



**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA“ DIN BUCUREȘTI**



Str. Dionisie Lupu 37, sector 2, București, 020021, România, www.umfd.ro, email: rectorat@umfd.ro

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

**Studiul markerilor imunohistochimici în recunoașterea post-mortem a
infarctului miocardic.**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. VLADIMIR BELIȘ

MEMBRU ONORIFIC AL ACADEMIEI ROMÂNE

Student-doctorand: MOLDOVAN RADU

2024

CUPRINS

INTRODUCERE

I. PARTEA GENERALĂ	4
1. Moartea subită de cauză cardiacă.....	4
1.1 Introducere.....	4
1.2 Epidemiologie.....	4
1.3 Fiziopatologia în moartea subită de cauză cardiacă.....	4
1.4 Ischemia miocardică și infarctul miocardic acut.....	5
1.4.1 Infarctul miocardic ca urmare a trombozei coronariene acute	5
1.4.2 Infarctul miocardic acut cauzat de dezechilibrul dintre cererea și oferta de oxigen la nivelul țesutului miocardic	5
1.4.2.1 Infarctul miocardic acut ca urmare a scăderii aportului de oxigen la nivelul țesutului miocardic	6
1.4.2.2 Infarctul miocardic acut ca urmare a creșterii cererii de oxigen la nivelul țesutului miocardic.....	6
2. Markerii imunohistochimici de identificare a ischemiei și necrozei miocardice...7	
2.1 Markerii imunohistochimici ai sistemului complement.....	7
2.2 Markerii imunohistochimici mediatori ai inflamației.....	7
2.3 Markerii imunohistochimici specifici proteinelor cardiomiocitelor	7
2.4 Markerii imunohistochimici specifici proteinelor plasmatice și necrozei miocardice.....	8
2.5 Markerii imunohistochimici specifici hipoxiei.....	8
2.6 Markerii imunohistochimici specifici de destabilizare a plăcii aterosclerotice..8	
2.7 Markerii imunohistochimici specifici apoptozei.....	8
II. CONTRIBUȚII PERSONALE.....	9
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	9
4. Metodologia generală a cercetării.....	10
5. STUDIUL I: Analiză statistică a cauzelor de deces și a diagnosticului histopatologic în investigațiile medico-legale din cadrul morților subite cardiace.....	11
5.1 Ipoteza de lucru și obiective specifice.....	11
5.2 Material și metodă.....	11
5.3 Rezultate.....	14

5.4	Discuții.....	17
5.5	Concluzii.....	20
6.	STUDIUL II: Noi perspective asupra expresiei markerilor imunohistochimici în recunoașterea post-mortem a infarctului miocardic.....	21
6.1	Ipoteza de lucru și obiective specifice	21
6.2	Material și metodă	22
6.3	Rezultate	22
6.4	Discuții	26
6.5	Concluzii.....	27
7.	STUDIUL III: Studiu imunohistochimic al ATP1A3 și Plakophilinei 2 ca potențiali noi markeri în diagnosticul ischemiei miocardice.....	28
7.1	Ipoteza de lucru și obiective specifice.....	28
7.2	Material și metodă	29
7.3	Rezultate	33
7.4	Discuții	35
7.5	Concluzii.....	38
8.	Concluzii și contribuții personale	39
	BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ	42

INTRODUCERE

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate la nivel global, cu infarctul miocardic acut și ateroscleroza coronariană fiind printre cele mai frecvente cauze de deces. În cazurile de moarte subită, care include și decesele de cauză cardiacă, autopsia joacă un rol esențial în stabilirea cauzei decesului, contribuind la o înțelegere mai profundă a mecanismelor patologice și la îmbunătățirea intervențiilor preventive.

Teza de doctorat prezentată cuprinde trei studii, fiecare aducând contribuții valoroase în domeniul histopatologiei și medicinei legale. Primul studiu, de tip observațional retrospectiv, analizează cazurile de moarte subită cardiacă autopsiate în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Maramureș. Acest studiu subliniază dificultatea identificării infarctului miocardic incipient, o provocare majoră în medicina legală. Studiul scoate în evidență importanța metodelor de diagnosticare histopatologice.

Al doilea studiu prezintă un amplu review al literaturii de specialitate, concentrându-se pe utilizarea markerilor imunohistochimici pentru diagnosticarea ischemiei miocardice. Markerii precum complexul C5b-9, fibronectina și troponinele cardiace joacă un rol crucial în detectarea ischemiei în stadii timpurii, în special în cazurile în care leziunile macroscopice și microscopice nu sunt evidente. Acest studiu reiterează importanța tehnicilor avansate de imunohistochimie.

Cel de-al treilea studiu, de natură experimentală, explorează expresia imunohistochimică a proteinelor ATP1A3 și PKP2 ca markeri potențiali pentru diagnosticarea ischemiei miocardice. Concluziile acestui studiu, sugerând că ATP1A3 prezintă un potențial promițător în diagnosticul ischemiei, în timp ce PKP2 nu demonstrează o corelație semnificativă în acest sens.

În concluzie, cercetarea doctorală subliniază importanța markerilor imunohistochimici în detectarea precoce a ischemiei miocardice și atrage atenția asupra necesității unor studii suplimentare. Dezvoltarea unor metode de diagnostic mai avansate și precise are potențialul de a îmbunătăți acuratețea diagnosticării infarctului miocardic acut.

I. PARTEA GENERALĂ

1. Moartea subită de cauză cardiacă

1.1 Introducere

Bolile cardiovasculare constituie principala cauză de mortalitate la nivel global. Dintre afecțiunile cardiovasculare, mortalitatea de cauză cardiacă ocupă primul loc. Exemple de cauze de deces asociate patologiei cardiovasculare includ infarctul miocardic acut, ateroscleroza coronariană severă, fibrilația ventriculară, cardiomiopatia dilatativă, cardiomiopatia hipertrofică, cardiomiopatia aritmogenă a ventriculului drept și miocardita. Infarctul miocardic și ateroscleroza coronariană reprezintă principalele cauze de mortalitate cardiovasculară de cauză cardiacă, fiind responsabile pentru 85% din totalitatea deceselor de cauză cardiacă. Aceste două patologii au implicații considerabile asupra vieții sociale și asupra sistemului de sănătate

Cazurile de moarte subită cardiacă sunt frecvent incadrate ca și cazuri medico-legale, în conformitate cu prevederile din Codului Penal și Codului de Procedură Penală care se referă la decesele suspectate de a fi violente sau cele cu cauză necunoscută. Identificarea exactă a cauzei MSC poate fi dificilă chiar și în urma investigațiilor complementare post-mortem, deoarece unele patologii, precum spasmul coronarian, sunt greu de obiectivat. Cea mai frecventă cauză de MSC este patologia coronariană aterosclerotică, care poate duce la ischemie miocardică cu declasarea de aritmii ventriculare sau unui infarct miocardic (1). Ischemia miocardică este etapa premergătoare oricărui tip de infarct miocardic. Ca urmare folosirea markerii imunohistochemici este esențială în detectarea precoce a ischemiei (2).

1.2 Epidemiologie

La nivel global, MSC cauzează peste 7.000.000 de decese anual. În Statele Unite, MSC este responsabilă pentru aproximativ 300.000 de decese, iar în Uniunea Europeană, pentru aproximativ 250.000. În urma studiilor a fost observat că bărbații prezintă o susceptibilitate mai ridicată a MSC, datorită unui cumul de factori ce pot contribui la diferențele de incidență între cele două sexe. În plus, se consideră că rolul protector hormonal la sexul feminin contribuie la diferențele de incidență MSC (3). Grupa de vârstă cea mai afectată este între 50 și 60 de ani.

1.3 Fiziopatologia morții subite cardiace

MSC este cauzată de interacțiuni între factori structurali, funcționali și de gradienti electrici care afectează miocardul. Nivelurile crescute de catecolamine, stresul oxidativ și mutațiile genetice pot declanșa aritmii ventriculare maligne (4). Daunele endoteliale asociate

stresului oxidativ pot conduce la ateroscleroză și vasospasm, care duc la ischemie miocardică și infarct.

1.4 Ischemia miocardică și infarctul miocardic acut

Ischemia miocardică

Ischemia miocardică reprezintă o insuficiență de oxigen la nivelul mușchiului cardiac, care poate fi reversibilă, spre deosebire de infarctul miocardic acut, care implică necroza. Ca și factori ce pot întârzia deteriorarea ireversibilă a cardiomiocitelor au fost descriși blocanții canalelor de calciu (5).

Infarctul miocardic

Infarctul miocardic implică necroza țesutului miocardic și este clasificat clinic în cinci tipuri, cele mai frecvente fiind tipul unu (ruptură de placă aterosclerotică) și tipul doi (dezechilibru între aportul și cererea de oxigen). Tipul unu este responsabil pentru aproximativ 60% din cazuri (6), iar tipul doi este mai frecvent la femei, vârstnici și cei cu comorbidități multiple. O de clasificare histopatologică ghidată de clasificarea clinică a fost efectuată de Asociația Europeană de Patologie Cardiovasculară (7).

1.4.1 Infarctul miocardic cauzat de tromboza coronariană acută

Tromboza coronariană acută este recunoscută ca principala cauză a infarctului miocardic, fiind responsabilă pentru aproximativ 60% din cazurile de infarct miocardic acut (6). Fiziopatologic, pe măsură ce ateroscleroza progresează, striurile aterosclerotice evoluează către plăci mai avansate, ducând în cele din urmă la blocarea arterelor și încetinirea fluxului sanguin. Studii recente au demonstrat că, înainte de aderarea trombocitelor la nivelul plăcii de aterom rupte, are loc depunerea fibronectinei plasmatice și a altor proteine la nivelul plăcii. Acest proces a fost identificat recent ca un mecanism ce precede adeziunea trombocitelor. După ruptura plăcii aterosclerotice, proteinele componente ale matricei lipidice, printre care colagenul, factorul von Willebrand (FVW), fibrinogenul și fibronectina, determină un răspuns rapid al trombocitelor. Ulterior acestui mecanism se produce adeziune, activarea și agregarea, trombocitelor. Acest lucru poate duce la ocluzia parțială sau completă a vasului, ducând la evenimente ischemice și ulterior la infarct miocardic (8).

1.4.2 Infarctul miocardic acut cauzat de dezechilibrul dintre cererea și oferta de oxigen la nivelul țesutului miocardic

Infarctul miocardic clasificat clinic ca infarct miocardic de tip II rezultă din ischemia prelungită cauzată de un dezechilibru între cererea și oferta de oxigen, altul decât cel de cauză trombotică. Acest mecanism poate fi determinat de diverși factori, inclusiv patologie sistemică, cardiacă sau coronariană, care pot compromite echilibrul între cererea și oferta de oxigen către

miocard (9). Acest mecanism include și ateroscleroza coronariană fără tromboză acută, cât și boli coronariene non-aterosclerotice relativ rare, cum ar fi spasmul, disecția spontană sau embolizarea coronariană (10). Cauzele care perturbă echilibrul dintre cerere și ofertă pot fi clasificate pe baza creșterii cererii miocardice de oxigen sau a scăderii aportului la nivelul miocardului (11-13).

1.4.2.1 Infarctul miocardic acut ca urmare a scăderii aportului de oxigen la nivelul țesutului miocardic

Ateroscleroza implică acumularea de lipide și țesut fibros pe pereții arteriali, conducând la reducerea fluxului sanguin și la ischemie miocardică etapă premergătoare infarctului miocardic (14). Spasmul arterelor coronare reprezintă o constricție intensă a vaselor coronariene, care poate duce la ocluzie parțială sau totală, rezultând o ischemie acută. De obicei, apare în contextul aterosclerozei, dar poate afecta și vase coronariene normale. Mecanismele includ hiperreactivitatea mușchilor netezi, disfuncția endotelială și deficiența de magneziu. Stresul fizic și mental, precum și substanțele vasoconstrictoare sunt factori declanșatori(15-17). Disecția spontană a arterei coronare poate duce la infarct miocardic acut prin ruperea endoteliului vascular, afectând fluxul sanguin. Disecția aortică de tip A se poate extinde în arterele coronare. Embolia coronariană, care poate apărea din cauza fibrilației atriale, cardiomiopatiilor sau endocarditei, obstrucționează fluxul coronarian, provocând ischemie și infarct. Șocul, fie că este hipovolemic, cardiogen sau septic, reduce perfuzia coronariană, provocând ischemie și infarct. Embolia pulmonară poate cauza ischemie miocardică prin creșterea presiunii ventriculului drept, ducând la infarct (18).

1.4.2.2 Infarctul miocardic acut cauzat de creșterea cererii de oxigen poate avea multiple cauze, fiecare contribuind la suprasolicitarea miocardului.

Aritmiile, în special tahiaritmiile, cresc cererea de oxigen la nivelul inimii și sunt o cauză frecventă a infarctului de tip II (10). În cazurile de cardiomiopatie hipertrofică și stenoză aortică, hipertrofia ventriculară stângă determinată de acestea crește semnificativ cererea de oxigen, contribuind la ischemie (19). Insuficiența renală cronică crește riscul de infarct prin acumularea de lichide, hipertrofie ventriculară și disfuncție endotelială (20). Cardiomiopatia Takotsubo, adesea indusă de stres fizic sau emoțional, declanșează o creștere temporară a cererii de oxigen, provocând ischemie. Talasemiile și anemia falciformă pot obstrucționa microcirculația coronariană, provocând crize vaso-ocluzive și infarct. De asemenea, cazuri rare de infarct miocardic de tip II sunt asociate cu embolii, sarcina sau afecțiuni gastrointestinale (21).

2. Markeri imunohistochimici de identificare a ischemiei și necrozei miocardice

2.1 Markeri imunohistochimici ai sistemului complement

Complexul C5b-9, denumit și complex complement terminal sau complex de atac membranar. Acest marker este recunoscut ca un standard de referință în evaluarea leziunilor ischemice. Acest marker are o sensibilitate crescută ce face ca C5b-9 să fie detectabil după aproximativ 40 de minute de la debutul ischemiei studiile au demonstrat o corelație între expresia C5b-9 și severitatea ischemiei miocardice. De asemenea, componentele C1, C3, C8 și C9 joacă un rol important în inflamația asociată infarctului miocardic. C1 și C3 sunt activi în primele faze ale ischemiei iar C8 și C9 apar în etapa finală de activarea a complementului (22).

2.2 Markeri imunohistochimici mediatori ai inflamației

Inflamația joacă un rol esențial în patogeneza infarctului miocardic, contribuind semnificativ la agravarea leziunilor cardiace. Galectina-3 este un marker asociat cu inflamația și fibroză, fiind activ în perioadele ischemice. Studiile indică o corelație între infiltrarea macrofagelor pozitive pentru Galectina-3 și progresia fibrozei în infarctul miocardic (23). Imunohistochimia permite vizualizarea localizării și intensității expresiei IL-1 β , IL-6 și IL-15 în țesutul miocardic ischemic (24). Markerii precum CD15, CD18 și triptaza sunt prezenți în timpul ischemiei și necrozei, fiind detectabili în stadiile incipiente ale leziunilor cardiace.

2.3 Markeri imunohistochimici specifici proteinelor cardiomiocitelor

Desmina, alfa-actinina și vinculina sunt proteine esențiale pentru menținerea structurii cardiomiocitelor, iar degradarea lor în timpul ischemiei indică afectarea severă a structurii celulare. H-FABP (proteina care leagă acizii grași) este un marker sensibil pentru ischemia miocardică, considerat superior markerilor, cum ar fi creatinkinaza și mioglobina.

Troponinele cardiace (I și T) sunt markeri esențiali pentru diagnosticarea infarctului miocardic, variațiile lor imunoreactive fiind detectabile la o oră după infarct. Zonula occludens-1 joacă un rol în menținerea joncțiunilor celulare și a activității electrice a cardiomiocitelor, fiind un marker utilizat pentru a detecta ischemia miocardică. Conexina-4 formează canalele joncțiunilor gap, facilitând activitatea electrică între cardiomiocite și este considerată un marker sensibil pentru ischemia miocardică. Peptidele natriuretice, inclusiv peptida natriuretică de tip B (BNP), sunt markeri pentru stresul cardiac și insuficiența cardiacă, fiind folosiți pentru evaluarea ischemiei (2).

2.4 Markeri imunohistochimici specifici proteinelor plasmatice și necrozei miocardice

Fibronectina este unul dintre primii markeri care pot fi detectați în ischemia miocardică, jucând un rol important în evaluarea extinderii necrozei (25). S100A1, un marker sensibil, devine vizibil la scurt timp după debutul ischemiei și este deosebit de util în evaluările medico-legale. Prezența sa indică afectarea miocardică timpurie, permițând o evaluare precisă a evenimentelor ischemice (26).

2.5 Markeri imunohistochimici specifici hipoxiei

HIF1-alfa este un marker de hipoxie care poate fi detectat prin imunohistochimie în cazurile de infarct miocardic, fiind strâns legat de răspunsul organismului la ischemie. Expresia sa crește în condiții de oxigen scăzut, contribuind la adaptarea celulelor la stresul ischemic (27). Galectina-1, de asemenea un marker de hipoxie, prezintă o depleție rapidă după debutul ischemiei (28)

2.6 Markeri imunohistochimici specifici de destabilizare a plăcii aterosclerotice

Metaloproteinazele matriceale, cum ar fi MMP-9, sunt implicate în degradarea matricei extracelulare și au un rol esențial în destabilizarea plăcilor aterosclerotice, contribuind la progresia bolii cardiovasculare și la riscul de infarct. Mieloperoxidaza este un marker inflamator important, asociat atât cu destabilizarea plăcilor aterosclerotice, cât și cu remodelarea cardiacă post-infarct. Prezența sa indică activarea proceselor inflamatorii și contribuie la evoluția ischemiei.(29)

2.7 Markeri imunohistochimici specifici apoptozei

Apoptoza este un proces esențial în necroza miocardică. Markerii precum BCL2 și caspaza-3 sunt implicați în detectarea apoptozei în țesuturile miocardice afectate (30, 31).

II. CONTRIBUȚII PERSONALE

3. Ipoteza de lucru/Obiective

Premisele acestei lucrări au pornit de la observația că, în cazul decesului subit de cauză cardiacă, diagnosticul de infarct miocardic acut poate să fie omis în timpul examinării histopatologice microscopice. Semnele microscopice de ischemie pot să nu fie evidente dacă pacientul nu a supraviețuit suficient de mult timp de la debutul ischemiei, etapa premergătoare infarctului miocardic acut. Utilizarea IHC poate ajuta la detectarea ischemiei chiar și în primele minute de la debut, înainte ca modificările să fie vizibile prin colorație H&E.

Scopul acestei lucrări a fost de a realiza o analiză cuprinzătoare a datelor existente în literatura de specialitate, până în prezent, referitoare la ischemia miocardică și infarctul miocardic acut, cu un accent deosebit pe aspectele anatomopatologice și pe markerii IHC cunoscuți pentru detectarea ischemiei și a IMA.

Obiective:

- Evaluarea datelor existente în literatura de specialitate cu privire la ischemia miocardică și infarctul miocardic acut, centrată pe aspectele anatomopatologice.
- Evaluarea datelor existente în literatura de specialitate referitoare la markerii imunohistochimici cunoscuți pentru detectarea ischemiei și a infarctului miocardic acut.
- Realizarea unei analize statistice retrospective privind importanța numărului de cazuri de moarte subită cardiacă întâlnite în laboratoarele de prosectură medico-legală, având ca scop obiectivarea diagnosticelor finale de deces raportate în cadrul investigațiilor medico-legale în cazurile de moarte subită cardiacă.
- Realizarea unei clasificări a markerilor imunohistochimici pentru detectarea ischemiei miocardice și a infarctului miocardic acut în funcție de mecanismul implicat și/sau localizarea markerilor la nivelul cardiomiocitelor.
- Investigarea unor potențiali noi markeri ai ischemiei miocardice și infarctului miocardic acut, cum ar fi proteinele ATP1A3 și PKP2, localizate în intracelular și la discurile intercalare ale cardiomiocitelor, care prezintă specificitate și sensibilitate ridicată.

4. Metodologie generală a cercetării

Designul studiilor și culegerea datelor

Studiul 1 a fost de tip observațional retrospectiv, desfășurat pe o perioadă de 3 ani (2021-2023). Studiul 2 a fost un review sistematic. Studiul 3 a fost de tip observațional retrospectiv, desfășurat pe o durată de 4 ani (2020-2023).

Datele utilizate pentru studiile efectuate au fost colectate din:

Studiul 1 și 3: realizate pe baza datelor și cazurilor medico-legale ale Serviciului Județean de Medicină Legală Maramureș.

Studiul 2: realizat cu baza de date PubMed, Scopus, Science Direct, American Chemical Society, Springer, ProQuest și Wiley. Cercetarea de față respectă Declarația de la Helsinki.

Locația și infrastructura de cercetare

Studierea bazei de date s-a realizat la sediul Serviciului Județean de Medicină Legală Maramureș. Lamelele colorate cu hematoxină-eozină din cazurile incluse în studiul 3 au fost revizuite de un anatomopatolog în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Maramureș. Colorația imunohistochimică a fost realizată în cadrul laboratorului Spitalului MedLife Humanitas din Cluj-Napoca.

Markeri imunohistochimici utilizați

Au fost achiziționați 3 anticorpi:

Anti-ATP1A3 antibody [XVIF9-G10] ab2826, cantitate 100μg, concentrație 0.1 mg/mL (ABCAM);

Anti-Plakophilin 2/PKP2 antibody ab189323, cantitate 100μg, concentrație 0.1 mg/mL (ABCAM);

Anti-C5b-9 antibody ab55811, cantitate 100μg, concentrație 0.5 mg/mL (ABCAM).

Procedura de colorare imunohistochimică a fost cea recomandată de producător.

Analiza statistică

Analiza statistică descriptivă a fost realizată cu ajutorul pachetelor statistice Microsoft Office 2010 și a programului SPSS 17. Pentru analiza descriptivă, s-au folosit mai multe variabile și testul Chi-pătrat, iar pentru corelațiile imunohistochimice s-a folosit testul de corelație Pearson și ROC.

5. STUDIUL I: Analiză statistică a cauzelor de deces și a diagnosticului histopatologic în investigațiile medico-legale din cadrul mortilor subite cardiace

5.1 Ipoteza de lucru și obiective specifice

Decesele subite de cauză cardiacă sunt în creștere la nivel global, fiind asociate cu multiple cauze. Anual, aproximativ 350.000 de persoane în Europa și între 300.000 și 400.000 de persoane în Statele Unite decedează ca urmare a unei patologii asociate MSC. Cauzele principale includ ateroscleroza coronariană avansată, infarctul miocardic acut, aritmiile, cardiomiopatiile, spasmele arterelor coronare și dezechilibrele electrolitice .

Premisele acestui studiu se bazează pe observația că multe cazuri de infarct miocardic acut rămân nediagnosticate, deși acest diagnostic ar trebui să fie frecvent stabilit. Această situație poate fi explicată prin faptul că un infarct miocardic incipient poate fi omis ca diagnostic dacă pacientul nu a supraviețuit suficient de mult pentru ca modificările microscopice și, ulterior, cele macroscopice să devină evidente.

Scopul studiului de față este de a investiga fondul patologic al pacienților decedați în contextul morții subite cardiace și de a efectua o analiză statistică descriptivă a cazurilor întâlnite.

Obiective:

- Realizarea unei analize statistice a cauzelor de deces înregistrate în perioada 2021-2023, folosind baza de date a Serviciului Județean de Medicină Legală Maramureș, în contextul cazurilor de MSC.
- Efectuarea unei analize statistice a diagnosticelor microscopice întâlnite în cazurile de MSC pentru a identifica tiparele și frecvența acestora.

5.2 Material și metodă

Criterii de colectare și includere a datelor

Acest studiu a fost de tip observațional descriptiv, care a investigat cauzele patologice cardiace ce au determinat decesul și diagnosticul histopatologic asociat cu MSC în perioada 2021-2023. Cazurile analizate provin din diverse regiuni ale județului Maramureș, România, și au inclus toate cazurile de moarte subită cardiacă raportate în această perioadă.

Criteriile de excludere au vizat cazurile în care examenele toxicologice au evidențiat prezența substanțelor de abuz sau a intoxicațiilor acute, precum și cazurile în care, după efectuarea examenului histopatologic, s-a identificat o altă cauză de deces, care inițial fusese atribuită MSC. Aceste cazuri au fost eliminate din studiu, asigurându-se astfel includerea exclusivă a cazurilor de MSC, ceea ce a permis o evaluare precisă a fondului patologic cardiac asociat MSC.

Dimensiunea eșantionului

În total, au fost efectuate 1.186 de autopsii în perioada 2021-2023 în cadrul Serviciului Județean de Medicină Legală Maramureș. Numărul de autopsii pe fiecare an este următorul: 417 în 2021, 394 în 2022 și 375 în 2023. Dintre acestea, 126 de cazuri în 2021, 89 de cazuri în 2022 și 61 de cazuri în 2023 au fost identificate ca morți subite cardiace. Astfel, eșantionul de studiu a constat din 276 de cazuri de moarte subită cardiacă, care constituie baza de date a acestui studiu.

Examen histopatologic

Fiecare caz inclus în studiu a fost supus unei examinări histopatologice microscopice detaliate a țesutului miocardic, unele cazuri incluzând multiple fragmente de țesut miocardic recoltate din diferite zone ale miocardului. Majoritatea lamelor examinate provin de la nivelul ventriculului stâng.

Diagnosticile histopatologice microscopice au fost clasificate în cinci grupuri distincte pentru a facilita analiza statistică:

1. Leziuni miocardice: Include cazuri de tromboză coronariană acută (leziune indirectă miocardică), infarct miocardic acut, infarct miocardic în faza de organizare a țesutului conjunctiv și infarct miocardic vechi (cicatricial).
2. Fibroză miocardică avansată (FMA): Cuprinde toate cazurile în care a fost observată fibroză miocardică avansată.
3. Lipomatoză: Caracterizată prin acumularea anormală de celule adipoase în interiorul țesutului miocardic.
4. Ateroscleroză coronariană: Include cazurile cu ateroscleroză coronariană avansată.
5. Cardiomiopatie: include cazuri de cardiomiopatie dilatată și hipertrofică.

Diagnosticile finale ale rapoartelor medico-legale (2021-2023) în caz de moarte subită cardiacă întâlnite în cadrul prosecturii se pot încadra în una dintre cele șase categorii. Aceste diagnostice au fost susținute de examinările histopatologice microscopice și sunt printre cele mai des întâlnite în cazurile de MSC.

1. IMA: Modificările histologice apar între 6 și 12 ore după eveniment, prima modificare fiind necroza coagulativă. După necroză, un aflux de neutrofile este observat în intervalul 12-24 de ore. Carioliza se produce între zilele 1 și 3, fagocitoza de către macrofage între zilele 3 și 7, iar formarea țesutului de granulație la margini are loc ulterior (12).
2. Fibroză miocardică avansată (MFA): Acest diagnostic este adesea unul de excludere, utilizat atunci când nicio altă patologie cardiacă nu poate explica cauza morții. Fibroza miocardică apare într-o multitudine de patologii cardiace de cauză ischemică sau non-ischemică, cum ar fi hipertensiunea arterială, cardiomiopatia dilatativă, ateroscleroza coronariană, miocardita etc. (32). Fiziopatologic, fibroza avansată poate duce la apariția unei aritmii ventriculare care să conducă la deces (33, 34). MFA se caracterizează prin creșterea activității miofibroblastelor cu depunerea de colagen la nivelul matricei extracelulare (35).
3. Infarct miocardic cicatricial (IMC): Formarea completă a cicatricei miocardice durează aproximativ 2 luni. Cel mai adesea, această patologie cardiacă duce la deces prin apariția unei aritmii ventriculare. Infarctul miocardic vechi este asociat și cu cardiomiopatia dilatativă post-infarct miocardic (12).
4. Cardiomiopatie dilatată (CMD): Aceasta include dilatarea atriilor și a ventriculelor, împreună cu restul modificărilor patologice asociate acestei afecțiuni (36).
5. Hipertrofie cardiacă (HC): Macroscopic, se observă o îngroșare a peretelui ventricular stâng în majoritatea cazurilor. Cauzele hipertrofiei ventriculare stângi sunt multiple: hipertensiunea arterială, patologii valvulare, amiloidoza etc. Microscopic, se observă nuclei măriți în volum cu dezorganizarea arhitecturii miocitelor hipertrofiate, care apar ramificate și pot fi însoțite de o cantitate variabilă de fibroză interstițială (37).
6. Ateroscleroză coronariană (ATSC): Această categorie include îngustarea vaselor coronare din cauza plăcilor aterosclerotice, care pot conduce la reducerea fluxului sanguin și, în final, la moarte subită cardiacă (38).

Analiza statistică

Datele au fost introduse în tabele în programul Excel și analizate ulterior prin utilizarea statisticilor descriptive și a altor tehnici analitice. Pentru a evalua diferențele statistice dintre diverse grupuri, a fost folosit testul Chi-pătrat, acesta fiind deosebit de util în analiza datelor pe categorii, cum ar fi diferențele între diagnosticele de deces în funcție de sex (39). De asemenea, a fost utilizat testul AMOVA unifactorial pentru a examina diferențele de

vârstă medie între diferitele diagnostice de deces, ajutând la determinarea dacă variațiile de vârstă au avut un impact semnificativ asupra prevalenței diferitelor patologii cardiace (40).

Interpretarea datelor

Rezultatele au fost prezentate prin tabele și reprezentări grafice, permițând interpretarea clară a diagnosticelor de deces în MSC și a diagnosticelor microscopice asociate MSC. Această abordare a permis o înțelegere aprofundată a fondului patologic și a tendințelor asociate cu cazurile de MSC în populația studiată.

5.3 Rezultate

Pe parcursul anilor 2021, 2022 și 2023, Serviciul Județean de Medicină Legală Maramureș a efectuat un total de 1.186 de autopsii, incluzând atât decese traumatiche, cât și netraumatice. Dintre acestea, 276 de cazuri au fost atribuite morții subite cardiace. Aproximativ 23% din toate autopsiile, care includ decese traumatiche și netraumatice, s-au datorat MSC (Figura 5.1). A doua reprezentare grafică ilustrează proporțiile dintre totalul autopsiilor efectuate și cele atribuite MSC în anii 2021, 2022 și 2023.

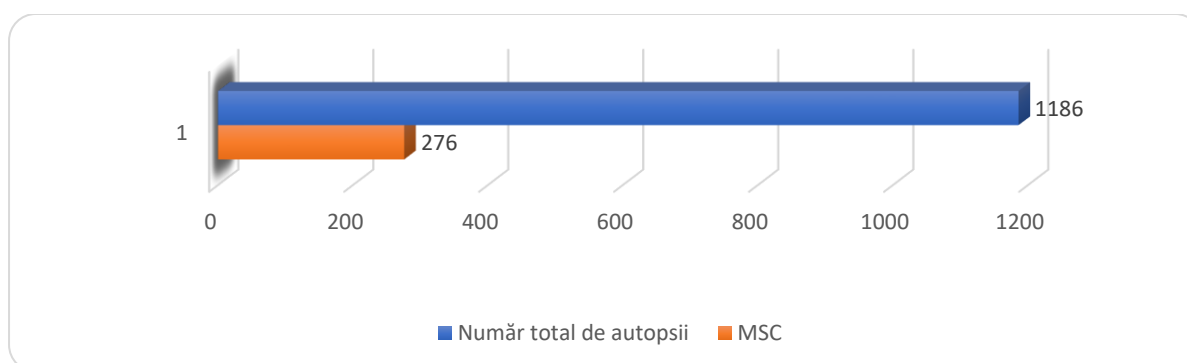


Figura 5.1: Grafic care arată numărul total de autopsii (albastru) și MSC (roșu) pe întreaga perioadă de studiu.

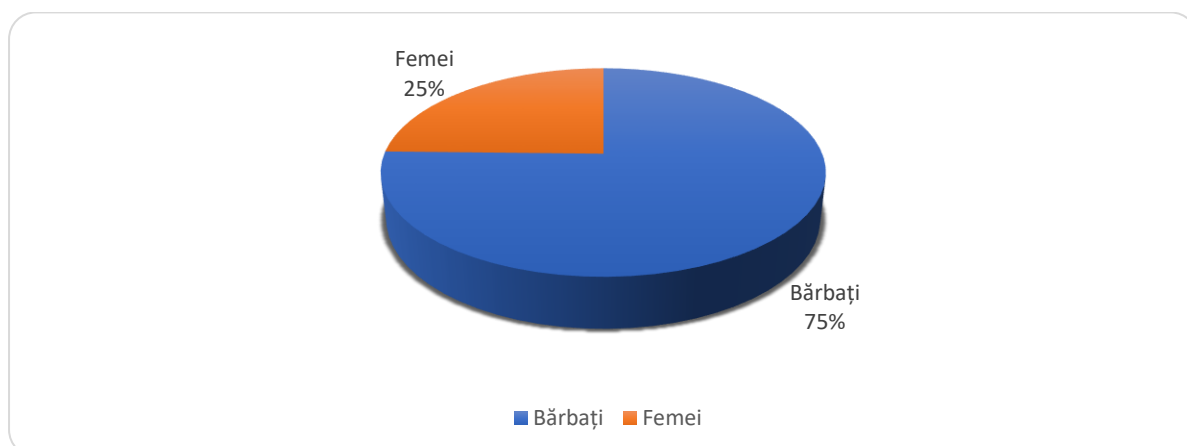


Figura 5.2: Grafic care arată distribuția de gen în rândul eșantionului de studiu.

Figura 5.2 ilustrează distribuția pe sexe a cazurilor de moarte subită cardiacă (MSC) pe toată durata studiului. Este de remarcă faptul că, decesele subite cardiace sunt aproximativ 75% bărbați (albastru) și 25% femei (roșu). Acest procent de distribuție pe sexe este consecvent în fiecare an 2021, 2022 și 2023.

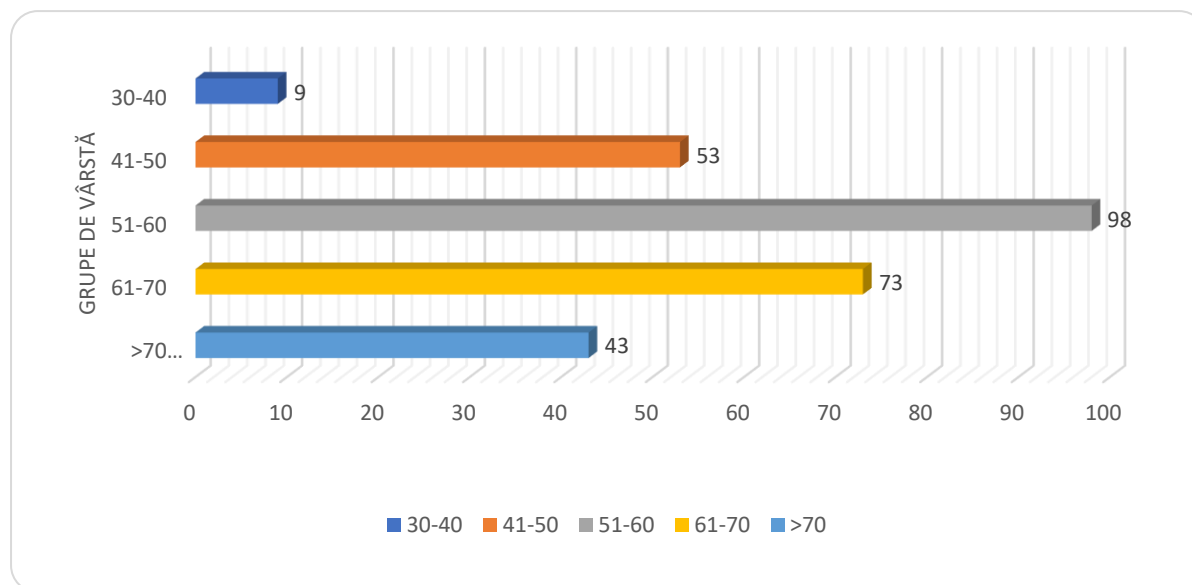


Figura 5.3: Grafic care arată numărul de cazuri pentru fiecare interval de vârstă.

Tabelul 5.1: Frecvențele diferitelor cauze de MSC pentru fiecare interval de grupă de vârstă.

Grupă de vârstă	MFA	IMA	ATSC	HC	CMD	IMC	Total
>70	22 (51%)	5 (11.65%)	6 (14%)	5 (11.65%)	3 (7%)	2 (4.7%)	43
30-40	2 (22.3%)	4 (44.4%)	1 (11.1%)	1 (11.11%)	0 (0%)	1 (11.1%)	9
41-50	21 (39.6%)	8 (15.1%)	9 (17%)	5 (9.4%)	10 (18.9%)	0 (0%)	53
51-60	38 (39%)	19 (19.2%)	20 (20.3%)	7 (7.2%)	12 (12.2%)	2 (2.1%)	98
61-70	32 (43.8%)	12 (16.4%)	14 (19.2%)	4 (5.5%)	10 (13.7%)	1 (1.4%)	73
Total	115	48	50	22	35	6	276

Procentul (%) reprezintă ponderea fiecărui diagnostic în fiecare grupă de vârstă.

Tabelul 5.1 prezintă o descriere detaliată a frecvențelor diferitelor cauze de moarte subită cardiacă (MSC) pe diferite intervale de vârstă. În cadrul setului de date, cea mai frecventă cauză a MSC pentru grupa de vârstă de peste 70 de ani a fost fibroza miocardică avansată (MFA), cu 22 de cazuri, contribuind semnificativ la totalul de 43 de cazuri din acest

interval de vârstă. Ce se mai poate observa că incidența IMA și a ATSC crește odată cu vârsta, în timp ce DCM nu se observă așa frecvent la grupele de vârstă înaintată.

Analiza datelor indică o schimbare a cauzelor predominante de MSC pe măsură ce vârsta crește, MFA fiind mai răspândită în rândul grupelor de vârstă mai înaintate. Numărul total al cazurilor arată că MFA este cauza cea mai frecventă în ansamblu, cu 115 cazuri din 276.

Tabelul 5.2: Analiza comparativă a cauzelor de moarte subită cardiacă în funcție de gen și vârstă.

<i>Diagnostic</i>	<i>Valori</i>	Bărbați	Femei	Total	P value
MFA	Frecvență pe gen (%)	38.46%	51.47%	41.67%	0.13
	Vârstă (M±SD)	58.4±10.4	64±11	60±10.9	0.4**
IMA	Frecvență pe gen (%)	20.19%	8.82%	17.39%	0.045***
	Vârstă (M±SD)	56±10	59.8±10.8	56.6±10	
ATSC	Frecvență pe gen (%)	15.87%	25.00%	18.12%	0.09
	Vârstă (M±SD)	57.2±9.6	62.2±11	58.9±11.3	
HC	Frecvență pe gen (%)	9.62%	2.94%	7.97%	0.12
	Vârstă (M±SD)	58.75±11.7	67±18.4	59.5±12	
CMD	Frecvență pe gen (%)	13.46%	10.29%	12.68%	0.53
	Vârstă (M±SD)	55.35±8.9	63±14.3	56.9±10.5	
IMC	Frecvență pe gen (%)	2.40%	1.47%	2.17%	0.39
	Vârstă (M±SD)	55.6±13.6	72	58.3±13.9	

** Valoarea P din ANOVA unifactorial, care nu arată diferențe semnificative în vârstele medii între cele șase grupuri (MFA, IMA, ATSC, HC, CMD și IMC).
*** Indică o diferență semnificativă între bărbați și femei în ceea ce privește frecvența AMI, în favoarea bărbaților.

Tabelul 5.2 prezintă o analiză comparativă a morții subite cardiace în funcție de sex și vârstă. Datele arată că bărbații se confruntă cu o frecvență mai mare a IMA comparativ cu femeile, cu o diferență semnificativă observată (20,19% la bărbați față de 8,82% la femei, $p = 0,045$). Alte cauze ale MSC (HC, CMD și IMC) au arătat diferențe mai mari la sexul masculin comparativ cu cel feminin, dar fără semnificație statistică. În schimb, sexul feminin prezintă o frecvență mai mare a (ATSC) (25,00%) comparativ cu sexul masculin (15,87%) și o frecvență mai mare a MFA (51,47%) comparativ cu bărbați (38,46%), deși această diferență este ne semnificativ statistic ($p = 0,09$). Vârsta medie la care apare fiecare condiție variază, fără diferențe semnificative găsite în vârsta medie între grupuri ($p = 0,4$), obținută prin testul ANOVA unifactorial. În ciuda acestor variații, tendința generală indică faptul că ambele sexe sunt afectate de cauze diferite de moarte subită cardiacă la vârste diferite, IMA fiind mai răspândită la bărbați și ATSC mai frecventă la femei.

5.4 Discuție

Moartea subită cardiacă este definită ca moartea care se presupune a fi de origine cardiacă care are loc în decurs de 1 oră de la debutul simptomelor cardiace sau la 24 de ore de la ultima observare a persoanei în stare de sănătate aparentă (41).

Prin urmare, stabilirea unor definiții universale valabile ar ajuta și ghida spre încadrarea mai precisă și realizarea unor studii mai exacte în ceea ce privește MSC. Un protocol național ar facilita o codificare mai precisă a cazurilor de MSC la care s-a efectuat autopsie medico-legală sau anatomopatologică.

După cum am observat în studiu, decesele subite cardiace (MSC) reprezintă aproximativ 23% din toate autopsiile medico-legale efectuate în regiune între 2021 și 2023, cu o apariție predominantă la sexul masculin (75%). Populația studiată reflectă îndeaproape tendința globală a unei predispoziții masculine mai mari de a dezvolta o patologie ce duce la moarte subită cardiacă (42).

Fibroza miocardică avansată (MFA) a apărut ca cea mai frecventă cauză de MSC, în special în rândul grupelor de vârstă mai înaintată, constituind 41,6% din cazuri. Alte cauze semnificative IMA și ATSC, cu IMA mult mai frecvent la sexul masculin (20,19%) comparativ cu sexul feminin (8,82%), diferență care a atins semnificație statistică ($p = 0,045$).

Grupa de vârstă 51-60 a arătat cea mai mare prevalență a tuturor cauzelor de MSC. Acest lucru este în concordanță cu alte studii care au raportat constatări similare (43-45). A doua grupă de vârstă cu cel mai mare număr de pacienți este grupa de 61-70 de ani.

Pacienții din aceste grupe de vârstă trebuie evaluați pentru modificările stilului de viață, schimbările în rutinele zilnice și alți factori care pot fi modificați pentru a scădea susceptibilitatea la boli care pot duce la MSC.

MFA a fost diagnosticul cel mai răspândit în toate grupele de vârstă, cu excepția grupului de vârstă între 31 și 40 de ani în această grupă de vârstă IMA a înregistrat cea mai mare prevalență (44,4%). Aceste constatări subliniază importanța luării în considerare atât a sexului, cât și a vârstei în înțelegerea și prevenirea MSC.

Mulți factori de risc au fost identificați în contextul MSC, inclusiv toți factorii de risc pentru bolile cardiovasculare aterosclerotice (BCV), hipertrofia ventriculară stângă și patologii genetice. Riscul MSC a fost raportat a fi relativ scăzut în populațiile cu incidență mai mică de BCV și boli cardiace structurale.

Conform literaturii de specialitate, boala coronariană, incluzând ateroscleroza coronariană, este considerată responsabilă pentru majoritatea cazurilor de MSC (46).

În studiul de față a rezultat ca fibroza miocardică este principala cauză de deces în MSC. Fibroza miocardică poate să apară independent de boala aterosclerotică coronariană și reprezintă o leziune ce se întâlnește la multiple alte patologii cardiace. În acest studiu de față ATSC a reprezentat doar 18% din cazurile de MSC. Această situație poate fi explicată și prin utilizarea frecventă a diagnosticului de excludere de fibroză miocardică, precum și prin omisiunea unor cazuri de infarct miocardic acut, în care leziunile microscopice nu sunt evidente. Această subdiagnosticare poate duce la o statistică incompletă a cauzei MSC. Această controversă histopatologică poate fi explicată prin mai mulți factori. Dacă decesul survine imediat după debutul ischemiei, aceasta nu poate fi obiectivată prin microscopie în colorația uzuală H&E. În plus, microinfarctele pot fi omise în timpul autopsiei de rutină, mai ales dacă sunt în zone cicatriciale sau în zone cu fibroza miocardică avansată.

MSC poate rezulta, de asemenea, din factori declanșatori non-ischemici, cum ar fi aritmiile din anumite canalopatii genetice.

După cum s-a raportat în studiul nostru, cea mai frecventă cauză de deces și diagnostic microscopic observată în autopsiile în moartea subită cardiacă a fost MFA. Fibroza cardiacă este un proces de remodelare patologică a matricei extracelulare, care afectează funcția miocardului. Fibroza mușchiului cardiac apare cel mai frecvent după infarctul miocardic; cu toate acestea, există diverse alte afecțiuni care au potențialul de a promova fibroza cardiacă,

cum ar fi boala cardiacă hipertensivă, miocardita, stenoza aortică, hipertensiunea pulmonară, fibrilația atrială, cardiomiopatia hipertrofică diabetică și cardiomiopatia dilatativă idiopatică (34, 47).

Boala cardiacă ischemică implică scăderea aportului de sânge din cauza aterosclerozei care duce la fibroză; hipertensiune arterială cronică poate tensiona miocardul și poate duce la modificări structurale; cardiomiopatiile sunt diverse afecțiuni ale miocardului care afectează funcția și duc la fibroză; miocardita este o inflamație cauzată de infecții sau afecțiuni autoimune, care are ca rezultat fibroză pe măsură ce țesutul se vindecă; cardiomiopatie hipertrofică diabetică; stenoza aortică; hipertensiune pulmonară; fibrilație atrială; expunerea la agenți cardiotoxici; îmbătrânirea duce în mod natural la acumularea de țesut fibros; tulburările genetice predispun indivizii la fibroză din cauza mutațiilor care afectează proteinele mușchiului cardiac. Acest diagnostic al fibrozei miocardice avansate (scleroza miocardică) este utilizat frecvent în cazurile de MSC în România.

Este bine stabilit că ateroscleroza este principala cauză de deces în bolile cardiovasculare și că infarctul miocardic cel mai frecvent apare ca o complicație a aterosclerozei coronariene (48, 49).

Cu toate acestea, analiza noastră statistică a arătat că cea mai frecventă cauză de deces în diagnosticul cardiac și microscopic este fibroza miocardică difuză avansată. Este important de subliniat că acest diagnostic este unul de excludere, utilizat doar atunci când nicio altă patologie cardiacă nu poate explica cauza morții.

Imunohistochimia este o metodă prin care se poate stabili un diagnostic mai precis în cazurile în care se suspicionează o ischemie miocardică, etapa premergătoare infarctului miocardic. În cazurile cu implicații legale semnificative, se recomandă utilizarea imunohistochimiei pentru a determina prezența și amploarea ischemiei la nivelul miocardului.

Examinările macroscopice și microscopice efectuate în cazurile de MSC sunt esențiale pentru o mai bună înțelegere a patologiei cardiace subiacente. Moartea subită cardiacă reprezintă o amenințare majoră pentru orice persoană, datorită naturii sale imprevizibile și a dificultății de a fi detectată și prevenită în mod eficient. Aceste investigații contribuie semnificativ la clarificarea cauzelor ascunse și la dezvoltarea unor strategii preventive adecvate.

O abordare multidisciplinară cu cercetare bazată pe dovezi este necesară pentru a îmbunătăți și mai mult capacitățile de diagnosticare în cazurile de MSC. De asemenea, este larg acceptat faptul că factorii genetici joacă un rol esențial în incidența MSC. Prin urmare,

devine o necesitate evaluarea bazei genetice a deceselor subite cardiace cu ajutorul laboratoarelor de genetică (50-52).

Deși acest studiu oferă informații valoroase asupra epidemiologiei și patologia morții MSC în județul Maramureș, România, studiul prezintă limitări.

Laboratorul de histopatologie al Serviciului Județean de Medicină Legală nu dispune infrastructura necesară pentru a efectua tehnici de imunohistochimie. Această limitare poate conduce la subdiagnosticarea infarctelor miocardice. Implementarea tehnicilor imunohistochimice ar îmbunătăți considerabil precizia diagnosticului în astfel de cazuri. De asemenea, studiul nu ia în considerare prezența comorbidităților sau a altor factori care pot contribui la MSC. Includerea acestor date ar permite o analiză mai detaliată și concludentă, oferind o perspectivă mai completă asupra cauzelor multiple care pot influența MSC. Dimensiunea eșantionului, deși semnificativă, este limitată la o anumită zonă geografică și interval de timp, ceea ce poate afecta generalizarea rezultatelor la alte regiuni. În plus, factorul uman poate juca un rol important în diagnosticarea MSC, experiența profesională influențând acuratețea diagnosticului final. Prin urmare, standardizarea procedurilor la nivel național ar minimiza impactul factorului uman în diagnosticarea MSC.

5.5 Concluzie

După cum s-a observat în analiza statistică efectuată în regiune, există o tendință care se aliniază cu alte studii care indică faptul că populația masculină este mai afectată de MSC, în special în intervalul de vârstă 50-60 de ani. O perspectivă nouă adusă de acest studiu se referă la utilizarea frecventă a FMA ca și principală cauză de deces, aspect ce poate rezulta din limitările examenului histopatologic microscopic în colorația uzuală de hematoxilina eozină. Acest aspect subliniază necesitatea elaborării unor protocoale de diagnostic îmbunătățite, inclusiv integrarea markerilor imunohistochimici specifici pentru ischemie, cu scopul de a crește acuratețea investigațiilor postmortem.

Având în vedere natura complexă a MCS, este vital să se dezvolte protocoale standardizate care implică și tehnici de imunohistochimie și genetice. O astfel de abordare ar putea oferi diagnostice mai precise și o mai bună înțelegere a mecanismelor de bază ale MCS.

Scopul final al acestei cercetări este nu numai de a îmbunătăți acuratețea diagnosticelor MCS, și de a deschide calea pentru strategii mai bune de prevenire. Această cercetare reprezintă un apel pentru integrarea imunohistochimiei în diagnosticul histopatologic microscopic pentru o evaluare mai precisă a patologiei MSC.

6. STUDIUL II: Noi perspective asupra expresiei markerilor imunohistochimici în recunoașterea post-mortem a infarctului miocardic

6.1 Ipoteza de lucru și obiective specifice

Imunohistochimia joacă un rol esențial în detectarea infarctului miocardic prin utilizarea markerilor specifici în analiza histologică a cardiomiocitelor. Acești markeri permit identificarea modificărilor moleculare și structurale care apar în cardiomiocitele ischemice sau după instalarea necrozei. Prin evidențierea proteinelor specifice asociate cu necroza și inflamația celulară, imunohistochimia oferă un instrument precis pentru diagnosticarea precoce și evaluarea extinderii leziunilor miocardice, contribuind astfel la acuratețea diagnosticului.

Premisele acestui studiu au fost stabilite în urma dificultății întâmpinate în identificarea particularităților markerilor IHC în literatura de specialitate. O sinteză actualizată a markerilor, bazată pe sensibilitatea și specificitatea lor, este esențială pentru a selecta markerul adecvat în funcție de particularitățile fiecărui caz. Această problemă este amplificată de caracterul fragmentat al informațiilor disponibile în literatura de specialitate, ceea ce complică procesul de diagnosticare și evaluare a ischemiei miocardice în diferite contexte patologice. Lipsa unei sinteze coerente a datelor privind markerii specifici pentru ischemie miocardică post mortem face dificilă aplicarea unor protocoale clare în practica medico-legală și anatomo-patologică. Acest lucru subliniază necesitatea unor studii mai ample și detaliate care să clarifice rolul markerilor imunohistochimici. O mai bună înțelegere a acestor variabile ar permite nu doar o evaluare mai precisă a IMA dar și dezvoltarea unor metodologii de diagnostic mai eficiente, adaptate fiecărui tip de caz. în diagnosticul post-mortem. Progresele continue în utilizarea markerilor imunohistochimici pentru diagnosticarea ischemiei la nivelul cardiomiocitelor ne-au condus la realizarea unei analize sistematice (review) care să ofere o imagine detaliată asupra markerilor utilizați în detectarea ischemiei miocardice.

Scopul acestui studiu nu este doar de a prezenta cei mai relevanți markeri imunohistochimici, ci și de a-i clasifica în funcție de mecanismul implicat și/sau localizarea lor la nivelul cardiomiocitelor. Datele au fost sintetizate într-un tabel accesibil, care oferă o imagine clară asupra expresiei markerilor în funcție de: localizarea markerilor, timpul efectiv în care aceștia devin detectabili după debutul ischemiei și caracteristicile principale ale fiecărui marker, inclusiv specificitatea. Tabelul are ca scop sprijinirea medicilor anatomopatologi și legisti în alegerea markerilor adecvați pentru diagnosticarea a ischemiei miocardice etapă premergătoare infarctului miocardic acut. Prin urmare, acest studiu își propune să ofere o

sinteză cuprinzătoare, prezentând o perspectivă unificată asupra markerilor de ischemie miocardică și a modalităților de aplicare a acestora în diagnosticul post-mortem.

Obiective

- Identificarea markerilor direcți utilizați în imunohistochimie, precum și a celor secundari, implicați în detectarea ischemiei și a infarctului miocardic acut.
- Elaborarea unei clasificări a markerilor în funcție de mecanismul lor de acțiune.
- Crearea unui tabel care să includă particularitățile specifice markerilor utilizați în detectarea ischemiei și a IMA.

6.2 Material și metodă

Am realizat o analiză (review) de tip sistematic asupra studiilor publicate în domeniul imunohistochimiei, axată pe ischemia miocardică și infarctul miocardic acut.

Strategia de căutare

Am efectuat o căutare în bazele de date PubMed, Scopus, Science Direct, American Chemical Society, Springer și Wiley folosind cuvintele cheie ani, precum „Infarct Miocardic Acut,” „Ischemie,” „Hipoxie,” „Medicină Legală,” „OMS,” „detectie imunohistochimică,” „Patologie Medico-Legală,” „markeri,” „C5b-9,” „Troponină,” „CK-MB,” „GBPP” și „HIF”. Au fost incluse studii din ultimii 10-15 ani.

Textul complet al studiilor relevante identificate a fost evaluat, iar în final, am identificat peste 25 de markeri imunohistochimici folosiți în detecția ischemiei miocardice și infarctul miocardic acut.

6.3 Rezultate

În urma unei cercetării tip sistematic (review), au fost identificați mai mulți markeri asociați cu ischemia miocardică. Acești markeri includ proteine și alte molecule implicate în mod direct în mecanismele de răspuns celular la evenimentele ischemice și necrotice.

În Tabelul 6.1, markerii au fost clasificați în funcție de mecanismul lor de acțiune, oferindu-se o imagine clară asupra rolului specific pe care îl joacă în cascada patologică asociată ischemiei miocardice. Un aspect evidențiat a fost este timpul de reacție al fiecărui marker de la debutul ischemiei, precum și modul în care aceștia manifestă o expresie pozitivă sau suferă depleția la nivelul compartimentelor citoplasmatic, membranar sau nuclear. Particularitățile fiecărui marker, relevante din punct de vedere morfopatologic.

Aceste informații permit o mai bună înțelegere a dinamicii temporale și spațiale a markerilor în contextul ischemiei miocardice, oferind o bază solidă pentru evaluarea potențialului lor diagnostic.

Tabelul 6.1: Clasificarea și particularitățile markeri imunohistochimici utilizați pentru recunoașterea post-mortem a ischemiei și infarctului miocardic acut (2).

MARKER	DETECȚIE TIMPURIE OBSERVATĂ ÎN STUDII	EXPRESIA MARKERULUI	PARTICULARITĂȚI
<i>Markeri ai Complementului și Inflamației Complex C5b-9</i>	40 minute	Colorare IHC pozitivă	- sensibilitate mare în detectarea cardiomiocitelor ischemice /necrozate printre cardiomiocite viabile - resuscitarea nu afectează expresia complexul C5b-9. - rezistent la descompunerea post- mortem. (53)
<i>C1, C3, C8 și C9</i>	2 ore (studiu pe animale)	Colorare IHC pozitivă	- detectarea cea mai timpurie a complementului C3 în cadrul studii experimentale pe animale de laborator (54)
<i>Markeri ai Mediatorilor Inflamatori Galectina-3</i>	20 minute	Colorare IHC pozitivă	- cardiomiocitele și celulele endoteliale exprimă GAL-3 în timpul evenimentului ischemic. - după 24 de ore post infarct miocardic, neutrofilele exprimă GAL- 3
<i>Familia IL-1β, IL-6, IL-15, IL-8, ST-2</i>	4 ore	Colorare IHC pozitivă	- 0-6 ore ușoară pozitivitate a IL-1 β , IL-6, IL-8 și reacții intense IL-15 în zona infarctului (55).
<i>TNF-alfa</i>	4 ore	Colorare IHC pozitivă	- nu este un marker specific pentru infarctul miocardic; producerea de TNF- α poate fi promovată de ischemia miocardică, reperfuzie, chirurgia de bypass cardiac și insuficiența cardiacă cronică (56).

<i>CD15, CD18 și triptaza</i>	4 ore	Colorare IHC pozitivă	- 0-6 ore ușoară pozitivitate CD15, CD18 și triptaza. - 6-8 ore reacție imună puternică CD15 vizibilă în zona infarctată(55).
Proteine Celulare Cardiace			
<i>Proteina de legare a acizilor grași din inimă (H-FABP)</i>	15 minute	Pierdere colorării IHC	- zonele pierdere a expresiei H-FABP ajung la maxim după patru ore de la debutul ischemiei miocardice. nu există un consens dacă H-FABP este afectată de autoliză, iar mai multe studii au ajuns la concluzii diferite (57, 58).
<i>Desmin, alfa-actinina și vinculina</i>	1 oră	Pierdere colorării IHC	- desmin și α -actinina sunt potriviți markeri nu sunt rezistenți la autoliză/putrefacție. pot fi folosiți până la 1-2 zile post-mortem (54, 59).
<i>Troponinele cardiace (CTns)</i>	1 oră	Pierdere colorării IHC	- CTns sunt foarte specifice pentru leziune miocardică și sunt eliberate din cardiomiocite doar în caz de moarte celulară ireversibilă (60-63).
<i>Creatin Kinaza MM, BB și MB</i>	-	Pierdere colorării IHC	- CK-MB este unul dintre cei mai utilizați markeri de ischemie. - pierdere expresiei CK-MB în zona de periferie infarctului este mai evidentă decât în centru (63, 64).
<i>Cx43</i>	-	Pierdere colorării IHC	- marker ce își pierde expresia rapid după debutul ischemiei miocardice. - nivelurile de mRNA ale acestor proteine pot fi utilizate ca markeri ai aritmiei ventriculare (65).
<i>ZO-1</i>	-	Colorare pozitivă IHC	- marker al ischemiei miocardice (65).

<i>Peptidele natriuretice</i>	-	Colorare pozitivă IHC	- nu este un marker specific, poate fi crescut în alte miopatii. - BNP și NT-proBNP sunt rezistente la descompunerea post-mortem și ar putea fi biomarkeri mai obiectivi ai funcției cardiace (66, 67).
<i>Mioglobina</i>	3 ore	Pierderea colorării IHC	- unul dintre cei mai de încredere biomarkeri utilizați pentru diagnosticarea în cazul IM. - expresia imunohistochimică a mioglobinei ar putea fi utilizată pentru detectarea infarctului miocardic în 2-3 zile după deces (59, 63).
Markeri specifici pentru proteinele plasmatică și necroza miocardică			
<i>Fibronectina</i>	2 ore	Colorare pozitivă IHC	- nu este un marker specific, deoarece expresia pozitivă poate fi văzută și în cazuri de miocardită. - putrefacția avansată nu are un efect dăunător asupra colorării fibronectinei (25).
<i>S100A1</i>	15 minute (studiu pe animale)	Pierderea colorării IHC	- cardiomiocitele ischemice prezintă o depleție de S100A1 (26).
Markeri specifici pentru hipoxie			
<i>HIF și HIF1-alfa</i>	2 ore	Colorare pozitivă IHC	- exprimate în timpul ischemiei ca rezultat al lipsei de oxigen (68).
<i>Galectina-1</i>	20 minute (studiu pe animale)	Pierderea colorării IHC	- are un rol semnificativ ca marker diagnostic în infarctul miocardic timpuriu. - celulele care sunt capabile să supraviețuiască în zona ischemică și sunt situate la marginea exterioară a leziunii tisulare (zona

			infarctului) prezintă expresie crescută de GAL-1 (28).
Markeri ai destabilizării plăcii			
<i>Metaloproteinaze matriceale</i>	-	Colorare pozitivă IHC	- imunopozitivitatea MMP-9 a fost observată în principal în celulele polimorfonucleare endovasculare, marker al ischemiei miocardice timpurii, „indirect”.(69-71)
<i>Mieloperoxidaza</i>	-	Colorare pozitivă IHC	- MPO este o enzimă găsită în leucocite și este eliberată în cazurile de infarct miocardic. - specificitate scăzută, eliberarea MPO nu este exclusivă pentru infarctul miocardic.(72)
<i>Proteina plasmatică asociată sarcinii A</i>	-	Colorare pozitivă IHC	- PAPP-A este detectabilă în sânge și în țesutul cardiac timp de până la câteva zile după infarctul miocardic. - nu este un marker specific, poate fi crescut în alte miopatii.(73, 74)
Alți Markeri			
<i>Markeri ai Apoptozei</i>	-	Colorare pozitivă IHC	- proteinele care reglează apoptoza, precum Bcl-2 și Caspaza-3, au fost de asemenea utilizate în infarctul miocardic recent, dar nu sunt specifice (30, 31, 75).

6.4 Discuții

În cadrul studiului actual, au fost identificați și analizați peste 25 de markeri imunohistochimici, fiecare fiind evaluat pe baza specificității și sensibilității sale în detectarea ischemiei miocardice și a infarctului miocardic acut. Fiecare marker a fost supus unei evaluări individuale, iar ulterior, au fost clasificați în funcție de mecanismele patologice implicate și/sau localizarea lor specifică la nivelul cardiomiocitelor. Această clasificare este menită să simplifice alegerea markerilor adecvați în contextul diagnosticului ischemiei miocardice, asigurând utilizarea lor optimă în funcție de particularitățile fiecărui caz. Pentru o prezentare

clară și concisă, rezultatele studiului au fost sintetizate și organizate într-un tabel. Acest tabel oferă o privire de ansamblu asupra fiecărui marker, evidențiind contribuția sa în evaluarea ischemiei miocardice.

6.5 Concluzii

Am discutat principalele tipuri de markeri diagnostici care pot fi folosiți sub formă de anticorpi pentru colorarea imunohistochimică a secțiunilor de țesut miocardic fixate în blocuri de parafină. În contextul dificultăților de diagnostic post-mortem al infarctului miocardic acut (IMA), mai ales în absența necrozei și a leziunilor celulare vizibile, este esențial să identificăm markerii relevanți care pot fi detectați încă din stadiile incipiente ale evenimentului ischemic, înainte de instalarea necrozei. Printre markerii esențiali specifici infarctului miocardic acut, se numără troponinele cardiace, care reprezintă un indicator sensibil și specific al leziunilor miocardice, precum și componentele complementului, în special complexul C5b-9, care reflectă activarea cascadei imune. De asemenea, peptidele natriuretice joacă un rol semnificativ în evaluarea disfuncției cardiace și sunt folosite frecvent pentru a evalua stresul hemodinamic. Alături de aceștia, markerii asociați cu ischemia oferă informații valoroase cu privire la prezența și severitatea evenimentului ischemic.

Cu toate acestea, unii dintre acești markeri prezintă anumite limitări notabile. De exemplu, în cazurile unde autoliza este într-un stadiu avansat, acuratețea detectării și interpretării lor poate fi redusă semnificativ, limitând astfel utilitatea lor diagnostică postmortem. Pentru a spori acuratețea diagnosticului și a reduce riscul de erori, se recomandă utilizarea acestor markeri într-o combinație de cel puțin trei sau patru. Această abordare poate oferi o evaluare mai completă a patologiilor cardiace, cu un accent deosebit pe detectarea timpurie a infarctului miocardic.

7. STUDIUL III: Studiu imunohistochimic al ATP1A3 și Plakophilinei 2 ca potențiali noi markeri în diagnosticul ischemiei miocardice

7.1 Ipoteza de lucru și obiective specifice

În situațiile în care persoana decedează în primele 6 ore de la debutul ischemiei miocardice etapă premergătoare infarctului miocardic acut modificările histologice nu sunt vizibile microscopic folosind colorația standard cu hematoxilină-eozină.

Printre cei mai fiabili și frecvent utilizați markeri de ischemie se numără complexul C5b-9, fibronectina și troponinele cardiace (2).

Proteinele de joncțiune „gap”, proteinele canalelor ionice, proteinele transportoare, precum și cele implicate în semnalizare și reglare joacă un rol crucial în menținerea integrității și funcționării eficiente a cardiomiocitelor. Aceste studii subliniază complexitatea mecanismelor implicate la nivelul discurilor intercalare.

PKP2 este o proteină din clasa plakofilinelor cu proprietăți de adeziune celulară. Pe lângă rolul lor structural în desmozomi, plakofilinele sunt implicate în diferite procese de semnalizare și reglare intracelulară (24, 25).

ATP1A3 a fost identificată în discurile intercalate și intracelular, iar la modelele animale a fost confirmată în sarcolema cardiomiocitelor. ATP1A3 este o subfamilie a Na⁺/K⁺-ATPazei și este o proteină integrală de membrană responsabilă de stabilirea și menținerea gradientilor electrochimici ai ionilor de sodiu (Na) și potasiu (K) în membrana plasmatică. Se exprimă în principal în creier și cardiomiocite. Studii recente au evidențiat rolul său complex în patologii cardiace și neuronale (26-30). ATP1A3 joacă un rol în procesul de autofagie neuronală „autosis” indusă de hipoxie (76).

Premisele acestui studiu se bazează pe observația că markerii imunohistochimici disponibili în detectarea ischemiei și a infarctului miocardic nu oferă un nivel suficient de sensibilitate și specificitate. Detectarea ischemiei miocardice la nivelul cardiomiocitelor într-un stadiu cât mai precoce după debutul acesteia rămâne încă o provocare în medicina legală. În acest context, identificarea și validarea unor noi markeri imunohistochimici pentru detectarea ischemiei etapă premergătoare IMA reprezintă o prioritate în medicina legală.

Scopul acestui studiu a fost descoperirea de noi markeri imunohistochimici pentru ischemia miocardică cu specificitate și sensibilitate crescute, care să fie de real folos în practica anatomo-patologică și medico-legală. În acest scop au fost alese două proteine localizate la nivelul discurilor intercalare și anume PKP2 și ATP1A3.

Obiectivele acestui studiu a fost identificarea posibilității ca expresia și distribuția markerilor PKP2 și ATP1A3 să fie influențate în contextul ischemiei miocardice, etapă premergătoare infarctului miocardic acut. Distribuția și nivelurile de expresie ale PKP2 și ATP1A3 au fost comparate cu cele ale complexului C5b-9 pentru a evalua potențialul acestor markeri de a furniza rezultate concordante cu un marker cunoscut pentru ischemie.

7.2 Material și metodă

Pentru acest studiu retrospectiv, am avut acces la certificatele de deces și la examenele histopatologice aferente unui număr de 1184 de cazuri autopsiate în cadrul departamentului de medicină legală, în perioada 2020-2023. Din acest eșantion, au fost selectate 85 de cazuri, pentru care au fost extrase din histotecă blocurile de parafină și secțiunile histopatologice colorate cu H&E ale țesutului miocardic și ale arterelor coronare. Probele de țesut au fost prelevate preponderent din ventriculul stâng, iar numărul de secțiuni H&E examinate a variat între cazuri.

Criteriile de includere au permis selecția cazurilor indiferent de vârstă, sex, comorbidități sau dacă au fost sau nu efectuate manevre de resuscitare. Criteriul de excludere a vizat eliminarea cazurilor în care autopsiile au fost efectuate la mai mult de 72 de ore de la deces și cazurile care prezentau semne de autoliză pe secțiunile histopatologice în colorația H&E deși se încadrau în intervalul de 72 de ore. În plus, au fost excluse cazurile în care inițial resuscitarea a avut succes, urmată de o perioadă variabilă de supraviețuire.

Astfel cele 85 de cazuri au fost împărțite în patru grupuri în funcție de cauza decesului stabilită post-mortem din rapoartele medico-legale. La determinarea cauzei de deces s-a ținut cont și de datele de anchetă, investigațiile toxicologice negative, examinările macroscopice și/sau microscopice efectuate pe secțiunile de hematoxilină și eozină.

În primul grup, au fost selectate 10 cazuri în care cauza decesului a fost atribuită IMA. În fiecare dintre aceste 10 cazuri, examenul histopatologic în colorația H&E, a confirmat infarctului miocardic acut. Secțiunile miocardice colorate cu H&E au evidențiat zone cu necroză coagulativă, necroză în bandă carioliză, alături de infiltrarea polimorfonuclearelor neutrofile.

În al doilea grup, au fost incluse 25 de cazuri de moarte subită cardiacă atribuite trombozei coronariene acute, ATSC, infarctului miocardic vechi, CMD, HC și MFA, pentru toate aceste cazuri examenul histopatologic microscopic nu a evidențiat semne de ischemie miocardică pe secțiunile examinate din țesutul miocardic în colorația hematoxilină-eozină. Am utilizat două grupuri de control, cu decese atribuite asfixiei mecanice prin spânzurare.

Al treilea grup a constat în 25 de cazuri în care cauza de deces a fost atribuită asfixiei mecanice prin spânzurare. În acest grup, subiecții examenul histopatologic macroscopic și/sau microscopic au pus în evidență una din următoarele afecțiuni: ateroscleroză coronară, infarct miocardic vechi, hipertrofie cardiacă, cardiomiopatie dilatată și fibroză miocardică avansată. Examenul histopatologic microscopic nu a pus în evidență semne de ischemie miocardică în colorația hematoxilină-eozină.

Al patrulea grup a inclus 25 de cazuri care au implicat țesut miocardic de la indivizi care au murit din cauza asfixiei mecanice acute. Aceste cazuri nu au prezentat nicio patologie histologică la nivel macroscopic și/sau microscopic, fără semn de ischemie vizibile microscopic.

Toate secțiunile histopatologice în colorație H&E provenite de la cele 85 de cazuri au fost reexaminat de către un anatomopatolog cu experiență. Accentul principal a fost pus pe identificarea modificărilor de ischemie miocardică.

Imunohistochimie

Secțiunile ATP1A3, Plakophilin 2 și C5b-9 au fost colorate utilizând un sistem automatizat (DAKO Autostainer Plus). Procesul a inclus deparafinizarea, rehidratarea și extracția epitopului folosind modulul PT-link (10 minute la 97°C).

Același anatomopatolog a examinat cu atenție lamelele imunohistochemic colorate folosind markerii ATP1A3, PKP2 și complexul C5b-9 din cele 85 de cazuri. Examinarea a fost realizată la diferite obiective (10x, 20x, 40x și 100x cu imersie). S-au examinat cu atenție expresia și distribuția markerilor inclusiv modificările histopatologice la nivelul discurilor intercalate, nucleului și citoplasmei.

Tabelul 7.1: Anticorpii investigați și scala de gradare

Marker	Gradul 0	Gradul 1	Gradul 2
ATP1A3	S-a observat o expresie pozitivă uniformă, cu minime excepții la nivelul regiunii subendocardice și muschilor papilari	O ușoară pierdere a expresiei markerului.	Pierderea expresiei markerului în celulele grupului se observă un aspect de mozaic.
PKP2	Expresia markerului pozitivă la nivelul discurilor intercalare.	Prezintă o pierdere discretă a intensității expresiei markerului la nivelul discurilor intercalare.	Expresie foarte slabă sau absentă a markerului comparativ cu un standard intern de miocard normal.

<p>C5b-9 Complex</p>	<p>Negativ, fără expresia markerului.</p>	<p>Pozitivitate redusă, indicând o prezență minimă a markerului.</p>	<p>Pozitivitate intensă și sau difuză pe o arie mărită, demonstrând o expresie larg răspândită sau puternică a markerului la nivelul citoplasmei cardiomiocitelor.</p>
-----------------------------	---	--	--

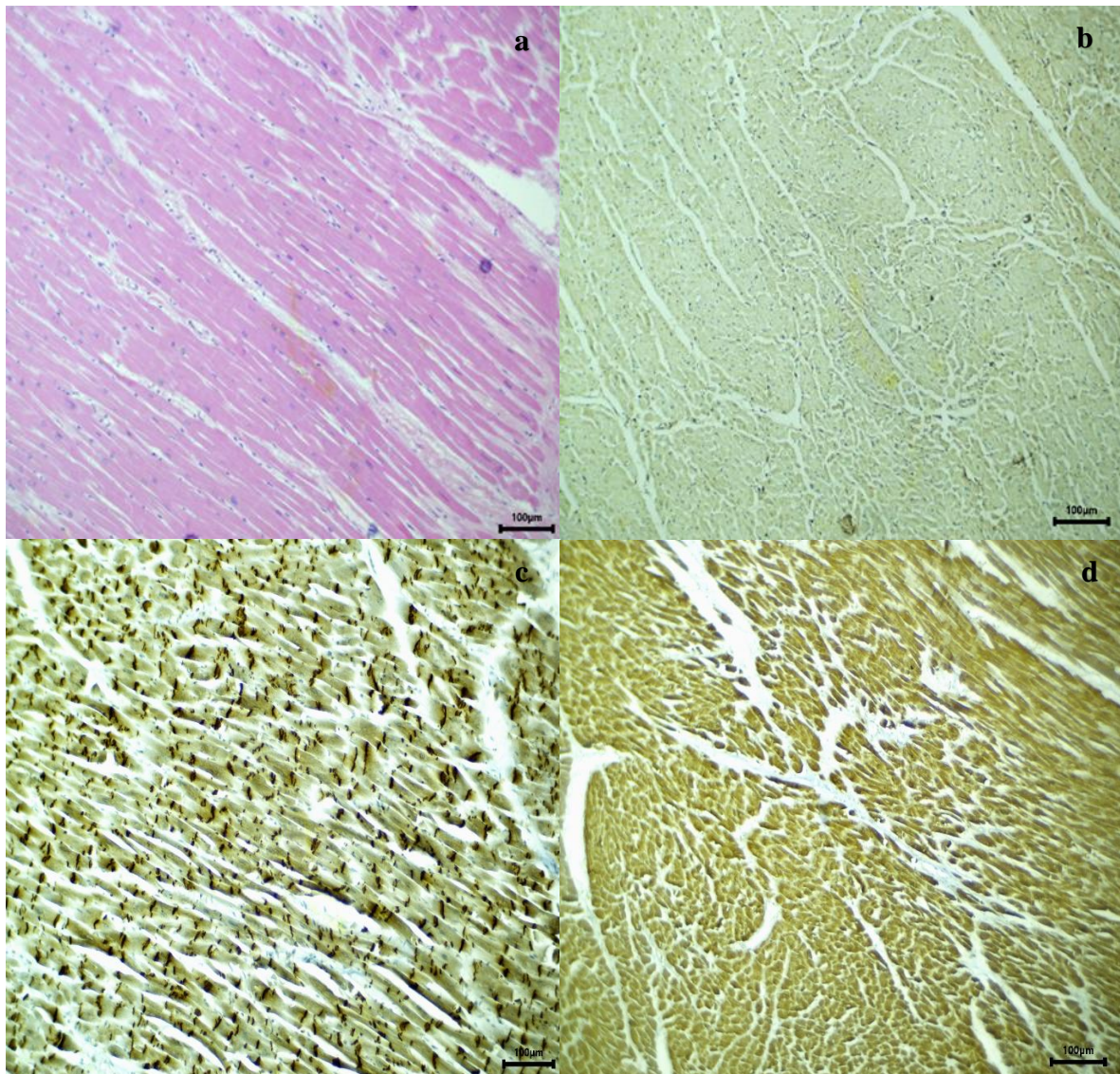


Figura 7.1: Scala semicuantitativă grad 0, aceeași reprezentare a lamei histologice pentru H&E și IHC, (20x), bara de scală 100 μm: (a) Colorare H&E a cardiomiocitelor într-o secțiune longitudinală fără semne de ischemie; (b) Complexul C5b-9, expresie negativă; (c) PKP2 puternic exprimat la nivelul discurilor intercalare; (d) ATP1A3 model uniform fără depleție a markerului.

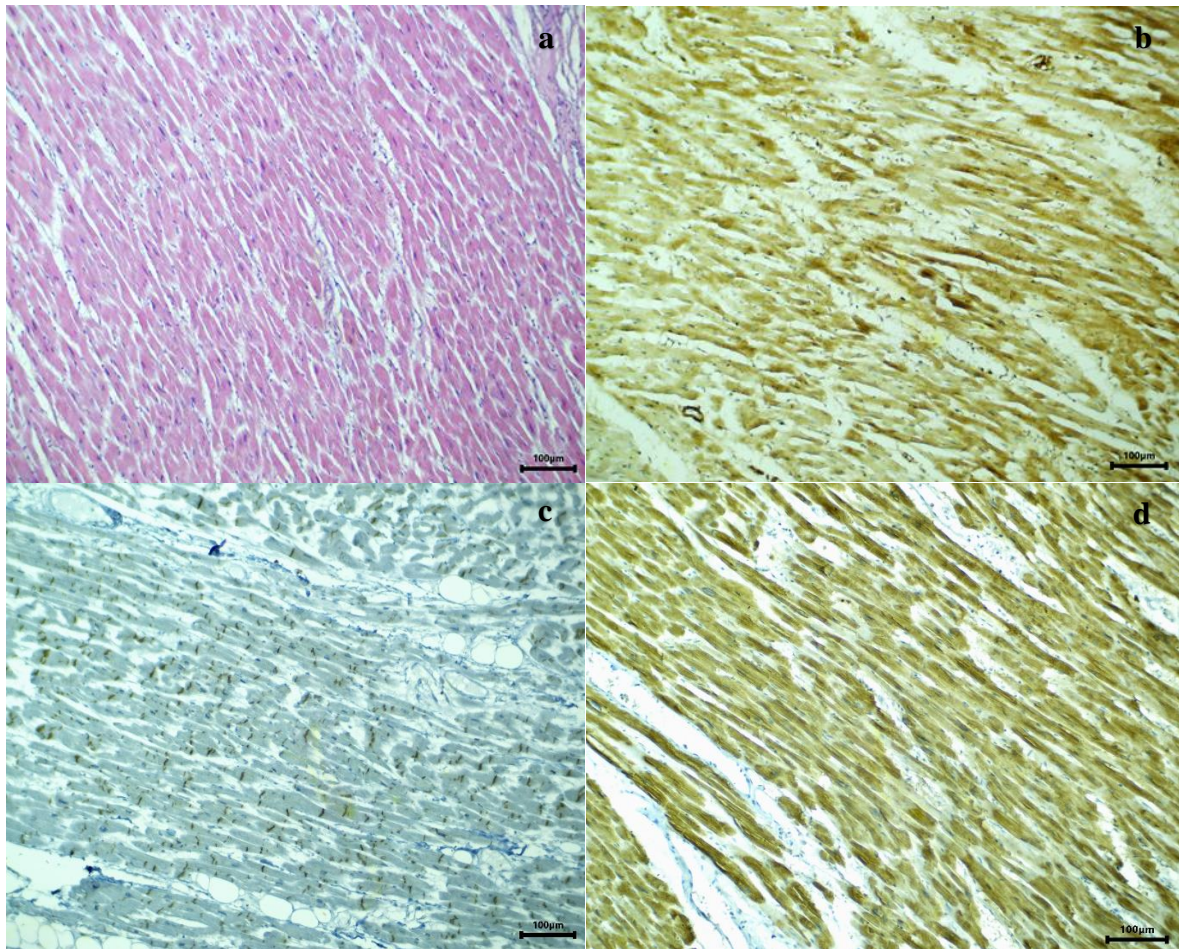


Figura 7.2: Scala semicuantitativă de grad 1, aceeași reprezentare a lamei histologice pentru H&E și IHC, (20x), bara de scală 100 μm : (a) Colorare H&E a cardiomiocitelor într-o secțiune longitudinală fără semne de ischemie; (b) Complexul C5b-9 ușor pozitiv, reflectând prezența markerului; (c) PKP2 expresie slabă la nivelul discurilor intercalare în regiunea ischemică; (d) ATP1A3 o ușoară pierdere a expresiei intracelulare și la nivelul discurilor intercalare observată în grupul de celule.

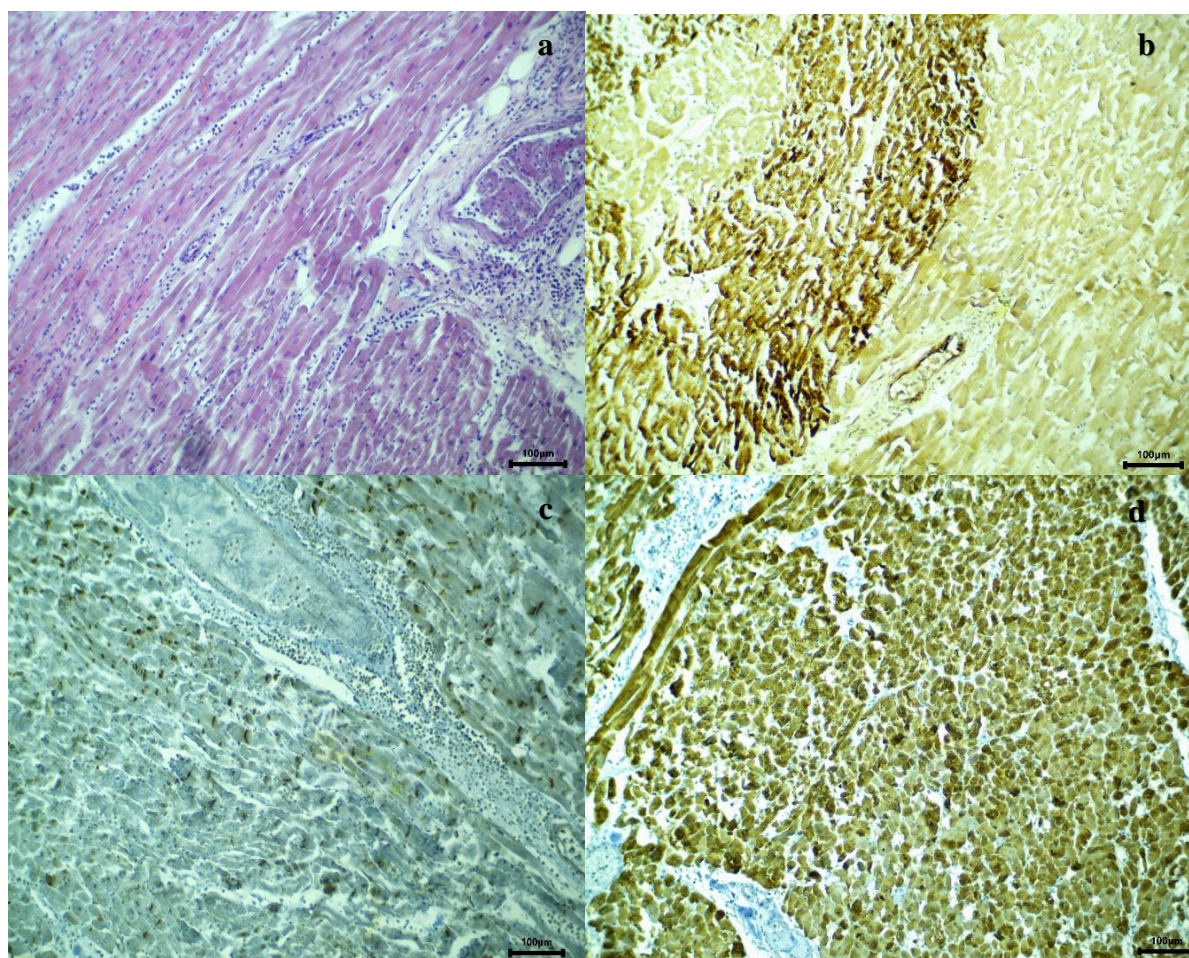


Figura 3: Scala semicuantitativă de grad 2, cu aceeași reprezentare a lamei histologice pentru H&E și IHC, (20x), bara de scală 100 µm: (a) Necroză coagulativă a miocitelor observată în colorația H&E, caracterizată prin absența nucleilor, împreună cu infiltrat neutrofil interstițial. În plus, un vas de sânge prezintă dovezi de tromboză; (b) Complexul C5b-9, expresie pozitivă, arată o delimitare bruscă între țesutul vital și zonele necrotice; (c) PKP2 prezintă expresie foarte slabă sau absentă a discurilor intercalare în zona infarctată; (d) ATP1A3 expresie de tip mozaic în grupurile de celule.

7.3 Rezultate

Tabelul 7.2: Frecvențele gradelor IHC (0, 1 și 2) folosind cei trei markeri din fiecare grup.

Marker		Grup 1 (n = 10)	Grup 2 (n = 25)	Grup 3 (n = 25)	Grup 4 (n = 25)
	Grad 0	0%	12%	76%	88%
	Grad 1	10%	36%	16%	8%

ATP1A3 (%)	Grad 2	90%	52%	8%	4%
PKP2 (%)	Grad 0	30%	64%	96%	96%
	Grad 1	50%	16%	4%	4%
	Grad 2	20%	20%	0%	0%
C5b-9 (%)	Grad 0	0%	44%	92%	96%
	Grad 1	10%	32%	8%	4%
	Grad 2	90%	24%	0%	0%

Tabel 7.3: Rezultatele Testului de Corelație Person

Grup	Marker 1	Marker 2	Coeficient de corelație Pearson	Valoare p	Relație	Semnificație statistică
Grup 1 (n = 10)	PKP2	C5b-9	-0.063	0.8627	Corelație negativă foarte slabă, fără relație între markeri	Nesemnificativ din punct de vedere statistic
Grup 1 (n = 10)	APT1A3	C5b-9	1.0	6.65e-64	Corelație pozitivă puternică, markerii oferă informații despre infarctul miocardic	Semnificativ din punct de vedere statistic
Grup 2 (n = 25)	PKP2	C5b-9	0.184	0.3784	Corelație pozitivă slabă, fără relație semnificativă între markeri	Nesemnificativ din punct de vedere statistic
Grup 2 (n = 25)	APT1A3	C5b-9	0.674	0.00022	Corelație pozitivă puternică, markerii oferă informații relevante	Semnificativ din punct de vedere statistic

Grup 3 (n = 25)	PKP2	C5b-9	-0.060	0.7750	Corelație negativă foarte slabă, fără relație între markeri	Nesemnificativ din punct de vedere statistic
Grup 3 (n = 25)	APT1A3	C5b-9	0.548	0.0046	Corelație pozitivă moderată, markerii sugerează o relație semnificativă	Semnificativ din punct de vedere statistic
Grup 4 (n = 25)	PKP2	C5b-9	-0.042	0.8432	Corelație negativă foarte slabă, fără relație între markeri	Nesemnificativ din punct de vedere statistic
Grup 4 (n = 25)	APT1A3	C5b-9	0.602	0.0015	Corelație pozitivă puternică, markerii oferă informații relevante	Semnificativ din punct de vedere statistic

7.4 Discuții

Scopul acestui studiu a fost de a evalua potențialul proteinelor ATP1A3 și PKP2 ca markeri specifici pentru ischemia miocardică. În vederea realizării acestui obiectiv, cazurile au fost repartizate în patru grupuri distincte.

Primul grup a inclus 10 cazuri de IMA, confirmat ca fiind cauza decesului. Acest grup a fost selectat deoarece se cunoaște că expresia markerilor IHC poate varia în funcție de timpul scurs de la debutul ischemiei. Anumiți markeri prezintă o exprimare pozitivă în stadiile precoce sau suferă o depleție rapidă, în timp ce alții devin detectabili doar în etapele mai avansate ale ischemiei sau ulterior instalării necrozei (54). Prin intermediul acestui grup, s-a urmărit evaluarea modificărilor în expresia sau distribuția celor doi noi markeri în stadiile incipiente ale IM. În cazul în care nu se observă modificări semnificative, se poate concluziona că acești markeri nu dețin sensibilitatea necesară pentru a detecta ischemia sau etapele initiale ale infarctului miocardic.

În toate cele 10 cazuri, nu s-a observat depunerea de colagen, procesul de depunere a colagenului începe, de obicei, după aproximativ o săptămână de la debutul infarctului (12, 77). Este cunoscut faptul că, pe aceeași secțiune histopatologică examinată în colorația H&E se pot

observa unele zone cu necroză de coagulare, în timp ce alte zone pot prezenta un aspect ondulat al miocitelor.

Pentru PKP2, am observat o expresie a markerului la nivelul discurilor intercalare. Zonele cu semne histopatologice de infarct miocardic acut au prezentat o expresie slabă (gradul 1) și foarte slabă sau absentă (gradul 2), în special în regiunile cu infiltrare crescută de polimorfe neutrofile și cu necroză de coagulare. Interpretarea gradului PKP2 la discurilor intercalare a fost mai ușor de efectuat în secțiunile longitudinale ale cardiomiocitelor. În zonele de fibroză miocardică, evaluarea distribuției și a intensității expresiei PKP2 devine mai dificilă. Cu ajutorul colorație H&E au fost identificate zonele de IMA cu infiltrare de polimorfe neutrofile interstițiale și unde cardiomiocitele prezentau hipereozinofilie, fiind mai puțin afectate de necroza de coagulare. Apoi, am analizat aceeași regiune pe lama histopatologică marcată cu PKP2. Markerul a prezentat o expresie pozitivă intensă încadrabilă în gradul 0 în zona de infarct miocardic. Markerul de control, complexul C5b-9, a testat pozitiv pentru ischemie și necroză în aceleași zone. Acest tipar a fost observat în mod constant în mai multe cazuri, ceea ce ne-a condus la concluzia că PKP2 ar putea pierde expresia mai târziu în evoluția IMA.

Pentru ATP1A3, am observat expresia markerului atât la nivelul discurilor intercalare, cât și la nivel intracelular (78). În primul grup, a fost observată o depleție a markerului în toate cazurile, majoritatea fiind clasificate la gradul 2. Pentru acest grad, secțiunea transversală a cardiomiocitelor din zona infarctului miocardic a prezentat o expresie tip mozaic în grupurile de celule, cu unele cardiomiocite prezentând o depleție totală a markerului intracelular, altele având o pierdere parțială, iar unele de aspect normal față de un standard intern. La mărimi mai mari (40x și 100x cu imersie) intracelular se poate observa o depleție variabilă a acestuia cu modificări histopatologice interpretate ca edem miofibrilar și rhexis. În secțiunile longitudinale, cardiomiocitele au relevat discuri intercalare cu depleție variabilă a colorării și modificări histopatologice, precum distorsiuni și rupturi ale discurilor intercalare.

Al doilea grup a fost ales pentru a evalua dacă markerii își modifică expresia în stadiul incipient al ischemiei. În acest scop, am inclus cazuri cu o probabilitate ridicată de a identifica ischemia miocardică cu ajutorul IHC, dar fără modificări histopatologice evidente în colorația H&E. Acest grup a cuprins, de asemenea, cazuri de tromboză coronariană acută și ateroscleroză coronariană avansată cu infarcte miocardice vechi, dar fără semne histopatologice de ischemie. În unele cazuri, tromboza coronariană acută observată la autopsie nu prezintă semne de ischemie sau infarct atunci când este examinată cu colorația H&E. Datorită intervalului scurt dintre debutul ischemiei și deces, semnele histopatologice ale ischemiei și necrozei, care sunt

în mod obișnuit observate în colorația H&E, nu au suficient timp să se dezvolte. Scopul acestui studiu a fost să determinăm dacă acești markeri pot detecta specific ischemia în stadiul incipient, mai degrabă decât necroza. Acest grup nu a fost inclus în analiza ROC deoarece nu am putut clasifica cu certitudine subiecții ca având sau nu infarct miocardic (IM) din cauza utilizării a unui singur marker de control C5b-9.

Al treilea grup a inclus cazuri de asfixie mecanică (spânzurare) asociate cu patologie miocardică. Patologia cardiacă asociată acestor cazuri a fost documentată fie prin examinare macroscopică fie prin examen microscopic. Am utilizat acest grup ca martor pentru a determina dacă patologia miocardică din aceste cazuri ar putea influența distribuția sau expresia markerilor APT1A3 și PKP2 și pentru a evalua dacă modificările observate în primul și al doilea grup sunt prezente atunci când decesul survine în câteva minute din cauza asfixiei mecanice. În cazurile de asfixie mecanică, cel mai adesea stopul cardiac survine în câteva minute fie prin asistolie sau fie prin activitate electrică fără puls, ambele fiind ritmuri nonșocabile.

Au existat și câteva cazuri în care am observat diferențe în gradele de APT1A3 și complexul C5b-9. Acest grup a inclus doar cazuri de asfixie mecanică, în care indivizii au fost găsiți decedați la locul faptei, Gradele 1 și 2 pentru APT1A3 și complexul C5b-9 pentru în cazurile de asfixie poate fi explicat printr-o perioadă prelungită de agonie. Se știe că diferite tipuri de spânzurare pot duce la o perioadă prelungită de agonie și astfel sunt influențați anumiți biomarkeri.

Al patrulea grup a fost utilizat ca martor de bază pentru a evalua markerii în țesutul miocardic fără modificări patologice observate macroscopic și microscopic în cazurile de asfixie mecanică. Acest grup a servit ca referință negativă, contribuind la evaluarea valorii predictive negative a noilor markeri.

Modificările în expresia diferiților markeri imunohistochimici în ischemia sau necroza miocardică pot fi explicate prin factori diverși. Localizarea specifică și funcțiile fiecărui marker sunt determinante. Expresia complexului C5b-9 depinde în principal de leziunile mediate de complement sau de un răspuns inflamator, absența expresiei APT1A3 poate fi asociată cu depleția energetică și stresul ischemic, iar absența PKP2 este influențată de modificările moleculare suferite la nivelul discurilor intercalare. Factorul timp joacă un rol crucial, deoarece schimbările moleculare declanșate de ischemie apar într-o succesiune de evenimente. Alți factori, cum ar fi vulnerabilitatea selectivă a proteinelor, variațiile în răspunsurile celulare la stres, intervalele post-mortem și variabilitatea în prelevarea histologică, pot contribui și ele la aceste variații în expresia markerilor.

Limitările studiului

Studiul a prezentat câteva limitări. Natura retrospectivă a acestuia, împreună cu dimensiunea redusă a secțiunilor histopatologice analizate. De asemenea, există posibilitatea unor rezultate fals pozitive cu APT1A3 în cazurile de deces atribuite altor cauze decât ischemia miocardică, ceea ce nu poate fi explicat în acest studiu. În plus, eforturile de resuscitare nu au fost luate în considerare în analiza statistică din cauza numărului redus de cazuri din eșantion, deși se știe că resuscitarea poate influența modelele de distribuție și exprimarea markerilor. O altă limitare este neinclusiunea cazurilor în care autopsia a fost efectuată la mai mult de 72 de ore după deces, ceea ce înseamnă că nu am putut evalua dacă markerii sunt afectați de autoliză.

7.5 Concluzie

Majoritatea cazurilor de deces non-violent examinate în autopsiile medico-legale sunt atribuite morții subite cardiace. Uneori, stabilirea cauzei decesului ca infarct miocardic reprezintă o provocare semnificativă. În astfel de situații, imunohistocolorarea pentru detectarea ischemiei timpurii care precede infarctul miocardic a devenit un instrument esențial. Găsirea de noi markeri imunohistochimici care oferă o specificitate și sensibilitate mai ridicată este de o importanță majoră. În acest studiu, am investigat pentru prima dată potențialul markerilor imunohistochimici APT1A3 și PKP2 în detectarea ischemiei în țesutul miocardic. În analiza statistică a celor patru grupuri, markerii APT1A3 și C5b-9 au demonstrat corelații pozitive puternice, semnificative din punct de vedere statistic, sugerând o relație de încredere în care ambii markeri oferă informații corelate despre infarctul miocardic. PKP2 și C5b-9 nu au prezentat nicio corelație în primele două grupuri, indicând absența unei relații solide sau de încredere între acești markeri în seturile de date analizate. Pentru APT1A3 au fost observate cazuri în care a prezentat grade 1 sau 2, în timp ce complexul C5b-9 a avut grade 0 sau 1, sugerând că APT1A3 ar putea detecta ischemia timpurie mai eficient decât C5b-9. Putem concluziona că markerul APT1A3 ar putea fi utilizat în combinație cu alți markeri pentru detectarea ischemiei în țesutul miocardic. Cercetările viitoare asupra acestui marker imunohistochimic ar putea fi benefice pentru a-i stabili și îmbunătăți sensibilitatea și specificitatea.

8. Concluzii și contribuții personale

Cele trei studii analizate în cadrul acestei teze de doctorat abordează teme esențiale și de actualitate în domeniul patologiei cardiace și medicinei legale. Acestea se concentrează în mod special pe ischemie etapă premergătoare infarctului miocardic, un subiect de mare relevanță în contextul medicinei legale, și pe utilizarea markerilor imunohistochimici pentru diagnosticarea acestuia. Studiile contribuie semnificativ la avansarea cunoștințelor în domeniul patologiei cardiace și al medicinei legale, oferind metode noi pentru diagnosticarea și evaluarea infarctului miocardic în cadrul examenului histopatologic. Această lucrare reprezintă prima realizată în România care se concentrează pe utilizarea markerilor imunohistochimici în contextul ischemiei și infarctului miocardic acut. În plus, este unică în literatura de specialitate, nefiind identificate studii anterioare care să investigheze utilizarea markerilor ATP1A3 și PKP2 pentru identificarea precoce a ischemiei miocardice, etapa premergătoare infarctului miocardic acut.

Rezultatele celor trei studii contribuie la o mai bună înțelegere a următoarelor aspecte esențiale:

- Prevalența crescută a morții subite cardiace (MSC) în rândul bărbaților (75%), cu o incidență maximă în grupa de vârstă 50-60 de ani (Capitolul 5.3).
- Fibroza miocardică avansată (FMA) a fost identificată ca fiind cea mai frecventă cauză a MSC, reprezentând 41,6% din totalul cazurilor. Această constatare ridică probleme legate de diagnosticarea ischemiei miocardice, deoarece fibroza miocardică avansată este adesea un diagnostic de excludere (Capitolul 5.3, 5.4 și 5.5).
- Se evidențiază necesitatea elaborării unor protocoale naționale care să uniformizeze modul de diagnosticare și raportare a cazurilor de MSC în investigațiile anatomopatologice și medico-legale (Capitolul 5.3, 5.4 și 5.5).
- Microscopia cu colorația H&E s-a dovedit a fi insuficientă în anumite cazuri pentru diagnosticul infarctului miocardic acut, evidențiind nevoia folosirii markerilor imunohistochimici în diagnosticul histopatologic.
- Identificarea rapidă a markerilor adecvați pentru fiecare caz contribuie la acuratețea diagnosticului (Capitolul 6.3).
- Clasificarea markerilor în funcție de mecanismul lor de acțiune (Capitolul 6.3).
- ATP1A3 are un potențial ridicat ca marker imunohistochimic pentru ischemia miocardică, în special datorită sensibilității sale (Capitolul 7.3).

- Un alt aspect important evidențiat este faptul că ATP1A3 poate fi utilizat în combinație cu alți markeri cunoscuți, precum complexul C5b-9, pentru a oferi o imagine completă asupra ischemiei (Capitolul 7.5).
- PKP2 nu a arătat o corelație clară în toate cazurile studiate, ceea ce sugerează că acest marker nu este optim pentru diagnosticarea ischemiei cardiace sau a infarctului miocardic (Capitolul 7.5).

Recomandări și perspective viitoare

Cele trei studii realizate în cadrul acestei teze oferă concluzii valoroase și direcții clare pentru cercetări viitoare în domeniul ischemiei miocardice și al infarctului miocardic. Una dintre principalele recomandări este necesitatea integrării tehnicilor de imunohistochimie în diagnosticul standard al morții subite cardiace și al infarctului miocardic acut, în special în cazurile în care examinările histopatologice convenționale nu oferă rezultate concludente.

Standardizarea protocoalelor: Se recomandă elaborarea unor protocoale standardizate care să includă utilizarea markerilor imunohistochimici în examinările post-mortem, pentru a îmbunătăți acuratețea diagnosticelor și pentru a preveni subdiagnosticarea infarctului miocardic acut.

Utilizarea combinată a markerilor: Pentru a crește specificitatea și sensibilitatea diagnosticului, se recomandă utilizarea combinată a markerilor imunohistochimici. De exemplu, combinația markerilor ATP1A3, C5b-9 și fibronectină poate oferi o imagine completă a ischemiei și poate îmbunătăți semnificativ diagnosticarea infarctului miocardic acut.

În concluzie, aceste studii au adus contribuții semnificative la diagnosticarea ischemiei, etapa premergătoare infarctului miocardic acut, și au evidențiat necesitatea unor metode mai precise de diagnostic în cazurile de moarte subită cardiacă și infarct miocardic. O abordare multidisciplinară și integrarea tehnicilor avansate de imunohistochimie și genetice pot duce la îmbunătățirea semnificativă a diagnosticului și, ulterior, a prevenției infarctului miocardic.

Listă cu publicații și lucrări științifice Articole originale publicate în reviste de specialitate naționale și internaționale indexate prim autor:

1. **Moldovan R**, Ichim VA, Beliș V. Recent perspectives on the early expression immunohistochemical markers in post-mortem recognition of myocardial infarction. Legal Medicine. 2023;64:102293.
CiteScore 2.8
Factor de impact: 1.3
Indexat: ISI, PubMed.
Capitolul din care a fost realizată lucrarea: Capitolul 6
2. **Moldovan R**, Ichim VA, Pufu G.A, Beliș V. Comprehensive Statistical Analysis of Causes of Death and Histopathological Diagnosis in Medico-Legal Investigations of Sudden Cardiac Deaths RM.J Vol 71 No 3. Year 2024; DOI: 10.37897/RMJ
Indexat: Scopus.
Capitolul din care a fost realizată lucrarea: Capitolul 5

Bibliografie selectivă

1. Milroy CM. Coronary artery disease, sudden death and implications for forensic pathology practice. *Diagnostic Histopathology*. 2017;23(11):479-85.
2. Moldovan R, Ichim VA, Beliș V. Recent perspectives on the early expression immunohistochemical markers in post-mortem recognition of myocardial infarction. *Legal Medicine*. 2023;64:102293.
3. Iorga A, Cunningham CM, Moazeni S, Ruffenach G, Umar S, Eghbali M. The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. *Biology of Sex Differences*. 2017;8(1).
4. Goyal V, Jassal DS, Dhalla NS. Pathophysiology and prevention of sudden cardiac death. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016;94(3):237-44.
5. Monticello TM, Sargent CA, McGill JR, Barton DS, Grover GJ. Amelioration of ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts by the ATP-sensitive potassium channel opener BMS-180448. *Cardiovascular Research*. 1996;31(1):93-101.
6. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, White HD. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*. 2018;138(20).
7. Michaud K, Basso C, D'Amati G, Giordano C, Kholová I, Preston SD, et al. Diagnosis of myocardial infarction at autopsy: AECVP reappraisal in the light of the current clinical classification. *Virchows Archiv*. 2020;476(2):179-94.
8. Xu XR, Carrim N, Neves MAD, McKeown T, Stratton TW, Coelho RMP, et al. Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies. *Thrombosis Journal*. 2016;14(S1).
9. Collinson P, Lindahl B. Type 2 myocardial infarction: the chimaera of cardiology? *Heart*. 2015;101(21):1697-703.
10. Coscia T, Nestelberger T, Boeddinghaus J, Lopez-Ayala P, Koechlin L, Miró Ò, et al. Characteristics and Outcomes of Type 2 Myocardial Infarction. *JAMA Cardiology*. 2022;7(4):427.
11. Kumar V AA, Aster JC. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 10th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
12. Ghafoor M, Kamal M, Nadeem U, Husain AN. Educational Case: Myocardial Infarction: Histopathology and Timing of Changes. *Academic Pathology*. 2020;7:237428952097663.
13. Wang G, Zhao N, Zhong S, Li J. A systematic review on the triggers and clinical features of type 2 myocardial infarction. *Clinical Cardiology*. 2019;42(10):1019-27.
14. Libby P. The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*. 2021;592(7855):524-33.
15. Macalpin RN. Some observations on and controversies about coronary arterial spasm. *International Journal of Cardiology*. 2015;181:389-98.
16. Lanza GA, Careri G, Crea F. Mechanisms of Coronary Artery Spasm. *Circulation*. 2011;124(16):1774-82.
17. Hung M-J, Hu P, Hung M-Y. Coronary Artery Spasm: Review and Update. *International Journal of Medical Sciences*. 2014;11(11):1161-71.
18. Freund Y, Cohen-Aubart F, Bloom B. Acute Pulmonary Embolism. *JAMA*. 2022;328(13):1336.
19. Brașoveanu AM, Mogoantă L, Mălăescu GD, Predescu OI, Cotoi BV, Ifrim Chen F. Hypertensive cardiomyopathy - histopathological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol*. 2019;60(2):487-94.
20. Tanaka Y, Joki N, Hase H. Ischemic Heart Disease in Patients with End-Stage Kidney Disease. *Blood Purification*. 2015;40(4):332-6.

21. Shi Y, Zong Y. Type 2 Myocardial Infarction Resulted from the Left Thoracic Stomach. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 2020;35(5).
22. Bally I, Rossi V, Lunardi T, Thielens NM, Gaboriaud C, Arlaud GJ. Identification of the C1q-binding Sites of Human C1r and C1s. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(29):19340-8.
23. Tsai T-H, Sung P-H, Chang L-T, Sun C-K, Yeh K-H, Chung S-Y, et al. Value and level of galectin-3 in acute myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2012;19(12):1073-82.
24. Katkenov N, Mukhatayev Z, Kozhakhmetov S, Sailybayeva A, Bekbossynova M, Kushugulova A. Systematic Review on the Role of IL-6 and IL-1 β in Cardiovascular Diseases. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*. 2024;11(7):206.
25. Sepideh Saleki¹ FA-A, Hamidreza Eftekhari², Hayedeh Haeri², Sahra Emamzadehfard^{2,3}. Fibronectin as an Immunohistochemical Marker for Postmortem Diagnosis of Myocardial Infarction. *M J Immu* 1(1): 001. 2016;Volume 1(Issue 1 - 2017).
26. Bi H, Yang Y, Huang J, Li Y, Ma C, Cong B. Immunohistochemical detection of S100A1 in the postmortem diagnosis of acute myocardial infarction. *Diagnostic Pathology*. 2013;8(1):84.
27. Cecchi R, Camatti J, Bonasoni MP, Maria CG, Simona N, Nicoletta C, Paola M. HIF-1 α expression by immunohistochemistry and mRNA-210 levels by real time polymerase chain reaction in post-mortem cardiac tissues: A pilot study. *Legal Medicine*. 2024:102508.
28. Al-Salam S, Hashmi S. Galectin-1 in Early Acute Myocardial Infarction. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86994.
29. Mondello C, Ventura Spagnolo E, Bartoloni G, Alibrandi A, Cardia L, Sapienza D, et al. Dystrophin and metalloproteinase 9 in myocardial ischemia: A post-mortem immunohistochemical study. *Legal Medicine*. 2021;53:101948.
30. Korshunova A, Blagonravov M, Neborak E, Syatkin S, Sklifasovskaya A, Semyatov S, Agostinelli E. BCL2-regulated apoptotic process in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2020;47(1):23-36.
31. Zidar N, Dolenc-Stražar Z, Jeruc J, Štajer D. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 in human myocardial infarction. *Virchows Archiv*. 2006;448(1):75-9.
32. Hinderer S, Schenke-Layland K. Cardiac fibrosis – A short review of causes and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019;146:77-82.
33. Corrado D, Zorzi A, Cipriani A, Bauce B, Bariani R, Brunetti G, et al. Scarring/arrhythmogenic cardiomyopathy. *European Heart Journal Supplements*. 2023;25(Supplement_C):C144-C54.
34. Disertori M, Masè M, Ravelli F. Myocardial fibrosis predicts ventricular tachyarrhythmias. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2017;27(5):363-72.
35. Galati G, Leone O, Pasquale F, Olivotto I, Biagini E, Grigioni F, et al. Histological and Histometric Characterization of Myocardial Fibrosis in End-Stage Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation: Heart Failure*. 2016;9(9):e003090.
36. Mitrut R, Stepan AE, Pirici D. Histopathological Aspects of the Myocardium in Dilated Cardiomyopathy. *Curr Health Sci J*. 2018;44(3):243-9.
37. Tejado BSM, Jou C. Histopathology in HCM. *Global Cardiology Science and Practice*. 2018;2018(3).
38. Abedinzadeh N, Pedram B, Sadeghian Y, Nodushan SMHT, Gilasgar M, Darvish M, Mokarizadeh A. **RETRACTED ARTICLE**: A histopathological analysis of the epidemiology of coronary atherosclerosis: an autopsy study. *Diagnostic Pathology*. 2015;10(1).
39. McHugh ML. The Chi-square test of independence. *Biochemia Medica*. 2013:143-9.
40. Ross A, Willson VL. *Basic and Advanced Statistical Tests*. 2017.
41. Zipes DP, Wellens HJJ. Sudden Cardiac Death. *Circulation*. 1998;98(21):2334-51.

42. Skjelbred T, Rajan D, Svane J, Lynge TH, Tfelt-Hansen J. Sex differences in sudden cardiac death in a nationwide study of 54 028 deaths. *Heart*. 2022;108(13):1012-8.
43. Mahapatra R, Gouda K, Das R, Mohanty P, Prusty G. Histopathological Spectrum of Cardiac Lesions in Sudden Cardiac Death An Autopsy Study. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2023;17.
44. Zeppenfeld K, Tfelt-Hansen J, De Riva M, Winkel BG, Behr ER, Blom NA, et al. 2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death. *European Heart Journal*. 2022;43(40):3997-4126.
45. Stecker EC, Reinier K, Marijon E, Narayanan K, Teodorescu C, Uy-Evanado A, et al. Public Health Burden of Sudden Cardiac Death in the United States. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*. 2014;7(2):212-7.
46. Fox CS, Evans JC, Larson MG, Kannel WB, Levy D. Temporal Trends in Coronary Heart Disease Mortality and Sudden Cardiac Death From 1950 to 1999. *Circulation*. 2004;110(5):522-7.
47. Jellis C, Martin J, Narula J, Marwick TH. Assessment of Nonischemic Myocardial Fibrosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56(2):89-97.
48. Salari N, Morddarvanjoghi F, Abdolmaleki A, Rasoulpoor S, Khaleghi AA, Hezarkhani LA, et al. The global prevalence of myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovascular Disorders*. 2023;23(1).
49. Huikuri HV, Castellanos A, Myerburg RJ. Sudden Death Due to Cardiac Arrhythmias. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(20):1473-82.
50. Hayashi M, Shimizu W, Albert CM. The Spectrum of Epidemiology Underlying Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*. 2015;116(12):1887-906.
51. Deyell MW, Krahn AD, Goldberger JJ. Sudden Cardiac Death Risk Stratification. *Circulation Research*. 2015;116(12):1907-18.
52. Bezzina CR, Lahrouchi N, Priori SG. Genetics of Sudden Cardiac Death. *Circulation Research*. 2015;116(12):1919-36.
53. Jasra SK, Badian C, Macri I, Ra P. Recognition of Early Myocardial Infarction by Immunohistochemical Staining with Cardiac Troponin-I and Complement C9. *Journal of forensic sciences*. 2012;57(6):1595-600.
54. Mondello C, Cardia L, Ventura-Spagnolo E. Immunohistochemical detection of early myocardial infarction: a systematic review. *International journal of legal medicine*. 2017;131:411-21.
55. Turillazzi E, Di Paolo M, Neri M, Riezzo I, Fineschi V. A theoretical timeline for myocardial infarction: immunohistochemical evaluation and western blot quantification for Interleukin-15 and Monocyte chemoattractant protein-1 as very early markers. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12(1):188.
56. Tian M, Yuan YC, Li JY, Gionfriddo MR, Huang RC. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Diseases and Translational Medicine*. 2015;1(1):18-26.
57. Pyati DAK. Heart-Type Fatty Acid Binding Protein: A Better Cardiac Biomarker than CK-MB and Myoglobin in the Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. 2015.
58. Zhu ZL, Wang P, You JB, Yue Q, Wang PF, Wang XL, et al. [Application of IMA and H-FABP in Forensic Diagnosis of Sudden Cardiac Death]. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2017;33(4):393-6.
59. Bing-Jie Hu^{1, *}, Yu-Chuan Chen², J-ZZ. IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE DEPLETION OF DESMIN, ACTIN AND MYOGLOBIN IN AUTOLYZED AND PUTREFIED NORMAL HUMAN MYOCARDIA. *Rom J Leg Med*. 2020; 121-126 [2020].

60. Jia J-z, Shen Y-w, Xue A-m, Zhao Z-q. Immunohistochemical analysis of cardiac troponin inhibitor in an experimental model of acute myocardial infarction experimental model and in human tissues. *Pathology-Research and Practice*. 2015;211(6):456-61.
61. Park KC, Gaze DC, Collinson PO, Marber MS. Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovascular research*. 2017;113(14):1708-18.
62. Jaffe AS, Wu AHB. Troponin Release—Reversible or Irreversible Injury? Should We Care? *Clinical Chemistry*. 2012;58(1):148-50.
63. Wang Q, Michiue T, Ishikawa T, Zhu B-L, Maeda H. Combined analyses of creatine kinase MB, cardiac troponin I and myoglobin in pericardial and cerebrospinal fluids to investigate myocardial and skeletal muscle injury in medicolegal autopsy cases. *Legal medicine*. 2011;13(5):226-32.
64. Barranco R, Ventura F. Immunohistochemistry in the Detection of Early Myocardial Infarction: Systematic Review and Analysis of Limitations Because of Autolysis and Putrefaction. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2018;28(2):95-102.
65. Xue Y, Zhao R, Du S-H, Zhao D, Li D-R, Xu J-T, et al. Decreased mRNA levels of cardiac Cx43 and ZO1 in sudden cardiac death related to coronary atherosclerosis: a pilot study. *International Journal of Legal Medicine*. 2016;130(4):915-22.
66. Schwuchow-Thonke S, Göbel S, Emrich T, Schmitt VH, Fueting F, Klank C, et al. Increased C reactive protein, cardiac troponin I and GLS are associated with myocardial inflammation in patients with non-ischemic heart failure. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
67. Cao Z, Jia Y, Zhu B. BNP and NT-proBNP as Diagnostic Biomarkers for Cardiac Dysfunction in Both Clinical and Forensic Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(8):1820.
68. Hashimoto T, Shibasaki F. Hypoxia-Inducible Factor as an Angiogenic Master Switch. *Frontiers in Pediatrics*. 2015;3.
69. Bass-Zubek AE, Godsel LM, Delmar M, Green KJ. Plakophilins: multifunctional scaffolds for adhesion and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21(5):708-16.
70. Mondello C, Ventura Spagnolo E, Cardia L, Sapienza D, Scurria S, Gualniera P, Asmundo A. Membrane Attack Complex in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: A Systematic Review for Post Mortem Applications. *Diagnostics*. 2020;10(11):898.
71. Guo X, Wang J, Elimban V, Dhalla NS. Both enalapril and losartan attenuate sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase remodeling in failing rat heart due to myocardial infarction. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2008;86(4):139-47.
72. Omran MM, Zahran FM, Kadry M, Belal AAM, Emran TM. Role of myeloperoxidase in early diagnosis of acute myocardial infarction in patients admitted with chest pain. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2018;39(3):337-47.
73. Bayes-Genis A, Conover CA, Overgaard MT, Bailey KR, Christiansen M, Holmes DR, et al. Pregnancy-Associated Plasma Protein A as a Marker of Acute Coronary Syndromes. *New England Journal of Medicine*. 2001;345(14):1022-9.
74. Nilsson E, Kastrup J, Sajadieh A, Boje Jensen G, Kjølner E, Kolmos HJ, et al. Pregnancy Associated Plasma Protein-A as a Cardiovascular Risk Marker in Patients with Stable Coronary Heart Disease During 10 Years Follow-Up—A CLARICOR Trial Sub-Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2020;9(1):265.
75. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M, Kato S, Fujiwara T, Fujiwara H. Expression of bcl-2 Protein, an Inhibitor of Apoptosis, and Bax, an Accelerator of Apoptosis, in Ventricular Myocytes of Human Hearts With Myocardial Infarction. *Circulation*. 1996;94(7):1506-12.
76. Depierre P, Ginet V, Truttmann AC, Puyal J. Neuronal autosis is Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase alpha 3-dependent and involved in hypoxic-ischemic neuronal death. *Cell Death Dis*. 2024;15(5):363.

77. Duncanson ER, Mackey-Bojack SM. Histologic Examination of the Heart in the Forensic Autopsy. *Academic Forensic Pathology*. 2018;8(3):565-615.
78. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419-.