

БАБКИНА

Анастасия Сергеевна

**ДИНАМИКА ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ КОФЕРМЕНТОВ
НАДН, ФАД И ИХ ОТНОШЕНИЯ В СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЕ В РАННЕМ
ПОСМЕРТНОМ ПЕРИОДЕ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ДАВНОСТИ
НАСТУПЛЕНИЯ СМЕРТИ**

14.03.05 – Судебная медицина

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Работа выполнена на кафедре судебной медицины Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
доцент

Сундуков Дмитрий Вадимович

Научный консультант:

доктор медицинских наук,
профессор

Голубев Аркадий Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
судебной медицины имени П.А. Минакова
лечебного факультета ФГАОУ
ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России

Кильдюшов Евгений Михайлович

доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
судебной медицины с курсом судебной
гистологии ФПК и ПП
ФГБОУ ВО «Ижевская государственная
медицинская академия»
Минздрава России

Вавилов Алексей Юрьевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Защита состоится «22» марта 2022 г. в «11» часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.011 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6)

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: <http://dissovet.rudn.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ПДС 0300.011
кандидат биологических наук, доцент

Романова Ольга Леонидовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Проблема определения давности наступления смерти (ДНС) является одной из основных в науке и практике судебной медицины. Г. В. Шор в завершении монографии «О смерти человека (введение в танатологию)» высказал «пожелание, чтобы к разработке танатологической проблемы приступили представители различных научных дисциплин, так как только полигранная разработка этих вопросов сможет внести ясность в учение о смерти» [Шор Г.В., 1925].

Начиная с середины двадцатого века, когда в судебно-медицинской танатологии стали активно использовать биохимические, биофизические, физические методы, по настоящее время отечественными и зарубежными исследователями интенсивно разрабатываются и совершенствуются методы определения ДНС. К сожалению, большинство разработанных методов, позволяющих с высокой точностью определить ДНС, так и не были внедрены в экспертную практику. Зачастую это связано либо со сложностью выполнения, дороговизной или отсутствием серийных приборов [Пашинян Г.А., 1999].

Однако, трудности внедрения в практику полученных результатов и новых методов несколько не обесценивают исследования в данной области, так как изучение темпов посмертных изменений в органах, тканях, клетках позволяет выяснить, уточнить механизмы умирания и дезорганизации биологических структур и их функций, что имеет большое значение в клинической и фундаментальной медицине. В.А. Неговский, основоположник реаниматологии, неоднократно подчёркивал необходимость изучения танатологии: «Чем глубже будет происходить это изучение [смерти], тем больше будет сниматься мистический налёт со слова «смерть», тем более понятными и объяснимыми станут все элементы этого сложного, но неизбежного явления жизни» [Неговский В.А., 1954].

В.Н. Крюков отмечал значимость результатов исследований «ранних посмертных изменений с помощью современных лабораторных методов ... для

трансплантологов, реаниматологов, патофизиологов, биохимиков и представителей других медицинских специальностей» [Крюков В.Н., 1990]. Разработка методов определения ДНС в раннем постмортальном периоде находится в тесной связи с изучением устойчивости тканей к гипоксии и аноксии, а также механизмов и закономерностей тканевого метаболизма в условиях аноксии. Следовательно, посмертные процессы, происходящие в тканях, должны рассматриваться не только в прикладном аспекте, но и в фундаментальном.

Степень разработанности темы

Новым направлением, разрабатываемым в настоящее время кафедрой судебной медицины Российского университета дружбы народов, является изучение закономерностей посмертного метаболизма в переживающих тканях методом лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии [Бабкина А.С., Сундуков Д.В., Голубев А.М., 2019; 2020; 2021]. Применение данного метода для решения судебно-медицинских задач не было ранее описано в зарубежной и отечественной литературе.

Использование показателей интенсивности аутофлуоресценции коферментов никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (НАДН) и флавинадениндинуклеотида окисленного (ФАД) в ультрафиолетовом и синем спектрах соответственно, а также редокс-отношения (РО) в качестве маркеров окислительно-восстановительных процессов, обусловлено множеством исследований в области биологии, клинической и фундаментальной медицины, которые доказали возможность использования показателей аутофлуоресценции внутриклеточных коферментов с целью оценки метаболической и митохондриальной активности [Heikal A.A. et al., 2010; Сясин Н.И. и соавт., 2014; Schaefer P.M., 2019]. Применение метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии позволяет проводить исследование *in situ*, не изымая и не подготавливая ткань.

Цель исследования

Выявить закономерности изменения интенсивности флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и их отношения в скелетной мышце в первые сутки посмертного периода для установления возможности использования этих данных при диагностике давности наступления смерти.

Задачи исследования

1. Изучить характер динамики флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и редокс-отношения в скелетной мышце крысы в раннем посмертном периоде (24 часа).

2. Обосновать взаимосвязь биохимических посмертных процессов, в частности внутриклеточного протеолиза, с флуоресцентными свойствами коферментов.

3. Апробировать метод лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии на трупах скоропостижно умерших с целью определения давности наступления смерти.

4. Провести сравнительную оценку флуоресценции НАДН, ФАД и РО в скелетной мышце в зависимости от давности наступления смерти с целью выявления наиболее практически значимого показателя.

Научная новизна

С целью изучения закономерностей посмертных метаболических процессов и давности наступления смерти применён метод лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии, ранее не используемый в мировой и отечественной судебно-медицинской практике.

Впервые представлена и обоснована динамика коферментов НАДН, ФАД и их отношения в скелетной мышце крысы в первые сутки после смерти.

Впервые рассмотрена возможность использования лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии при диагностике давности наступления смерти.

По результатам апробации метода на трупах скоропостижно умерших был разработан способ определения давности наступления смерти человека (Патент РФ № 2696847. Заявка № 2018146578. Дата регистрации 06.08.2019).

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования обосновывают возможность применения метода лазер-индуцированной спектроскопии *in situ* при диагностике давности наступления смерти, уточняют механизмы процессов, происходящих в мышечной ткани посмертно, а также в условиях аноксии. Проведённое исследование создаёт предпосылки для дальнейшего исследования биофизических посмертных изменений в совокупности со связанными с ними биохимическими процессами с целью диагностики ДНС, а также уточнения механизмов трупных изменений, в частности трупного аутолиза и мышечного окоченения.

Методология и методы исследования

В исследовании применяли общенаучные методы (наблюдение, описание, сравнение, измерение, обобщение, моделирование, эксперимент), специальные методы (метод лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии, метод определения активности протеолитических ферментов), методы логического мышления (анализ, синтез, дедукция, индукция) и статистический анализ.

Реализация результатов исследования

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры судебной медицины Российского университета дружбы народов, используются преподавателями кафедры при подготовке лекций, на занятиях со студентами, ординаторами и аспирантами (Справка о внедрении результатов диссертационного исследования в учебный процесс от 03.09.2021).

Положения, выносимые на защиту

1. Лазер-индуцированная флуоресценция коферментов НАДН и ФАД в скелетной мышце крысы сохраняется в раннем посмертном периоде и изменяется в зависимости от ДНС. Зависимость редокс-отношения

(НАДН/ФАД) и показателей интенсивности флуоресценции НАДН от ДНС неслучайна и может быть охарактеризована уравнением Вейбулла.

2. Изменение флуоресцентных свойств коферментов во многом обусловлено внутриклеточным протеолизом, в частности, изменением активности протеолитических ферментов: катепсина D и кальпаинов. В период увеличения интенсивности флуоресценции НАДН, в течение 3-х часов после смерти, активность протеолитических ферментов, катепсина D и кальпаинов, низкая. Возрастание протеолитической активности катепсина D отмечается через 4,5 ч после смерти, что соответствует начальной точке снижения интенсивности флуоресценции НАДН. Через 24 ч после смерти, что соответствует увеличению интенсивности флуоресценции ФАД, выявляется значимое снижение активности кальпаинов.

3. Коферменты в мышечной ткани трупов людей, умерших скоропостижно, также сохраняют способность к аутофлуоресценции в раннем посмертном периоде. В первые сутки интенсивность флуоресценции НАДН преобладает над ФАД, $PO > 1$, на вторые сутки интенсивность флуоресценции ФАД становится выше НАДН, $PO < 1$.

4. Метод лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии может быть использован при диагностике давности наступления смерти. Редокс-отношение является наиболее практически значимым маркером посмертного метаболизма, что подтверждается наиболее высокой точностью математической модели, полученной из экспериментальных данных, а также сильной корреляционной связью с ДНС, выявленной в результате апробирования метода на трупах людей.

Степень достоверности и апробации диссертационной работы

Результаты исследования доложены и обсуждены на заседаниях кафедры судебной медицины РУДН (Москва, 2019, 2020, 2021); на II научно-практической конференции аспирантов и ординаторов и молодых учёных «Актуальные вопросы анестезиологии-реаниматологии и реабилитологии» (Москва, 2019), на Международном конгрессе «Актуальные вопросы судебной

медицины и экспертной практики» (Москва, 2019), на ежегодной научно-практической конференции по судебной медицине «Декабрьские чтения в РУДН» (Москва, 2018, 2019).

Апробация диссертации состоялась на кафедре судебной медицины Российского университета дружбы народов 30 сентября 2021 года (протокол № 0300-28-04/02).

Достоверность результатов работы подтверждена большим количеством проведённых измерений, использованием сертифицированного оборудования, математическим анализом и статистической обработкой данных, теоретическим обоснованием полученных результатов на основании анализа большого количества литературы по применению метода в других областях медицины.

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 3 статьи входят в международные базы данных научного цитирования, 1 – из списка рекомендованных РУДН/ВАК, 4 работы опубликованы в сборниках конференций, 1 патент РФ №2696847 «Способ определения давности наступления смерти человека» от 06.08.2019.

Объём и структура исследования

Исследование изложено на 100 страницах компьютерного набора, состоит из введения, обзора литературы, главы о материале и методах, главы с представлением результатов собственных исследований, обсуждения, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 156 источников, 37 из которых отечественных авторов, 119 – зарубежных. Диссертация содержит 12 рисунков, 6 таблиц.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальное исследование

Эксперимент проведён на самцах и самках крыс линии Sprague Dawley (n=48) с массой 250 - 300 г в соответствии с принятыми национальными и международным стандартами. Перед проведением исследования животные находились в одинаковых условиях с предоставлением воды и пищи. Эвтаназию

осуществляли цервикальной дислокацией под общей анестезией хлоралгидратом. Хлоралгидрат вводили внутривентриально в дозировке 300 мг/кг. Трупы животных весь период исследования находились в условиях комнатной температуры (20 – 22 °С, относительная влажность воздуха 40-60%). Выбор скелетной мышцы в качестве объекта исследования был обусловлен медленными темпами аутолитических процессов в мышечной ткани, наибольшей устойчивостью по сравнению с другими органами к аноксии. Протокол проведения эксперимента был одобрен Комитетом по Этике Медицинского института РУДН (Протокол №19 от 18 июня 2020 г).

Измерения интенсивности флуоресценции коферментов ФАД и НАДН в скелетной мышце 28 экспериментальных животных (крыс) проводили при жизни под общей анестезией хлоралгидратом, через 5 минут после смерти, каждые 1,5 - 3 ч в течение 24 часов посмертного периода. Исходные прижизненные показатели интенсивности флуоресценции коферментов в скелетной мышце рассматривали в качестве контрольных.

Доступ к мышце бедра крысы обеспечивали через разрез кожи длиной 1 см., устанавливали волоконно-оптический зонд анализатора коферментов на участок поверхности скелетной мышцы. Измерение исследуемых показателей проводили в течение 4 мин у каждого животного.

Забор скелетных мышц крыс (n=20) для исследования активности ферментов, катепсина D и кальпаинов, проводили после измерения флуоресценции во временных точках посмертного периода, соответствующих наиболее значимым изменениям выявленной динамики флуоресценции коферментов: 1) через 5 минут после смерти (n=5), 2) через 3 ч (n=5), 3) 4,5 ч (n=5), 4) 24 ч (n=5).

После тщательного измельчения ножницами бедренную мышцу гомогенизировали в 0,9% растворе NaCl. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 15 минут при 1500 об/мин. Супернатант переносили в чистую пробирку. Для определения протеолитической активности ферментов катепсина D и кальпаинов использовали метод Ансона в

модификации Е. Каверзневой. Протеолитическую активность ферментов выражали в мкмоль тирозина за 1 час на 1 г ткани.

Апробирование метода на трупах людей

Апробирование метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии с целью установления ДНС проводили на практическом судебно-медицинском материале, представленном 15 трупами людей 38 – 77 лет, мужского пола, умерших скоропостижно. В исследование были включены трупы лиц с достоверно известной давностью смерти в период до 48 часов, поступившие в ГБУЗ Бюро судебно-медицинской экспертизы г. Москвы.

Доступ к скелетной мышце бедра трупа обеспечивали через вертикальный разрез кожи, подкожно-жировой клетчатки длиной 5 – 10 см, на передней поверхности бедра, в нижней его трети. С участка, на который устанавливали зонд, удаляли соединительную ткань во избежание вклада коллагена в аутофлуоресценцию. Устанавливали волоконно-оптический зонд анализатора коферментов «Лазма МЦ-3» на участок скелетной мышцы бедра.

Метод лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии

Для оценки интенсивности флуоресценции коферментов НАДН и ФАД использовали лазерный диагностический аппарат «Лазма МЦ-3» (ООО НПП «Лазма», Россия, № РЗН 2015/3142 от 29.10.2015) с зондирующим излучением с длиной волны 365 нм (UV) и 450 нм (В) с программным обеспечением.

Принцип работы комплекса заключается в зондировании с помощью волоконно-оптического зонда исследуемой ткани лазерным излучением, приеме отраженного сигнала, его фотометрировании и первичной аналоговой обработке. На выходе блока диагностики формируются сигналы, пропорциональные амплитудам флуоресценции коферментов в ткани.

Показатели флуоресценции НАДН, ФАД, РО были автоматически рассчитаны программным обеспечением к аппарату «Лазма МЦ-3», зафиксированы и сохранены в персональном компьютере.

Статистическая обработка

С помощью программы Microsoft Excel формировали базы данных экспериментальных исследований и данных апробирования метода на трупах.

Статистический анализ осуществляли с помощью Microsoft Excel и пакета прикладных программ Statistica 13. Для проверки нормальности распределения данных использовали критерий Лиллиефорса. Для описания показателей с нормальным распределением использовали среднее с указанием стандартного отклонения. Для признаков с отличным от нормального распределения указывали медиану с указанием межквартильного размаха – 25-й и 75-й процентиля.

Изменение показателей в различные временные точки проанализировали методом дисперсионного анализа (ANOVA).

Множественные сравнения средних значений интенсивности флуоресценции коферментов проведены с использованием критерия Тамхейна, так как объём выборки (n) и дисперсии в группах отличались. Отличия принимали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Полученные показатели интенсивности флуоресценции коферментов и их отношение анализировали методом нелинейного регрессионного анализа. Математическая модель, описывающая полученные данные, подбиралась путём анализа нескольких близких моделей, на основании критериев точности, статистической значимости и простоты. Вывод, оценку точности и значимость коэффициентов уравнения регрессии проводили с использованием программы SigmaPlot 10.0.

Проверку значимости модели регрессии проводили с использованием F-критерия Фишера. Анализ коэффициентов регрессионной модели проводили с использованием критерия Стьюдента.

Сравнение показателей протеолитической активности ферментов в различные сроки посмертного периода осуществляли непараметрическим методом (U-test Mann-Whitney). Различия принимались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Для изучения взаимосвязи НАДН и ФАД, РО и давности наступления смерти проводили анализ корреляций. Для исследования взаимосвязи нормально распределённых данных использовали параметрический корреляционный анализ Пирсона. Для данных с распределением отличным от нормального применяли непараметрический метод Спирмена. При $p < 0,05$ нулевую гипотезу отклоняли и принимали альтернативную гипотезу о том, что значение r не равно нулю.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Показатели интенсивности флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и их отношения РО в скелетной мышце крысы в зависимости от времени после смерти

Возрастание средних значений показателей флуоресценции НАДН было отмечено с 5-ой минуты посмертного периода. Пик флуоресценции отмечался в 3 часа. Снижение интенсивности флуоресценции было отмечено с 4,5 ч. Через 6 ч после смерти показатели интенсивности флуоресценции НАДН были достоверно ниже, чем через 3 ч.

С 9 ч посмертного периода и до окончания исследования значения интенсивности флуоресценции НАДН находились почти на одном уровне, но были достоверно ниже, чем в 3 часа.

Средние значения интенсивности флуоресценции ФАД до 10,5 ч менялись незначительно. В 6 ч отмечено минимальное среднее значение интенсивности флуоресценции ФАД. Статистически значимое увеличение показателей интенсивности флуоресценции ФАД выявлено через 10,5 ч, 15 ч, 16,5 ч, 21 ч, 24 ч после смерти в сравнении с 6 ч посмертного периода (рисунок 1).

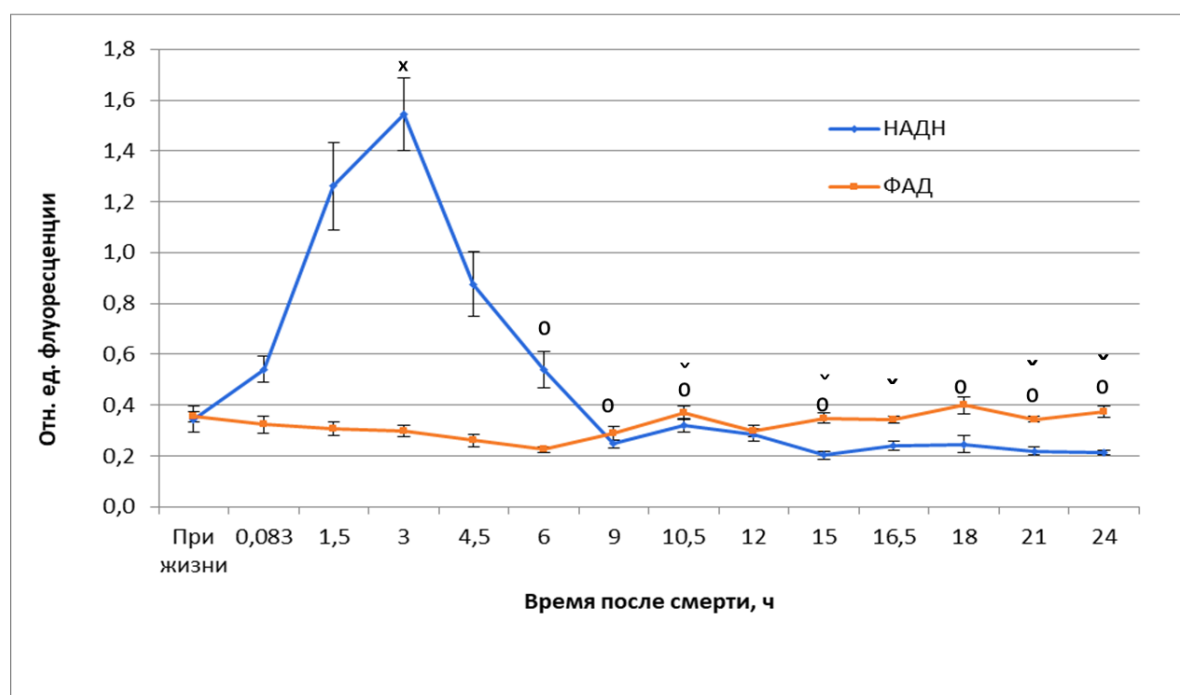


Рисунок 1 - Зависимость интенсивности флуоресценции коферментов НАДН и ФАД от времени после смерти

Примечание: значения показателей представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего

^x - $p < 0,05$ при сравнении с показателями НАДН через 5 мин посмертного периода;

⁰ - $p < 0,05$ при сравнении с показателями НАДН в 3 ч посмертного периода;

[^] - $p < 0,05$ при сравнении с показателями ФАД в 6 ч посмертного периода

Возрастание отношения коэффициентов флуоресценции НАДН к ФАД (редокс- отношение, РО) было зарегистрировано с 5-ой минуты до 3 ч посмертного периода включительно. С 1,5 ч до 4,5 показатели были значимо выше прижизненных. Начиная с 4,5 до 24 ч наблюдалось постепенное снижение РО. С 9 ч посмертного периода и до конца исследования показатели были достоверно ниже, чем через 1,5 ч, 3 ч, 4,5 ч. В 24 ч отмечалось достоверное снижение РО в сравнении с 12 ч (рисунок 2).

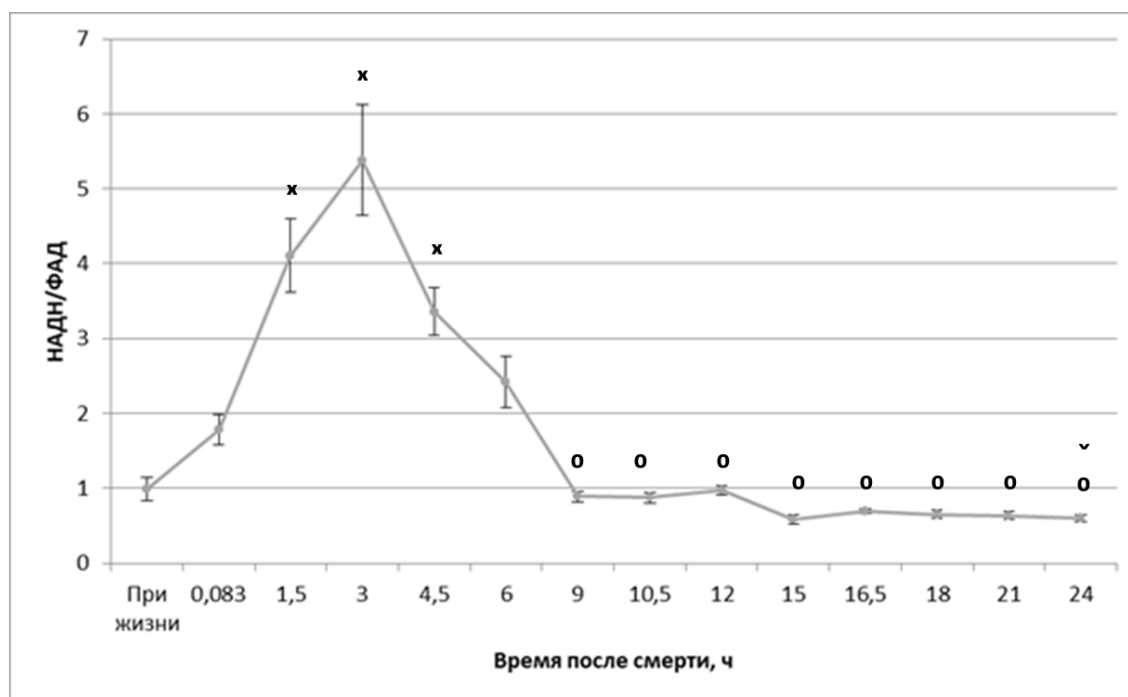


Рисунок 2 - Зависимость РО от времени после смерти.

Примечание: значения показателей представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего

x - $p < 0,05$ при сравнении с прижизненными показателями РО;

0 - $p < 0,05$ при сравнении с показателями РО через 1,5; 3; 4,5 ч после смерти;

^ - $p < 0,05$ при сравнении с показателями РО через 12 ч после смерти.

Математическое моделирование динамики интенсивности флуоресценции коферментов в первые сутки после смерти

Анализ изменения средних значений показателя флуоресценции НАДН в зависимости от времени после смерти позволил предположить, что обнаруженная зависимость описывается уравнением Вейбулла (уравнение 1) или логнормальным уравнением (уравнение 2). В результате анализа для построения зависимости было выбрано уравнение 1, так как оно давало большую точность приближения ($R^2=0,77$, $F(4,109)=87,4$, $p < 0,001$) по сравнению с уравнением 2 ($R^2=0,70$, $F(2,109)=123,3$, $p < 0,001$).

$$y = y_0 + a \times \frac{(c-1)^{\frac{(1-c)}{c}}}{c} \times \left| \frac{x-x_0}{b} + \frac{(c-1)^{\frac{1}{c}}}{c} \right|^{(c-1)} \times e^{-\left| \frac{x-x_0}{b} + \frac{(c-1)^{\frac{1}{c}}}{c} + \frac{(c-1)}{c} \right|}, \quad (\text{уравнение 1})$$

где

y – величина показателя НАДН;

x – время после смерти, ч;

a, b, c, y_0 и x_0 – коэффициенты уравнения регрессии.

$$y = y_0 + \frac{a}{x} \times e^{-0,5 \times \left(\frac{\ln(x/x_0)}{b}\right)^2}, \quad (\text{уравнение 2})$$

где

y – величина показателя НАДН;

x – время после смерти, ч;

a, b, y_0 и x_0 – коэффициенты уравнения регрессии.

По результатам анализа была построена модель, описывающая зависимость флюоресценции НАДН от времени после смерти на основании уравнения 1 (рисунок 3)

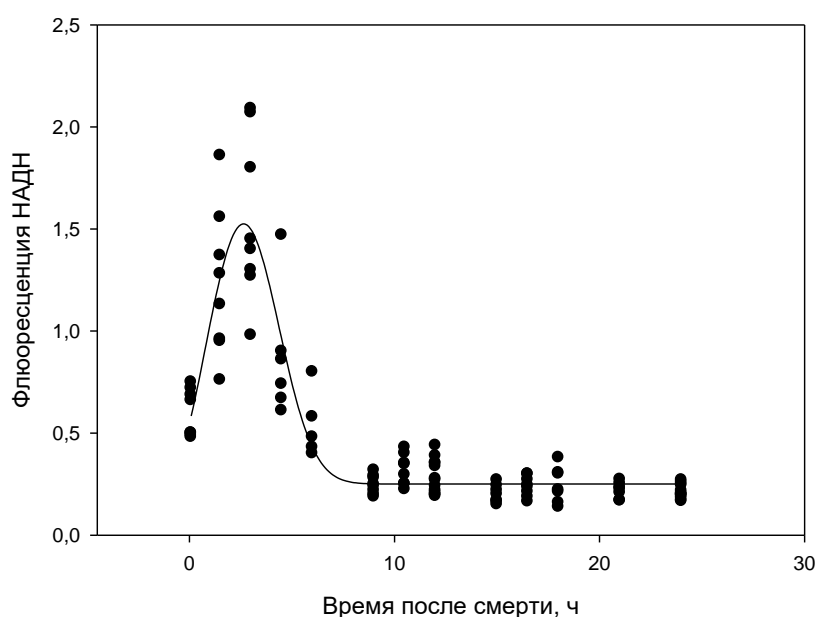


Рисунок 3 - Математическая модель динамики интенсивности флюоресценции НАДН в первые сутки после смерти

Коэффициент детерминации (R^2) полученной регрессионной модели составил 0,85, стандартная ошибка модели – 0,17, то есть полученное уравнение описывало анализируемую зависимость достаточно точно. Оценка статистической значимости полученного уравнения на основании критерия

Фишера, при эмпирическом значении критерия Фишера $F=146,3$ и числа степеней свободы 4 и 105 составила $p<0,001$.

Таким образом, полученное уравнение было статистически значимым, то есть характеризовало зависимость в генеральной совокупности.

Значения интенсивности флуоресценции ФАД мало изменялись в течение всего времени исследования, поэтому подобрать модель не представлялось возможным.

Анализ изменения средних значений показателя РО в зависимости от времени после смерти более точно описывается уравнением 1, где где y – величина показателя РО; x – время после смерти, ч; a, b, c, y_0 и x_0 – коэффициенты уравнения регрессии, так как оно давало большую точность приближения ($R^2=0,79, F(4,109) =97,0, p<0,001$) по сравнению с уравнением 2 ($R^2=0,65, F(2,109)=101,3, p<0,001$).

На основании уравнения 1 была построена модель, описывающая зависимость изменения значений показателя РО от времени после смерти, представленная графически на рисунке 4.

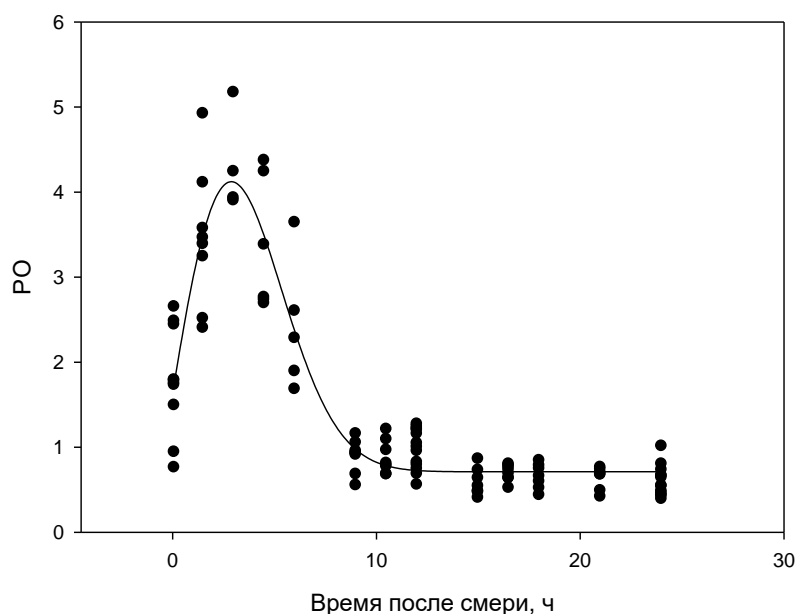


Рисунок 4 - Математическая модель динамики РО в первые сутки после смерти

Коэффициент детерминации (R^2) полученной регрессионной модели составил 0,86, стандартная ошибка модели – 0,43, то есть полученное уравнение зависимости РО от времени после смерти является достаточно точным.

Оценка статистической значимости полученного уравнения на основании критерия Фишера, при эмпирическом значении критерия Фишера $F=173,5$ и числах степеней свободы 4 и 103 составила $p<0,001$. Таким образом, полученное уравнение было статистически значимым, то есть характеризовало зависимость в генеральной совокупности.

Возможность математического описания наблюдаемых изменений и достаточная точность полученных моделей, подтвердившие неслучайность зависимости показателей от ДНС, позволили расценивать исследуемые показатели в качестве маркеров изменения тканевого метаболизма в различные сроки после смерти.

**Активность протеолитических ферментов во временных точках
посмертного периода, соответствующих наиболее значимым изменениям
выявленной динамики флуоресценции коферментов**

Перед забором скелетной мышцы на биохимическое исследование было проведено исследование интенсивности флуоресценции коферментов у каждой крысы через 5 минут после смерти, 3 ч, 4,5 ч и 24 ч. Динамика интенсивности флуоресценции коферментов НАДН, ФАД, полученная в данном исследовании, имела тот же характер, что и описанная в предыдущих исследованиях. Отметим возрастание флуоресценции НАДН через 3 ч после смерти, а с 4,5 ч - снижение флуоресценции данного кофермента. Повышение интенсивности флуоресценции ФАД зарегистрировали через 24 ч после смерти.

Результаты исследования протеолитической активности ферментов – катепсина D и кальпаинов – во временных точках посмертного периода, соответствующих наиболее значимым изменениям динамики флуоресценции коферментов НАДН и ФАД, представлены на графике (рисунок 5).

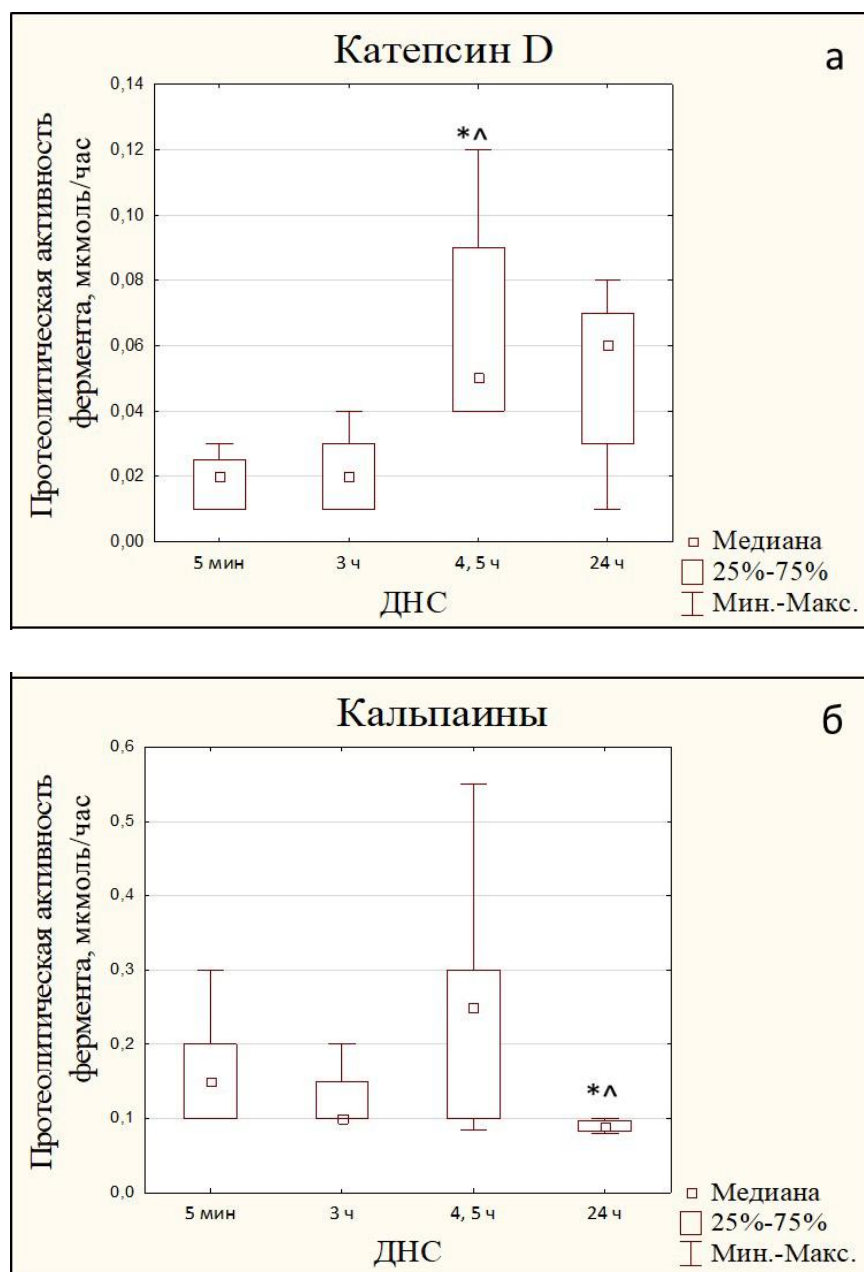


Рисунок 5 - Активность протеолитических ферментов в скелетной мышце крысы в раннем посмертном периоде: а – активность катепсина D; б – активность кальпайнов.

Примечание: данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me[25%;75%]).

* - $p < 0,05$ при сравнении с показателями через 3 ч после смерти

^ - $p < 0,05$ при сравнении с показателями через 5 минут после смерти

В течение первых 3-х часов посмертного периода, которые соответствуют увеличению интенсивности флуоресценции НАДН, протеолитическая активность катепсина D и кальпайнов низкая.

Через 4,5 ч увеличивается протеолитическая активность катепсина D ($p < 0,05$), а также возрастает медианное значение активности кальпайнов ($p > 0,05$,

статистически не значимо). Увеличение протеолитической активности катепсина D через 4,5 ч после смерти статистически значимо в сравнении с 3 ч ($p=0,01$) и 5-ой минуты ($p=0,02$) посмертного периода.

Через 24 ч после смерти медианное значение активность катепсина D увеличивается, а активность кальпаинов статистически значимо снижается по сравнению с 3 ч ($p=0,04$) и 5 мин ($p=0,03$).

Связь флуоресцентных свойств ткани с молекулярными механизмами умирания клеток доказывает перспективность и обоснованность применения метода лазер-индуцированной спектроскопии для оценки посмертных изменений при решении вопроса о давности наступления смерти.

Результаты апробирования метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии на практическом экспертном материале

В результате апробирования метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии на трупах людей было выявлено, что коферменты НАДН и ФАД сохраняют способность к аутофлуоресценции в мышечной ткани всех исследованных трупов. В результате анализа связи НАДН с ДНС была выявлена умеренная корреляция ($r = -0,59$, $p=0,02$) (рисунок 6).

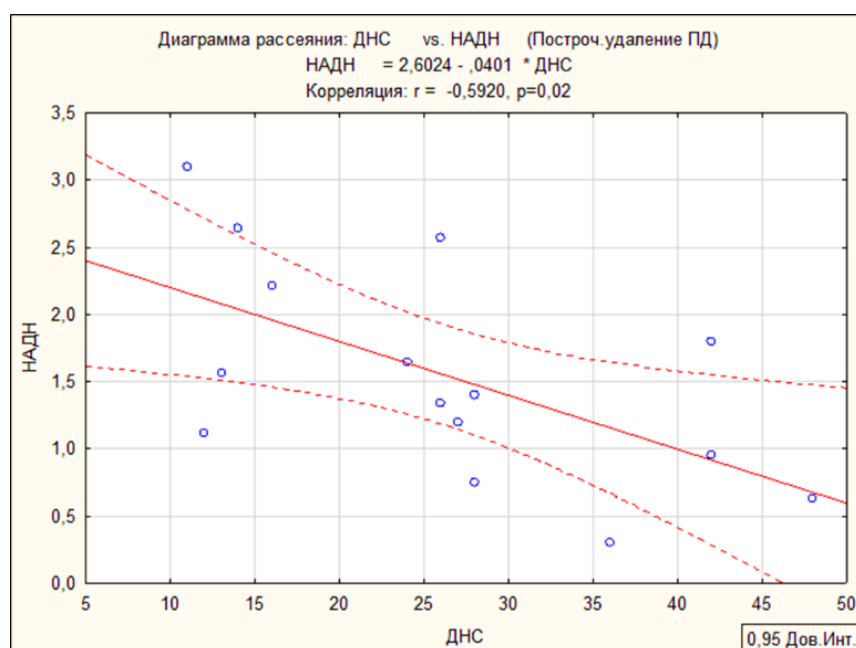


Рисунок 6 - График рассеяния при анализе корреляционной связи НАДН с ДНС

В результате анализа связи РО с ДНС была выявлена сильная корреляция (Спирмена R = -0,93, p=0,000001) (рисунок 7).

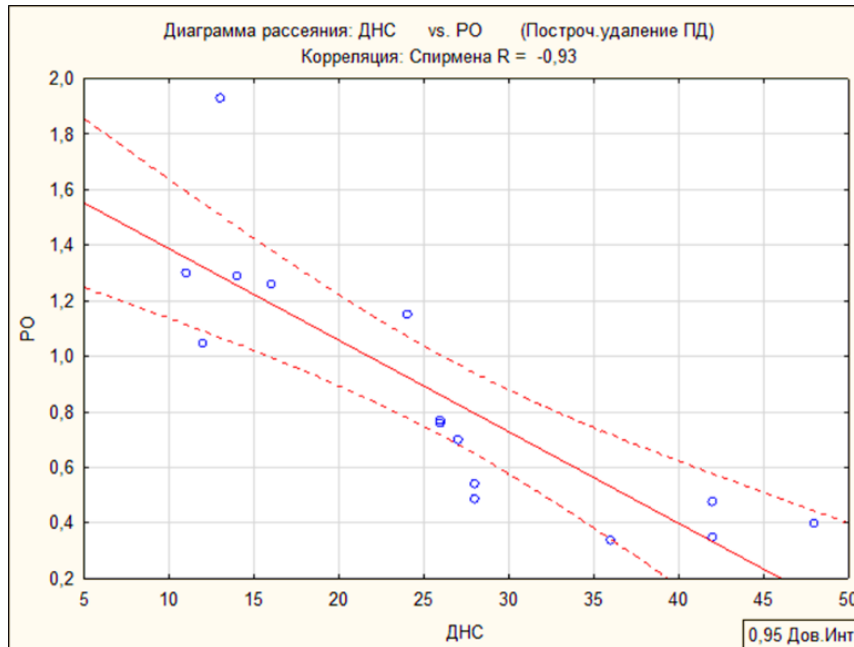


Рисунок 7 - График рассеяния при анализе корреляционной связи РО с ДНС

Так как при корреляционном анализе связи ФАД с ДНС получили $p=0,5$, нулевую гипотезу не отклонили.

При анализе соотношения НАДН и ФАД в различные сроки посмертного периода было установлено, что первые сутки в каждом конкретном случае отмечается преобладание НАДН над ФАД, $PO > 1$, на вторые сутки ФАД становится выше НАДН, $PO < 1$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии является перспективным методом для изучения посмертных внутриклеточных процессов при диагностике давности наступления смерти. Результаты применения метода в экспериментальном исследовании позволили считать флуоресцентные свойства коферментов НАДН, ФАД и их отношение потенциальными маркерами для установления ДНС. Апробирование метода на трупах людей выявило корреляционную связь между ДНС и РО, а также НАДН, которая характеризовалась как отрицательная сильная и отрицательная умеренная соответственно. Установлено, что наиболее информативным показателем является РО. Обзор литературы по принципам метода и применению метода в медицине, а именно при диагностике тканевой ишемии, не выявил противоречий в полученных нами данных. Динамика объяснима процессами анаэробного гликолиза и внутриклеточного протеолиза.

Проведённое исследование создаёт предпосылки для дальнейшего исследования биофизических посмертных изменений в совокупности со связанными с ними биохимическими процессами с целью диагностики ДНС, а также уточнения механизмов трупных изменений, в частности трупного аутолиза и мышечного окоченения. Так как нельзя исключить возможность влияния температуры окружающей среды, вида смерти и темпа умирания, целесообразно дальнейшее исследование с учётом перечисленных факторов.

Выводы

1. Экспериментальное исследование показало, что интенсивность флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и их отношение (РО) в скелетной мышце лабораторных животных в раннем посмертном периоде меняется в зависимости от ДНС. В условиях комнатной температуры (20 – 22 °С, относительная влажность воздуха 40-60%) в течение 3 ч посмертного периода наблюдается возрастание интенсивности флуоресценции НАДН, затем – постепенное снижение до конца исследования. Преобладание флуоресценции НАДН над ФАД до 9 ч посмертного периода, увеличение флуоресценции ФАД

к концу первых суток отражает РО, которое до 9 ч посмертного периода больше единицы, а с 9 ч до конца исследования меньше единицы. Динамика интенсивности флуоресценции кофермента НАДН и РО в скелетной мышце крысы может быть охарактеризована уравнением Вейбулла. Статистическая значимость и достаточная точность математических моделей подтверждает неслучайность выявленных изменений.

2. Посмертная динамика интенсивности флуоресценции коферментов во многом обусловлена внутриклеточным протеолизом. Значимое увеличение протеолитической активности катепсина D отмечается через 4,5 ч после смерти, что соответствует начальной точке снижения интенсивности флуоресценции НАДН. Через 24 ч после смерти происходит значимое снижение активности кальпаинов, что соответствует увеличению интенсивности флуоресценции ФАД.

3. Исследование интенсивности флуоресценции коферментов в скелетной мышце трупов лиц, умерших скоропостижно, выявило преобладание флуоресценции НАДН над ФАД, $РО > 1$ в первые сутки посмертного периода, на вторые сутки ФАД становится выше НАДН, $РО < 1$. С ДНС умеренно коррелирует интенсивность флуоресценции НАДН ($r = -0,59$, $p = 0,02$), сильно коррелирует РО (Спирмена $R = -0,93$, $p = 0,000001$).

4. Выявленные в эксперименте закономерности изменения интенсивности флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и их отношения (РО) в зависимости от сроков посмертного периода, а также результаты практически ориентирующего исследования доказывают возможность применения метода лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии при диагностике ДНС. Несложность и малая трудоёмкость являются преимуществом данного метода, позволяющим рекомендовать его для внедрения в судебно-медицинскую экспертную практику, при условии дальнейшей разработки критериев ДНС на основании выявленных закономерностей с учётом наличия многочисленных факторов, влияющих на темпы посмертных изменений. РО является наиболее практически значимым показателем при диагностике ДНС человека.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Бабкина, А.С.** Определение интенсивности флуоресценции коферментов НАДН и ФАД в скелетной мышце крысы в зависимости от давности наступления смерти/ А.С. Бабкина, Д.В. Сундуков, А.М. Голубев, И.А. Рыжков, З.И. Цоколаева, Ю.В. Заржецкий// Судебно-медицинская экспертиза. - 2020. - Т. 63. - №1. - С. 31–35. DOI: 10.17116/sudmed20206301131
2. **Бабкина, А.С.** Лазер-индуцированная флуоресцентная спектроскопия в диагностике тканевой гипоксии (обзор)/ А.С. Бабкина// Общая реаниматология. - 2019. - Т. 15. - № 6. - С. 50-61. DOI: 10.15360/1813-9779-2019-6-50-61
3. **Бабкина, А.С.** Закономерности изменения показателей флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и их отношения в скелетной мышце в раннем посмертном периоде (экспериментальное исследование)/ А.С. Бабкина, Д.В. Сундуков, А.М. Голубев// Судебная медицина. – 2020. –Т.6. -№3. – С. 12–19. DOI: 10.19048/fm318
4. **Бабкина, А.С.** Судебно-медицинское значение взаимосвязи активности протеолитических ферментов и динамики интенсивности флуоресценции коферментов NADH и FAD в скелетной мышце при диагностике давности наступления смерти (экспериментальное исследование)/ А.С. Бабкина, Д.В. Сундуков, А.М. Голубев// Судебно-медицинская экспертиза. – 2021. – Т. 64. - №3. – С. 24-28. DOI: 10.17116/sudmed20216403124
5. Способ определения давности наступления смерти человека: патент RU 2696847 С1. Российская Федерация, МПК А61В 5/04 (2006.01), G01N 33/483 (2006.01) 06.08.2019/ **Бабкина А.С.**, Голубев А.М., Сундуков Д.В., Рыжков И.А., Папышев И.П., Цоколаева З.И., Кузовлев А.Н. Заявка № 2018146578 от 26.12.2018
6. **Бабкина, А.С.** Динамика интенсивности флуоресценции коферментов НАДН и ФАД мышечной ткани в условиях аноксии (экспериментальное

- исследование)/ А.С. Бабкина// Актуальные вопросы анестезиологии-реаниматологии и реабилитологии. Сборник трудов II научно-практической конференции (с международным участием) аспирантов, ординаторов и молодых учёных. – М., 2019.
7. **Babkina, A.** Fluorescence intensity dynamics of coenzymes NADH and FAD in skeletal muscle under anoxia (experimental study)/ A. Babkina, A. Golubev, D. Sundukov// XVIII Congress of the European Shock Society and IX Congress of the International Federation of Shock Societies. Aegean Conferences. - 2019. - С. 168
 8. **Бабкина, А.С.** Изменения интенсивности флуоресценции коферментов скелетной мышцы в различные сроки посмертного периода (экспериментальное исследование)/ А.С. Бабкина, Д.В. Сундуков, А.М. Голубев// Судебная медицина. - 2019. - Т. 5. - № S1. - С. 84-85.
 9. **Бабкина, А.С.** Активность протеолитических ферментов – потенциальный фактор, влияющий на характер динамики флуоресценции коферментов НАДН и ФАД в скелетной мышце в условиях аноксии (экспериментальное исследование)/ А.С. Бабкина, А.М. Голубев, Д.В. Сундуков// Материалы XXII Всероссийской Конференции с международным участием «Жизнеобеспечение при критических состояниях». – М., 2020.

Бабкина Анастасия Сергеевна (Российская Федерация)

Динамика интенсивности флуоресценции коферментов НАДН, ФАД и их отношения в скелетной мышце в раннем посмертном периоде при диагностике давности наступления смерти.

Выявлены изменения интенсивности флуоресценции коферментов никотинамидадениндинуклетида (НАДН), флавинадениндинуклетида (ФАД) и их отношения (РО) в скелетной мышце крыс в первые сутки после смерти методом лазер-индуцированной флуоресцентной спектроскопии. Установлена зависимость выявленных изменений от давности наступления смерти (ДНС). Выявлена взаимосвязь активности протеолитических ферментов (катепсина D и кальпаинов) с флуоресцентными свойствами коферментов в скелетной мышце крысы. Изучена интенсивность флуоресценции коферментов в скелетных мышцах трупов лиц, умерших скоропостижно. Выявлена сильная корреляционная связь между РО и ДНС. Установлено, что РО является наиболее практически значимым показателем при диагностике ДНС. Результаты исследования доказывают перспективность и обоснованность применения метода лазер-индуцированной спектроскопии для оценки посмертных изменений при решении вопроса о давности наступления смерти.

Babkina Anastasiya (Russian Federation)

Dynamics of the fluorescence intensity of the coenzymes NADH, FAD and their ratio in skeletal muscle in the early postmortem period in determining the time of death.

Changes in the fluorescence intensity of coenzymes NADH, FAD and their redox ratio (RR) in the skeletal muscle of rats during the first 24 hours after death were revealed by laser-induced fluorescence spectroscopy. The dependence of the revealed changes on the time since death has been established. The relationship between the activity of proteolytic enzymes (cathepsin D and calpains) and the changes in fluorescence intensity of NADH, FAD coenzymes in the rat skeletal muscles in relation to the time of death was found. The intensity of fluorescence of coenzymes in skeletal muscles of persons who died suddenly was investigated. It was determined that RR is the most practically significant indicator for determining the time after death. The results of the study prove the viability and feasibility of laser-induced spectroscopy for post-mortem changes assessment when determining the time of death.