

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПРИВОЛЖСКИЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**Четвертнова Анна Павловна**

**КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МЕКОНИЯ В СЛЕДАХ НА  
ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВАХ**

14.03.05 – Судебная медицина

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель

доктор медицинских наук, профессор,

Эделев Николай Серафимович

Нижний Новгород – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА ПО ИССЛЕДОВАНИЮ МЕКОНИЯ И КАЛА.....	12
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	28
2.1. Материалы исследования.....	28
2.2. Методы исследования.....	31
2.2.1. Световая и люминесцентная микроскопия.....	31
2.2.2. Исследование активности амилазы в крахмально-агаровом геле.....	31
2.2.3. Исследование активности трипсина методом субстратной пленки.....	32
2.2.4. Установление наличия желчных кислот модификацией реакции Петтенкофера.....	33
2.2.5. Метод спектрофотометрии.....	34
2.2.6. Метод восходящей тонкослойной хроматографии.....	34
Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА МЕКОНИЯ И КАЛА.....	35
3.1. Изучение морфологического состава мекония.....	35
3.2. Изучение морфологического состава кала.....	40
Глава 4. ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА МЕКОНИЯ И КАЛА....	49
4.1. Исследование активности панкреатической амилазы .....	49
4.1.1. Исследование активности панкреатической амилазы мекония.....	49
4.1.2. Исследование активности панкреатической амилазы кала.....	53
4.2. Исследование активности трипсина.....	55
4.2.1. Исследование активности трипсина мекония.....	55
4.2.2. Исследование активности трипсина кала.....	59
4.3. Исследование по выявлению желчных кислот.....	61
4.3.1. Выявление желчных кислот в меконии.....	61

4.3.2. Выявление желчных кислот в кале.....	65
Глава 5. ИЗУЧЕНИЕ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МЕКОНИЯ И КАЛА....	67
5.1. Изучение пигментного состава мекония и кала методом спектрофотометрии.....	68
5.2. Изучение пигментного состава мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии.....	72
5.2.1. Изучение влияния крайних температур на выявление стеркобилина кала.....	81
5.2.2. Изучение влияния процессов гниения на выявление стеркобилина кала.....	83
5.2.3. Изучение чувствительности метода.....	85
5.2.4. Изучение специфичности метода.....	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	89
ВЫВОДЫ.....	112
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	116
Приложение.....	133

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность проблемы и степень ее разработанности**

В случаях обнаружения трупа новорожденного вне лечебного учреждения всегда возникает подозрение в его насильственной смерти. При этом, как правило, отсутствуют сведения о течении беременности и родов, анамнезе роженицы, состоянии ребенка после рождения, об обстоятельствах и времени его смерти [Баринов Е.Х. и соавт., 2002]. Однако смерть может быть и ненасильственной – до, во время и после родов [Большакова М.В., 2019; Борисевич М.А. и соавт., 2019; Власюк В.В., 2019; Караваева С.А., Козлов Ю.А., 2019; Молчанова М.Н. и соавт., 2019; Румянцев А.Г., 2019; Чепурной Г.И. и соавт., 2019; Щеголев А.И., Серов В.Н., 2019; Щеголев А.И. и соавт., 2019; Waldhausen J.H.T., Richards M., 2018]. Поэтому при судебно-медицинском исследовании перед экспертом стоит решение ряда специальных вопросов, интересующих следствие, таких как новорожденность, доношенность, жизнеспособность, продолжительность внеутробной жизни и др. [Лунева А.В., 2013; Коротаева М.А., 2018; Кузьмина А.В., 2018; Cohen M., 2018].

При подтверждении факта убийства новорожденного данное преступление квалифицируется как детоубийство (ст. 106 УК РФ). При этом, среди прочего, появляется необходимость выявления в следах на вещественных доказательствах первородного кала – мекония [Крюков В.Н. и соавт., 2009], поскольку его обнаружение указывает на имевшие место роды и дает следственным органам информацию об их месте и времени [Соловьева Н.А., 2004; Ковригина Г.Д., 2017; Соломатина Е.А., 2018]. Кроме этого, выявление мекония подтверждает факт новорожденности [Абрамов С.С. и соавт., 2001; Ефимов А.А., Шухнин М.Н., 2008; Соколова З.Ю. и соавт., 2011]. В судебно-медицинской практике данный период длится от момента рождения до конца первых суток. Это обусловлено юридическим определением убийства матерью новорожденного ребенка [Алхимина И.А., 2012; Кузнецов В.И., 2013; Бабичев А.Г., 2014; Мачинский П.А.,

Тишков С.В., 2014; Терновцова А.М., 2016; Гречаный С.В., Кожадей Е.В., 2018; Добрикова Н.В., 2018; Сухинин А.В., Соловьева Н.А., 2018; Тарасова О.А., Сидорова С.А., 2018].

Вопрос о наличии мекония может быть решен при проведении судебно-медицинской биологической экспертизы [Мамурков В.А., 2012; Elkins К.М., 2014; Гусаров А.А. и соавт., 2015; Конон А.В., 2016; Горбулинская И.Н., 2018; Ковалев и соавт., 2018; Смирнов Р.Ю., 2018; Куприна Т.А. и соавт., 2019]. В настоящее время обнаружение мекония в следах на вещественных доказательствах основано только на изучении его морфологического состава микроскопическим методом [Бронникова М.А., Гаркави А.С., 1963; Барсегянц Л.О., 1999; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009; Федоровцев А.Л., Эделев Н.С., 2014]. Однако, при малом количестве исследуемого материала, неблагоприятном воздействии факторов внешней среды, что зачастую не редкость в судебно-медицинской практике, многие морфологические элементы мекония не выявляются.

Учитывая низкую выявляемость типичных морфологических элементов микроскопическим методом целесообразно изучение ферментного и пигментного составов мекония с целью разработки новых методических подходов для его обнаружения в следах на вещественных доказательствах.

При диагностике мекония также необходимо отличать его от кала. Выявление последнего основано на обнаружении типичных морфологических элементов микроскопическим методом [Барсегянц Л.О., 2008; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009; Сулейменова Г.М., 2013]. Кроме этого проводились исследования по изучению ферментного состава кала в следах [Ильина Е.А., 1991; Федоровцев А.Л., 2002; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009]. Установлено, что ферменты желудочно-кишечного тракта, выявляемые в кале, присутствуют и в других биологических жидкостях, т.е. данные пробы являются неспецифичными. В недавнее время появились результаты молекулярно-генетического исследования кала, основанного на выявлении генов бактерий, входящих в состав кишечной микрофлоры. [Verhoff M.A. et al., 2002; Andrew Carson C. et al., 2009; Hiroaki N. et

al., 2013; Zou K.-N. et al., 2016; Sinelnikov et al. A., 2017]. Однако, несмотря на высокую чувствительность, данные способы не лишены недостатков.

Разработка новых подходов для диагностики кала повысит объективность и доказательную значимость судебно-медицинских биологических экспертиз, т.к. появится возможность его дифференцирования от мекония. Кроме этого, выявление кала в следах на вещественных доказательствах дает ценную информацию правоохранительным органам при расследовании преступлений по поводу насильственных действий сексуального характера [Поддубная Е.В., 2007; Пискарева В.К., 2016; Чугунов А.А., Морозова А.А., 2016]

Таким образом, до настоящего времени не изучены ферментный и пигментный составы мекония и кала в следах на вещественных доказательствах, не разработаны достоверные способы установления их наличия, отсутствуют критерии дифференциальной диагностики этих выделений, что подчеркивает актуальность работы и определяет

### **Цель исследования**

Совершенствование судебно-медицинской диагностики мекония в следах на вещественных доказательствах при экспертизах по делам о детоубийствах.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать морфологический и ферментный составы мекония и кала в следах на объектах-носителях.
2. С помощью спектрофотометрического метода исследования разработать новые методические подходы для диагностики мекония и кала.
3. Установить возможность выявления желчных пигментов мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии.
4. Изучить влияние крайних температур и процессов гниения на выявляемость стеркобилина кала во внешней среде.
5. На основе полученных данных разработать судебно-медицинские критерии дифференциальной диагностики мекония и кала в следах на вещественных доказательствах.

## **Научная новизна**

В ходе исследования проведено комплексное изучение морфологического, ферментного и пигментного составов мекония и кала в следах на вещественных доказательствах.

Установлена возможность достоверного выявления мекония и кала по спектрам поглощения видимого и ультрафиолетового света. (Способ установления наличия мекония и/или кала в следах на вещественных доказательствах // Патент РФ на изобретение № 2646813 от 07.03.2018).

Разработан способ установления наличия кала в следах методом восходящей тонкослойной хроматографии, основанный на выявлении желчного пигмента – стеркобилина. (Способ установления наличия кала в следах на вещественных доказательствах // Патент РФ на изобретение № 2691727 от 18.06.2019).

Получены ранее неизвестные данные о влиянии крайних температур и процессов гниения на выявляемость стеркобилина кала.

Впервые определены критерии дифференциальной диагностики мекония и кала в следах на вещественных доказательствах, основанные на особенностях их морфологического и пигментного составов.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

В результате проведенных исследований разработаны способы установления наличия следов мекония и кала и определены критерии дифференциальной диагностики данных выделений, основанные на особенностях их морфологического и биохимического составов.

Предложенные способы установления наличия мекония и кала в следах на объектах внешней среды повышают объективность и доказательную значимость судебно-медицинских биологических экспертиз, что позволяет оказать более эффективную помощь правоохранительным органам в расследовании преступлений по факту детоубийств и насильственных действий сексуального характера.

Доступность оборудования, скорость и простота выполнения используемых методик обеспечивают возможность применения разработанных способов в

практической деятельности врачей - судебно-медицинских экспертов судебно-биологических отделов бюро судебно-медицинской экспертизы.

### **Методология и методы исследования**

В ходе исследования проведен анализ научных трудов отечественных и зарубежных авторов в области исследования следов биологического происхождения. В работе использовались эмпирические, теоретические и общенаучные методы сравнительного изучения данных, полученных в ходе морфологического, биохимического и спектрофотометрического исследования биоматериала. Результаты подвергались математико-статистической обработке и комплексному анализу.

Диссертационное исследование выполнено на 50 образцах мекония от мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития, 50 образцах живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток и 50 образцах кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту**

1. При микроскопическом исследовании мекония и кала в следах выявляются типичные для данных выделений морфологические элементы. При исследовании активности пищеварительных ферментов – амилазы и трипсина, установлено, что они обнаруживаются непостоянно, также как и желчные кислоты.

2. В результате исследования разработан способ установления наличия мекония и кала в следах на вещественных доказательствах методом спектрофотометрии, основанный на отличиях спектров поглощения света данными выделениями.

3. Выявление в следах желчного пигмента – стеркобилина методом восходящей тонкослойной хроматографии позволяет определять наличие кала.

4. Действие крайних температур не влияет на выявляемость стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии, в то время как гнилостные процессы оказывают отрицательное влияние на его обнаружение.

5. Разработанные критерии дифференциальной диагностики мекония и кала в следах на вещественных доказательствах основаны на отличиях их морфологического и пигментного составов.

### **Связь работы с научными программами и планами**

Диссертационное исследование выполнено на базе:

1. Кафедры клинической судебной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

2. ГБУЗ НО «Нижегородское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

3. ОГБУЗ «Костромское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

Тема диссертации утверждена на заседании проблемной комиссии ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (протокол №1 от 14.10.2015 года).

Диссертационное исследование на тему «Комплексное исследование мекония в следах на вещественных доказательствах» одобрено Комитетом по этике ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (протокол №4 от 13.03.2019 года).

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертационного исследования, его цели, задачи и результаты соответствуют паспорту научной специальности 14.03.05 – Судебная медицина (медицинские науки) по пункту 10 – исследование вещественных доказательств биологического происхождения для целей следственной и судебной практики.

### **Личное участие автора**

Личное участие автора осуществлялось на всех этапах диссертационной работы и заключалось в заборе материала, планировании, организации и проведении научного исследования по всем разделам диссертации, включая аналитический обзор литературы. Проведена систематизация, статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных данных.

Автором выполнено 5 практических судебно-медицинских экспертиз по исследованию мекония и кала в следах на вещественных доказательствах.

### **Степень достоверности исследования**

Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждается достаточным количеством объектов исследования, использованием методов и методик, адекватных поставленным задачам, с применением современных методов статистического анализа. Первичная документация и материалы статистической обработки проверены и признаны достоверными.

Основные результаты опубликованы в научных изданиях, в том числе, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

### **Апробация диссертации**

Диссертационная работа апробирована и рекомендована к защите на заседании проблемной комиссии по направлению «Биомедицинские науки» ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (протокол №5 от 23.04.2019 года).

**Основные положения диссертационного исследования доложены и обсуждены на:** Заседаниях кафедры клинической судебной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России (Нижний Новгород, 2016-2019); Заседаниях Нижегородского научного общества судебных медиков №570, №577 (Нижний Новгород, 2018, 2019); Межрегиональном научно-практическом симпозиуме «Актуальные вопросы судебно-медицинской экспертизы» (г. Суздаль, 2017); Межрегиональном научно-практическом симпозиуме «Вопросы теории и практики судебной медицины» (Нижний Новгород, 2018); Международной научной конференции «Международные и национальные тенденции и перспективы развития судебной экспертизы» (Нижний Новгород, 2019).

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационного исследования внедрены в работу ГБУЗ НО «Нижегородское областное бюро судебно-медицинской экспертизы», ОГБУЗ «Костромское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России, в том числе 1 – индексируемая в международной базе цитирования SCOPUS, получено 2 патента на изобретения.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 134 страницах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 158 источников литературы, из них 112 отечественных и 46 зарубежных.

Иллюстрирована 14 таблицами, 18 рисунками, 2 приложениями.

## ГЛАВА 1

### СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА ПО ИССЛЕДОВАНИЮ МЕКОНИЯ И КАЛА

В случаях обнаружения трупа новорожденного вне лечебного учреждения всегда возникает подозрение в его насильственной смерти. При этом, как правило, отсутствуют сведения о течении беременности и родов, анамнезе роженицы, состоянии ребенка после рождения, об обстоятельствах и времени его смерти [Баринов Е.Х. и соавт., 2002]. Однако смерть может быть и не насильственной – до, во время и после родов. [Машинец Н.В., Демидов В.Н., 2015; Щеголев А.И., 2016; Бебешко О.И. и соавт., 2017; Кочкорбаева Г.Н., Иванова О.Н., 2017; Кузнецов П.А., Козлов П.В., 2017; Щеголев А.И. и соавт., 2017; Богомазова И.М. и соавт., 2018; Кузьмичев Д.Е., 2018; Кухарчик Ю.В. и соавт., 2018; Милош Т.С., 2018; Большакова М.В., 2019; Борисевич М.А. и соавт., 2019; Власюк В.В., 2019; Караваева С.А., Козлов Ю.А., 2019; Молчанова М.Н. и соавт., 2019; Румянцев А.Г., 2019; Чепурной Г.И. и соавт., 2019; Щеголев А.И., Серов В.Н., 2019; Щеголев А.И. и соавт., 2019; Waldhausen J.H.T., Richards M., 2018]. Поэтому при судебно-медицинском исследовании перед экспертом стоит решение ряда специальных вопросов, интересующих следствие, таких как новорожденность, доношенность, жизнеспособность, продолжительность внеутробной жизни и др. [Коротаева М.А., 2018; Кузьмина А.В., 2018; Лунева А.В., 2013; Cohen M., 2018].

В судебно-медицинской практике период новорожденности отличается от такового в педиатрии и акушерстве и длится от момента рождения до конца первых суток. Это обусловлено юридическим определением убийства матерью новорожденного ребенка [Алхимина И.А., 2012; Кузнецов В.И., 2013; Бабичев А.Г., 2014; Терновцова А.М., 2016; Гречаный С.В., Кожадей Е.В., 2018;

Добрикова Н.В., 2018; Сухинин А.В., Соловьева Н.А., 2018; Тарасова О.А., Сидорова С.А, 2018;].

На новорожденность указывают наличие сочной блестящей пуповины без признаков демаркационного воспаления, родовой опухоли, мекония и т.д. Меконий (первородный кал) обнаруживают при секционном исследовании в дистальных отделах кишечника плода или новорожденного, им могут быть обпачканы кожа ягодиц, внутренней поверхности бедер, предметы, в которые был завернут труп [Абрамов С.С. и соавт., 2001; Ефимов А.А., Шухнин М.Н., 2008; Соколова З.Ю. и соавт., 2011].

Кроме подтверждения факта новорожденности обнаружение мекония в следах на вещественных доказательствах подтверждает факт имевших место родов и помогает следственным органам сформировать правильное представление об их времени и месте. [Загрядская А.П. и соавт., 1999; Соловьева Н.А., 2004; Ковригина Г.Д., 2017; Соломатина Е.А., 2018].

Крюков В.Н. и соавт. (2009) указывают на необходимость исследования мекония в следах при расследовании дел по факту убийства новорожденного.

Вопрос о наличии мекония может быть решен при проведении судебно-медицинской биологической экспертизы. [Бронникова М.А., Гаркави А.С., 1963; Барсегянц Л.О., 1999, 2008; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009; Мамурков В.А., 2012; Горбулинская И.Н., 2018].

Меконий образуется в кишечнике плода, представляет темно-зеленую субстанцию слизистой консистенции, с рН около 6,1 и состоит из элементов проглоченных околоплодных вод, желчи и продуктов секреции органов желудочно-кишечного тракта. Первые следы мекония обнаруживают в подвздошном отделе кишечника к 10-14 неделе внутриутробного развития, с 16 недели – в толстом. После рождения меконий выделяется в течение 1-3 суток, а к 4-5 дню сменяется калом грудного ребенка [Polin R.A., 1992; Acosta et. al., 2005].

Особенности морфологического и биохимического состава мекония обусловлены, в первую очередь, типом питания плода, морфофункциональной

незрелостью желудочно-кишечного тракта и его последовательной колонизацией микрофлорой.

Известно, что заселение кишечника микроорганизмами начинается во внутриутробный период, однако это микробное сообщество немногочисленно и качественно однообразно. Наиболее интенсивно процесс микробной колонизации ребенка происходит уже в постнатальном периоде. Состав формирующейся микробиоты зависит от гестационного возраста, способа родоразрешения, типа вскармливания и др. [Набока Ю.Л. и соавт., 2012, 2014; Рыбина Е.В. и соавт., 2015; Кузнецова Э.Э. и соавт., 2016; Рымашевский А.Н., 2017; Якушин А.С. и соавт., 2017; Антонова Л.К., 2018; Червинец В.М., 2018; Николаева И.В., 2018, 2019; Ашурова Н.Г., 2019; Румянцев А.Г., 2019; Hansen R. et al., 2015; Underwood M. A., Sohn K., 2017; Walker R.W., 2017; Stinson L.F., 2018]. Скудностью состава кишечной микрофлоры в ранний постнатальный период объясняются особенности пигментного состава мекония – в нем содержится значительное количество неконъюгированного билирубина, а стеркобилин отсутствует, поскольку его образование происходит под влиянием ферментов, вырабатываемых кишечной микрофлорой [Е.С. Филиппов, 1997; Дашишев В.В., 2006; Соколов В.Н., 2019; S. Aziz, 1995, 2001, 2005].

В настоящее время судебной-медицинской практике исследование мекония проводится, преимущественно, с целью выявления этанола, психотропных и наркотических веществ. [L. Morini et al., 2010; J. Ristimaa et al., 2010; I. Tarcomnicu et al., 2010; M. Hastedt et al., 2013; P. Cabarcos et al., 2015; M. Tynon et al., 2015; F. Vaiano et al., 2016; P. Prego-Meleiro et al., 2017; C. Abernethy et al., 2018; L. Cortes et al., 2018; A. Biondi et al., 2019; A. Nemeskalova et al., 2019; K.L. Palmer, M.D. Krasowski, 2019].

Однако в судебной-медицинской литературе содержатся единичные упоминания об исследовании мекония в следах на вещественных доказательствах, что свидетельствует о недостаточном внимании к этому вопросу. Имеющиеся данные содержат лишь информацию об исследовании

морфологического состава мекония микроскопическим методом, в то время как отсутствуют сведения об исследовании его биохимического состава.

Впервые вопрос судебно-медицинского исследования мекония был освящен И.В. Марковиным (1934) в докторской диссертации на тему: «Морфологический состав мекония и его судебно-медицинское значение». В ходе секционного исследования кишечника плодов и новорожденных он установил, что характерный темно-зеленый цвет меконий приобретает в дистальных отделах толстого кишечника. При исследовании микроскопических препаратов мекония выявлялись пласты кишечного эпителия, который, по мнению автора, отслаивается в результате мацерации и физиологической десквамации; начиная с 4-5 месяца внутриутробного развития появлялись мекониевые тельца, являющиеся производными кишечного эпителия. С 8 месяца обнаруживались пушковые волосы, кристаллы холестерина и клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия. Также, в результате проведенных исследований, Марковин И.В. сделал вывод о том, что обнаружение пушковых волос в меконии является одним из признаков жизнеспособности плода. Однако, их невыявление в составе мекония не всегда свидетельствует о первоначальном отсутствии.

М.А. Бронникова, А.С. Гаркави (1963) использовали технику приготовления микроскопических препаратов мекония в следах на вещественных доказательствах путем размельчения следа на предметном стекле, размачивания его физиологическим раствором или дистиллированной водой, а в случаях старых следов, рекомендовали применение 2% раствора аммиака или глицерина. При микроскопическом исследовании препаратов авторы выявляли мекониевые тельца, пушковые волосы, клетки эпидермиса, кишечного эпителия, кристаллы холестерина, жировые капли и желчные пигменты. Также ими установлено, что мекониевые тельца представляют собой безъядерные образования округлой или овальной формы с ровными краями, величиной от 2-3 мкм до 40 мкм, окрашенные при наличии желчных пигментов в желто-зеленый или коричневый цвет, происходящие из эпителия кожи и слизистой оболочки желудочно-

кишечного тракта. По мнению авторов, наличие мекония считается установленным при обнаружении в пятнах большинства из его морфологических элементов, причем особое значение имеют мекониевые тельца. В ходе исследований Бронникова М.А., Гаркави А.С. пришли к выводу, что присутствие в меконии пушковых волос и клеток эпидермиса свидетельствует о возрасте плода не менее 8 месяцев внутриутробной жизни. Наличие этих элементов в меконии объясняют заглатыванием плодом околоплодных вод. Наличие же в меконии желчных пигментов и кристаллов холестерина при отсутствии пушковых волос и клеток эпидермиса указывает на то, что возраст плода соответствует периоду от 5 до 8 месяцев внутриутробного развития.

Eliakis et al. (1971) считали, что меконий можно дифференцировать от других биологических объектов по весьма высокому содержанию в нем фермента кислой фосфатазы. Количество последней определяли спектрофотометрически по отщепленному паранитрофенолу. Однако, в судебно-медицинской практике этот метод не нашел широкого применения.

Л.О. Барсегянц, М.Ф. Верещака (1982) проводили исследование макро- и микроскопического строения пушковых волос, являющихся одним из морфологических элементов мекония. Ими установлено, что пушковые волосы представляют собой светлые, тонкие или слегка изогнутые волосы. Верхушка их истончена, зашлифована или расщеплена, оптический край ровный. В корковом веществе пигмент мелкозернистый, располагается равномерно, местами группируется в виде тонких тяжей или цепочек. Сердцевина, как правило, отсутствует. Рисунок кутикулы простой, местами слегка усложнен.

Таким образом, имеющиеся в судебно-медицинской литературе данные об исследовании мекония в следах на вещественных доказательствах, освещают лишь вопрос его морфологического состава. В то время как характерные морфологические элементы под действием неблагоприятных факторов внешней среды, а также при исследовании микроследов, не всегда выявляются. Данные об изучении ферментного и пигментного состава мекония в следах на вещественных доказательствах в судебно-медицинской литературе отсутствуют.

Похожая ситуация складывается и в вопросе обнаружения кала в следах на вещественных доказательствах. Большинство исследований посвящено изучению его морфологического состава.

М.А. Бронникова, А.С. Гаркави (1963) использовали метод приготовления неокрашенных препаратов кала путем получения вытяжек из следов. При их микроскопии обнаруживали аморфный детрит из пищевых масс, кишечного эпителия, слизи и микроорганизмов. Также выделяли отдельные элементы, к которым относили, в первую очередь, мышечные волокна. По их наблюдениям, наименее переваренные мышечные волокна представляют собой образования неправильно-прямоугольной формы с несколько закругленными углами и отчетливо различной поперечной исчерченностью. По мере увеличения степени переваривания размеры фрагментов мышечных волокон уменьшаются, прямоугольная форма утрачивается, края закругляются, поперечная исчерченность исчезает. Все мышечные волокна имели желтый или грязно-зеленый цвет. Также авторы обнаруживали непереваримую и переваримую растительную клетчатку, остатки растений (кутикулярные образования, «палисадные» клетки из кожицы бобовых растений, растительные спирали), зерна крахмала, нейтральные жиры и жирные кислоты, мыла жирных кислот, кристаллы оксалатов и холестерин. По мнению Бронниковой М.А. и Гаркави А.С., наличие кала считается установленным при обнаружении большинства составных его элементов, причем, важное диагностическое значение придается мышечным волокнам, сохранившим поперечную исчерченность. Для решения вопроса о возможности происхождения кала от определенного лица авторы предлагали микробиологическое исследование, т.к. основная масса микробов, содержащихся в кале, может быть характерна для того или иного человека, а также макро- и микроскопическое исследования с целью установления наличия крови, паразитов и их яиц, констатации недостатка желчных кислот.

Весомый вклад в изучение морфологического состава содержимого желудочно-кишечного тракта, в том числе кала, внесли К.И. Хижнякова, Л.Н. Моралев (1986), которые для выявления крахмала в микроскопических

препаратах кала использовали раствора Люголя, для выявления жира – раствор красителя Судана III, а для дифференцирования клеточных элементов применяли окраску по Романовскому-Гимзе и другими азур-эозиновыми смесями. По наблюдениям авторов морфологическую картину кала составляют остатки пищи, элементы слизистой оболочки кишечника, клеточный детрит, кристаллы солей и микроорганизмы. Также они отметили, что соединительная ткань при микроскопическом исследовании имеет волокнистое строение и отличается от слизи более четкими контурами, плотной консистенцией и непрозрачностью. Было установлено, что уксусная кислота растворяет соединительную ткань и в ней выявляются эластические волокна, а в слизи обнаруживается слоистость и исчерченность. Авторы отметили, что в нативном препарате нейтральный жир встречается в виде бесцветных или желтоватых круглых и овальных капель. При надавливании покровным стеклом они сливаются. Жирные кислоты в кале имеют вид длинных «заостренных» кристаллов.

Е.А. Ильина (1991) применила метод электрофореза в агаровом геле для установления наличия кала на вещественных доказательствах, который основан на выявлении фермента щелочной фосфатазы. Данный метод сходен с электрофоретическим методом установления наличия спермы по кислой фосфатазе. В результате исследования образцов кала были выявлены полосы энзиматической активности щелочной фосфатазы – малинового цвета на светлом фоне агарового геля; в пятнах слюны, спермы, крови, влагалищных и других выделений, а также в пятнах растительного происхождения полосы активности щелочной фосфатазы не выявлялись.

По данным Л.О. Барсегянц (1999) доказательство наличия кала может быть основано на данных его морфологического исследования микроскопическим методом. Для экстрагирования элементов кала из пятна она предлагала использовать дистиллированную воду с экспозицией в течение 18-20 часов при температуре 4-6 градусов. Затем кусочки материала отжимают и извлекают, жидкость центрифугируют, избыток отсасывают пастеровской пипеткой, а осадок переносят на предметные стекла и накрывают покровным. В случаях,

когда на экспертизу представлена корочка, она предлагала сразу же её микроскопировать, предварительно размельчив на предметном стекле в капле дистиллированной воды. По данным её исследований основную массу кала составляет детрит – аморфные, преимущественно зернистые образования, которые состоят из пищевых масс, кишечного эпителия, слизи и микроорганизмов. Среди дифференцируемых элементов она выявляла мышечные волокна и отмечала, что их внешний вид изменялся в зависимости от стадии переваривания. Наименее переваренные волокна имели неправильную прямоугольную форму с несколько закругленными углами и отчетливой поперечной исчерченностью, по мере увеличения переваривания утрачивалась их прямоугольная форма, края закруглялись, исчерченность исчезала. По её наблюдениям, все мышечные волокна имеют желтоватый или грязно-зеленый цвет. Кроме мышечных волокон Барсегянц Л. О. обнаруживала остатки растительного происхождения: 1) неперевариваемую растительную клетчатку, которая состоит из двухконтурных клеток, непрозрачна и окрашена в желтый или коричневый цвет; 2) перевариваемую растительную клетчатку, для которой характерны прозрачность и отсутствие двухконтурности клеток; 3) растительные спирали – бесцветные сосуды листьев; 4) кутикулярные образования – волоски и иглы эпидермиса зерновых злаков, они бесцветны, постепенно истончаются и в центральной части имеют прозрачный канал; 5) палисадные клетки, соединенные в виде частокола, происходящие из кожицы бобовых растений; 6) прочие остатки растений; 7) зерна крахмала. Среди продуктов жирового обмена выявлялись нейтральный жир, жирные кислоты и их мыла. Кроме этого, обнаруживались кристаллы оксалатов, которые похожи на почтовые конверты, трипельфосфаты в виде призм, напоминающих по форме крышку гроба, холестерин в виде бесцветных четырехугольных пластинок с 1-2 как бы отломанными углами.

А.Л. Федоровцев, Л.А. Ревнитская, Е.И. Королева (2009) предложили экстрагировать элементы кала 15% раствором уксусной кислоты и микроскопировать в проходящем свете без окраски или после обработки

раствором Люголя, либо на люминесцентном микроскопе, используя флюорохромирование препаратов растворами акрихина или акридинового оранжевого. При этом авторы выявляли полупереваренные мышечные волокна, полупереваренные волокна соединительной ткани, клетки перевариваемой и неперевариваемой растительной клетчатки, остатки пищи с сохранившейся структурой органов и тканей, продукты расщепления крахмала, простейших (амебы, лямблии, балантидии, трихомонады), яйца гельминтов, йодофильную микрофлору, клетки кубического многослойного плоского неороговевающего эпителия, происходящие из столбчатой зоны слизистой оболочки прямой кишки. Особое внимание они уделяли мышечным волокнам, которые, по их наблюдениям, имеют вид тяжей, чаще всего с закругленными концами, местами с сохранившейся поперечной исчерченностью, ядра в них обычно не различаются.

По мнению Г.М. Сулейменовой (2013) единственным методом установления наличия кала в следах на вещественных доказательствах в настоящее время является изучение его морфологического состава микроскопическим методом с целью выявления характерных элементов.

М. А. Verhoff et al. (2002), С. Andrew Carson et al. (2009) работали над способами установления наличия кала животных и человека методами полимеразной цепной реакции и электрофореза в агарозном геле, основанные на сравнительном анализе последовательностей генов бактерий с целью оценки загрязненности природных объектов.

N. Hiroaki et al. (2013) работали над способом установления наличия кала на вещественных доказательствах молекулярно-генетическим методом, основанном на выявлении гена  $\beta$ -субъединицы *B. uniformis* and *B. vulgatus* и гена  $\alpha$ -1-6 маннаназы *B. thetaiotaomicron*. При этом установлено, что *B. Uniformis* и *B. thetaiotaomicron* специфичны для кала и могут быть использованы в качестве его маркеров для криминалистической идентификации.

К.-N. Zou et al. (2016) разработали метод обнаружения кала путем определения последовательности генов бактерий, входящих в его состав.

Обнаружение генов осуществляли методом полимеразной цепной реакции с использованием зонда для амплификации РНК-полимеразы  $\beta$ -субъединицы *B. uniformis* and *B. vulgatus* и гена  $\alpha$ -1-6 маннаназы *B. thetaiotaomicron*. Результаты исследования показали, что по крайней мере, один из данных видов бактерий был обнаружен в кале 20 доноров, при этом соотношение *B. uniformis* and *B. vulgatus* и *B. Thetaiotaomicron* составило 95, 85 и 60% соответственно. Однако установлено, что данные гены могут выявляться и в других биологических жидкостях (слюна, влагалищное содержимое).

Их идеи продолжили и развили А. Sinelnikov et al. (2017), разработавшие способ идентификации кала в следах на вещественных доказательствах полимеразной цепной реакцией, основанный на выявлении 16S рРНК гена *B. dorei* микрофлоры кишечника человека. В санитарной гигиене выявление этого гена в образцах воды является показателем её фекального загрязнения. В результате исследования установлено, что в части образцов кала тест на наличие этого гена был отрицательным. Авторы объясняют этот факт вариабельностью количества и состава кишечной микрофлоры у разных лиц. Также установлено, что этот ген отсутствует в крови, слюне, сперме и моче. Однако, несмотря на то, что данный способ обладает достаточной точностью, чувствительностью и специфичностью, он не лишен недостатков.

Итак, в настоящий момент, обнаружение кала в следах на вещественных доказательствах основано только на изучении его морфологического состава микроскопическими методами. Единичные попытки исследования ферментного и пигментного состава кала не нашли применения в судебно-медицинской практике. Результаты последних работ зарубежных авторов по изучению бактериологического состава кала молекулярно-генетическим методом не лишены недостатков.

Следует отметить, что вопрос изучения активности ферментов желудочно-кишечного тракта в следах на вещественных доказательствах подробно освещен в научных исследованиях Нижегородской школы судебных медиков. Так, для обнаружения содержимого желудочно-кишечного тракта на орудиях травмы и

других вещественных доказательствах при ранениях желудка, кишечника, печени и желчного пузыря Л. А. Ревнитской и соавт. (1988), А.Л. Федоровцевым (1998, 2002), А.В. Суминым и соавт. (2011) были проведены исследования по выявлению желчных кислот, ферментов пепсина, амилазы и трипсина.

Так, для установления наличия желчных кислот в следах-наложениях на орудиях травмы при ранениях печени и желчного пузыря Л.А. Ревнитской и соавт. (1988) была предложена модификация реакции Петтенкофера. Реакция основана на том, что в присутствии концентрированной серной кислоты из фруктозы и её производных образуется гидроксиметилфурфурол, дающий при контакте с желчными кислотами красно-фиолетовую окраску.

Для обнаружения амилазы в следах-наложениях на орудиях травмы с целью выявления слюны и кишечного содержимого А.Л. Федоровцевым (1998) была модифицирована методика по установлению наличия слюны в 2% крахмально-агаровом геле. Реакция основана на способности крахмала приобретать синюю окраску при взаимодействии с йодом. Крахмал же, подвергшийся гидролизу под действием амилазы, при добавлении йода не дает синей окраски, поскольку с продуктами его расщепления (простые сахара) такого окрашивания не происходит. Результаты реакции оценивали визуально – при появлении обесцвеченных участков геля вокруг лунок с исследуемыми объектами реакция на наличие амилазы считалась положительной.

С целью выявления кишечных протеаз (трипсина) А.Л. Федоровцевым (2002) была модифицирована методика с использованием проявленной рентгеновской фотопленки, в основе которой лежит метод субстратной пленки. Субстратом реакции является желатина, (гидролизированный коллаген), которая входит в состав эмульсионного слоя фотопленки, при взаимодействии с вытяжками из объектов, содержащими трипсин, при  $pH=8,0$  она разрушается, и на пленке появляются прозрачные зоны.

Для выявления пепсина А.В. Суминым с соавт. (2011) для обнаружения желудочного содержимого во внешней среде была модифицирована проба с использованием рентгеновской фотопленки, предложенная Н.С. Эделевым и

соавт. (2004) для посмертной диагностики аспирации желудочного содержимого. В основе реакции лежит метод субстратной пленки. Проба основана на способности пепсина в кислой среде (рН 2,0) расщеплять белки, входящие в состав эмульсионного слоя рентгеновской пленки. Результат реакции считается положительным при появлении прозрачных зон на фотопленке в местах контакта объектов с предположительным наличием в них содержимого желудка.

Таким образом, выявление ферментов желудочно-кишечного тракта является этапом комплексной диагностики наличия желудочно-кишечного содержимого в следах на вещественных доказательствах [Федоровцев А.Л., 2002; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009].

Вышеперечисленные способы могут найти применение при изучении активности ферментов мекония и кала в следах на вещественных доказательствах.

Следует отметить, что в клинике вопрос морфологического и биохимического состава кала освещен более широко, т.к. копрологический анализ повсеместно применяется в диагностике патологических процессов. На наш взгляд, сведения о клинико-лабораторных методах исследования кала могут дать ценную информацию о возможностях исследования кала в следах на вещественных доказательствах.

Методы химического исследования кала были разработаны еще на рубеже 19-20 веков. Так, при химическом исследовании кала определяли качественное и количественное содержание желчных пигментов, крови, органических кислот, белка, рН.

Первый качественный метод идентификации скрытой крови в кале изобрел голландский врач и химик И.А. Исааксен (1840). Он установил, что эфирная вытяжка из кала, разведенного в уксусной кислоте, после добавления нескольких капель гваяковой смолы и нескольких капель перекиси водорода, при содержании в кале крови окрашивается в синий или фиолетовый цвет. Сложный и малочувствительный метод неоднократно модифицировался – его изменил датский химик Й.П. Греггерсен (1919), предложив пробу с бензидином вместо

гваяковой смолы и  $\text{BaO}_2$  вместо  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В настоящее время бензидиновая проба лежит в основе работы тест-полосок по установлению наличия крови в кале.

А. Шмидт (1898) ввел в копрологию «ядерную пробу», которая основана на том, что ядра клеток могут перевариваться только соком поджелудочной железы. Данная проба демонстрирует её функциональную активность. Ему также принадлежит сулемовая проба на присутствие желчных пигментов в кале: билирубина и стеркобилина. В результате реакции стеркобилина с двуххлористой ртутью образуется соединение, имеющее розовое окрашивание. При наличии билирубина происходит окрашивание в зеленый цвет.

Для количественного определения стеркобилина кала О. Neubauer (1903) году был предложен унифицированный метод с пара-диметиламинобензальдегидом (реактив Эрлиха). Стеркобилиноген (уробилиноген) с пара-диметиламинобензальдегидом образует окрашенный в красный цвет комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию уробилиноидов.

Французский фармаколог Р. Гуаффон (1910) предложил и ввел в практику метод количественного определения органических кислот в кале, в том числе аминокислот, путем титрования соляной кислотой их растворимых солей, образующихся при добавлении к фильтрату кала гидрата окиси кальция и метод количественного определения аммиака в кале путем титрования щелочью кислых радикалов, освобождающихся при добавлении к фильтрату кала формалина.

Однако, сейчас, на смену рутинным методам химического исследования кала пришли экспресс-методы с использованием диагностических тест-полосок. Так, для установления наличия белка, крови, стеркобилина, билирубина, лейкоцитов, определения рН кала используют диагностические тест-полоски альбу-ФАН, гемо-ФАН, икто-ФАН. Для полного химического анализа кала используют полифункциональные полоски ДекаФАН ЛЕЙКО, позволяющие определять присутствие в кале крови, лейкоцитов, билирубина, уробилиногена, белка и рН. Принцип реакции заключается в том, что каловую эмульсию наносят на уголок реагентного поля полоски и отмечают изменение или появление окраски

реагентного поля около капли каловой эмульсии. По истечении времени, указанного в инструкции к тесту, сравнивают окраску реагентной зоны со шкалой на этикетке контейнера [Миронова И.И., 2013; Никитина А.В. и соавт., 2019].

Морфологический состав кала в клинико-лабораторной диагностике до сих пор изучают микроскопическим методом. Для этого, из образца кала готовят пять микроскопических препаратов. Первым исследуют нативный препарат - каплю каловой эмульсии наносят на предметное стекло, накрывают покровным и микроскопируют. При этом, на фоне аморфного детрита обнаруживают волокна соединительной ткани, мышечные волокна с поперечной исчерченностью и без, перевариваемую и неперевариваемую растительную клетчатку, капли нейтрального жира, «иглы» жирных кислот, глыбки солей жирных кислот, кристаллы холестерина, кристаллы трипельфосфатов, оксалаты кальция, кристаллы Шарко-Лейдена, слизь, лейкоциты, кишечный эпителий, цисты простейших, их вегетативные формы, яйца гельминтов. Второй препарат окрашивают раствором Люголя – на предметное стекло наносят каплю каловой эмульсии и такую же каплю раствора Люголя, смешивают и накрывают покровным стеклом. При этом зерна внутри- и внеклеточного крахмала окрашиваются в черный, темно-синий, голубой, розовый, красноватый или фиолетовый цвет, в зависимости от стадии его расщепления. Также выявляют колонии нормальной и патологической йодофильной микрофлоры, которая окрашивается йодом в черный и коричневый цвет. Для выявления игл и глыбок солей жирных кислот (мыл) на предметное стекло наносят каплю каловой эмульсии и каплю 30% уксусной кислоты, смешивают, покрывают покровным стеклом, доводят до кипения над пламенем спиртовки и микроскопируют под большим увеличением. При этом, образование капель жира указывает на наличие в кале мыл. Четвертый препарат предназначен для дифференцирования капель нейтрального жира и капель жирных кислот. Для этого, на предметное стекло наносят каплю каловой эмульсии и каплю 0,5% водного раствора метиленовой сини, смешивают и покрывают покровным стеклом. Капли жирных

кислот окрашиваются в темно-синий, синий и голубой цвет, капли нейтрального жира остаются бесцветными. Пятый препарат готовят при наличии в кале слизи, гнойных масс или фрагментов ткани. Отобранные фрагменты помещают на предметное стекло и накрывают покровным. При микроскопии можно обнаружить клеточные элементы крови, кишечного эпителия, клетки злокачественных новообразований и др. Выявление возбудителей кишечных гельминтозов и протозоозов также является неотъемлемой частью клинического исследования кала [Миронова И.И., 2005; Сердюк А.П. и соавт., 2015].

В норме, при микроскопии нативного препарата кала, на фоне недифференцируемого пищевого детрита встречаются единичные, в редких полях зрения, лишенные исчерченности мышечные волокна, неперевариваемая растительная клетчатка и небольшое количество кристаллов жирных кислот. Однако при различных формах диспепсии морфологический состав кала может быть более разнообразным. Так, при ахлоргидрии и гиперхлоргидрии в кале обнаруживают непереваренные мышечные волокна (креаторея) и волокна соединительной ткани. При недостаточности поджелудочной железы в кале выявляют большое количество нейтрального жира (стеаторея). При нарушении желчеобразования и желчеотделения в препаратах присутствует большое количество игл, глыбок и капель жирных кислот. Нарушение всасывания в тонком кишечнике любой этиологии тоже характеризуется стеатореей. При бродильной диспепсии обнаруживают большое количество перевариваемой клетчатки, внутри- и внеклеточного крахмала, нормальной и патологической йодофильной флоры, лейкоциты и клетки эпителия толстой кишки. При язвенном колите среди слизи выявляют эритроциты, нейтрофилы, клетки цилиндрического эпителия толстой кишки, кристаллы гематоидина и др. [Миронова И.И., 2005; Батуревич Л.В., 2014; Полушкина Е.И., Полушкин И.С., 2016].

Итак, методы клинического исследования кала сформировались к середине 20 века и до сих пор широко применяются в лабораторной диагностике.

Следует отметить, что при клинико-лабораторном исследовании микроскопического состава кала в норме встречаются лишь единичные дифференцируемые элементы: мышечные волокна, лишенные исчерченности, неперевариваемая растительная клетчатка и небольшое количество жирных кислот [Миронова И.И., 2005; Камышников В.С. и соавт., 2015]. Тем более, при исследовании следов кала на вещественных доказательствах дифференцируемых элементов будет еще меньше. Этот факт еще раз подчеркивает необходимость разработки способов установления наличия кала, основанных на особенностях его биохимического состава. На наш взгляд, возможно исследование биохимического состава кала в следах на вещественных доказательствах методами, применяемыми в клинико-лабораторной диагностике.

Подводя итог, следует подчеркнуть, что в настоящее время экспертиза мекония и кала в следах на вещественных доказательствах основана на обнаружении характерных для этих выделений морфологических элементов микроскопическим методом, которые не всегда выявляются. В судебно-медицинской литературе содержатся лишь единичные данные об исследовании ферментного и пигментного состава мекония и кала, которые не нашли практического применения.

Такое положение вещей диктует необходимость изучения биохимического состава этих выделений в следах на вещественных доказательствах и разработку простых, доступных, специфичных и чувствительных методов установления их наличия.

Также, в настоящее время отсутствуют и критерии дифференциальной диагностики мекония и кала в следах на вещественных доказательствах, которые тоже требуют разработки.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Материалы исследования

Для решения задач настоящей работы проведено 3160 экспериментов разных серий по исследованию мекония и кала в следах на вещественных доказательствах. Объем и характеристика экспериментов представлены в таблице 1.

В экспериментах было исследовано:

- 50 образцов мекония мертворожденных плодов без признаков гнилостных изменений, умерших в результате нарушения плацентарного кровообращения (отслойки плаценты, фетоплацентарной недостаточности), пороков развития, сроком от 20 до 41 недели внутриутробного развития, с давностью хранения от 3 суток до 2 лет;

- 50 образцов мекония живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения от 3 суток до 2 лет;

- 50 образцов кала от трупов взрослых лиц без признаков гнилостных изменений в возрасте от 40 до 75 лет, без видимых болезненных изменений печени, желчного пузыря, кишечника при секционном исследовании, с давностью хранения от 3 суток до 2 лет.

Образцы мекония мертворожденных плодов получали из нисходящей ободочной и сигмовидной кишки во время секционного исследования.

Забор образцов мекония от живых новорожденных производили с пеленок и подгузников после дефекации.

Образцы кала получали из прямой кишки во время секционного исследования трупов взрослых лиц.

Полученный материал равномерно наносили на марлевые тампоны размерами 10,0x10,0 см, сложенные в 3 раза, высушивали в вытяжном шкафу при комнатной температуре в открытых чашках Петри, без прямого доступа солнечного света. Высушенные образцы хранили в маркированных бумажных конвертах в условиях лаборатории.

Таблица 1 – Характер и количество проведенных экспериментов

№	Характер исследований	Количество экспериментов
1	Исследование неокрашенных микроскопических препаратов мекония методом световой микроскопии	200
2	Исследование неокрашенных микроскопических препаратов кала методом световой микроскопии	100
3	Исследование микроскопических препаратов мекония методом световой микроскопии с окраской раствором Люголя	100
4	Исследование микроскопических препаратов кала методом световой микроскопии с окраской раствором Люголя	100
5	Исследование микроскопических препаратов мекония методом люминесцентной микроскопии с окраской препаратов 0,0005 % раствором акрихина	100
6	Исследование микроскопических препаратов кала методом люминесцентной микроскопии с окраской препаратов 0,0005 % раствором акрихина	100
7	Исследование активности амилазы мекония в крахмально-агаровом геле	400

## Продолжение таблицы 1

8	Исследование активности амилазы кала в крахмально-агаровом геле	200
9	Исследование активности трипсина мекония методом субстратной пленки	400
10	Исследование активности трипсина кала методом субстратной пленки	200
11	Установление наличия желчных кислот мекония модификацией реакции Петтенкофера	100
12	Установление наличия желчных кислот кала модификацией реакции Петтенкофера	50
13	Исследование спектров поглощения мекония методом спектрофотометрии	200
14	Исследование спектров поглощения кала методом спектрофотометрии	100
14	Исследование спектров поглощения кала методом спектрофотометрии	100
15	Исследование пигментного состава мекония методом восходящей тонкослойной хроматографии	200
16	Исследование пигментного состава кала методом восходящей тонкослойной хроматографии	610
17	Всего	3160

В настоящей главе описываются основные методики исследования мекония и кала в следах на вещественных доказательствах. Характеристики проведенных экспериментов приводятся в соответствующих главах.

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Световая и люминесцентная микроскопия**

Для исследования морфологического состава мекония и кала вырезки из марлевых тампонов размерами 4,0x4,0 см помещали в пробирки и экстрагировали 15% раствором уксусной кислоты при температуре 4-8° в течение 24 часов. Затем их отжимали и извлекали из пробирок, жидкость центрифугировали в течение 4-5 мин при 1500 об/мин, избыток отсасывали пипеткой, а осадок переносили на обезжиренные в смеси Никифорова предметные стекла, высушивали при комнатной температуре и фиксировали 96% этиловым спиртом.

Препараты изучали с использованием светового микроскопа МИКМЕД-5 без окраски и после обработки раствором Люголя. Обзорную микроскопию проводили с объективом 20x и окулярами 10x. Изучение отдельных элементов - с объективами 40x и окулярами 10x. Для окраски 1-2 каплю раствора Люголя наносили на предметное стекло, накрывали покровным, избыток удаляли фильтровальной бумагой и микроскопировали.

Для исследования препаратов методом люминесцентной микроскопии препараты окрашивали 0,0005% водным раствором акрихина (в ходе нашего исследования использован акрихин производства фирмы «Bayer» с коммерческим названием Atebrin) в течение 10 минут. Затем краситель смывали в течение 10 секунд под струей проточной воды и микроскопировали на люминесцентном микроскопе OLYMPUS CX-41 с объективами 20x, 40x и окулярами 10x.

### **2.2.2. Исследование активности амилазы в крахмально-агаровом геле**

Для изучения активности панкреатической амилазы в составе мекония и кала использована методика, предложенная А.Л. Федоровцевым (1998) для установления наличия кишечного содержимого и слюны, с использованием крахмально-агарового геля. В основе реакции лежит способность крахмала приобретать синюю окраску при взаимодействии с йодом. Крахмал, который подвергся гидролизу под действием амилазы, при нанесении йода не

окрашивается в синий цвет, т.к. с продуктами его гидролиза, которыми являются простые сахара, такого окрашивания не происходит.

Вырезки из пятен мекония и кала с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4-8°. На предметные стекла слоем толщиной 1 мм наносили расплавленный 2% крахмально-агаровый гель (2,0 г картофельного крахмала и 1,0 г агара растворяли при нагревании в 100 мл физиологического раствора), в котором после застывания делали отверстия диаметром 5 мм и вносили в них вытяжки из исследуемых образцов мекония и кала. Параллельно, в качестве контроля в отдельные лунки вносили заведомую амилазу (слюну в разведении 1:500). Препараты во влажных камерах помещали на 2 часа в термостат при температуре 37°. С целью повышения чувствительности опыта, использовали 1% крахмально-агаровый гель (1,0 г агара, 1,0 г крахмала, 100,0 мл дистиллированной воды). По истечении указанного времени стекла извлекали из термостата и окрашивали раствором Люголя. Результаты оценивали визуально. При появлении обесцвеченных участков геля вокруг лунок с исследуемыми объектами, свидетельствующими о гидролизе крахмала, реакция на наличие амилазы считалась положительной.

### **2.2.3. Исследование активности трипсина методом субстратной пленки**

Для исследования активности трипсина в составе мекония и кала использовали метод субстратной пленки, модифицированный А.Л. Федоровцевым (2002) для выявления кишечного содержимого в следах на вещественных доказательствах. В качестве субстрата реакции используют желатину – гидролизированный коллаген, входящую в состав эмульсионного слоя фотопленки, которая при взаимодействии с вытяжками из объектов, содержащими трипсин, разрушается, а на пленке появляются прозрачные зоны.

Вырезки из пятен мекония и кала с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4-8°. На эмульсионный слой засвеченной, проявленной, отфиксированной и промытой фотопленки ФТ-41 помещали кусочки

фильтровальной бумаги размерами 0,5x0,5 см, пропитанные фосфатным буфером с рН 8,0, на которые наклеивали вытяжки из исследуемых объектов и контрольный образец трипсина в разведении 1:1000. Фотопленку помещали во влажную камеру и в течение 2 и 4 часов инкубировали в термостате при температуре 37°. По истечении указанного времени, влажные камеры с исследуемыми объектами извлекали из термостата, фотоплёнку с нанесенными вытяжками промывали под струёй проточной воды, результаты оценивали визуально. При появлении участков просветления эмульсионного слоя фотопленки, свидетельствующих о гидролизе желатины, проба на наличие трипсина считалась положительной.

#### **2.2.4. Установление наличия желчных кислот модификацией реакции Петтенкофера**

Для установления наличия желчных кислот в составе мекония и кала использована модификация реакции Петтенкофера, предложенная Ревнитской Л.А. и соавт. (1988) как микрометод для выявления желчных кислот в следах-наложениях на орудиях травмы при ранениях желчного пузыря и печени. Реакция основана на том, что в присутствии концентрированной серной кислоты из фруктозы и её производных образуется гидроксиметилфурфурол, дающий с желчными кислотами красно-фиолетовую окраску.

Вырезки с марлевых тампонов из пятен мекония и кала размером 0,5x0,5 см заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4-8°. Затем, на предметное стекло помещали по капле вытяжки из пятна мекония и кала и, после высыхания, добавляли 1 каплю 10% раствора сахарозы и 5 капель концентрированной серной кислоты. Для контроля производили вырезки из пятен желчи размерами 0,5x0,5 см. Результаты реакции оценивали визуально. Реакция считалась положительной при появлении через несколько минут окрашивания вишневого цвета.

### **2.2.5. Метод спектрофотометрии**

Для исследования спектров поглощения видимого и ультрафиолетового света мекония и кала использовали метод спектрофотометрии. Детальная характеристика опытов и методики их проведения приводится в Главе 5.

### **2.2.6. Метод восходящей тонкослойной хроматографии**

Для исследования пигментного состава мекония и кала использован метод восходящей тонкослойной хроматографии. Детальная характеристика опытов и методики их проведения приводится в Главе 5.

## ГЛАВА 3

### ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО СОСТАВА МЕКОНИЯ И КАЛА

#### 3.1. Изучение морфологического состава мекония

С целью изучения морфологического состава мекония было исследовано 50 образцов мекония мертворожденных плодов сроком с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и 50 образцов мекония живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения от 3 суток до 2 лет. Образцы мекония были разделены на 5 групп (в зависимости от внутриутробного возраста – срока гестации): 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

Всего исследовано 400 микроскопических препаратов.

Микроскопические препараты исследовались методами световой и люминесцентной микроскопии.

Детальное описание методики находится в главе «Материалы и методы».

Макроскопически, содержимое дистальных отделов толстого кишечника мертворожденных плодов - нисходящей ободочной и сигмовидной, начиная с 20 недели внутриутробного развития, представляло собой кашицеобразную однородную массу темно-зеленого цвета без запаха. Высыхая, образовывало пятна темно-зеленого цвета. В тонком кишечнике и восходящей ободочной кишке содержимое кишечника имело темно-коричневый цвет с красноватым оттенком. Меконий живых новорожденных до 2-х суток после рождения представлял темно-зеленую субстанцию слизистой консистенции без запаха.

При обзорной микроскопии препаратов (об.20х, ок.10х), окрашенных 0,0005% раствором акрихина, начиная с 20 недели внутриутробного развития, обнаруживали безъядерные клетки полигональной формы, светящиеся зеленым

цветом (рис. 1), размерами от 10 до 40 мкм – клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи. Клетки в препаратах располагались по отдельности (20-40 в поле зрения) или в виде однослойных пластов, имеющих вид пластинок с плотно прилежащими друг к другу клетками и хорошо различимыми границами. При прицельной микроскопии клеток (об.40х, ок.10х), в центральной части некоторых из них определялись неинтенсивно окрашенные зоны округлой формы – места утраченных ядер. В цитоплазме были различимы тонкие разнонаправленные тяжи. При фазово-контрастной микроскопии неокрашенных препаратов клетки рогового слоя выглядели прозрачными или имели зеленоватый оттенок (рис. 2). При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю внутриутробного развития данные элементы были выявлены в 7 образцах; с 25 по 30 неделю – в 13; с 31 по 34 неделю внутриутробного развития – в 11 образцах; в группе 35-41 недель – в 19; при исследовании образцов мекония живых новорожденных клетки рогового слоя эпидермиса были выявлены в 50 образцах. Таким образом, частота встречаемости клеток рогового слоя эпидермиса в образцах мекония всех возрастных групп составила 100%. Данные, полученные нами, не совпадают с результатами, полученными при исследовании мекония И.В. Марковиным, М.А. Бронниковой, А.С. Гаркави – в ходе нашего исследования было установлено, что клетки рогового слоя кожи обнаруживаются в меконии с 20 недели внутриутробного развития, а по данным вышеуказанных авторов – начиная с 8 месяца.

При световой микроскопии неокрашенных препаратов обнаруживали единичные, не в каждом поле зрения, безъядерные образования овальной формы с ровными краями, размерами от 10 до 30 мкм, неинтенсивно окрашенные в коричневый и зеленый цвет – мекониевые тельца. При окраске препаратов 0,0005% раствором акрихина тельца приобретали ярко-зеленую однородную окраску (рис. 3). Мекониевые тельца обнаруживали во всех возрастных группах. При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю внутриутробного развития мекониевые тельца были выявлены при

исследовании 3-х образцов; с 25 по 30 неделю выявлены в 5 образцах; с 31 по 34 неделю внутриутробного развития – в 6 образцах; в группе с 35 по 41 неделю – в 9 образцах; при исследовании мекония живых новорожденных мекониевые тельца были выявлены в 26 образцах. Таким образом, частота обнаружения мекониевых телец составила около 50%. Отмеченные нами морфологические признаки, по данным И.В. Марковина, характерны для мекониевых телец, которые, по его наблюдениям, появляются на 4-5 месяце внутриутробного развития. По результатам нашего исследования, мекониевые тельца обнаруживались, начиная с 22 недели внутриутробного развития, что совпадает с данными, полученными И.В. Марковиным.

При световой микроскопии неокрашенных препаратов, начиная с 32 недели внутриутробного развития, обнаруживали единичные в поле зрения волосы, верхушка которых была игловидно истончена или зашлифована; корковое вещество содержало мелкозернистый пигмент в виде отдельных глыбок и нежных мазков, располагавшихся равномерно по всему волосу. Сердцевина у волос отсутствовала, рисунок кутикулы был простой, оптический край - ровным (рис. 4). Отмеченные морфологические особенности по данным Л.О. Барсегянц, М.Ф. Верещака характерны для пушковых волос. Пушковые волосы не были выявлены в группах с 20 по 30 неделю внутриутробного развития; в группе с 31 по 34 неделю были обнаружены в 4 из 11 образцов; с 35 по 41 неделю – в 7 из 19; при исследовании мекония живых новорожденных пушковые волосы были обнаружены в 16 образцах. Таким образом, пушковые волосы были обнаружены нами в 33% образцов мекония мертворожденных плодов с 31 по 41 неделю внутриутробного развития и образцах мекония живых новорожденных. В остальных возрастных группах они не были выявлены. Полученные нами результаты подтверждают данные И.В. Марковина о том, что пушковые волосы обнаруживают при микроскопическом исследовании мекония плодов, начиная с 8 месяца внутриутробного развития.

При окраске препаратов мекония раствором Люголя зерна крахмала и колонии йодофильной флоры не были выявлены ни в одном из препаратов.

Таким образом, при микроскопии мекония во всех возрастных группах обнаруживали клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи и мекониевые тельца. При микроскопии препаратов мекония, начиная с 32 недели внутриутробного развития, обнаруживали пушковые волосы.

С целью выявления зависимости между частотой обнаружения клеток рогового слоя эпидермиса кожи, мекониевых телец, пушковых волос и внутриутробным возрастом плодов и новорожденных использовались частотные таблицы сопряженности признаков, обрабатываемые с помощью критерия Пирсона (критерий  $\chi^2$ ).

Представим полученные нами данные в таблице сопряженности признаков:

Таблица 2 – Сопряженность признаков: внутриутробный возраст плодов и новорожденных и выявляемость морфологических элементов

Признак \ Срок гестации	Мертворожденные				Живые новорожденные
	20-24 нед.	25-30 нед.	31-34 нед.	35-41 нед.	
Клетки эпидермиса	7	13	11	19	50
Мекониевые тельца	3	5	6	9	26
Пушковые волосы	0	0	4	7	16

Для оценки связи между признаками формируем нулевую гипотезу (Но-гипотеза) – нет связи между признаками, что означает: «Выявляемость морфологических элементов не связана с внутриутробным возрастом плодов».

Метод Пирсона вычисляет статистику критерия  $\chi^2$  и её вероятность  $p$ , которая говорит о том, насколько справедливо предположение, что Но-гипотеза имеет место.

Если расчетная вероятность статистики критерия  $\chi^2$   $p < 0,05$  (или  $< 0,01$  или  $0,001$ ), Но-гипотеза отвергается на данном уровне значимости  $\alpha$  ( $\alpha = 0,05$  или  $0,01$ ).

или 0,001) и принимается гипотеза альтернативная  $H_1$  – есть связь между признаками.

Расчет значений критерия  $\chi^2$  и её вероятность  $p$  рассчитывали с помощью статистического пакета STADIA – 8.0.

При этом были получены следующие значения:  $\chi^2=6,58$  и  $p=0,582$ , т.е. Но-гипотеза должна быть принята – выявляемость морфологических элементов не связана с внутриутробным возрастом плодов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что частота встречаемости морфологических элементов мекония не зависит от внутриутробного возраста.

Таким образом, изучив морфологический состав мекония в следах на вещественных доказательствах, можно сделать следующие выводы:

-при исследовании морфологического состава мекония были выявлены клетки рогового слоя эпидермиса кожи, мекониевые тельца и пушковые волосы;

-клетки рогового слоя эпидермиса кожи были выявлены в 100% исследованных образцов;

-частота обнаружения мекониевых телец составила около 50%;

-пушковые волосы были выявлены в 33% образцов мекония плодов и новорожденных, начиная с 32 недели внутриутробного развития;

-при исследовании мекония не было выявлено связи между внутриутробным возрастом плодов и частотой выявления морфологических элементов.

Таким образом, морфологический состав мекония в следах на вещественных доказательствах довольно скуден. Установлено, что выявляемость морфологических элементов не зависит от внутриутробного возраста плодов.

Также, следует отметить, что частота встречаемости дифференцируемых элементов в препаратах была невысока, что затрудняет диагностику мекония и требует разработки более эффективных методов его обнаружения.

### 3.2. Изучение морфологического состава кала

С целью изучения морфологического состава кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет.

Макроскопически, цвет кала варьировал от светло-коричневого до темно-коричневого.

Всего исследовано 300 микроскопических препаратов.

Микроскопические препараты исследовались методами световой и люминесцентной микроскопии.

Детальное описание методики находится в главе «Материалы и методы».

При обзорной микроскопии неокрашенных препаратов (об.20х, ок.10х) основную массу кала представлял пищевой детрит в виде аморфной массы коричневого цвета, состоящей из недифференцируемых пищевых элементов, клеток кишечника и бактерий, утративших свою структуру.

Среди дифференцируемых элементов в неокрашенных препаратах кала обнаруживали гомогенные образования овальной формы со сглаженными углами и краями без поперечной исчерченности, с неразличимыми ядрами, окрашенные в светло-коричневый цвет, размерами от 30 до 50 мкм. Отмеченные морфологические особенности, по данным М.А. Бронниковой, А.С. Гаркави (1963), К.И. Хижняковой, Л.Н. Моралева (1986), Л.О. Барсегянц (1999), А.Л. Федоровцева и соавт. (2009), типичны для переваренных мышечных волокон, утративших поперечную исчерченность. Частота их встречаемости составила около 30%. Максимальное количество элементов, обнаруженных в одном препарате – 3. Кроме переваренных мышечных волокон обнаруживали полупереваренные и непереваренные. Полупереваренные мышечные волокна имели четкую цилиндрическую форму со слегка закругленными краями, местами с сохранившейся продольной и поперечной исчерченностью, длиной от 30 до 50 мкм (рис. 8); непереваренные имели более удлиненную цилиндрическую форму с хорошо выраженными прямыми углами и различной продольной и поперечной исчерченностью, что подтверждается данными

вышеуказанных авторов. Однако, частота встречаемости полупереваренных и непереваренных мышечных волокон еще меньше – они были обнаружены в 10% исследованных препаратов. Причем максимальное количество этих элементов не превышало 2-х в одном препарате.

При окраске препаратов раствором Люголя обнаруживали зерна крахмала в виде овальных образований сине-черного, фиолетового и красно-бурого цвета с четкими, ровными контурами, размерами от 5 до 10 мкм, которые располагались как внутри клеток перевариваемой клетчатки группами по 5-10 (рис. 5), так и внеклеточно (рис. 6). Частота встречаемости зерен крахмала составила около 30%. Максимальное количество в одном препарате – 4 группы внутриклеточных зерен крахмала. Также в 45% исследованных образцов были обнаружены крупные клетки перевариваемой растительной клетчатки (так называемые «мякотные» клетки) без зерен крахмала (рис. 7).

Кроме зерен крахмала и клеток перевариваемой растительной клетчатки, при световой и люминесцентной микроскопии обнаруживали элементы неперевариваемой клетчатки в виде спиралей – сосудов растений (рис. 9); «усиков» - волосков растений; пластов клеток с толстыми межклеточными оболочками (рис. 10) – неперевариваемая клетчатка фруктов, овощей и злаков. Элементы неперевариваемой растительной клетчатки были обнаружены в 40% исследованных образцов.

Также, при микроскопии препаратов, окрашенных раствором Люголя, обнаруживали колонии йодофильной флоры в виде палочек и кокков темно-коричневого и черного цветов. Частота их обнаружения составила около 20%.

Наличие внеклеточных и внутриклеточных зерен крахмала, элементов перевариваемой и неперевариваемой клетчатки, йодофильной флоры при исследовании следов кала, также было отмечено в работах М.А. Бронниковой, А.С. Гаркави (1963), А.Л. Федоровцева и соавт. (2009).

По данным А.Л. Федоровцева и соавт. (2009) при исследовании кала в следах на вещественных доказательствах обнаруживают клетки кубического многослойного плоского неороговевающего эпителия, происходящего из

дистального отдела прямой кишки, простейших и яйца гельминтов. В ходе нашего исследования эти элементы не были выявлены ни в одном из образцов. Эпителиоциты слизистой оболочки кишечника, упомянутые вышеуказанными авторами, также не были выявлены ни в одном из препаратов.

Также, в препаратах были обнаружены единичные в поле зрения клетки рогового слоя эпидермиса кожи, которые попали в препараты из внешней среды и не несут диагностического значения.

Таким образом, при микроскопии кала, основную массу составлял не дифференцируемый аморфный детрит, среди которого выявляли фрагменты переваренных и полупереваренных мышечных волокон, зерна вне- и внутриклеточного крахмала, элементы перевариваемой и неперевариваемой растительной клетчатки, йодофильную микрофлору в виде палочек и кокков. Частота встречаемости дифференцируемых элементов в препаратах кала была также невысока.

Следует отметить, что сроки хранения образцов мекония и кала не влияли на выявление дифференцируемых морфологических элементов.

На основании исследования морфологического состава мекония и кала можно сделать вывод о том, что обнаружение мекония может быть основано на выявлении «чешуек» эпидермиса, мекониевых телец и пушковых волос, а наличие кала подтверждает обнаружение мышечных волокон, перевариваемой и неперевариваемой клетчатки, крахмала и йодофильной флоры. Следовательно, дифференциальная диагностика этих выделений может быть основана на выявлении в меконии клеток рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи, мекониевых телец, и, начиная с 32 недели внутриутробного развития, пушковых волос, которые отсутствуют в кале. В то время как в кале, среди дифференцируемых элементов, обнаруживают фрагменты переваренных и полупереваренных мышечных волокон, зерна вне- и внутриклеточного крахмала, элементы перевариваемой и неперевариваемой растительной клетчатки и йодофильную микрофлору, отсутствующие в меконии.

Сравнительная характеристика морфологических элементов мекония и кала представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительная характеристика морфологических элементов мекония и кала

Морфологические элементы	Меконий плодов	Кал взрослых
Клетки рогового слоя эпидермиса кожи	+	+
	(20-40 в поле зрения)	(единичные в поле зрения)
Мекониевые тельца	+	-
Пушковые волосы	+	-
	(начиная с 32 недели)	
Мышечные волокна	-	+
Зерна крахмала (внеклеточный и внутриклеточный)	-	+
Перевариваемая растительная клетчатка	-	+
Неперевариваемая растительная клетчатка	-	+
Йодофильная флора	-	+

Таким образом, указанные выше особенности морфологического состава мекония и кала в следах на вещественных доказательствах могут быть использованы как для их обнаружения, так и при дифференциальной диагностике. Однако низкий процент обнаружения характерных морфологических элементов затрудняет этот процесс. Следовательно, возникает закономерная потребность в разработке более эффективных способов обнаружения мекония и кала в следах на вещественных доказательствах и их дифференциальной диагностики.

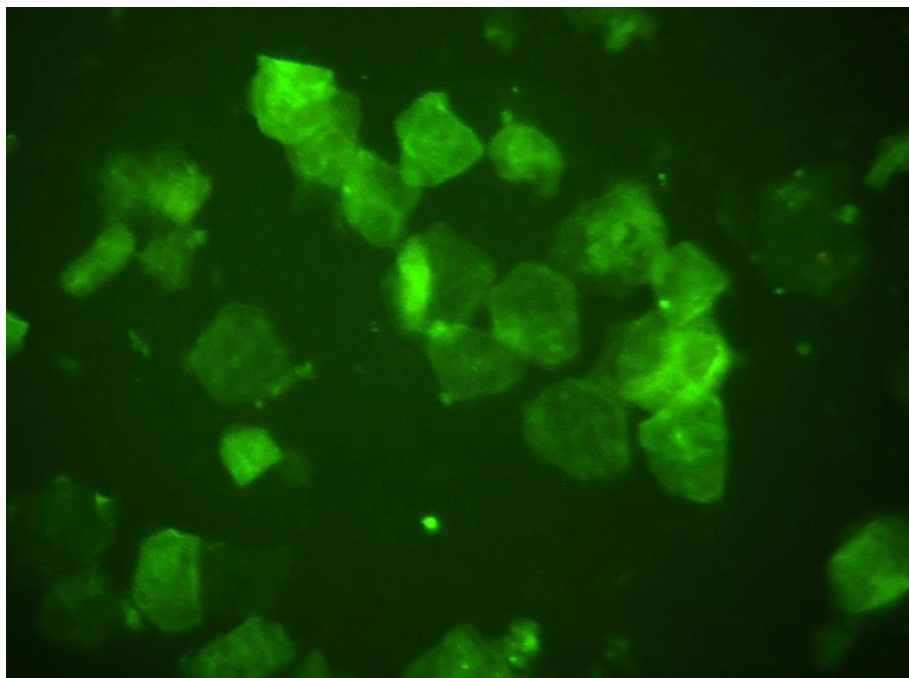


Рисунок 1 – Клетки рогового слоя эпидермиса кожи  
(окраска 0,0005% раствором акрихина, об.40х, ок.10х)

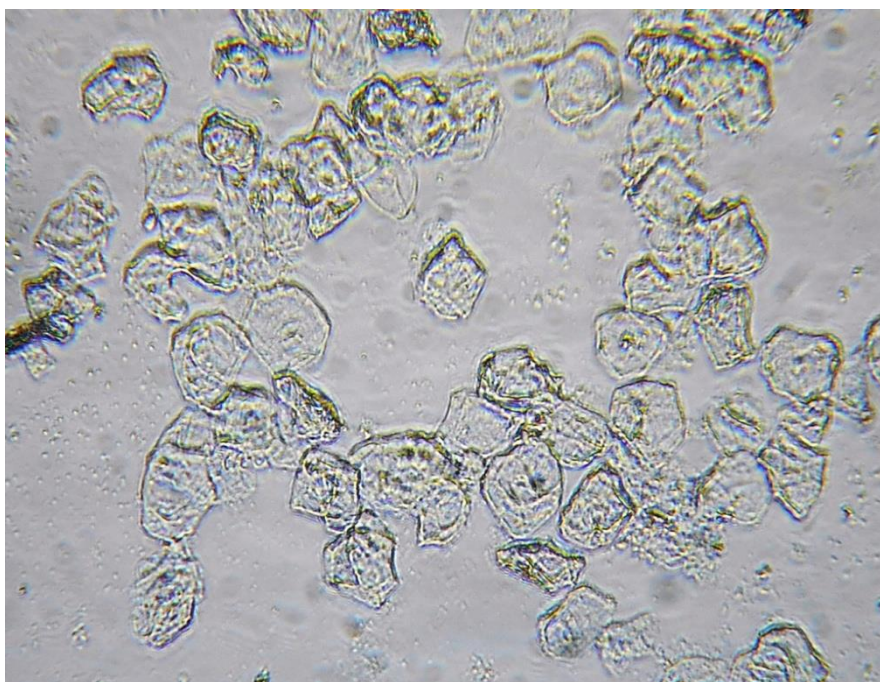


Рисунок 2 – Клетки рогового слоя эпидермиса кожи  
(фазово-контрастная микроскопия без окраски, об.40х, ок.10х)

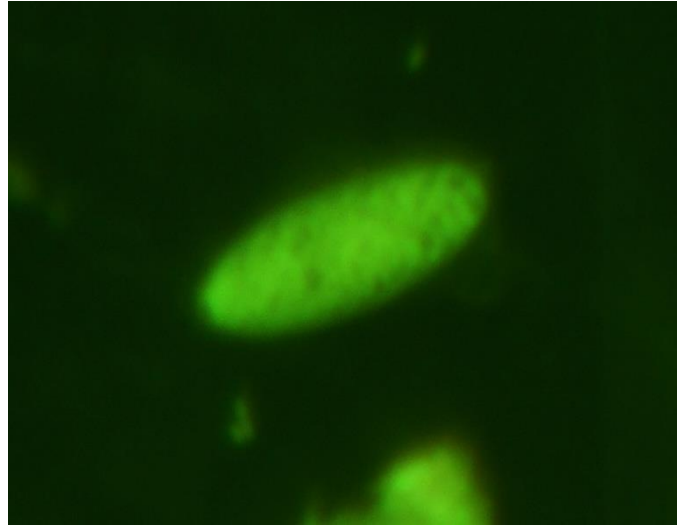


Рисунок 3 – Мекониевое тельце  
(окраска 0,0005% раствором акрихина, об.40х, ок.10х)



Рисунок 4 – Пушковый волос  
(световая микроскопия без окраски, об.20х, ок.10х)

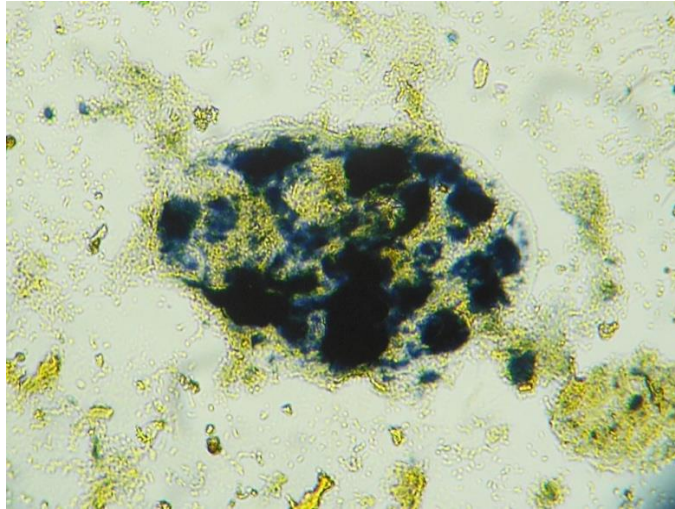


Рисунок 5 – Внутриклеточные зерна крахмала  
(окраска раствором Люголя, об.40х, ок.10х)

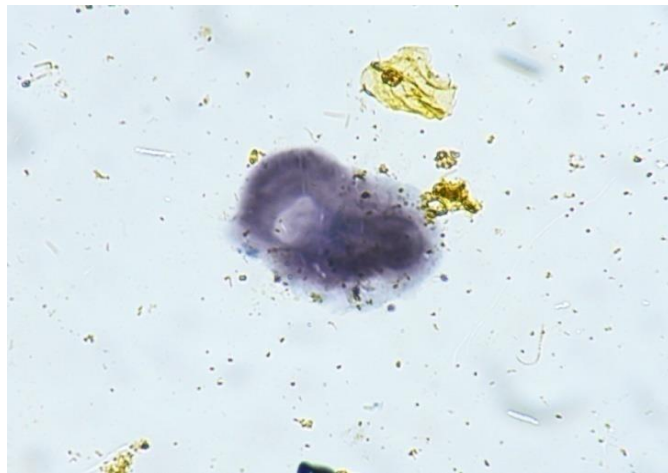


Рисунок 6 – Полупереваренное зерно крахмала  
(окраска раствором Люголя, об.40х, ок.10х)

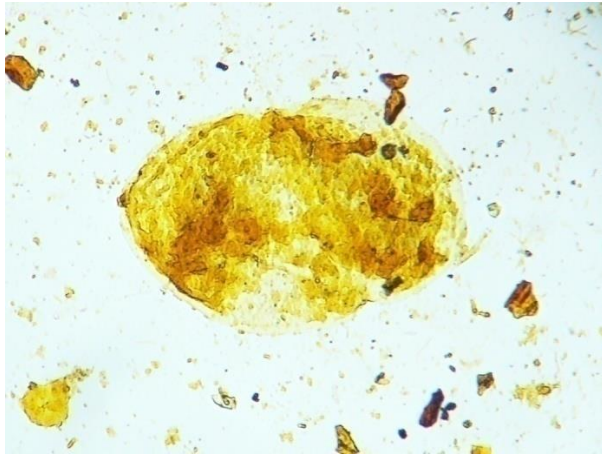


Рисунок 7 – Клетка перевариваемой растительной клетчатки  
(окраска раствором Люголя, об.40х, ок.10х)



Рисунок 8 – Фрагмент полупереваренного мышечного волокна  
на фоне аморфного детрита  
(окраска раствором Люголя, об.40х, ок.10х)

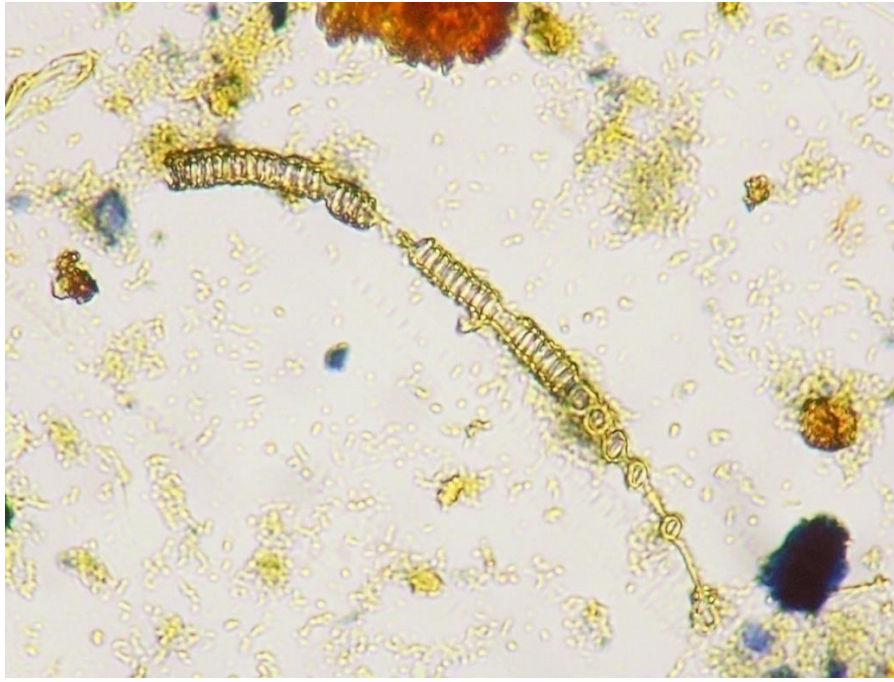


Рисунок 9 – Неперевариваемая растительная клетчатка в виде сосуда растения  
(световая микроскопия без окраски, об.40х, ок.10х)



Рисунок 10 – Неперевариваемая растительная клетчатка овощей  
(окраска раствором Люголя, об.20х, ок.10х)

## ГЛАВА 4

### ИЗУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА МЕКОНИЯ И КАЛА

#### 4.1. Исследование активности панкреатической амилазы

В ходе исследования была изучена активность панкреатической амилазы и трипсина мекония плодов и новорожденных и кала взрослых лиц.

Амилаза и трипсин вырабатываются клетками экзокринного аппарата поджелудочной железы и выделяются в просвет двенадцатиперстной кишки в составе панкреатического сока. В тонком кишечнике, под действием этих ферментов, происходит гидролиз пищевых веществ.

Панкреатическая  $\alpha$ -амилаза расщепляет полисахариды до ди- и моносахаридов, а именно гидролизует б-1,4-гликозидные связи в крахмале и декстринах, и сходна по своему действию с амилазой слюны.

С целью изучения активности панкреатической амилазы мекония плодов и новорожденных, а также кала взрослых лиц использовалась модификация методики, предложенная А.Л. Федоровцевым (1998) для выявления амилазы кишечного содержимого и слюны.

Детальное описание методики представлено в главе «Материалы и методы».

##### 4.1.1. Исследование активности панкреатической амилазы мекония

С целью изучения активности панкреатической амилазы мекония было исследовано 50 образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и 50 образцов мекония живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет. Образцы мекония были разделены на 5 групп (в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов): 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

Исследование активности панкреатической амилазы в следах проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала. В качестве контрольного образца использовали заведомую амилазу (слюну в разведении 1:500).

Всего проведено 400 экспериментов.

В первой серии опытов использовался 2% крахмально-агаровый гель. Результаты проведенных экспериментов изложены в таблице 4.

Таблица 4 – Изучение активности панкреатической амилазы мекония в 2% крахмально-агаровом геле

Срок гестации Давность хранения	20-24 недель	25-30 недель	31-34 недель	35-41 недель	1-2 суток после рождения	Контроль (амилаза)
3 суток	-	-	-	±	±	+
1 месяц	-	-	-	±	±	+
6 месяцев	-	-	-	±	±	+
1 год	-	-	-	±	±	+
2 года	-	-	-	±	±	+

Как видно из таблицы 4, при исследовании образцов мекония плодов с 20 по 34 неделю внутриутробного развития реакция на наличие амилазы в 2% крахмально-агаровом геле была отрицательной.

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 35 по 41 неделю внутриутробного развития, спустя 3-е суток после забора материала, в 10-ти образцах реакция на наличие амилазы была отрицательной, в 9-ти – положительной. Такие же результаты получены через 1 месяц, 6 месяцев, 1 и 2 года.

При исследовании образцов мекония живых новорожденных через 3-е суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года в 34 образцах реакция на наличие амилазы была положительной, в 16-ти – отрицательной.

С целью повышения чувствительности опыта в тех же группах использовался 1% крахмально-агаровый гель. Результаты проведенных экспериментов изложены в таблице 5.

Таблица 5 – Изучение активности панкреатической амилазы мекония в 1% крахмально-агаровом геле

Срок гестации Давность хранения	20-24 недель	25-30 недель	31-34 недель	35-41 недель	1-2 суток после рождения	Контроль (амилаза)
3 суток	-	-	±	±	±	+
1 месяц	-	-	±	±	±	+
6 месяцев	-	-	±	±	±	+
1 год	-	-	±	±	±	+
2 года	-	-	±	±	±	+

Как видно из таблицы 5, при исследовании образцов мекония плодов с 20 по 30 неделю внутриутробного развития реакция на наличие амилазы в 1% крахмально-агаровом геле была отрицательной.

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 31 по 41 неделю внутриутробного развития, спустя 3-е суток после забора материала, в 13-ти образцах реакция на наличие амилазы была отрицательной, в 17-ти – положительной. Такие же результаты получены через 1 месяц, 6 месяцев, 1 и 2 года.

При исследовании образцов мекония живых новорожденных через 3-е суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года в 40 образцах реакция на наличие амилазы была положительной, в 10-ти – отрицательной.

Сравнительные результаты пробы в 2% и 1% крахмально-агаровом геле отображены в рисунке 11.

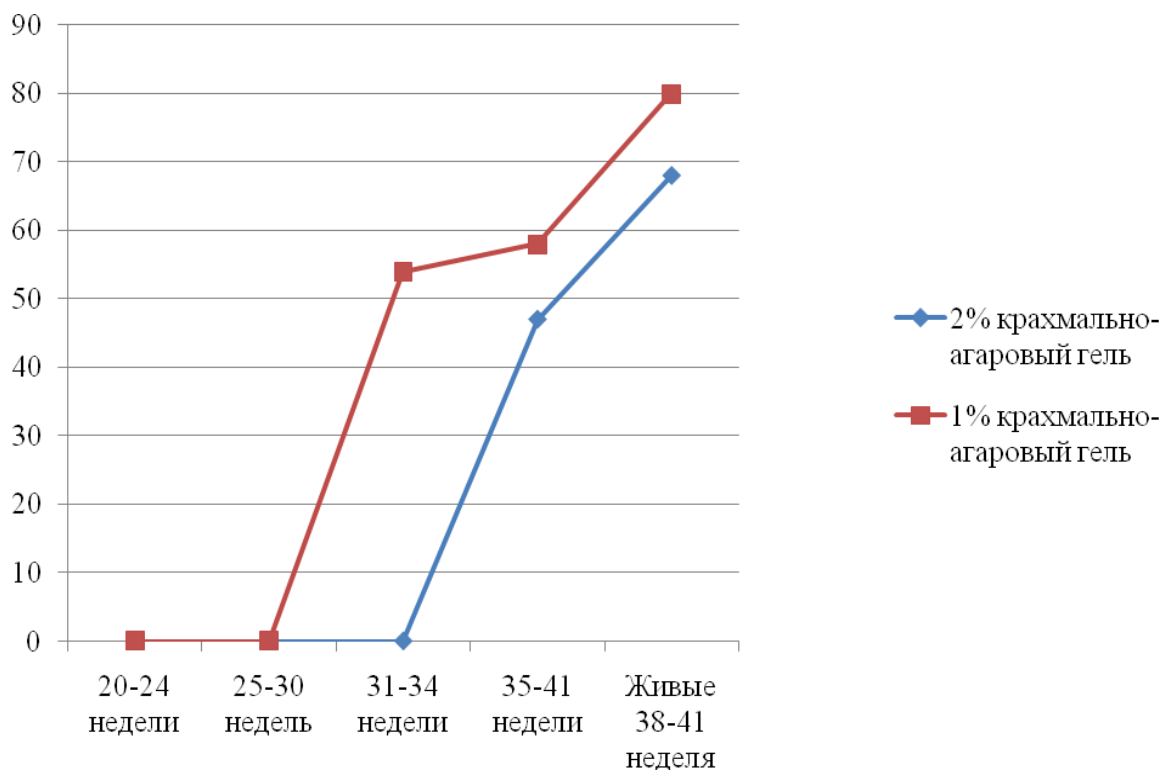


Рисунок 11 – Результаты пробы по исследованию активности амилазы мекония в 2% и 1% крахмально-агаровом геле (%)

Как видно из рисунка 11, при исследовании образцов мекония плодов с 31 по 34 неделю появились положительные результаты пробы в 50% исследованных образцов; с 35 по 41 неделю – с 47% до 58%; а при исследовании образцов мекония живых новорожденных увеличилось с 68 до 80%. Однако, в образцах мекония плодов с 20 по 30 неделю внутриутробного развития проба была отрицательной в обеих сериях опыта.

Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что с увеличением внутриутробного возраста плодов, количество положительных результатов пробы увеличивалось, и, при уменьшении концентрации крахмала в составе крахмально-агарового геля количество положительных результатов возрастало.

#### 4.1.2. Исследование активности панкреатической амилазы кала

Исследование активности панкреатической амилазы кала взрослых проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала. В качестве контрольного образца использовали заведомую амилазу (слюну в разведении 1:500). Исследование проводилось в 2% крахмально-агаровом геле.

Всего проведено 200 экспериментов.

При исследовании образцов кала взрослых лиц с давностью хранения от 3 суток до 2 лет реакция на наличие амилазы в 2% крахмально-агаровом геле была положительной во всех экспериментах (рис. 12).

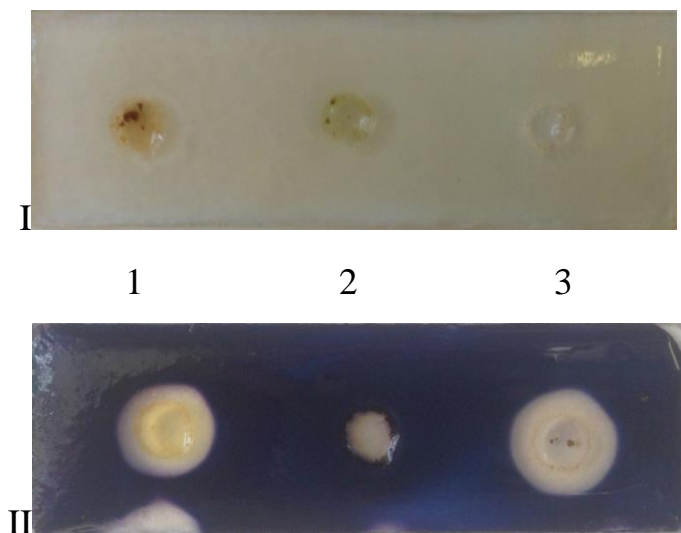


Рисунок 12 – Исследование активности панкреатической амилазы мекония и кала в 2% крахмально-агаровом геле (I – до нанесения раствора Люголя, II – после нанесения раствора Люголя; 1 – образец кала, 2 – образец мекония; 3 – образец амилазы (контроль))

Таким образом, при исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 30 неделю внутриутробного развития с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет в 2% и 1% крахмально-агаровом геле реакция на наличие амилазы была отрицательной. При исследовании образцов мекония

мертвоорожденных плодов с 31 по 34 неделю внутриутробного развития в 2% крахмально-агаровом геле реакция на наличие амилазы была отрицательной; в 1% крахмально-агаровом геле – в 5 образцах получены отрицательные результаты, в 6-ти образцах проба была положительной. При исследовании образцов мекония мертвоорожденных плодов с 35 по 41 неделю внутриутробного развития в 2% крахмально-агаровом геле реакция на наличие амилазы была положительной в 9 образцах; в 1% крахмально-агаровом геле – в 11 образцах. При исследовании образцов мекония живых новорожденных в 2% крахмально-агаровом геле в 34 образцах реакция на наличие амилазы была положительной, в 16-ти – отрицательной; при исследовании активности амилазы в 1% крахмально-агаровом геле – в 40 образцах реакция на наличие амилазы была положительной, в 10-ти – отрицательной.

При исследовании образцов кала взрослых лиц реакция на наличие амилазы была положительной во всех образцах.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что:

-проба на наличие амилазы с образцами мекония давала как положительные, так и отрицательные результаты.

-положительные результаты пробы при исследовании образцов мекония наблюдали на протяжении всего срока наблюдений.

-количество положительных проб возрастало с увеличением внутриутробного возраста.

-при уменьшении концентрации крахмала в составе крахмально-агарового геля количество положительных результатов увеличивалось.

-при исследовании всех образцов кала проба на наличие амилазы была положительной независимо от сроков хранения образцов.

Таким образом, проба по выявлению амилазы в крахмально-агаровом геле может быть использована как этап комплексной диагностики кала в следах на вещественных доказательствах. Однако, данный способ не может быть использован при дифференциальной диагностике мекония и кала, т.к. и при исследовании мекония проба тоже дает положительные результаты.

## 4.2. Исследование активности трипсина

Трипсин, как и панкреатическая  $\alpha$ -амилаза, продуцируется панкреатоцитами ацинусов и выделяется через панкреатический проток в просвет двенадцатиперстной кишки в виде неактивного профермента – трипсиногена, который активируется самим трипсином и энтерокиназой, вырабатываемой клетками слизистой оболочки кишечника. Трипсин – основной протеолитический фермент поджелудочной железы.

С целью изучения активности трипсина мекония плодов и новорожденных, а также кала взрослых лиц использовали метод субстратной пленки, модифицированный А.Л. Федоровцевым (2002) для выявления трипсина в следах-наложениях на орудиях травмы при ранениях кишечника.

Детальное описание методики представлено в главе «Материалы и методы».

### 4.2.1. Исследование активности трипсина мекония

С целью изучения активности трипсина мекония было исследовано 50 образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и 50 образцов мекония живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития, со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет.

Образцы мекония были разделены на 5 групп (в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов): 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных. Исследование активности трипсина проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала. В качестве контроля использовали образец трипсина в разведении 1:1000.

Всего проведено 400 экспериментов.

В первой серии опытов исследуемые образцы инкубировали в течение 2 часов. Результаты проведенных экспериментов изложены в таблице 6.

Таблица 6 – Изучение активности трипсина мекония. Время инкубации – 2 часа

Срок гестации / Давность хранения	20-24 недель	25-30 недель	31-34 недель	35-41 недель	1-2 суток после рождения	Контроль (трипсин)
3 суток	-	-	±	±	±	+
1 месяц	-	-	±	±	±	+
6 месяцев	-	-	±	±	±	+
1 год	-	-	±	±	±	+
2 года	-	-	±	±	±	+

Как видно из таблицы 6, реакция на наличие трипсина при времени инкубации 2 часа с образцами мекония плодов с 20 по 30 неделю внутриутробного развития была отрицательной.

При исследовании 2-х образцов мекония мертворожденных плодов с 31 по 34 неделю внутриутробного развития через 3-е суток после забора материала проба на наличие трипсина была положительной; 9-ти – отрицательной.

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 35 по 41 неделю внутриутробного развития, спустя 3-е суток после забора материала, в 8 образцах реакция на наличие трипсина была положительной, в 11-ти – отрицательной.

Такие же результаты получены через 1 месяц, 6 месяцев, 1 и 2 года.

При исследовании образцов мекония живых новорожденных через 3-е суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года в 30-ти образцах реакция на наличие трипсина была положительной, в 20-ти – отрицательной.

С целью повышения эффективности метода, увеличили время инкубации до 4 часов. Результаты проведенных экспериментов изложены в таблице 7.

Таблица 7 – Изучение активности трипсина мекония. Время инкубации – 4 часа

Срок гестации Давность хранения	20-24 недель	25-30 недель	31-34 недель	35-41 недель	1-2 суток после рождения	Контроль (трипсин)
3 суток	-	±	±	±	±	+
1 месяц	-	±	±	±	±	+
6 месяцев	-	±	±	±	±	+
1 год	-	±	±	±	±	+
2 года	-	±	±	±	±	+

Как видно из таблицы 7, реакция на наличие трипсина при времени инкубации 4 часа с образцами мекония плодов с 20 по 24 неделю внутриутробного развития была отрицательной.

При исследовании 1 образца мекония мертворожденного плода со сроком внутриутробной жизни 25-26 недель реакция на наличие трипсина была положительной спустя 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала.

В группе с 31 по 34 неделю реакция на наличие трипсина была положительной в 4-х образцах мекония, в остальных - отрицательная.

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 35 по 41 неделю внутриутробного развития, спустя 3-е суток после забора материала, в 12-ти образцах реакция на наличие трипсина была положительной, в 7 – отрицательной.

При исследовании образцов мекония живых новорожденных через 3-е суток в 36 образцах реакция на наличие трипсина была положительной, в 14-ти – отрицательной.

Такие же результаты получены через 1 месяц, 6 месяцев, 1 и 2 года.

Сравнительные результаты пробы на наличие трипсина при времени инкубации 2 и 4 часа отображены в рисунке 13.

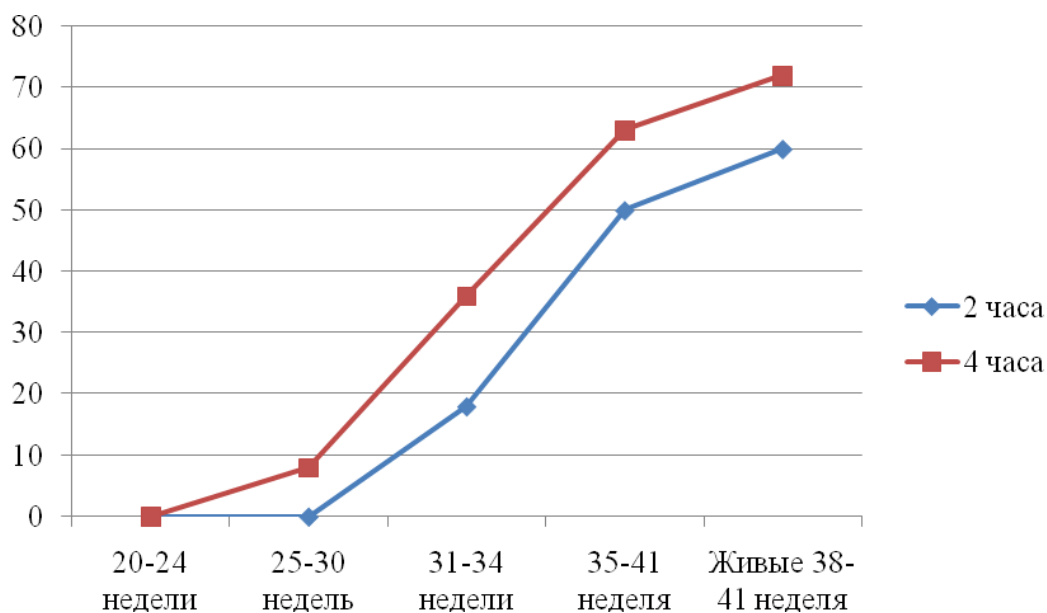


Рисунок 13 – Результаты пробы по исследованию активности трипсина мекония при времени инкубации 2 и 4 часа (%)

Как видно из рисунка 13, при увеличении времени инкубации с 2-х до 4-х часов появились положительные результаты пробы в группе с 25 по 30 неделю; в группе с 31 по 34 неделю число положительных результатов возросло с 18% до 36%; с 35 по 41 неделю увеличилось на 13%, а при исследовании образцов мекония живых новорожденных – на 12%. Однако, в группе 20-24 недель проба была отрицательной в обеих сериях опыта.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что с увеличением внутриутробного возраста плодов количество положительных проб на трипсин в меконии увеличивается. Кроме этого, при увеличении времени инкубации количество положительных результатов тоже возрастает.

#### 4.2.2. Исследование активности трипсина кала

С целью изучения активности трипсина кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет.

Исследование активности трипсина проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала. В качестве контроля использовали образец трипсина в разведении 1:1000.

Всего проведено 200 экспериментов.

При этом получены следующие результаты: при исследовании образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет реакция на наличие трипсина была положительной во всех экспериментах (рис. 14).

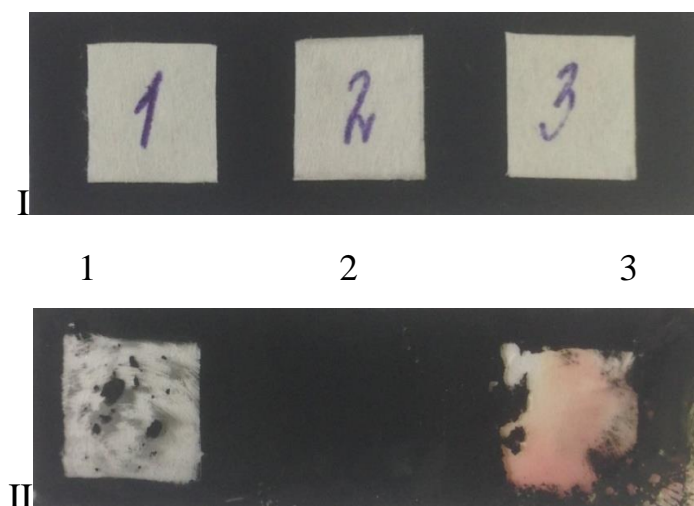


Рисунок 14 – Исследование активности трипсина методом субстратной пленки (I – до реакции, II – после реакции; 1 – образец кала, 2 – образец мекония; 3 – образец трипсина в разведении 1:1000 (контроль))

Таким образом, при исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю внутриутробного развития проба на наличие трипсина была отрицательной при времени инкубации 2 и 4 часа. При исследовании 13-ти образцов мекония мертворожденных плодов на сроке 25-30 недель при времени инкубации 2 часа реакция на наличие трипсина была отрицательной во всех

образцах; при увеличении времени инкубации до 4-х часов получен положительный результат с 1-м образцом мекония плода со сроком 25-26 недель. При исследовании 19-ти образцов мекония плодов на 35-41 неделе при времени инкубации 2 часа реакция на наличие трипсина была положительной в 8-ми образцах; при времени инкубации 4 часа – в 12-ти. При исследовании 50 образцов мекония живых новорожденных при сроке инкубации 2 и 4 часа реакция на наличие трипсина была положительной в 30 и 36 образцах, соответственно. Положительные результаты проб наблюдали через 3 суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала.

При исследовании образцов кала взрослых лиц реакция на наличие трипсина была положительной во всех образцах.

Таким образом, на основании проведенных исследований, можно сделать следующие выводы:

-при исследовании образцов мекония проба на наличие трипсина давала как положительные, так и отрицательные результаты.

-положительные результаты пробы при исследовании образцов мекония наблюдали на протяжении всего срока наблюдений.

-при увеличении внутриутробного возраста плодов количество положительных проб увеличивалось.

-при увеличении времени инкубации с 2-х до 4-х часов число положительных проб возрастало.

-при исследовании всех образцов кала реакция на наличие трипсина была положительной на протяжении всего срока наблюдений.

Таким образом, проба по выявлению трипсина методом субстратной пленки может быть использована как этап комплексной диагностики кала в следах на вещественных доказательствах, наряду с тестом на наличие амилазы. Однако, данный способ не может быть использован при дифференциальной диагностике мекония и кала, т.к. и при исследовании мекония проба тоже дает положительные результаты.

Однако, нельзя не упомянуть, что данная проба, также как и проба на наличие амилазы носит качественный характер, и не дает сведений о количественном содержании фермента, что ограничивает возможности данных способов.

### **4.3. Исследование по выявлению желчных кислот**

Первичные желчные кислоты (холевая и хенодезоксихолевая) синтезируются в печени из холестерина. В физиологических условиях свободные желчные кислоты практически не встречаются и секретируются преимущественно в виде конъюгатов с глицином и таурином. В кишечнике, под действием микробной флоры, из первичных желчных кислот образуются вторичные – дезоксихолевая и литохолевая, которые реабсорбируются в дистальном отделе тонкой кишки и по системе портальной вены попадают в печень, где практически полностью реабсорбируются [Силаева С.А., 2008].

С целью выявления желчных кислот мекония плодов и кала взрослых использована модификация реакции Петтенкофера, предложенная Л.А. Ревнитской, М.Ш. Кольш (1988) для обнаружения желчных кислот в следах-наложениях на орудиях травмы при ранениях печени и желчного пузыря.

Детальное описание методики приведено в главе «Материалы и методы».

#### **4.3.1. Выявление желчных кислот в меконии**

С целью выявления желчных кислот мекония было исследовано 100 образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития, со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет. Образцы мекония были разделены на 5 групп, в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов: 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

Всего проведено 100 экспериментов.

Для выявления желчных кислот кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет.

Всего проведено 50 экспериментов.

Исследование по выявлению желчных кислот проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала. В качестве контроля использовали вырезки из пятен желчи. Результаты проведенных экспериментов изложены в таблице 8.

Таблица 8 – Выявление желчных кислот мекония и кала

Образцы Давность хранения	Меконий мертворожденных				Меконий живых новорожденных	Кал	Контроль (желчь)
	Срок гестации						
	20-24 недель	25-30 недель	31-34 недель	35-41 недель			
3 суток	±	±	±	±	±	-	+
1 месяц	±	±	±	±	±	-	+
6 месяцев	±	±	±	±	±	-	+
1 год	±	±	±	±	±	-	+
2 года	±	±	±	±	±	-	+

Как видно из таблицы 8, реакция на наличие желчных кислот с образцами кала была отрицательной во всех экспериментах, а с образцами мекония давала как положительные, так и отрицательные результаты.

Необходимо также упомянуть, что проба на наличие желчных кислот носит сугубо субъективный характер, т.к. оценка результатов данной пробы проводится путем визуального наблюдения за изменением цвета раствора – положительным считается результат, при котором его цвет меняется до малинового (рис.15).

Так, при исследовании образцов мекония, получены как положительные, отрицательные (когда цвет раствора не изменился), так и сомнительные

результаты, когда окраска раствора изменилась до красно-коричневой или зелено-коричневой.

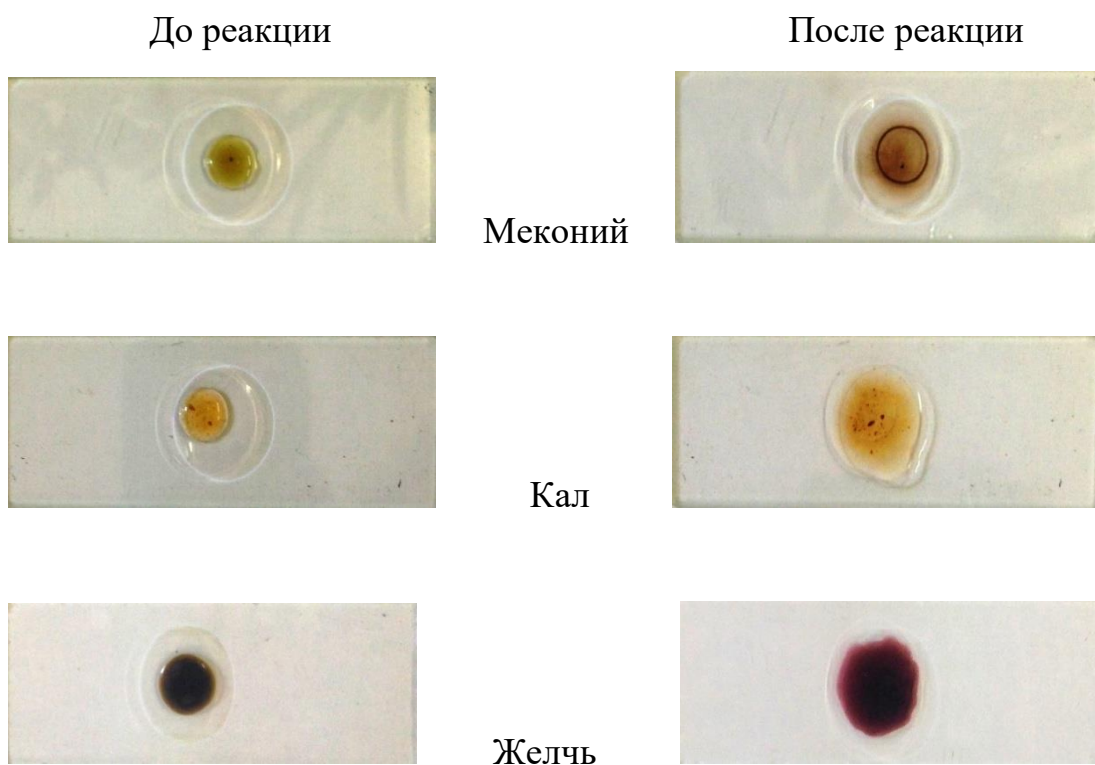


Рисунок 15 – Исследование по выявлению желчных кислот мекония и кала модификацией реакции Петтенкофера

Процентное соотношение положительных, отрицательных и сомнительных результатов на наличие желчных кислот в образцах мекония отражено в рис. 16.

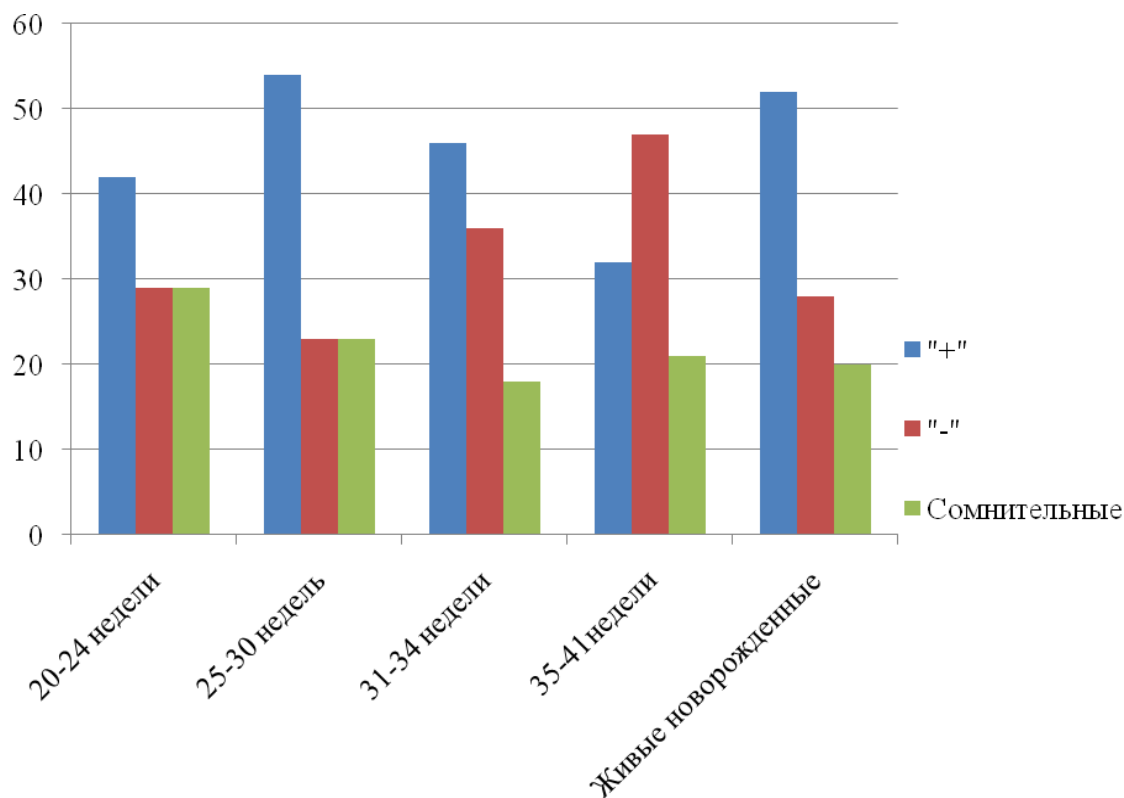


Рисунок 16 – Выявление желчных кислот в образцах мекония (%)

Как видно из рисунка 16, положительные результаты пробы составили около 50% в каждой возрастной группе. Процент отрицательных результатов находился в границе от 23% в группе 25-30 недель до 47% в группе 35-41 недели. При этом были получены и сомнительные результаты, доля которых составила около 1/3 во всех исследуемых образцах.

С целью выявления зависимости между частотой выявления желчных кислот и внутриутробным возрастом плодов и новорожденных использовались частотные таблицы сопряженности признаков, обрабатываемые с помощью критерия Пирсона (критерий  $\chi^2$ ).

Для оценки связи между признаками формируем нулевую гипотезу (Нуль-гипотеза) – нет связи между признаками, что означает: «Выявляемость желчных кислот не связана с внутриутробным возрастом плодов».

Представим полученные нами данные в таблице сопряженности признаков:

Таблица 9 – Сопряженность признаков: внутриутробный возраст плодов и новорожденных и выявляемость желчных кислот.

Реакция на наличие желчных кислот	Срок гестации	Мертворожденные				Живые норожден- ные
		20-24 нед.	25-30 нед.	31-34 нед.	35-41 нед.	
«+»		3	7	5	6	26
«-»		2	3	4	9	14

При этом были получены следующие значения:  $\chi^2=3,39$  и  $p=0,496$ . Так как  $p \gg 0,05$ , Но-гипотеза не отвергается, что означает: выявляемость желчных кислот не связана с внутриутробным возрастом плодов.

Таким образом, в ходе исследования, установлено, что при исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития, со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет проба на наличие желчных кислот давала как положительные, так отрицательные и сомнительные результаты.

Кроме этого, в ходе исследования не было выявлено зависимости между частотой выявления желчных кислот ни внутриутробным возрастом плодов, ни с давностью хранения материала.

#### 4.3.2. Выявление желчных кислот в кале

При исследовании образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет реакция была отрицательной во всех экспериментах.

На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

-при выявлении желчных кислот в образцах мекония плодов и новорожденных с давностью хранения от 3 суток до 2 лет были получены положительные, отрицательные и сомнительные результаты.

-при исследовании образцов мекония не было выявлено корреляции полученных результатов ни с внутриутробным возрастом плодов, ни с давностью хранения материала.

-с образцами кала реакция на наличие желчных кислот была отрицательной во всех экспериментах.

Подводя итог, следует сказать, что проба на наличие желчных кислот модификацией реакции Петтенкофера не может быть использована при дифференциальной диагностике мекония и кала, т.к. с образцами мекония дает как положительные, так и отрицательные результаты.

Также, следует подчеркнуть, что данная проба носит сугубо субъективный характер, т.к. оценка результатов проводится путем визуального наблюдения за изменением цвета раствора, что резко ограничивает возможности данного способа.

## ГЛАВА 5

### ИЗУЧЕНИЕ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА МЕКОНИЯ И КАЛА

Известно, что у взрослых лиц билирубин выделяется в составе желчи в виде диглюкоронида (75%) и моноглюкоронида (25%) билирубина. В свою очередь, неконъюгированный билирубин реабсорбируется в кишечнике и по системе воротной вены снова попадает в печень, где подвергается конъюгации. Под влиянием кишечной флоры конъюгированный билирубин превращается в бесцветный уробилиноген и затем в стеркобилиноген-стеркобилин, который придает калу характерную коричневую окраску. Однако, следует отметить, что стеркобилин в кале может отсутствовать при обтурации желчных протоков желчными камнями и опухолями головки поджелудочной железы. При этом кал выглядит бесцветным. Также, при кишечных диспепсиях, сопровождающихся развитием дисбактериоза, в кале взрослых может содержаться билирубин. Таким образом, основным желчным пигментом кала взрослых в норме, является стеркобилин.

Меконий же содержит небольшое количество уробилина и значительное количество неконъюгированного билирубина [Дашишев В.В., 2006; Соколов В.Н., 2019; Aziz S., 1995, 2001, 2005]. Это обусловлено тем, что кишечник плодов и новорожденных первых дней жизни полностью не заселен микрофлорой и стеркобилин не образуется. Кроме этого, во внутриутробном развитии билирубин практически не подвергается конъюгации, в связи с отсутствием в печени плода лигандина и Z-протеина, которые обеспечивают захват билирубина гепатоцитами, а также угнетением активности ферментов уридиндифосфогидрогеназы и глюкоронил-трансферазы гормонами беременных. Кроме этого, в кишечнике плодов и новорожденных повышена активность фермента  $\beta$ -глюкоронидазы, который отщепляет от прямого билирубина глюкуроновую кислоту и превращает его в неконъюгированный

билирубин. При этом часть свободного билирубина реабсорбируется в тонком кишечнике. Далее, с развитием микрофлоры кишечника, к 7-9 месяцам жизни ребёнка, билирубин полностью переходит в стеркобилин.

Таким образом, кал взрослых в норме содержит стеркобилин, который отсутствует в меконии, в свою очередь, основным пигментом мекония является билирубин, который отсутствует в кале взрослых.

С целью обнаружения желчных пигментов мекония и кала в следах на вещественных доказательствах нами были выбраны методы восходящей тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии, которые отличаются доступностью оборудования и реактивов, точностью, простотой и быстротой проведения анализа.

### **5.1. Изучение пигментного состава мекония и кала методом спектрофотометрии**

Молекулярно-абсорбционный спектральный анализ основан на измерении ослабления светового потока, происходящего вследствие избирательного поглощения света анализируемым веществом (системой). Его проводят с помощью прибора – спектрофотометра в видимой ( $\lambda=380-760$  нм), ультрафиолетовой ( $\lambda=200-380$  нм) и инфракрасной ( $\lambda=760-1100$  нм) областях спектра [Елисеев А.А., 2000; Чакчир Б.А., 2002].

Свойство атомов и молекул поглощать свет с определенной длиной волны, характерной для данного вещества, широко используется в медицине и фармации для качественных и количественных исследований. Измерение спектров поглощения позволяет судить о химическом составе вещества и его состоянии в биологических структурах. Обычно спектр поглощения выражают в виде графической зависимости оптической плотности от длины волны падающего света.

Преимуществами спектральных методов являются достоверность, информативность, быстрота проведения анализа, возможность автоматизации измерений, наличие разнообразных методов математической обработки

результатов [Илларионова Е.А., 2013; Черданцева Е.В. и соавт., 2015; Gore M., 2000].

Наиболее распространенным применением спектрофотометра в судебной экспертизе на сегодняшний день является определение гемоглобина и его производных, лекарственных средств, ядовитых и наркотических веществ [Муртазина Н.Р., 2006].

С целью изучения спектров поглощения мекония было изучено 50 образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и 50 образцов мекония живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития, со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет.

Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

С целью изучения спектров поглощения кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет. Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Вырезки с марлевых тампонов из пятен мекония и кала размерами 0,5x0,5 см заливали 2,0 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°, затем центрифугировали в течение 4-5 мин при 1500 об/мин и фильтровали через фильтровальную бумагу.

Для исследования использовали спектрофотометр СФ-2000 со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нМ под управлением внешнего персонального компьютера типа IBM PC с программным обеспечением СФ-2000. Измерения производились в спектральном диапазоне от 300 до 700 нМ с шагом 1 нМ.

Вытяжки из исследуемых объектов помещали в кюветы спектрофотометра с толщиной поглощающего слоя 1 см и исследовали в режиме «Сканирование». В качестве контроля использовали физиологический раствор, которым производилось экстрагирование объектов.

Результаты получали в виде графиков и автоматически производили поиск экстремумов (пиков поглощения). Всего проведено 300 экспериментов.

При этом получены следующие результаты:

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 дней до 2 лет максимумы поглощения зарегистрированы при длинах волн  $332,42 \pm 2,05$  нМ и  $399,84 \pm 2,6$  нМ.

При исследовании образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет максимум поглощения зарегистрирован при длине волны  $498,0 \pm 2,65$  нМ (рис. 17).

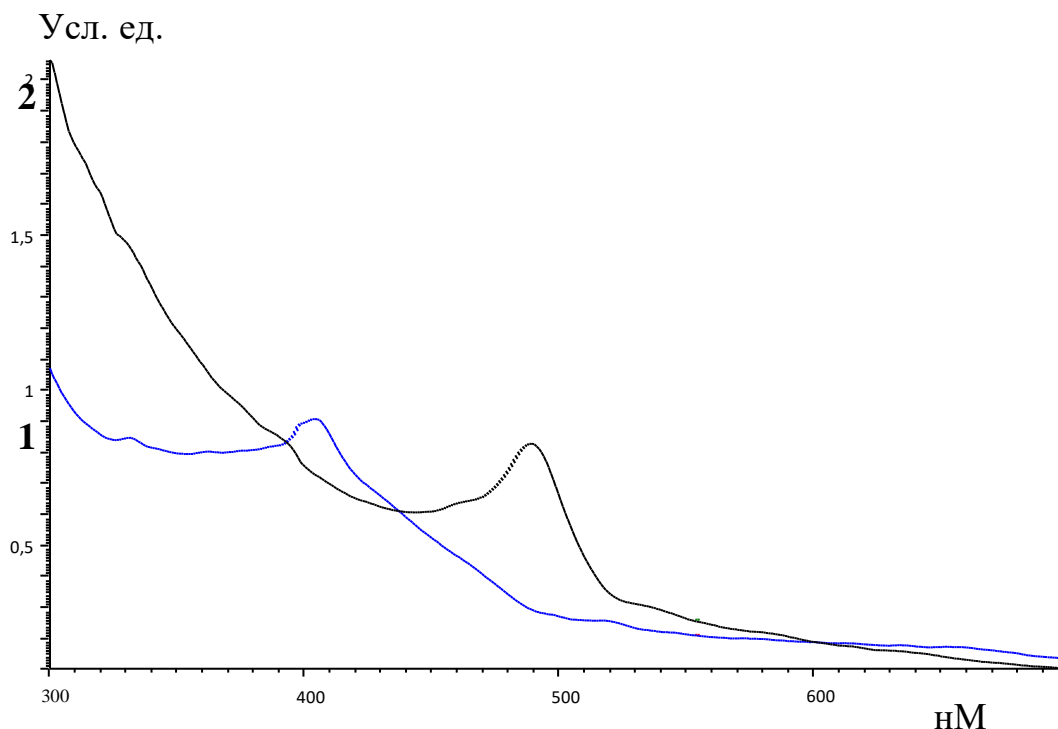


Рисунок 17 – Результат спектрофотометрии образца мекония и кала

1 – образец кала; 2 – образец мекония

С целью поиска различий между спектрами поглощения мекония и кала производилось сплошное статистическое исследование зарегистрированных пиков поглощения.

Были исследованы следующие количественные признаки:

$X_1$  – первый пик поглощения мекония;

$X_2$  – второй пик поглощения мекония;

$X_3$  – пик поглощения кала.

Обработка данных производилась с помощью статистического пакета STADIA – 8.0.

Изучаемые количественные признаки ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ) исследовались на близость к нормальному распределению (распределению Гаусса).

Анализ показал, что распределение признаков отлично от нормального, поэтому сравнение данных выполнялось с помощью непараметрических методов статистики; т.к. изучаемые выборки являются непарными, то сравнение выполнялось с помощью критериев Вилкоксона и Ван дер Вардена.

Формулируем нулевую Но-гипотезу – нет различий между пиками поглощения мекония и кала.

Для исследуемых количественных признаков были выполнены расчеты описательных статистик (среднее  $M$ , среднеквадратическое отклонение  $\delta$ , ошибка выборочного среднего  $m$ , медиана  $Me$  и межквартильный размах), эти значения и результат анализа распределения приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Описательные статистики сравниваемых признаков

Обозначение признака	Среднее $M$	$\delta$	$m$	$Me$	Межквартильный размах	Распределение
$X_1$	332,42	$\pm 2,05$	0,29	330	331-334	$\neq N$
$X_2$	399,84	$\pm 2,06$	0,37	400	398-402	$\neq N$
$X_3$	498,0	$\pm 2,65$	0,38	500	496-500	$\neq N$

Результаты сравнения выборок приведены в следующей таблице 11.

Таблица 11 – Результат сравнения выборок

Сравниваемые признаки	Различие	Уровень значимости $\alpha$	Различие
$X_1 - X_2$	есть	$\ll 0,001$	в медианах
$X_2 - X_3$	есть	$\ll 0,001$	в медианах

Таким образом, при данном уровне значимости  $\alpha \ll 0,001$  Но-гипотеза отвергается и принимается гипотеза альтернативная  $H_1$  – есть различия между сравниваемыми признаками.

Таким образом, можно утверждать о наличии статистически значимых различий между спектрами поглощения мекония и кала.

Таким образом, установлено, что при исследовании образцов мекония плодов и новорожденных методом спектрофотометрии максимумы поглощения зарегистрированы при длинах волн  $332,42 \pm 2,05$  и  $399,84 \pm 2,6$  нМ, а в образцах кала взрослых лиц максимум поглощения наблюдался при длине волны  $498,0 \pm 2,65$  нМ. Отмеченное свидетельствует о том, что для каждого из этих выделений имеются характерные спектры поглощения видимого и ультрафиолетового цвета.

На основе данного метода был разработан способ установления мекония и/или кала в следах на вещественных доказательствах [Патент РФ на изобретение №2646813 от 07.03.2018].

Учитывая вышесказанное, можно сделать вывод, что определение спектров поглощения ультрафиолетового и видимого света меконием и калом может быть использовано как в качестве способа их обнаружения, так и для дифференциации данных выделений.

## **5.2. Изучение пигментного состава мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии**

Тонкослойная хроматография является экспресс-методом анализа химических соединений различных классов. Она широко используется в фармации, медицине, токсикологических исследованиях и других областях.

Этот метод отличается простотой, экономичностью, доступностью оборудования и гибкостью, позволяющей легко модифицировать его в соответствии с поставленной задачей [Сумина Е.Г., 2012; Умарова З.Х.А. и соавт., 2019].

Суть метода заключается в том, что на хроматографическую пластину со слоем сорбента наносят анализируемый раствор и помещают в

хроматографическую камеру с растворителем, который под действием капиллярных сил, разделяет исследуемый раствор на компоненты. Окрашенные вещества не требуют специального обнаружения, бесцветные пятна делают видимыми, опрыскивая хроматограммы соответствующим реагентом-обнаружителем. Положение зоны вещества на хроматограмме характеризуется величиной  $R_f$ , которая равна отношению расстояния, пройденного исследуемым веществом к расстоянию, пройденному растворителем.

В судебной биологии методом восходящей тонкослойной хроматографии устанавливают наличие крови, пота, мочи [Барсегянц Л.О., Кинле А.Ф., 2008].

В настоящее время для установления наличия крови используют метод восходящей тонкослойной хроматографии на слое силикагеля в системе растворителей *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в соотношении 4:1:2. Метод основан на обнаружении гемоглобина, который содержится только в эритроцитах. Для его детектирования используют 10% спиртовой раствор бензидина с ледяной уксусной кислотой в соотношении 10:1 и 3% раствор перекиси водорода. Гемоглобин, обладая пероксидазной активностью, разлагает перекись водорода с образованием атомарного кислорода, который окисляет бензидин. При этом участок хроматограммы, содержащий гемоглобин, окрашивается в интенсивный синий цвет. В качестве контроля используют заведомую кровь. Наличие крови в исследуемом объекте считается доказанным при появлении синего окрашивания на одном уровне с заведомой кровью [Кузьмина Л.А. и соавт., 2010].

Установление наличия пота основано на обнаружении аминокислоты серина. В качестве растворителя тоже используют систему *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в соотношении 4:1:2, а выявление осуществляется 1% спиртовым раствором нингидрина – реагентом, специфичным для аминокислот. В качестве контроля используют заведомый пот. При наличии пота в исследуемом материале на хроматограмме образуется зона красно-фиолетового цвета на одном уровне с заведомым образцом пота [Кузьмина Л.А. и соавт., 2010].

Доказательство наличия мочи в исследуемом пятне основано на выявлении мочевины. Элюирование проводят в системе *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – дистиллированная вода в соотношении 4:1:2, а детектирование 10% раствором парадиметилбензальдегида в концентрированной соляной кислоте. Наличие мочи считают доказанным при появлении зоны желтого цвета на одном уровне с контрольным образцом мочи.

По аналогии с вышеописанными способами мы поставили перед собой задачу – разработать способы установления наличия мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии, основанные на особенностях их пигментного состава.

В клинической биохимии, еще в середине прошлого века, были разработаны способы установления наличия желчных пигментов в желчи, крови, моче методом тонкослойной хроматографии.

E. Demole (1958) хроматографировал биливердин и билирубин на слоях кремниевой кислоты смесью бензол-этилацетат-этанол (90:20:7,5) при длине пути элюирования 5,4 см и получил  $R_f$  0,06 и 0,92 соответственно.

R. Tenhunen (1963) для идентификации билирубина в биологических жидкостях (желчи, крови, моче) использовал хроматографические пластины со слоем силикагеля. Желчные пигменты превращал в азопроизводные, которые очищал петролейным эфиром от избытка желчных кислот. Для разделения он использовал две системы растворителей: метилэтилкетон – пропионовая кислота – вода (10:2,5:2,5), которая разделяет желчные пигменты на четыре фракции: фракция I ( $R_f$  0,57) – свободный билирубин; фракция II ( $R_f$  0,37) соответствует моноглюкорониду билирубина; фракция III ( $R_f$  0,20) – диглюкорониду билирубина и фракция IV ( $R_f$  0,09) соответствует билирубинсульфату. Вторая система растворителей – *n*-бутанол – ацетон – пропионовая кислота – вода (7:4:3:3), которая также разделяет желчные пигменты на четыре фракции со следующими значениями  $R_f$ : I – 0,70, II – 0,58, III – 0,43, IV – 0,20. Биливердин в обеих системах имеет  $R_f$  0,72-0,80.

J. Fever et al. (1968) для разделения диазотированных производных желчных пигментов использовали пластины со слоем силикагеля и системой растворителей хлороформ – уксусная кислота (100:3).

J. Jacobsen (1969) определял азопроизводные после разделения на слое силикагеля в смеси метилэтилкетон – пропионовая кислота – вода (15:5:6).

R.P.H. Thompson, A.F. Hofmann (1973) хроматографировали исследуемые образцы желчи на пластинах со слоем силикагеля в системе 88% фенол – вода (41:9) при pH 4,6 в темноте при комнатной температуре. После разделения, вещества обнаруживали на дневном свете в виде желтых или зеленых пятен или при ультрафиолетовом свете после опрыскивания насыщенным раствором уксуснокислого цинка в метаноле и 0,006% раствором йода в метаноле (образуются пятна с красной и желтой флуоресценцией). Диазоположительные производные обнаруживали, опрыскивая перед нагреванием свежеприготовленным диазореактивом. Желчные пигменты имели следующие значения Rf: билирубин – 0,70-0,85, биливердин – 0,60, уробилин – 0,60, моноглюкоронид билирубина – 0,38, диглюкоронид билирубина – 0,24.

В число других растворителей, применявшихся для разделения билирубина и его производных на силикагеле, входят следующие смеси: хлороформ – этилацетат (5:3) [Kuenzle C.S., Reuttner J.R., 1970], хлороформ – метанол – муравьиная кислота (60:30:1) и метилацетат – метилпропиловый эфир – тетрахлорид углерода – дихлорметан (1:1:1:1) [Berry C.S., 1972]. Этерифицированные образцы разделяли на силикагеле смесями бензол – этанол (25:2) и хлороформ – этанол (50:1) [Petryka Z.J., 1970].

Способы обнаружения желчных пигментов, предложенные вышеуказанными авторами, мы применили и в ходе нашего исследования. Их результаты будут изложены ниже.

С целью изучения пигментного состава кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет.

Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Всего выполнено 400 экспериментов.

Для этого вырезки с марлевых тампонов из пятен кала размерами 0,5x0,5 см экстрагировали в 0,5 мл физиологического раствора в течение 24 часов при температуре 4°. Для хроматографирования использовали хроматографические пластины со слоем сорбента в виде закрепленного силикагеля (ПТСХ-АФ-В) размерами 10,0x10,0 см. На хроматографической пластине скальпелем размечали полосы шириной 2,0 см. На линию старта, отступя 1,5 см от нижнего края хроматографической пластины, на слой силикагеля, легко касаясь его поверхности, наносили капилляром с ровным концом каплю вытяжки из исследуемого объекта и подсушивали её при комнатной температуре. С целью насыщения на образовавшееся пятно помещали вторую каплю и снова подсушивали. В хроматографическую камеру, которая представляет стеклянную прямоугольную банку, наливали растворитель, так, чтобы высота его в камере не превышала 1,0 см. Пластины с нанесенными на нее вытяжками помещали в камеру так, чтобы растворитель не соприкасался с линией старта. Камеру накрывали стеклянной крышкой. Когда растворитель достигал верхнего края пластины, её извлекали из камеры и черным графитовым карандашом отмечали уровень растворителя – линию финиша.

В качестве растворителей использовали следующие системы: бензол – этанол (25:2), *n*-бутанол – дистиллированная вода – ледяная уксусная кислота (4:1:2), бензол – этилацетат – этанол (90:20:7,5), хлороформ – этанол (50:1), хлороформ – уксусная кислота (100:3).

В системах хлороформ – этанол (50:1), бензол – этанол (25:2) результаты были отрицательными – отсутствие видимых при дневном свете окрашенных участков на хроматограммах. Учитывая, что основным пигментом кала является стеркобилин и, допуская, что он может не иметь видимой окраски на хроматограмме, пластины обрабатывали 10% спиртовым раствором уксуснокислого цинка и 1% спиртовым раствором йода, результат оценивали в

ультрафиолетовом цвете с помощью ультрафиолетовой лампы в темном помещении. Данная реакция основана на способности цинковой соли уробилиноидов (в том числе стеркобилина) давать флуоресценцию – проба, предложенная W. Schlesinger (1903). Однако, результат реакции был отрицательным – отсутствие видимых полос на хроматограммах.

В системах n-бутанол – дистиллированная вода – ледяная уксусная кислота (4:1:2), хлороформ – уксусная кислота (100:3) и бензол – этилацетат – этанол (90:20:7,5) получены положительные результаты – появление полос оранжевого цвета на хроматограммах. Для последующей работы нами была выбрана система n-бутанол – дистиллированная вода – ледяная уксусная кислота (4:1:2), т.к. она более доступна в условиях работы судебно-биологического отделения.

Для подтверждения наличия стеркобилина в исследуемых участках на хроматограммах, использовали унифицированную бензальдегидную пробу О. Нейбауэра (1903), основанную на том, что уробилиногеновые тела, в том числе стеркобилин, с парадиметилбензальдегидом (реактив Эрлиха) образуют соединение красной окраски. С этой целью после элюирования пластину помещали в термостат на 2-3 минуты при температуре 50-52° и проявляли реактивом Эрлиха (10% раствор парадиметилбензальдегида в концентрированной соляной кислоте). Затем снова, в вертикальном положении, помещали в термостат на 2-3 минуты при температуре 50-52°. При этом оранжевые полосы на хроматограммах окрашивались в красный цвет (рис. 18), что подтверждает факт наличия стеркобилина в исследуемых участках на хроматограммах.

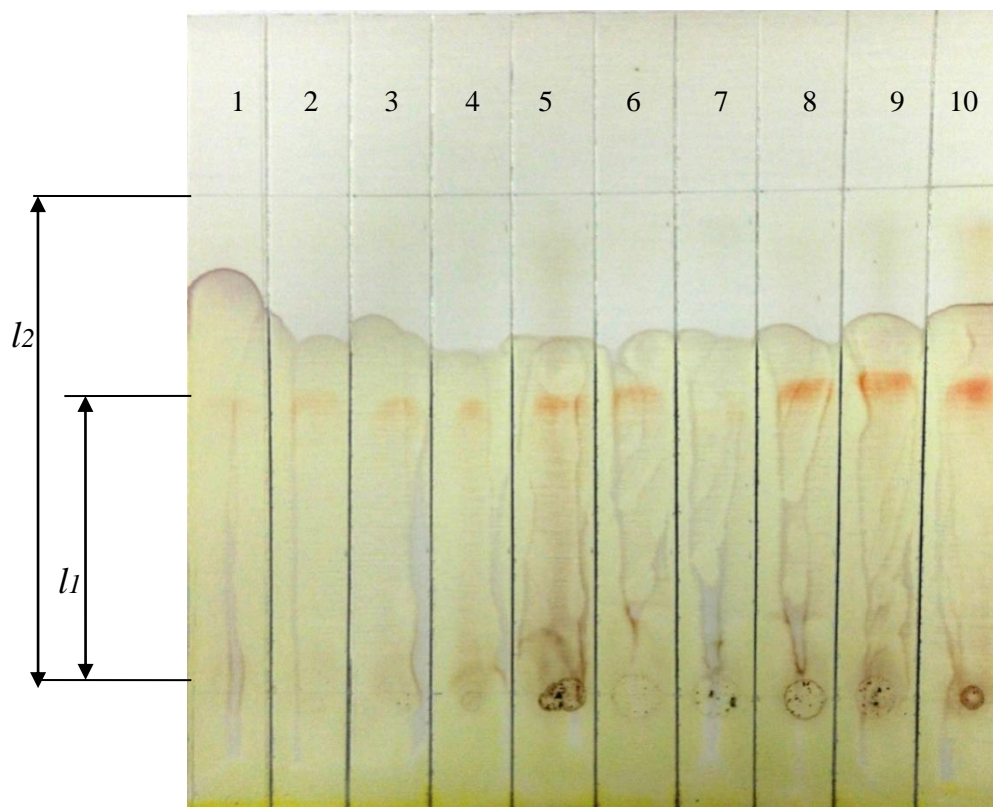


Рисунок 18 – Хроматограмма с образцами кала, проявленная реактивом Эрлиха:

$l_1$  – расстояние между центром пятна вещества и стартом;

$l_2$  – расстояние между фронтом растворителя и стартом.

Для каждого образца рассчитывали  $R_f$ .

$$R_f = \frac{l_1}{l_2}$$

$l_1$  – расстояние между центром пятна вещества и стартом;  $l_2$  – расстояние между фронтом растворителя и стартом.

При этом получены следующие результаты: при хроматографировании 50 образцов кала взрослых лиц с давностью хранения от 3 суток до 2 лет в системе растворителей бензол – дистиллированная вода – ледяная уксусная кислота (4:1:2) наблюдали появление полос оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха приобретали красную окраску, что свидетельствует о наличии уробилиновых тел (стеркобилина).

На основе данного метода был разработан способ установления кала в следах на вещественных доказательствах [Патент РФ на изобретение №2691727 от 18.06.2019 г.]

С целью изучения пигментного состава мекония было изучено 100 образцов мекония мертворожденных плодов сроком с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет. Образцы мекония были разделены на 5 групп, в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов: 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Всего проведено 200 экспериментов.

Вырезки с марлевых тампонов из пятен мекония размерами 0,5x0,5 см заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°. Для хроматографирования использовали хроматографические пластины со слоем сорбента в виде закрепленного силикагеля (ПТСХ-АФ-В) размерами 10,0x10,0 см. На хроматографической бумаге скальпелем размечали полосы шириной 2,0 см. На линию старта, отступя 1,5 см от нижнего края хроматографической пластины на слой силикагеля, легко касаясь его поверхности, наносили капилляром с ровным концом каплю вытяжки из исследуемого объекта и подсушивали её при комнатной температуре. С целью насыщения на образовавшееся пятно помещали вторую каплю и снова подсушивали. В хроматографическую камеру наливали растворитель, так, чтобы высота его в камере не превышала 1,0 см. Пластины с нанесенными на нее вытяжками помещали в камеру так, чтобы растворитель не соприкасался с линией старта. Камеру накрывали стеклянной крышкой. Когда растворитель достигал верхнего края пластины, её извлекали из камеры и черным графитовым карандашом отмечали уровень растворителя – линию финиша.

В качестве растворителей использовали следующие системы: хлороформ – уксусная кислота (100:3), бензол-этилацетат-этанол (90:20:7,5), бензол – этанол (25:2), хлороформ – этанол (50:1), n-бутанол – дистиллированная вода – ледяная уксусная кислота (4:1:2).

В системах бензол-этилацетат-этанол (90:20:7,5), бензол – этанол (25:2), хлороформ – этанол (50:1) не наблюдали появление окрашенных зон на хроматограмме.

Учитывая, что основным пигментом мекония является билирубин, для его обнаружения пластины перед нагреванием опрыскивали свежеприготовленным diazo-реактивом. Принцип реакции состоит в том, что прямой билирубин, при взаимодействии с diazo-реактивом, образует соединение красно-фиолетового цвета. Для приготовления diazo-реактива I, 1 г сульфаниловой кислоты растворяли при нагревании в 80 мл воды, затем прибавляли 3 мл концентрированной соляной кислоты. После растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения, раствор доливали до 200 мл. Для приготовления diazo-реактива II, 0,1 г нитрита натрия растворяли в 20 мл воды. Перед работой смешивали 10 мл diazo-реактива I и diazo-реактива II. При учете результатов окрашенных зон на хроматограммах не наблюдали.

Также проводили элюирование образцов мекония в системах хлороформ – уксусная кислота (100:3), n-бутанол – дистиллированная вода – ледяная уксусная кислота (4:1:2). В части образцов наблюдали появление полос зеленого цвета на хроматограммах с  $R_f=0,82-0,84$ . При этом, корреляции положительных результатов с внутриутробным возрастом плодов и давностью хранения материала не выявили. Для детектирования прямого билирубина эти хроматограммы также опрыскивали свежеприготовленным diazo-реактивом. При этом, не наблюдали изменения окраски зеленых полос. Кроме уже имевшихся полос других не появилось.

Таким образом, в результате исследования, был разработан способ установления наличия кала методом восходящей тонкослойной хроматографии, основанный на выявлении желчного пигмента – стеркобилина. Данный способ

отличается доступностью, быстротой и простотой выполнения. С образцами мекония проба была отрицательной – отсутствие красных полос на хроматограммах с  $R_f=0,55-0,6$  после их обработки реактивом Эрлиха.

Следовательно, данный признак может быть использован при дифференциальной диагностике мекония и кала.

### **5.2.1. Изучение влияния крайних температур на выявление стеркобилина кала**

В связи с тем, что находясь во внешней среде, кал в следах на вещественных доказательствах подвергается воздействию физических факторов, в том числе крайних температур, на наш взгляд, целесообразно изучить их влияние на выявляемость стеркобилина кала.

Так, при попытке сокрытия следов преступления путем их сожжения, в том числе в очагах пожаров, кал в следах на вещественных доказательствах может подвергаться действию высоких температур.

С целью изучения действия высоких температур на выявление стеркобилина кала вырезки из пятен кала с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см помещали на 2 часа в сухожаровой шкаф при температуре +100°. После извлечения вырезки заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°. Затем вытяжки наносили на линию старта хроматографической пластины ПТСХ-АФ-В, элюировали в системе растворителей n-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) и проявляли реактивом Эрлиха. Детальное описание методики находится в Подразделе 5.2.

С этой целью исследовано 20 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет.

Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Всего проведено 50 экспериментов.

Результаты проведенных экспериментов отображены в таблице 12.

Таблица 12 – Изучение влияния крайних температур на выявление стеркобилина кала

Фактор Давность хранения	+100° в течение 2 часов	-15° в течение 1 суток
3 суток	+	+
1 месяц	+	+
6 месяцев	+	+
1 год	+	+
2 года	+	+

Как видно из таблицы 12, при хроматографировании 20 образцов кала взрослых лиц с давностью хранения от 3 суток до 2 лет в системе растворителей *n*-бутанол - дистиллированная вода - ледяная уксусная кислота (4:1:2) наблюдали появление полос оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха приобретали красную окраску, что свидетельствует о наличии уробилиновых тел (стеркобилина).

Также, находясь во внешней среде, кал в следах на вещественных доказательствах, может подвергаться и действию отрицательных температур, что не редкость в умеренном климатическом поясе.

С целью изучения действия низких температур на выявление стеркобилина кала вырезки из пятен кала с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см выдерживали в морозильной камере бытового холодильника при температуре -15° в течение 1 суток. После извлечения вырезки заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°. Затем вытяжки наносили на линию старта хроматографической пластины ПТСХ-АФ-В, элюировали в системе растворителей *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) и обрабатывали реактивом Эрлиха. Детальное описание методики находится в Подразделе 5.2.

С этой целью исследовано 20 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет.

Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Всего проведено 50 экспериментов.

Результаты проведенных экспериментов отображены в таблице 10.

Как видно из таблицы 10, при хроматографировании 20 образцов кала взрослых лиц с давностью хранения от 3 суток до 2 лет в системе растворителей n-бутанол - дистиллированная вода - ледяная уксусная кислота (4:1:2) наблюдали появление полос оранжевого цвета при  $R_f = 0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха приобретали красную окраску, что свидетельствует о наличии уробилиновых тел (стеркобилина).

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что воздействие температуры  $+100^\circ$  в течение 2 часов и  $-15^\circ$  в течение 1 суток не влияет на выявление стеркобилина кала.

### **5.2.2. Изучение влияния процессов гниения на выявление стеркобилина кала**

При проведении судебно-биологических экспертиз эксперты нередко сталкиваются с тем, что биологические следы на вещественных доказательствах подвергаются гниению. Это возникает в случаях, если исследуемый материал находился в благоприятных для гниения условиях, в том числе при несоблюдении правил его изъятия, упаковки, хранения и транспортировки.

Таким образом, на наш взгляд, целесообразным было исследование влияния процессов гниения на выявление стеркобилина кала.

С целью изучения действия процессов гниения на выявление стеркобилина кала вырезки из пятен кала с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см помещали во влажные камеры при комнатной температуре, где созданы благоприятные условия для гниения, и исследовали методом восходящей тонкослойной хроматографии через 1, 2, 3, 4 и 5 суток. При этом отмечено, что на 4-5-е сутки на образцах кала появлялись колонии плесневых грибов зеленого,

оранжевого и белого цветов. После извлечения из влажной камеры вырезки заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°. Затем вытяжки наносили на линию старта хроматографической пластины ПТСХ-АФ-В, элюировали в системе растворителей n-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) и обрабатывали реактивом Эрлиха. Детальное описание методики находится в Подразделе 5.2.

С этой целью исследовано 10 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет.

Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Всего проведено 50 экспериментов.

Результаты проведенных экспериментов отображены в таблице 13.

Таблица 13 – Изучение влияния процессов гниения на выявление стеркобилина кала

Количество суток / Давность хранения	1 сутки	2 суток	3 суток	4 суток	5 суток
3 суток	+	+	±	-	-
1 месяц	+	+	±	-	-
6 месяцев	+	+	±	-	-
1 год	+	+	±	-	-
2 года	+	+	±	-	-

Как видно из таблицы 13, при хроматографировании 10 образцов кала взрослых лиц с давностью хранения от 3 суток до 2 лет в системе растворителей n-бутанол - дистиллированная вода - ледяная уксусная кислота (4:1:2) после нахождения в течение 1-х и 2-х суток во влажных камерах реакция на наличие стеркобилина была положительной - наблюдали появление полос оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха приобретали

красную окраску, что свидетельствует о наличии уробилиновых тел (стеркобилина). При исследовании тех же образцов после нахождения их во влажных камерах в течение 3-х суток результаты реакции были сомнительными – на хроматограммах появлялись едва заметные полосы оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ , а спустя 4 и 5 суток реакция на наличие стеркобилина кала была отрицательной – отсутствие полос оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ .

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что процессы гниения влияют на выявление стеркобилина кала.

### 5.2.3. Изучение чувствительности метода

С целью изучения чувствительности метода вырезки из пятен кала с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см взвешивали на электронных весах.

Всего проведено 30 экспериментов. Масса вырезок составила  $33,9 \pm 1,43$  мг. Отдельно взвешивали чистую марлю, на которую производился забор исследуемых образцов кала, размерами 0,5x0,5 см. Ее масса составила  $4 \pm 2$  мг. Затем рассчитывали среднюю массу сухого вещества (кала):

$$m_{\text{ср. сухого вещества}} = \frac{(m_1 + m_2 + \dots + m_{30}) - (n_1 + n_2 + \dots + n_{30})}{30},$$

где  $m_{1-30}$  – масса вырезок из пятен кала с марлевых тампонов;  $n_{1-30}$  – масса чистой марли, на которую производился забор образцов кала.

Таким образом, средняя масса сухого вещества (кала) в исследуемых вырезках составила  $29,8 \pm 1,4$  мг.

Взвешенную вырезку помещали в пробирку №1, заливали 0,2 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре  $4^\circ$ . После этого, исследуемый образец разводили в 2, 4, 8, 16, 32 и 64 раза. Для этого, в пять пустых пробирок вносили по 0,2 мл физиологического раствора и маркировали их 2, 4, 8, 16, 32 и 64 соответственно разведениям. Из пробирки 1, дозатором забирали 0,2 мл вытяжки и переносили её в пробирку 2, смешивали растворы в пробирке и переносили 0,2 мл получившегося раствора в пробирку 4. Аналогичным образом 0,2 мл раствора переносили в пробирку 8; из 8 в 16, из 16 в 32 и из 32 в 64. Из пробирки 64 0,2 мл физиологического раствора

сбрасывали, чтобы в каждой пробирке был равный объем – 0,2 мл. При этом, путем кратного разведения, концентрация исследуемого вещества в каждой следующей пробирке снижалась в геометрической прогрессии. Если изначально средняя масса кала в вырезках составляла  $29,8 \pm 1,4$  мг, то после кратного разведения, уменьшилась соответственно в 2, 4, 8, 16, 32 и 64 раза.

После этого, полученные растворы из пробирок 1, 2, 4, 8, 16, 32 и 64 переносили в полном объеме (0,2 мл) на линию старта хроматографической пластины ПТСХ-АФ-В, элюировали в системе растворителей n-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) и обрабатывали реактивом Эрлиха. Детальное описание методики находится в Подразделе 5.2.

При этом получены следующие результаты:

Максимальное разведение, при котором результат реакции был положительным (появление полос оранжевого цвета при  $R_f = 0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха приобретали красную окраску) составило – 16 раз.

Таким образом, минимальное количество кала в объекте составляет  $1,86 \pm 0,03$  мг при условии экстрагирования его в 0,2 мл физиологического раствора или  $9,3 \pm 0,15$  мг/мл.

#### **5.2.4. Изучение специфичности метода**

С целью изучения специфичности метода восходящей тонкослойной хроматографии по выявлению стеркобилина кала в реакцию, кроме образцов кала, вводили образцы мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи.

Для этого, вырезки с марлевых тампонов размерами 0,5x0,5 см, с давностью хранения 3 суток, из пятен кала, мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи заливали 0,5 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°. Затем вытяжки наносили на линию старта хроматографической пластины ПТСХ-АФ-В, элюировали в системе растворителей n-бутанол - ледяная уксусная кислота - вода (4:1:2) и

обрабатывали реактивом Эрлиха. Детальное описание методики находится в Подразделе 5.2.

Всего проведено 30 экспериментов.

При этом оказалось, что при исследовании образцов кала реакция на наличие стеркобилина была положительной - появление полос оранжевого цвета при  $R_f = 0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха приобретали красную окраску. При исследовании образцов мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи реакция на наличие стеркобилина была отрицательной – полосы красного цвета при  $R_f=0,55-0,6$  отсутствовали.

Результаты исследования свидетельствуют о том, что способ выявления стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии является специфичным.

Таким образом, в ходе исследования пигментного состава мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии, получены следующие результаты:

- 1) Разработан способ установления наличия стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии;
- 2) Положительные результаты наблюдали спустя 3 суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала, который хранился в условиях лаборатории;
- 3) Воздействие температуры  $+100^\circ$  в течение 2 часов и  $-15^\circ$  на протяжении 1 суток не влияет на выявление стеркобилина кала;
- 4) Установлено, что процессы гниения влияют на выявление стеркобилина кала, который может быть выявлен лишь на протяжении 2-3 суток;
- 5) При изучении чувствительности способа установлено, что минимальное количество кала, при котором результат реакции положителен, составляет  $9,3 \pm 0,15$  мг/мл.
- 6) При изучении специфичности способа установлено, что при исследовании мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи реакция на наличие стеркобилина отрицательна.

Таким образом, в результате исследований разработан простой в выполнении, доступный, специфичный и чувствительный способ установления наличия кала, основанный на выявлении желчного пигмента – стеркобилина.

Данный способ может быть использован как при установлении наличия кала в следах на вещественных доказательствах, так и при дифференциальной диагностике кала и мекония, поскольку в меконии данный пигмент отсутствует.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При проведении судебно-биологических экспертиз первым этапом является установление наличия на вещественных доказательствах следов биологического происхождения – крови, спермы, микрочастиц органов и тканей и др. Среди них особое место занимает экспертиза мекония (первородного кала) [Мамурков В.А., 2012; Elkins К.М., 2014; Гусаров А.А. и соавт., 2015; Конон А.В., 2016; Горбулинская И.Н., 2018; Ковалев и соавт., 2018; Смирнов Р.Ю., 2018; Куприна Т.А. и соавт., 2019].

Установление наличия мекония в следах на вещественных доказательствах необходимо при расследовании уголовных дел по факту «детоубийств» (ст. 106 УК РФ), а именно, убийства матерью новорожденного ребенка во время родов или сразу после них, т.к. его обнаружение подтверждает факт имевших место родов [Соловьева Н.А., 2004; Ковригина Г.Д., 2017; Соломатина Е.А., 2018]. Кроме этого, выявление мекония подтверждает факт новорожденности [Абрамов С.С. и соавт., 2001; Ефимов А.А., Шухнин М.Н., 2008; Соколова З.Ю. и соавт., 2011]. В судебно-медицинской практике данный период длится от момента рождения до конца первых суток. Это обусловлено юридическим определением убийства матерью новорожденного ребенка [Алхимина И.А., 2012; Кузнецов В.И., 2013; Бабичев А.Г., 2014; Мачинский П.А., Тишков С.В., 2014; Терновцова А.М., 2016; Гречаный С.В., Кожадей Е.В., 2018; Добрикова Н.В., 2018; Сухинин А.В., Соловьева Н.А., 2018; Тарасова О.А., Сидорова С.А., 2018].

Вопрос о наличии мекония может быть решен при проведении судебно-медицинской биологической экспертизы [Мамурков В.А., 2012; Elkins К.М., 2014; Гусаров А.А. и соавт., 2015; Конон А.В., 2016; Горбулинская И.Н., 2018; Ковалев и соавт., 2018; Смирнов Р.Ю., 2018; Куприна Т.А. и соавт., 2019]. В настоящее время обнаружение мекония основано исключительно на изучении его морфологического состава микроскопическим методом. Однако, как показывает практика, это не всегда возможно, поскольку многие

морфологические элементы вследствие неблагоприятного воздействия факторов внешней среды или при малом количестве исследуемого материала, не выявляются. В судебно-медицинской литературе содержатся лишь единичные данные об исследовании мекония в следах на вещественных доказательствах, которые посвящены изучению его морфологического состава микроскопическим методом.

При диагностике мекония также необходимо отличать его от кала. Выявление последнего основано на обнаружении типичных морфологических элементов микроскопическим методом [Барсегянц Л.О., 2008; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009; Сулейменова Г.М., 2013]. Кроме этого проводились исследования по изучению ферментного состава кала в следах [Ильина Е.А., 1991; Федоровцев А.Л., 2002; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009]. Установлено, что ферменты желудочно-кишечного тракта, выявляемые в кале, присутствуют и в других биологических жидкостях, т.е. данные пробы являются неспецифичными. В недавнее время появились результаты молекулярно-генетического исследования кала, основанного на выявлении генов бактерий, входящих в состав кишечной микрофлоры. [Verhoff M.A. et al., 2002; Andrew Carson C. et al., 2009; Hiroaki N. et al., 2013; Zou K.-N. et al., 2016; Sinelnikov et al. A., 2017]. Однако, несмотря на высокую чувствительность, данные способы не лишены недостатков.

Учитывая актуальность и практическую значимость проблемы, целью нашего исследования явилось совершенствование судебно-медицинской диагностики мекония в следах на вещественных доказательствах при экспертизах по делам о детоубийствах. В соответствии с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать морфологический и ферментный составы мекония и кала в следах на объектах-носителях.
2. С помощью спектрофотометрического метода исследования разработать новые методические подходы для диагностики мекония и кала.
3. Установить возможность выявления желчных пигментов мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии.

4. Изучить влияние крайних температур и процессов гниения на выявляемость стеркобилина кала во внешней среде.

5. На основе полученных данных разработать судебно-медицинские критерии дифференциальной диагностики мекония и кала в следах на вещественных доказательствах.

Для решения поставленных задач в 3160 экспериментах исследовано 50 образцов мекония мертворожденных плодов сроком от 20 до 41 недели внутриутробного развития с давностью хранения от 3 суток до 2 лет и 50 образцов мекония живых новорожденных на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток; 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет без нарушения функции печени, желчного пузыря и кишечника, с давностью хранения от 3 суток до 2 лет.

При исследовании были использованы методы световой и люминесцентной микроскопии, реакция по изучению активности амилазы в крахмально-агаровом геле, реакция по изучению активности трипсина методом субстратной пленки, модификация реакции Петтенкофера по установлению наличия желчных кислот, метод спектрофотометрии и восходящей тонкослойной хроматографии.

#### **Изучение морфологического состава мекония и кала**

С целью изучения морфологического состава мекония и кала было исследовано 700 цитологических препаратов методами световой микроскопии без окраски и после обработки раствором Люголя, и люминесцентной микроскопии препаратов, флюорохромированных раствором акрихина.

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов сроком с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных, рожденных на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток были выявлены клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи и мекониевые тельца. При микроскопии препаратов мекония, начиная с 32 недели внутриутробного развития, обнаруживали также пушковые волосы. Частота обнаружения клеток рогового слоя эпидермиса составила 100%; мекониевые тельца были выявлены в 50%

исследованных образцов; пушковые волосы – в 33% образцов плодов и новорожденных со сроком внутриутробной жизни 32 и более недель.

Зависимости между частотой обнаружения морфологических элементов и внутриутробным возрастом плодов с использованием таблиц сопряженности признаков, обрабатываемых с помощью критерия Пирсона, не было выявлено.

Обнаружение клеток рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия подтверждается тем, что к 4 месяцу внутриутробного развития эпителий кожи плода становится многослойным и приближается к своему окончательному строению. Клетки верхнего рогового слоя начинают накапливать кератин и ороговеть. Первые признаки ороговения проявляются на подошвах, ладонях и дистальных фалангах пальцев. Этот факт подтверждается началом образования ногтевых пластин пальцев плода на 5 месяце внутриутробного развития путем кератинизации клеток поверхностного слоя эпидермиса. Ороговевшие клетки слущиваются и попадают в околоплодные воды, а затем при заглатывании – в желудочно-кишечный тракт, и, практически не изменёнными выявляются в составе мекония.

Обнаружение мекониевых телец объясняется тем, что на 7 неделе внутриутробного развития энтодермальный эпителий кишечной трубки плода начинает активно пролиферировать, превращаясь в однослойный призматический эпителий, на 90% состоящий из столбчатых эпителиоцитов [Афанасьев Ю.И. и соавт., 2012], который, вследствие физиологической десквамации слущивается в просвет кишечника и выделяется в составе мекония. Источником мекониевых телец считают десквамированный эпителий кожи и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, что также подтверждает полученные нами результаты.

Пушковые волосы (*lanugo*) начинают появляться на поверхности тела плода к концу шестого и началу седьмого месяца внутриутробного развития. Наиболее выражены *lanugo* в течение 7-8 месяцев, а затем они начинают выпадать, что подтверждает полученные нами данные – пушковые волосы были обнаружены в образцах мекония, начиная с 32 недели внутриутробного развития.

Итак, особенности морфологического состава мекония обусловлены, в первую очередь, типом питания плода, стерильностью его кишечника и морфофункциональной незрелостью желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, установлено, что морфологический состав мекония в следах на вещественных доказательствах довольно скуден.

Кроме этого, следует отметить, что частота встречаемости дифференцируемых элементов была невысока, что затрудняет диагностику мекония и требует разработки более эффективных методов его обнаружения.

Также установлено, что выявляемость морфологических элементов не зависит от внутриутробного возраста плодов.

При микроскопии кала, основную массу составлял недифференцируемый аморфный детрит, среди которого выявляли фрагменты переваренных и полупереваренных мышечных волокон, зерна вне- и внутриклеточного крахмала, элементы перевариваемой и неперевариваемой растительной клетчатки, колонии йодофильной микрофлоры. Данные элементы представляют собой непереваренные или полупереваренные фрагменты пищи животного и растительного происхождения, которые в норме содержатся в кале. Йодофильная микрофлора является элементом нормальной микрофлоры кишечника, которая тоже выделяется с калом во внешнюю среду.

Вопрос морфологического состава кала в следах на вещественных доказательствах достаточно изучен и не требует комментариев. Данные, полученные в ходе нашего исследования, подтверждают результаты, полученные, М.А. Бронниковой А.С. Гаркави (1963), Л.О. Барсегянц (1999), А.Л. Федоровцевым и соавт. (2009).

Однако частота обнаружения дифференцируемых элементов в образцах кала была также невысока, что подтверждается полученными в ходе исследования данными.

Следует отметить, что сроки хранения образцов мекония и кала не влияли на выявление дифференцируемых морфологических элементов.

При сравнительном исследовании мекония и кала были выявлены отличия в их морфологическом составе: в кале, в отличие от мекония, выявляли полупереваренные волокна мышечной и соединительной тканей, неперевариваемую и перевариваемую растительную клетчатку, зерна вне- и внутриклеточного крахмала, колонии йодофильной микрофлоры, которые отсутствуют в меконии. В то время как в меконии содержатся мекониевые тельца, пушковые волосы, клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи, отсутствующие в кале.

Таким образом, вышеуказанные отличия морфологического состава могут быть использованы как для обнаружения мекония и кала в следах на вещественных доказательствах, так и для дифференциальной диагностики.

Однако еще раз следует отметить довольно низкий процент обнаружения типичных морфологических элементов в следах данных выделений, что затрудняет диагностику и требует разработки более эффективных способов установления их наличия и дифференциации между собой.

### **Изучение активности панкреатической амилазы мекония и кала**

С целью изучения активности панкреатической амилазы в составе мекония плодов, новорожденных и кала взрослых лиц было проведено 600 экспериментов реакцией в 2% и 1% крахмально-агаровом геле. Образцы мекония были разделены на 5 групп (в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов): 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

При этом получены следующие результаты:

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 30 неделю внутриутробного развития с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет в 2% и 1% крахмально-агаровом геле реакция на наличие амилазы была отрицательной. При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 31 по 34 неделю внутриутробного развития в 2% крахмально-агаровом геле реакция на наличие амилазы была отрицательной; в 1% крахмально-агаровом

геле в 5 образцах получены отрицательные результаты, а в 6-ти проба была положительной.

При исследовании образцов мекония живых новорожденных в 2% крахмально-агаровом геле в 34 образцах реакция на наличие амилазы оказалась положительной, в 16-ти – отрицательной; при исследовании активности амилазы в 1% крахмально-агаровом геле – в 40 образцах реакция на наличие амилазы была положительной, в 10-ти – отрицательной.

При исследовании образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью забора от 3 суток до 2 лет в 2% крахмально-агаровом геле реакция на наличие амилазы была положительной во всех образцах.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что:

1) Проба на наличие амилазы с образцами мекония давала как положительные, так и отрицательные результаты.

2) Положительные результаты пробы при исследовании образцов мекония наблюдали на протяжении всего срока наблюдений.

3) Количество положительных проб возрастало с увеличением внутриутробного возраста.

4) При уменьшении концентрации крахмала в составе крахмально-агарового геля количество положительных результатов увеличивалось.

5) При исследовании всех образцов кала проба на наличие амилазы была положительной независимо от сроков хранения образцов.

Полученные результаты можно объяснить следующим образом:

Зачаток поджелудочной железы появляется на третьей неделе эмбриогенеза. Первыми начинают образовываться клетки экзокринного аппарата. Однако их дифференцировка протекает сравнительно медленно – секреторные гранулы появляются в ацинарных клетках к пятому месяцу внутриутробного развития. Этим фактом можно объяснить отрицательные пробы с образцами мекония мертворожденных плодов с 20 по 30 неделю внутриутробного развития.

У недоношенных новорожденных в 70% случаев амилаза отсутствует, у зрелых новорожденных содержание амилазы в железе длительное время низкое.

Ранний постнатальный период, когда единственной пищей является молоко, характеризуется относительно невысокой активностью амилолитических ферментов. Внешнесекреторная функция поджелудочной железы у недоношенных детей полноценна, а экскреторная снижена. У доношенных новорожденных также низка реактивность glanduloцитов поджелудочной железы к стимуляторам секреции, и становление секреции ферментов происходит не одновременно.

Таким образом, при рождении функция экзокринного аппарата поджелудочной железы снижена вследствие низкой секреторной активности glanduloцитов панкреатических ацинусов, чем можно объяснить отрицательные результаты пробы в крахмально-агаровом геле с образцами мекония доношенных новорожденных.

Положительные результаты пробы в тех же возрастных группах, возможно, связаны с индивидуальными особенностями организма плода или новорожденного.

В части образцов, с которыми реакция в 2% крахмально-агаровом геле была отрицательной, в 1% крахмально-агаровом геле получены положительные результаты, что объясняется большей чувствительностью пробы.

Положительные же результаты пробы с образцами кала объясняются тем, что часть фермента, не затраченного на переваривание углеводов в кишечнике, выделяется в неизменном виде в составе каловых масс.

Таким образом, проба по выявлению амилазы в крахмально-агаровом геле может быть использована как этап комплексной диагностики кала в следах на вещественных доказательствах. Однако, данный метод не может быть применен для дифференциальной диагностики мекония и кала, т.к. и при исследовании мекония проба может давать положительные результаты.

Также, следует отметить, что проба по выявлению амилазы в крахмально-агаровом геле носит качественный характер. С помощью данного способа невозможно установить количественное содержание амилазы в исследуемых образцах.

### **Изучение активности трипсина мекония и кала**

С целью изучения активности трипсина мекония и кала взрослых лиц проведено 600 экспериментов методом субстратной пленки.

Образцы мекония были разделены на 5 групп (в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов): 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

При этом получены следующие результаты:

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю внутриутробного развития проба на наличие трипсина была отрицательной при времени инкубации 2 и 4 часа. При исследовании 13-ти образцов мекония мертворожденных плодов на сроке 25-30 недель при времени инкубации 2 часа реакция на наличие трипсина была отрицательной во всех образцах; при увеличении времени инкубации до 4-х часов получен положительный результат с 1-м образцом мекония плода со сроком 25-26 недель. При исследовании 19-ти образцов мекония плодов на 35-41 неделе при времени инкубации 2 часа реакция на наличие трипсина была положительной в 8-ми образцах; при времени инкубации 4 часа – в 12-ти.

При исследовании 50 образцов мекония живых новорожденных при сроке инкубации 2 и 4 часа реакция на наличие трипсина была положительной в 30 и 36 образцах соответственно.

Положительные результаты проб наблюдали через 3 суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала.

При исследовании образцов кала взрослых лиц реакция на наличие трипсина была положительной во всех образцах через 3 суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала.

Таким образом, на основании проведенных исследований, можно сделать следующие выводы:

1) При исследовании образцов мекония проба на наличие трипсина давала как положительные, так и отрицательные результаты.

2) Положительные результаты пробы при исследовании образцов мекония наблюдали на протяжении всего срока наблюдений.

3) При увеличении внутриутробного возраста плодов количество положительных проб увеличивалось.

4) При увеличении времени инкубации с 2-х до 4-х часов число положительных проб возрастало.

5) При исследовании всех образцов кала реакция на наличие трипсина была положительной на протяжении всего срока наблюдений.

Полученные результаты можно объяснить следующим образом:

Как было сказано выше, зачаток поджелудочной железы появляется на третьей неделе эмбрионального развития. Однако, секреторные гранулы клеток появляются в ацинарных клетках лишь на пятом месяце внутриутробной жизни. Следовательно, отрицательные пробы на наличие трипсина в меконии плодов с 20 по 24 неделю внутриутробного развития могут быть обусловлены низкой секреторной активностью панкреатоцитов.

Поскольку с увеличением внутриутробного возраста плода происходит созревание и экзокринного аппарата поджелудочной железы, продукция протеолитических ферментов возрастает, чем обусловлено получение положительных результатов пробы на наличие трипсина в образцах мекония более старших возрастных групп. Отрицательные результаты проб в тех же возрастных группах могут быть связаны с индивидуальными физиологическими особенностями плодов и новорожденных. Тем более, данная проба носит качественный характер и не позволяет определять точное количество фермента в исследуемых образцах.

Возрастание числа положительных проб при увеличении времени инкубации при температуре 37° с 2-х до 4-х часов обусловлено созданием более благоприятных условий для реакции трипсина с желатиной, входящей в состав эмульсионного слоя фотопленки. Благодаря этому даже меньшее количество фермента, содержащегося в исследуемом образце, давало положительные результаты.

Положительные результаты пробы с образцами кала объясняются тем, что часть фермента, не затраченного на переваривание белков в кишечнике, выделяется в неизменном виде в составе каловых масс.

Таким образом, проба по выявлению трипсина методом субстратной пленки может быть использована как этап комплексной диагностики кала в следах на вещественных доказательствах, наряду с тестом на наличие амилазы. Однако данный способ не может быть использован при дифференциальной диагностике мекония и кала, т.к. и при исследовании мекония проба в ряде случаев также дает положительные результаты.

Следует отметить, что данная проба, также как и проба на наличие амилазы, носит качественный характер и не дает сведений о количественном содержании фермента, что ограничивает возможности данных способов в плане дифференциации мекония от кала.

### **Изучение желчных кислот в меконии и кале**

С целью установления наличия желчных кислот в меконии и кале взрослых использована модификация реакции Петтенкофера, предложенная Л.А. Ревнитской, М.Ш. Колыш (1988) для выявления желчных кислот в следах-наложениях на орудиях травмы при ранениях печени и желчного пузыря. Оценка результатов реакции осуществляется визуально без применения каких-либо аппаратных методов.

Образцы мекония были разделены на 5 групп (в зависимости от срока внутриутробного возраста плодов): 7 образцов мертворожденных плодов с 20 по 24 неделю, 13 образцов - 25-30 недель, 11 образцов - 31-34 недели, 19 образцов - 35-41 недель и 50 образцов живых новорожденных.

Всего проведено 150 экспериментов.

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития, со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет, проба на наличие желчных кислот давала как положительные, так отрицательные и сомнительные

результаты. Положительные результаты пробы составили около 50% в каждой возрастной группе. Процент отрицательных результатов находился в границе от 23% в группе 25-30 недель до 47% в группе 35-41 недели. При этом были получены и сомнительные результаты, доля которых составила около 1/3 во всех исследуемых образцах.

При исследовании образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет реакция была отрицательной во всех экспериментах.

Полученные результаты можно объяснить следующим образом:

Синтез желчных кислот начинается в печени плода на 15-16 неделе гестации. В это же время появляется способность печени к конъюгации желчных кислот. Около 85% желчных кислот плода конъюгируется с таурином, в то время как у взрослых – с глицином. Тауриновые конъюгаты менее токсичны и проходят через плаценту. В отличие от взрослых, кишечник плодов стерилен. А поскольку синтез вторичных кислот в кишечнике происходит только с участием микрофлоры, первичные кислоты проникают через плаценту и подвергаются дальнейшим превращениям в организме матери. Вторичные желчные кислоты, образовавшиеся в кишечнике матери, возвращаются в организм плода и подвергаются гидроксилированию в печени. Часть первичных желчных кислот связываются с сульфатами. Сульфурированные желчные кислоты минимально всасываются в кишечнике и накапливаются в меконии. У новорожденных первых дней жизни содержание вторичных желчных кислот значительно снижено, что связано с отсутствием микрофлоры. Повышение уровня вторичных желчных кислот зависит от становления биоценоза кишечника. В кишечнике новорожденных около 70-80% желчных кислот выводится с меконием, что связано с незрелостью всех этапов их печеночно-кишечной циркуляции [Таболин В.А. и соавт., 1997; Kumagai M. et al., 2007], чем объясняются положительные пробы на желчные кислоты с образцами мекония.

Отрицательные результаты пробы с образцами мекония, возможно, связаны с индивидуальными особенностями организма плодов и новорожденных.

Также необходимо упомянуть, что кроме положительных и отрицательных результатов, с образцами мекония получены и сомнительные. Данный факт обращает внимание на то, что эта проба носит сугубо субъективный характер, что существенно затрудняет оценку результатов.

Отрицательные результаты пробы с образцами кала объясняются тем, что в физиологических условиях у взрослых лиц 80-95% желчных кислот реабсорбируется в кишечнике по системе воротной вены в печень и снова включается в процесс переваривания жиров [Северин Е.С. и соавт., 2008; Ильченко А.А., 2010; Бондаренко В.М., 2013]. Таким образом, следовое количество желчных кислот в составе кала не дает положительный результат модификацией реакции Петтенкофера.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1) При исследовании желчных кислот в образцах мекония плодов и новорожденных с давностью хранения от 3 суток до 2 лет были получены положительные, отрицательные и сомнительные результаты.

2) Положительные результаты пробы с образцами мекония объясняются тем, что в кишечнике новорожденных около 70-80% желчных кислот выводится с меконием, что связано с незрелостью всех этапов их печеночно-кишечной циркуляции.

3) В ходе исследования образцов мекония не было выявлено корреляции результатов ни с внутриутробным возрастом плодов, ни с давностью хранения материала.

4) С образцами кала реакция на наличие желчных кислот была отрицательной во всех экспериментах, поскольку у взрослых лиц 80-95% желчных кислот реабсорбируется в кишечнике по системе воротной вены, а оставшаяся часть выделяется с фекалиями в виде бактериальных метаболитов.

Подводя итог, следует сказать, что проба на наличие желчных кислот модификацией реакции Петтенкофера не может быть использована для дифференциальной диагностики мекония и кала, т.к. с образцами мекония она дает как положительные, так и отрицательные результаты.

Также, следует подчеркнуть, что данная проба носит сугубо субъективный и качественный характер, т.к. оценка результатов проводится путем визуального наблюдения за изменением цвета раствора, что резко ограничивает возможности данного способа.

### **Изучение пигментного состава мекония и кала методом спектрофотометрии**

С целью изучения спектров поглощения видимого и ультрафиолетового света мекония и кала был применён метод спектрофотометрии с использованием спектрофотометра СФ-2000 со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нМ.

Данный метод основан на измерении ослабления светового потока, происходящего вследствие избирательного поглощения света анализируемым веществом.

Изменение интенсивности излучения после взаимодействия с анализируемым веществом связано с качественным и количественным составом вещества.

На основании изучения поглощения веществом света в ультрафиолетовой и видимой областях спектра можно получить спектр поглощения, который выражается в виде графической зависимости оптической плотности от длины волны падающего света.

На основе данного метода был разработан способ установления мекония и/или кала в следах на вещественных доказательствах [Патент РФ на изобретение №2646813 от 07.03.2018].

Данный способ отличается быстротой проведения анализа, доступностью оборудования и точностью результатов, которые отображаются в виде графиков.

Всего проведено 300 экспериментов.

При этом получены следующие результаты:

2) При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов сроком с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток с давностью хранения материала от 3 суток до 2 лет, максимумы поглощения зарегистрированы при длинах волн  $332,42 \pm 2,05$  и  $399,84 \pm 2,6$  нМ.

1) При исследовании образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет максимум поглощения зарегистрирован при длине волны  $498,0 \pm 2,65$  нМ;

Таким образом, при исследовании мекония и кала методом спектрофотометрии, зарегистрированы характерные для каждого из этих выделений спектры поглощения видимого и ультрафиолетового цвета.

Полученные результаты объясняются тем, что каждое вещество или смесь веществ обладают характерными спектрами поглощения, что связано с особенностями химического строения анализируемых веществ.

По нашему мнению, различия спектров поглощения мекония и кала обусловлены особенностями их пигментного состава.

Учитывая вышесказанное, можно сделать вывод, что исследование спектров поглощения ультрафиолетового и видимого света меконием и калом может быть использовано как способ их обнаружения, так и для дифференциации данных выделений.

### **Изучение пигментного состава мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии**

С целью изучения пигментного состава мекония и кала был выбран метод восходящей тонкослойной хроматографии, который отличается простотой, экономичностью, доступностью оборудования и гибкостью, позволяющей легко модифицировать его в соответствии с поставленной задачей.

Общеизвестно, что основным пигментом кала взрослых в норме является стеркобилин, который придает ему характерную коричневую окраску.

В отличие от кала взрослых, в меконии стеркобилин отсутствует. Это обусловлено тем, что кишечник плодов и новорожденных первых дней жизни

стерилен, а для синтеза стеркобилина необходима кишечная флора. Кроме этого, во внутриутробном развитии билирубин практически не подвергается конъюгации, в связи с отсутствием в печени плода лигандина и Z-протеина, обеспечивающих захват билирубина гепатоцитами и угнетением активности ферментов уридиндифосфогидрогеназы и глюкоронилтрансферазы гормонами беременных. Кроме этого, в кишечнике плодов и новорожденных повышена активность фермента  $\beta$ -глюкоронидазы, который отщепляет от прямого билирубина глюкуроновую кислоту и превращает его в неконъюгированный билирубин. При этом часть свободного билирубина реабсорбируется в тонком кишечнике. Далее, с развитием микрофлоры кишечника, к 7-9 месяцам жизни ребёнка, билирубин полностью переходит в стеркобилин. Таким образом, основным желчным пигментом мекония является непрямой билирубин.

Учитывая вышесказанное, перед нами была поставлена задача – разработать способы установления наличия мекония и кала, основанные на особенностях их пигментного состава.

С целью изучения пигментного состава кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет с давностью хранения от 3 суток до 2 лет. Исследование проводилось через 3 суток, 1 месяц, 6 месяцев, 1 год и 2 года после забора материала.

Всего выполнено 810 экспериментов.

В ходе исследования было установлено, что при элюировании вытяжек из пятен кала в системе растворителей *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2) на хроматографических пластинах ПТСХ-АФ-В появлялись полосы оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ , которые, при нанесении реактива Эрлиха (10% раствор парадиметилбензальдегида в концентрированной соляной кислоте) приобретали красную окраску, что свидетельствует о наличии уробилиновых тел (стеркобилина).

На основании проведенного исследования был разработан способ установления наличия кала методом восходящей тонкослойной хроматографии. [Патент РФ на изобретение № №2691727 от 18.06.2019 г.].

С целью изучения влияния крайних температур на выявление стеркобилина кала было проведено две серии опытов: в первой вырезки из исследуемых объектов помещали в сухожаровой шкаф при температуре  $+100^{\circ}$  в течение 2 часов; а во второй – в морозильную камеру бытового холодильника при температуре  $-15^{\circ}$  в течение 1 суток, и исследовали методом восходящей тонкослойной хроматографии.

При этом установлено, что при нагревании образцов при температуре  $+100^{\circ}$  в течение 2 часов реакция на наличие стеркобилина кала была положительной. Также положительные результаты получены при воздействии температуры  $-15^{\circ}$  в течение 1 суток.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что воздействие температуры до  $+100^{\circ}$  в течение 2 часов и  $-15^{\circ}$  в течение 1 суток не влияет на выявление стеркобилина кала.

Устойчивость стеркобилина к воздействию крайних температур объясняется его химической структурой (его основу составляют четыре пиррольных кольца), в отличие от белковых молекул, которые при воздействии высоких температур, подвергаются денатурации.

С целью изучения процессов гниения на выявление стеркобилина кала вырезки из исследуемых объектов помещали во влажные камеры при комнатной температуре, где созданы благоприятные условия для гниения, на 1, 2, 3, 4 и 5 суток. По истечении указанного времени их исследовали методом восходящей тонкослойной хроматографии.

В ходе исследования установлено, что после нахождения образцов в течение 1-х и 2-х суток во влажных камерах реакция на наличие стеркобилина была положительной. При исследовании тех же образцов после нахождения их во влажных камерах в течение 3-х суток результаты реакции были сомнительными – на хроматограммах появлялись едва заметные полосы оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ , а спустя 4 и 5 суток реакция на наличие стеркобилина кала была отрицательной – отсутствие полос оранжевого цвета при  $R_f=0,55-0,6$ .

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что процессы гниения влияют на выявление стеркобилина кала, который может быть выявлен лишь на 2-3 сутки.

Полученные результаты можно объяснить тем, что микроорганизмы, вызывающие процессы гниения, обладая собственной ферментативной активностью, расщепляют стеркобилин кала.

С целью изучения чувствительности способа по установлению наличия стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии вытяжки из исследуемых образцов кала со средней массой  $29,8 \pm 1,4$  мг объемом 0,2 мл путем титрования разводили в 2, 4, 8, 16, 32 и 64 раза. После этого, полученные растворы переносили в полном объеме (0,2 мл) на хроматографическую пластину и устанавливали наличие стеркобилина кала.

При этом получены следующие результаты:

Максимальное разведение, при котором результат реакции был положительным, составило – 16 раз.

Таким образом, минимальная концентрация кала, при котором реакция на наличие стеркобилина была положительной, составила  $1,86 \pm 0,03$  мг при условии экстрагирования его в 0,2 мл физиологического раствора или  $9,3 \pm 0,15$  мг/мл.

С целью изучения специфичности метода восходящей тонкослойной хроматографии по выявлению стеркобилина кала в реакцию, кроме образцов кала вводили образцы мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи.

При этом получены следующие результаты:

При исследовании образцов кала реакция на наличие стеркобилина была положительной. При исследовании образцов мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи реакция на наличие стеркобилина была отрицательной – отмечалось отсутствие каких-либо полос при  $R_f=0,55-0,6$ .

Результаты исследования свидетельствуют о том, что способ выявления стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии является специфичным.

Таким образом, в ходе проведённых исследований получены следующие результаты:

1) Разработан способ установления наличия стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии. При этом положительные результаты наблюдали спустя 3 суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала;

2) При изучении влияния крайних температур установлено, что воздействие температуры до  $+100^{\circ}$  в течение 2 часов и  $-15^{\circ}$  в течение 1 суток не влияет на выявление стеркобилина кала;

3) Установлено, что процессы гниения влияют на выявление стеркобилина кала;

4) При определении чувствительности способа установлено, что минимальное количество кала, при котором результат реакции положителен, составляет  $9,3 \pm 0,15$  мг/мл;

5) Разработанный способ специфичен: при исследовании мекония, крови, слюны, пота, влагалищного содержимого, мочи реакция на наличие стеркобилина была отрицательна.

Таким образом, в результате исследований разработан простой в выполнении, доступный, специфичный и чувствительный способ выявления кала, основанный на выявлении желчного пигмента – стеркобилина.

Данный способ может быть использован как для установлении наличия кала в следах на вещественных доказательствах, так и для дифференциальной диагностики кала и мекония, поскольку в меконии данный пигмент отсутствует.

#### **Дифференциальная диагностика мекония и кала**

В ходе исследования были выявлены отличия морфологического, ферментного и пигментного состава мекония и кала, которые могут быть использованы в качестве критериев их дифференциальной диагностики.

Сравнительная характеристика морфологического, ферментного и пигментного состава мекония и кала отражена в таблице 14.

Таблица 14 – Сравнительная характеристика морфологического, ферментного и пигментного состава мекония и кала

Сравниваемый признак		Меконий	Кал взрослых
Морфологические элементы	Мекониевые тельца	+	-
	Клетки рогового слоя эпидермиса кожи	+(20-40 в поле зрения)	+(единичные в поле зрения)
	Пушковые волосы	+	-
	Мышечные волокна	-	+
	Зерна крахмала	-	+
	Неперевариваемая и перевариваемая растительная клетчатка	-	+
	Йодофильная флора	-	+
Амилаза		±	+
Трипсин		±	+
Желчные кислоты		±	-
Спектры поглощения видимого и УФ-света		332,42±2,05 нМ 399,84±2,6 нМ	498,0±2,65 нМ
Желчные пигменты (стеркобилин)		-	+

Как видно из таблицы 14, при исследовании морфологического состава мекония обнаруживаются клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи, мекониевые тельца и, начиная с 32 недели внутриутробного развития, пушковые волосы, которые отсутствуют в кале.

В кале, среди дифференцируемых элементов, выявляются фрагменты переваренных и полупереваренных мышечных волокон, зерна вне- и внутриклеточного крахмала, элементы перевариваемой и неперевариваемой растительной клетчатки и йодофильная микрофлора.

Отличия морфологического состава мекония и кала обусловлены, в первую очередь, типом питания плода и морфофункциональной незрелостью желудочно-кишечного тракта.

Таким образом, отличия морфологического состава мекония и кала могут быть использованы при дифференциальной диагностике данных выделений.

При исследовании активности панкреатической амилазы и трипсина в составе мекония и кала установлено, что с образцами мекония пробы давали как положительные, так и отрицательные результаты. Отрицательные результаты проб связаны, в первую очередь, с морфофункциональной незрелостью поджелудочной железы плодов и новорожденных. Однако, при исследовании кала пробы были положительны во всех экспериментах.

Следует еще раз подчеркнуть, что данные пробы носят сугубо качественный характер, что значительно ограничивает их возможности.

Таким образом, приходим к выводу, что исследование активности панкреатической амилазы в крахмально-агаровом геле и трипсина методом субстратной пленки в составе мекония и кала не может быть использовано при дифференциации данных выделений.

При исследовании активности желчных кислот в составе мекония и кала модификацией реакции Петтенкофера, с образцами мекония проба давала как положительные, так сомнительные и отрицательные результаты, а при исследовании кала – была отрицательной во всех экспериментах.

Данная проба также носит качественный характер и не дает информации о количественном содержании желчных кислот в составе этих выделений.

Учитывая вышесказанное, приходим к выводу, что данная проба не может быть использована при дифференциальной диагностике мекония и кала.

При изучении спектров поглощения видимого и ультрафиолетового света меконием и калом методом спектрофотометрии установлено, что каждое из этих выделений обладает характерным спектром поглощения. Следовательно, данный признак может быть использован как отличительный мекония от кала.

При исследовании пигментного состава кала методом восходящей тонкослойной хроматографии был выявлен стеркобилин, который отсутствует в меконии. Данный признак тоже может быть использован в качестве критерия дифференциальной диагностики мекония и кала.

Таким образом, дифференциальная диагностика мекония и кала может быть основана на отличиях их морфологического и пигментного состава.

Для подтверждения наших выводов, приведем два случая из практики.

*Наблюдение №1.* В мусорном контейнере на территории жилищного комплекса, был обнаружен труп новорожденного ребенка мужского пола длиной 40 см, завернутым в простынь. Кожа трупа в области заднего прохода и ягодиц, а также простынь были обпачканы подсохшим веществом зеленовато-коричневого без цвета и запаха. Для проведения судебно-биологической экспертизы был представлен смыв на марлевый тампон с кожи ягодиц трупа и простынь, в которую он был завернут, с целью установления природы вещества биологического происхождения. При цитологическом исследовании в веществе со смыва и с простыни были обнаружены десятки (в каждом поле зрения) безъядерных клеток рогового слоя эпидермиса кожи. Реакция на наличие амилазы в 1% крахмально-агаровом геле была отрицательной. При исследовании ферментативной активности трипсина методом субстратной пленки получены положительные результаты. Проба на наличие желчных модификацией реакции Петтенкофера была отрицательной. При исследовании спектров поглощения видимого и УФ-света методом спектрофотометрии зарегистрированы максимумы поглощения при длине волны 334,0 и 400,2 нМ. При исследовании пигментного состава методом восходящей тонкослойной хроматографии реакция на наличие стеркобилина была отрицательной. На основании проведенных исследований были сделаны следующие выводы: вещество на марлевом тампоне со смывом с ягодиц трупа является первородным калом – меконием, о чем свидетельствуют характерный цвет, отсутствие запаха, наличие значительного количество клеток рогового слоя кожи, характерные спектры поглощения видимого и УФ света, отсутствие стеркобилина. Пятна на простыне

сходны по морфологическому, ферментному и пигментному составу со смывом с ягодич и также являются меконием.

*Наблюдение №2.* При освидетельствовании П., подозреваемого в совершении насильственных действий сексуального характера, а именно введении полового члена в прямую кишку потерпевшей М., были изъяты смывы с его полового члена на марлевый тампон, который затем был направлен для проведения судебно-биологической экспертизы. Перед экспертом был поставлен вопрос: «Имеется ли на представленном на исследование объекте кал?» Визуально, на участке размерами около 2,0x2,5 см тампон был обпачкан наложениями подсохшего вещества коричневатого цвета, слегка пропитывающими верхние слои марли. С целью экономии материала для установления наличия кала был выбран способ по установлению наличия стеркобилина методом восходящей хроматографии. В качестве контроля использовали заведомый кал. При этом наблюдали появление полос оранжевого цвета в исследуемом объекте, находящихся на одном уровне с заведомым образцом кала, которые при нанесении реактива Эрлиха приобретали красную окраску, что подтверждает наличие стеркобилина и, следовательно, кала на представленном на экспертизу объекте.

## ВЫВОДЫ

1. При микроскопическом исследовании мекония выявлены безъядерные клетки эпидермиса, мекониевые тельца и пушковые волосы, отсутствующие в кале. В кале обнаружены элементы пищи растительного и животного происхождения, колонии йодофильной микрофлоры. Низкая встречаемость типичных элементов ограничивает возможности обнаружения мекония и кала микроскопическим методом.

2. В кале постоянно выявлялись панкреатическая амилаза и трипсин, при этом желчные кислоты не обнаруживались. В меконии непостоянно выявлялись панкреатическая амилаза, трипсин и желчные кислоты, что не позволяет использовать данные признаки для диагностики мекония и кала.

3. При исследовании мекония и кала в следах методом спектрофотометрии зарегистрированы характерные пики поглощения света (для мекония –  $332,42 \pm 2,05$  и  $399,84 \pm 2,6$  нМ; для кала –  $498,0 \pm 2,65$  нМ), что позволило разработать достоверный способ диагностики данных выделений.

4. Установлена возможность выявления желчного пигмента – стеркобилина методом восходящей тонкослойной хроматографии на слое силикагеля в системе растворителей бутанол - ледяная уксусная кислота - вода со значением Rf в диапазоне 0,55-0,6 для диагностики кала в следах.

5. Отмечено отсутствие влияния крайних температур (до  $+100^\circ$  и  $-15^\circ$ ) на выявляемость стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии, а также отрицательное влияние гнилостных процессов на выявляемость стеркобилина, который обнаруживался в кале только в течение 2-3 суток от начала процессов гниения.

6. Используя микроскопический, спектрофотометрический методы исследования и метод восходящей тонкослойной хроматографии выявлены отличия морфологического и пигментного составов мекония и кала, а именно при исследовании мекония обнаружены безъядерные клетки эпидермиса,

мекониевые тельца и пушковые волосы и зарегистрированы пики поглощения света на длинах волн  $332,42 \pm 2,05$  и  $399,84 \pm 2,6$  нМ; при исследовании кала обнаружены элементы пищи растительного и животного происхождения, колонии йодофильной микрофлоры, выявлен желчный пигмент – стеркобилин, отсутствующие в меконии и зарегистрирован характерный пик поглощения света на длине волны  $498,0 \pm 2,65$  нМ, которые могут быть использованы в качестве критериев дифференциальной диагностики данных выделений в следах на вещественных доказательствах.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для установления наличия мекония и/или кала методом спектрофотометрии вырезки из следов на вещественных доказательствах размерами 0,5x0,5 см заливают 2,0 мл физиологического раствора и экстрагируют в течение 24 часов при температуре 4°, затем центрифугируют в течение 4-5 мин при 1500 об/мин и надосадочную жидкость фильтруют через фильтровальную бумагу.

Для исследования используют спектрофотометр СФ-2000 (или подобная ему модель) со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нМ под управлением внешнего персонального компьютера типа IBM PC с программным обеспечением СФ-2000.

Измерения производятся в спектральном диапазоне от 300 до 700 нМ с шагом 1 нМ.

Вытяжки из исследуемых объектов помещают в кюветы спектрофотометра с толщиной поглощающего слоя 1 см и исследуют в режиме «Сканирование». В качестве контроля используют физиологический раствор, которым производилось экстрагирование объектов.

Результаты получают в виде графиков и автоматически производят поиск экстремумов (пиков поглощения).

На основании регистрации характерных для данных выделений спектров поглощения (для мекония –  $332,42 \pm 2,05$  и  $399,84 \pm 2,6$  нМ; для кала –  $498,0 \pm 2,65$  нМ) делают вывод об их наличии.

2. Для выявления стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии вырезки из следов на вещественных доказательствах с предполагаемым наличием кала размерами 0,5x0,5 см заливают 0,5 мл физиологического раствора и экстрагируют в течение 24 часов при температуре 4°.

Для хроматографии используют хроматографические пластины ПТСХ-АФ-В размерами 10,0x10,0 см.

На хроматографической пластине скальпелем размечают полосы шириной 2,0 см. На линию старта, отступя 1,5 см от нижнего края хроматографической пластины, на слой силикагеля легко касаясь его поверхности, наносят капилляром с ровным концом каплю вытяжки из исследуемого объекта и подсушивают их при комнатной температуре. С целью насыщения на образовавшееся пятно помещают вторую каплю вытяжки и снова подсушивают.

В хроматографическую камеру наливают систему растворителей n-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода в соотношении 4:1:2 и помещают в нее хроматографическую пластину с нанесенными вытяжками так, чтобы растворитель не соприкасался с линией старта. Камеру накрывают стеклянной крышкой. Когда растворитель достигает верхнего края пластины, её извлекают из камеры и черным графитовым карандашом отмечают уровень растворителя – линию финиша.

Затем пластину высушивают в термостате при температуре 50° в течение 2-3 минут, обрабатывают реактивом Эрлиха (10% раствор парадиметилбензальдегида в концентрированной соляной кислоте), снова высушивают в термостате при температуре 50° в течение 2-3 минут.

При регистрации полос красного цвета на уровне Rf в диапазоне 0,55-0,6, свидетельствующих о наличии стеркобилина, устанавливают наличие кала.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алхими́на, И.А. Понятие новорожденности в криминалистической характеристике детоубийства/ И.А. Алхими́на // Сборник материалов Международной научно-практической конференции: Государственно-правовое регулирование интеграционных процессов на постсоветском пространстве. – 2012. – С. 41-43.
2. Антонова, Л.К. Современный взгляд на формирование микробиоты пищеварительного тракта у детей первого года жизни / Л.К. Антонова, А.М. Самоукина, Ю.А. Алексеева // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – №6. – С. 68.
3. Ашурова, Н.Г. Бактериологическое исследование после преждевременного разрыва плодных оболочек /Н.Г. Ашурова // Вестник Башкирского государственного университета. – 2019. – №1. – С.398-399.
4. Бабичев, А.Г. Конструктивные признаки в составе убийства матерью новорожденного ребенка / А.Г. Бабичев // Евразийский юридический журнал. – 2014. - №11. – С. 178-184.
5. Барсегянц, Л.О. Морфологические особенности волос человека в аспекте судебно-медицинской экспертизы / Л.О. Барсегянц, М.Ф. Верещака. – М.: Медицина, 1982. – С. 21, 107-109.
6. Барсегянц, Л.О. Судебно-медицинское исследование вещественных доказательств (кровь, выделения, волосы): руководство для судебных медиков. – М.: Медицина, 1999. – С. 154-155.
7. Барсегянц, Л.О. Современное состояние судебно-медицинского исследования вещественных доказательств / Л.О. Барсегянц, А.Ф. Кинле // Судебно-медицинская экспертиза. – 2008. – №1. – С.27-29.
8. Батуревич, Л.В. Копрологические синдромы / Л.В. Батуревич // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2014. – №1. – С. 120-128.

9. Бебешко, О.И. Перинатальные исходы при мекониальной окраске околоплодных вод / О.И. Бебешко, Н.Ф. Хворостухина, С.А. Камалян // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №5. – С. 72.

10. Богомазова, И.М. Неонатальная аспирация мекония: факторы риска и особенности адаптации новорожденный / И.М. Богомазова, А.Н. Стрижаков, И.В. Игнатко // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2018. – №4. – С. 5-14.

11. Бондаренко, В.М. Роль кишечной микробиоты в обмене холестерина и рециркуляции желчных кислот / В.М. Бондаренко, О.В. Рыбальченко, Н.П. Ерофеев // Лечение и профилактика. – 2013. – №3 – С.65-73.

12. Борисевич, М.А. Врожденные атрезии желудочно-кишечного тракта у новорожденных // М.А. Борисевич, И.Д. Кумейко, А.М. Изенов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – №6. – С. 78-84.

13. Большакова, М.В. Современные представления о патогенезе гипоксии плода и роли в нем гипоксия-индуцируемого фактора (HIF) / М.В. Большакова, В.Ф. Беженарь, Н.Г. Павлова // Акушерство и гинекология Санкт Петербурга. – 2019. – №1. – С. 19-24.

14. Бронникова, М.А. Методика и техника судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств / М.А. Бронникова, А.С. Гаркави. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1963. – С. 243-245, 257-258.

15. Власюк, В.В. Циркуляторная интранатальная гипоксия / В.В. Власюк // Архив патологии. – 2019. – №4. – с. 73-77.

16. Гистология, цитология, эмбриология: учебник / Ю.И. Афанасьев, Н.А. Юрина, Е.Ф. Котовский и др.; под. ред. Ю.И. Афанасьева. – 6-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. – С. 637-656.

17. Горбулинская, И.Н. К вопросу о понятии следов биологического происхождения / И.Н. Горбулинская // Сборник материалов криминалистических чтений. – 2018. – №15. – С. 29-31.

18. Горбулинская, И.Н. Биологические следы как источники идентификационной информации / И.Н. Горбулинская // Сборник статей по итогам международной научно-практической конференции: Технокриминалистическое обеспечение раскрытия и расследования преступлений. – 2018. – С. 86-89.

19. Горбулинская, И.Н. К вопросу о понятии следов биологического происхождения / И.Н. Горбулинская // Актуальные проблемы борьбы с преступлениями и иными правонарушениями. – 2019. – №1. – С.30-32.

20. Гречаный, С.В. Клинико-психопатологические и судебно-медицинские аспекты инфантицида / С.В. Гречаный, Е.В. Кожадей // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2018. – №6. – С. 35-41.

21. Греггерсен Й. П., 1919. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 71.

22. Гусаров, А.А. Анализ тематики и структуры научных публикаций по судебной биологии в журнале «Судебно-медицинская экспертиза» (1960-2010 гг.). / А.А. Гусаров, С.В. Шигеев, В.А. Фетисов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2015. – №5. – С. 57-61.

23. Дашишев, В.В. Особенности развития пищеварительной системы и усвоения липидов у недоношенных детей / В.В. Дашичев, А.А. Андреев, Н.Н. Олендарь // Вопросы современной педиатрии. – 2006. – №5. – С. 51-55.

24. Добрикова, Н.В. Новорожденность как специфическое описание возраста в уголовном праве / Н.В. Добрикова // Инновационная наука. – 2018. – №10. – С. 63-66.

25. Елисеев, А.А. Компьютерная спектрофотометрия в медицинской диагностике/ А.А. Елисеев, Ю.П. Морозова, В.А. Козинская // Вестник Томского Государственного Университета. – 2000. – №1. – С.113-117.

26. Ефимов, А.А. К вопросу об экспертной и правовой оценке понятия новорожденности в судебно-медицинской практике / А.А. Ефимов, М.Н. Шухнин // Судебная экспертиза. – 2008. – №4. – С. 78-82.

27. Загрядская, А.П. Судебно-медицинская экспертиза в уголовном процессе: учебное пособие / А.П. Загрядская, А.Л. Федоровцев, Н.С. Эделев. – Н. Новгород: НижГМА, 1999. – С. 30-32.
28. Исааксен И.А., 1840. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 71.
29. Илларионова, Е.А. Фотометрия. Теоретические основы метода. Практическое применение метода: учебное пособие / Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский. – Иркутск, 2013. – 83 с.
30. Ильина, Е.А. Установление наличия кала в пятнах методом электрофореза в агаровом геле / Е.А. Ильина // Судебно-медицинская экспертиза. – 1991. – № 4. – С. 41-42.
31. Ильченко, А.А. Желчные кислоты в норме и при патологии / А.А. Ильченко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – №4 – С. 3-13.
32. Ирринг, В. 1852. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 71-72.
33. Караваева, С.А. Мекониевый илеус недоношенных / С.А. Караваева, Ю.А. Козлов // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2019. – №2. – С.171-177.
34. Ковалев, А.В. Судебно-медицинские экспертизы и исследования вещественных доказательств биологического происхождения в России (по материалам 2003-2017 гг.) / Ковалев А.В., Куприна Т.А., Самоходская О.В., Кондратова И.В. // Судебно-медицинская экспертиза. – 2018. - №6. – С.29-32.
35. Ковригина, Г.Д. Убийство матерью новорожденного ребенка. Методика расследования / Г.Д. Ковригина // Закон и право. – 2017. – №.11. – С. 63-66.
36. Конон, А.В. Судебно-медицинская экспертиза следов биологического происхождения / Евразийский союз ученых. – 2016. - №5. – С.63-64.

37. Котораева, М.А. К вопросу установления начала жизни при квалификации детоубийства / М.А. Котораева // Гуманитарные, социально-экономические и общественные науки. – 2018. – №3. – С. 99-101.

38. Кочкорбаева, Г.Н. Клинический случай атрезии желчевыводящих путей у ребенка 1 года/ Г.Н. Кочкорбаева, О.Н. Иванова // Успехи современной науки. – 2017. – №. 2. – С. 211-213.

39. Кузнецов, В.И. Сложные вопросы квалификации детоубийства / В.И. Кузнецов // Сибирский юридический вестник. – 2013. – №1. – С. 65-73.

40. Кузнецова, Э.Э. Микробиота кишечника. Роль в развитии различных патологий / Э.Э. Кузнецова, В.Г. Горохова, С.Л. Богородская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – №4. – С. 723-726.

41. Кузьмина, А.В. Особенности судебно-медицинской экспертизы трупов новорожденных /А.В. Кузьмина // Центральный научный вестник. – 2018. – №12. – С. 78.

42. Кузьмина, Л.А. Установление наличия крови методом тонкослойной восходящей хроматографии. Медицинская технология / Л.А. Кузьмина, Л.О. Барсегянц. – М., 2010. – 12 с. Регистрационное разрешение Росздравнадзора № 256.

43. Кузьмичев, Д.Е. Постнатальная смертность /Д.Е. Кузьмичев, А.Ю. Раннев, И.М. Вильцев. Здоровоохранение Югры: опыт и инновации. – 2018. – №1. – С. 13-15.

44. Кузнецов, П.А. Гипоксия плода и асфиксия новорожденного / П.А. Кузнецов, П.В. Козлов // Лечебное дело. – 2017. – №4. – С. 9-15.

45. Куприна, Т.А. Анализ судебно-биологических методов исследования вещественных доказательств (по материалам 2017 года) / Т.А. Куприна, О.В. Самоходская, И.В. Кондратова // В сборнике: Достижения российской судебно-медицинской науки XX-XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ. Труды VIII Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием. Под общей редакцией А.В. Ковалева. – 2019. – С. 37-39.

46. Кухарчик, Ю.В. Интранатальная гипоксия плода при плацентарных нарушениях // Ю.В. Кухарчик, Т.В. Русина, И.В. Шишова // Сборник межрегиональной научно-практической конференции с международным участием: Актуальные вопросы педиатрии. – 2018. – С. 146-150.

47. Лунева, А.В. К вопросу определения возраста жертвы детоубийства / А.В. Лунева. Сборник материалов Международной научно-практической конференции: Проблемы обеспечения законности и правопорядка в Дальневосточном регионе. – 2013. – С.216-219.

48. Марковин, И.В. Морфологический состав мекония и его судебно-медицинское значение / И.В. Марковин. – Ташкент: «Правда Востока», 1934. – 48 с.

49. Мамурков, В.А. Основы систематизации и классификации биологических объектов / В.А. Мамурков // Российский юридический журнал. – 2012. – №6. – С. 2015-2013.

50. Мачинский, П.А. Судебно-медицинское исследование трупов плодов и новорожденных в учебном процессе. Сообщение 1. О понятиях «Новорожденность» и «детоубийство» / П.А. Мачинский, С.В. Тишков // Проблемы экспертизы в медицине. – 2014. – №1. – С.47-49.

51. Машинец, Н.В. Мекониевый перитонит у плода – ультразвуковая диагностика и исходы / Н.В. Машинец, В.Н. Демидов // Акушерство и гинекология. – 2015. – №11. – С. 110-116.

52. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников, О.А. Вологовская, А.Б. Ходюкова и др.; под ред. В.С. Камышникова. – 8-е изд. – М.: «МЕДпресс-информ», 2015. – С. 116-132, 570-583.

53. Милош, Т.С. Беременность и роды с мекониевой окраской околоплодных вод // Т.С. Милош, А.Л. Гурин, Л.Н. Кеда // Сборник ежегодной научно-практической конференции: Актуальные проблемы медицины. – 2018. – С. 526-529.

54. Миронова, И.И. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, эякулят: монография / И.И. Миронова, Л.А. Романова, В.В. Долгов. – Тверь: «Триада», 2005 г. – С. 88-128.

55. Миронова, И.И. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство в 2 т. – Т.1 / под ред. В.В. Долгова, В.В. Меншикова. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2013. – С. 352-372.

56. Молекулярно-абсорбционный метод анализа органических веществ: учебно-методическое пособие / Е.В. Черданцева, И.В. Гейде, В.Г. Китаева и др.; под ред. И.В. Гейде. – Екатеринбург: Изд-во Уральского ун-та, 2015. – 96 с.

57. Молчанова, М.Н. Роль состава околоплодных вод в структуре перинатальной патологии / М.Н. Молчанова, В.А. Мудров, А.А. Мудров // Журнал акушерства и женских болезней. – 2019. – №2. – С. 95-108.

58. Муртазина, Н.Р. Применение спектрофотометрии УФ-, видимого и ближнего ИК-диапазона в судебной медицине и криминалистике / Н.Р. Муртазина // Эксперт-криминалист. – 2006. – №3. – С. 13-15.

59. Набока, Ю.Л. Формирование микрофлоры пищеварительного тракта новорожденных в динамике / Ю.Л. Набока, А.Н. Рымашевский, Э.Г. Свирава // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – №3. – С. 65-70.

60. Набока, Ю.Л. Становление микробиоты толстого кишечника новорожденного при различных видах вскармливания / Ю.Л. Набока, А.Н. Рымашевский, Э.Г. Свирава // Педиатрия. – 2014. – №3. – С. 22-29.

61. Никитина, А.В. Иммунохроматографический тест для выявления скрытой крови в кале / А.В. Никитина, Ю.А. Акиншина, Н.Е. Нищакова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2019. – №9. – С. 536-540.

62. Николаева, И.В. Использование метода газожидкостной хроматографии для оценки метаболической активности кишечной микрофлоры у новорожденных детей / И.В. Николаева, Г.С. Шайхиева // Медицинский алфавит. – 2018. – № 2. – С. 12.

63. Николаева, И.В. Формирование кишечной микробиоты ребенка и факторы, влияющие на этот процесс // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2018. – №2. – С. 13-18.

64. Николаева, И.В. Метаболическая активность кишечной микрофлоры у новорожденных детей при различном способе родоразрешения / И.В. Николаева, Г.С. Шайхиева, В.А. Анохин // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – №2. – С. 81-86.

65. Пискарева В.К. Разграничение развратных действий и насильственных действий сексуального характера / В.К. Пискарева // Актуальные вопросы борьбы с преступлениями. – 2016. – №4. – С. 14-16.

66. Поддубная Е.В. Понятие изнасилования и насильственных действий сексуального характера / Е.В. Поддубная // Актуальные вопросы российского права. – 2007. – №1. – С. 474-480.

67. Полушкина, Е.И. Макроскопическое исследование кала / Е.И. Полушкина, И.С. Полушкин // Сборник статей международной научно-практической конференции: Проблемы и перспективы развития науки в России и мире. – 2016. – С. 159-161.

68. Равич И., 1846. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 71.

69. Ревнитская, Л.А. Желчь как объект комплексного исследования следов наложений на орудиях травмы: III Всесоюзный съезд судебных медиков / Л.А. Ревнитская, М.Ш. Кольш. – М., 1988. – С. 230-232.

70. Руководство по судебной медицине / С.С. Абрамов, Е.Х. Баринов, С.В. Гуртовая и др.; под. ред. В.В. Томилина, Г.А. Пашиняна. – М: Медицина, 2001. – С. 76-82, 423.

71. Румянцев, А.Г. Приоритеты фундаментальной педиатрии в контроле младенческой и детской смертности / А.Г. Румянцев // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2019. – №2. – С.8-13.

72. Румянцев, А.Г. Роль взаимоотношений матери и плода в формировании иммунной системы новорожденного / А.Г. Румянцев // Педиатрия. Журнал им. Г.Н., Сперанского. – 2019. – №3. – С.180-187.

73. Рыбина, Е.В. Особенности микрофлоры желудочно-кишечного тракта доношенных новорожденных при разных способах родоразрешения / Е.В. Рыбина, К.Г. Кенбаева, А.М. Савичева // Педиатрия. – 2015. – №3. – С. 30-32.

74. Рымашевский, А.Н. Бактериальное приданое новорожденного. Смена парадигмы: нестерильность плода как норма / А.Н. Рымашевский, Ю.Л. Набока, А.П. Продеус // Педиатрия и неонатология. – 2017. – №2. – С.23-29.

75. Саймон Д., 1842. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 71.

76. Сердюк, А.П. Проблемы идентификации клеточных и неклеточных элементов при проведении общеклинических микроскопических исследования // Справочник заведующего КДЛ. – 2015. – №8. – С. 25-39.

77. Силаева С.А. Биологическая химия: учебник для ВУЗов / Е.С. Северин, Т.Л. Алейникова, Е.В. Осипов, С.А. Силаева. – М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008. – С. 237-239.

78. Смирнов, Р.Ю. Особенности судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств биологического происхождения / Р.Ю. Смирнов // Актуальные вопросы борьбы с преступлениями. – 2018. - №1. – С. 62-65.

79. Соколов, В.Н. Конъюгационные гипербилирубинемии у новорожденных детей / В.Н. Соколов, С.М. Колесникова, В.В. Филиппова // Здоровоохранение Дальнего Востока. – 2019. – №2. – С. 67-74.

80. Соколова, З.Ю. О правомерности установления факта новорожденности ребенка на основании экспертизы его трупа / З.Ю. Соколова, И.В. Буромский, Э.В. Туманов и др. // Судебно-медицинская экспертиза. – 2011. - №2. – С.53-56.

81. Соловьева, Н.А. Методика расследования детоубийств: учебное пособие / под. ред. А.А. Закатова. – Волгоград.: ВолГУ, 2004. – С. 50-51.

82. Соломатина, Е.А. О профилактике и расследовании детоубийств (на основе анализа следственной практики) / Н.А. Соломатина, А.В. Троцанович // Расследование преступлений: проблемы и пути их решения. – 2018. – №1. – с. 81-85.

83. Способ определения содержимого желудка человека на объектах внешней среды при проведении судебно-медицинской экспертизы. пат: 2426987 Рос. Федерация, МПК G01N33/48/ Н.С. Эделев, А.Л. Шершевский, А.В. Сумин; заявитель и патентообладатель НижГМА - №2009127999/15; заявл. - 20.07.2009. Режим доступа [http://www1.fips.ru/wps/wcm/connect/content\\_ru/ru](http://www1.fips.ru/wps/wcm/connect/content_ru/ru). Дата обращения: 20.08.2011.

84. Судебная медицина: учебник / В.Н. Крюков, И.В. Буромский, И.А. Гедыгушев и др.; под общ. ред. В.Н. Крюкова. – 2-е изд., переработ. и доп. – М.: Норма, 2009 – С. 379-380.

85. Судебно-медицинская экспертиза в случаях гибели плодов и новорожденных / Е.Х. Баринов, В.В. Колкутин, К.В. Ноздряков, Т.И. Русакова. – М.: Юрлитинформ, 2002. – 128 с.

86. Сулейменова, Г.М. Идентификация следов выделений. Составление выводов при судебно-медицинской биологической экспертизе: учебное пособие для врачей / Г.М. Сулейменова. – Издание 2-е, стереотипное. – Спб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2013. – 80 с.

87. Сумин, А.В. Определение желудочного содержимого на вещественных доказательствах и во внешней среде // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – №6. – С. 22-24.

88. Сумин, А.В. Изучение возможности идентификации содержимого желудка при помощи выявления пепсина / Сумин А.В., Эделев Н.С., Федоровцев А.В. // Вестник судебной медицины. – 2016. – №1. – С.15-18.

89. Сумин, А.В. Определение желудочного содержимого на вещественных доказательствах и во внешней среде: автореф. дисс... канд. мед. наук: 14.03.05 / Сумин Антон Владимирович. – М., 2016. – 25 с.

90. Сумина, Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение: учебное пособие / Е.Г. Сумина, С.Н. Штыков, В.З. Угланова, Н.В. Кулакова. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение: учебное пособие. – 3-е изд., доп. – Саратов, 2012. – 128 с.

91. Сухинин, А.В. Совершенствование уголовно-правовой регламентации ответственности за убийство новорожденного ребенка / А.В. Сухинин, Н.А. Соловьева // Право и практика. – 2018. – №2. – С. 68-74.

92. Тарасова, О.А. Уголовно-правовая защита новорожденных детей от матерей-убийц / О.А. Тарасова, С.А. Сидорова // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции: Защита прав и свобод человека и гражданина: современное состояние и перспективы развития. – 2018. – С.114-123.

93. Таболин, В.А. Особенности метаболизма и печеночно-кишечной циркуляции желчных кислот у плода и новорожденного / В. А. Таболин, А. В. Иванова, Н. Н. Володин // Педиатрия. – 1997. – № 3. – С. 89-98.

94. Терновцова, А.М. Убийство матерью новорожденного ребенка: понятие, причины и уголовная ответственность / А.М. Терновцова // Экономика и социум. – 2016. – №6. – С. 606-609.

95. Умарова, З.Х.А. Особенности метода тонкослойной хроматографии/ З.Х.А. Умарова, О.В. Малыгина, К.С. Юсупова // Сборник статей Международной научно-практической конференции: Информационное обеспечение как двигатель научного прогресса. – Уфа. – 2019. – С.17-19.

96. Федоровцев, А.Л. Комплексная методика выявления элементов кишечного содержимого в следах наложениях на орудиях травмы при ранениях кишки // Актуальные вопросы судебной и клинической медицины. – Ханты-Мансийск, 2002. – № 6. – С. 114-115.

97. Федоровцев, А.Л. Судебно-медицинские цитологические исследования следов на вещественных доказательствах / А.Л. Федоровцев, Л.А. Ревнитская, Е.И. Королева, Н.С. Эделев. – Н.Новгород, 2009. – С. 87-88.

98. Федоровцев, А.Л. Современные возможности цитологических исследований объектов судебно-медицинской экспертизы / А.Л. Федоровцев, Н.С. Эделев // Вестник судебной медицины. – 2014. – №3. – С. 18-22.

99. Филиппов, Е.С. Обмен билирубина и его особенности у новорожденных / Е.С. Филиппов, М.В. Гомелля, Т.И. Дифенбах // Сибирский медицинский журнал. – 1997. – №1. – С. 11-15.

100. Хижнякова, К.И. Исследование желудочно-кишечного тракта при определении давности смерти / К.И. Хижнякова, Л.Н. Моралев. – М.: Медицина, 1986. – 144 с.: ил.

101. Чакчир, Б. А. Фотометрические методы анализа: методические указания / Б. А. Чакчир, Г. М. Алексеева. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2002. – 44 с.

102. Чепурной, Г.И. Изолированная илеоцекальная форма аганглиоза у новорожденного / Г.И. Чепурной, А.В. Лейга, В.Б. Кацупеев // Детская хирургия. – 2019. – №1. – С. 52-53.

103. Червинец, В.М. Микробиота желудочно-кишечного тракта новорожденных первого месяца жизни в Тверской области / Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – №9. – С. 579-583.

104. Чугунов А.А. Особенности квалификации насильственных действий сексуального характера / А.А. Чугунов, А.А. Морозова // Современное право. – 2016. – №6. – С.98-99.

105. Шаликова, Л.О. Топографо-анатомические особенности органов малого таза плодов человека мужского пола 16-22 недель развития / Л.О. Шаликова, Д.Н. Лященко, Э.Н. Галеева // Оренбургский медицинский вестник. – 2019.– №2. – С. 19-23.

106. Щеголев, А.И. Современная морфологическая классификация повреждений плаценты / А.И. Щеголев // Акушерство и гинекология. – 2016. - №8. – С.5-9.

107. Шидловский С.В., 1870. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 72.

108. Шмидт А., 1898. Цит. по ст.: Решетняк Д.В. История становления лабораторной диагностики / Д.В. Решетняк, В.К. Решетняк // Патогенез. – 2015. – №2. – С. 72.
109. Щеголев, А.И. Патологоанатомическая оценка давности внутриутробной гибели плода / А.И. Щеголев, У.Н. Туманова, В.М. Ляпин // Архив патологии. – 2017. – №12. – С. 127-132.
110. Щеголев, А.И. Клиническая значимость поражений плаценты // А.И. Щеголев, В.Н. Серов. – 2019. – №3. – С. 54-62.
111. Щеголев, А.И. Извитость пуповины: определение, классификация, клиническое значение / А.И. Щеголев, У.Н. Туманова, В.М. Ляпин // Акушерство и гинекология. – 2019. – №2. – С. 42-50.
112. Якушин, А.С. Кишечная микробиота: формирование в раннем возрасте, влияние на здоровье, способы коррекции / А.С. Якушин, С.Е. Украинцев, М.Ю. Денисов // Вопросы современной педиатрии. – 2017. – №6. – С. 487-492.
113. Abernethy, C. Determining the pattern and prevalence of alcohol consumption in pregnancy by measuring biomarkers in meconium / C. Abernethy, K.E. McCall, G. Cooper et al. // Drug testing and analysis. – 2018. – V. 103. – P.2016-220.
114. Acosta, R. Mechanisms of meconium passage: cholinergic stimulation of electromechanical coordination in the fetal colon / R. Acosta, N. Oyachi, J.J. Lee // Journal of the Society for Gynecologic Investigation. – 2005. – V.12. – P.169-173.
115. Andrew Carson C. Development of faecalibacterium 16S RRNA gene marker for identification of human faeces / C. Andrew Carson, G. Zheng, H. Yampara-Iquise, J. E. Jones // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – V.106. – С. 634-641.
116. Antonowicz, I. Meconium in health and in disease / I. Antonowicz, H. Shwachman // Advances in Pediatrics. – 1979. –V 26. – P. 275-310.
117. Aziz, S. On the nature of the bilirubin pigments in the newborn infant / S. Aziz. –Leuven: Leuven University Press, 1995. – 194 p.

118. Aziz, S. Bilirubin-IX beta is a marker of meconium, like zinc coproporphyrin / S. Aziz // *Journal of Pediatric gastroenterology and nutrition*. – 2001. – V. 32, №3. – P. 287-292.
119. Aziz, S. Bilirubin pigments in the first meconium of newborn infants / S. Aziz // *Journal Pakistan Medical Association*. – 2005. – V. 55, №5. – P. 188-192.
120. Begley, M. The interaction between bacteria and bile / M. Begley, C. G. Gahan, C. Hill // *FEMS Microbiology Reviews* – 2005. – V. 29. – P. 625-651.
121. Bilirubin-IX alpha and -IX beta pigments, coproporphyrins and bile acids in meconium and stools from full-term and preterm neonates during the first month of life / S. Aziz, P. Kotal, P. Leroy, R. Servaes, E. Eggermont, J. Fevery // *Acta Paediatrica*. – 2001. – V. 90, №1. – P. 81-87.
122. Biondi, A. Ethyl glucuronide hair testing: A review / A. Biondi, F. Freni, Monetti M., Morini L. // *Forensic science international*. – 2019. – V. 300. – P. 1-6-119.
123. Cabarcos, P. Determination of direct alcohol markers: a review / P. Cabarcos, I. Alvarez, M.J. Taberner, A.M. Bermejo // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – V. 407. – P. 4907-25.
124. Cazes, J. *Chromatography theory* / J. Cazes. – New York: Marcel Dekker, 2002. – 475 p.
125. Cohen, M. *Forensic Aspects of Perinatal Deaths* / M. Cohen, Scheimberg I. // *Academic Forensic Pathology*. – 2018. – V.8. – P.452-491.
126. Comparison of Meconium DNA Extraction Methods for Use in Microbiome Studies / L. F. Stinson, J. A. Keelan, M. S. Payne // *Frontiers of Microbiology*. – 2018. – V.9 – P. 1-14.
127. Cortes, L. Maternal hair and neonatal meconium to assess gestational consumption and prenatal exposure to drugs of abuse and psychoactive drugs / L. Cortes, L. Almeida, S. Sabra, M. Muniesa et al. – 2018. – V.19. – P.136-143.
128. Elkins, K.M. Curriculum and course materials for a forensic DNA biology course / K.M. Elkins // *Biochemistry and Molecular Biology Education*. – 2014. – V. 42. – P. 15-28.

129. Eliakis, 1971. Цит. по кн.: Барсегянц Л.О. Судебно-медицинская экспертиза выделений организма / Л.О. Барсегянц, Б.Д. Левченков. – М.: Медицина, 1978. – С. 92.
130. Fevery J., Kotal P. Normal and disturbed bilirubin metabolism. In: Buts J.P., Sokal E.M., eds. Management of digestive and liver disorders in infants and children. New York: Elsevier Science Publishers B.V., 1993. – P. 501-516.
131. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota / R. Hansen, K.P. Scott, S. Khan, J.S. Martin, S.H. Berry // Public Library of Science One. – 2015. – V.10. – P. 1-10.
132. Fried, B. Thin-Layer Chromatography / B. Fried, J. Sherma. – 5th ed. revised and expanded. – New York: Marcel Dekker., 1999. – 512 p.
133. Gore, M. G. Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: a practical approach / M. G. Gore. – Oxford University Press, 2000. – 368 p.
134. Gourley, G.R. Excremental studies in human neonates. Identification of zinc coproporphyrin as a maker for meconium / G.R. Gourley, B. Kreamer, R. Arend // Gastroenterology. – 1990. – V. 99. – P.1705-1709.
135. Harries, J. Meconium in health and disease / J. Harries // British Medical Bulletin. – 1978. – V. 34, №1. – P.75-78.
136. Hastedt, M. Fatty acid ethyl esters as markers for alcohol in meconium: method validation and implementation of a screening program for prenatal drug exposure / M. Hastedt, F. Krumbiegel, R. Gapert et al. // Forensic science medical pathology. – 2013. – V.9. – P.287-295.
137. Isherwood, D.M. Bile pigment metabolism in the fetus and newborn infant / D.M. Isherwood, G.H. Lathe. In: J.A. Davis, J. Dobbing, eds. Scientific foundations in paediatrics. – London.: Heinemann, 1981. – P.138-160.
138. Hiroaki, N. Identification of feces by detection of Bacteroides genes / N. Hiroaki, H. Shojo, T. Ohmori, M. Hara, A. Takada, N. Adachi, K. Saito // Forensic Science International: Genetics. – 2013. – V. 7, №1. P. 176-179.
139. Midtvedt, T. Establishment of intestinal microbial functions at birth: bilirubin and bacteria / T. Midtvedt // Acta Paediatrica. – 2001. – V.80. – P.7-8.

140. Morini, L. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol / L. Morini, E. Marchei, F. Vagnarelli et al // *Forensic science international*. – 2010. – V.20. – P. 74-77.
141. Nemeskalova, A. Salting out assisted liquid extraction for liquid chromatography tandem-mass spectrometry determination of amphetamine-like stimulants in meconium / Nemeskalova A., Bursova M., Sykora D. et al. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – V. 172. – P. 42-49.
142. Neubauer O., 1903. Цит. по кн.: *Hepatology: principles and practice* / E. Kuntz, H.-D. – 2<sup>nd</sup> edition. – Heidelberg: Springer. – 2006. P. 12.
143. Palmer, K.L. Alternate matrices: meconium, cord tissue, hair and oral fluid / Palmer K.L., Krasowski M.D. // *Methods of Molecular Biology*. – 2019. – V. 1872. – P.191-197.
144. Perinatal bile acid metabolism: bile acid analysis of meconium of preterm and full-term infants / M. Kumagai, A. Kimura, H. Takei, T. Kurosawa, K. Aoki // *Journal of gastroenterology*. – 2007. – V. 42, №11. – P.904-910.
145. Polin, R.A. Fetal and neonatal physiology / R. A. Polin, W.W. Fox. – Philadelphia: W.A. Saunders, 1992. – P.1013-1027.
146. Ristimaa, J. Broad-spectrum drug screening of meconium by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry / J. Ristimaa, M. Gergov, A. Pelander et al. // *Analytic and bioanalytic chemistry*. – 2010. – V. 398. – P.925-935.
147. Rosenthal P. Bilirubin metabolism in the fetus and neonate. In: Polin R.A., Fox W.W., eds. *Fetal and neonatal physiology*. Philadelphia: WB Saunders, 1992. – P. 1154-1159.
148. Prego-Meleiro, P. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of cannaboids and phase I and II metabolites in meconium / P. Prego-Meleiro, E. Leondorio, M. Concheiro ea al // *Journal of chromatography A*. – 2017. – V. 1497. – P.118-126.

149. Sinelnikov, A. PRS-based tests for forensic detection of feces; use of *Bacteroides* species as indicator of fecal matter / A. Sinelnikov, E. Kopitke. K. Reich // *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. – 2007. – V.6. – P. 37-39.
150. Schlesinger W., 1903. Цит. по кн.: *Hepatology: principles and practice* / E. Kuntz, H.-D. – 2<sup>nd</sup> edition. – Heidelberg: Springer. – 2006. – P. 12.
151. Tarcomnicu, I. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography – tandem mass spectrometry / I. Tarcomnicu, A.L. van Nuijs, K. Aerts et al. // *Forensic science international*. – 2010. – V. 196. – P. 121-127.
152. The prenatal gut microbiome: Are we colonized with bacteria in utero? / R. W. Walker, J.C. Clemente, I. Peter, R. Loos // *Pediatric Obesity*. – 2017. – V.12. – P.3-17.
153. Tynon, M. Simplified analysis of 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol and 110carboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol in human meconium: method development and validation / M. Tynon, M. Porto, B.K. Logan // *Journal of analytic toxicology*. – 2015. – V. 39. – P. 35-40.
154. Underwood, M.A. The Microbiota of the Extremely Preterm Infant / M.A. Underwood, Sohn K // *Clinical Perinatology*. – 2017. – V.44. – P. 407-427.
155. Vaiano, F. A novel, simultaneous extraction of FAEE and EtG from meconium and analysis by LC-MS/MS / F. Vaiano, D. Favretto, D. Palumbo et al. // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2016. – V.408. – P.2587-94.
156. Verhoff, M.A. On problems involved in DNA typing of faeces / M.A. Verhoff, F. Heidorn, S. Oehmke, G. Weiler // *Rechtsmedizin*. – 2002. – V.12 – P. 172-174.
157. Waldhausen, J.H.T. Meconium ileus / J.H.T. Waldhausen, M. Richards // *Clinical colon and rectal surgery*. – 2018. – V. – 31. – P.121-126.
158. Zou, Kai-Nan. Identification of vaginal fluid, saliva, and feces using microbial signatures in a Han Chinese population/ Kai-Nan Zou, Li-Jie Ren, Y. Ping // *Journal of Forensic and Legal Medicine*. – 2016. – V.43. – P. 126-131.

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2646813

**Способ установления наличия мекония и/или кала в следах  
на вещественных доказательствах**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО НижГМА Минздрава России) (RU)*

Авторы: *Эделев Николай Серафимович (RU), Федоровцев Андрей Леонидович (RU), Четвертнова Анна Павловна (RU)*

Заявка № 2017117541

Приоритет изобретения 19 мая 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 07 марта 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 19 мая 2037 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев

## РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2691727

Способ установления наличия кала в следах на  
вещественных доказательствах

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО "ПИМУ" Минздрава России) (RU)*

Авторы: *Четвертнова Анна Павловна (RU), Федоровцев Андрей Леонидович (RU), Эделев Николай Серафимович (RU)*

Заявка № 2018115660

Приоритет изобретения 26 апреля 2018 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 18 июня 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 26 апреля 2038 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Г.П. Ивлиев* Г.П. Ивлиев

