UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE

“CAROL DAVIA” din BUCUREȘTI

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE

„CAROL DAVILA”, BUCUREŞTI

ŞCOALA DOCTORALĂ

DOMENIUL MEDICINĂ

Contribuții în estimarea intervalului postmortem în practica medico-legală

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. CURCĂ GEORGE-CRISTIAN

Student-doctorand:

ȚURLEA IOANA RUXANDRA

2026

Cuprins

Introducere……..……..……..……..……...1

I. Partea generală ……..……..……..……4

Capitol 1 Estimarea IPM prin metode convenționale……..…….4

1.1. Semnele cadaverice ……..……..…….4

1.1.1. Lividitățile cadaverice (*livor mortis*) ……..……...4

1.1.2 Rigiditatea cadaverică (*rigor mortis*) ……..……4

1.1.3 Răcirea cadaverică (*algor mortis*) ……..…….4

1.1.4 Autoliza (*autolysis*) ……..……..…….4

1.2 Etapele descompunerii cadavrului în aprecierea IPM …….....5

1.4 Entomologia medico-legală……..……..……....5

1.5 Estimarea IPM la fața locului și în studii de caz ……..6

1.5.1 Metode integrative: scorurile de descompunere în studii de caz …….6

Capitol 2 Estimarea IPM prin metode și tehnici de laborator ……..……6

2.1 Biomarkeri……..……..……..……...6

2.2. Metode de studiu de laborator ale IPM, tehnici și echipamente ……..6

2.3. Științele omice…….…….…….6

2.3.7 Aprecieri integrative asupra utilizării științelor omice în estimarea IPM……..……..……7

2.6.2 Reproductibilitatea datelor și inerpretarea rezultatelor…….9

2.6.3 Valoarea probatorie în justiție……..……..9

2.6.4 Aspecte etice ale estimării IPM prin metode de laborator…….9

II. Partea originală. Contribuţii personale……..…….10

Capitolul 3. Ipoteza de lucru şi obiectivele generale……..……..10

Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării……..……..…….10

Capitolul 5. Studiul metabolomic al umorii vitroase la cadavru folosind spectroscopia ATR-FTIR și analiza prin regresie multivariată în estimarea IPM……11

5.1. Introducere (scopul specific, ipoteza de lucru şi obiective specifice) 11

5.2. Material şi metodă ……..……..……11

5.2.1 Umoarea vitroasă……..……..……...11
5.2.2 FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy), ATR-FTIR (Attenuated total reflection)-FTIR ……..……..…….11
5.2.3 Locul desfășurării cercetării, temperaturile ambientale …….....12
5.2.4 Selecția cazurilor ……..……12
5.2.5 Calculul IPM ……..……..…….12
5.2.5.1. Calculul IPM pentru cohorta 1 și cohorta 2 …… …….12
5.2.5.2 Limitări în calculul IPM ……..……..12
5.2.6 Cazuistică ……..……..…….12
5.2.6.1. Cohortă 1- decese din spital (cazuri din spital), IPM cunoscut, IPM_C ……..……..……...12
5.2.6.2 Cohortă 2 - decese de la fața locului, IPM estimat la fața locului, IPM_E ……..……12
5.2.7 Protocolul de recoltare a umorii vitroase ……..…….....12
5.2.8 Protocol de biosecuritate pentru uz de laborator privind probe biologice umane (recoltare-transport-depozitare-prelucrare-analiză) a probelor de UV recoltate de la cadavru ……..…….12
5.2.10 Analiza datelor FTIR ……..……12
5.3. Rezultate ……..……..……..……13
5.3.1 Modificări spectrale în IPM ……..……..……...13
5.3.2 Clusterele 1 și 2 de valori a celor 30 spectre FTIR ……..…….14
5.3.3 Modelarea datelor prin metode de regresie ……..……15
5.3.3.1 Principalele componente ale analizei spectrale ……..……15
5.3.2.2 Metoda de regresie partial least square, PLS pentru predicția IPM…16
5.3.2.3 Predicția IPM pentru probe necunoscute folosind modelul PLS …..17
5.3.2.4 Clasificarea binară a probelor pentru trierea medico-legală …….18
5.3.2.5 Comparație între metodele de regresie pentru predicția IPM…….18
5.4. Discuţii ……..……..……..…….....19
5.4.2 Comparația rezultatelor cercetarii întreprinse cu studii de referință internaționale ……..……..…… .19

Capitolul 6. Studiul proteomic asupra degradării proteinelor în mușchiului scheletic la cadavru folosind testele imunologice Western Blot și ELISA pentru estimarea IPM……..……..…… . …….21

6.1. Introducere (scopul specific, ipoteza de lucru şi obiective specifice)……21

6.2. Material şi metodă ……..……..……..21

6.2.1 Testele imunologice ELISA, SDS-PAGE, Western Blot …….21

6.2.1.1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) …….21

6.2.1.2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, engl.) cu Western Blot ……..…….21

6.2.2 Vinculina, desmina, Troponina T cardiacă în mușchiul scheletic ….....21

6.2.3 Tipul cercetării, produsul biologic supus analizei ……..……..22

6.2.4 Cazuistica și limitele selecției cazurilor ……..…….22

6.2.5 Protocolul de biosecuritate ……..……..……...22

6.3 Rezultate ……..……..……..…….....22

6.3.1 Măsurătorile prin imunoteste a cazuisticii în studiu și compararea rezultatelor cu date din literatura de specialitate ……22

6.3.1.1 ELISA și limitele testării în studiul estimării IPM …….....22

6.3.1.2 Western Blot și limitele testării în studiul estimării IPM 23

6.4 Discuții ……..……..……..……..23

6.4.1 Valoarea și limitele testării degradării proteinelor în particular a vinculinei, desminei și Troponinei T în estimarea IPM ……..……..23

Capitolul 7. Concluzii şi contribuţii personale……..……..……..24

7.1 Concluziile cercetării doctorale întreprinse……..……..…….24

7.2 Contribuții personale ale cercetării doctorale……..……..……..25

Bibliografie……..……..……..……..……28

Lista cu lucrările științifice publicate (prezentare cronologică)

1.Web of Science 2026: **Țurlea, IR**; Curca, GC; Mernea, M; Matanie, AC; Fendrihan, S; Mihailescu, DF. FTIR Spectroscopy of Vitreous Humor for Postmortem Interval Estimation: A Multivariate Regression Approach. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES. 27/8, 3468, Q1 4.9/4,9 **[35]**

LINK-ul poate fi accesat la [https://www.mdpi.com/1422-0067/27/8/3468]

Provine din Introducere pag. 3-16, 2.3 Științele omice pag. 36, Fig 2.1 pag.37, 2.3.7 Aprecieri integrative, Fig. 2.2 pag.42, 2.6.2 Reproductibilitatea datelor pag.45, 2.6.3 Valoare probatorie in justitie pag.46, 2.6.4 Aspecte etice, pag.48, Contributii personale, cap. 3 pag.50, cap. 4 pag. 53, 55, 57, cap. 5 Studiul metabolomic al UV la cadavru folosind ATR-FTIR pag.58, capitol 5.1 Introducere pag. 58, 5.2 materiale si metoda pag.62-63, 5.2.4 selectia cazurilor pag.64 , 5.2.5 calculul IPM pag.67, 5.2.6 cazuistica pag.70, 5.2.8 protocol de biosecuritate la cadavru pag. 74, 5.2.9 procesarea probelor ATR_FTIR pag. 78, 5.2.10 analiza datelor FTIR pag. 82, 5.3 Rezultate pag. 87, 5.4 discutii, 5.3.2 clustere pag. 90, 5.3.3 modelarea datelor prin regresie pag. 95, 5.4 Discutii pag. 112, 5.4.4. Consideratii metodologice și limitări, noi directii de cercetare, pag. 116-120, 5.5. Concluziile studiului de metabolomică pag. 120.

2.PubMed 2026: **Țurlea IR**, Curca GC, Matei L, Stoica A. Death in Epilepsy: Ictogenic Vs. Cardiogenic Mechanisms and Immunoassays in Postmortem Interval Estimation - Case Report. MAEDICA (Bucur). 2026 Mar; 21(1):226-236. doi: 10.26574/maedica.2026.21.1.226. IPMD: 41978846; PMCID: PMC13061439, **[36].**

LINK-ul poate fi accesat la [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC13061439/]

Provine din Partea generala, 1.1.4 autoliza pag. 19, 2.3.3. Studii de proteomică pag. 38, 2.6 interepretarea rezultatelor de laborator pag. 44, o stiință omica? Pag. 44, reproductibilitatea pag. 45, valoarea probatorie pag. 46, aspect etice pag. 48, Contributii personale pag. 50,

Cap. 6 studiul proteomic 6.1 Introducere (scop, ipoteza, obiective) pag. 122, 6.2 material si metoda pag 123, 6.2.1.1. ELISA pag. 123, 6.2.1.2 SDS-PAGE cu Western Blot pag. 129, 6.2.2 Vnculina, desmina, Troponina T cardiaca pag. 135, 6.2.3 recoltare pag. 136, 6.2.4 cazuistica pag. 137, 6.3 rezultate pag. 139, 6.3.1.1. ELISA și limitele testării pag. 140, , 6.3.1.2 Western Blot și limite, pag. 143, 6.4. Discutii valore si limite pag. 144, noi cercetari, pag. 146, 6.5 concluzii studiu proteomică pag. 147

3. PubMed 2025: **Țurlea IR**, Curca GC. Recent Advances in Forensic Medicine at the Horizon of Omics Sciences and New Biomarkers for Postmortem Interval Estimation. MAEDICA (Bucur). 2025 Dec;20(4):851-863. doi: 10.26574/maedica.2025.20.4.851. IPMD: 41537070; PMCID: PMC12767902, **[1]**
LINK-ul poate fi accesat la [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12767902/]

Provine din Introducere pag. 1-13, Partea generala, 1. Estimarea IPM prin metode conventionale pag. 17-26, 2. Estimarea IPM prin metode si tehnici de laborator pag. 32-43, Biomarkeri Tabel 2.1 pag. 32, Tabel 2.2. metode si tehnici pag. 35, Fig. 2.1 Estimarea IPM pag. 37, Fig. 2.2 Stiințe omice studiile pe om, pag. 42, 2.6 Interpretarea rezultatelor de laborator pag. 44-48, o știință omica? pag. 44, reproductibilitatea pag. 45, valoarea probatorie in justitie pag. 46, aspecte etice pag. 48

4.BDI 2025: **Țurlea IR,** G. Curca, L. Matei, C. Trandafir, F. Perde. Limitations of ELISA immunological analyses in determining the postmortem interval. Rom J Leg Med33(2)162-165(2025), DOI:10.4323/rjlm.2025.162, **[37]**

LINK-ul poate fi accesat la [https://rjlm.ro/index.php/arhiv/1052]

Provine din Partea generala, 2.6. Interpretarea rezultatelor de laborator în estimarea IPM pag. 44, partea II Contributii personale, 6. studiul proteomic, 6.2. Material si metoda, 6.2.1.1 ELISA pag. 123, 6.2.1.2 SDS-PAGE cu Western Blot pag. 129, 6.3.1.1. ELISA si limitări pag. 140, 6.4.1 valoarea si limitele testarii degradarii proteinelor pag. 144, 6.4.2 noi cercetari pag. 146.

Lista cu abrevieri şi simboluri

ADD, accumulated degree-days, engl.

ATR, Attenuated Total Reflection

CTG, convulsii tonico-clonice generalizate

cTnT, Troponină cardiacă T izoformă cTnT

DAFAB, Departamentul de Anatomie și Fiziologie Animală și Biofizică, Facultatea Biologie, Universitatea București

DPM, data probabilă a morții

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, engl.

EMSC, Extended Multiplicative Signal Correction

FTIR, Fourier-transform infrared spectroscopy

INML MM, Institutul Național de Medicină Legală Mina Minovici București

IPM, interval postmortem

IPM_C cunoscut

IPM_E estimat

LDA, analiza liniară discriminantă

LOOCV, leave-one-out cross validation

MAE, mean absolute error, engl., eroare medie absolută

OD, ochi drept

OLS, Ordinary Least Squares

OS, ochi stâng

PLS, Partial Least Squares DA, PLS-analiza discriminantă, regresie multivariată

PC, componente principale

PCA, analiza componentei principale

PYTHON limbaj de programare superior cu algoritmi de interpretare

R^2, coefficient de determinare

RAMAN, Spectroscopie

RANSAC, RANdom SAmple Consensus

RANDOM FOREST, algoritmi care îmbunătesc acuratețea predicției și suprapunerile

RMSD, root mean squared deviation, engl. deviația mediei rădăcinii pătrate

RMSE, root mean squared error, engl., eroarea mediei radăcinii pătrate

SERCA, reticulului sarcoendoplasmatic

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, engl.

SVM, Mașini de Suport Vectorial

TSD, Timp scurs de la moarte

UB, Universitatea București

UMFCD Universitatea de Medicină și Farmacie Carol Davila

UV, umoare vitroasă

VIP scoruri cu importanță variabilă în proiecție

Western Blot, engl.

Introducere

Estimarea intervalului postmortem (IPM) este una dintre etapele importante în cercetarea la fața locului în fiecare caz de deces, având o mare însemnătate judiciară în moartea suspectă sau într-un caz de omor, în cadrul cercetării sau al constituirii listei suspecților. Estimarea IPM aduce dificultăți în ancheta judiciară și poate orienta organele de cercetare în alegerea unei piste. În practica medico-legală am întâlnit cazuri în care aflarea IPM a putut ajuta ulterior la descoperirea adevărului. Tema pe care am ales-o, estimarea IPM, este un factor de noutate la nivel national, în care am întreprins două studii pe produse biologice umane, beneficiind de aportul unor echipe interdisciplinare, acesul în laboratoare specializate de proteomică și metabolomică: *studiul experimental de metabolomică* a fost realizat în echipă interdisciplinară medic legist-biolog-fizician și m-a condus spre Departamentul de Anatomie, Fiziologie Animală și Biofizică (D.A.F.A.B.) din Facultatea de Biologie a Universității București, UB; *studiul non-experimental de proteomică* spre a lucra în echipă interdisciplinară ca medic legist cu biolog și medic de laborator în Laboratorul de Serologie Medico-Legală din Institutul Național de Medicină Legală „Mina Minovici" București, *Ipoteza de cercetare în studiul metabolomic* a fost următoarea: dacă selectăm un lot (cohortă) de cazuri decedate în spital cu IPM cunoscut IPM_C, fără alte criterii speciale de selecție pentru a păstra heterogenitatea și complexitatea cazurilor (randomizare stratificată) și vom recolta umoare vitroasă, UV, pe care o cercetăm spectroscopic prin metoda spectroscopică, tehnica ATR_FTIR, vom cunoaște spectrul metabolic al UV al acestor cazuri la diferite IPM cunoscute la care vom aplica regresie multivariată pentru a obține un model spectroscopic corespunzător, pe care apoi îl aplicăm unor cazuri reale din teren cu IPM necunoscut, care a fost estimat prin metode convenționale la fața locului, IPM_E, urmând a verifica corespondența dintre estimarea convențională și estimarea spectrală ATR-FTIR cu scopul de a aplica acest model cazurilor cu IPM necunoscut din cazuistica reală medico-legală. *Ipoteza de cercetare în studiul proteomic* a fost umătoarea: dacă selectăm un caz din mediul spitalicesc, care a decedat la date cunoscute (zi, ora, minut), în care IPM este cunoscut în raport cu data autopsiei (zi, ora, minut), 36.8 ore și vom recolta, cu ocazia autopsiei medico-legale, mușchi scheletic ca probă biologică pentru a determina în laboratorul de imunologie valorile de degradare autolitică a 3 biomarkeri proteici: vinculina, desmină (proteine de citoschelet celular) și Troponina T cardiacă, cTnC folosind tehnica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, engl.) și vinculina prin electroforeză SDS-Page (sodium

dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, engl.) cu Western Blot (immunoblotting, engl.), am putea compara valorile rezultate cu literatura de specialitate, ceea ce ne-ar permite, pe o cazuistică selectată, să apreciem utilitatea studiului degradării proteice pentru estimarea IPM și pe de altă parte, am putea folosi rezultatele obținute ca valori de referință, benchmark, pentru IPM studiat, 36.8 ore.

Limitele cercetărilor efectuate

Printre limitările studiului metabolomic pot enumera:

- numărul relativ redus de cazuri;
- selecția aleatorie pseudostratificată a cazurilor nu a făcut diferența între cauzele morții, tratamentul acordat în spital, alte condiții, astfel încât interferența condițiilor interne (confounding factors) și externe (extraneous factors) a fost complexă (această heterogenitate a cazurilor ca limitare a condus design-ul cercetării spre cazurile reale medico-legale, în care medicul legist nu selectează cauzele morții);
- IPM a fost, pentru cohorta cazurilor din spital, o variabilă indepedentă, iar pentru cohorta cazurilor din teren o variabila dependentă (această limitare a condus design-ul cercetării spre cazurile reale medico-legale);
- calculul IPM al cazurilor din teren, IPM_E are condiționări dependente de factorii de mediu: temperatura, umiditatea, prezența hainelor, dispunerea pe sol/în sol, felul solului, etc., dar și momentul anunțului descoperirii cadavrului, etc.;
- lipsa datelor detaliate privind mediul (în special temperatura, umiditatea, etc.) a împiedicat dezvoltarea unor modele corectate în funcție de temperature;
- lipsa cunoașterii prin electroforză a compoziției UV anterior analizei spectrale.

Printre limitările studiului proteomic pot enumera:

- un singur caz selectat și prezentat;
- cauza decesului (epilepsie cu crize de grand mal și convulsii generalizate) este o limitare, întrucât poate interfera modelele de degradare a proteinelor datorită modificării metabolismului muscular (mușchi scheletic regenerativ, cu posibilă rabdomioliză);
- deși IPM este cunoscut, 36.8 ore, temperatura de răcire a corpului, până când ajunge la temperature de 4^0C - temperatura de refrigerare, nu este cunoscut (calculul ADD [°d] = timp [d] × temperatură [°C]). Toate temperaturile trebuie cunoscute și avute

în vedere: temperatura mediului ambiant în care se răcește corpul, timp de răcire, temperatura de refrigerare, temperatura camerei de autopsie, temperatura de lucru în laborator (chiar dacă prepararea se face pe gheață);

- lipsa controlului creatinkinazei pentru rabdomioliză;
- ELISA are un protocol de lucru complex, care impune o bună cunoaștere și specialiști.

Perspective de continuare a cercetărilor. Pentru o cât mai utilă aplicație în practica medico-legală și o valoare translațională crescută, decurgând din interdisciplinaritate, cercetările trebuie continuate atât metabolomic cât și, mai ales, proteomic, pentru a oferi validitate, pentru a verifica rezultatele și a confirma aspectele noi identificate, astfel încât să ofere, dincolo de valoare exploratorie și o valoare cert validat experimentală. Cercetarea poate fi continaută păstrând design-ului actual al studiului metabolomic, care să fie extins și la cel proteomic: două cohorte, una cu IPM cunoscut IPM_C - decese în spital, față de care să se construiască un model ce va fi aplicat pe cohorta 2 - cazuri din teren. Selecția cazurilor având în vedere (1) condițiile interne (cauza morții, comobidități și tratamentul aplica în spital), (2) cunoașterea temperaturilor în cazurile din teren (inclusiv meteorologic), (3) intervale IPM selectate cronologic IPM 24-26, IPM 36-48, IPM 48-72, IPM 72-96 ore și > 96 de ore. Apreciem că metoda cohortelor este superioară studiului intracorporeal la intervale IPM diferite, pentru că aceasta ar presupune conservarea în refrigerație prelungită a cadavrului și efectuara repetată a recoltării probelor, precum și metodei extracorporeale, care presupune congelaera și dezghețarea probelor la IPM diferite care aduce condiții de laborator net diferite de cazurile reale, (4) cunoașterea condițiilor interne/externe (confounding și extraneous factors). O altă perspectivă este o aliniere a IPM în studiul de laborator și IPM de descompunere a cadavrului (de exemplu, intervalul post-mortem scurt, așa cum este definit în studiile de laborator, < 7 zile, este inclus parțial în faza precoce de descompunere post-mortem și parțial în faza tardivă de descompunere post-mortem, în timp ce intervalul post-mortem intermediar <120 de zile și intervalul post-mortem târziu (> 120 de zile) aparțin amandouă fazei tardive de descompunere a corpului) cu corelarea conceptualizării IPM și descompunerii cadavrului.

I. Partea generală (Stadiul actual al cunoașterii)

Capitol 1 Estimarea intervalului postmortem folosind metode convenționale

1.1. Semnele cadaverice

1.1.1. Lividitățile cadaverice, hipostaza (*livor mortis*)

Dupa încetarea activității cardiovasculare sub acțiunea factorului gravitational, sângele fluid se acumulează treptat în patul capilar decliv, unde determină o colorare violaceu-albăstruie: începe la 1-2 ore, este evidentă începând cu 2-4 ore, complet instalată la 10-12 ore [1].

1.1.2 Rigiditatea cadaverică (*rigor mortis*)

Lipsa oxigenului după încetarea respirației duce inițial la scăderea ATP, apoi la resinteza prin glicoliza anaerobă și reacția creatinkinazei, apoi la epuizarea resurselor, cu modificarea conformațională a filamentelor de actină și miozină și generarea unor punți între miofilamente. O dată cu scăderea ATP, scade în fibrele musculare și decuplarea actinei-miozinei (sub 85%) și, astfel, apare rigiditatea [2,3] care se manifestă la toți mușchii deodată, dar devine observabilă clinic la 2-4-6 ore la nivelul mușchilor capului (pleoape, orbiculari, facial, mandibular, mușchi cu volum mai mic) și progresează apoi conform legii Nysten (1881), „marșul rigidității" cap, trunchi, membre inferioare, membre superioare pentru a se generaliza la 12 ore; O dată cu proteoliza complexului actină-miozină [4] și debutul de putrefacție, rigiditatea intră în rezoluție, cu dispariție completă spre 36 de ore [5,6].

1.1.3 Răcirea cadaverică (*algor mortis*)

Temperatura corpului (măsurată rectal) este probabil cea mai fiabilă metodă de determinare a IPM precoce ("gold standard") în condiții cunoscute și stabile de temperatură externă [49]: scăderea este de aproximativ 1°C/oră (1,5 °F/oră) în primele 12 ore și 1,5 °C/oră (1 °F/oră) în următoarele 12-18 ore, de 2 ori mai repede în climă tropicală [50]. Nomograma Hennsge este gold standard-ul pentru IPM precoce în primele 10 ore conform B = -1.2815 (greutate corpului - 0.625) + 0.0284, arătând că ecuația depinde de greutatea corpului [7, 8].

1.1.4 Autoliza (autolysis)

După moarte, țesuturile sunt sub acțiunea enzimelor proprii care se exteriorizează prin destabilizarea membranelor intracelulare și celulare și se manifestă activ degradând structurile organice și diversele molecule și compuși proteici, lipidici, nucleici etc. Autoliza se produce fără consum de energie și interesează toate celulele, structurile tisulare și organele corpului. Stă la

baza putrefacției și descompunerii corpului, fiind procesul invers construcției, sintezei și organizării structurilor corpului. Autoliza se însoțește de modificări ale compoziției întregului organism, dar mai studiate în ultimii ani au fost modificările tanatochimice (studii de tanatochimie) [9] ale globului ocular, precum cele privind hipoxantina [10, 11], potasiul [11], a metaboliților din umoarea vitroasă (studii de metabolomică) de către Zhang J. începând cu 2018 [12], beneficiind ulterior de aportul ATR-FTIR, spectroscopia în infrarosu cu transformare Fourier [13,14,15,16] preocupare științifică în care se include și studiul personal de metabolomică din cercetarea doctorală prezentă [17]. Tanatochimia aduce analize asupra modificarilor chimice în fluidele biologice umane, precum în lichidul pericardic [18], lichidul cefalorahidian, inclusiv în studii comparative, de exemplu cu umoarea vitroasa [19], etc.

Primele studii de proteomică privind degradarea proteinelor în autoliză au fost imaginate de catre Pittner S. în anul 2015-2016 [20,21], context științific în care se include și studiul personal de proteomică din cercetarea doctorală prezentă [22].

1.2 Etapele descompunerii cadavrului în aprecierea IPM

Descompunerea cadavrului parcurge mai multe stadia, o dată ce autoliza începe procesul dezagregării structurii înalt organizate [23]: stadiul precoce (fresh), care include autoliza și debutul putrefacției, stadiul inițial (putrefacția), stadiul progresiv, stadiul de scheletizare [5].

Alți autori [24] consideră potrivite alte 5 etape, care de asemenea pot fi folosite în evaluarea IPM:

a. descompunere inițială (1-3 zile) echivalent fresh state, initial decay, engl.
b. putrefacție umflată (4-10 zile) echivalent bloat state, putrefaction, engl.
c. putrefacție neagră (10-20 zile) echivalent active decay, black putrefaction, engl.
d. fermentație butirică (20-50 zile) echivalent advanced (post decay), engl.
e. descompunere uscată 50-365 zile echivalent dry decay, engl.
f. rămășițe umane : 365 zile (Payne, [23])

Modificările convenționale sunt de obicei acceptate judiciar de către organele de cercetare sau de către instanțe, cu precădere cele care sunt susținute obiectiv științific prin rezultate de laborator, precum măsurătorile temperaturii.

1.4 Entomologia medico-legală

Există două metode de evaluare a IPM folosind entomologia medico-legală [25]:

1) evaluarea succesiunii insectelor (valul de succesiune) dependente de zona geografică și de condițiile de mediu [26].
2) urmărirea dezvoltării insectelor imature recoltate de pe cadavru, ce sunt observate într-un mediu controlat [25].

1.5 Estimarea IPM la fața locului și în studii de caz

1.5.1 Metode integrative: scorurile de descompunere în studii de caz

Studiul descompunerii și folosirea unor scoruri de descompunere, cu deosebire pentru etapa postmortem tardivăm devin însă util [27-31, 32]. O metodă cantitativă a fost numită scorul total corporal, total body score, engl. TBS [29]. Combinând TBS cu acumulare de zile-temperatură, accumulated degree-days, ADD, engl., [26] se poate estima cu mai multă acuratețe IPM atunci când se iau în considerare și diferențele de temperatură în contextul descompunerii, mai ales a descompunerii avansate [33], scorul hepatic de descompunere, hepatic decomposition score, engl. HDS [26,27], sistemul de scor TADS pe corpul întreg în spațiile acvatice [28], scorul de descompunere totală, total decomposition score, engl. [30] sau formula universală [31].

Capitol 2 Estimarea IPM prin metode și tehnici de laborator

2.1 Biomarkeri

Descoperirea unor noi biomarkeri este de o mare importanță nu doar pentru dezvoltarea științei, dar și pentru a obține biomarkeri cât mai specifici care să manifeste un comportament predictiv superior.

2.2. Metode de studiu de laborator ale IPM, tehnici și echipamente

IPM poate fi studiat prin multiple metode și tehnici de laborator microscopie, fluorescență în ultraviolet, microscopie în infraroșu, microscopie electronică SEM, chemiluminiscență, testul cu radiocarbon, biochimie, spectroscopie în infraroșu, inclusiv FTIR, spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier sau ATR-FTIR, reflectanță atenuată totală FTIR, spectroscopie RAMAN, care măsoară dispersia luminii prin material, analiza energiei dispersive în raze X, EDX, micro CT, LC-MS, LC-MS/MS, Maldi Toff, etc.

2.3 Științele omice

Omicele (omics, engl.) este un termen care a început să fie folosit începând cu anii 1990 prin preluarea unui neo-sufix din limba greacă (oma, gr.) pentru a desemna un întreg, “un set întreg”, ”o totalitate din ceva”, în biologie “o totalitate de molecule” [56]. Științele omice

cuprind astăzi genomica (ADN), transcriptomica (ARN), proteomică (proteine), metabolomică (metaboliti), lipidomică (lipide) [56].

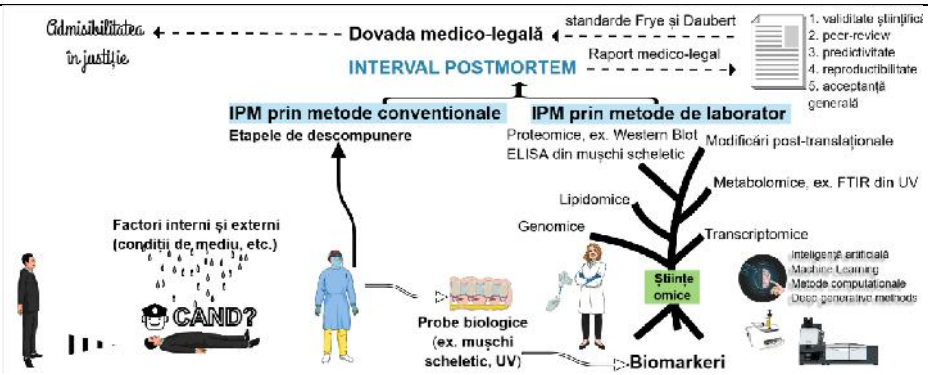


Fig 2 Reprezentare grafică originală folosind Mind the Graph a estimării IPM prin metode convenționale și de laborator. Sarcina probei (burden of proof, engl.) revine medicinii legale și experților medico-legali, care asigură obiectivitatea științifică cu respectarea standardelor Frye și Daubert și a celor 5 criterii de admisibilitate în justiție: validitate științifică și contradictorialitate (peer-review), predictibilitate, reproductibilitate, acceptanță generală. Modificat după [56].

2.3.7 Aprecieri integrative asupra utilizării științelor omice în estimarea IPM

Doar în anul 2025, un număr de 22 review-uri în acest domeniu vin să aducă cunoaștere și noutăți în estimarea IPM, ceea ce susține o dezvoltare a informației fără precedent în acest domeniu, importanța și actualitatea temei de studiu, estimarea IPM, temă în care se încadrează prezentul studiu doctoral, modernitatea cercetării în IPM prin dezvoltarea metodelor și tehnicilor de laborator, cu precădere a științelor omice în ce privește estimarea IPM [55] (cerecetări între care se încadrează, de asemenea, studiile de metabolomică și proteomică ale cercetării doctorale, ce vor fi prezentate în partea specială), "omice", "multi-omice" în IPM [57], înțelegerea actuală a IPM și viitoare direcții de cercetare [58].

Am extins cercetări anterioare [20,21] privind studiile pe om care estimează IPM și care folosesc în laborator produse biologice umane și am reușit să identific, actualizând căutările, inclusiv cu anul 2026, un număr de 21 de studii postmortem pe om (Figura 1). Estimarea IPM folosind metodele și tehnicile științelor omice la nivelul anului 2025 scoate în evidență 26 de studii, dintre care 17 prin studii de proteomică, 9 prin studii de metabolomică, două studii de lipidomică și un studiu de multiomică [34]. Dintre acestea, 17 studii sunt asupra IPM precoce,

8 asupra IPM mediu si 4 asupra IPM lung [35]. 11 studii (42,30%) au analizat țesuturi umane și au preluat spre studiu probe biologice de la cadavru, restul modele de animale: 3 studii au publicat studiul cu rezultate și pe animal si pe om.

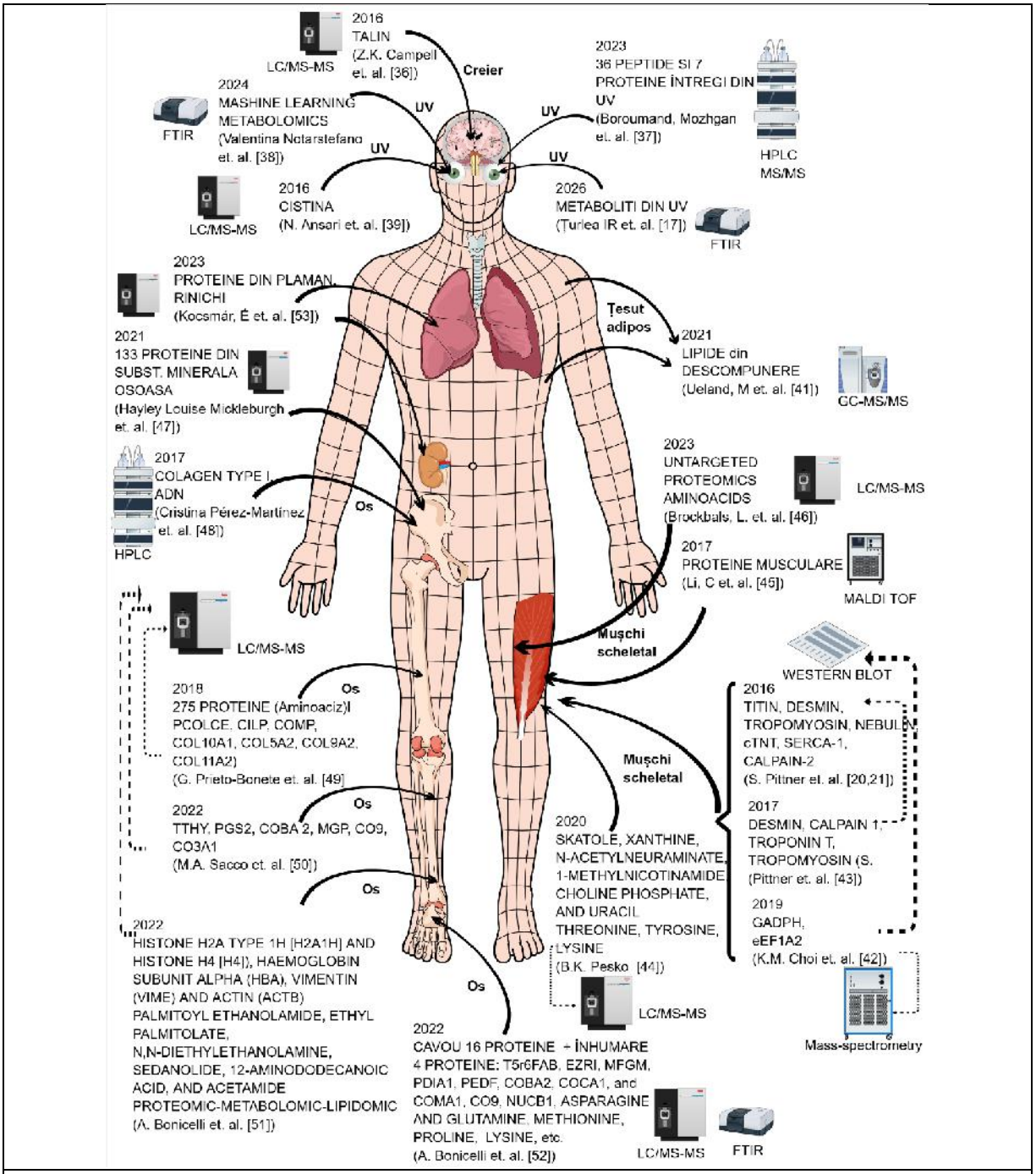


Fig. 1 Reprezentare infografică a cercetărilor în domeniul științelor omice [56]. Căutările noastre au condus la identificarea a 21 de studii pe om care sunt figurate alăturat. Creație originală folosind Mind the Graph, modificat după [56].

În cercetarea noastră a referințelor bibliografice am găsit 22 de studii pe om, inclusiv studiile prezente [17,22]. Ca produse biologice umane sunt folosite creierul [36], umoare vitroasă [17, 17,38,39], organe (plămân și rinichi) [40], țesut adipos [41], mușchi scheletic (cu precădere pentru estimarea IPM scurt) [42,20,21,43,44,45,46], os și ligamente (cu precădere pentru estimarea IPM lung) [47,48,49,50,51,52]. Ca tehnici se folosesc LC/MS-MS [36,53,47,49,50, 51,52,44], spectroscopie de masă [42] HPLC si HPLC-MS [37,48], FTIR [35,52], Maldi-TOF [45], Imunoanaliza Western Blot [20,21,43]. Doar în anul 2025, un număr de 22 review-uri în acest domeniu vin să aducă cunoaștere și noutăți în estimarea IPM, ceea ce susține o dezvoltare a informației fără precedent în acest domeniu, importanța și actualitatea temei de studiu, estimarea IPM, temă în care se încadrează prezentul studiu doctoral, modernitatea cercetării în IPM prin dezvoltarea metodelor și tehnicilor de laborator, cu precădere a științelor omice în ce privește estimarea IPM [55,56].

2.6.2 Reproductibilitatea și interpretarea datelor

Cunoașterea condițiilor interne/externe și selecția cazurilor care să aibă în vedere acești factori ar conduce spre date cu reproductibilitate crescută.

2.6.3 Valoarea probatorie în justiție

Obligația sarcinii probei revine expertului medico-legal, care prin concluziile sale validează datele și rezultatele de laborator. Aceasta presupune corelarea datelor din perspectiva reproductibilității, acceptanței, validității științifice, adică a standardelor Frye și Daubert, pentru a fi admisibile în justiție, care revine, desigur justiției. Complementaritatea, interdisciplinaritatea, transdisciplinaritatea, cercetarea translațională pot crește admisiblitatea: studiile întreprinse au fost și interdisciplinare și translaționale.

2.6.4 Aspecte etice ale estimării IPM prin metode de laborator

Respectarae eticii cercetării, a consimțământului informat, a avizului de etică, a declarației de la Helsinki și a Codului Deontologic al medicului CMR.

B. Partea originală (Contribuţii personale)

Capitolul 3. Ipoteza de lucru şi obiectivele generale

Cercetarea are *scopul general* să evidențieze utilitatea investigațiilor de laborator în estimarea IPM prin analiza degradării postmortem a metaboliților (studiu de metabolomică) și a degradării postmortem a proteinelor (studiu de proteomică). Întotdeauna, la fața locului se solicită de către organele judiciare un estimat al IPM, care se apreciază prin metode convenționale (modificări postmortem, stadiul lividităților, rigidității, temperatură, stadiul deshidratării, fenomene de debut de putrefacție, descompunerea cadavrului, activitatea larvelor, etc.) pe care judiciariștii le integrează în cadrul datelor de anchetă obținute de la martori, etc., dar care se poate rafina prin îngustarea IPM și reconfirmarea datelor obținute prin metoda convențională folosind rezultate ale investigațiilor de laborator.

Obiectivul general este să surprindă modificări postmortem biochimice și moleculare ale metaboliților și proteinelor din țesuturile și produsele biologice umane și să identifice comportamente predictive utile pentru aprecierea intervalului postmortem, cu precădere în perioada IPM precoce. Obiectivele specifice vor fi detaliate o dată cu prezentarea fiecărui studiu în parte.

Ipotezele generale de lucru au fost prezentate în capitolul de Introducere.

Capitolul 4. Metodologia generală a cercetării

Ambele studii de cercetare au fost pe om și produse biologice umane: studiul de metabolomică este un studiu experimental, iar studiul de proteomică un studiu non-experimental observațional, în care au fost cercetate în degradarea în mușchiul scheletic: vinculina, desmina și troponina T cardiacă. Studiul non-experiemental, spre deosebire de studiul experimental poate avea în vedere nu numai variabilele independente și dependente, dar și ceilalți factori, precum factori terți (extraneous factor, engl.) și factori interni, care pot fi confuzionali în cercetare, astfel încât să permită o apreciere cât mai completă a degradării proteinelor, precum se întâmplă într-un caz real. Studiul de metabolomică are IPM drept variabilă independentă pe lotul de control (cohorta 1), unde prin alegerea cazurilor cu IPM cunoscut, IPM_C s-a încercat dezvoltarea unui posibil model metabolomic (al analizelor spectrale FTIR în UV) și care să fie aplicat pe lotul de studiu (cazuri din teren) la care la fața locului cu IPM necunoscut s-a estimat un IPM estimat, IPM_E prin metode convenționale, în care IPM este o variabilă dependentă, respectiv care se

măsoară (se evaluează). Studiul de proteomică în schimb are IPM ca variabilă independentă (care se cunoaște de la început) în cazul avut în cercetare: variabilele dependente (care se măsoară) sunt proteinele studiate, vinculina, desmina si Troponina T cardiacă în procesul lor de degradare din mușchiul scheletic. Cercetarea desfășurată în cadrul studiului de metabolomică folosește două instrumente matematice capabile să administreze baze de date ample și să coreleze predictiv mai multe variabile: (1) șirul Fourier, care stă la baza algoritmului ce permite analiza datelor pe care le recepționează spectrosopul cu infraroșu în cadrul echipamentului FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, engl.) și (2) regresia multivariată. În cadrul metodologiilor generale folosite în cercetarea desfășurată, atât pentru studiul metabolomic, cât și pentru cel de proteomică, putem include și respectarea principiilor etice.

Capitolul 5. Studiu metabolomic al umorii vitroase la cadavru folosind spectroscopia FTIR și analiza prin regresie multivariată în estimarea IPM

5.1 Introducere. Scop, ipoteze, obiective specifice, aspecte prezentate deja în introducerea rezumatului.

Obiectivele specifice studiului metabolomic:

a) Cercetare extensivă a literaturii de specialitate
b) Analize spectrale a UV cadaverice
c) Constituirea unui protocol de transport și de biosecuritate a probelor biologice
d) Folosirea metodelor de interpretare statistică (regresie multivariată, etc.) pentru a genera un model spectral ce poate fi aplicat pe cazuri din teren cu IPM necunoscut, IPM estimat $IPM_{E,}$ astfe încât să valideze IPM_E prin metode convețională și verificarea aplicabilității modelului în cazuri reale.
e) Stabilirea limitelor aplicabilității modelului bazat pe profilul metabolomic al UV
f) Identificarea unor direcții de cercetare ulterioară

5.2 Material şi metodă

5.2.1 Umoarea vitroasă a fost recoltată de la cadavru în timpul autopsiei din ambii ochi, OD, OS, la fiecare caz.

5.2.2 FTIR, ATR-FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, engl.) a fost metoda de spectroscopie folosită pentre analiza spectrală în infraroșu.

5.2.3 Locul desfășurării cercetării a fost atât INML Mina Minovici București (autopsia medico-legală, recoltarea probelor, inițierea protocolul de transport) cât și Departamentul de Anatomie și Fiziologie Animală UB, DAFAUB (depozitare probe, punere în lucru, analize spectrale, interpretare statistică prin regesie multivariată).

5.2.4 **Selecția cazurilor:** Cohortă 1, 20 decese din spital (cazuri din spital), cu IPM cunoscut, IPM_C (lot de control)**,** criterii de includere: decese din spital cu IPM cunoscut, IPM_C (randomizare stratificată), criterii de excludere: cazuri nespitalizate și cohorta 2, 10 decese de la fața locului, IPM_E (lot de studiu) cu criterii de includere decese din teren nespitalizate cu IPM necunoscut, la care s-a estimat IPM prin metode convenționale IPM_E, criterii de excludere: decese din spital (cazuri internate) sau cu IPM cunoscut.

5.2.5 Calculul IPM

Calculul IPM pentru cohorta 1 și cohorta 2

> *IPM_C = (Data autopsiei la momentul autopsiei, zi, ora, minut) – (Data decesului la momentul decesului, zi, ora, minut), data cunoscută IPM_C sau estimate IPM_E*

5.2.6 Cazuistică

5.2.6.1. Cohortă 1- decese din spital (cazuri din spital), IPM cunoscut, IPM_C [17].

5.2.6.2. Cohortă 2- decese de la fața locului, IPM estimat la fața locului, IPM_E [17].

5.2.7 Protocolul de recoltare a umorii vitroase. Din ambii ochi, OD, OS, câte 1ml UV pe gheață.

5.2.8. Protocolul de biosecuritate pentru uz de laborator. A fost dezvoltat un protocol de biosecuritate (ce include recoltarea probelor, depozitare în INML MM, transport, depozitare în DAFAB UB, prelucrare probe prin ATR-FTIR în laboratorul DAFAB UB, analiza spectrală, interpretarea datelor, returnarea deșeurilor biologice la INML MM) [17].

5.2.10 Analiza datelor FTIR. Analiza datelor a fost făcută cu Python (v3.11.7; Python Software Foundation, Wilmington, DE, SUA) folosind bibliotecile NumPy (versiunea 1.21.0), pandas (versiunea 1.3.0), SciPy (versiunea 1.7.0) și scikit-learn (versiunea 1.0.2) [17]. A cuprins procesarea spectrală, transformarea derivatei a doua cu centrarea pe medie, analiza intensității vârfurilor, analiza componentei principale (PCA), regresia PLS (Partial Least Squares), calibrarea modelului final, interpretarea spectrală, clasificarea binară a mostrelor, analiză

comparativă a metodelor de regresie prin metoda celor mai mici pătrate obișnuite (OLS), metoda celor mai mici pătrate parțiale (PLS), regresia Huber, regresia Theil–Sen, RANSAC (RANdom SAmple Consensus). Toate metodele de regresie au fost aplicate pe aceleași date spectrale preprocesate și evaluate folosind LOOCV. Performanța modelului a fost evaluată folosind RMSE, MAE și R2 [17].

5.3. Rezultate

5.3.1 Modificări spectrale în IPM. Spectrele FTIR ale probelor UV cu IPM cunoscut (cohorta 1) au fost analizate pentru a caracteriza variația vârfurilor de absorbție în funcție de IPM. Exemple de spectre FTIR măsurate pe probe cu IPM diferit (interval 1800 – 700 cm-1) sunt prezentate în Figura 3, [17]. Aceste vârfuri reflectă principalii constituenți biochimici ai UV analizate, peptide (~1663 cm-1, ~1630 cm-1, ~1315 cm-1), aminoacizi liberi (~1414 cm-1), lipide (~1456 cm-1), lactat (~1121 cm-1, ~855 cm-1), glucoză și alți monozaharide (~1041 cm-1), acizi nucleici (~925 cm-1) sau uree, creatinină și acid uric (~1580 cm-1) [17].

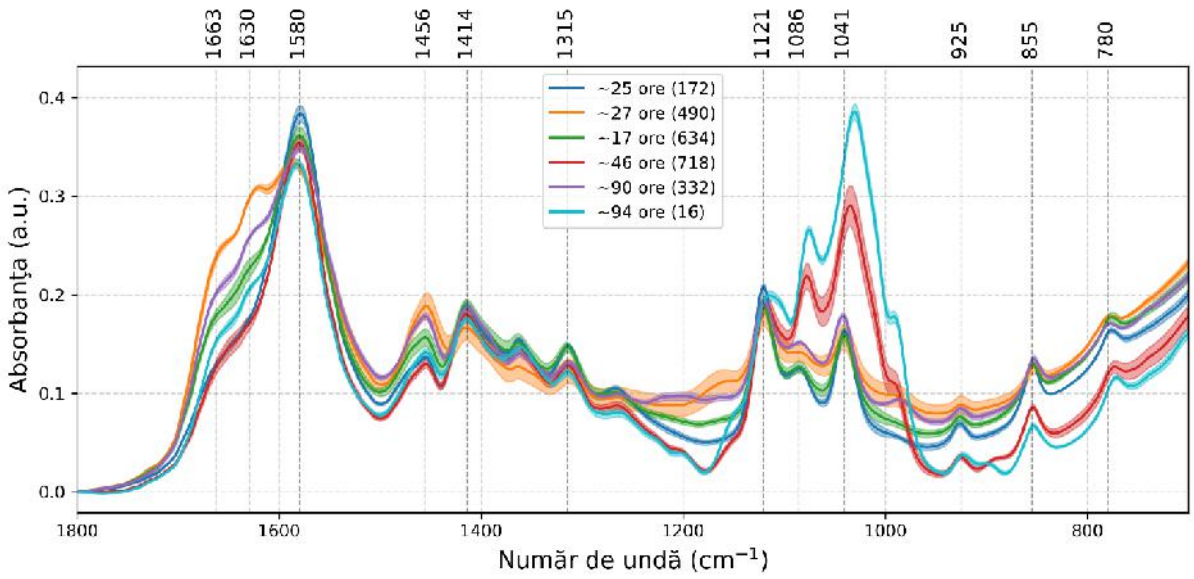


Fig. 3 Spectrele FTIR ale probelor cu IPM cunoscut, IPM_C: 172 (~25 ore, linia albastră), 490 (~27 ore, linia portocalie), 718 (~46 ore, linia roșie), 332 (~90 ore, linia violetă), 16 (~94 ore, linia cyan) și o probă cu IPM necunoscut: 634 (IPM estimat ~17 ore, linia verde). Liniile reprezintă valorile medii obținute din repetări, iar nuanțele reprezintă abaterile standard, n = 4. Vârfurile diagnostice sunt marcate cu linii punctate, iar numerele de undă corespunzătoare sunt indicate deasupra acestora [17].

5.3.2. Clusterele 1 și 2 de valori a celor 30 spectre FTIR

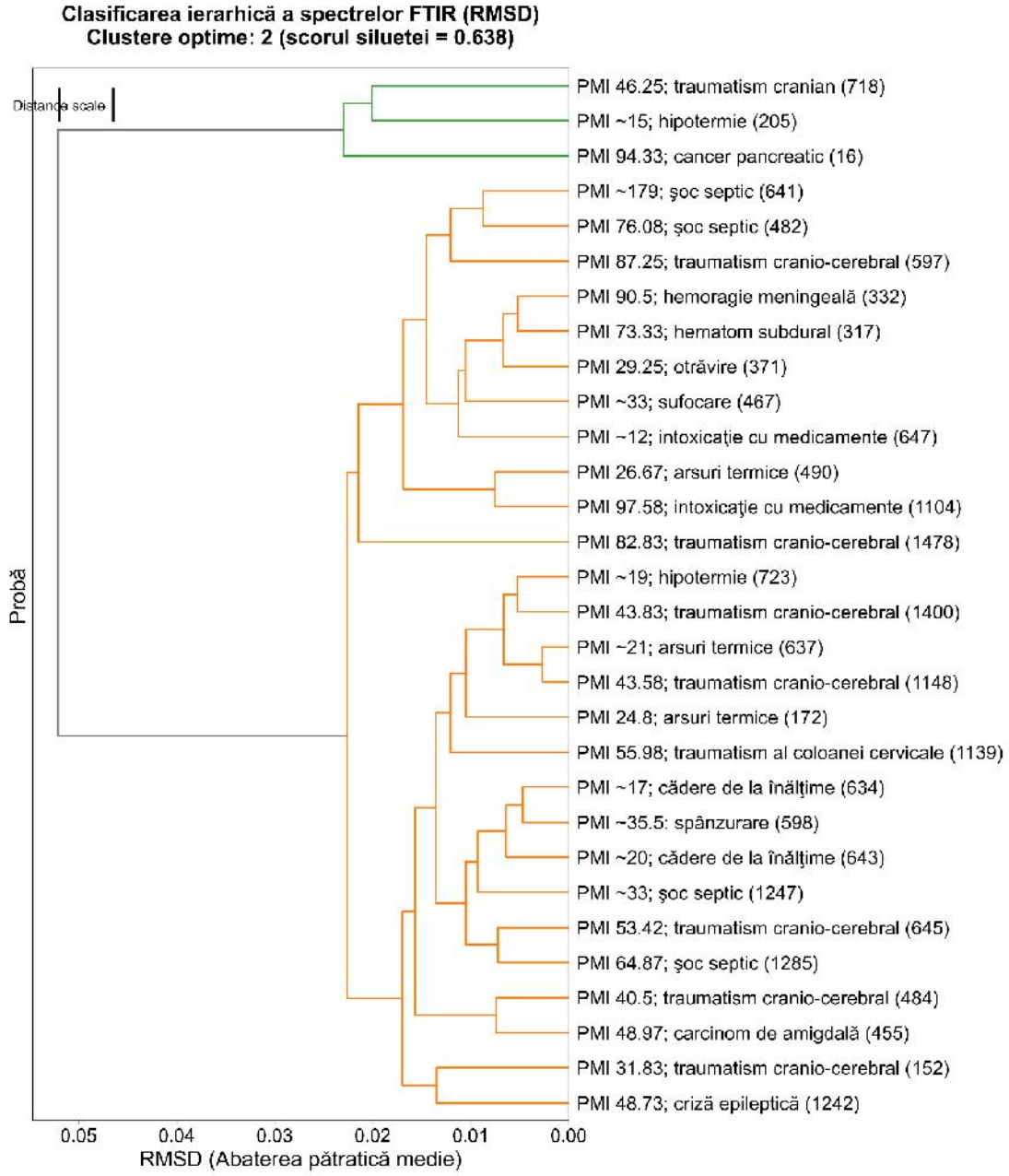


Figura 4. Dendrogramă orizontală care ilustrează relația dintre cele 30 de probe de umoare vitroasă. Etichetele indică IPM, cauza decesului și codul de identificare al probei. Soluția optimă cu două clustere (scor de siluetă = 0,636) este evidențiată prin nuanțe de culoare: Clusterul 1 (albastru, n = 27) și Clusterul 2 (portocaliu, n = 3) [17].

Cazurile au fost organizate în clustere, cluster 1 si cluster 2 (Figura 4) [17]. Clusterul 1 cuprinde probe cu cazuistică diferită care arată că spectrele sunt sensibile la condițiile biochimice

specifice patologiilor traumatice diferite. Clusterul 2 cuprinde trei probe: cazul 16 (IPM 94,3 ore, cancer pancreatic, accident vascular cerebral acut), cazul 205 (IPM ~15 ore, hipotermie) și cazul 718 (IPM 46,2 ore, traumatism cranian și intervenție chirurgicală pentru hematom subdural). În probele 16 și 718, se dovedește că patologia intracraniană (accident vascular cerebral și traumatism cranian) favorizează alterarea barierei hemato-oculare, permițând proteinelor de origine sanguină, mediatorilor inflamatori și resturilor celulare să pătrundă în umoarea vitroasă, aspect pe care îl confirmă studii din literatură [59,60,61]. S-a demonstrat, de asemenea, că hipertermia poate afecta compoziția UV [17].

5.3.3 Modelarea datelor prin metode de regresie

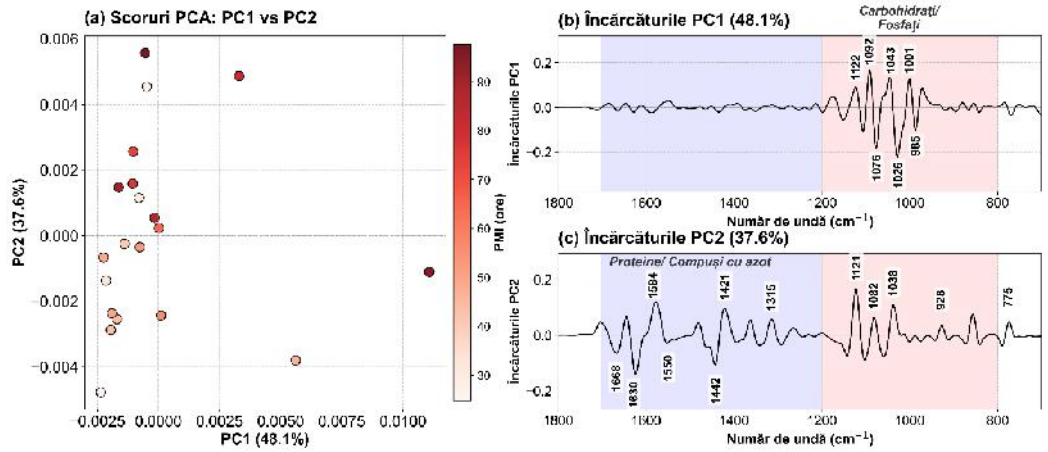


Figura 5. Rezultatele analizei PCA efectuate pe spectrele probelor VH cu IPM cunoscut, luând în considerare intervalul 1800–700 cm^{-1}. (a) Graficul scorurilor PC1 vs. PC2. IPM este codificat conform scalei de culori. Probele atipice sunt marcate. (b) Spectrul încărcărilor PC1. Roșul a fost utilizat pentru a evidenția regiunea spectrală asociată carbohidraților/fosfaților. (c) Spectrul de încărcare PC2. Albastrul a fost utilizat pentru a marca regiunea spectrală asociată proteinelor, iar roșul a fost utilizat așa cum este descris în (b). În (b,c) am etichetat caracteristicile importante de pe grafice [17].

5.3.3.1 Principalele componente ale analizei spectrale

S-a aplicat analiza componentelor principale (PCA) spectrelor derivatei a doua centrate pe medie (1800–700 cm^{-1}) pentru toate cele 20 de probe UV cu IPM cunoscut. Primele două componente principale (PC) au explicat 85,7% din varianța spectrală totală (PC1: 48,1%, PC2: 37,6%), ceea ce sugerează că cele două componente surprind majoritatea variației biochimice între probe (Figura 5, a). Graficul încărcării PC1 (Figura 5, b) a arătat că trăsăturile cele mai

proeminente sunt concentrate în regiunea 950–1100 cm^{-1}, care este asociată în principal cu modurile vibraționale ale carbohidraților și ale compușilor care conțin fosfat. Se observă încărcări pozitive puternice la 1092, 1043 și 1001 cm^{-1}, caracteristice glicogenului (1043 cm^{-1}) [58,59], vibrațiilor de întindere ale fosfatului (1086–1092 cm^{-1}) și vibrațiilor scheletului riboză-fosfat (1001 cm^{-1}), sugerând că aceste domenii biochimice reprezintă cea mai mare sursă de variație spectrală între probe. Diagrama de încărcare PC2 (Figura 5) are încărcări pozitive puternice la 1584 cm^{-1} (amida II, cuplată întindere C–N și îndoire N–H) și 1315 cm^{-1} (amida III, întindere C–N și îndoire N–H), precum și încărcări negative puternice la 1668 cm^{-1} (amida I, structuri α-elicoidale), 1630 cm^{-1} (amida I, structuri β-pliate) și 1442 cm^{-1} (îndoire CH2, lipide și proteine). Contribuția substanțială a semnalelor legate de carbohidrați/fosfați la varianța spectrală structurată, atât în domeniile dependente de timp (PC1), cât și în cele interindividuale (PC2), sugerează că acești markeri biochimici pot fi mai consistent aliniați cu progresia IPM decât semnalele derivate din proteine, care sunt în mare parte limitate la PC2. [17].

5.3.2.2 Metoda de regresie partial least square, PLS pentru predicția IPM

Pentru a valida modelul PLS, am efectuat cinci iterații în care spectrele IPM cunoscute au fost împărțite aleatoriu în setul de antrenament (15 eșantioane) și setul de testare (5 eșantioane). Rezultatele arată RMSE-ul mediu de testare de 17,9 ± 7,1 h (interval 6,7–28,8 h), reflectând heterogenitatea setului de date și că performanța modelului este puternic influențată de includerea cazurilor dificile, dar și că modelul cu 2 componente (cea mai frecventă alegere) oferă o soluție parcimonioasă și robustă. Modelul a atins un RMSE cross-validat de 15,82 h, un R2 de 0,531 și o eroare absolută medie de 12,27 h. Pe baza erorilor absolute de predicție din validarea încrucișată leave-one-out (LOOCV) pentru toate cele 20 de mostre cunoscute folosind modelul PLS final cu 2 componente (RMSE = 15,8 h), mostrele au fost împărțite în trei grupuri de fiabilitate (1) Mostre fiabile (eroare < RMSE, n = 14): Predicții în limita a 15,8 h de IPM adevărat (2) Mostre marginale (RMSE ≤ eroare < 2×RMSE, n = 4): Devieri moderate (15,8 – 31,6 h) (3) Mostre problematice (eroare ≥ 2×RMSE, n = 2) [17]. Interpretarea modelului PLS prin coeficienți de regresie standardizați arată direcția și mărimea asocierii dintre fiecare regiune spectrală și IPM: coeficienții pozitivi indică benzile care cresc în intensitate pe măsură ce IPM avansează, în timp ce coeficienții negativi indică benzile care scad IPM estimat, eroare 0,1 h); Cei mai semnificativi coeficienți pozitivi au fost observați în regiunea 1120–1126 cm^{-1}, atingând un vârf la 1122,5 cm^{-1} (coeficient = $5,6 \times 10^{-5}$) [17]. Această regiune este atribuită

glicoproteinelor, carbohidraților mici și fosfodiesterilor și indică acumulare progresivă sau rearanjare structurală a componentelor glicoproteinei în funcție de IPM. Coeficienți negativi puternici au fost observați în regiunea 1070–1080 cm^{-1}, în special la 1076 cm^{-1} ($-4{,}4 \times 10^{-5}$) și 1074 cm^{-1} ($-4{,}3 \times 10^{-5}$). Această regiune este asociată cu vibrații de întindere ale fosfatului ($PO2-$) și întinderea C–O a carbohidraților [63]. Semnul negativ sugerează o scădere a acestor componente în timp, în concordanță cu degradarea progresivă a membranei. Scorurile VIP cu (variabila importantă în proiecție) folosite în regresia PLS au fost observate la 1190 cm^{-1} (VIP = 2,16) și 1192 cm^{-1} (VIP = 2,13), confirmând rolul dominant al glicoproteinei, carbohidraților mici și regiunii fosfodiester în predicția IPM. Regiunea fosfolipidică la 735–739 cm^{-1} a fost următoarea ca importanță (VIP = 2,02–2,10), evidențiind importanța proceselor de degradare a membrane [17].

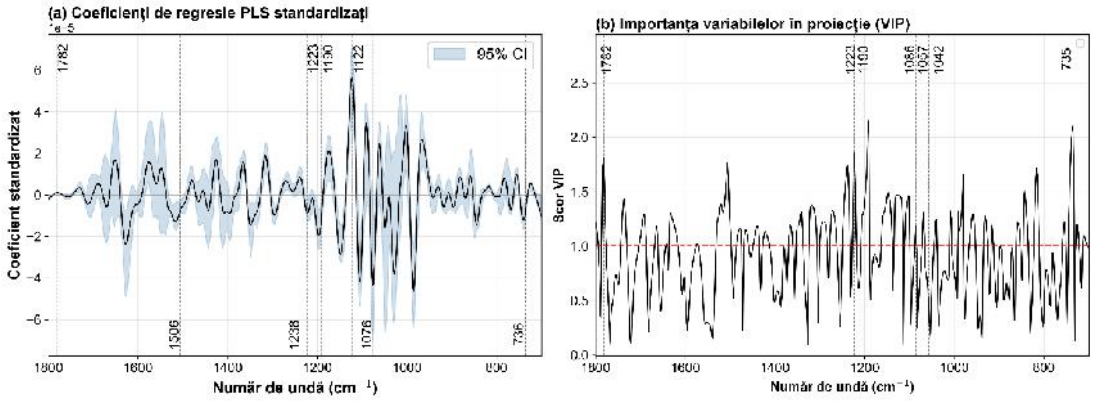


Fig. 6 Interpretarea modelului de regresie PLS (2 componente). (a) Coeficienți de regresie standardizați pentru modelul final. Zonele umbrite reprezintă intervalele de încredere bootstrap de 95%. Regiunile spectrale cheie sunt notate cu numerele de undă aproximative. (b) Scorurile importanței variabilelor în proiecție (VIP). Linia roșie punctată orizontal indică pragul VIP = 1.0; numerele de undă de deasupra acestei linii sunt considerate predictori semnificativi. Vârfurile VIP selectate sunt etichetate [17].

5.3.2.3 Predicția IPM pentru probe necunoscute folosind modelul PLS

Modelul final PLS cu două componente, calibrat pe toate cele 20 de probe cunoscute, a fost aplicat celor zece probe cu IPM necunoscut sau incert. Predicțiile au variat între 27,1 și 80,1 h. Patru probe au fost clasificate ca discrepante, cu estimări care depășesc intervalul de încredere de 90%: 634 (~17 h, estimată 37,7 h; ~1 h sub limita inferioară), 637 (~21 h, estimată 48,5 h; ~9 h sub limita inferioară), 643 (~20 h, estimată 54,6 h; ~14 h sub limita inferioară) și 205 (~15

h, estimată 67,0 h; ~30 h sub limita inferioară). În ciuda diferențelor în IPM, aceste probe împărtășesc caracteristici spectrale similare.

Probă	Predicția clasei IPM (precoce, tardiv)	Confidență	IPM_E	Utilitate
647	Precoce (≤48h)	0.59	~12 h	DA
205	Precoce (≤48h)	0.52	~15 h	DA
634	Precoce (≤48h)	0.64	~17 h	DA
723	Precoce (≤48h)	0.83	~19 h	DA
643	Tardiv (>48h)	0.52	~20 h	NU
637	Precoce (≤48h)	0.64	~21 h	NU
1247	Precoce (≤48h)	0.64	~33 h	DA
467	Precoce (≤48h)	0.62	~33 h	DA
598	Precoce (≤48h)	0.64	~35.5 h	DA
641	Tardiv (>48h)	0.87	~179 h	NU

O excepție notabilă a fost proba 641 (estimată la ~179 h, prevăzută la 80,1 h; cu ~79 h peste limita superioară a intervalului de încredere de 90%). Spectroscopia FTIR a surprins semnătura biochimică a acestei probe, care pare decuplată de IPM cronologic. În cazul 641, spectroscopia FTIR detectează într-o măsură mai mare vârsta biochimică decât timpul cronologic în sine, datorită perioadei mai îndelungate de depozitare la temperatură scăzută, aspect menționat și în alte studii [63]. Această distincție poate avea implicații importante pentru investigațiile medico-legale în care istoricul temperaturii poate fi necunoscut sau variabil [17].

5.3.2.4 Clasificarea binară a probelor pentru trierea medico-legală

Am evaluat mai multe metode de clasificare pentru a diferenția între IPM precoce (≤48 h) și IPM tardiv (>48 h), precum Analiza Discriminantă Liniară (LDA), Analiza Discriminantă Cvadrică (QDA), Mașini de Sprijin Vectorial (SVM) cu kerneluri liniare și de funcție bază radială (RBF) și Random Forest. Performanța modelului a fost evaluată folosind LOOCV. Rezultatele arată că Random Forest este clasificatorul care a obținut cea mai mare acuratețe validată încrucișat de 70,0% (14 din 20 de probe clasificate corect).

5.3.2.5 Comparație între metodele de regresie pentru predicția IPM

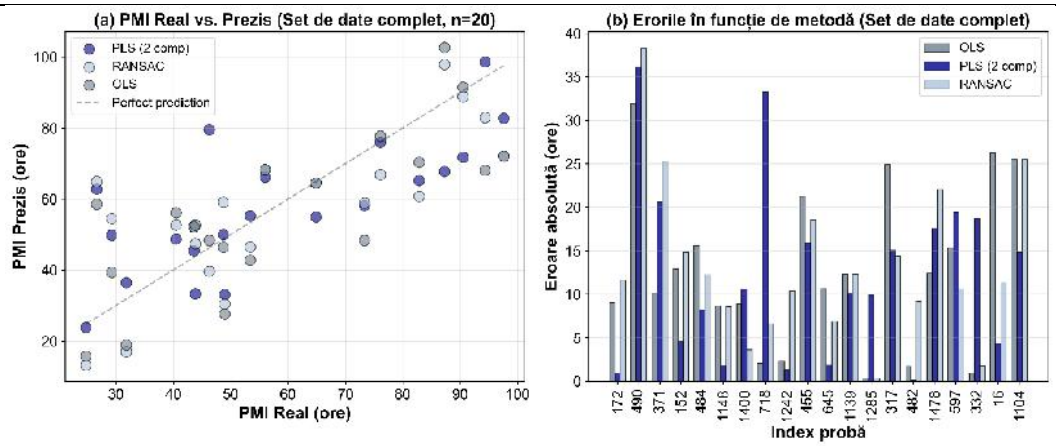


Fig. 7 Comparația metodelor de regresie pentru predicția IPM. (a) IPM real versus IPM estimat (prezis) pentru PLS, OLS și RANSAC. (b) Erori absolute pe probe pentru PLS, OLS și RANSAC, care pot fi folosite de metode multivariate precum regresia PLS [17].

5.4 Discuții

5.4.2 Comparația rezultatelor cercetarii cu studii de referință internaționale

Studiile anterioare efectuate pe probe de UV prelevate de la oameni [37,38,39] și de la iepuri [12] au arătat că măsurătorile ATR-FTIR, susținute de analiza chemometrică și cu învățarea automata (machine learning, engl.), pot fi utilizate pentru a prezice IPM-ul unei probe. Studiul realizat de Zhang et al. [12] oferă o dovadă de concept pentru estimarea IPM pe baza metodei ATR-FTIR în condiții experimentale strict controlate, pe care am aplicat-o în cercetarea noastră [17]. Am confirmat contribuția regiunii de 1315 cm^{-1} (Amidă III) la predicția IPM, (VIP = 1.37, positive regression coefficient = 1.92×10^{-5}), ceea ce reprezintă o validare importantă între specii, dar și diferențe la banda de 925 cm^{-1} (acizi nucleici) care a prezentat o corelație puternică la iepuri [12] și o contribuție minimă în modelul nostru PLS pentru oameni (VIP = 1.01, coeficient aproape de zero, 1.10×10^{-6}), diferențe de specie [17].

În cazul UV de la om, Valentina Notarstefano și colab. [38] au stabilit o metodologie, au raportat o precizie de clasificare de peste 80% folosind PLS-DA. Aceștia au identificat vârfuri discriminante, inclusiv cele de la 1120, 1630 și 1585 cm^{-1}, care pot fi atribuite degradării proteinelor, degradării aminoacizilor, acumulării de lactat și modificărilor acidului hialuronic.

Rezultatele noastre validează în mod independent unele dintre aceste observații: banda glicoproteinei/fosfodiesterului la 1121 cm^{-1} s-a evidențiat ca predictor dominant în modelul nostru PLS (VIP = 1,47, cel mai mare coeficient de regresie), în timp ce benzile legate de proteine la 1630 cm^{-1} (foaie β) și 1580 cm^{-1} (Amidă II) au prezentat un comportament consistent

și ne-au determinat să formulăm ipoteza că pot fi biomarkeri robuști, cu un grad rezonabil de incertitudine [17]. Banda la 1121 cm^{-1}, care corespunde vârfului de 1120 cm^{-1} identificat de noi. În analiza noastră VIP bazată pe date a identificat și regiunea fosfolipidică 734–739 cm^{-1} (VIP = 2,02–2,10) și regiunea esterului lipidic 1782–1784 cm^{-1} (VIP = 1,72–1,81) ca predictori foarte influenți, subliniind importanța degradării membranei și oxidației lipidelor, procese care nu au fost anterior evidențiate în studiile VH la oameni, ceea ce sprijină soliditatea acestor caracteristici spectrale ca biomarkeri IPM. Studiul nostru extinde studiile de referință citate cu mai multă aplicabilitate practică, pentru că am adoptat un design orientat către practica medico-legală, care include cohorta 1 cu IPM_C și cohorta cu IPM necunosct (din teren), ce au fost estimate prin metode convenționale, IPM_E. Astfel, am abordat discrepanța dintre condițiile controlate de laborator și cazurile medico-legale din situații reale. Deși includerea cazurilor cu IPM_E introduce un grad de incertitudine, oferă o evaluare mai realistă asupra avantajelor modelului cât și limitelor lui. Apreciem că, ceea ce pare o slăbiciune metodologică, evidențiază valoarea spectroscopiei ATR-FTIR, care poate susține sau valida IPM_E la fața locuui prin metode convenționale, dar nu îl poate încă înlocui [17].

În urma analizei detaliate a valorilor aberante, întotdeauna corelate cu complexitatea cazurilor (490 – arsuri termice, 718 – traumatisme craniene), PLS abordază eficient, subliniind robustețea metodei față de heterogenitatea biologică. În plus, observația că o probă refrigerată (641) a fost estimată de către modelul metabolomic la 80,5 ore, deși IPM convențional este de ~179 ore, demonstrează că FTIR detectează vârsta biochimică, mai degrabă decât timpul cronologic, o distincție cu implicații importante pentru cazurile medico-legale în care istoricul temperaturii este necunoscut [17]. În acest fel, studiul nostru abordează nu numai performanța algoritmică a modelelor de predicție a IPM, dar permite și o interpretare biologică și medico-legală a modificărilor spectrale [17]. Trebuie menționat că modelul nostru a fost calibrat pe probe cu un IPM cuprins între 24,8 și 97,6 h (aproximativ 1 până la 4 zile), corespunzând intervalelor postmortem precoce-intermediare. Modelul metabolomic pe care îl prezentăm este, așadar, destinat utilizării cu precădere în acest interval 24,8 - 97,6 h. Aplicabilitatea modelului metabolomic pe care l-am identificat pentru intervale mai scurte sau mai lungi de IPM rămâne de validat. Factorii de mediu, cum ar fi temperatura, condițiile de descompunere etc., pot influența semnăturile spectrale, așa cum se vede în cazul probei prelungit refrigerate (641), care a arătat un IPM estimat de 80,1 h, deși IPM cunoscut a fost 179 h [17].

Capitolul 6. Studiul proteomic asupra degradării proteinelor în mușchiului scheletic la cadavru folosind testele imunologice Western Blot și ELISA pentru estimarea IPM

6.1 Introducere: scopul specific, ipoteza de lucru şi obiective specifice au fost prezentate în introducere.

Obiectivele specifice studiului de proteomică:

a) Cercetare extensivă a literaturii de specialitate
b) Analize ELISA și SDS_PAGE cu Western Blot de determinare a degradării proteinelor pentru Troponina cardiacă T, cTnT, vinculina, desmină, cu valoare predictivă în estimarea IPM
c) Constituirea unui protocol de transport și de biosecuritate a probelor biologice
d) Compararea datelor imunotestelor cu rezultate asemănătoare din literatura de specialitate, pentru a aprecia valoarea predictivă a degradării proteinelor pentru estimarea IPM cu precădere a IPM precoce.
e) Folosirea valorilor biomarkerilor ca valori benchmark pentru studii viitoare
f) Stabilirea limitelor folosirii rezultatelor obținute în alte cazuri reale.
g) Identificarea unor direcții de cercetare ulterioară

6.2 Material şi metodă

6.2.1 Testele imunologice ELISA, SDS-PAGE, Western Blot

6.2.1.1 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). A fost aplicata ELISA semiautomată, în care un antigen fixat prin câte un epitop liber de doi anticorpi, anticorpul de captură și anticorpul de detecție marcat enzimatic ELK Bio-Rad cu soft specific (Magellan).

6.2.1.2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, engl.) cu Western Blot, SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) cu kitul de testare Pierce BCA de la Thermo Scientific, identificarea proteinelor prin Western Blot.

6.2.2 Vinculina, desmina, Troponina T cardiacă în mușchiul scheletic. Produsul biologic supus analizei a fost mușchiul scheletic cadaveric (m. cvadriceps). Biomarkerii căutați au fost prin ELISA Troponina T cardiacă, cTNT, vinculina, desmina iar pentru SDS-PAGE cu Western Blot, vinculina. Cel mai folosit protocol de studiu (extracție, identificare proteică) este furnizat de S. Pittner [20,21,43,64] în cercetare extracorporeală, design pe care l-am preluat și l-am folosit și noi.

6.2.3 Tipul cercetării, produsul biologic supus analizei

Pentru studiul de proteomică, a fost desfășurată o cercetare non-experimentală observațională în care IPM a fost variabilă independentă, în raport cu care a fost cercetată degradarea proteinelor de citoschelet desmina, vinculina și troponina T cardiacă în mușchiul scheletic pentru estimarea IPM prin analiza autolitică a degradării proteice folosind metodele imunologice și tehnicile ELISA pentru desmină, vinculină și troponina T cardiacă și SDS-PAGE cu Western Blot pentru vinculină. A fost ales mușchiul scheletic uman pentru că poate fi recoltat încă de la fața locului și are o rată mai lentă de autoliză în etapa postmortem precoce [22]. A fost aleasă vinculina pentru că este mai rar cercetată pe om [65].

6.2.4 Cazuistica și limitele selecției cazurilor

A fost cercetat 1 caz ales dintre cazurile cohortei 1, decese în spital, cu $IPM_{C,}$ anume cazul 1242, care a făcut și obiectul publicării științifice Pubmed [22].

Intervalul postmortem* a fost calculat după formula [22]:

IPM_C = [data şi ora autopsiei (24.10.2024, 9.30]) – [data şi ora decesului (22.10.2024, 20:46)]= 36,8 ore

6.2.5 Protocolul de biosecuritate

A fost aplicat același protocol de biosecuritate ca și în studiul metabolomic, care pentru studiul proteomic a inclus recoltarea probelor biologice din mușchiul scheletic, transportul la laboratorul de serologie din INML MM, depozitare, prelucrare probe prin ELISA, SDS-PAGE și Western Blot, interpretare rezultate, distrugerea materialului biologic folosit.

6.3 Rezultate

6.3.1 Măsurătorile prin imunoteste a cazuisticii în studiu și compararea rezultatelor cu date din literatura de specialitate

6.3.1.1 ELISA și limitele testării în studiul estimării IPM. ELISA a oferit valori cantitative cu sensibilitate ridicată pentru cTnT 178,85 pg/mL, vinculină 570,96 pg/mL și desmină 565,77 pg/mL în mușchiul scheletic uman la IPM_C de 36.8 ore [22], care pot fi folosite ca valori de referință pentru cazuri similare în studii viitoare. Rezultatul este notabil întrucât alte studii nu au reușit identificare prin ELISA a Troponinei T cardiace în mușchiul scheletic: rezultatul nostru favorabil se datorează probabil și faptului că, în cazul studiat, în care persoana a decedat în plină criză tonico-clonică cu diagnostic de epilepsie, mușchiul scheletic are caracteristici regenerative datorită convulsiilor anamnestic repetate [22]. Am găsit un singur

studiu reproductibil în literatura de specialitate cu asemănări importante cu studiul nostru pentru comparație, Bodor, GC, 1997 [66]: metoda ELISA utilizată în ambele studii, un interval similar de IPM (30-40 ore), prelevare de probe din mușchiul scheletic, mușchi cu afecțiuni regenerative (epilepsie cu rabdomioliză prin crize tonico-clonice generalizate, GTCS vs. polimiozită și distrofie musculară Duchenne [70]). Între avantajele remarcabile ale tehnicii ELISA se regăsește capacitatea acesteia de a produce valori exacte ale analiților cercetați, capabili să devină referințe sau valori benchmark [67]. Limitele imunotestării cu ELISA sunt mai ales reprezentate de complexitatea tehnicii, necesitatea unor specialiști, corectitudinea curbelor standard, etc. [67].

6.3.1.2 Western Blot și limitele testării în studiul estimării IPM. Electroforeza SDS-PAGE cu Western Blot a confirmat detecția banzii native de 117kDa a vinculinei, de obicei prezentată în studiile de referință cu probe umane în IPM precoce < 0,5 zile [65], <24 de ore [68] sau zilele 1, 2, 3 postmortem [69], precum și produșii săi de degradare prin autoliză corespunzătoare benzilor 84 kDa [64], de obicei prezentă în ziua 1 (24 ore) și ore 90kDa, de obicei prezentă în ziua 3 postmortem [70]; s-au validat astfel metoda și tehnica folosită cât si IPM cunoscut din spital, 36,8 ore. Suplimentar, am reușit să identificăm un produs de degradare pe care alte studii nu l-au identificat [42,21,64], corespunzător benzii de 87 kDa, ce ar putea și acesta să fie o valoare benchmark pentru IPM 36.8 ore. Nu am reușit pe cazul studiat să identificăm benzile de 75 kDa și 63 kDa [65] prezente de obcei în IPM intermediar (24-72 ore), ceea ce nu reduce din reușita determinărilor degradărilor proteinelor și perspectivele continuării acestor cercetări întrucât am demonstrat prin comparație cu rezultate similare din studii de referință internaționale utilitatea folosirii degradării proteinelor în mușchiul scheletic în estimarea IPM [4]. Alte studii de caz umane prezintă la IPM intermediar < 72 de ore benzi de degradare a vinculinei de 90 kDa, și 84 kDa [71] și, prin urmare, validează și constatările noastre pentu IPM intermediar și în cazul selectat la IPM_C de 36,8 ore.

6.4 Discuții

6.4.1 Valoarea și limitele testării degradării proteinelor, în particular, în cazul studiat, a vinculinei, desminei și Troponinei T în estimarea IPM. Studiul de proteomică confirmă valoarea utilizării degradării proteinelor în estimarea IPM, în particular a vinculinei, desminei și Troponinei T cardiace. Limitările au fost deja prezentate [67].

7. Concluzii şi contribuţii personale

7.1. Concluziile cercetării doctorale întreprinse

Studiul de metabolomică stabilește un reper realist pentru ceea ce spectroscopia ATR-FTIR poate oferi în scenarii reale medico-legale și poziționează spectroscopia ATR-FTIR ca un instrument complementar estimării convenționale medico-legale, care poate consolida estimările IPM în practica medico-legală. Cercetarea întreprinsă în studiul de metabolomică a arătat următoarele [17]:

a) Modelul cu două cohorte (cohorta 1, IPM cunoscut IPM_C din spital și cohorta 2, IPM estimat IPM_E la fața locului și IPM_E prin ATR-FTIR cu comparația rezultatelor) a demonstrat o performanță robustă pe eșantioane eterogene, atingând o valoare RMSE validată încrucișat de 15,82 ore pe setul complet de date și oferind predicții credibile pentru cele zece eșantioane cu IPM_E la fața locului.
b) Regresia multivariată PLS cu două componente este capabilă să extragă informații predictive din eșantioanele complexe, cu factori clinici confundatori, pe care metodele liniare mai simple nu le pot valorifica și de a menține o performanță stabilă (RMSE = 12,44, R2 = 0,075, MAE = 10,01 h) care în prezența unor cazuri clinice complexe a demonstrat eșecul altor metode (OLS și RANSAC) și susține adecvarea sa pentru aplicații medico-legale
c) Modelul de clasificare binară Random Forest oferă un instrument practic de triaj cu o precizie de 70%, depășind performanța LDA (60%) și oferind scoruri de încredere care depășesc 0,9 pentru 70% din eșantioanele necunoscute
d) Interpretarea modelului PLS: coeficienți de regresie standardizați și importanța variabilelor, 5.3.2.4 Clasificarea binară a probelor pentru trierea medico-legală
e) Regiunea carbohidraților/glicoproteinelor (1190-1192 cm^{-1}) precum și fosfolipidică membranară (734-739 cm^{-1}) ca biomarkeri noi în estimarea IPM, care pot fi mai robuști decât unele benzi proteice tradiționale
f) Observația conform căreia depozitarea pe termen lung la frigider (proba 641) separă vârsta biochimică de cea cronologică, sugerează necesitatea dezvoltării unor modele corectate în funcție de temperatură, care vor spori și mai mult utilitatea în domeniul medico-legal

g) Avantajele practice ale metodei de determinarea a compoziției metabolice a UV prin ATR-FTIR sunt: (1) aplicabilitate practică (2) pregătire minima a probelor, (3) rapidă în rezultate, (4) transferabilă prin interdisciplinaritate către domeniul medico-legal (valoare translațională)

Studiul de proteomică, centrat pe demonstrarea degradării proteinelor vinculina, desmina și Troponina T cardiacă în mușchiul scheletic uman, a identificării valorii și limitelor imunotestelor ELISA, SDS-PAGE cu Western Blot în estimarea IPM, a confirmării rezultatelor obținute prin comparare cu referințele științifice în domeniu și a dezvoltării unor noi date a relevat [22]:

a) ELISA poate detecta precis valorile analitice pentru toți cei trei biomarkeri selectați în mușchiul scheletic (Troponina T cardiacă, cTnT 178,85 pg/ml, vinculină 570,96 pg/ml și desmină 565,77 pg/ml) și aceste valori pot fi valori benchmark pentru 36.8 ore IPM cunoscut
b) Rezultatele SDS-PAGE și Western Blott pentru degradarea vinculinei în mușchiul scheletic uman sunt validate de studii internaționale, identificând la IPM intermediar (IPM_C 36,8 ore) absența benzii native a vinculinei cu prezența benzilor de degradare de 90 kDa, 84 kDa.
c) Suplimentar, am reușit folosind SDS-PAGE și Western Blott, identificarea unei benzi de degradare la 87 kDa, pe care alte studii nu au relevat-o, descoperire ce trebuie verificată și care poate folosi și ea ca valoare benchmark pentru IPM intermediar (36.8 ore)

7.2 Contribuții personale ale cercetării doctorale

Cercetarea întreprinsă în cele două studii, de metabolomică și proteomică a generat următoarele contribuții personale (prezentare umăr la umăr) [17,22]:

Studiul de metabolomică	Studiul de proteomică
a analizat compoziția spectrală a umorii vitroase, UV prin tehnica ATR-FTIR pentru a estima IPM (studiu interdisciplinar și interinstituțional)	a analizat degradarea proteinelor vinculina, desmina, Troponina T cardiacă în mușchiul scheletic prin tehnica ELISA, SDS-PAGE, Western Blot pentru a estima IPM (studiu interdisciplinar)

<table>
<tr><td colspan="2">Studiu pe om și produse biologice umane (unul dintre cele 21 de studii pe om din literatură privind estimarea IPM), ceea ce permite o folosire directă practică a rezultatelor în practica medico-legală cu valoare probatorie în justiție</td></tr>
<tr><td colspan="2">Construirea unui protocol de biosecuritate pentru probe biologice umane (recoltare-transport-depozitare-prelucrare-analiză) spre a fi folosit în laborator</td></tr>
<tr><td colspan="2">Valoare translațională
(transferabilă prin interdisciplinaritate către domeniul medico-legal cu valoare probatorie crescută în justiție)</td></tr>
<tr><td>Primul studiu de metabolomică pe UV publicat național cu IF > 4 privind estimarea IPM prin analiza compoziției spectrale a UV umane
Al 12 studiu pe om privind IPM
Al 4-lea studiu pe om privind estimarea IPM în UV, din cunoștințele noastre, singurul pe om privind estimarea IPM în UV cu ATR-FTIR
Primul studiu național cu ATR-FTIR pe UV la om.</td><td>Primul studiu de proteomică publicat național Pubmed privind estimarea IPM prin degradarea proteinelor în mușchiul scheletic uman</td></tr>
<tr><td>Modelul structurat pe doua cohorte (IPM_C și IPM_E), design original de studiu, folosind regresia multivariată PLS cu două componente este robust în predicțiile sale privind IPM necunoscut mai ales atunci când există o heterogenitate și o complexitate crescută a cazurilor (IPM_E la fața locului)</td><td>Valori ELISA pentru cTnT 178,85 pg/ml, vinculină 570,96 pg/ml și desmină 565,77 pg/ml la 36,8 ore IPM cu valoare benchmark pentru IPM-ul de studiu.</td></tr>
<tr><td>Regresia multivariată și clasificarea binară Random Forest pe modelul imaginat are rezultatele cele mai bune și solide.</td><td rowspan="2">Bandă de degradare a vinculinei de 87 kDa prin Western Blot care ar putea fi specifică pentru IPM la 36,8 ore, cu valoare benchmark pentru inervalul IPM de studiu (validare necesară),</td></tr>
<tr><td>Carbohidrați/glicoproteine și fosfolipidele eliberate prin ruperea membranelor se</td></tr>
</table>

dovedesc a fi noi biomarkeri cu predictibilitate robustă și semnale superioare de predictibilitate și stabilitate în estimarea IPM	
Expunerea prelungită la frig decuplează modificările biochimice dependente de timp în umoarea vitroasă (mai ales în metabolismul glucidic) și aduce în prim plan valoarea cunoașterii și controlului temperaturii în estimarea IPM (inclusiv istoricul meteorologic)	
Avantajele practice ale metodei de determinarea a compoziției metabolice a UV prin ATR-FTIR și a folosirii regresiei multivariate în analiza datelor sunt: (1) aplicabilitate practică (2) pregătire minimă a probelor, (3) rapiditate în rezultate, (4) soliditate în interpretare statistică prin regresie multivariată adecvată unei heterogenități și complexități sporite a cazurilor, (5) aplicabilitate practică și valoare translațională transferabilă prin interdisciplinaritate în estimarea IPM	

Bibliografie selectivă

1. M. Lee Goff, Early post-mortem changes and stages of decomposition in exposed cadavers, Exp. Appl. Acarol. 49 (2009) 21–36,

2. Madea B. Methods for determining time of death. Forensic Sci Med Pathol. Dec;12(4):451-485, 2016.

3. Madea B, Henssge C. Historisches zur Todeszeitbestimmung. Z Rechtsmed. 1985;95:19–25.

4. Bate-Smith EC, Bendall JR. Factors determining the time course of rigor mortis. J Physiol. 1949;110:47–65.

5. Shrestha R, Kanchan T, Krishan K. Methods of Estimation of Time Since Death. [Updated 2023 May 30]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549867/

6. Jyotsana Singh, Ambrish Kumar, Shruti Trivedi, Surendra Kumar Pandey. Advancements in estimating post-mortem interval in medico-legal practice: A comprehensive review, Legal Medicine, Volume 75, 2025, 102627, ISSN 1344-6223,

7. Henssge C. Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. Forensic Sci Int. 1988 Sep;38(3-4):209-36.

8. Henssge C. Temperature based methods II. In: Henssge C, Knight B, Krompecher T, Madea B, Nokes L, editors. The estimation of the time since death in the early post-mortem period. 2nd ed. London: Edward Arnold; 2002.

9. HodaFouad Abdel Salam, Eman Ahmed Shaat, Manal Hassan Abdel Aziz, Abeer Abdel MoneimSheta, Heba Abdel Samie Mohammed Hussein. Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes, Alexandria Journal of Medicine, Volume 48, Issue 4, 2012, Pages 335-344, ISSN 2090-5068,

10. Andrea Nicola Cardinale, Antonio Di Lorenzo, Mara Bellino, Giuseppe Strisciullo and Valentina Mussi, Sara Sablone. Thanatochemistry and the role of hypoxanthine in the post-mortem interval estimation: a systematic literature review. International Journal of Legal Medicine, 2025, Volume 139, Pages 1743 – 1780,

11. Marieta L.C. Passos, Ana M. Santos, Ana I. Pereira, J. Rodrigo Santos, Agostinho J.C. Santos, M. Lúcia M.F.S. Saraiva, José L.F.C. Lima. Estimation of postmortem interval by

hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a sequential injection system, Talanta,Volume 79, Issue 4, 2009, Pages 1094-1099, ISSN 0039-9140,
12.Zhang, J., Wei, X., Huang, J. et al. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectral prediction of postmortem interval from vitreous humor samples. Anal Bioanal Chem 410, 7611–7620 (2018).
13. Zhang, K., Wang, Q., Liu, R. et al. Evaluating the effects of causes of death on postmortem interval estimation by ATR-FTIR spectroscopy. Int J Legal Med 134, 565–574 (2020).
14. Riaz L, Siddiqui A, Rashid M, Shahid RA, NasrulHuda, Butt F. Post-mortem changes in metabolomic profiles of human serum, aqueous humor, and vitreous humor. Biol Clin Sci Res J [Internet]. 2024 Jun. 29 [cited 2026 Jun. 16];2024(1):966. Available from:
15. Nicola Pigaiani, Anna Bertaso, Elio Franco De Palo, Federica Bortolotti, Franco Tagliaro. Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. Forensic Science International, Volume 310, 2020, 110235, ISSN 0379-0738,
16. Aya Khalil, Nagah Ibrahim Hegazy, A.A. Abou-Hashem, Mohamed A. Shaheen, Nourhan Mohammed Hassan From Death to Decay: An Overview of Postmortem Changes Zagazig 2024, University Medical Journal, https://api.semanticscholar.org/CorpusID:270429564
17. **Turlea, IR**; Curca, GC; Mernea, M; Matanie, AC; Fendrihan, S; Mihailescu, DF. FTIR Spectroscopy of Vitreous Humor for Postmortem Interval Estimation: A Multivariate Regression Approach. 2026, International Journal of Molecular Sciences. 27/8, 3468, Q1 4.9 [httpss://www.mdpi.com/1422-0067/27/8/3468].
18. Rajanikanta Swain, Adarsh Kumar, Jyotiranjan Sahoo, R. Lakshmy, S.K. Gupta, D.N. Bhardwaj, R.M. Pandey, Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry, Journal of Forensic and Legal Medicine, vol. 36, 2015, Pages 144-148, ISSN 1752-928X, https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.09.017
19. Takasu S, Matsumoto S, Sakamoto K. A Comparison of Postmortem Serum and Pericardial Fluid Total Bilirubin Levels With Antemortem Data. Cureus. 2025 Feb 16;17(2):e79089. doi: 10.7759/cureus.79089. IPMD: 40104474; PMCID: PMC11917459.
20. Pittner S, Monticelli FC, Pfisterer A et al. Postmortem degradation of skeletal muscle proteins: a novel approach to determine the time since death. International Journal of Legal Medicine; 130 (2): 421-431, 2016,

21. Pittner S, Ehrenfellner B, Monticelli FC et al. Postmortem muscle protein degradation in humans as a tool for IPM delimitation. International Journal of Legal Medicine; 130 (6): 1547-1555, 2016.

22. **Turlea, IR**, Curca GC, Matei L, Stoica A. Death in Epilepsy: Ictogenic Vs. Cardiogenic Mechanisms and Immunoassays in Postmortem Interval Estimation - Case Report. MAEDICA (Bucur). 2026 Mar; 21(1):226-236. doi: 10.26574/maedica.2026.21.1.226. IPMD: 41978846; PMCID: PMC13061439, [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC13061439/]

23. J.A. Payne, A summer carrion study of the baby pig sus scrofa linnaeus, Ecology 46 (1965) 592–602,

24. Jopp-van Well E, Augustin C, Busse B, Fuhrmann A, Hahn M, Tsokos M, Verhoff M, Schulz F. The assessment of adipocere to estimate the post-mortem interval - a skeleton from the tidelands. Anthropol Anz. 2016;73(3):235-47.

25. Szymon Matuszewski, Anna Mądra-Bielewicz. When insect development meets insect succession: Advantages of combining different methods and insect taxa in estimating the post-mortem interval. Forensic Science International: Synergy, Volume 10, 2025, 100574, ISSN 2589-871X,

26.Time Of Death Calculator - Estimate Postmortem Interval. Updated: May 28, 2026 • Free Tool, accesibil la [https://best-calculators.com/health-fitness/time-of-death-calculator/], accesat la 20.05.2026

27. Ceciliason, A.-S., Andersson M. G., Nyberg S., and Sandler H.. 2021. “Histological Quantification of Decomposed Human Livers: A Potential Aid for Estimation of the Post-Mortem Interval?” International Journal of Legal Medicine 135, no. 1: 253–267. 10.1007/s00414-020-02467-x.

28. Dalal, J. , Sharma S., Bhardwaj T., and Dhattarwal S. K.. 2023. “Assessment of Post-Mortem Submersion Interval Using Total Aquatic Decomposition Scores of Drowned Human Cadavers.” Journal of Forensic Sciences 68, no. 2: 549–557. 10.1111/1556-4029.15220.

29. Gunawardena, S. A., Abeyratne P., Jayasena A., et al. 2023. “Retrospective Analysis of Factors Affecting Rate of Skeletonization Within a Tropical Climate.” Science & Justice 63, no. 5: 638–650. 10.1016/j.scijus.2023.08.001.

30. Gelderman, H. T , Boer L., Naujocks T., IJzermans A. C. M., and Duijst W. L. J. M.. 2018. “The Development of a Post-Mortem Interval Estimation for Human Remains Found on Land

in The Netherlands." International Journal of Legal Medicine 132, no. 3: 863–873. 10.1007/s00414-017-1700-9.

31. Maile, A. E., Inoue C. G., Barksdale L. E., and Carter D. O.. 2017. "Toward a Universal Equation to Estimate Postmortem Interval." Forensic Science International 272: 150–153. 10.1016/j.forsciint.2017.01.013.

32. Jarvis Hayman, Marc Oxenham, Chapter 10 - The development of grading systems to determine human decomposition: Total Body Scoring of decomposed human bodies in indoor settings, Editor(s): Jarvis Hayman, Marc Oxenham, Estimation of the Time since Death, Academic Press, 2020, Pages 229-249, ISBN 9780128157312

33. M.S. Megyesi, S.P. Nawrocki, N.H. Haskell, Using accumulated degree-days to estimate the postmortem interval from decomposed human remains, J. Forensic Sci. 50 (2005) 1–9,

34. Secco, L.; Palumbi, S.; Padalino, P.; Grosso, E.; Perilli, M.; Casonato, M.; Cecchetto, G.; Viel, G. "Omics" and Postmortem Interval Estimation: A Systematic Review. Int. J. Mol. Sci. 2025, 26, 1034.

35. Adserias-Garriga, J.; Hernandez, M.; Quijada, N.M.; Rodriguez Lazaro, D.; Steadman, D.; Garcia-Gil, J. Daily thanatomicrobiome changes in soil as an approach of postmortem interval estimation: An ecological perspective. Forensic Sci. Int. 2017, 278, 388–395.

VINE FIGURA

36. Z.K. Campell, I. Kwon, S.J. Finley, Y. Lee, G.T. Javan. Talin: a potential protein biomarker in postmortem investigations. J. Forensic Leg. Med., 44 (2016), pp. 188-191,

37.Boroumand, M., Grassi, V.M.; Castagnola, F.; De-Giorgio, F.; d'Aloja, E.; Vetrugno, G.; Pascali, V.L.; Vincenzoni, F.; Iavarone, F.; Faa, G.; et al. Estimation of Postmortem Interval Using Top-down HPLC–MS Analysis of Peptide Fragments in Vitreous Humour: A Pilot Study. Int. J. Mass. Spectrom. 2023, 483, 116952. [Google Scholar] [CrossRef]

38.Valentina Notarstefano, Chiara Santoni, Eva Montanari, Francesco Paolo Busardò, Angelo Montana, Giulia Orilisi, Paolo Mariani, Elisabetta Giorgini. A new approach to assess post-mortem interval: A machine learning-assisted label-free ATR-FTIR analysis of human vitreous humor, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, Volume 327, 2025, 125326, ISSN 1386-1425, https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.125326.

39.N. Ansari, A. Lodha, S.K. Menon. Smart platform for the time since death determination from vitreous humor cystine. Biosens. Bioelectron., 86 (2016), pp. 115-121

40.213. Kocsmár, É.; Schmid, M.; Cosenza-Contreras, M.; Kocsmár, I.; Föll, M.; Krey, L.; Barta, B.A.; Rácz, G.; Kiss, A.; Werner, M.; et al. Proteome Alterations in Human Autopsy Tissues in Relation to Time after Death. Cell. Mol. Life Sci. 2023, 80, 117.
41. Ueland, M.; Collins, S.; Maestrini, L.; Forbes, S.L.; Luong, S. Fresh vs. Frozen Human Decomposition—A Preliminary Investigation of Lipid Degradation Products as Biomarkers of Post-Mortem Interval. For. Chem. 2021, 24, 100335. [Google Scholar] [CrossRef]
42.Choi KM, Zissler A, Kim E, et al. Postmortem proteomics to discover biomarkers for forensic postmortem interval estimation. Int J Legal Med 2019;133:899-908.
43.Pittner S, Ehrenfellner B, Zissler A, et. al. First application of a protein-based approach for time since death estimation. Int J Legal Med. 2017 Mar;131(2):479-483. doi: 10.1007/s00414-016-1459-4. Epub 2016 Oct 21. IPMD: 27770266; PMCID: PMC5591615
44.Pesko, Bogumila K.; Weidt, S.; McLaughlin, M.; Wescott, D.J.; Torrance, H.; Burgess, K.; Burchmore, R. Postmortomics: The Potential of Untargeted Metabolomics to Highlight Markers for Time Since Death. OMICS J. Integr. Biol. 2020, 24, 649–659.
45.Li, C.; Ma, D.; Deng, K.; Chen, Y.; Huang, P.; Wang, Z. Application of MALDI—TOF MS for Estimating the Postmortem Interval in Rat Muscle Samples. J. Forensic Sci. 2017, 62, 1345–1350.
46.Brockbals, L.; Garrett-Rickman, S.; Fu, S.; Ueland, M.; McNevin, D.; Padula, M.P. Estimating the Time of Human Decomposition Based on Skeletal Muscle Biopsy Samples Utilizing an Untargeted LC–MS/MS-Based Proteomics Approach. Anal. Bioanal. Chem. 2023, 415, 5487–5498.
47.Mickleburgh, H.L.; Schwalbe, E.C.; Bonicelli, A.; Mizukami, H.; Sellitto, F.; Starace, S.; Wescott, D.J.; Carter, D.O.; Procopio, N. Human Bone Proteomes before and after Decomposition: Investigating the Effects of Biological Variation and Taphonomic Alteration on Bone Protein Profiles and the Implications for Forensic Proteomics. J. Proteome Res. 2021, 20, 2533–2546.
48.Pérez-Martínez, C.; Pérez-Cárceles, M.D.; Legaz, I.; Prieto-Bonete, G.; Luna, A. Quantification of Nitrogenous Bases, DNA and Collagen Type I for the Estimation of the Postmortem Interval in Bone Remains. Forensic Sci. Int. 2017, 281, 106–112. [Google Scholar] [CrossRef]

49.Prieto-Bonete G.. Pérez-Cárceles, A. Maurandi-López, C. et.al. Association between protein profile and postmortem interval in human bone remains. J.
Proteome, 2019 (192) (December 2017), pp. 54-63,
50.M.A. Sacco, F. Cordasco, C. Scalise, et.al. Systematic review on post-mortem protein alterations: analysis of experimental models and evaluation of potential biomarkers of time of death. Diagnostics, 12 (6) (2022),
51.Bonicelli, A.; Mickleburgh, H.L.; Chighine, A.; Locci, E.; Wescott, D.J.; Procopio, N. The 'ForensOMICS' Approach for Postmortem Interval Estimation from Human Bone by Integrating Metabolomics, Lipidomics, and Proteomics. eLife 2022, 11, e83658.
52.Bonicelli, A.; Di Nunzio, A.; Di Nunzio, C.; Procopio, N. Insights into the Differential Preservation of Bone Proteomes in Inhumed and Entombed Cadavers from Italian Forensic Caseworks. J. Proteome Res. 2022, 21, 1285–1298.
54. Bate-Smith EC, Bendall JR. Rigor mortis and adenosinetriphosphate. J Physiol. 1947;106:177–85.
55. Juan Luis Ruiz López, Manuel Partido Navadijo, Estimation of the post-mortem interval: a review, Forensic Science International, Volume 369, 2025, 112412, ISSN 0379-0738,
56.**Turlea, IR**, Curca GC. Recent Advances in Forensic Medicine at the Horizon of Omics Sciences and New Biomarkers for Postmortem Interval Estimation. MAEDICA (Bucur). 2025 Dec;20(4):851-863. doi: 10.26574/maedica.2025.20.4.851. IPMD: 41537070; PMCID: PMC12767902, poate fi accesat la [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC12767902/].
57. Mian Sahib Zar, Afshan Bibi, Muhammad Shoaib Akhtar, Unravelling time after death: A comprehensive review of multi-omics approaches in postmortem interval estimation, Forensic Science International, Volume 379, 2026, 112779, ISSN 0379-0738,
58.Strete, G.; Sălcudean, A.; Cozma, A.-A.; Radu, C.-C. Current Understanding and Future Research Direction for Estimating the Postmortem Interval: A Systematic Review. Diagnostics 2025, 15, 1954.
59.Péntek, L.; Szarka, G.; Ross, L.; Balogh, B.; Telkes, I.; Völgyi, B.; Kovács-Öller, T. Eyes Are the Windows to the Soul: Reviewing the Possible Use of the Retina to Indicate Traumatic Brain Injury. Int. J. Mol. Sci. **2025**, 26, 5171. https://doi.org/10.3390/ijms26115171

60.Zissler A, Ehrenfellner B, Foditsch EE, Monticelli FC, Pittner S. Does altered protein metabolism interfere with postmortem degradation analysis for IPM estimation? Int J Legal Med. 2018 Sep;132(5):1349-1356.

61.Cianci, V., Fracasso, T., Germanà, A. et al. Forensic applications of postmortem protein analysis in estimating the time since death: a systematic review. Int J Legal Med 140, 1665–1688 (2026).

62.Talari, A.C.S., Martinez, M.A.G., Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U. Advances in Fourier Transform Infrared (FTIR). Spectroscopy of Biological Tissues. Appl. Spectrosc. Rev. 2017, 52, 456–506.

63.Zhang, H.; Wang, Q.; Zhang, K.; Liu, R.; Fan, S.; Wang, Z. Estimation of Postmortem Interval Using Attenuated Total Reflectance: Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Adipose Tissues. J. Forensic Sci. Med. 2019, 5, 7.

64.Pittner S, Merold V, Anders S, et al. A standard protocol for the analysis of postmortem muscle protein degradation: process optimization and considerations for the application in forensic IPM estimation. International Journal of Legal Medicine. 2022 Nov;136(6):1913-1923. DOI: 10.1007/s00414-022-02849-3. IPMD: 35710956; PMCID: PMC9576658.

65.Ehrenfellner B, Zissler A, Steinbacher P, Monticelli FC, Pittner S. Are animal models predictive for human postmortem muscle protein degradation? Int J Legal Med. 2017 Nov;131(6):1615-1621. doi: 10.1007/s00414-017-1643-1. Epub 2017 Jul 18. IPMD: 28721468; PMCID: PMC5635072.

66.Bodor GS, Survant L, Voss EM, et al. Cardiac troponin T composition in normal and regenerating human skeletal muscle. Clin Chem. 1997;43(3):476-84

67.**Turlea, IR,** G. Curca, L. Matei, C. Trandafir, F. Perde. Limitations of ELISA immunological analyses in determining the postmortem interval. Rom J Leg Med33(2)162-165(2025), DOI:10.4323/rjlm.2025.162, poate fi accesat la [https://rjlm.ro/index.php/arhiv/1052].

68. Mañas-Jordá S, León-Cortés JL, García-García MD, Caballero U, Infante F. Dipteran Diversity and Ecological Succession on Dead Pigs in Contrasting Mountain Habitats of Chiapas, Mexico. J Med Entomol. 2018 Jan 10;55(1):59-68.

69.Rinnan, A.; van den Berg, F.; Engelsen, S.B. Review of the Most Common Pre-Processing Techniques for near-Infrared Spectra.TrAC Trends Anal. Chem. 2009, 28, 1201–1222. [CrossRef]

70. Afseth, N.K.; Kohler, A. Extended Multiplicative Signal Correction in Vibrational Spectroscopy, a Tutorial. Chemom. Intell. Lab.Syst. 2012, 117, 92–99.
71.Meurs J, Krap T, Duijst W. Evaluation of postmortem biochemical markers: Completeness of data and assessment of implication in the field. Sci Justice. 2019 Mar;59(2):177-180.