моделі покладено задачу підвищення точності оцінки ступеня атрофії тимуса плодів та новонароджених.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі оцінки атрофії тимуса плодів та новонароджених, що включає визначення відносних обсягів стромального, лімфоїдного, епітеліального компонентів та незрілих пре-Т-лімфоцитів органу, згідно з корисною моделлю, додатково враховують співвідношення цих обсягів та розраховують величину цього співвідношення за формулою

$$\frac{V_s}{V_l + V_e} \times V_{thy-1}$$
, де V_s - відносний обсяг строми, $V_l + V_e$ - відносний обсяг лімфоїдного та епітеліального компонентів, V_{thy-1} - відносний обсяг незрілих пре-Т-лімфоцитів і якщо вона знаходиться в границях 1,5-3,0% - атрофію оцінюють як I ступеня, якщо в границях 3,1-4,5% - як II ступеня, якщо величина співвідношення 4,6 та більше - атрофію оцінюють як III ступеня.

Технічний ефект корисної моделі, а саме підвищення точності оцінки ступеня атрофії тимуса плодів та новонароджених, полягає в тому, що визначають не тільки відносні обсяги компонентів органу, а й їх співвідношення, що дає змогу практично повністю виключити такий суб'єктивний фактор, як кваліфікація дослідника.

Спосіб виконують наступним чином:

Тимуси досліджують макроскопічно. Виявляють та підраховують відносні обсяги строми, лімфоїдного, епітеліального компонентів та незрілих пре-Т-лімфоцитів. Враховують співвідношення відносного обсягу строми та пре-Т-лімфоцитів до відносних обсягів лімфоїдного та епітеліального компонентів разом взятих. Вираховують кількісне значення цього співвідношення за формулою:

$$\frac{V_s}{V_l + V_e} \times V_{thy-1}$$

де V_s - відносний обсяг строми, $V_l + V_e$ - відносний обсяг лімфоїдного та епітеліального компонентів, V_{thy-1} - відносний обсяг незрілих пре-Т-лімфоцитів. І якщо вона знаходиться в границях 1,5-3,0% - атрофію оцінюють як I ступеня, якщо в

границях 3,1-4,5% - як II ступеня, якщо величина співвідношення 4,6 та більше - атрофію оцінюють як III ступеня.

Кількісні значення структурних зрушень, які відповідають різним ступеням атрофії тимуса, встановлені експериментально. Результати експериментальних досліджень були сформовані за ступенем атрофії.

При цьому атрофія I ступеня представлена тимусами, які макроскопічно мають трикутну форму і представлені двома дольками і перешийком. Зовні тимуси покриті сполучнотканинною капсулою, сірого кольору із синюшним відтінком. Паренхіма тимусів сполучнотканинними перегородками розділена на дольки. На розрізі тимус сірувато-синюшого кольору, дрібнозернистий.

Маса тимусів знаходиться в межах від 0,018кг до 0,028кг, у середньому складає $0,025 \pm 0,0025$ кг, а відношення маси тимуса до маси тіла померлих дітей дорівнює 0,00261.

Внутрішня структура тимуса представлена дрібними дольками, оточеними широкими сполучнотканинними перегородками і жировою клітковиною. Краї дольок у більшості випадків фестончасті, рідше округлі. Кортико-медулярна диференційовка змазана.

Субкапсулярна зона складається з трьох рядів епітеліальних клітин. В осередках, утворених тілами і відростками цих клітин, розташовані нечисленні тимоцити і макрофаги. Щільність епітеліальних кліток цього шару дорівнює $510,0 \pm 6,2$ екз. у 1мм^2 .

Відносний обсяг кори складає $39,51 \pm 2,16\%$ (V_1). Коркова речовина виглядає гіперхромно у порівнянні з мозковою речовиною. Це зв'язано з більш високою щільністю епітеліоцитів і тимоцитів кори, у порівнянні з мозковою речовиною. Епітеліоцити кори розташовані дифузно, щільність їх складає $450,0 \pm 2,7$ екз. у 1мм^2 . Тимоцити цієї зони дрібні, з гіперхромними округлими ядрами і дуже вузькими ободками помірно еозинофільної цитоплазми. Розташовані вони в мережному епітеліальному кістяку. Щільність кортикальних тимоцитів дорівнює $11405,0 \pm 306,0$ у мм^2 .

Мозкова речовина трохи вужче, ніж коркова. Відносний обсяг її складає $36,36 \pm 1,71\%$ (V_e). Тимоцити медулярної зони виглядають більш світлими, чим тимоцити кори, за рахунок більшого обсягу цитоплазми. Щільність тимоцитів мозкової речовини дорівнює $7347,0 \pm 185,0$ у 1мм^2 . Епітеліоцити мозкової речовини мають більш світлі веретеноподібні ядра і помірно еозинофільну цитоплазму. Щільність епітеліоцитів цієї зони дорівнює $320,0 \pm 3,2$ екз. у 1мм^2 . У мозковій речовині визначається безліч великих, кістковидозмінених тимічних тілець. Відносний обсяг їх складає $5,37 \pm 0,61\%$.

Внутрішньодолькові периваскулярні простори розширені, містять пухку сполучну тканину й одиничні дрібні тимоцити і макрофаги. Відносний обсяг стромально-судинного компонента тимусів, які ввійшли у дану групу, складає $18,05 \pm 1,21\%$ (V_s).

Імуногістохімічне дослідження тимусів даної групи дозволило визначити відносні обсяги

основних структурних компонентів, які експресують різні антигени. Відносний обсяг епітеліальних клітин, які експресують HLA-Dg-антиген, склав $0,7 \pm 0,04\%$. Інтенсивність світіння ендотеліна-1 (мка) у венах і артеріях дорівнює $30,27 \pm 1,88$ і $33,66 \pm 1,99$ відповідно. Зрілі тимоцити містяться в наступних обсягах: CD3 - $29,2 \pm 4,0\%$, CD4⁺ - $25,0 \pm 3,0\%$ і CD8⁺ - $11,0 \pm 2,5\%$. Імунорегуляторний індекс тимусів цієї групи (CD4⁺/CD8⁺) відповідає $3,18 \pm 0,4$. Відносний обсяг незрілих тимоцитів, які експресують Thy-1 антиген складає - $11,0 \pm 1,5\%$ (V_{thy-1}). Тимоцити, що знаходяться на різних стадіях дозрівання, мають відносні обсяги: CD7 - $75,0 \pm 5,0\%$, CD38 - $72,0 \pm 4,0\%$. Відносний обсяг клітин продуцентів - ІЛ-7 і ІЛ-4 дорівнює $2,8 \pm 0,1\%$ і $0,9 \pm 0,01\%$ відповідно. Апоптозний індекс склав $48,3 \pm 4,78\%$.

Кількісне значення структурних зрушень:
 $\frac{18,05}{39,51 + 36,36} \times 11 = 2,31$, що відповідає атрофії 1-го ступеня.

Атрофія II ступеня представлена тимусами, що макроскопічно частіше представлені двома дольками і перешийком, а в 3 випадках мають три дольки. Зовні вони покриті сполучнотканинною капсулою сірого кольору. Паренхіма на розрізі дрібнозерниста, сіруватого кольору, щільної консистенції. Маса тимусів коливається від $0,0200$ кг до $0,0250$ кг, у середньому складає $0,0227 \pm 0,0012$ кг, а відношення маси тимуса до маси тіла померлих дітей дорівнює $0,007264$.

Мікроскопічно тимуси представлені дуже дрібними дольками з фестончастими краями і масивними розростаннями сполучної тканини.

У субкапсулярній зоні між двома рядами епітеліальних клітин розташовані одиничні тимоцити, з овальним гіперхромним ядром і вузьким ободком помірно еозинофільної цитоплазми, щільність яких складає $387,0 \pm 6,3$ екз. у 1 мм^2 .

Внутрішня кортикальна зона є вузької і більш гіперхромною у порівнянні з мозковою речовиною. Відносний обсяг її складає $28,74 \pm 0,7\%$ (V_1). Епітеліоцити кори розташовані як групами, так і дифузно, щільність їх складає $345,0 \pm 3,2$ екз. у 1 мм^2 . Тимоцити кори розташовані рівномірно, але представлені дуже скудно. Щільність їх дорівнює $6580,0 \pm 230,0$ у 1 мм^2 .

Медулярна зона ширше, ніж внутрішня кортикальна, відносний обсяг її складає $37,93 \pm 2,04\%$ (V_e). Щільність медулярних тимоцитів дорівнює $4592,0 \pm 200,0$ у 1 мм^2 . Епітеліальний компонент у цій зоні виражений слабо. Щільність епітеліоцитів мозкової речовини дорівнює $190,0 \pm 3,7$ екз. у 1 мм^2 . У мозковій речовині безліч великих, шаруватих, кістовидозмінених тимічних тілець, відносний обсяг яких, складає $4,33 \pm 0,66\%$.

Внутрішньодолькові периваскулярні простори розширені. У них міститься пухка сполучна тканина, дрібні тимоцити і макрофаги. Відносний обсяг стромально-судинного компонента складає $28,95 \pm 2,15\%$ (V_s).

Показник відносного обсягу епітеліальних кліток, які експресують HLA-Dg - антиген дорівнює

$0,45 \pm 0,02\%$. Апоптозний індекс склав $40,2 \pm 3,35\%$. Відносний обсяг зрілих тимоцитів дорівнює - CD3 - $19,5 \pm 4,0\%$, CD4⁺ - $13,0 \pm 3,5\%$ і CD8⁺ - $6,0 \pm 1,7\%$.

Імунорегуляторний індекс CD4⁺/CD8⁺ відповідає $2,16 \pm 0,2$. Незрілі тимоцити (Thy-1) у тимусі складають - $8,5 \pm 2,5\%$ (V_{thy-1}). Відносний обсяг тимоцитів різного ступеня зрілості дорівнює: CD7 - $90,0 \pm 8,0\%$, CD38 - $86,0 \pm 6,0\%$. Відносний обсяг ІЛ-7 і ІЛ-4 - продуцентів складає $0,49 \pm 0,01\%$ і $0,15 \pm 0,01\%$ відповідно. Інтенсивність світіння ендотеліна-1 (мка) у венах і артеріях дорівнює $22,22 \pm 2,10$ і $23,11 \pm 2,66$ відповідно.

28 35
 Кількісне значення структурних зрушень
 $\frac{28,35}{28,74 + 37,93} \times 8,5 = 3,7$, що відповідає атрофії II-го ступеня.

Атрофія III ступеня представлена тимусами, форма яких частіше наближається до трикутної, рідше має вид неправильного квадрата. Зовні він покритий сполучнотканинною капсулою, сіруватого рожевого кольору. Тканина залози щільної консистенції, розділена на дольки, на розрізі дрібнозерниста, сіруватого кольору. Маса тимусів знаходиться в межах від $0,0180$ кг до $0,0200$ кг, у середньому складала $0,0189 \pm 0,0011$ кг, а відношення маси тимуса до маси тіла померлих дітей дорівнює $0,006048$.

Мікроскопічно капсула, що покриває паренхіму органа, представлена пухкою сполучною тканиною. Септи, що відходять від капсули, розділяють тимус на дрібні дольки з фестончастими краями.

Субкапсулярна зона має два ряди епітеліальних клітин, між якими знаходяться одиничні тимоцити і макрофаги. У перикапілярних просторах цієї зони розташовані тимоцити і макрофаги, оточені пухкою сполучною тканиною. Епітеліальні клітки субкапсулярної зони середнього і дрібного розміру з округлими світлими ядрами і вузьким ободком цитоплазми. Щільність їх складає $270,0 \pm 3,6$ екз. у 1 мм^2 .

Місце переходу кори в мозкову речовину визначити практично неможливо внаслідок лімфоїдного спустошення цих зон.

Внутрішня кортикальна зона складає $25,33 \pm 1,44\%$ (V_1) від загального обсягу тимуса. Кількість епітеліальних кліток кори, дорівнює $295,0 \pm 2,8$ екз. у 1 мм^2 . Тимоцити, розташовані між епітеліальними клітинами, гіперхромні. Щільність їх дорівнює - $4900,0 \pm 316,0$ у 1 мм^2 .

У мозковій речовині тимічні тілця не визначаються. Епітеліоцити медулярної зони більш світлі в порівнянні з корою, їхня щільність дорівнює $180,0 \pm 1,8$ екз. у 1 мм^2 . Відносний обсяг мозкової речовини дорівнює $-38,05 \pm 0,37\%$ (V_e). Тимоцити цієї зони, щільність яких складає $3362,0 \pm 322,0$ у 1 мм^2 , мають темне округле ядро і вузький ободок світлої цитоплазми.

Внутрішньодолькові периваскулярні простори цієї групи містять одиничні тимоцити, оточені пухкою сполучною тканиною. Відносний обсяг стромально-судинного компонента тимусів складає $36,6 \pm 1,28\%$ (V_s).

Імуногістохімічно виявлено, що зрілі тимоцити містяться в тимусі в наступних обсягах: CD3 - $16,0 \pm 1,5\%$, CD4⁺ - $11,0 \pm 2,4\%$ і CD8⁺ - $0,8 \pm 0,1\%$.

Інтенсивність світіння ендотеліна-1 (мкка) у венах і артеріях склали $23,76 \pm 2,87$ і $24,34 \pm 2,43$ відповідно. Імунорегуляторний індекс CD4⁺/CD8⁺ дорівнює $13,75 \pm 1,05$. Незрілі тимоцити, які експресують на своїй поверхні маркер Thy-1, складають $9,5 \pm 0,7\%$ (V_{thy-1}), від загального обсягу імунних клітин тимусів даної групи. Клітини, які експресують рецептори до CD7 і CD38, що знаходяться на різних стадіях диференціювання, складають $81,0 \pm 5,0\%$ і $72,0 \pm 3,0\%$ відповідно. Відносний обсяг ІЛ-7-продуцентів дорівнює $0,05 \pm 0,001\%$, ІЛ-4-продукуючих клітин - $0,025 \pm 0,001\%$. Відносний обсяг епітеліальних клітин які експресують HLA-Dg - антиген складає $0,25 \pm 0,01\%$. Апоптозний індекс дорівнює $42,6 \pm 4,06\%$.

Кількісне значення структурних зрушень

$$\frac{36,6}{25,33 + 38,05} \times 9,5 = 5,5$$

, що відповідає атрофії III-го ступеня.