

## **Streszczenie rozprawy doktorskiej: „Ocena czasu zgonu w oparciu o pośmiertne zmiany parametrów bioimpedancji w modelu zwierzęcym”.**

Ustalenie czasu zgonu jest jednym z podstawowych zadań medyka sądowego, gdyż informacja o czasie śmierci ma często kluczowe znaczenie dowodowe w prowadzonym przez organy ścigania śledztwie. Pomimo stałego rozwoju sądowo-lekarskiej metodologii oznaczania czasu zgonu dotychczas nie udało się opracować metody optymalnej, tj.: jak najdokładniejszej, miarodajnej i możliwej do przeprowadzenia w jak najdłuższym - minimum kilkudniowym - okresie po śmierci denata, łatwej w wykonaniu dla każdego lekarza i w miarę możliwości nieinwazyjnej dla zwłok, możliwej do przeprowadzenia w miejscu znalezienia zwłok, wykonanej z użyciem podręcznej aparatury dającej obiektywne - możliwe do późniejszego ewentualnego ponownego zweryfikowania - dane, oraz której interpretacja powinna być możliwa do przeprowadzenia w jak najkrótszym czasie (najlepiej również na miejscu naleźenia zwłok). Celem niniejszej pracy było sprawdzenie możliwości wprowadzenia w medycynie sądowej nowatorskiej metody określania czasu zgonu możliwie najbliższej nakreślonego wzorcowi metody optymalnej, opartemu o pośmiertne pomiary parametrów bioimpedancji. Przegląd literatury wykazał, iż dotychczas wykonane badania w tej dziedzinie wykazały potencjalną możliwość wykorzystania pomiarów parametrów bioimpedancji do oceny czasu zgonu, nie zawierały jednak dokładniejszych wniosków w tym zakresie. Badania te były bowiem przeprowadzane na małych, nieistotnych statystycznie grupach osobników, a częściowo jedynie na fragmentach ciała czy poszczególnych narządach. Nie uwzględniały one wpływu płci ani masy ciała na wyniki pomiaru, a część z nich nie badała wszystkich 3 parametrów bioimpedancji. Żadne z dotychczas wykonanych badań nie obejmowało również oceny zmian parametrów bioimpedancji we wczesnym okresie pośmiertnym (tj. bezpośrednio po zgonie oraz w ciągu pierwszej godziny po śmierci) oraz w odniesieniu do wyników pomiaru badanego osobnika wykonanego przyżyciowo.

Badanie dla potrzeb niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzono na 70 szczurach rasy Wistar, podzielonych na siedem grup badawczych po 10 osobników każda, przy temperaturze otoczenia wahającej się w stałym zakresie 20 - 24°C. Grupy były jednorodne pod względem płci i wieku zwierząt, cztery żeńskie i trzy męskie. Po wprowadzeniu szczurów w stan anestezji zostały one zważone i zmierzone, po czym założono im podskórnie 4 elektrody igłowe i ułożono na dielektrycznym podłożu. W tym stanie dokonywano przyżyciowego pomiaru analizy bioimpedancji (BIA), do mierzenia której użyto analizatora składu ciała

Body Explorer firmy Juwell Medicall. Mierzono 3 parametry bioimpedancji, tj. rezystancję (opór rzeczywisty), reaktancję (opór pojemnościowy) i kąt fazowy. Po przeprowadzeniu przyżyciowego pomiaru bioimpedancji zwierzęta zabijano, podając dootrzewnowo pentobarbital sodu w dawce 100 mg/kg m.c. Bezpośrednio po stwierdzeniu śmierci szczura, czego dokonywano na podstawie ustania pracy serca oraz braku odruchu rogówkowego, przystępowano do dalszych pomiarów bioimpedancji prowadzonych w każdej grupie w równych odstępach (interwałach) czasowych, które wydłużały się wraz z czasem jaki upłynął od momentu zgonu. Okres przeprowadzania pomiarów był różny dla poszczególnych grup i wynosił od 146,5 godziny po zgonie do 180 godzin po śmierci.

Przeprowadzonymi badaniami stwierdzono wzrost wszystkich parametrów w pierwszych godzinach po zgonie, rozpoczynający się bezpośrednio po śmierci (przy czym najsilniejszy wzrost następuje w ciągu pierwszej godziny po zgonie), a następnie występuje ich zbliżony do liniowego spadek, dążący - w przypadku reaktancji oraz kąta fazowego - w ciągu około 5 dni do wartości 0. Czas osiągnięcia maksimum wzrostu i dynamika zmian różnią się w zależności od badanego parametru. Rezystancja (opór rzeczywisty) wykazuje tendencję wzrostową średnio do 12,6 godziny po zgonie, przy czym w pierwszych 7 godzinach wykazuje stałą tendencję wzrostową, a w następnych godzinach, pomimo utrzymującej się tendencji wzrostowej do 12,6 godziny, wykazuje nieregularne wahania. Po osiągnięciu maksimum swojej wartości opór zaczyna maleć, wraz z upływem czasu w sposób coraz bardziej zbliżony do liniowego, przyjmując średnią wartość spadku (wyliczoną na podstawie równań regresji) 1,363  $\Omega$  na godzinę. Wartość oporu nie spada do 0. Reaktancja (opór pojemnościowy) wykazuje tendencję wzrostową średnio do około 8 godzin po zgonie (przy czym stałą tendencję wzrostową wykazuje w ciągu pierwszych pięciu godzin). Następnie reaktancja maleje w sposób zbliżony do liniowego, przyjmując średnią wartość spadku 0,532  $\Omega$  na godzinę, osiągając wartość 0 (u 51 szczurów) lub bliską 0 (u pozostałych 19 szczurów) średnio w 128 godzinie po zgonie, z czego wartość 0 została osiągnięta najszybciej już w 78 godzinie, a najpóźniej w 180 godzinie po śmierci. Kąt fazowy wykazuje tendencję wzrostową do 6,15 godziny po zgonie (wykazując stałą tendencję wzrostową w ciągu pierwszych 5 godzin po śmierci) a następnie maleje ze średnią wartość spadku 0,076  $\Omega$  na godzinę. Wartości zerowe kąt fazowy uzyskuje jednocześnie z reaktancją, średnio w 128 godzinie po śmierci. Kąt fazowy charakteryzuje się najmniejszym rozrzutem wyników (odchyleniem standardowym) ze wszystkich zmierzonych parametrów, zaś rezystancja największym.

Badanie wykazało różną przydatność poszczególnych parametrów bioimpedancji do szacowania czasu zgonu. Na podstawie wzorów opracowanych w modelu regresji liniowej stwierdzono, że jedynym parametrem bioimpedancji mogącym teoretycznie służyć do określania czasu zgonu jest kąt fazowy. W jego przypadku dla 13,6% wyników błąd obliczenia wynosił więcej niż 24 godziny, a w 40,8% przypadków błąd wyliczenia wynosi więcej niż 12 godzin. Rezystencja i reaktancja - ze względu występujący w ponad 50% przypadków błąd wyliczenia wynoszący więcej niż 12 godzin - nie są w tym modelu dobrymi parametrami do oznaczania czasu zgonu. Badanie wykazało również, że niezależnie od wzorów wyprowadzonych w modelu regresji liniowej, do oceny czasu zgonu można wykorzystać również surowe (tzn. niepoddane żadnym przekształceniom) wyniki pomiarów parametrów bioimpedancji. Ich wykorzystanie nie może stanowić podstawy oznaczenia konkretnej wartości (godziny zgonu), pozwala jednak na oszacowanie pewnych przedziałów czasowych. Wykonany kilkakrotnie (5 lub więcej razy) w czasie około 1,5 godziny pośmiertny pomiar parametrów bioimpedancji pozwala na ocenę kierunku i dynamiki zmian wszystkich trzech parametrów, tj. ocenę, czy ich wartości wzrastają czy też maleją oraz w jakim tempie. Znaczną przydatność w tym zakresie wykazują wszystkie trzy parametry bioimpedancji. Ocena czy wartość danego parametru rośnie w sposób niezaburzony, wzrasta ale w sposób zaburzony, czy też maleje, a także porównanie kierunku zmian poszczególnych parametrów, pozwala na określenie konkretnego godzinowego przedziału czasu, jaki upłynął od momentu zgonu. Kolejny przedział wyznacza osiągnięcie wartości 0 (lub bliskiej 0) przez kąt fazowy i reaktancję - co następuje po około 5 dniach po zgonie. Płeć i masa ciała badanych osobników mają znaczenie głównie przy zastosowaniu wzorów wyliczonych w modelu regresji liniowej, nie ma zaś konieczności ich uwzględniania przy ocenie przedziałów czasowych na podstawie surowych wyników pomiarów. Znaczenie dla wyników pomiarów może mieć bardzo dużego stopnia zasiedlenie zwłok przez larwy muchówek z ich przeniknięciem do narządów wewnętrznych - w takim przypadku może dojść do zaburzenia liniowości spadku mierzonych parametrów. Określenie wpływu temperatury otoczenia na dynamikę zmian parametrów bioimpedancji nie było celem niniejszej pracy i powinno być przedmiotem dalszych badań, prowadzonych - co ważne - na grupie osobników istotnej statystycznie.

Wyniki pracy doktorskiej potwierdzają możliwość wykorzystania analizy pośmiertnych zmian parametrów bioimpedancji jako potencjalnej metody określania czasu zgonu, jednakże - ze względu na m.in. stosunkowo małą dokładność - metoda ta nie będzie zbliżoną do optymalnej. Brak jest zatem podstaw do przyjęcia, że metoda ta może w przyszłości

zastąpić inne, dotychczas tradycyjnie stosowane metody oznaczania czasu śmierci. Określanie czasu zgonu na podstawie pośmiertnych zmian parametrów bioimpedancji może mieć praktyczne znaczenie przede wszystkim jako potencjalna przyszła metoda wspomagająca oznaczanie czasu zgonu, tj. zastosowana nie samodzielnie, ale równocześnie z powszechnie stosowanymi metodami opartymi o makroskopową ocenę ewolucji zmian pośmiertnych oraz pomiar temperatury zwłok. Ponieważ każda metoda oceny czasu zgonu posiada pewien (zazwyczaj dość znaczny) margines błędu, jednoczesne zastosowanie kilku różnorodnych metod oceny czasu, jaki upłynął od śmierci, (łącznie z metodą opartą o pomiar parametrów bioimpedancji) pozwoli na zmniejszenie potencjalnego zakresu błędu, a tym samym na zwiększenie dokładności przeprowadzonych wyliczeń. Potencjalnemu praktycznemu zastosowaniu badanej metody sprzyjają ponadto łatwość jej zastosowania oraz obiektywność uzyskanych za pomocą pomiarów wyników. Wskazane jest zatem prowadzenie dalszych badań w tej dziedzinie, obejmujących m.in. przeniesienie wyników niniejszej pracy doktorskiej - wykonanej na modelu zwierzęcym - na model ludzki.

### **Summary of the PhD thesis: “Estimation of the time of death based on postmortem changes in bioimpedance parameters in an animal model”.**

Estimation of the time of death is one of the basic tasks of a forensic medic, as information about the time of death is often of key evidentiary importance in an investigation conducted by law enforcement agencies. Despite the constant development of forensic medical methodology for determining the time of death, it has not been possible to develop an optimal method so far, i.e. the most accurate, reliable and possible to be carried out in the longest - at least several days - period after the death of the deceased, easy to perform for every doctor and if possible non-invasive for a corpse, possible to be carried out at the place of finding the corpse, made with the use of handheld apparatus that gives objective - possible to be re-verified later - data, and the interpretation of which should be possible in the shortest possible time (preferably also at the place where the corpse was found). The aim of this study was to check the possibility of introducing in forensic medicine an innovative method of determining the time of death as close as possible to the outlined model of the optimal method, based on postmortem measurements of bioimpedance parameters. The literature review showed that the studies carried out so far in this field have shown the potential possibility of using bioimpedance parameter measurements to assess the time of death, but did not contain more

precise conclusions in this regard. These studies were carried out on small, statistically insignificant groups of individuals, and partially only on parts of the body or individual organs. They did not take into account the influence of sex or body weight on the measurement results, and some of them did not investigate all 3 bioimpedance parameters. None of the studies conducted so far have included the assessment of changes in bioimpedance parameters in the early post-mortem period (i.e. immediately after death and in the first hour after death), and in relation to the measurement taken during the lifetime.

The study for the purposes of this doctoral dissertation was carried out on 70 Wistar rats, divided into seven research groups of 10 animals each, with the ambient temperature varying in the constant range of 20 - 24 ° C. The groups were homogeneous in terms of sex and age of the animals, four female and three male. After inducing the anesthesia, the rats were weighed and measured, and 4 needle electrodes were placed subcutaneously and placed on a dielectric support. In this state, the in vivo bioimpedance (BIA) measurement was performed using the Juwell Medical Body Explorer Body Composition Analyzer. Three bioimpedance parameters were measured, i.e. resistance (real resistance), reactance (capacitive resistance) and phase angle. After the in vivo bioimpedance measurement was performed, the animals were sacrificed by administering intraperitoneal sodium pentobarbital at a dose of 100 mg / kg body weight. Immediately after determining the death of the rat, which was performed on the basis of the cessation of heart rate and the lack of corneal reflex, further bioimpedance measurements were made in each group at equal time intervals, which increased with the time elapsed from the moment of death. The duration of the measurements varied between groups and ranged from 146.5 hours after death to 180 hours after death.

The conducted research revealed that that all parameters increase in the first hours after death, starting immediately after death (with the strongest increase in the first hour after death), and then there is a decrease close to a linear one, tending - in the case of reactance and angle phase - within about 5 days to the value of 0. The time of reaching the maxima of growth and the dynamics of changes differ depending on the examined parameter. Resistance (real resistance) tends to increase on average to 12.6 hours after death, while in the first 7 hours it shows a constant upward trend, and in the following hours, despite the continuing upward trend to 12.6 hours, it shows irregular fluctuations. After reaching its maximum value, the resistance begins to decrease with time, more and more linearly, assuming the average value of the decrease (calculated on the basis of regression equations) of 1.363  $\Omega$  per hour. The resistance value does not go down to 0. The reactance (capacitive resistance) tends to increase to an average of about 8 hours after death, (showing a steadily increasing trend

during the first 5 hours. After that the reactance decreases in almost linear fashion, assuming an average value of  $0.532 \Omega$  per hour, reaching a value of 0 (in 51 rats) or close to 0 (in the remaining 19 rats) on average at 128 hours after death, of which the value of 0 was reached the fastest. at 78 hours, and at the latest 180 hours after death. Phase angle tends to increase on average up to about 6,15 hours after death (showing a steadily increasing trend during the first 5 hours) and after that decreases with an average drop value of  $0.076 \Omega$  per hour. Zero values of the phase angle are obtained simultaneously with the reactance, on average in 128 hours after death. The phase angle is characterized by the smallest scatter of results (standard deviation) of all measured parameters, and the resistance by the greatest.

The study showed different usefulness of individual bioimpedance parameters for estimating the time of death. Based on the formulas developed in the linear regression model, it was found that the only bioimpedance parameter that could theoretically be used to determine the time of death is the phase angle. In its case, for 13.6% of the results, the calculation error was more than 24 hours, and in 40.8% of the cases, the calculation error was more than 12 hours. Resistance and reactance - due to the calculation error of more than 12 hours occurring in over 50% of cases - are not good parameters for determining the time of death in this model. The study also showed that, regardless of the formulas derived from the linear regression model, raw (i.e. untransformed) results of bioimpedance parameter measurements can also be used to estimate the time of death. Their use cannot constitute the basis for determining a specific value (hour of death), but allows for the estimation of certain time intervals. The postmortem measurement of bioimpedance parameters performed several times (5 or more times) within about 1.5 hours allows for the assessment of the direction and dynamics of changes in all three parameters, i.e. assessment of whether their values increase or decrease and at what pace. All three bioimpedance parameters are useful in this respect. Assessment of whether the value of a given parameter increases undisturbed, increases but in a disturbed manner, or decreases, as well as the comparison of the direction of changes of individual parameters, allows for the determination of a specific hourly interval that has elapsed since death. Another interval determines the achievement of the value of 0 (or close to 0) by the phase angle and reactance - which occurs about 5 days after death. Gender and body weight of the studied individuals are important mainly when using formulas calculated in the linear regression model, and there is no need to take them into account when assessing time intervals on the basis of raw measurement results. The results of measurements may be influenced by a very high degree of colonization of the corpse by the fly larvae with their penetration into the internal organs - in this case the linearity of the decrease of the measured

parameters may be disturbed. Determining the influence of ambient temperature on the dynamics of changes in bioimpedance parameters was not the aim of this study and should be the subject of further research on - what is important - a statistically significant group of individuals.

The results of the doctoral dissertation confirm the possibility of using the analysis of post-mortem changes in bioimpedance parameters as a potential method of determining the time of death, however - due to, inter alia, relatively low accuracy - this method will not be close to optimal. Therefore, there are no grounds to assume that this method may in the future replace other, so far traditionally used methods of determining the time of death. Determining the time of death on the basis of post-mortem changes in bioimpedance parameters may be of practical importance mainly as a potential future method supporting the determination of the time of death, i.e. applied not alone, but simultaneously with commonly used methods based on the macroscopic assessment of the evolution of post-mortem changes and the measurement of the temperature of the corpse.

Since each method of estimating the time of death has a certain (usually quite significant) margin of error, the simultaneous use of several different methods of assessing the time elapsed after death (including the method based on the measurement of bioimpedance parameters) will reduce the potential error range, and thus will increase the accuracy of the calculations performed. The potential practical application of the tested method is also favored by the ease of its application and the objectivity of the results obtained by measuring. It is therefore advisable to conduct further research in this area, including, inter alia, transfer of the results of this doctoral dissertation - made on the animal model - to the human model.