

*На правах рукописи*

**ВЕЛЕНКО**

**Павел Сергеевич**

**СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ДИАГНОСТИКА ВОЗРАСТНЫХ  
ИЗМЕНЕНИЙ ДЕНТИНА С ПОМОЩЬЮ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ**

14.03.05 – Судебная медицина

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва – 2020**

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

**Научный руководитель:**

член-корреспондент РАН,

доктор медицинских наук, профессор

**Пиголкин Юрий Иванович**

**Официальные оппоненты:**

**Божченко Александр Петрович** – доктор медицинских наук, профессор, ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кафедра судебной медицины, профессор кафедры

**Федулова Мария Вадимовна** – доктор медицинских наук, ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Минздрава России, отдел лабораторных, морфологических и специальных исследований, заведующая отделом

**Ведущая организация:** ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России

Защита состоится: «18» сентября 2020 года в 13 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.04 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119021, г. Москва, Zubovskiy bulvar, d.37/1 и на сайте организации [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор медицинских наук

**Конева Елизавета Сергеевна**

## ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Актуальность и степень разработанности темы исследования.** За последние десятилетия проблема определения биологического возраста человека стала одной из наиболее актуальных задач при идентификации личности [Пиголкин Ю.И. и соавт., 2018; Vernoff M., 2017]. В случаях чрезвычайных происшествий, когда жертвы исчисляются десятками или сотнями трупов и сопровождаются значительным разбросом и повреждением не только мягких покровов, но и костных тканей, практически невозможно произвести непосредственное сопоставление фрагментов тела по области их анатомического расположения или по плоскости разделения [Золотенкова Г.В., Федулова М.В., 2002]. Поэтому в ситуациях подобного рода первоочередное значение приобретает оценка общегрупповых признаков [Wolf M., 2017]. К их числу относятся пол и возраст, масса тела, раса и этническая группа и др.

Зачастую эксперт исследует скелетированные трупы, костные фрагменты, а также тела, которые подверглись тем или иным посмертным изменениям: гниение, повреждение насекомыми и грызунами, воздействие природных факторов [Пиголкин Ю.И. и соавт., 2014; Gelderman H., 2019].

К настоящему времени возрастной морфологией, лежащей в основе судебно-медицинского установления общегрупповых признаков, в частности, возраста, достигнуты значительные результаты [Пиголкин и соавт., 2018; Priyadarshini S., 2015]. Однако на текущий момент не существует единого метода определения возраста, который отвечал бы всем требованиям, предъявляемым к технике определения возраста: 1) точность, достаточная для применения метода в целях идентификации личности; 2) универсальность и применимость к большинству судебно-медицинских случаев определения возраста; 3) простота и воспроизводимость во всех судебно-медицинских учреждениях; 4) как можно меньшие затраты времени и ресурсов для проведения методики [Yekkala R., 2004].

### **Цель исследования.**

Оптимизация подхода к судебно-медицинской диагностике биологического возраста человека на основе данных возрастной динамики аминокислотного состава дентина.

### **Задачи исследования.**

1. На основе анализа архивных данных ГБУЗ города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» дать судебно-медицинскую характеристику неопознанных трупов, поступающих в танатологические отделения.
2. Разработать биохимическую методику диагностики аминокислотного состава дентина с помощью хромато-масс-спектрометрического исследования зубов.
3. Изучить возрастные особенности аминокислотного состава в тканях зуба.
4. Разработать судебно-медицинские критерии определения биологического возраста человека по изменению аминокислотного состава зубов.
5. Разработать математическую модель судебно-медицинской диагностики биологического возраста на основе хроматографических данных о динамике аминокислотного состава твердых тканей зуба.

**Научная новизна исследования.** Разработана судебно-медицинская цифровая методика определения биологического возраста человека по данным хромато-масс-спектрометрического исследования аспарагиновой кислоты в дентине зубов.

Описанная в работе методика определения возраста неизвестного человека с помощью хроматографического изучения возрастных изменений аминокислотного состава дентина не имеет аналогов среди отечественных работ. В ходе работы получены данные о возрастной динамике производных аминокислот в тканях зуба, которые до этого не были описаны в мировой литературе.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Разработанная судебно-медицинская цифровая методика определения возраста по степени рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине имеет ряд преимуществ по

сравнению с существующими на текущий момент способами установления биологического возраста.

Для воспроизведения методики достаточно небольшого количества дентина зуба идентифицируемого человека, в связи с этим метод определения возраста пригоден в подавляющем большинстве случаев судебно-медицинской идентификации личности неопознанных трупов, при этом оставшуюся зубную ткань можно хранить и использовать в случае назначения повторных судебно-медицинских экспертиз.

**Личный вклад автора.** Весь представленный в диссертации материал обработан и проанализирован лично автором. Диссертант самостоятельно исследовал возрастные морфологические особенности дентина, принимал непосредственное участие в разработке методик пробоподготовки образцов дентина и хромато-масс-спектрометрического исследования.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Неопознанные тела, поступившие в ГБУЗ города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» характеризуются рядом закономерностей в своем распределении по полу и возрасту и причинам смерти.

2. Разработанная биохимическая методика исследования твердых тканей зуба с помощью масс-селективной газовой хроматографии позволяет установить количество аминокислот в дентине и их возрастную динамику.

3. Аминокислотный состав дентина имеет ряд хроматографических параметров, имеющих сильную корреляционную связь с биологическим возрастом человека.

4. На основе степени рацемизации и количественного состава форм аспарагиновой кислоты в дентине разработаны судебно-медицинские критерии, позволяющие установить биологический возраст человека с точностью  $\pm 2,4$  года, что дает возможность использовать их в целях идентификации личности.

5. Разработанная математическая модель судебно-медицинской диагностики биологического возраста на основе базы данных хроматографических исследований твердых тканей зуба обеспечивает

повышение точности результатов при определении биологического возраста человека.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность результатов работы подтверждается достаточным объемом исследованного материала, использованием адекватных методов исследования, применением современных методик математико-статистической обработки данных.

Результаты исследования были доложены на научно-практических конференциях ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (25 мая 2017г., 27-28 марта 2018г., Москва); VI международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (10-12 апреля 2019г., Казань).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 14.03.05 –судебная медицина (медицинские науки) по пункту 7 –разработка методов идентификации личности.

**Публикации результатов работы.** По теме диссертации было опубликовано 4 научные работы, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и входящих в международную базу цитирования Scopus.

**Внедрение результатов исследования.** Материалы диссертации включены в учебный процесс кафедры судебной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 113 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав собственных исследований, обсуждения результатов исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы включает 122 источника (из них отечественных – 56, зарубежных – 66). Представлено 9 таблиц, 42 рисунка.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материал и методы исследования.** Статистически была обработана информация из 2278 судебно-медицинских экспертиз неопознанных трупов, поступивших в танатологические отделения ГБУЗ города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» в период с 2012 по 2016 год и оставшихся неопознанными на текущий момент. Для каждого года дана характеристика распределения трупов по полу и возрасту. Проанализированы данные о местах обнаружения трупов, дана характеристика категории и вида смерти по годам. Для характеристики применяемых методик при идентификации личности проанализировано дополнительно 1489 экспертиз, выполненных за тот же период в медико-криминалистическом отделении вышеуказанного Бюро, изучены примененные методы исследования, цели их применения и результаты.

Для хроматографии объектом исследования послужили коренные зубы, удаленные у 145 неопознанных трупов (106 мужчин и 39 женщин) в рамках стандартного медико-криминалистического исследования возраста (Табл. 1). При этом были выбраны трупы, которые впоследствии были опознаны, и их возраст находился в диапазоне от 16 до 76 лет. Исследование проводилось на твердых тканях 1-х премоляров, при этом зубы с сильными кариозными изменениями в исследование не включались.

Таблица 1 – Распределение материала исследования по изучаемым возрастным интервалам

Возрастной интервал	Количество зубов, шт
16-20	12
21-25	16
26-30	11
31-35	12
36-40	11
41-45	12
46-50	13
51-55	12

56-60	11
61-65	11
66-70	11
71-76	13
Всего	145

До начала подготовки образцов зубной ткани донорский материал хранился в условиях пониженной температуры (3°C) во избежание дополнительной термоиндуцированной рацемизации аминокислот.

Подготовка проб для хроматографического исследования включала в себя очистку зубов, получение фрагментов твердой ткани, их взвешивание, гидролиз и дериватизацию аминокислот. После механической очистки зубов от крови, слюны и мягких тканей, они были погружены на 1 час в водный раствор гипохлорита натрия (NaOCl) с содержанием активного хлора 12% для уничтожения бактерий и примесей, способных повлиять на результат хроматографии. Отмытые дистиллированной водой и просушенные до постоянного веса зубы были измельчены с помощью ступки и пестика, а затем разделены на необходимое количество образцов.

Гидролиз измельченных тканей зуба проводился 6М метанольным раствором HCl в течение 12 часов при комнатной температуре (21°C). Получение полного деривата аспарагиновой кислоты после гидролиза осуществлялся одним из трех дериватирующих агентов: трифтороуксусный ангидрид, 3,5-бис(трифлуорометил) бензоил хлорид и пентафлуоробензоил хлорид.

Хроматографическое исследование проводилось на газовом хроматографе «Agilent 6850» с использованием хиральной колонки с фазой 20% циклодекстрина в метилполисилоксане (35% фенил) «Agilent CP-Chirasil-20 beta 19091 GB233» (30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм) и масс-селективным детектором 5973N.



Характеристики оборудования и общие параметры хроматографирования:

- тип детектора: квадрупольный;
- температура квадруполя: 150°C;
- температура ионного источника: 230°C;
- режим работы детектора устанавливался по стандартной программе «AUTOTUNE»;
- градиентное хроматографирование: согласно заданным условиям;
- температура инжектора: 230°C;
- режим ввода пробы: «splitless»;
- газ-носитель: гелий;
- температура интерфейса: 210°C;
- задержка для растворителя перед сканированием: 3 минуты;
- интервал сканируемых масс в скрининге: 29-550 m/z.

Условия хроматографирования частичных дериватов диметилловых эфиров энантиомеров аспарагиновой кислоты:

- объем вводимой пробы: 1 мкл;
- скорость потока: 1,6 мл/мин;
- начальная температура колонки: 130°C;
- выдержка: 1 минута, скорость подъема 0,5 °C в минуту до 135 °C;
- интервал сканируемых масс: 35-200 m/z;
- предел открытия 77 нг во вводимой пробе для диметилового эфира D - аспарагиновой кислоты, 67 нг – для диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты.

Условия хроматографирования полных дериватов эфиров энантиомеров аспарагиновой кислоты:

- ввод пробы: импульсный, без деления потока;
- импульсное давление: 60.00 psi;
- время импульса: 0.50 мин;

- поток продувки: 50.0 мл/мин;
- время продувки: 1.00 мин;
- общий поток: 53.4 мл/мин;
- объем вводимой пробы: 5 мкл;
- скорость потока: 0,5 мл/мин;
- начальная температура колонки: 50°C;
- выдержка: 2 минуты, скорость подъема 20<sup>0</sup>С в минуту до 220<sup>0</sup>С;
- интервал сканируемых масс 29-550 m/z;
- время удерживания в SIM-режиме для деривата D-формы – 10,479 минут, для деривата L-формы – 10,838 минут.

Помимо донорского материала были приготовлены контрольные метанольные растворы D-аспарагиновой кислоты, L-аспарагиновой кислоты и их смеси в соотношении 1:1 (L-аспарагиновая кислота –Sigma-Aldrich A8949-100GLot № BCBL8875V, D-аспарагиновая кислота -Sigma-Aldrich 219096-25GLot № MKBS0053V).

Детектирование в SCAN режиме производилось путем сравнения масс-спектра исследуемого пика с заранее полученным масс-спектром контрольных растворов энантиомеров аспарагиновой кислоты, либо с данными из библиотеки масс-спектров NIST 14.

**Результаты исследования и их обсуждение.** По архивным данным экспертиз танатологических отделений всего изучено 504 случаев за 2012 год, 505 за 2013, 492 за 2014, 389 за 2015 и 371 за 2016 год.

При анализе результатов погодного распределения неопознанных трупов по полу и возрасту 18 экспертиз было исключено из исследования, поскольку пол человека в них установлен не был. В 4 экспертизах из данных 18 также не был установлен возраст.

Общая доля погибших мужчин среди трупов, чья личность осталась неустановленной, составляет 82,2%, а женщин - 17,8%. При оценке средней

арифметической выявлено 82,4% мужчин и 17,6% женщин ( $\sigma = 1,34\%$ ) в год среди неопознанных лиц.

При анализе возрастного распределения неопознанных тел обнаружено, что в 47% случаев (1097 экспертиз) возраст человека был отнесен к молодому возрасту в соответствии с классификацией, принятой ВОЗ, то есть, находился в диапазоне до 45 лет. 888 (38%) лиц были отнесены к диапазону 45-60 лет (средний возраст), 14% - 60-75 лет (пожилой возраст) и 1% - старческий возраст и долгожители (более 75 лет).

Большинство трупов с неустановленной личностью было обнаружено непосредственно на улице (824 случая; 36,2%), а также в общественных местах (119 случаев; 5,2%).

Значительную долю в местах обнаружения неопознанных трупов занимают лечебные учреждения (23,6%; 538 случаев), из них 5 трупов поступило непосредственно из приемного отделения стационаров.

Среди выявленных причин смерти насильственная смерть была установлена в 55,2% случаев, ненасильственная – в 43% случаев. В 1,8% случаев причина смерти не была установлена.

Среди причин насильственной смерти преобладают отравления (629 случаев, 50,4% от общего количества случаев насильственной смерти), в том числе отравление этанолом – 292 случая (46,4% всех отравлений неопознанных лиц); механическая травма и ее осложнения, в том числе травматический шок, кровопотеря и др. (362 случая, 29,0%) и действие физических факторов, включающих в себя смерть от действия низкой и высокой температур, а также поражения электричеством (171 случаев, 13,7%). Оставшиеся 86 случаев приходятся на смерть в результате механической асфиксии, их доля в структуре насильственной смерти относительно невелика и составляет 6,9%. Удельная доля причин насильственной смерти представлена на рисунке 1.

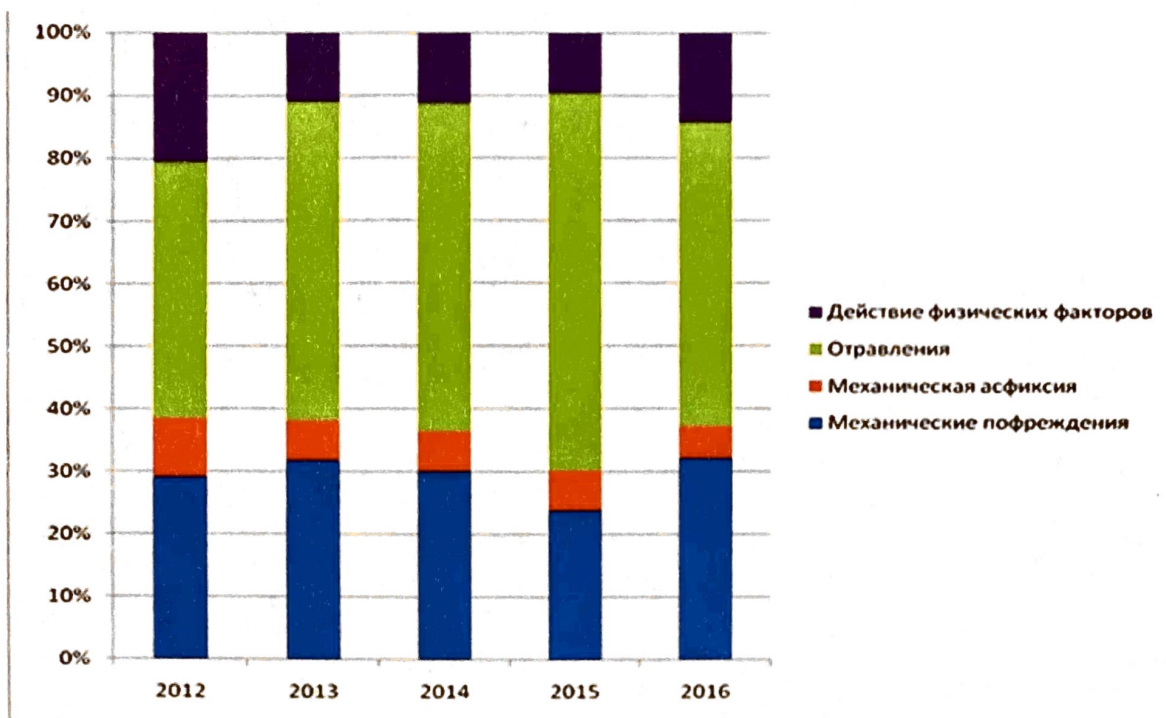


Рисунок 1 – Удельная доля причин насильственной смерти неопознанных лиц в период с 2012 по 2016 гг.

Подавляющее количество случаев ненасильственной смерти составила смерть от заболеваний сердечно-сосудистой системы, включающая в себя различные формы ишемической болезни сердца (536 случаев, 75,1%) (Рис. 2).

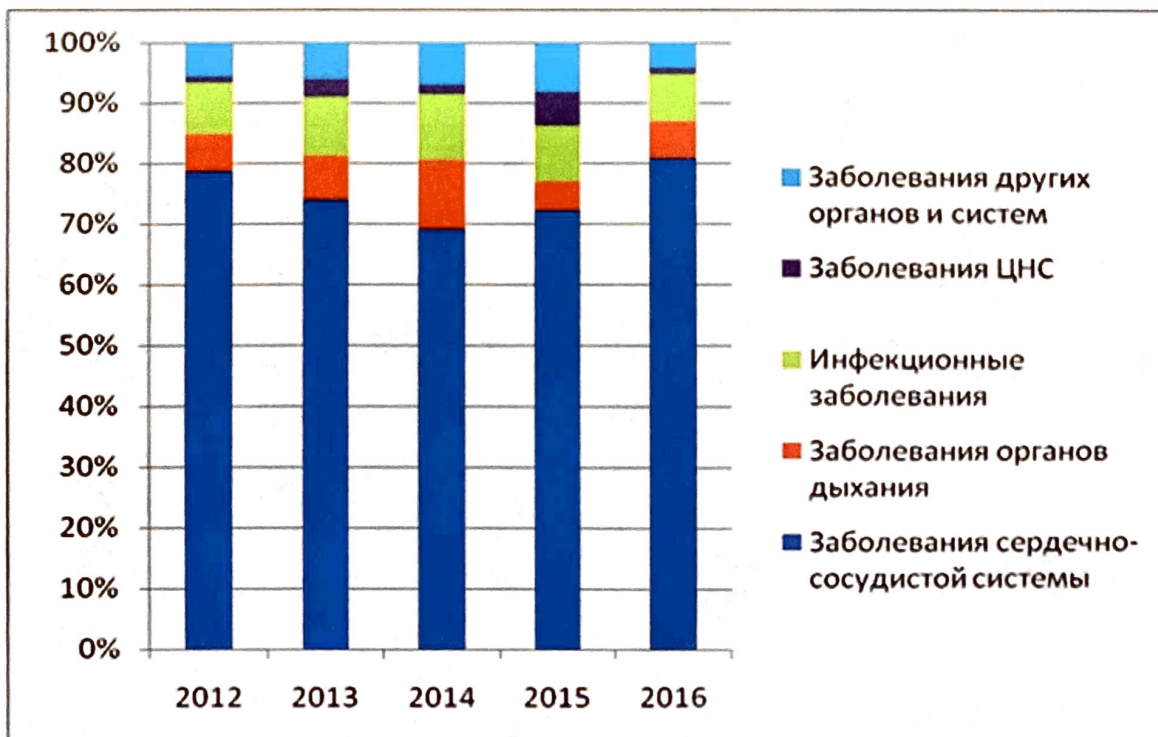


Рисунок 2 – Удельная доля причин ненасильственной смерти неопознанных лиц в период с 2012 по 2016 гг.

В медико-криминалистическом отделении были проанализированы данные 1489 экспертиз. 44,4% экспертиз имели целью непосредственное отождествление личности тем или иным методом. В 54,7% случаев задача эксперта состояла в определении общих признаков личности в связи со значительными посмертными изменениями трупов. За изучаемые 5 лет среди объектов, представленных на экспертизу, встречаются скелетированные останки, а также обугленные, гнилостно измененные и фрагментированные трупы. Практически во всех случаях установление общих признаков личности проводилось по костям трупа. В большинстве случаев (84%) изучали череп и таз, а также длинные трубчатые кости (плечевые и бедренные), а также зубы. При установлении половой принадлежности частей трупа мужской пол был установлен в 75,4% случаев, женский – в 24,6% случаев ( $\sigma = 3,6\%$ ). В 32% экспертиз был установлен молодой возраст трупа, примерно в 24% - средний возраст. Пожилой возраст был установлен в 16% случаев. Среди подготовительных методов преобладает препаровка (27,4% от общего числа подготовительных манипуляций), высушивание (20,3%) и анатомическая реконструкция (21,3%) образцов, среди методов наблюдения выделяются визуальный осмотр и изучение документов (26,2% исследований), измерение антропометрических и остеометрических показателей (9,4%) и стереомикроскопия (11,6%). В 30,5% случаев было применено сопоставление и анатомо-морфологический метод.

Исследование аминокислотного состава дентина было проведено в два этапа. На первом этапе было необходимо вычислить вес образцов, достаточный для достоверного результата на хроматограмме. Для этого из тканей двух зубов доноров возрасте 23 лет изготовили по 5 проб весом 5, 10, 50, 100 и 200 мг. На втором этапе исследования с учетом полученных результатов из зубов от доноров 20, 35 и 50 лет было изготовлено по 6 проб, которые были разделены по 2 образца для каждого дериватизирующего агента. Также было изготовлено 3 пробы, состоящие из смеси чистых D- и L-аспарагиновых кислот (Sigma-Aldrich) в качестве стандарта. С использованием стандартов в SCAN режиме

были изучены масс-спектры полных дериватов D- и L-аминокислот и получены интенсивности сигналов ионов в зависимости от отношения массы к заряду ( $m/z$ ). В связи с относительно низким содержанием изучаемых веществ в зубной ткани для идентификации был сформирован SIM режим и проведен поиск дериватов в анализируемых образцах зубной ткани по основным характеристическим ионам.

Обнаружение форм аспарагиновой кислоты по вышеописанной методике было достигнуто во всех пробах, однако пробы, отобранные в количестве 5 мг, оказались недостаточно информативны при хроматографическом исследовании. С другой стороны, пробы по 10, 50, 100 и 200 мг динамически различались между собой в наглядности и информативности на хроматограммах. Также в ходе первой части исследования была обнаружена прямая зависимость между количеством дентина в пробе и информативности хроматографического ответа. Учитывая первые полученные результаты, после разработки методики в дальнейшем исследовании использовались пробы, содержащие чистый дентин в количестве 10 мг.

Кроме хроматографической характеристики (времени удерживания) по стандартному веществу проводилась оценка спектральной характеристики исследуемого вещества, при этом полученные результаты сравнивали с контрольными растворами D- и L-аминокислот и их смеси, либо с библиотекой масс-спектров, в том числе, NIST MS 2014.

После подробного анализа спектра изучаемых веществ и определения их характеристических ионов в SCAN-режиме, были подобраны условия для SIM-режима с целью максимально эффективной и точной оценки количества производных в рацемате. В SIM-режиме спектр диметилового эфира аспарагиновой кислоты определяли, используя данные молекулярных масс наиболее характерных ионов:  $m/z$  161 (159),  $m/z$  102 (осн) и  $m/z$  88. В данном случае ион с отношением массы к заряду, равным 102, имел наибольшую интенсивность, что позволило успешно использовать его для количественного определения диметиловых эфиров D- и L- энантиомеров аспарагиновой аминокислоты.

С помощью данных масс-спектров производных аспарагиновой кислоты, образующихся в ходе дериватизации, были вычислены характеристические ионы ее дериватов:  $m/z$  159,102 (осн), 88 для диметилового эфира аспарагиновой кислоты;  $m/z$  173,155 (осн), 117 для диизобутилового эфира аспарагиновой кислоты;  $m/z$  189, 130 (осн), 116, 98 для диметилового эфира N-диметиласпарагиновой кислоты;  $m/z$  189, 130, 116 (осн), 98 для диметилового эфира N-метиласпарагиновой кислоты. Указанные массы облегчают обнаружение пиков искомым веществ на хроматограмме и существенно повышают точность исследования при изучении тканей зуба.

В процессе дальнейшей оптимизации методики были изучены различные варианты пробоподготовки. Было отмечено, что изменение концентрации соляной кислоты как в сторону концентрирования, так и в сторону разбавления в процессе гидролиза, приводит к резкому снижению извлечения (проценту выхода) аминокислот из дентина зуба. В то же время, использование 6M раствора соляной кислоты в метаноле позволило снизить температурный режим гидролиза, так как длительное температурное воздействие в агрессивной среде не только индуцирует процесс рацемизации аминокислот, но и снижает хроматографическую «чистоту» исследуемого образца, что может оказать существенное влияние на точность установления биологического возраста. Оптимальные результаты гидролиза были достигнуты при температуре 37°C в течение 6 часов и без температурного воздействия (при комнатной температуре 21°C) при 12 часовом воздействии. Для экспресс-исследования в случае массового поступления образцов допустимо брать навеску дентина не менее 20 мг и проводить гидролиз при температуре 50°C в течение 2 часов. Для растворения стандартов D- и L- форм аспарагиновой кислоты использовался метанольный раствор соляной кислоты (HCl) в соотношении 9 частей спирта 1 часть концентрированной HCl. В вышеуказанных условиях протекает процесс частичной дериватизации по карбоксильным группам аспарагиновой кислоты, что облегчает ее хромато-масс-спектрометрическое исследование. Установлено, что стандарты аминокислот труднее растворимы при повышении атомности спирта (от метилового до бутилового), и для их полного растворения требуется

нагревание, что является нежелательным и должно быть минимальным по времени.

В процессе масс-спектрометрического исследования были получены данные о большинстве дериватов аспарагиновой кислоты, при этом некоторые масс-спектры изучаемых веществ отсутствуют в общедоступных масс-спектрометрических библиотеках. В частности, данные хромато-масс-спектрометрии диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты оказалось невозможным подтвердить с помощью пользовательской библиотеки, поэтому в ходе работы были вручную рассчитаны закономерности распада диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты на характеристические ионы (Рис.3). Основываясь на теоретических расчетах и данных, получаемых при хромато-масс-спектрометрическом исследовании диизопропиловых эфиров, для SIM режима были выбраны следующие характеристические ионы:  $m/z$  158,  $m/z$  130 и  $m/z$  88 (осн).



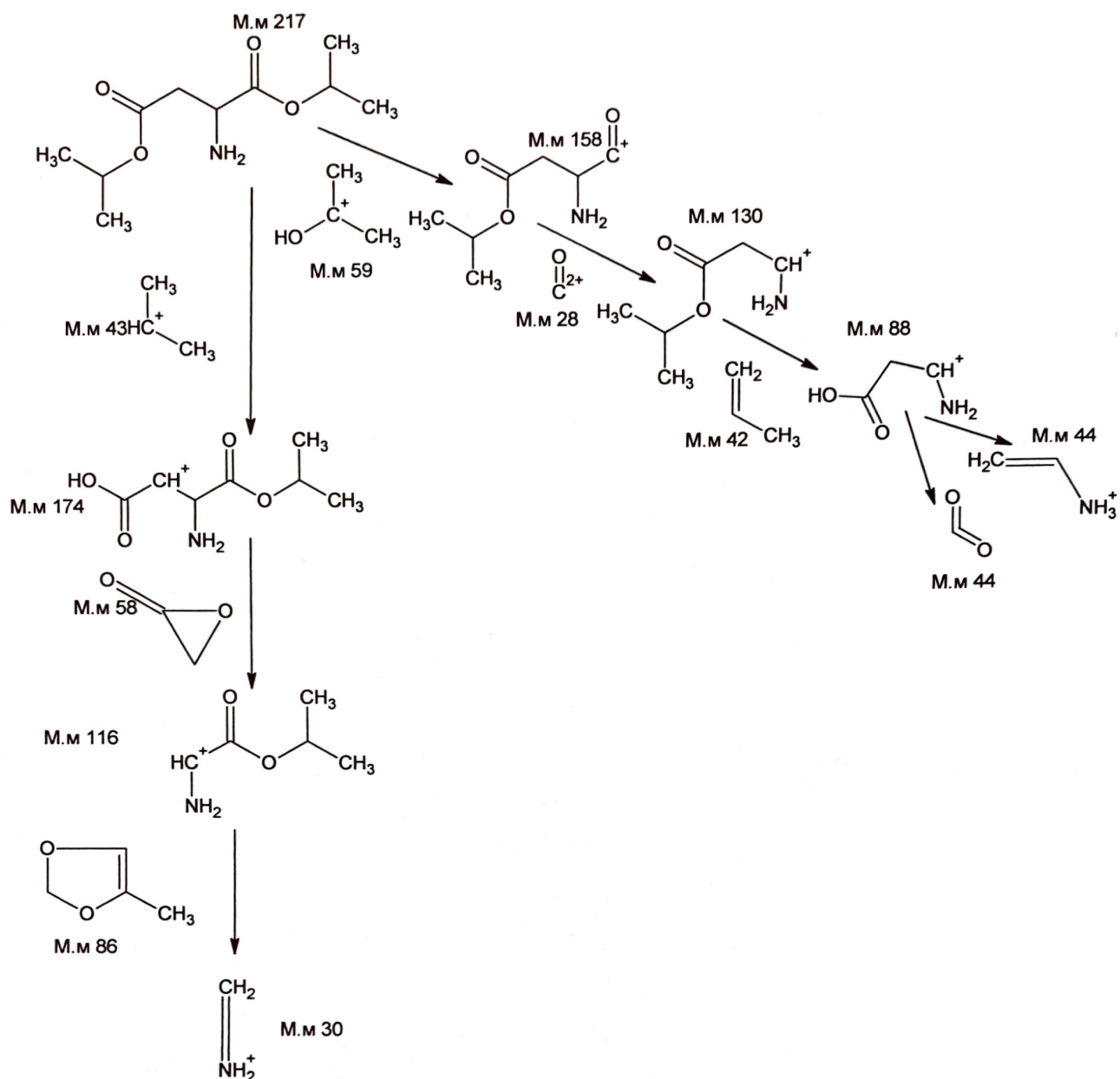


Рисунок 3 – Рассчитанная схема фрагментации при формировании масс-спектра диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты

Для разработки цифровой методики определения возраста было выбрано два хроматографических параметра: площадь пика D-аспарагиновой кислоты (DasprPS) и логарифм соотношения количеств D- и L-форм энантиомеров аспарагиновой кислоты: DasprPS/LasprPS. Калибровочные результаты хроматографического исследования по 20 зубам приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Распределение исследуемых зубов по возрасту и полу донора и результаты хроматографического исследования образцов дентина при калибровочном исследовании

Возраст	Пол	DasprPS	DasprPS/ LasprPS	Установленный возраст, лет	Абсолютная погрешность, лет
16	ж	4.081	0.018032	16.7	0.7
20	ж	4.972	0.018154	16.8	3.2
22	ж	4.905	0.021947	21.5	0.5
25	м	5.216	0.02453	24.8	0.2
25	м	5.427	0.025002	25.4	0.4
30	ж	6.31	0.032886	35.2	5.2
34	ж	6.366	0.033679	36.2	2.2
37	м	6.351	0.032744	35.1	1.9
41	ж	7.244	0.035991	39.1	1.9
45	м	7.095	0.036872	40.2	4.8
48	ж	7.913	0.04192	46.5	1.5
50	ж	7.7	0.04077	45.1	4.9
53	ж	8.009	0.046313	52.0	1.0
54	ж	8.124	0.046502	52.3	1.7
59	ж	8.387	0.0564	64.6	5.6
62	ж	9.399	0.055126	63.0	1.0
66	м	9.301	0.053379	60.8	5.2
71	ж	9.892	0.061074	70.5	0.5
73	ж	10.514	0.060966	70.3	2.7
76	ж	10.047	0.065917	82.4	6.4

График уравнения линейной регрессии при использовании в качестве изучаемого параметра площади пика D-формы (DasprPS) аспарагиновой кислоты представлен на рис. 4, полученное уравнение имеет вид

$$\text{DasprPS} = 0.1x + 2.8362,$$

где  $x$  – возраст человека.

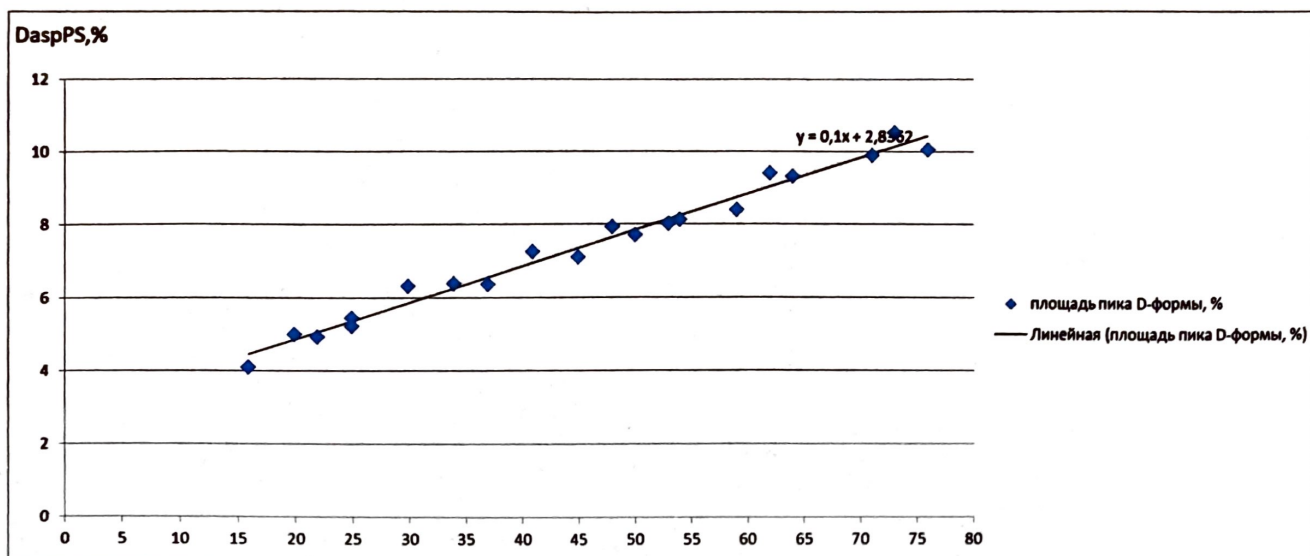


Рисунок 4 – График регрессии, показывающий линейную зависимость между возрастом человека (ось x) и площадью пика D-энантиомера аспарагиновой кислоты на хроматограмме (ось y)

При использовании DaspRPS/LaspRPS в качестве хроматографического критерия возраста в результате проведенного статистического анализа с помощью метода наименьших квадратов было построено уравнение линейной регрессии:

$$\ln(1+D/L)-0,045 = 0.0008x + 0.0047,$$

где x – возраст человека, D/L – соотношение любых энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине зуба (рис. 5).

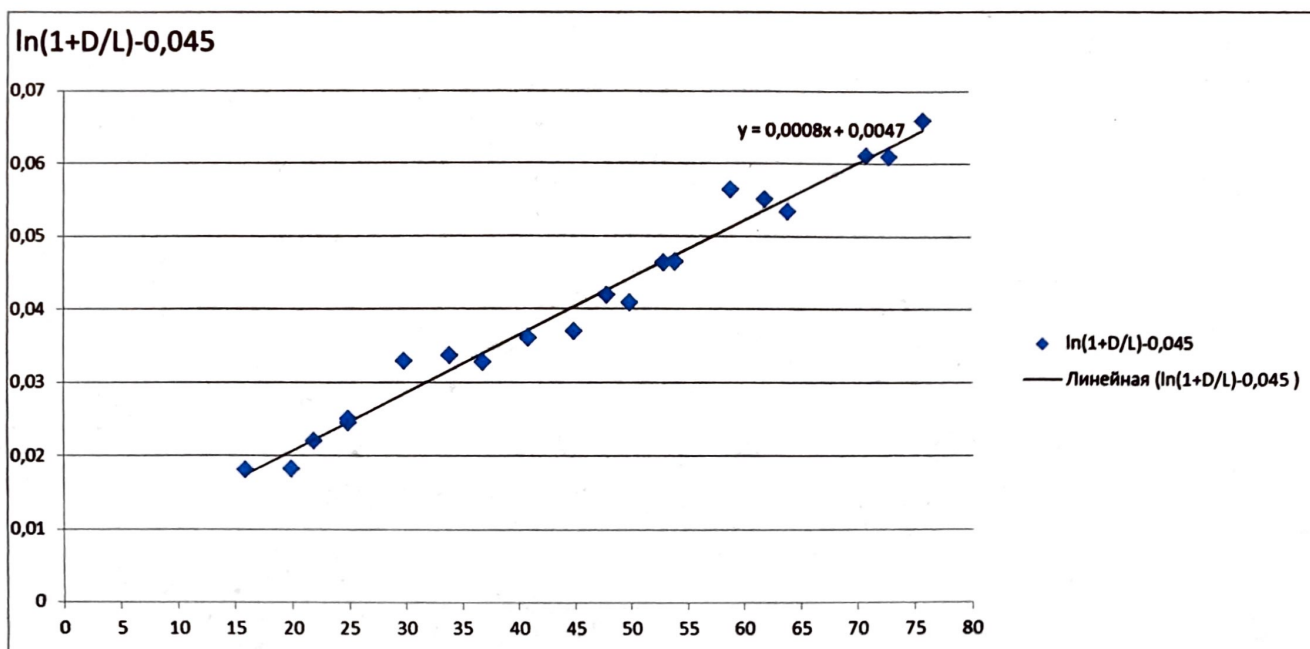


Рисунок 5 – График регрессии, показывающий линейную зависимость между возрастом человека (ось x) и логарифмом соотношения энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине зуба (ось y)

После калибровочного исследования и регрессионного анализа дальнейшие результаты исследования образцов зубной ткани имели целью создание базы данных значений исследуемых хроматографических параметров, общий вид которой представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Показатели хроматографических критериев определения биологического возраста человека в дентине зубов по пятилетним возрастным интервалам

Возрастной интервал	DaspPS	Dasp/Lasp
16-20	4.509 ± 0.43	0.01809 ± 0.00092
21-25	5.094 ± 0.24	0.02217 ± 0.00314
26-30	5.611 ± 0.28	0.02908 ± 0.00542
31-35	6.273 ± 0.32	0.03219 ± 0.0047
36-40	6.715 ± 0.27	0.03437 ± 0.00229
41-45	7.149 ± 0.2	0.03652 ± 0.00091
46-50	7.689 ± 0.42	0.04091 ± 0.00101
51-55	8.106 ± 0,45	0.04612 ± 0.00265

56-60	$8.623 \pm 0.33$	$0,05133 \pm 0.0024$
61-65	$9.35 \pm 0.28$	$0.05685 \pm 0.00306$
66-70	$9.597 \pm 0.42$	$0.05899 \pm 0.00474$
71-76	$10.281 \pm 0.33$	$0.06278 \pm 0.00276$

Таким образом, наибольшую корреляцию с биологическим возрастом показали следующие хроматографические параметры: площадь пика D-аспарагиновой кислоты и логарифм соотношения количества D- и L-форм энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине с погрешностью в  $\pm 2.4$  года. Для определения количества энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине зубов человека следует оценивать следующие производные аспарагиновой кислоты: диметиловый эфир, диэтиловый эфир, диизопропиловый эфир, диизобутиловый эфир, N-трифлуороацетил диизобутиловый эфир, N-пентафлуоробензоил диметиловый эфир, N - бис (3,5-трифлуорометил) бензоил диметиловый эфир. В результате исследования определена возможность использования аминокислотного состава дентина для установления возраста человека в условиях стандартной биохимической лаборатории. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией позволяет определять стереоизомеры аспарагиновой кислоты, содержащиеся в твердых тканях зуба, при этом обнаруженные особенности исследования аминокислот в тканях зуба отсутствуют как в отечественной, так и в зарубежной литературе. С учетом установленных в исследовании стандартов пробоподготовки и параметров хромато-масс-спектрометрического анализа методика оценки степени рацемизации аспарагиновой кислоты является легко воспроизводимой, что позволяет рекомендовать ее для исследования возрастной динамики биохимического состава зубов человека.

## ВЫВОДЫ

1. Согласно архивным данным Бюро СМЭ ДЗ г.Москвы, большинство неопознанных трупов составляют мужчины молодого возраста; среди категорий смерти преобладает насильственная, наступившая от отравлений и механической травмы; при ненасильственной смерти неопознанных лиц причиной в подавляющем большинстве случаев явились заболевания сердца и сосудов.

2. Масс-селективная газовая хроматография может быть применена в качестве основы для установления количественного состава аминокислот в дентине зуба при оценке их возрастной динамики.

3. Биохимическими маркерами возрастных изменений дентина зубов, наиболее сильно коррелирующими с биологическим возрастом человека, являются площадь пика D-аспарагиновой кислоты и логарифм соотношения количеств D- и L-форм энантиомеров аспарагиновой кислоты.

4. Возрастные закономерности динамики аминокислотного состава тканей зуба заключаются в пропорциональном увеличении с возрастом количества D-форм аминокислот в белках зуба, в том числе аспарагиновой кислоты; а также увеличением соотношения D/L форм аминокислот в твердых тканях зуба.

5. Судебно-медицинскими критериями, пригодными для установления биологического возраста человека на основе аминокислотного состава дентина являются количество и соотношение D- и L-форм энантиомеров аспарагиновой кислоты: диметилового эфира, диэтилового эфира, диизопропилового эфира, диизобутилового эфира, N – трифлуороацетил диизобутилового эфира, N-пентафлуоробензоил диметилового эфира, N - бис (3,5-трифлуорометил) бензоил диметилового эфира.

6. Данные хроматографических исследований возрастной динамики форм аспарагиновой кислоты в дентине позволяют использовать математическую основу для создания базы данных и дальнейшего усовершенствования цифровой методики определения биологического возраста человека.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Метод исследования аминокислот твердых тканей зуба рекомендуется к применению при установлении возраста погибших в случаях происшествий и катастроф с массовым количеством пораженных, обнаружении скелетизированных останков и тел с выраженными посмертными изменениями.

2. Зуб перед исследованием хранить вне источников ультрафиолетового и теплового излучения при пониженной температуре.

3. Для газовой хроматографии необходимо использовать навеску измельченного дентина в количестве не менее 10 мг для получения адекватного и достоверного ответа на хроматограмме.

4. Образцы дентина получать путем выпиливания из зубной ткани с помощью инструментов с алмазным напылением с применением постоянного охлаждения, далее измельчить в агатовой ступке до получения порошка. Для экспресс-исследования образцы дентина рекомендуется получать путем механического измельчения зубной ткани в агатовой ступке до крупных фрагментов с последующим отбором фрагментов дентина в ультрафиолетовом свете и дальнейшем их измельчении до получения порошка.

5. Рекомендуется проводить гидролиз при температуре от 20°C до 37°C в течение 8-12 часов, поскольку при температуре выше 37°C возникает дополнительная, искусственно спровоцированная, рацемизация аминокислот.

6. Для экспресс-исследования в случаях большого поступления материала в лабораторию рекомендуется увеличить температуру гидролиза до 50°C для сокращения времени до 6 часов.

7. В процессе дериватизации целесообразно применять метанольный раствор соляной кислоты в соотношении 9 частей спирта на 1 часть концентрированной HCl, поскольку в указанных условиях протекает процесс частичной дериватизации по карбоксильным группам аспарагиновой кислоты, что делает ее хроматографическую визуализацию значительно проще.

8. Хроматомасс-спектрометрическое исследование рекомендуется проводить в SIM-режиме, ориентируясь на характеристические ионы дериватов аспарагиновой кислоты, в частности, ( $m/z$  159, 102 (осн), 88) для диметилового

эфира аспарагиновой кислоты; ( $m/z$  173, 155 (осн), 117) для диизобутилового эфира аспарагиновой кислоты; ( $m/z$  189, 130 (осн), 116, 98) для диметилового эфира N-диметил аспарагиновой кислоты; ( $m/z$  189, 130, 116 (осн), 98) для диметилового эфира N-метил аспарагиновой кислоты. Значения отношений массы к заряду приведены в порядке убывания интенсивности на спектрограмме.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Пиголкин Ю.И., Золотенкова Г.В., **Веленко П.С.**, Изотов Б.Н. Исследование аминокислотного состава зуба в целях судебно-медицинской идентификации личности // **Судебно-медицинская экспертиза.** – 2017. – Т.60. – №1. – С.42-45.
2. **Веленко П.С.** Идентификационные аспекты судебно-медицинской одонтологии. // Сборник тезисов научно-практической конференции с международным участием, посвященной 200-летию со дня рождения ДмитрияЕгоровичаМина. Актуальные проблемы судебной медицины. – Москва. – 2018. – С.26-28.
3. Шигеев С.В., **Веленко П.С.**, Аметрин М.Д. Судебно-медицинская характеристика неопознанных трупов по данным Бюро СМЭ г. Москвы. // **Судебно-медицинская экспертиза.** – 2018. – Т.61 – №4. – С.35-38.
4. Изотов Б.Н., **Веленко П.С.**, Лисовская С.Б., ЗолотенковаГ.В., Башилов А.А.Методика исследования биохимического состава твердых тканей зуба человека // **Судебно-медицинская экспертиза.** – 2019. – Т.62 – №5. – С.39-42.