

Kvantifikácia výsledkov imunohistochemického vyšetrenia dezminu v srdcovom svale

MUDr. Ján Šikuta^{1,2}

(patologická anatómia a súdne lekárstvo)

Školiteľ: doc. MUDr. Jozef Šidlo, CSc., MPH^{1,2}

¹Ústav súdneho lekárstva LF UK, Bratislava, ²Súdnolekárske pracovisko ÚDZS, Bratislava

Úvod

Diagnostika náhlych úmrtí z kardiovaskulárnych príčin tvorí významnú a zároveň náročnú súčasť každodennej súdnolekárskej praxe. Stanovenie diagnózy nie je problémom pokiaľ pri pitve zistíme už makroskopicky jednoznačné morfológické nálezy ako trombózu koronárnej tepny, nekrózu svaloviny srdca pri *akútnom infarkte myokardu* alebo diseminovanú myofibrózu ako prejav *ischemickej choroby srdca*, pri ktorej sú v svalovine drobné jazvičky, prípadne jazvy väčšieho rozsahu po prekonanom infarkte myokardu, alebo aterosklerózu tepien srdca. V prípade negatívneho makroskopického nálezu a negatívneho výsledku dopĺňajúceho toxikologicko-chemického vyšetrenia je potrebné pátrať po skorých ischemických zmenách v srdcovom svale na mikroskopickej úrovni. V prípade vzniku ischemie v čase 4 až 7 hodín pred smrťou, kedy ešte nie je prítomná leukocytárna reakcia (Janssen, 1977) je potrebné odlíšiť pri štandardnom farbení hematoxylínom eozínom veľmi skoré ischemické zmeny v mikroštruktúre svaloviny srdca od posmrtných zmien – autolýzy. Hodnotenie mikroskopického vyšetrenia v takom prípade môže byť veľmi subjektívne a príčina smrti je stanovená *per exclusionem*, a to z kardiálnych funkčných, nie morfológických, príčin.

Z uvedeného vyplýva nutnosť objektivizovať mikroskopické vyšetrenie vizualizáciou takej morfológickej zmeny v mikroštruktúre srdca, ktorá by odrážala jeho funkčnú poruchu.

V rámci diagnostiky skorých ischemických zmien v srdcovom svale je možné použiť dôkaz protilátok proti štruktúrnym proteínom (napr. dezmin, myoglobín a ďalšie), alebo proti markerom nekrózy (ako napr. fibronektín, C5b-9_(m)) v tkanivách srdca imunohistochemickými metódami (Brinkmann, 1993, Dettmeyer, 2018, Michaud, 2020).

Vzhľadom na dostupné ekonomické možnosti sme sa v pilotnej štúdií zamerali na testovanie využitia imunochemickej reakcie s protilátkou proti dezminu. Predbežné výsledky ukázali stratu (depléciu) dezminu v niektorých vzorkách srdcového svaly v prípadoch jeho ischemického poškodenia, t. j. pri skorých ischemických zmenách. Na základe predbežných výsledkov sme stanovili nasledovné okruhy skúmania: vzťah medzi ischemickými a autolytickými zmenami v srdcovom svale, hodnotenie a kvantifikácia vizualizovaného dezminu a interpretácia získaných výsledkov.

Cieľom práce je zistiť spôsob kvantifikácie rozsahu zachovaného dezminu - Colour Proportionate Area (CPA) a jej vzťah k závažnosti ischemického poškodenia myokardu so zreteľom na autolytické procesy a tak objektivizovať získané výsledky a možnosti diagnostiky včasných ischemických zmien ako príčiny náhleho úmrtia.

Pacienti a metódy

Do štúdie bolo zaradených 88 prípadov úmrtí pitvaných na Súdnolekárskom pracovisku Úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou v Bratislave v období rokov 2012 až 2017. Vo všetkých prípadoch bola vykonaná analýza pitevných protokolov so zameraním na detailné údaje o pohlaví, veku, okolnostiach smrti, čase smrti, čase uloženia tela do chladiaceho boxu a čase pitvy. Na mikroskopické vyšetrenie boli odobraté vzorky z medzikomorovej priehradky, prednej a zadnej steny ľavej komory srdca. Vzorky boli spracované štandardným postupom v imunohistochemickom laboratóriu na Ústave

patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave. Na vizualizáciu štruktúrného proteínu – dezminu boli použité protilátky „DAKOCytomation, Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin, Clone D33“. Vzorky boli zároveň spracované štandardnou metódou zaliatím do parafinových bločkov, rezy boli ofarbené štandardným konvenčným farbením hematoxylínom eoziном (ďalej HE). Takto spracované preparáty boli naskenované a digitalizované prostredníctvom zariadenia - *PrimeHistoXE* a následne analyzované softvérom *ImageJ*, ver. 2.0 s doplnkom (*pluginom*) „*IHC Tool Box*“ s modulom „*H-DAB*“ a „*H-DAB(more brown)*“. Rozsah a intenzita zafarbenia hnedou farbou – diaminobenzidínom (DAB) – Colour Proportionate Area (CPA) bola vo vyšetrovaných preparátoch následne vypočítaná softvérom. Hodnota CPA je uvádzaná v percentách (%). Na elimináciu nevýrazných alebo nezafarbených plôch vo výrezku (napr. edém interstícia, príp. mierna fibróza a pod.) bol použitý matematický pomer medzi „*H-DAB*“ / „*H-DAB(more brown)*“, pracovne nazvaný ako „dezminový index ischemického poškodenia“. Takto získané hodnoty CPA a uvedených indexov, spolu s ďalšími kritériami – vek (v rokoch), časový interval od smrti do uloženia do chladiaceho zariadenia a do pitvy (v hodinách) a údaje o prípadnej resuscitácii, s prihliadnutím na makroskopické a ostatné mikroskopické nálezy boli zosumarizované a ďalej analyzované v softvéri Microsoft Office Excel ver. 16.11 pre macOS 10.14.6.

Výsledky

Skenovanie mikroskopických preparátov prebiehalo v dvoch krokoch – v roku 2017 a s odstupom dvoch rokov v roku 2019. Kvalita preparátov, ktoré boli uchované na suchom a tmavom mieste, zostala po digitalizácii nezmenená, t. j. neboli, pri zachovaní parametrov skenovania, zistené rozdiely v intenzite a rozsahu zafarbenia. Zo skenov, digitalizovaných preparátov a analýzy protokolov bola v programe Excel zhotovená nasledovná tabuľka (Tabuľka 1) s predbežnými výsledkami:

Pozitívne kontroly - priemer CPA [%]	index1 [%]	Negatívne kontroly - priemer CPA [%]	Index1 [%]
19,30%	74,8%	2,800%	53,0%
21,60%	57,8%	10,600%	56,0%
15,00%	74,8%	7,433%	45,6%
10,27%	75,5%	15,800%	71,6%
0,50%	83,3%	13,850%	67,4%
7,47%	59,9%	12,700%	67,4%
		15,700%	68,5%
		12,050%	57,6%
		13,300%	73,5%
Priemerná CPA 12,36%	Priemerný index1: 71%	11,600%	62,3%
Smerodajná odchýlka			
7,867617645	9,981251843	4,177514582	9,534797584
MAX: 21,6% MIN: 0,5%	MAX: 83,3% MIN: 57,8%	MAX: 15,8% MIN: 2,8%	MAX: 73,5% MIN: 45,6%

Tabuľka 1. Výsledky pozitívnych a negatívnych kontrol zoskenovaných mikroskopických preparátov zo srdcového svalu a hodnoty CPA a „indexu ischemického poškodenia“

Diskusia

K sledovanej problematike sme v dostupnej literatúre zistili osem prác zaoberajúcich sa vyšetrovaním zmien dezminu vo vzťahu k ischemickým zmenám v srdcovom svale (kľúčové slová „desmin, ischemic, myocard*, immunohistochem*). Nakoľko ide o ojedinelú štúdiu, možnosti porovnania postupov pri meraní resp. kvantifikovaní rozsahu Colour Proportionate Area (CPA) zistených imunohistochemickými metódami sú veľmi obmedzené (Walker, 2006, Taylor, 2006). Z uvedeného dôvodu sme si museli zvoliť metódu, zabezpečiť prístrojové vybavenie s príslušným softvérom a potrebnými funkciami a vypracovať pracovný postup na

dosiahnutie vytýčeného cieľa. Nakoľko ide o pilotnú štúdiu, postup a kritériá hodnotenia nálezov je možné v priebehu práce, v závislosti od predbežných výsledkov, modifikovať, prehodnocovať a spresňovať.

Vizualizácia štrukturálneho proteínu – dezminu v tkanive srdcového svalu bola zvolená pre jeho citlivosť na ischémiu, kedy už od 4 až 5 hodín od nástupu ischémie sú pozorované jeho výpadky (Dettmeyer, 2018), ale najmä pre jeho ľahkú materiálovú a cenovú dostupnosť.

V niektorých prípadoch v laboratórnych podmienkach, bola pozorovaná úplná deplécia tinkčných vlastností dezminu, a to už v časovom intervale 90 až 120 minút od vzniku ischémie (Hein, 1995). Xiaohong (2002) pozoroval depléciu dezminu a myoglobínu už v čase 30 až 60 minút od vzniku nedokrvenia.

Prvé skúsenosti so skenovaním preparátov, ako aj s časovou náročnosťou dvojitého skenovania, poukázali na potrebu odstrániť niektoré artefakty, ktoré závažne ovplyvňovali meranie rozsahu deplécie dezminu, a to napr. nepravidelný tvar niektorých výrezkov. Preto bola zvolená jednotná metóda nastavenia v softvéri na štvorcový tvar výrezku, o ploche 1 cm². Nakoľko predmetom merania bol rozsah hnedého zafarbenia svalových buniek diaminobenzidínom, bolo potrebné eliminovať nefarbiace sa plochy tvorené napríklad edémom interstícia, štruktúrami srdcového skeletu, alebo fokálnymi jazvičkami (disperzná myofibróza), ktoré dezminu neobsahujú. Po konzultácii s autorom *pluginu* IHC Tool Box Jie Shu (Jie Shu, 2018) bola vyskúšaná jedinečná metóda, a to rozšírenie rozsahu „hnedej farby“, tzv. *H-DAB(more brown)*, ktorou bol rozšírený rozsah zafarbených plôch a zvýšená citlivosť pre kalkuláciu, kde sa dezminu „mohol“ nachádzať. Týmto spôsobom bola znížená chybovosť skenovania o štruktúry resp. plochy, ktoré dezminu neobsahovali. Uvedený pomer *H-DAB/H-DAB(more brown)* naznačil, že by mohol byť dobrým markerom rozsahu ischemického poškodenia srdcového svalu. Ide o pomer rozsahu jasne hnedo vizualizovaného dezminu k rozsahu napr. autolýzou pozmeneného dezminu, ktorý sa síce farbí na hnedo, ale menšou intenzitou. Preto bol pracovne tento pomer nazvaný: „dezminový index ischemického poškodenia 1“.

Doposiaľ vyšetrené prípady poskytli veľmi rôznorodé výsledky, a preto bol zmenený postup pri skenovaní preparátov (v roku 2020) a boli oskenované aj preparáty ofarbené hematoxylínom eozínom, a to za účelom sprísnenia „dezminového indexu ischemického poškodenia“. Bol vyslovený predpoklad, že hodnotenie uvedeného pomeru: rozsah zafarbenia *CPA H-DAB* / rozsah *CPA HE*, bude zodpovedať reálnejšiemu hodnoteniu svalových buniek a stavu dezminu, ktorý obsahujú, ako rozsah doposiaľ použitého skenovania s rozšírenou škálou pre hnedú farbu (*H-DAB(more brown)*), ktoré neprinieslo očakávané výsledky a bolo zatiaľ chybou v prípadoch prítomnosti autolýzy buniek srdcového svalu.

Od tzv. „dezminového indexu ischemického poškodenia 2“ očakávame, že bude odrážať pomer rozsahu vizualizovaného dezminu v svalových bunkách (*CPA H-DAB*), k rozsahu svalových buniek zafarbených HE (*CPA HE*), a tak bude možné lepšie odlíšiť aj autolýzu svalových buniek od ich reálneho ischemického poškodenia.

Zoznam použitej literatúry

1. Dettmeyer, Reinhard B. "Coronary sclerosis, myocardial infarction, myocarditis, cardiomyopathy, coronary anomalies, and the cardiac conduction system." *Forensic Histopathology*. Springer, Cham, 2018. 303-355.
2. Janssen, W. *Forensische Histologie: mit 10 Tabellen*. Lübeck, Schmidt-Römhild, 1977.
3. Xiaohong, Z, et al.: The contrast of immunohistochemical studies of myocardial fibrinogen and myoglobin in early myocardial ischemia in rats. *Legal Medicine* 2002; 4(1): 47-51.

4. Hein S, Scheffold T, Schaper J. Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995; 110:89-98
5. Michaud, Katarzyna, et al.: Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Archiv* 2020; 476(2): 179-194.
6. Brinkmann, B., Sepulchre, M. A., Fechner, G. The application of selected histochemical and immunohistochemical markers and procedures to the diagnosis of early myocardial damage. *International journal of legal medicine*, 1993, 106.3: 135-141.
7. Jie Shu, Guoping Qiu, Mohammad Ilyas and Philip Kaye. Biomarker Detection in Whole Slide Imaging Based on Statistical Color Models. *The MIDAS Journal- Computational Imaging Biomarkers for Tumors (CIBT)*, <http://www.midasjournal.org/browse/publication/758>, 2010
8. Jie Shu Guoping Qiu, Mohammad Ilyas, G. Dolman: A Semi-Automatic Image Analysis Tool for Biomarker Detection in Immunohistochemistry Analysis. *International Conference on Image and Graphics (ICIG)*. pp. 937-942, 2013
9. Jie Shu, Guoping Qiu, Philip Kaye and Mohammad Ilyas: Segmenting Overlapping Cell Nuclei in Digital Histopathology Images. *35th IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*. pp. 5445-5448, 2013
10. Jie Shu, Hao Fu, Guoping Qiu and Mohammad Ilyas: An Efficient Gland Detection Method Based on Texture and Morphological Transformation. *Medical Image Understanding and Analysis (MIUA)*. pp. 173-178, 2013
11. IHC ToolBox, <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/ihc-toolbox/index.html>
12. Walker, RA: Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology*, 2006, 49.4: 406-410.
13. Taylor, C. R. and Richard M. Levenson: Quantification of immunohistochemistry—issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, 2006, 49.4 (2006): 411-424.