

УДК: 616-091.1/5:616.831.9]:340.6

*М.С. Гараздюк,**В.Т. Бачинський,**О.І. Гараздюк,**І.Л.Беженар*

Вищий державний навчальний заклад України "Буковинський державний медичний університет", м. Чернівці

ДІАГНОСТИКА ДАВНОСТІ НАСТАННЯ СМЕРТІ ЗА АЗИМУТОМ ЛАЗЕРНО-ІНДУКОВАНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ПЛІВОК ЛІКВОРУ**Ключові слова:** автофлуоресценція, ліквор, давність настання смерті.**Резюме.** Серед безлічі нових методів дослідження біологічних тканин оптичні поляризаційні методи є одними із найбільш перспективних в оцінці давності настання смерті (ДНС).**Метою роботи** є розробка та апробація методу двомірного стокс-поляриметричного картографування біологічних шарів з метою встановлення інтервалу і точності визначення ДНС шляхом статистичного аналізу динаміки посмертних змін координатних розподілів значень азимута лазерно-індукованої флуоресценції полікристалічних плівок ліквору (ППЛ).**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження є ППЛ, забрані у 78 трупів з точно встановленим часом смерті і у 20-ти здорових добровольців. Координатні розподіли значень азимута аутофлуоресценції визначали для кожного зразка ППЛ в оптичному пристрої Стокс-поляриметра в короткохвильових діапазонах спектру оптичного випромінювання.**Результати та висновки.** Досліджено динаміку посмертних змін величини статистичних моментів 1 - 4-го порядків, які характеризують розподілу значень азимута поляризації зображень ППЛ і виявлено, що найбільш чутливими є статистичні моменти 3-го і 4-го порядків, які характеризують асиметрію і ексцес розподілів значень азимута зображень ППЛ. Було встановлено оптимальний інтервал в 24 години з точністю оцінки ДНС у 25 хв для білків і НАДН.**Вступ**

У зв'язку із складністю вирішення проблеми визначення ДНС багатьма вітчизняними та закордонними науковцями було докладено значних зусиль для розробки нових методів дослідження біологічних тканин та рідин організму людини, які б дозволили із високою об'єктивністю та точністю вирішити дане питання [1,2,6,8,10,12,14].

Оптико-фізичні флуоресцентні методи широко та з високою ефективністю застосовуються в медичній діагностиці пухлин різного генезу, для виявлення та дослідження інших патологічних процесів, що розвиваються у тканинах та рідинах організму людини [6,9,11]. Ці методи засновані на використанні явища флуоресценції, яке базується на вторинному випромінюванні різноманітних молекулярних структур, що виникає під дією короткохвильового оптичного випромінювання на біологічну тканину або рідину.

На сьогодні у аспекті діагностики ДНС порівняно мало вивченими є біологічні рідини, зокрема ліквор та склисте тіло. Значну увагу як

об'єкт дослідження привертає до себе спинномозкова рідина, оскільки відносна сталість її хімічного складу у різних осіб дає можливість дослідити ті посмертні процеси, що можуть у ній розвиватися [5].

Наше дослідження орієнтоване на динаміку посмертних змін у білкових структурах, що містяться у лікворі. Структура білків змінюється завдяки процесам окислення, які тривають і після смерті людини, що призводить до зміни третинної структури білка, агрегації та фрагментації білка та появи так званих середньомолекулярних сполук [3].

Власна флуоресценція білків зумовлена наявністю трьох ароматичних амінокислот - фенілаланіну, тирозину та триптофану. У меншій мірі флуоресценцією володіють гістидин та пролін. Найбільший внесок у флуоресценцію білків (90%) вносить амінокислота триптофан [4].

Максимум флуоресценції складних молекул зміщений в короткохвильову ділянку порівняно з максимумом флуоресценції окремих компонентів

молекули [6]. Спектр поглинання білків сироватки крові відрізняється від спектрів поглинання амінокислот, оскільки спектр поглинання останніх зміщений в довгохвильову ділянку. Максимуму флуоресценції триптофану в білках по відношенню до вільного триптофану зміщено в короткохвильову область. Спектр флуоресценції білків змінюється при зміні середовища, в якому на даний момент знаходиться цей білок, наприклад при зміні структури білка, при зв'язуванні білків з лігандами, при утворенні комплексів білок-білок, при розпаді білка та ін.

У нашому дослідженні ми використали методику, що заснована на збудженні власної флуоресценції біологічних молекул випромінюванням лазера - лазерно-індукована флуоресценція. Даний метод дозволяє поєднати вивчення у різних спектральних ділянках розподілів інтенсивності власної флуоресценції.

Мета дослідження

Точніше установити інтервал ДНС шляхом статистичного аналізу динаміки посмертних змін координатних розподілів значень азимута лазерно-індукованої флуоресценції (ЛІФ) полікристалічних плівок ліквору (ППЛ), використовуючи метод двомірного картографування власної флуорес-

ценції біологічних шарів.

Матеріал і методи

Як об'єкт дослідження використовувалися ППЛ, забрані у 78 трупів обох статей (основна група дослідження) віком від 32-х до 91-го року з попередньо відомим часом настання смерті, що становив від 1 до 44 год, та 20 здорових добровольців (група порівняння). Відбір ліквору здійснювався методом субокципітальної пункції з великої потиличної цистерни у трупів та при спінальній анестезії при підготовці до оперативних втручань у здорових добровольців. До основної групи відбирали ліквор від трупів, що померли від серцево-судинної патології - 64 випадки (82,05%), від туберкульозу легень - 8 випадків (10,25%), від пухлин різних відділів шлунково-кишкового тракту - 6 випадків (7,7%).

Автофлуоресцентна лазерна поляриметрія

На рис. 1 наведена схема модифікованого для досліджень автофлуоресценції біологічних шарів лазерного стокс-поляриметра [5,12].

Режим опромінювання ППЛ 6 складався з паралельного ($\varnothing=2 \times 10^3 \mu\text{m}$) пучка "синього" ($\lambda_s=0,405 \mu\text{m}$) напівпровідникового лазера 1. Поляризаційний опромінювач складався з двох поляризаційних елементів - чвертьхвильової плас-

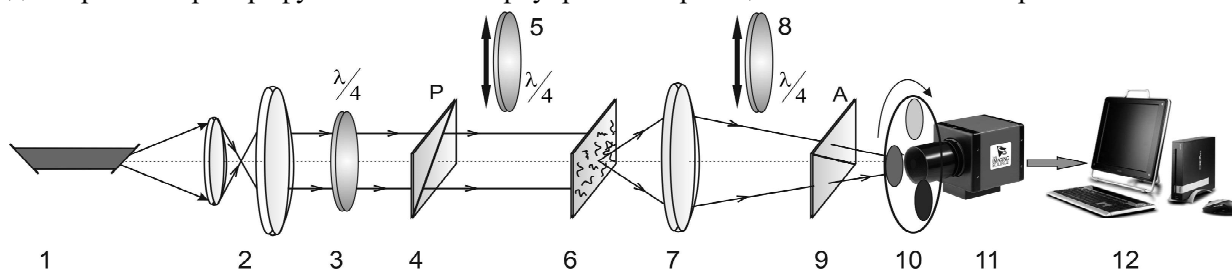


Рис. 1. Оптична схема автофлуоресцентного стокс-поляриметра. Пояснення у тексті.

тинки 3 та поляризатора 4. Зображення зразків ППЛ 6 за допомогою поляризаційного мікрооб'єктива 7 (Nikon CFI Achromat P, фокусна відстань - 30мм, апертура - 0.1, збільшення - 4x) проектувалося у площину світлочутливої площинки CCD-камери 10 (The Imaging Source DMK 41AU02.AS, monochrome 1/2" CCD, Sony ICX205AL (progressive scan); роздільна здатність - 1280x960; розмір світлочутливої площинки - 7600x6200мкм;

чутливість - 0.05 lx; динамічний діапазон - 8 bit). Поляризаційний аналіз зображень зразків ППЛ 6 відбувався за допомогою чвертьхвильової пластинки 8 та поляризатора 9.

Отже, головними інформаційними об'єктами для сукупності оптико-фізичних методів діагностики ДНС у нашій роботі є сукупність безпосередньо виміряних координатних розподілів поляризаційних параметрів α_{ik} ($m \times n$) ППЛ

$$\alpha_{ik}(m \times n) = \begin{pmatrix} (\alpha_{ik})_{11} & \dots & (\alpha_{ik})_{1n} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ (\alpha_{ik})_{m1} & \dots & (\alpha_{ik})_{mn} \end{pmatrix}$$

(1)

Як основний аналітичний інструмент для оцінювання розподілів значень азимута поляризації (АП) зображень ППЛ (у подальшому $q(m \times n)$)

використовувалися статистичні моменти (СМ) першого (Z_1), другого (Z_2), третього (Z_3) і четвертого (Z_4) порядків, які обчислювалися за та-

кими алгоритмами [5,13]:

$$\begin{aligned} Z_1 &= \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N q_j; \\ Z_2 &= \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (q^2)_j}; \\ Z_3 &= \frac{1}{Z_2^3} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (q^3)_j; \\ Z_4 &= \frac{1}{Z_2^4} \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N (q^4)_j, \end{aligned} \quad (2)$$

де N - кількість пікселів світлочутливої площадки CCD-камери.

Надалі здійснювалося вимірювання параметрів вектора Стокса зображень ППЛ, зокрема визначалася величина вектора Стокса S шляхом проведення вимірювань координатних розподілів значень інтенсивності I_0 ($m \times n$) лазерних зображень під кутом $\Theta=0^\circ$ та I_{90} ($m \times n$) при повороті площини пропускання поляризатора на кут $\Theta=90^\circ$

На основі визначення вектора Стокса S [5] знаходимо його перший S_1 і другий S_2 параметри

$$S_1 = I_0 + I_{90} \quad (3)$$

$$S_2 = I_0 - I_{90} \quad (4)$$

Надалі орієнтуємо площину пропускання поляризатора під кутом $\Theta=45^\circ$ і вимірюємо координатний розподіл I_{45} ($m \times n$) та на кут $\Theta=135^\circ$ і вимірюємо координатний розподіл значень інтенсивності I_{135} ($m \times n$). Обчислюємо третій S_3 параметр вектора Стокса:

$$S_3 = I_{45} - I_{135} \quad (5)$$

Для вимірювання четвертого параметра вектора Стокса S_4 встановлюємо чвертьхвильову пластинку 8 (рис. 1); орієнтуємо її вісь найбільшої швидкості під кутом 0° ; площину пропускання поляризатора 9 орієнтуємо під кутом $\Theta=45^\circ$ та вимірюємо координатний розподіл значень інтенсивності правоциркулярно поляризованого випромінювання I_0 ($m \times n$).

Орієнтуємо площину пропускання поляризатора відносно напрямку осі найбільшої швидкості чвертьхвильової пластинки під кутом $\Theta=135^\circ$ і вимірюємо розподіл значень інтенсивності лівоциркулярно поляризованого випромінювання I_0 ($m \times n$). Визначаємо координатний розподіл 4-го параметра:

$$S = I_0 - I_0 \quad (6)$$

Одержавши двомірні розподіли значень параметрів вектора Стокса $S_{i=1;2;3;4}(m \times n)$ ми розраховували координатні розподіли значень азимута поляризації зображення досліджуваної ППЛ за

наступним співвідношенням:

$$\alpha(m \times n) = 0,5 \arctg \frac{S_3(m \times n)}{S_2(m \times n)} \quad (7)$$

Обговорення результатів дослідження

Двомірне картографування розподілів АП ЛФФ молекулярних комплексів ППЛ у "короткохвильовій" ділянці спектру.

Описана поляризаційна методика несе принципово нову інформацію про молекулярну складову полікристалічної будови ППЛ, що суттєво розширює функціональні можливості визначення інтервалу та точності устанавлення ДНС. Якщо картографування розподілів значень інтенсивності ЛФФ та їхня часова динаміка, обумовлені концентраційними змінами молекулярних комплексів у різних спектральних ділянках оптичного випромінювання, то картографування АП забезпечує можливість отримати інформацію про ступень орієнтації молекул флуорофорів [6,8].

При проведенні картографування розподілів значень АП лазерно-індукованої флуоресценції ППЛ у "короткохвильовій" ділянці спектру застосовувався смуговий світлофільтр з максимумом пропускання $\lambda_{\max}^{(1)} = 0,45 \text{ мкм}$.

На серії рис. 2 і рис. 3 приведено приклади результатів часового поляризаційного картографування двомірних розподілів значень АП мікроскопічних зображень ЛФФ молекул білків та нікотинаміднуклеотиду НАДН ППЛ трупа людини.

Аналіз одержаних даних виявив:

Обидва мікроскопічних зображення ЛФФ ППЛ є координатно-неоднорідними (рис. 2, рис. 3, ліві частини) незалежно від зміни часу спостереження після настання смерті.

Топологічна структура координатних розподілів АП переважно дрібномасштабна та складається з просторово розподілених доменів, у межах яких формуються різні значення даного параметру, що складають певний діапазон зміни значень АП у гістограмах розподілу його величини (рис. 2, рис. 3, праві частини).

Із збільшенням часу спостереження за рахунок дегенеративних змін біохімічної структури ППЛ трупа людини має місце гасіння флуоресценції та разорієнтація молекулярних диполів, які випромінюють у "синій" ділянці спектру оптичного випромінювання.

Порівняльний аналіз гістограм розподілу випадкових значень АП ЛФФ показує, що діапазон розкиду зменшується (рис. 2, рис. 3, праві частини) у 1,4 раза за 3 години після настання смерті.

Найбільш чутливими до дегенеративних змін є СМ 3-го і 4-го порядків, які характеризують асиметрію та ексцес (гостроту піку) розподілу ви-

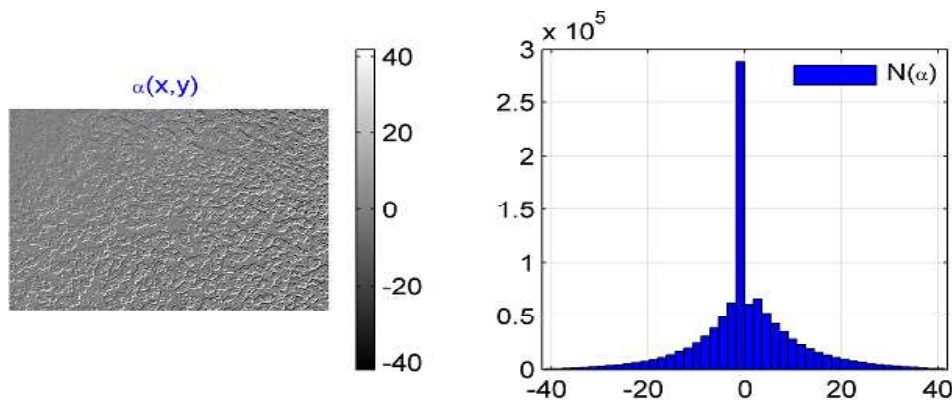


Рис. 2. Координатна структура (ліва частина) та гістограма розподілу (права частина) випадкових значень АП зображення власної флуоресценції ППЛ у короткохвильовій ділянці спектру оптичного діапазону. ДНС 1 год

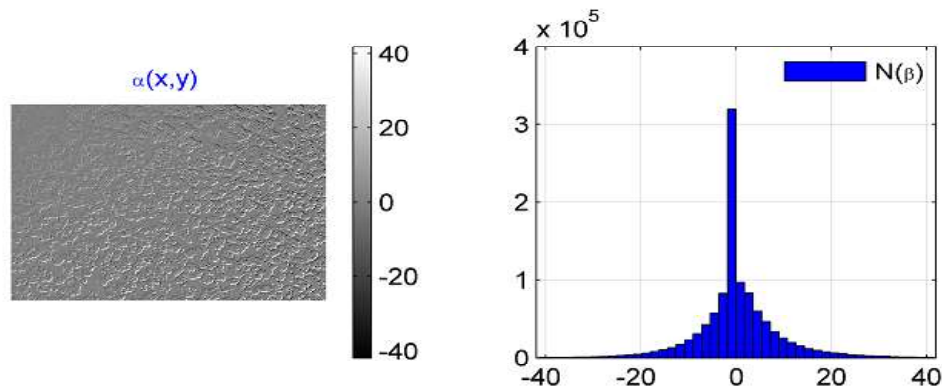


Рис. 3. Координатна структура (ліва частина) та гістограма розподілу (права частина) випадкових значень АП зображення власної флуоресценції ППЛ у короткохвильовій ділянці спектру оптичного діапазону. ДНС 3 год

падкових значень АП флуоресцентного випромінювання сукупності молекул білків та нікотинаміднуклеотиду НАДН - таблиця.

Аналіз часової динаміки зміни статистичної структури поляризаційної мапи азимутів мікроскопічних зображень власної флуоресценції ППЛ тру-

па людини у "синій" області спектру показав, що діапазон зміни значень СМ 3-го порядку складає 2,04 раза; СМ 4-го порядку складає 1,88 раза.

Аналітичний алгоритм визначення ДНС Схему аналітичного визначення ДНС ілюструє рис. 4.

Таблиця

Часові залежності величини СМ 3-го - 4-го порядків, які характеризують розподіли значень АП зображення ЛФ молекул білків та НАДН

T , год.	1	6	12	18	24	30
Z_3	$0,82 \pm 0,062$	$0,99 \pm 0,069$	$1,16 \pm 0,088$	$1,33 \pm 0,098$	$1,5 \pm 0,12$	$1,67 \pm 0,13$
Z_4	$0,98 \pm 0,077$	$1,15 \pm 0,095$	$1,32 \pm 0,11$	$1,49 \pm 0,12$	$1,66 \pm 0,13$	$1,83 \pm 0,14$

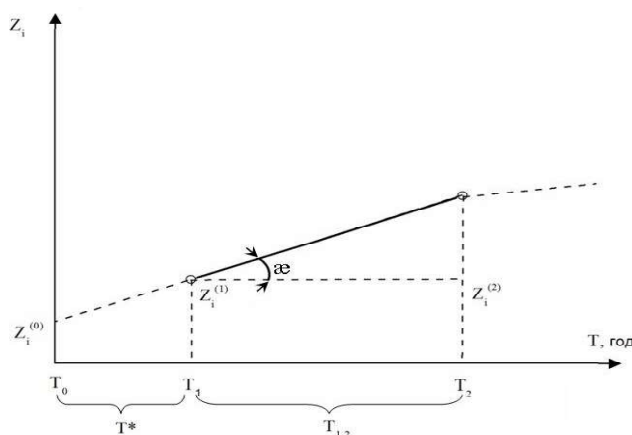


Рис. 4. До аналізу алгоритму аналітичного визначення ДНС. Тут: T_1 - час початку вимірювань показника $Z_i^{(1)}$; T_2 - час завершення вимірювань показника $Z_i^{(2)}$ на етапі "стабілізації" зміни його величини ($Z_i^{(2)}(T) \approx const$); T_0 - час настання смерті; ξ - кут нахилу інформаційної залежності $Z_i(T)$

З аналізу модельної схеми, що наведена на рис. 4, можна одержати наступні співвідношення для визначення ДНС:

$$\operatorname{tg} \xi = \frac{Z_i^{(1)} - Z_i^{(2)}}{T_2 - T_1} = \frac{\Delta Z_i^{(1,2)}}{\Delta T_{12}} \quad (8)$$

Використовуючи співвідношення (8), одержимо вираз для визначення ДНС:

$$T^* = Z_i^{(0)} \frac{\Delta T_{12}}{\Delta Z_i^{(1,2)}} \quad (9)$$

Тут $Z_i^{(0)}$ - значення об'єктивного параметру, визначене шляхом прижиттєвого забору ліквору у донора.

Висновки

1. Апробовано методику двомірного стокс-поляриметричного картографування розподілів азимута поляризації мікроскопічних зображень лазерно-індукованої власної флуоресценції полікристалічних плівок ліквору у часовому моніторингу посмертних змін різних біохімічних молекулярних комплексів ендогенних флуорофорів з метою визначення давності настання смерті у різних спектральних діапазонах оптичного випромінювання.

2. Для короткохвильового діапазону флуоресценції молекул білків та нікотинаміднуклеотиду НАДН встановлено інтервал 24 год. та точність визначення ДНС 25 хв.

Перспективи подальших досліджень

Лазерні поляриметричні методики успішно застосовуються у багатьох галузях медицини для діагностики різних патологічних станів. Отримані нами результати у значній мірі розширюють та уточнюють нині існуючі відомості про динаміку посмертних змін біологічних рідин і можуть бути використані в практиці бюро судово-медичної експертизи та роботі судово-слідчих органів з метою об'єктивного визначення ДНС.

Доцільними є подальші дослідження, що дозволять удосконалити та підвищити точність визначення часу, що минув після настання смерті.

Література. 1. Бачинський В.Т. Актуальність дослідження ліквору в судово-медичній практиці / В.Т. Бачинський, О.Я. Ванчуляк, М.С. Гараздюк, О.І. Гараздюк, О.Г. Паливода // Судово-медична експертиза. - 2015. - № 2. - С. 28-34. 2. Ванчуляк О.Я. Застосування поляризаційного методу для аналізу пошкоджень біотканин / О.Я. Ванчуляк, О.Г. Ушенко, І.Л. Беженар // Буковинський медичний вісник. - 2004. - Т.8, №3-4. - С.300-301. 3. Ермаков А.В. Изменения уровня среднемолекулярных соединений в ликворе в зависимости от времени наступления смерти / А. В. Ермаков // Проблемы экспертизы в медицине. - 2004. - № 4 (16). - Т.4. Ижевск. - С. 25 -26. 4. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков/ А.П. Демченко - Київ : Наук. думка, 1988. -277 с. 5. Неврологія: підручник / Т. І. Кареліна, Н. М. Касевич; за ред. Н. В. Литвиненко. - К.: Медици-

на, 2014.-287 с. 6. Основы лазерной поляриметрии биологических жидкостей / за ред. О.Г. Ушенко, Т.М. Бойчука та ін. - Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2011. - 656 с. ISBN 978-966-423-189-0. 7. Changde Peng, Jinsong Liu. Studies on Red-Shift Rules in Fluorescence Spectra of Human Blood Induced by LED/ P.Changde, L. Jinsong// Applied Physics Research (China).-2013 - Vol. 5, No. 1. 8. Chen J. H Cardiac biomarkers in blood, and pericardial and cerebrospinal fluids of forensic autopsy cases: A reassessment with special regard to postmortem interval / J.H.Chen, O. Inamori-Kawamoto, T. Michiue, S Ikeda [et al.] // Legal Medicine (Tokyo). - 2015. - 17(5). - P. 343-350. doi: 10.1016/j.legalmed.2015.03.007. Epub 2015 Apr 30. 9. Erythrocyte Protoporphyrin Fluorescence as a Biomarker for Monitoring Antiangiogenic Cancer Therapy/ De Goes Rocha, F. G. Barbosa Chaves, K. C. Gomes // Journal of fluorescence.- 2010. - 20(6) - 1225-1231. 10. Estimation of postmortem interval through albumin in CSF by simple dye binding method / A.K. Parmar, S.K. Menon // Sci Justice. - 2015. - 55(6) - P. 388-393. doi: 10.1016/j.scijus.2015.07.005 11. Detection of Energy Metabolism Level in Cancer Patients by Fluorescence Emission from Serum / Nina Mikirova, Hugh D. Riordan, Paul Rillema // Journal of Orthomolecular Medicine - 2003.-Vol. 18, No. 1. 12. Prieto-Bonete, G Morphological and histological changes in eye lens: Possible application for estimating postmortem interval / G. Prieto-Bonete, M.D. Perez-Carceles [et al.] // Leg Med (Tokyo). - 2015. - 17(6). - P. 437-442. doi: 10.1016/j.legalmed.2015.09.002 13. Mueller-matrix diagnostics of optical properties inherent to polycrystalline networks of human blood plasma / Yu.A. Ushenko, A.V. Olar, A.V. Dubolazov [et al.] // Semicond. Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics, 14(1), 98-105, 2011. 14. Ushenko V.O. Polarization correlometry of polycrystalline films of human liquids in problems of forensic medicine / V.O. Ushenko, O.V. Olar, Yu.O. Ushenko, M.P. Gorsky, I.V. Soltys // Proc. SPIE 9809, Twelfth International Conference on Correlation Optics, 98091B (November 30, 2015), doi:10.1117/12.2228997.

ДІАГНОСТИКА ДАВНОСТІ НАСТУПЛЕННЯ СМЕРТІ ЗА АЗИМУТОМ ЛАЗЕРНО-ІНДУЦІРОВАНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ ПЛІВОК ЛІКВОРА

М.С. Гараздюк, В.Т. Бачинський, А.І. Гараздюк, І.Л. Беженар

Резюме. Среди множества новых методов исследования биологических тканей оптические поляризационные методы являются одними из наиболее перспективных в оценке давности наступления смерти (ДНС).

Целью работы является разработка и апробация метода двухмерного стокс-поляриметрического картографирования биологических слоев с целью установления интервала и точности определения ДНС путем статистического анализа динамики посмертных изменений координатных распределений значений азимута аутофлуоресценции изображений поликристаллических пленок ликвора (ППЛ).

Материалы и методы. Объектом исследования являются ППЛ, изъятые у 78 трупов с точно известным временем смерти и у 20-ти здоровых добровольцев. Координатные распределения значений азимута аутофлуоресценции определяли для каждого образца ППЛ в оптическом устройстве поляриметра Стокса в коротковолновых диапазонах спектра оптического излучения.

Результаты и выводы. Исследована динамика посмертных изменений величины статистических моментов 1-4-го порядков, характеризующих распределения значений азимута поляризации изображений ППЛ и обнаружено, что наиболее чувствительными являются статистические моменты 3-го и 4-го порядков, характеризующих асимметрию и эксцесс распределений значений азимута изображений ППЛ. Было установлено оптимальный интервал в 24 часа с точностью оценки ДНС в 25 мин для белков и НАДН.

Ключевые слова: лазерная поляриметрия, аутофлуоресценция, давность наступления смерти.

POSTMORTEM INTERVAL ESTIMATION BY THE AZIMUTH OF LASER-INDUCED FLUORESCENCE OF POLYCRYSTALLINE CEREBROSPINAL FLUID FILMS IMAGES

M.S. Garazdiuk, V.T. Bachynskiy, O.I. Garazdiuk, I.L. Bezhenar

Abstract. There are many new optical polarimetric methods of biological tissue structure assessment, which ones are the most perspective in PMI estimation.

The purpose of the work is to develop and to test the method of two-dimensional Stokes-polarimetric mapping of biological layers autofluorescence for PMI estimation by statistical analysis of postmortem changes dynamics of the coordinate distributions values of polycrystalline films of liquor (PFL) images laser-induced fluorescence polarization azimuth (LIFPA).

Materials and methods. Objects of investigation are PFL, taken in 78 corpses with accurately known time of death and 20 healthy volunteers. Coordinate distributions of LIFPA image

values were determined for each sample of PFL in the optical arrangement of the Stokes polarimeter in short-wave spectral bands of optical emission.

Results and conclusions. Two-dimensional Stokes-polarimetric mapping distributions LIFPA of PFL images may be used in PMI estimation. Statistical points of the 3rd and 4th orders are the most sensitive PFL optical values to evaluate postmortem changes by short-range fluorescence. Optimal interval in 24 hours and the accuracy of PMI estimation 25 min for proteins and NADH were found.

Key words: laser polarimetry, autofluorescence, post-mortem interval.

**Higher State Educational Establishment of Ukraine
"Bukovinian State Medical University"**

Clin. and experim. pathol.- 2017.- Vol.16, №1 (59).-P.57-62.

Надійшла до редакції 15.02.2017

Рецензент – проф. І.С.Давиденко

*© М.С. Гараздюк, В.Т. Бачинський, О.І. Гараздюк,
І.Л.Беженар, 2017*