

КОМПЬЮТЕРНАЯ МОРФОМЕТРИЯ В ОЦЕНКЕ МАРКЕРОВ АПОПТОЗА В МИОКАРДЕ ПРИ ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ

Семёнов В.В., Юдина О.А.

*Белорусский государственный медицинский университет; Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь
(Минск, Беларусь)*

Актуальность. В настоящее время «золотым» стандартом при выполнении аутопсии для установления причин внезапной сердечной смерти (ВСС) в молодом возрасте (<45 лет) при аутопсийно-негативной макроскопической картине экстракардиальных и кардиальных причин смерти является обязательное проведение химико-токсикологического и гистологического исследований, отрицательный результат которых предусматривает проведение молекулярной аутопсии секционного материала, либо молекулярно-генетического исследования близкого семейного окружения умерших с целью исключения / подтверждения генетически детерминированной кардиопатологии (первичные электрические болезни сердца). Гистологическое исследование миокарда при ВСС в молодом возрасте с применением иммуногистохимического (ИГХ) и морфометрического (ММ) методов позволяет выявить морфологический субстрат аритмогенного механизма при внезапной сердечной смерти не ишемического генеза в молодом возрасте – интерстициальный фиброз, в патогенезе которого решающая роль отводится апоптозу кардиомиоцитов, что обеспечивает снижение электрической стабильности миокарда с развитием его электромеханической дисфункции (аритмогенная ВСС).

Цель. Изучить экспрессию белков, регулирующих митохондриальный механизм апоптоза в кардиомиоцитах при ВСС неишемического генеза в молодом возрасте с помощью компьютерной морфометрии виртуальных сканов (оцифрованных микропрепаратов) в программной среде Aperio Image Scope.

Материал и методы. Объектом исследования явились фрагменты миокарда боковой стенки левого желудочка сердца на границе средней и нижней её трети (уровень оснований папиллярных мышц), полученные ходе судебно-медицинского секционного исследования трупов мужчин, умерших в возрасте 18-45 лет с установленной причиной смерти I42.8/I42.9 (вторичная кардиомиопатия – исследуемая группа, n=77). Группа сравнения (n=20) – неиспользованные эксплантированные сердца неживых доноров с бьющимся сердцем мужского пола возрастного диапазона 18–45 лет. Для выявления признаков апоптоза использовались поликлональные кроличьи антитела для иммуногистохимического окрашивания (ИГХ) формалин-фиксированных заключенных в парафин гистологических препаратов тканей человека к цитохрому С (anti-CytC), фактору активации апоптотической протеазы-1 (anti-APAF-1), каспазе-3 (anti-CASP3) и белку Bcl2 (anti-BCL2). Для ИГХ использовались следующие реагенты: 1) Буферы для демаскировки антител в Pascal - Pascal Dako Cytomation S2800 (давление 21 psi при 125°C): pH 9.0 - IHC Antigen Retrieval Solution, 10x High pH, INVITROGEN (10 мл раствора и до 100 мл дистиллированной воды); pH 6.0 - 10x Sodium citrate Antigen Retrieval Solution pH6.0, Elabscience (10 мл раствора и до 100 мл дистиллированной воды). 2) Peroxide Block, ScyTec Lab (10% пероксид водорода), (Ready-to-use). 3) BSA 1% - Bovine serum albumin (0,1 г и 10 мл Tris-буфера). 4) Промывочный буфер Tris - Tris Buffered Saline Wash Buffer (25X) pH7.4, ZETA (80 мл раствора до 2000мл дистиллированной воды). 5) Раствор для разведения антител - Normal antibody diluent, ZETA (Ready-to-use). 6) 3-компонентная визуализирующая система - Universal HRP detection Pack, ZETA: Anti-Mouse+anti-Rabbit-

HRP (вторичное антитело, Ready-to-use) (смешиваемые перед употреблением с 50 мкл DAB-хромогена и 1000 мкл DAB-субстрата), DAB substrate и DAB Chromogen, concentrate. 7) Гематоксилин (гематоксилин Fluka - 2,5г, KJO3 - 0,15г, алюмокалиевые квасцы - 12,5г, глицерин - 400 мл и 500 мл дистиллированной воды). 8) Среда для заключения срезов - Cytoseal 60, ThermoScientific.

Конвертация (оцифровка) приготовленных нативных микропрепаратов в виртуальные (оцифрованные) осуществлялась в системе цифровой микроскопии MoticEasyScan Pro, China в автоматическом режиме на увеличении, эквивалентном физическому увеличению объектива микроскопа $\times 40$. Виртуальные ИГХ-микропрепараты импортировались в компьютерную программную среду Aperio Image Scope version 12.4.0.5043. Для компьютерной морфометрии импортированных виртуальных ИГХ-микропрепаратов применялся стандартный алгоритм подсчета позитивных пикселей (Positive Pixel Count v9), автоматически измеряющей интенсивность ИГХ реакции (коричневой окраски) и разделяющей её на 3 уровня и негативную реакцию. Проводилась морфометрическая оценка максимально возможного (≥ 6) количества произвольно выбранных полей зрения продольно срезанного миокарда, соответствующих объективу $\times 20$.

Результаты и их обсуждение. Результат программной оценки интенсивности экспрессии (компьютерной морфометрии) имеет обратную взаимосвязь с данными визуальной оценки и отражает данные о распространенности и интенсивности (коричневой) окраски диаминобензидином (ДАБ-окраски) – выраженная экспрессия (поля красного цвета), умеренно-выраженная экспрессия (поля оранжевого цвета), слабовыраженная экспрессия (поля желтого цвета), отсутствие экспрессии (поля синего и белого цвета – негативная реакция). Полученные данные в автоматическом режиме обрабатываются и представляются в цифровом (математическом) эквиваленте, что позволяет в дальнейшем использовать автоматически рассчитанные диагностические показатели морфометрической диагностики (в т.ч. оценить величину экспрессии ($\text{Positivity} = \text{NPositive} / \text{NTotal}$, где – NPositive – количество позитивно окрашенных пикселей, NTotal – общее количество пикселей) подвергнуть статическому анализу и установить статистически значимые различия между исследуемыми группами и/или группами сравнения.

Выводы. В патогенезе кардиального фиброза решающая роль отводится апоптозу кардиомиоцитов. Интерстициальный кардиосклероз различной степени выраженности обуславливает снижение электрической стабильности миокарда с развитием его электромеханической дисфункции и может рассматриваться как морфологический субстрат для реализации аритмогенного механизма при внезапной сердечной смерти не ишемического генеза в молодом возрасте. Проведённая компьютерная морфометрия виртуальных ИГХ-микропрепаратов позволила выявить выраженное увеличение экспрессии факторов апоптоза миокарде при ВСС неишемического генеза мужчин в молодом возрасте.



РМАНПО

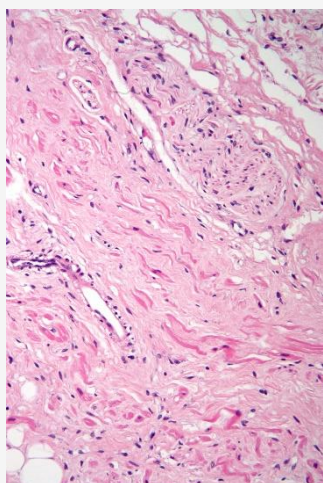
**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ЦЕНТР РАЗВИТИЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ КВАЛИФИКАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ**



**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ НЕПРЕРЫВНОГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ**

СБОРНИК
тезисов докладов международной научно-
практической on-line конференции
«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ
ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ АНАТОМИИ»

15 мая 2025 года



Ташкент - 2025