MEMORIU ȘTIINȚIFIC

Activitatea didactică și de cercetare

Sunt cadru didactic în cadrul Disciplinei de Medicină Legală și Bioetică, Facultatea de Medicină, UMFCD din anul 2022 (asist. univ. perioadă determinată), asistent univ. pe perioadă nedeterminată (atestarea UMFCD din anul 2024), medic specialist medicină legală în INML „Mina Minovici București prin concurs (din anul 2022), în integrare clinică în INML „Mina Minovici" din anul 2025. Am Indice Hirsch 1, 3 articole ISI WoS Clarivate, 2 articole Pubmed, 21 citări.

Titlul tezei de doctorat:

CONTRIBUTII ÎN ESTIMAREA INTERVALULUI POSTMORTEM ÎN PRACTICA MEDICO-LEGALĂ

Doctorand:

ȚURLEA IOANA - RUXANDRA

Conducător științific:

PROFESOR UNIV. DR GEORGE CRISTIAN CURCĂ

I. Tema lucrării

Scopul tezei de doctorat este să evidențieze utilitatea investigațiilor de laborator în estimarea intervalului postmortem, IPM și să cerceteze posibilitățile de estimare a intervalului postmortem folosind analiza spectrală a metaboliților din umoarea vitroasă, UV cadaverică prin ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy) și a degradării proteinelor Troponina T cardiacă (fracțiunea cTnT), vinculină și desmină din mușchiul scheletic cadaveric prin imunoteste**:** ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) și electroforeza SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulfat-Poliacrilamida Gel Electroforeza) cu Western Blot și evaluarea comportamentelor predictive privind intervalului postmortem pe care aceste componente moleculare le pot arăta pentru a îmbunătăți predicția intervalului postmortem în cazuri practice medico-legale.

II. Motivația alegerii temei

Estimarea intervalului postmortem (IPM) este una dintre etapele importante în cercetarea la fața locului în fiecare caz de deces, având o mare însemnătate judiciară. Cercetările privind data probabilă a morții sau intervalul postmortem sunt tot atât de vechi precum medicina legală, dar în ultimii ani, o dată cu dezvoltarea științelor omice, au fost reactualizate, pe de o parte, pentru a beneficia de dezvoltarea tehnologică fără precedent care se întrevede la orizontul științelor omice, dar și pentru că nevoia judiciară de datare a decesului este tot mai accentuată: doar în anul 2025 au fost publicate cu factor de impact un număr de 22 review-uri despre intervalul postmortem, ca dovadă a interesului științific crescând. Cercetările includ atât modele pe

animale, cât și pe om. Există un număr de 21 de studii pe om și produse biologice umane, între care se încadrează și studiul întreprins în partea originală a tezei. Majoritatea acestor studii privesc degradarea proteinelor în perioada postmortem, ceea ce am întreprins și eu în studiul al doilea, dar pentru primul studiu am ales să dezvolt o cercetare mai rară, prin care studiez comportamentul metaboliților din umoarea vitroasă umană cadaverică după deproteinizare și analiza folosind metoda spetroscopiei cu infraroșu, tehnica ATR-FTIR și interpretarea rezultatelor prin analiza statistică PLS, regresia multivariate, capabilă de a asocia date multe și heterogene: astfel este al 4-lea studiu pe om privind estimarea IPM în UV și unul dintre puținele ce folosesc ATR-FTIR, beneficiind de interpretarea rezultatelor cu regresie multivariată și singurul de acest fel la nivel național.

III. Obiectivele lucrării

Obiective generale:

1. Evidențierea modificărilor 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.
2. Constituirea unui protocol de transport și de biosecuritate a probelor biologice umane cadaverice pentru a fi folosite în laborator în vederea estimării IPM

Obiective specifice:

1. Studiul metabolomic folosind ATR-FTIR în umoarea vitroasă
    a) Evidențierea unui profil spectral metabolomic în UV în cazuri randomizat selecționate (randomizare stratificată), în care IPM este cunoscut (decese din spital) și identificarea unui model metabolomic prin interpretare statistică folosind regresie multivariată și Random Forest.
    b) Aplicarea modelului metabolomic ATR-FTIR pentru estimarea IPM în cazurile medico-legale reale din practică, în care există IPM necunoscut și care beneficiază de un IPM estimat prin mijloace convenționale, care evaluează modificările postmortem și degradarea cadavrului.
    c) Verificarea modului în care modelul metabolomic ATR-FTIR poate avea valoare predictivă în cazuri reale, folosind regresia multivariată și Random Forest.
    d) Stabilirea limitelor aplicabilității modelului bazat pe profilul metabolomic al UV
2. Studiul proteomic de degradare din mușchiul scheletic uman a proteinelor Troponina T cardiacă prin SDS-PAGE cu Western Blot și Troponina T cardiacă, vinculină și desmină folosind ELISA
    a) Determinarea valorilor vinculinei, desminei și a Troponinei T cardiace în mușchiul scheletic uman prin imunoteste ELISA și electroforeză SDS-PAGE cu Western Blot
    b) Compararea valorilor rezultatelor cu datele din literatura științifică de specialitate în scopul evalurării acestor metode imunologice în vederea estimării IPM, cu precădere a IPM precoce.

c) Verificarea aplicabilității degradării proteinelor în etapa postmortem pentru estimarea IPM în laboratorul de serologie medico-legală.
d) Stabilirea limitelor folosirii rezultatelor obținute în urma degradării proteinelor vinculina, desmina, Troponina T cardiacă în estimarea IPM.

IV. Ipoteze de lucru

1. Studiul metabolomic folosind ATR-FTIR în umoarea vitroasă:
   În cazuri de persoane neidentificate decedate în spital (lot de control), la care se solicită oficial estimarea IPM (data decesului ca obiectiv al ordonanței organului judiciar) și la care se cunoaște din actele medicale data decesului (zi, ora, minut), precum și din actele medico-legale data autopsiei (zi, ora, minut) astfel încât IPM este cunoscut ca variabilă independentă, păstrând aleator felul, cauza morții și caracteristicile individuale (randomizare stratificată) să determinăm prin analiză spectrală ATR-FTIR comportamentul metaboliților din UV în raport cu IPM cunoscut pentru a stabili un profil metabolic experimental prin regresie multivariată pe care apoi să îl folosim pentru a estima IPM in lotul de studiu (cazuri din teren din practica medico-legală), în care IPM este o variabilă dependentă și apoi să comparăm predicția ATR-FTIR a profilului metabolomic cu predicția IPM estimat prin mijloace convenționale bazate pe modificările postmortem și degradarea cadavrului în urma examenului medico-legal de la fața locului.

2. Studiul proteomic de degradare din mușchiul scheletic uman a proteinelor Troponina T cardiacă prin SDS-PAGE cu Western Blot și Troponina T cardiacă, vinculină și desmină folosind ELISA:
   Într-un caz selectat cu IPM cunoscut (36,8 ore postmortem), persoană neidentificată decedată în spital, să se determine valorile de degradare proteică în mușchiul scheletic uman a vinculinei, desminei și Troponinei T cardiace prin testul imunlogic ELISA și a Troponinei T cardiace prin electroforeză SDS-PAGE cu Western Blot pentru a obține valori benchmark, de referință, pentru 36,8 ore postmortem, care vor putea fi folosite ulterior pentru estimarea IPM în cazuri reale medico-legale în practica curentă.

V. Metodologie

Ambele studii de cercetare au fost pe om și produse biologice umane: studiul de metabolomică a avut în analiză umoare vitroasă cavaderică, studiul de proteomică a analizat degradarea proteinelor Troponină T cardiacă, precum și a proteinlor de citoschelet vinculină și desmină din mușchiul cadaveric uman.

Studiul metabolomic este un studiu experimental pe 30 de cazuri (cu două loturi, din care unul de control cu 20 cazuri cu IPM cunoscut, la care se stabilește un profil metabolomic experimental prin ATR-FTIR și un lot de studiu cu IPM necunoscut, estimat prin mijloace

convenționale postmortem la fața locului). Studiul metabolomic este un studiu analitic, pseudostratificat (cu IPM ca variabilă indepedentă în lotul 1 și variabilă dependentă în lotul 2), Analize statistice multiple: Python (v3.11.7) cu preprocesare prin Corecția Semnalului Multiplicativ Extins (EMSC), transformarea derivată de ordinul doi și centrare pe medie, analiza internsității vârfurilor corelate cu IPM prin coreficienți de corelație Pearson, cu Analiza Componentei Principale (PCA), Regresia PLS (Partial Least Squares) cu LOOCV și RMSECV, calibrarea modelului final cu RMSE (root mean square error), MAE - eroarea absolută medie, R^2 (coeficientul de determinare), interpretare spectrală folosind coeficienți de regresie standardizați inclusiv incertitudine, clasificare binară a mostrelor folosind Analiza Discriminantă Liniară (LDA) [315], Analiza Discriminantă Cuadratică (QDA), Mașini de Suport Vectorial (SVM) cu kerneluri liniare și bazate pe funcții radiale (RBF) și Random Forest, în care performanța modelului a fost evaluată folosind LOOCV, analiza comparativă a metodelor de regresie, pentru care au fost folosite metoda celor mai mici pătrate obișnuite (OLS), metoda celor mai mici pătrate parțiale (PLS), regresia Huber, regresia Theil–Sen, RANSAC (RANdom SAmple Consensus), toate evaluate folosind LOOCV, performanța modelului fiind evaluată cu RMSE, MAE și R^2.

Studiul de proteomică - studiu non-experimental observațional pe un singur caz, în care se identifică valori de degradare ale Troponinei T cardiace, vinculinei și desminei, care se precizează ca valori de referință pentru IPM cunoscut de 36.8 ore.
Ambele studii au aviz de etică a cercetării de la Comisia de Etică a cercetării din INML MM (nr. 3000/05.03.2024).

VI. Structura lucrării

Introducere și justificarea temei

1. Estimarea IPM prin metode convenționale
2. Estimarea IPM prin metode și tehnici de laborator
3. Ipoteza de lucru şi obiectivele generale
4. Metodologia generală a cercetării
5. Studiul metabolomic al umorii vitroase la cadavru folosind spectroscopia FTIR și analiza prin regresie multivariată în estimarea IPM, concluzii și perspective de cercetare viitoare
    - 5.1 Introducere
    - 5.2 Material si metodă, cazuistică, formule de calcul ale IPM
    - 5.3 Rezultate
    - 5.4 Discuții
    - 5.5 Concluziile studiul de metabolomică
6. Studiul proteomic asupra degradării proteinelor în mușchiului scheletic la cadavru folosind testele imunologice Western Blot și ELISA pentru estimarea IPM
    - 6.1 Introducere
    - 6.2 Material și metodă, prezentare de caz
    - 6.3 Rezultate

6.4 Discuții
6.5 Concluziile studiului de proteomică
7. Concluzii și contribuții personale

VII. Rezultate așteptate

Se anticipează că modelul experimental metabolomic ce decurge din analiza spectrala ATR-FTIR din UV și interpretat statistic prin regresie multivariată, Random Forest cu performanța modelului, evaluată cu RMSE, MAE și R2 este stabil, robust și poate fi aplicat pe cazuri reale medico-legale, având o valoare practică, prin care aduc elemente utile atunci când estimarea IPM precoce prin mijloace convețională bazate pe examinarea postmortem a cadavrului are nevoie de validare.

Se anticipează că degradarea proteinelor în perioada autolitică are valoare predictivă în estimarea IPM în analiza imunologică (imunoteste ELISA, SDS-PAGE cu Western Blot) din mușchiul scheletic uman și că valorile identificate pot fi considerate, în aceleași condiții, ca valori de referință pentru 36.8 ore IPM.

VIII. Originalitatea și contribuțiile lucrării

Ambele studii sunt pe om și pe produse biologice umane. Ambele studii folosesc un protocol de biosecuritate creat special pentru aceste studii pentru folosirea produselor biologice umane cadaverice în laborator. Ambele studii au o valoare ridicată translațională, pentru a fi folosite în practica medico-legală curentă.

Studiul de metabolomică are un design original de studiu structurat pe două cohorte (IPM_C și IPM_E) în care se identifică un profil metabolomic experimental validat prin analiză statistică mutiplă în care regresia multivariată și clasificarea binară Random Forest se dovedesc optimale pentru cazuistica curentă medico-legală, care au o structură heterogenă cu multe condiționalități ("extraneous" – ex. temperaturi, umiditate, dispunere pe sol/în sol, prezență haine, timpul până la anunț, etc. și "confounding factors" ex. felul mortii, cauza mortii, comorbidități, etc.).

Acest studiu a mai identificat carbohidrații/glicoproteinele și fosfolipidele eliberate prin ruperea membranelor ca fiind noi biomarkeri cu predictibilitate robustă în estimarea IPM.
Studiul a mai dovedit că expunerea prelungită la frig decuplează modificările biochimice dependente de timp în umoarea vitroasă, ceea ce aduce în prim plan necesitatea cunoașterii temperaturilor experiementale sau de la fața locului pentru o predicție cât mai apropiată de realitate a IPM.

Studiul de proteomică identifică valori ELISA pentru cTnT 178,85 pg/ml, vinculină 570,96 pg/ml și desmină 565,77 pg/ml la 36,8 ore IPM, iar SDS-PAGE cu Western Blot o bandă de degradare a vinculinei de 87 kDa, ce ar putea fi specifică pentru IPM la 36,8 ore, valori pe care

le apreciem, pentru condițiile date în acest caz, valori de referință (benchmark) pentru intervalul IPM de studiu 36.8 ore (aspect încă necesar a fi validat).

IX. Bibliografie selectivă

1. Madea B. Methods for determining time of death. Forensic Sci Med Pathol. Dec;12(4):451-485, 2016.
2. 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).
3. 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).
4. Zissler, A.; Stoiber, W.; Steinbacher, P.; Geissenberger, J.; Monticelli, F.C.; Pittner, S. Postmortem Protein Degradation as a Tool to Estimate the IPM: A Systematic Review. Diagnostics **2020**, 10, 1014.
5. Zelentsova, E. A., Yanshole, L. V., Melnikov, A. D., Kudryavtsev, I. S., Novoselov, V. P., & Tsentalovich, Y. Post-mortem changes in metabolomic profiles of human serum, aqueous humor and vitreous humor. 2020, Metabolomics, 16 (7) | 10.1007/s11306-020-01700-3
6. 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.
7. 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,
8. 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
9. 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,
10. 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.