

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Веленко Павел Сергеевич

**Судебно-медицинская диагностика возрастных изменений дентина с
помощью хроматографических исследований**

14.03.05 – судебная медицина

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
член-корр. РАН, доктор медицинских наук
Пиголкин Юрий Иванович

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Морфологические методы изучения возраста костной ткани и зубов человека.....	15
1.2 Рентгенологические методы определения возраста твердых тканей.....	26
1.3 Методы оценки биологического возраста по биохимическому составу твердых тканей.....	31
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	36
2.1 Материалы исследования.....	36
2.2 Методы исследования.....	38
2.3 Характеристики оборудования и параметры хроматографического анализа.....	39
ГЛАВА III. СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕОПОЗНАННЫХ ТРУПОВ ПО ДАННЫМ БЮРО СМЭ Г. МОСКВЫ.....	41
3.1 Результаты эпидемиологической оценки неопознанных трупов по г. Москве.....	41
3.2 Общая характеристика современных методов изучения неопознанных трупов в медико-криминалистическом отделении.....	47
ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ДЕНТИНА.....	56
4.1 Разработка биохимической методики диагностики аминокислотного состава дентина с помощью хромато-масс-спектрометрического исследования твердых тканей зуба.....	56
4.2 Разработка цифровой методики определения биологического возраста человека на основании возрастной динамики форм аспарагиновой кислоты.....	86
ГЛАВА V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	97
ВЫВОДЫ.....	98

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	99
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

За последние десятилетия проблема определения биологического возраста человека стала одной из наиболее актуальных задач при идентификации личности [8, 15, 27, 30-38, 54, 57, 64, 85, 89, 107]. В случаях чрезвычайных происшествий, когда жертвы исчисляются десятками или сотнями трупов и сопровождаются значительным разбросом и повреждением не только мягких покровов, но и костных тканей, зачастую невозможно произвести непосредственное сопоставление фрагментов тела по области их анатомического расположения или по плоскости разделения [8, 9, 14, 55]. Генетические экспертизы, набирающие актуальность в последнее время, в ряде случаев могут оказаться непригодными ввиду высокой стоимости исследования и отсутствия генетического материала для сопоставления, при этом в нашей стране не существует единого банка генетических и биометрических данных населения. Поэтому в ситуациях подобного рода первоочередное значение приобретает оценка общегрупповых признаков [8, 9, 41, 54, 55, 62, 104]. К их числу относятся пол и возраст, масса тела, раса и этническая группа и др.

Зачастую эксперт исследует скелетированные трупы, костные фрагменты, а также тела, которые подверглись тем или иным посмертным изменениям: гниение, повреждение насекомыми и грызунами, воздействие природных факторов [31, 38, 55, 72]. В таких случаях традиционные методы опознания по частным признакам могут стать невозможными, и для установления личности также приходится использовать оценку общих признаков [8, 15, 37, 66].

Помимо этого, современное развитие цивилизации характеризуется резкой интенсификацией деятельности человека, в том числе активным вмешательством в окружающую среду. В истории человечества уже произошло множество техногенных катастроф, стихийных бедствий с разрушительными последствиями и массовыми человеческими жертвами, при этом опасность возникновения новых с каждым годом увеличивается. В частности, согласно данным, приведенным в

докладе Бюро по сокращению риска бедствий (UNISDR) ООН, с 1997 года по 2017 год в общей сложности более 4 млрд человек оказались затронуты стихийными бедствиями, а более 600 тысяч человек погибли в результате различных стихийных бедствий [117].

Вышеизложенные факты свидетельствуют об актуальности исследований по опознанию и экспертному отождествлению граждан, погибших в тех или иных трагических случаях. И террористические акты, и природные и техногенные катастрофы в большинстве своем сопровождаются не только большим количеством человеческих жертв, но и значительным разрушением человеческих тел. Это затрудняет, а в иных случаях полностью исключает возможность судебно-медицинской сортировки, основанной на визуальном опознании трупов [14, 55, 107].

К настоящему времени возрастной морфологией, лежащей в основе судебно-медицинского установления общегрупповых признаков, в частности, возраста, достигнуты значительные результаты [13, 55, 59, 66, 89, 91, 111, 116, 121]. Для установления биологического возраста человека на данный момент исследователями предложены многие десятки методов, при этом поиск новых методик ведется и в настоящее время [8, 107, 116]. Причиной этому является отсутствие на текущий момент единого метода определения возраста, который отвечал бы всем требованиям, предъявляемым к технике определения возраста: 1) точность, достаточная для применения метода в целях идентификации личности; 2) универсальность и применимость к большинству судебно-медицинских случаев определения возраста; 3) простота и воспроизводимость во всех судебно-медицинских учреждениях; 4) как можно меньшие затраты времени и ресурсов для проведения методики [122].

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

Научная новизна исследования

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

На основе полученных данных разработана судебно-медицинская цифровая методика определения биологического возраста человека по данным хромато-масс-спектрометрического исследования аспарагиновой кислоты в дентине зубов. Разработанная методика основывается на современных математических методах и использует показатели динамики аминокислотного состава тканей зуба, которые ранее не были изучены.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная судебно-медицинская цифровая методика определения возраста по степени рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине имеет ряд

преимуществ по сравнению с существующими на текущий момент способами установления биологического возраста.

Результаты определения биологического возраста с помощью оценки аминокислотного состава зуба наиболее близки к паспортному возрасту человека, что говорит о высокой точности метода. Для воспроизведения методики достаточно одного зуба идентифицируемого человека, в связи с этим метод определения возраста пригоден в подавляющем большинстве случаев судебно-медицинской идентификации личности неопознанных трупов. В исследовании используется небольшая часть зуба, поэтому оставшуюся зубную ткань можно хранить и использовать в случае назначения повторных судебно-медицинских экспертиз.

Методика не предполагает больших затрат времени или ресурсов и может быть воспроизведена с помощью стандартного оборудования химических и криминалистических лабораторий. Это обеспечивает ее легкое и быстрое внедрение в повседневную практику судебно-медицинского эксперта при установлении общих признаков личности.

Разработанная методика основывается на современных методах статистического анализа, применяемых к хроматографическим параметрам аминокислотного состава зуба, что исключает субъективность оценки результатов и обеспечивает высокую точность определения биологического возраста человека.

Методология и методы исследования

Методология исследования заключается в комплексном анализе научных трудов отечественных и зарубежных ученых в области возрастной морфологии твердых тканей костей и зубов. Теоретико-методологической основой разработки методики явилось предположение о динамике аминокислотного состава тканей костей и зубов, выдвинутое Р.М. Helfman и J.L. Bada [78].

Для детального изучения возрастных изменений применены хроматографический и масс-спектрометрический анализы с последующей статистической обработкой цифрового материала (Рис. 1). Диссертационное

исследование выполнено на материале зубной ткани от лиц известного возраста (16-76 лет).

На начальном этапе проанализированы данные отечественной и зарубежной литературы, посвященной изучению возрастной морфологии и биохимическому анализу твердых тканей человеческого организма.

На втором этапе был разработан методический подход к подготовке образцов и хромато-масс-спектрометрическому анализу. Для этого использовано 5 зубов от лиц в возрасте от 20 до 50 лет. Данные хроматографического исследования и масс-спектры полученных дериватов использованы в дальнейшем исследовании для калибровки параметров хроматографии и построении базы данных параметров аспарагиновой кислоты в дентине зубов.

На третьем этапе на основе данных анализа дериватов, полученных из предыдущих исследований, было исследовано 140 образцов человеческих зубов. Данные о количестве производных аспарагиновой кислоты в исследуемых образцах легли в основу построения базы данных для цифровой методики определения возраста.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена на четвертом этапе исследования при помощи прикладных субпрограмм программного продукта Microsoft Excel 2010 с соблюдением рекомендаций для медицинских и биологических исследований.



Рисунок 1 – Дизайн исследования

Основные положения, выносимые на защиту

1. Неопознанные тела, поступившие в ГБУЗ города Москвы «Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы» характеризуются рядом закономерностей в своем распределении по полу и возрасту и причинам смерти.
2. Разработанная биохимическая методика исследования твердых тканей зуба с помощью масс-селективной газовой хроматографии позволяет установить количество аминокислот в дентине и их возрастную динамику.
3. Аминокислотный состав дентина имеет ряд хроматографических параметров, имеющих сильную корреляционную связь с биологическим возрастом человека.
4. На основе степени рацемизации и количественного состава форм аспарагиновой кислоты в дентине разработаны судебно-медицинские критерии, позволяющие установить биологический возраст человека с точностью $\pm 2,4$ года, что дает возможность использовать их в целях идентификации личности.
5. Разработанная математическая модель судебно-медицинской диагностики биологического возраста на основе базы данных хроматографических

исследований твердых тканей зуба обеспечивает повышение точности результатов при определении биологического возраста человека.

Личный вклад автора

Весь представленный в диссертации материал обработан и проанализирован лично автором. Диссертант самостоятельно исследовал возрастные морфологические особенности дентина, принимал непосредственное участие в разработке методик пробоподготовки образцов дентина и хромато-масс-спектрометрического исследования. Помимо этого, автором был проведен подробный анализ полученных данных о закономерностях возрастных изменений аспарагиновой кислоты в дентине с применением современных методов математико-статистической обработки данных.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности результатов работы подтверждается большим объемом исследованного материала, использованием адекватных методов исследования, применением современных методик математико-статистической обработки данных.

Результаты исследования были доложены на заседаниях кафедры судебной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); на научно-практических конференциях ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (25 мая 2017г., 27-28 марта 2018г., 26-27 сентября, Москва); XXII международной выставке средств обеспечения безопасности государства «ИНТЕРПОЛИТЕХ-2018» (24-25 октября 2018г., Москва); VI международном молодежном научном медицинском форуме «Белые цветы» (10-12 апреля 2019г., Казань).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Публикации по теме работы

По теме диссертации было опубликовано 4 научные работы, из них 3 статьи в ведущих российских журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ и проиндексированных в базе данных Scopus.

Внедрение результатов исследования

Материалы диссертации включены в учебный процесс кафедры судебной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), ГБУЗ города Москвы Бюро судебно-медицинской экспертизы Департамента здравоохранения города Москвы.

Объем и структура диссертации

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

ГЛАВА I

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В судебно-медицинской экспертной деятельности постоянно встречаются трупы, личность которых не установлена. Важность достоверного установления личности подчеркивается как отечественными [5, 36, 37, 54], так и зарубежными авторами [93, 103, 107]. По данным статистических отчетов ФБР, ежегодно в США обнаруживаются в среднем 799 неопознанных трупов. При этом личность погибших устанавливается в 76,2% случаев. В Великобритании существует база данных неопознанных трупов, включающая в себя от 1000 до 1500 случаев и ежемесячно обновляющаяся. Около 500 реставрированных изображений трупов в настоящее время размещены на сайте Бюро пропавших людей Великобритании.

Проведение экспертиз неопознанных трупов является одной из наиболее сложных задач для эксперта, поскольку часто такие случаи связаны с криминальными действиями, и, к тому же, нередко эти трупы представлены скелетированными останками, обугленными телами или фрагментами тел. На месте происшествия при трупе иногда не обнаруживаются документы, удостоверяющие его личность. В таком случае, согласно «Инструкции об организации и тактике установления личности граждан по неопознанным трупам, больных и детей, которые по состоянию здоровья или возрасту не могут сообщить о себе сведения», руководитель следственно-оперативной группы проводит дактилоскопирование и изъятие вещей и предметов, которые могут представлять ценность для идентификации личности, а общие и частные признаки личности умершего тщательно описываются и фиксируются в протоколе осмотра места происшествия и в акте судебно-медицинского вскрытия. Затем проводится предъявление тела для опознания родственникам или иным лицам, которые могли знать покойного, если таковые люди имеются.

Достаточно большая часть трупов хоронится неопознанными, поскольку на практике не всегда удается установить личность умершего человека, даже при вышеописанной тактике. Среди причин могут быть: отсутствие лиц, способных

опознать личность покойного, отсутствие единой базы данных по отпечаткам пальцев или ДНК, сильно выраженные посмертные изменения трупа и многие другие.

В случаях, когда предъявление тела на опознание невозможно, приходится прибегать к другим методам идентификации личности, например, краниофациальной идентификации, анализу генетического материала или стоматологического статуса, а также современным методам лучевой и компьютерной диагностики. Если тело некому предъявить для опознания, то необходимо получить и зафиксировать как можно больше информации о нем, поскольку в дальнейшем она может потребоваться в случаях новых обращений о пропавших людях. Учитывая, что после смерти тело человека все сильнее подвергается трупным изменениям, в том числе разрушающим ткани, немаловажную роль при судебно-медицинском исследовании играет тщательное описание общих и частных признаков личности, максимально точное составление словесного портрета, а также применение дополнительных методов идентификации личности, для чего трупы или их останки направляются в медико-криминалистические отделения [72]. Зачастую при экспертизе человеческих останков или фрагментов тел возможно получить представление лишь об общих признаках личности, поэтому исследование костей и зубов является одним из приоритетных направлений судебно-медицинской идентификации личности.

К наиболее твердым тканям в организме человека относят костную ткань, эмаль, дентин и цемент. Эти ткани способны выдерживать большие функциональные нагрузки и играют важнейшую роль в жизнедеятельности организма благодаря уникальной структуре и составу.

Основой опорно-двигательного аппарата человека служит костная ткань. Структурно-функциональной единицей кости является так называемая «гаверсова система», или остеон. Остеон представляет собой вложенные друг в друга концентрические костные пластинки, окружающие гаверсов канал. Остеоны, подвергаясь разрушению, формируют вставочные межостеонные конструкции, анастомозирующие друг с другом и образующие сеть трабекул. В

зависимости от количества остеонов и их расположения различают компактное и губчатое вещество кости. Особое расположение пластинок в остеоне, а также высокое содержание (до 22%) неорганических веществ, в частности кристаллов гидроксиапатита, обуславливают прочность кости, а высокое содержание оссеина придает костям гибкость.

Эмаль, дентин и цемент относятся к твердым тканям зубов [49]. Основу зуба составляет дентин, который состоит из отростков одонтобластов и основного вещества с большим количеством коллагена и минеральных солей кальция, магния и натрия. Дентин растет на протяжении всей жизни человека за счет преддентина – неизвестного слоя дентина, наиболее близкого к пульпе. В области корня дентин покрыт цементом, напоминающим грубоволокнистую соединительную ткань из волокон коллагена и солей кальция, а в области коронки – эмалью. Эмаль зуба состоит из тонких удлиненных призматических образований, скрепленных основным, межпризматическим, веществом. Гомогенность и высокая степень минерализации (до 97%) позволяют эмали выдерживать колоссальные физические нагрузки, поэтому она считается наиболее прочной тканью человеческого организма.

Ввиду наличия высокой доли неорганических веществ и относительно стабильного метаболизма все вышеперечисленные ткани могут сохраняться в окружающей среде довольно долгое время, не теряя при этом своей первоначальной макро- и микроструктуры. Это позволило исследователям изначально разделить подходы к изучению возрастных изменений твердых тканей на три группы:

1) Морфологические методы – исследование проводится с использованием целой кости или ее фрагмента, а также зубных рядов в качестве объекта исследования. Данные методы включают макро- и микроостеоскопию и остеометрию, оценку стоматологического статуса и др.

2) Рентгенологические – объектом исследования является рентгенограмма кости или зубных рядов.

3) Биохимические – исследование включает в себя оценку биохимических особенностей костной и зубной ткани и их динамику.

1.1 Морфологические методы изучения возраста костной ткани и зубов человека

Одними из наиболее ранних методов изучения костей и зубов считаются остеометрические и остеоскопические, направленные на изучение и измерение макропризнаков твердых тканей. Подобные методы сразу нашли широкое применение в случае определения возраста, например, по прорезыванию зубов у детей или степени их стираемости у взрослых людей [1, 5, 39].

Начиная с 30-х годов XX века в нашей стране наблюдался подъем интереса к макро- и микроуровневой организации костной ткани, связанный с появлением работ Д.Г. Рохлина [55] и В.И. Добряка [14]. В основе методологии отечественных микрометрических исследований стала классификация остеонов и остеонных конструкций, которая была разработана Ю.М. Гладышевым [19]. Автор подсчитывал количество различных форм остеонов на определенной площади срезов трубчатых и других костей, используя сочетание микроскопического и микрорентгенографического методов. На основе этой методики был написан ряд других работ [19-22].

Сходная методика была разработана за рубежом в 1965 году Е.Р. Kerley [121]. Тем не менее, и метод Kerley, и его модификации [55, 110] не могут обеспечить необходимую точность подсчета форм остеонов и некоторых других элементов, и полученные результаты обладают низкой достоверностью [55].

Разработкой и усовершенствованием методик остеографии и остеометрии с целью определения возраста человека занималась В.И. Пашкова [54]. В своих трудах она оценивала сроки наступления синостозов и появления ядер окостенения, размеры костей, период окончательного формирования скелета, старческие изменения костной ткани, в частности, остеопороз, остеофиты, изменение структуры костей и др.

Й.-В.Й. Найнис и его коллеги предложили комплексный метод определения возраста по костной ткани [46]. Для установления возраста по костям верхних и нижних конечностей была разработана подробная схема, учитывающая макроскопические признаки: рельеф кости, шероховатость надмышцелковой области, выраженность ямочек и наростов. Авторы отметили значительные индивидуальные различия в темпах старения костей у лиц разных полов, обусловленные особенностями образа жизни, состоянием здоровья и многими другими причинами.

Проблеме определения общих признаков личности по костям черепа были посвящены работы В. Н. Звягина [13]. Автор тщательно изучил процессы заращения швов черепа, что позволило ему предложить объективные критерии установления биологического возраста человека. На основе исследования инволюционных изменений 65 количественных показателей была разработана 5-балльная шкала оценки степени заращения швов черепа. При этом внедрение методов статистической обработки данных и создание математических моделей позволило создать три методики определения возраста по черепу с учетом его формы и половой принадлежности. При использовании комплекса методик удалось добиться точности ± 5 лет.

В последнее время к процессам старения черепа отмечается высокий интерес. Avelar и соавт. [62] изучили возрастные изменения костей черепа и мягких тканей головы на 241 черепах от трупов обоих полов. Авторы отметили важность оценки возрастных изменений костей черепа в комплексе с кожей, подкожно-жировой клетчаткой и мышцами головы и лица.

Важный вклад в судебно-медицинскую остеологию внесли труды А.-А.К. Гармуса [7, 46]. Применение линейной регрессии для определения возраста по лобковому симфизу позволило добиться точности $\pm 4,1$ года у лиц от 15 до 40 лет, но у лиц старше 40 лет точность составила $\pm 7,2$ года. За рубежом также проводились исследования, посвященные возрастным изменениям таза. N. Sarajlic [106] изучал морфологические характеристики 120 пар лобковых костей эксгумированных трупов. Исследование проводилось по методике Suchey-Brooks,

которая подразумевает измерение параметров кости с последующим сравнением с эмпирическими стандартами и последующей статистической обработкой результатов, проводящиеся в 6 фаз. N. Sarajlic обнаружил крайне высокие стандартные отклонения в каждой фазе и пришел к выводу о значительных индивидуальных возрастных вариациях костей, неизбежно приводящим к недооценке реального возраста. В нашей стране также в настоящее время принимаются попытки оценки биологического возраста с использованием методики Suchey-Brooks [11].

Не ослабевает повышенный интерес и к макроостеометрии трубчатых костей [93, 115]. Показано, что размерные характеристики ключицы менее всего подвержены индивидуальным колебаниям по сравнению с другими костями скелета, что позволяет разрабатывать оригинальные методики определения возраста, по точности не уступающие существующим [93].

Определение пола и возраста до 23 лет по ребрам изучал А.И. Туровцев [14]. Размерные характеристики ребер, исследованные им, позволяли установить возраст с точностью до ± 5 -10 лет. За рубежом метод оценки возраста по стернальным концам ребер был предложен M.Y. Iscan, S.R. Loth и R.K. Wright [12]. Авторы изучали структуру и плотность костей, их рельеф и вид стенок у трупов в возрасте от 14 до 28 лет.

Известно большое количество методов установления возраста личности, предполагающих визуальную оценку интенсивности старческих изменений позвонков [102, 108].

Западными антропологами для приблизительной оценки возрастных изменений позвоночника был разработан метод оценки зрелости шейных позвонков (cervical vertebrae maturation, CVM) [102]. Однако, по данным А. Predko-Engel и соавт., L. Schoretsaniti и соавт. [102, 108], несмотря на достоверную корреляцию с возрастом, точность метода вызывает много вопросов при оценке зрелости позвоночника в период скачков развития у детей.

Целый ряд работ посвящен возрастной изменчивости подъязычной кости, челюстей и ребер [71, 118]. В настоящее время активно изучаются

инволюционные изменения в ткани турецкого седла, стенках синусов черепа, щитовидного хряща [16, 38].

В работе Г.В. Золотенковой и М.В. Федуловой [15] о возрастных изменениях костной ткани ребра и большеберцовой кости для исследования морфологических особенностей костной ткани была применена компьютерная система анализа изображений. Регрессионные уравнения, созданные с применением компьютерных технологий, позволили определить возраст человека с точностью $\pm 2,5$ -4 года.

За рубежом на сегодняшний день активно ведутся исследования возрастных изменений костной ткани с применением комбинации макро- и микроостеометрических методов. А. Bonicelli и соавт. [64] исследовали зависимость биомеханических свойств ребер от возраста на костях 24 индивидов. Результаты исследования были подвергнуты пошаговому регрессионному анализу, созданные уравнения демонстрировали точность определения возраста $\pm 3,4$ года. Тем не менее, авторы обратили внимание на возможность применения методики преимущественно на свежих телах, а также большое количество времени (36 часов), уходящего на одно исследование, что делает затруднительным использование методики в ситуациях с массовыми человеческими жертвами.

В последнее время установлено, что выбор изучаемых параметров в большой степени влияет на точность результатов определения возраста, и в настоящее время ведется поиск оптимального набора признаков [112]. На данный момент наибольшей точности удастся добиться с использованием комплекса разных методов [38].

Морфометрические параметры зубов человека уже давно расцениваются в качестве надежного критерия для идентификации личности [45, 92]. Подъем интереса отечественных и зарубежных судебно-медицинских экспертов к стоматологическому статусу человека в качестве критерия для отождествления личности наблюдается, начиная со второй половины XX века [27, 29]. Стоматологический статус в настоящее время рассматривается как неповторимое

сочетание особенностей зубов каждого отдельно взятого человека ввиду большого разнообразия формы, аномалий строения и расположения, патологических процессов и следов медицинских вмешательств [27, 91]. Одними из наиболее ценных трудов в судебно-медицинской стоматологии считаются работы Н.Г. Аболмасова [1]. Автор изучил возрастные особенности 2400 зубов передней группы от лиц в возрасте 20-40 лет. Исследуемые зубы были разделены на группы в зависимости от возраста и типа зуба. Н.Г. Аболмасов установил достоверное снижение высоты коронки и увеличение толщины стенок зубов с возрастом за счет истирания зуба и отложения вторичного дентина.

Определению возраста по степени стертости твердых тканей зуба посвящено большое количество работ [39, 40, 48, 51]. Существуют схемы и таблицы, позволяющие отнести человека к той или иной возрастной группе в зависимости от выраженности стертости зубов. К одной из наиболее ранних методик относится шкала стертости эмали, разработанная Р. Вгоса в 1878 году и усовершенствованная М.И. Герасимовым [48] (табл.1).

Таблица 1 – Степень стирания зубов верхней челюсти в условных показателях в зависимости от возраста (Герасимов М. И., 1955)

Возраст, годы	Резцы	Клыки	Малые коренные	Первые большие коренные	Вторые большие коренные
13—14	0—1	0	0	0	0
14—16	1	0	1	0	0
16—18	1—2	1	1	1	0
18—20	2—3	2	2	2	1
20—25	2—3	2	2	2	2
25—30	3	2	2—3	2—3	2
30—35	3	2—3	2—3	3	2—3
35—40	3	3	3	3—4	3
40—50	3—4	3—4	3—4	4	3—4
50—60	4—5	4	4	5	4—5
60—70	5—6	5	5—6	5—6	6

Отмечено, что с возрастом по мере стирания твердых тканей зуба их поверхность изменяется: эмаль мутнеет и теряет свой блеск, в ней появляются

трещины. Сходные изменения происходят в дентине и цементе [40]. А.А. Плишкина [39] провела комплексное стоматологическое обследование 283 пациентов в возрасте от 15 до 75 лет. При этом при оценке стертости зубов большое внимание было уделено сопутствующей патологии организма и условиям профессионального труда обследуемых. В результате был сделан вывод о важной роли в темпах стирания зубов заболеваний ЖКТ, сердечно-сосудистой и эндокринной систем, а также контакта с различными химикатами на производстве, что может оказывать существенное влияние на точность определения возраста.

Несмотря на высокую значимость оценки стоматологического статуса при идентификации личности, существует ряд условий для успешного выполнения данной задачи, в том числе высокая сохранность зубных рядов и наличие предварительных данных о состоянии зубов разыскиваемого человека для сопоставления [85]. На сегодняшний день в ряде случаев подобные условия не могут быть выполнены, и судебно-медицинские экспертизы часто проводятся по фрагментам костей или частям тел. Ю.Г. Кузина [26] изучала анатомо-морфологическое строение зубов у лиц в возрасте от 18 до 70 лет. Данные о макропризнаках 2434 зубов позволили не только изучить особенности твердых тканей зуба в девяти возрастных интервалах, но и установить положение изучаемого зуба в зубном ряду, что может быть использовано в случае исследования единичных зубов.

Для изучения морфологических характеристик твердых тканей могут использоваться шлифы зубов [2, 24, 25, 50]. Большинство подобных методик подразумевают фиксацию зуба, выпиливание и вытачивание участка зуба на определенном уровне до получения требуемой толщины, затем окрашивание препарата и изучение структур эмали и дентина с помощью оптической техники.

Морфологическая связь эмали с дентином и их структурные особенности подробно изучены в работах Ю.П. Костиленко и И.В. Бойко [24, 25]. Авторы отсекали корни интактных коренных зубов и погружали в 4% раствор глютарового альдегида на фосфатном буфере. В дальнейшем зуб подвергался

дегидратации с последующей пропиткой эпоксидной смолой, после чего полимеризованный блок разрезали в продольном направлении и шлифовали поверхности зуба. После окраски ткани зуба становились видны и при световой микроскопии, однако, более точное разграничение структур эмали и дентина было достигнуто авторами при получении угольных отпечатков с помощью напыления графита на нитроклетчатку. В итоге была подробно описана эмалево-дентинная граница, которая при сканирующей электронной микроскопии выглядит как кальцинированный волокнистый барьер, разграничивающий каналцы дентина и кристаллические образования эмали. Данная граница была отнесена к одному из слоев эмали. По сходной методике К.А. Удальцова исследовала нормальную структуру эмали и дентина молочных зубов [50]. Изучив 10 здоровых выпадающих молочных зубов, автор отметила больший объем полости пульпы и более тонкие слои эмали и дентина молочных зубов в сравнении с коренными. При окраске метиленовым синим и последующей световой микроскопии структура дентина молочных зубов не демонстрирует значимых морфологических отличий от таковой у коренных зубов, однако при электронной микроскопии выявлено, что перитубулярный дентин обладает более рыхлой структурой, а эмалево-дентинная граница не прослеживается, за исключением терминального слоя плащевого дентина, что способствует интенсификации обменных процессов в твердых тканях зуба.

Одним из простых способов изучения строения твердых тканей зуба – получение среза на замораживающем микротоме [18, 119]. Эта техника исследования включает быстрое помещение зуба в жидкий азот без предварительной декальцинации, и последующее получение среза с использованием криостата. Получаемые при этом срезы полностью сохраняют оригинальное строение клеточных и внеклеточных образований и могут быть пригодны не только для световой и электронной микроскопии, но и для иммуногистохимического анализа. Проводя исследование на 12 резцах от самцов крыс, R.A. Williamson [119] использовал тетрациклин в качестве индикатора роста твердых тканей зубов. Получив продольный срез зуба на замораживающем

микротоме, автор имел возможность визуализировать все кальцинированные и некальцинированные структуры зуба, в которых отчетливо были видны прокрашенные тетрациклином флюоресцирующие слои, соответствующие зонам роста твердых тканей зубов.

Учитывая наличие в дентине определенных «зон роста», существуют предположения о том, что они могут быть использованы для определения возраста зуба [18]. Однако наибольшее развитие подобная теория получила при изучении годовых слоев в зубах животных, нежели человека. Преимущество этого метода состоит в том, что он не требует предварительной фиксации зубов в каких-либо средах, поэтому можно использовать также и нативный трупный материал.

Поскольку зубы человека рано прекращают свой рост, для исследования годовых слоев можно использовать как продольные, так и поперечные шлифы и срезы зубов.

Во многих случаях удастся визуализировать годовые слои дентина при приготовлении аншлифов зуба, когда зашлифовывается лишь одна сторона рассеченного зуба. В таких случаях либо шлифуется поверхность среза, либо половина зуба стачивается и дошлифовывается механически. Сточить лишнюю часть зуба можно с помощью стоматологических инструментов с алмазным напылением, после чего прибегают к шлифовке на мелкозернистых камнях. Часто для получения тонких шлифов пользуются фиксацией зуба в эпоксидных смолах.

Для приготовления шлифов можно использовать механические приспособления, в частности специально сконструированные точильные станки. В станок, конструкционно сходный с токарным, монтируются карборундовые камни с мелкой зернистостью. Шлифовка должна происходить под постоянным промыванием водой. Преимущество автоматизированного получения шлифа из предварительно фиксированного в жидких средах зуба в том, что в процессе шлифовки можно добиться истончения шлифа до 25 мкм, что невозможно при ручной шлифовке. Однако на шлифах такой толщины оценка годовых слоев дентина весьма затруднительна, поэтому некоторые авторы рекомендуют

шлифовать зуб до 100 мкм [18]. Для более отчётливой визуализации можно использовать 5% раствор азотнокислого серебра, либо 5% муравьиной кислоты с последующей фиксацией шлифа в 10% растворе тиосульфата натрия. Это позволяет разграничить слои дентина на темные и светлые полосы.

Более простой способ выявления годовых колец был описан Г.А. Федосеевым [18] при исследовании клыков кольчатых нерп: автором было предложено изготавливать срезы зуба после предварительной декальцинации в 10-12% растворе азотной кислоты в течение 24 часов, после чего срез возможно было выполнить любым острым режущим предметом. Метод оказался очень удобным в случае необходимости обработки большого количества поступившего материала, а также отсутствия сложного и дорогого оборудования, однако определение зон дентина на таких срезах затруднено вследствие проведенной в ходе подготовки декальцинации твердых тканей.

Г.А. Клевезаль [18] предлагает использовать более щадящий способ декальцинации зуба с помощью 5—7% раствора азотной кислоты, при этом время декальцинации можно сократить, если использовать в исследовании не весь зуб целиком, а лишь требуемую часть зуба. Плотность и размеры зуба также влияют на время декальцинации, поэтому оно может варьировать в пределах от 6 часов до нескольких дней. После тщательной промывки зуб можно залить в один из распространенных в подготовке препаратов материалов, в том числе парафин или желатин. Достоверных различий в результатах микроскопического исследования при изготовлении препарата с использованием различных техник обнаружено не было.

Для получения среза 15-30 мкм Г.А. Клевезаль использовала замораживающий микротом. Срезы такой толщины требовали основательной обработки, поэтому после промывания в дистиллированной воде они были прокрашены гематоксилином Эрлиха с последующей проводкой по глицеринам, доходя до чистого глицерина. Это позволяло видеть слои дентина как чередование полос различной ширины и интенсивности окрашивания. Автор также указывает на необходимость дифференцировки тканей после окрашивания,

поскольку твердые ткани, в том числе эмаль и цемент, прокрашиваются гематоксилином одинаково. Срез необходимо поместить в подкисленный этанол, затем тщательно промыть и провести по водным растворам глицерина нарастающей концентрации [18].

Подобные методы имеют ряд недостатков. Проводка по растворам очень сложна в случаях работы с образцами малого размера и особенно – в случаях с необходимостью исследовать множество образцов одновременно. К тому же препараты, получающиеся при такой дифференцировке среза имеют ограниченный срок годности – доказано, что гематоксилин в таких «временных» препаратах постепенно разрушается, и твердые ткани меняют свою окраску. Существуют различные техники подготовки препаратов и микроскопических исследований, которые позволяют избежать вышеуказанных проблем, но их исполнение требует большего количества времени и ресурсов [6].

Несмотря на большое количество данных о возможности определения возраста на шлифах, аншлифах и срезах зубов различных млекопитающих, в мировой литературе не встречаются данные о применении подобных гистологических техник для зубов человека. Это может быть связано с быстрой остановкой роста зубов человека, а также некоторыми различиями в структуре твердых тканей зубов человека и животных, обусловленными особенностями условий жизни, питания и др. И.Н.Антонова и соавт. [2] предложила модификацию методики подготовки шлифов человеческих зубов для исследования с помощью атомно-силовой микроскопии. Изучая продольные и поперечные шлифы зубов от живых лиц в возрасте от 18 до 30 лет, авторы отметили, что эмаль и дентин сходны по своему строению, но имеют различия в плотности и форме составляющих неорганического компонента. Особое расположение структур твердых тканей обуславливает их исключительную прочность.

За рубежом первые попытки определения возраста по параметрам зубов предпринимались в Великобритании в начале XIX века, когда остро встали проблемы использования детского труда и оценки сроков наступления уголовной

ответственности. В связи с отсутствием централизованной регистрации рождаемости, в случаях, когда требовалось определить возраст, его рассчитывали, исходя из роста ребенка [112]. В 40-х годах XIX века появились предположения, а затем и научные доказательства более высокой надежности установления возраста по параметрам развития зубов по сравнению с длиной тела [112]. В 60-х годах прошлого века большую популярность приобрел метод Густавсона [82], которым пользуются и в настоящее время. G. Gustafson было предложено использовать в качестве индикаторов возраста зубной ткани: стертость поверхностей, выраженность периодонтита, особенности отложения вторичного дентина, формирования цемента, а также степень резорбции и прозрачность корней зубов. Оценивая выраженность данных признаков с помощью четырехбалльной шкалы, автор добился точности в 4-6 лет при использовании однокорневых зубов передней группы. Средняя ошибка результатов определения возраста сильно возрастала в случае исследования зубов с патологическими изменениями, однако метод послужил отправной точкой для многих зарубежных исследователей [82, 103]. G.D. Dalitz [103] предложил оценивать предложенные признаки по пятибалльной шкале для повышения точности и обнаружил, что степень резорбции корней и формирование цемента практически не коррелирует с возрастом. В то же время G. Johanson [103] разработал поправочные коэффициенты для формул Густавсона и ввел семь степеней выраженности указанных им признаков. T. Solheim [103] добавил к шести признакам три новых: неровность поверхности, цвет и пол, которые, как было доказано, могут влиять на точность оценки возрастной морфологии зуба.

Н. Lamendin и соавт. [116] предложили более точный метод для оценки возраста по морфометрическим параметрам зубов по сравнению с методом Густавсона. Изучив 306 зубов людей известного возраста (от 20 лет и старше), пола и расы, авторы пришли к выводу о высокой корреляции биологического возраста человека с некоторыми макроскопическими характеристиками зуба, в том числе выраженностью периодонтита, резорбцией корня и его высотой. Необходимые параметры измерялись штангенциркулем и миллиметровой

линейкой, в связи с чем погрешность определения возраста составила $\pm 8,4$ лет. Позже Н.М. Liversidge и Т.И. Molleson [66] разработали уравнения множественной регрессии для определения возраста у лиц от первого дня после рождения до 19 лет. При этом было установлено, что дополнительное использование рентгенографических изображений зубов существенно повышает точность оценки возраста.

1.2 Рентгенологические методы определения возраста твердых тканей

Внедрение рентгенографического метода в судебно-медицинскую практику позволило значительно повысить точность исследований, как на макроструктурном, так и на микроструктурном уровнях. Использование рентгенограмм внесло значительную ясность в морфологию и патогенез инволюционных изменений костной ткани [41, 43].

Вскоре после того, как появился метод рентгенографии, исследователи начали изучать различные отделы человеческого скелета на предмет оценки признаков старения: кости [13, 56, 63], суставы [42, 99], зубы [29, 80, 95].

Одним из основоположников изучения старческих изменений скелета рентгенологическими методами в нашей стране является Д.Г. Рохлин [42, 55]. В своих исследованиях темпов старения костей кисти, Д.Г. Рохлин установил влияние пола на динамику старческих изменений и отсутствие профессиональных влияний на нее, а также разработал стандарты для пятилетних возрастных интервалов [10].

Метод балльной оценки возрастных изменений костей кисти был разработан О.М. Павловским [28]. Было предложено оценивать такие признаки, как остеопороз, остеофиты, остеосклероз и различные нетравматические суставные деформации. В дальнейшем метод был модифицирован Ю.И. Пиголкиным и соавт. [30-36]: вышеуказанные параметры на рентгеновских снимках оценивались не только на предмет их наличия или отсутствия, но и их степени выраженности. Проанализировав 594 рентгенограммы левых кистей лиц

обоих полов, авторы обнаружили появление первых инволюционных признаков на костях кисти уже в возрасте 20-24 лет, что говорило о широком диапазоне ее возможного применения. Дифференцированная балльная оценка параметров с учетом применения современных методов статистической обработки данных позволила обнаружить закономерности возрастной динамики признаков старения кисти у мужчин и у женщин [31, 34]. В частности, было выявлено более интенсивное развитие апиостозов у мужчин в возрасте до 30 лет и более раннее начало остеопоротических проявлений на дистальных фалангах кисти у женщин.

За рубежом знания о возрастных изменениях костей верхней конечности были систематизированы американскими радиологами W.W.Greulich и S.I.Pyle в отдельном атласе [73]. Авторы предложили использовать накопленные в атласе эмпирические данные в качестве стандартов для определения возраста костей кисти и выделили несколько опорных характеристик для сравнения, в том числе наличие или отсутствие пястных точек окостенения у детей и форму эпифиза у взрослых [101]. Более обширно этот вопрос рассмотрели в 2004 году V.Gilsanz и O.Ratib [76], создавшие свой атлас возрастных изменений кисти, который включает, помимо рентгенографических снимков, главы, посвященные развитию кости, а также обзор современных методик. Еще один атлас, посвященный оценке возрастных и патологических изменений зубов и челюстно-лицевой системы, был создан профессором И.А. Шехтером и соавт. [53] в 1968 году.

Е.П. Подрушняк проводил исследования инволюционных изменений анатомических, рентгенологических и гистологических параметров костей таза [31]. Исследователь выдвигает гипотезу о компенсаторно-приспособительном характере появления остеофитов благодаря выполнению ими функции опоры при уменьшении количества костной ткани.

Закономерности старения различных отделов скелета физической нагрузки на него изучал также Б.А. Никитюк [55]. Им был показан двоякий характер влияния нагрузок на процесс остеогенеза. В более раннем возрасте функциональные нагрузки ускоряют рост и формирование костной ткани, а в

пожилом и старческом замедляют. Такое же неоднозначное действие оказывают и статические нагрузки.

В последнее время активно накапливаются данные об изучении костной ткани на принципиально новом уровне – наноструктурном [22]. В нашей стране на базе Омского государственного медицинского университета ведутся исследования по изучению возрастных изменений твердых тканей человеческого организма. В работах В.П. Конева и соавт. [20-22] методом атомно-силовой микроскопии были получены данные об индивидуальном строении костей и зубов человека и животных, а также изменениях их структуры при различных патологических состояниях, в том числе остеопоротических изменениях. При этом авторы указывают на необходимость комплексного подхода к изучению структуры твердых тканей: наиболее рациональным ими было признано сочетание макро-, микро- и наноструктурного методов [22].

Для определения возраста грудных детей на текущий момент разработаны эхографические методы, позволяющие оценить наличие и размер ядер окостенения, которые у зрелых детей появляются в детерминированные периоды времени [4].

Рентгенографические изображения зубочелюстной системы также достаточно хорошо изучены, и их оценка считается одним из основополагающих методов идентификации личности [83, 89, 98]. С.А. Вайндрух [55] изучал рентгенологические особенности роста и развития зубов у детей в возрасте от 5 до 15 лет. На основе анализа рентгенограмм 1025 детей (533 девочки и 492 мальчика) автор составил подробную схему сроков обызвествления и прорезывания постоянных зубов с учетом типа зуба и пола ребенка.

В последнее время появляется большое количество данных об использовании ортопантомограмм в качестве одного из важных носителей информации о личности человека [17, 23, 51, 109]. Е.Я. Костенко и соавт. [23] использовали данные 112 ортопантомограмм стоматологических пациентов обоих полов в возрасте от 18 до 45 лет и доказали эффективность изучения параметров перенесенного стоматологического лечения в целях идентификации личности.

Данный успех авторы объяснили высокой степенью сохранности твердых тканей зуба в изучаемом возрасте, что способствует длительному сохранению следов перенесенного медицинского вмешательства, которые можно использовать для сопоставления с исходной информацией о пропавшем человеке методом «контрастного контурирования ятрогенных вмешательств». Г.К Казанджян, П.О. Ромодановский и соавт. [17] на основании данных 150 ортопантограмм выделили две возрастных группы: от 8 до 20 лет и от 21 до 60 лет. Исследователи пришли к выводу, что патологические изменения и заболевания зубочелюстной системы, а также следы медицинских вмешательств могут считаться надежными идентифицирующими признаками.

R. Cameriere и соавт. [58] предложил оценивать возраст по степени формирования верхушек корней постоянных зубов. По мере формирования корня зуба и в дальнейшем с возрастом наблюдается постепенное сужение апикального отверстия вплоть до его закрытия. Исследуя рентгенограммы коренных зубов левой половины нижней челюсти, R. Cameriere подсчитывал количество корней зубов с полностью закрытым отверстием верхушки, а также измерял диаметр отверстий у остальных корней [68, 94]. Автор создал уравнение регрессии с поправочным коэффициентом для лиц мужского пола, позволяющее с достаточной точностью установить возраст детей и подростков, однако методика не может быть применена у взрослых людей.

В настоящее время за рубежом активно развивается метод определения индекса полости пульпы [59-61]. Установлено, что с возрастом объем пульпарной полости уменьшается, при этом корреляционная связь объема полости с возрастом наиболее заметна в премолярах и молярах нижней челюсти. Индекс полости пульпы являет собой соотношение длины полости с длиной всего зуба [87]. Размерные характеристики, требуемые для расчета индекса легко получить с помощью панорамной рентгенографии, и метод может применяться, в том числе и при установлении возраста у живых лиц [100].

Несмотря на большое количество преимуществ при идентификации личности по данным рентгеновских исследований, точность таких данных

последнее время подвергается некоторой критике. Существуют данные [44, 97], показывающие, что технология получения ортопантомограмм подразумевает наличие наложения частей проксимальных поверхностей зубов друг на друга, что полностью исключает возможность исследования передней группы зубов. Помимо этого, степень искажения рентгенологических характеристик может различаться в зависимости от модели пантомографа, программы цифровой обработки данных, жесткости излучения и неаккуратном соблюдении методики съемки, что делает оценку таких данных весьма субъективной.

Для повышения точности оценки биологического возраста оценивается степень минерализации твердых тканей скелета посредством измерения оптической плотности её изображения с помощью фотометра и денситометра [111]. Было выявлено, что минеральная плотность костей до 30 лет практически не изменяется, а в старших возрастных группах достоверно уменьшается, и этот параметр может использоваться наряду с другими признаками в составлении регрессионных уравнений для вычисления биологического возраста человека в судебно-медицинских целях [8]. B.S. Kraus и R.E. Jordan [88] изучали процессы минерализации зачатков резцов у плодов, начиная с 16-й недели их внутриутробного развития. На основании результатов рентгенографического метода ими было выделено десять стадий минерализации зубов, при этом девятая стадия делится на три этапа, а десятая – на пять этапов. Созданные авторами таблицы демонстрировали интенсивную возрастную динамику минерализации зубов вне зависимости от пола человека.

Таким образом, было научно доказано, что возрастные изменения костей и зубов имеют крайне высокую индивидуальную вариабельность в сроках наступления и темпах развития. Существует большое количество факторов, ускоряющих и замедляющих старение твердых тканей: генетические предпосылки, пол, гормональный статус, физическая нагрузка, особенности профессиональной деятельности и многие другие. Определение возраста по макро- и микроструктуре костной ткани может вызывать затруднение без учета большого количества дополнительных условий, что обуславливает высокую

погрешность у многих существующих на сегодняшний день методов, если они применяются не в комплексе. Это побуждает исследователей продолжать поиск, направленный на создание точной и универсальной методики.

1.3 Методы оценки биологического возраста по биохимическому составу твердых тканей

Высокая устойчивость костей и твердых тканей зуба, как и относительно низкий уровень метаболической активности обуславливается высоким содержанием в этих тканях неорганических веществ. Неорганический компонент в эмали составляет 97-98,5%, оставшаяся доля вещества эмали приходится в основном на белки типа кератинов с большим количеством лизина, серина, глицина и оксипролина в своем составе. Содержание неорганического компонента в дентине несколько меньше, около 70% от основной массы, и его белки больше сходны с коллагеном, поскольку в них отсутствуют серосодержащие аминокислоты, но наблюдается большая доля глицина, пролина и оксипролина [49]. Это так же способствует высокой устойчивости подобных белков к метаболизму и изменениям внешней среды.

В тканях человеческого организма, в том числе и тканях зуба, все белки за редким исключением построены из L-аминокислот. Однако некоторые аминокислоты, имеющие в своем составе хотя бы один хиральный центр, то есть атом углерода с четырьмя разными радикалами, способны переходить в D-форму со временем и образовывать рацемат. Как и подавляющее большинство известных химических реакций, этот процесс ускоряется и замедляется в зависимости от температуры, в которой он протекает. Первые исследования в этой области были выполнены J.L. Bada [78], сотрудником института океанографии Стриппса в Сан-Диего, а также P.E. Hare, R.M. Mitterer [77]. В 60-х годах прошлого века на основе данных, полученных при изучении аминокислотной составляющей окаменелых морских раковин, ученые доказали, что процесс рацемизации аминокислот имеет постоянную скорость при определенной температуре окружающей среды. При

первичных подсчетах в год около 0,1% аминокислот переходит в D-форму при температуре, близкой к температуре человеческого тела. За рубежом этот метод стал широко применяться при изучении возраста окаменелостей и других археологических находках биологического происхождения. Сочетание D- и L-форм некоторых аминокислот, в частности аспарагиновой кислоты, позволяло определить возраст с точностью, вполне пригодной для нужд археологии и антропологии [69, 79, 84, 96].

С 1975 года было предпринято большое количество попыток адаптировать метод определения возраста по степени рацемизации аминокислот в тканях организма под требования судебно-медицинской идентификации личности [57, 75, 86]. Р.М. Helfman и J.L. Bada пришли к выводу, что одним из наиболее надежных индикаторов возраста человека могут служить аминокислоты белков эмали в связи с высокой долей неорганического компонента в ней. R.C. Griffin и соавт. [75] при изучении 44 зубов известного возраста, взятых от исследованных трупов, смогли добиться точности при определении биологического возраста этих людей в $\pm 6,2$ -8,7 лет. Подобная погрешность результатов была объяснена авторами как недостаточная чистота образцов (13 из 44 зубов были с выраженными кариозными изменениями), а также неоднородностью состава и разным количеством эмали на разных зубах. Впоследствии эта теория нашла некоторое подтверждение в ряде других работ [57, 86], в которых было доказано, что разные типы зубов демонстрируют разную степень рацемизации аминокислот у одного и того же человека. К. Kiran [86] показал, что усредненные показатели содержания D-изомеров аминокислот в твердых тканях зуба в зависимости от их типа уменьшаются в следующем порядке: первый моляр > второй моляр > второй премоляр > первый премоляр > клыки > центральные резцы > боковые резцы.

В настоящее время аминокислотный состав эмали не является ведущим параметром для оценки биологического возраста человека. Во-первых, отбор образцов эмали для хроматографических исследований представляет трудности, особенно у людей старшего возраста, что связано с износом и стиранием ткани, а также распространенным кариозным и другим патологическим изменениям

эмали. Во-вторых, среди всех твердых тканей зуба именно эмаль более всего подвержена колебаниям температуры в полости рта, в том числе, при приеме горячей и холодной воды и пищи, что может влиять на скорость биохимических реакций в белках эмали. Все эти факторы делают константу скорости рацемизации менее предсказуемой, и погрешность определения возраста по аминокислотному составу эмали может достигать ± 11 лет [57]. В сравнении с эмалью, дентин зуба гораздо менее подвержен как кариозным и другим патологическим изменениям и разрушениям, так и температурным воздействиям, поскольку хорошо защищен эмалью и цементом, и многие исследователи [57, 77] убедительно доказали преимущество в точности определения биологического возраста при исследовании образцов с чистым дентином. В том числе, J.L. Bada и P.M. Helfman обнаружили при исследовании 20 зубов от людей в возрасте 11-75 лет, что аминокислотный состав дентина по сравнению с эмалью позволяет более достоверно и точно охарактеризовать возрастные изменения зуба и больше коррелирует с биологическим возрастом человека, и рекомендовали использовать дентин в качестве его индикатора [78].

Впоследствии за рубежом к оценке динамики аминокислотного состава дентина было применено несколько разнообразных подходов с получением единичных разрозненных результатов [67, 86, 104, 114]. Так, Н. Mörnstad и соавт. [114] при статистической обработке результатов исследования 51 зуба лиц известного возраста от 3 до 86 лет указали на сильную корреляцию ($k = 0,97$) биологического возраста с количеством D-аспарагиновой кислоты в дентине, однако установленный возраст при этом отличался от реального на ± 12 лет. V.A. Carolan и соавт. [67] пришли к выводу о наличии прямой зависимости степени рацемизации некоторых хиральных аминокислот от возраста зуба. Исследуя возрастную динамику содержания в дентине D- и L-форм серина, а также аспарагиновой и глутаминовой кислот, авторы указали на некоторые погрешности в результатах при изучении глутаминовой кислоты. Используя материал нескольких крупных стоматологических клиник, V.A. Carolan удалось накопить большое количество образцов и максимально повысить достоверность

получаемых результатов. Исследования показали одинаковую эффективность, как при установлении возраста современных людей, так и при изучении 8 образцов дентина из человеческих останков 18-19 века, обнаруженных в захоронении на территории одного из европейских монастырей: во всех случаях реальный возраст отличался от установленного не более, чем на 12 лет. Авторы убедительно доказали перспективность исследований, рекомендовали продолжить дальнейший поиск способов повышения точности метода.

Для усовершенствования метода и повышения его точности S. Ohtani [57] исследовал изменения аминокислотного состава в пределах одного зуба. Не применяя отделения эмали от дентина с целью упрощения методики подготовки образцов, автор изучал содержание изомеров аспарагиновой кислоты в продольных и поперечных срезах зуба. Результаты показали, что продольные срезы зуба демонстрируют более высокую корреляцию аминокислотного состава ($k = 0,995$), чем поперечные ($k = 0,984-0,987$), поскольку количество D-форм аспарагиновой кислоты в зубах лиц молодого возраста различалась в пределах одного зуба. S. Ohtani было установлено, что в таком возрасте наблюдается увеличенное количество D-изомеров в верхушках корней и коронке зуба, при этом в старших возрастных группах подобной разницы не наблюдалось. Продольные срезы зуба позволяли изготовить образец для исследования с вовлечением всех зон зуба, поэтому точность исследования повышалась, однако изготовить необходимый продольный срез требует определенного навыка и затраты большого количества времени. Несколько лет назад группой польских ученых во главе с K. Wochna эта методика была модифицирована в попытке упростить процесс подготовки образцов дентина к исследованию [120]. Ученым удалось значительно сократить протокол лабораторной обработки дентина, при этом существенно не влияя на результат определения возраста. В ходе получения образца для хроматографии авторы забирали дентин из области перехода коронки в корень зуба, где, согласно исследованиям Ohtani, дентин содержал наиболее стабильное количество аспарагиновой кислоты. Требуемая зубная ткань выпиливалась с помощью алмазного бура под постоянным охлаждением.

Подобный подход широко используется авторами последнее десятилетие [122], поскольку позволяет отделить дентин от других зубных тканей с максимальной чистотой. Однако даже при постоянном охлаждении дистиллированной водой получаемый образец нагревается при выпиливании, что может оказывать влияние на точность определения возраста. Отрабатывая полученную методику на 75 зубах разных типов, взятых у трупов польского населения с возрастом от 20 до 68 лет, К. Wochna и соавт. получили результаты с погрешностью определения возраста до 10 лет.

В целях максимального упрощения методики Sacuma и соавт. [105] в своих трудах проверили возможность определения возраста по аминокислотной вытяжке из цельного зуба. Исследуя 12 пар клыков, взятых из нижней челюсти от трупов известного возраста, авторы использовали один клык из пары для приготовления образца чистого дентина, а второй клык подготавливали для хроматографического исследования целиком. В результате погрешность при использовании цельного зуба составила $\pm 7,4$ года, и хотя простота пробоподготовки зуба являлась большим преимуществом, использование данной методики для определения возраста человека с целью последующей идентификации личности оставалось неочевидным.

Таким образом, подавляющее большинство авторов, занимающихся изучением возрастной динамики аминокислот твердых тканей зуба, отметили перспективность данного направления для установления биологического возраста человека. Однако для того, чтобы данный метод нашел широкое применение в судебной медицине, необходимо решить целый ряд первостепенных задач.

ГЛАВА II

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

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

Для хроматографии объектом исследования послужили коренные зубы, удаленные у 145 неопознанных трупов (106 мужчин и 39 женщин) в рамках стандартного медико-криминалистического исследования возраста (Табл. 2). При этом были выбраны трупы, которые впоследствии были опознаны, и их возраст находился в диапазоне от 16 до 76 лет. Исследование проводилось на твердых тканях 1-х премоляров, при этом зубы с сильными кариозными изменениями в исследование не включались.

Таблица 2 – Распределение материала исследования по изучаемым возрастным интервалам

Возрастной интервал	Количество зубов, шт
16-20	12
21-25	16
26-30	11
31-35	12

Продолжение Таблицы 2

36-40	11
41-45	12
46-50	13
51-55	12
56-60	11
61-65	11
66-70	11
71-76	13
Всего	145

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

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

Разработка методики изучения аминокислотного состава дентина была осуществлена в два этапа. На первом этапе было необходимо вычислить вес образцов, достаточный для достоверного результата на хроматограмме. Для этого из тканей двух зубов доноров в возрасте 23 и 25 лет изготовили по 5 проб весом 5, 10, 50, 100 и 200 мг. На втором этапе исследования, с учетом полученных результатов, из зубов от доноров 20, 35 и 50 лет было изготовлено по 6 проб, которые были разделены по 2 образца для каждого дериватизирующего агента.

С использованием стандартов в SCAN режиме были изучены масс-спектры полных дериватов D- и L-аминокислот и получены интенсивности сигналов ионов в зависимости от отношения массы к заряду (m/z). В связи с относительно низким содержанием изучаемых веществ в зубной ткани для идентификации был сформирован SIM режим и проведен поиск дериватов в остальных анализируемых образцах зубной ткани по основным характеристическим ионам. Всего для исследования было изготовлено 163 образца зубной ткани с учетом того, что на

этапе разработки методики из одного зуба изготавливалось сразу несколько образцов.

2.2 Методы исследования

Достижением указанных выше целей и задач исследования послужили:

– **общенаучные и специальные методы**, в частности: системно-структурный анализ, наблюдение, описание, метод формальной логики – анализ и синтез, индукция и дедукция, сравнение, аналогия, обобщение, гипотеза;

– **статистический метод** - статистическая обработка данных произведена с использованием прикладных субпрограмм программного продукта Microsoft Excel 2000 в разделе описательной статистики, определения стандартных отклонений и сравнения выборок; полученные данные обрабатывали статистически с помощью корреляционного и регрессионного анализа, а также с определением средней арифметической, средней ошибки средней арифметической.

– **биохимические методы** – механическая и химическая обработка зубов, приготовление образцов дентина для хромато-масс-спектрометрического исследования и само исследование.

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

Гидролиз измельченных тканей зуба проводился 6М метанольным раствором HCl в течение 12 часов при комнатной температуре (21°C). Получение

полного деривата аспарагиновой кислоты после гидролиза осуществлялся одним из трех дериватизирующих агентов: трифтороуксусный ангидрид, 3,5-бис(трифлуорометил) бензоил хлорид и пентафлуоробензоил хлорид.

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

2.3 Характеристики оборудования и параметры хроматографического анализа

Общие параметры хроматографирования:

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

Условия хроматографирования частичных дериватов диметилowych эфиров энантиомеров аспарагиновой кислоты:

- объем вводимой пробы: 1 мкл
- скорость потока: 1,6 мл/мин
- начальная температура колонки: 130°C

- выдержка: 1 минута, скорость подъема 0,5 °C в минуту до 135 °C
- интервал сканируемых масс: 35-200 m/z
- предел открытия 77 нг во вводимой пробе для диметилового эфира D - аспарагиновой кислоты, 67 нг – для диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты

Условия хроматографирования полных дериватов эфиров энантиомеров аспарагиновой кислоты:

- ввод пробы: импульсный, без деления потока;
- импульсное давление: 60.00 psi;
- время импульса: 0.50 мин;
- поток продувки: 50.0 мл/мин;
- время продувки: 1.00 мин;
- общий поток: 53.4 мл/мин;
- объем вводимой пробы: 5 мкл;
- скорость потока: 0,5 мл/мин;
- начальная температура колонки: 50°C;
- выдержка: 2 минуты, скорость подъема 20°C в минуту до 220°C;
- интервал сканируемых масс 29-550 m/z;
- время удерживания в SIM-режиме для деривата D-формы – 10,479 минут, для деривата L-формы – 10,838 минут.

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

ГЛАВА III

СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕОПОЗНАННЫХ ТРУПОВ ПО ДАННЫМ БЮРО СМЭ Г. МОСКВЫ

3.1 Результаты судебно-медицинской эпидемиологической оценки неопознанных трупов по г. Москве

По архивным данным экспертиз танатологических отделений всего изучено 513 случаев за 2012 год, 506 за 2013, 492 за 2014, 393 за 2015 и 374 за 2016 год.

Результаты погодового распределения неопознанных тел по полу и возрасту представлены на рис. 2 и рис. 3. При этом в 18 случаях установить пол человека оказалось невозможным. Возраст не был установлен в 4 случаях. В каждом из этих случаев пол также не был установлен.



Рисунок 2 – Погодовое распределение неопознанных трупов по возрастам за 2012-2016 гг.

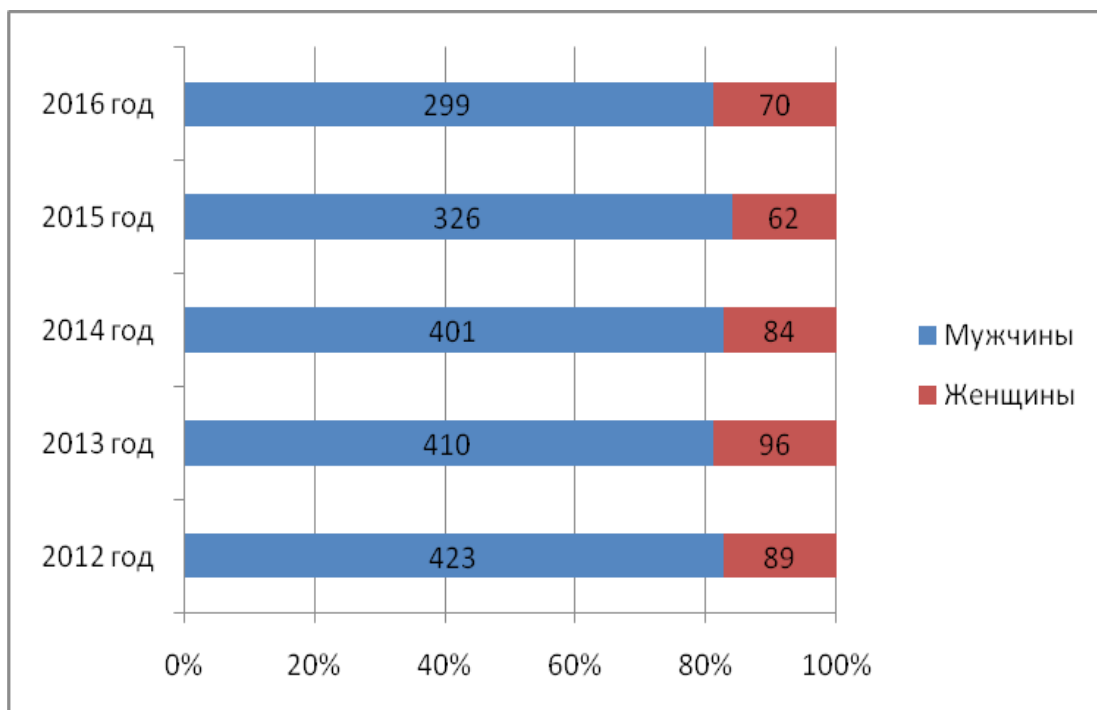


Рисунок 3 – Погодовое распределение неопознанных трупов по полу за 2012-2016 гг.

Общая доля погибших мужчин среди трупов, чья личность осталась неустановленной, составляет 82,2%, а женщин - 17,8%. В среднем в год среди неопознанных трупов насчитывается 82,4% мужчин и 17,6% женщин ($\sigma = 1,34\%$)

В 47% случаев (1097 экспертиз) возраст трупа находился в диапазоне до 45 лет (молодой возраст в соответствии с классификацией, принятой ВОЗ). 888 (38%) трупов были среднего возраста, 14% - пожилого возраста и 1% - старческого возраста и долгожители.

Распределение неопознанных трупов по месту их обнаружения представлено на рис. 4.

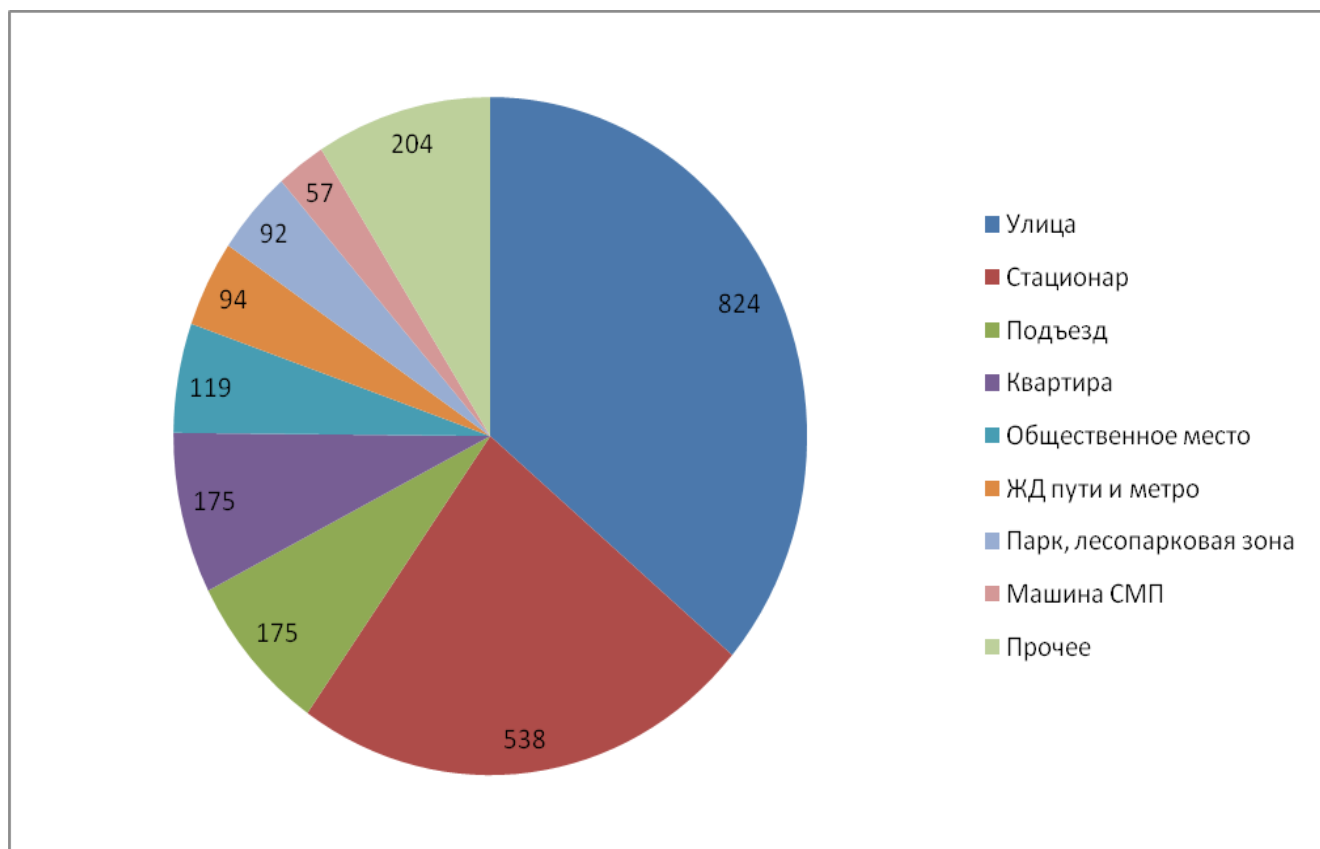


Рисунок 4 – Распределение трупов неопознанных лиц по месту их обнаружения в г. Москве за период 2012-2016 гг.

Частые места обнаружения неопознанных трупов:

- Вокзал или железнодорожная станция;
- дача;
- железнодорожные пути;
- квартира;
- машина СМП;
- метро;
- общественное место;
- парк, лесопарковая зона;
- подъезд;
- стационар;
- улица.

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

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

Распределение случаев смерти по категориям представлено в табл. 3 и на рис. 5.

Таблица 3 – Погодовое распределение случаев судебно-медицинских экспертиз неопознанных трупов по категориям смерти за период 2012-2016 гг

	2012 г	2013 г	2014 г	2015 г	2016 г	Всего
Насильственная смерть	291 56,7%	270 53,4%	282 57,3%	218 55,5%	196 52,5%	1257 55,2%
Ненасильственная смерть	178 34,7%	176 34,8%	139 28,3%	108 27,5%	113 30,3%	715 31,4%
Причина не установлена	44 8,6%	60 11,8%	71 14,4%	67 17,0%	64 17,2%	306 13,4%

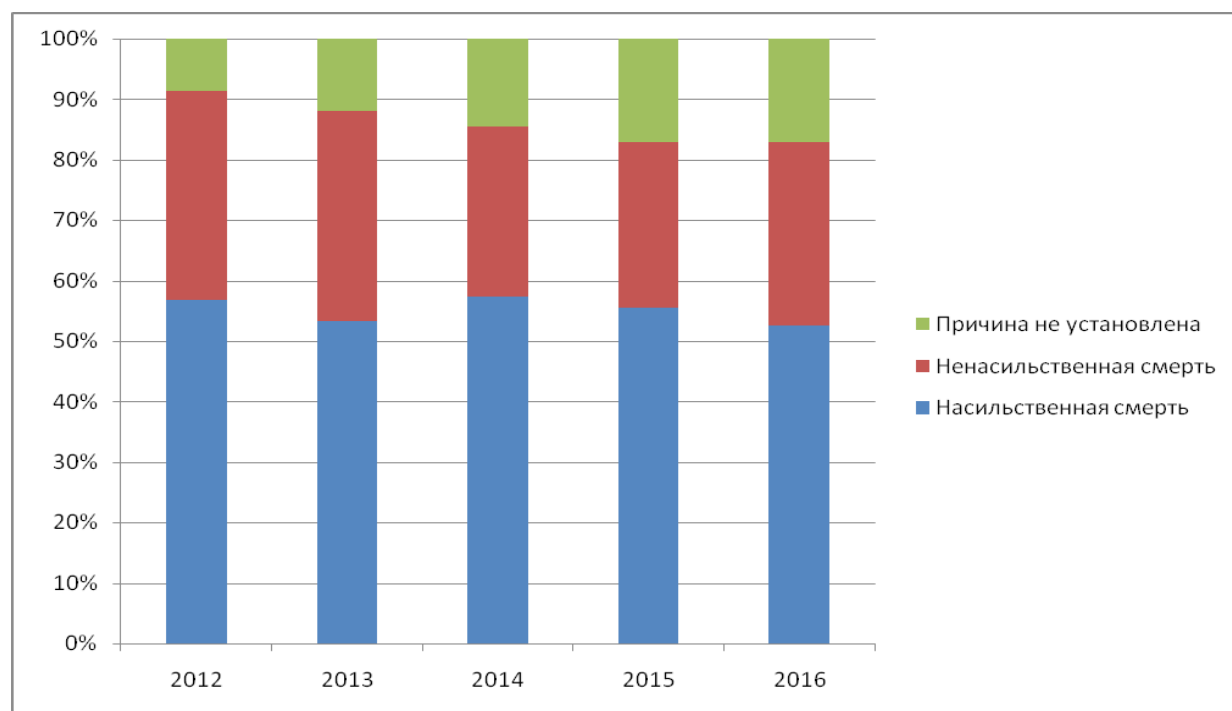


Рисунок 5 – Доля категорий смерти при судебно-медицинском исследовании неопознанных трупов за период 2012-2016 гг.

Среди всех анализируемых экспертиз насильственная смерть была установлена в 55,2% случаев, ненасильственная – в 31,4% случаев.

Структура насильственной смерти представлена в табл. 4, удельная доля причин насильственной смерти – на рис. 6.

Таблица 4 – Погодовая структура насильственной смерти неопознанных лиц за период 2012-2016 гг

	2012 г	2013 г	2014 г	2015 г	2016 г	всего
Механические повреждения	85 29,2%	86 31,9%	85 30,1%	52 23,9%	63 32,1%	362 29,0%
Механическая асфиксия	27 9,3%	17 6,3%	18 6,4%	14 6,4%	10 5,1%	86 6,9%
Отравления	119 40,9%	137 50,7%	147 52,1%	131 60,1%	95 48,5%	629 50,4%
Действие физических факторов	60 20,6%	30 11,1%	32 11,4%	21 9,6%	28 14,3%	171 13,7%

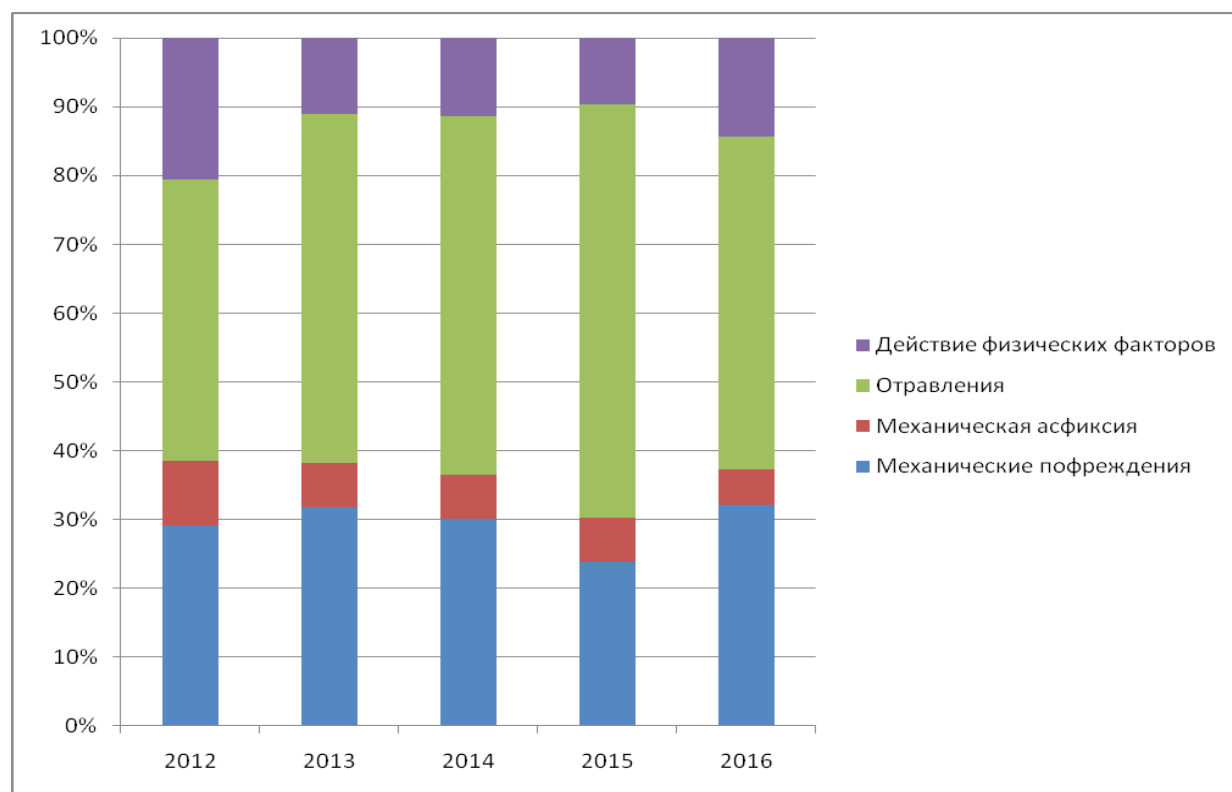


Рисунок 6 – Удельная доля причин насильственной смерти неопознанных лиц за период 2012-2016 гг.

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

Структура ненасильственной смерти представлена в табл. 5, удельная доля причин насильственной смерти – на рис. 7.

Таблица 5 – Погодовая структура ненасильственной смерти неопознанных лиц за период 2012-2016 гг.

	2012 г	2013 г	2014 г	2015 г	2016 г	Всего
Заболевания сердечно-сосудистой системы	140 78,7%	130 73,9%	96 69,1%	78 72,2%	92 80,7%	536 75,0%
Заболевания органов дыхания	11 6,2%	13 7,4%	16 11,5%	5 4,6%	7 6,1%	52 7,3%
Инфекционные заболевания	15 8,4%	17 9,7%	15 10,8%	10 9,3%	9 7,9%	66 9,2%
Заболевания ЦНС	2 1,1%	5 2,8%	2 1,4%	6 5,6%	1 0,9%	16 2,2%
Заболевания других органов и систем	10 5,6%	11 6,2%	10 7,2%	9 8,3%	5 4,4%	45 6,3%

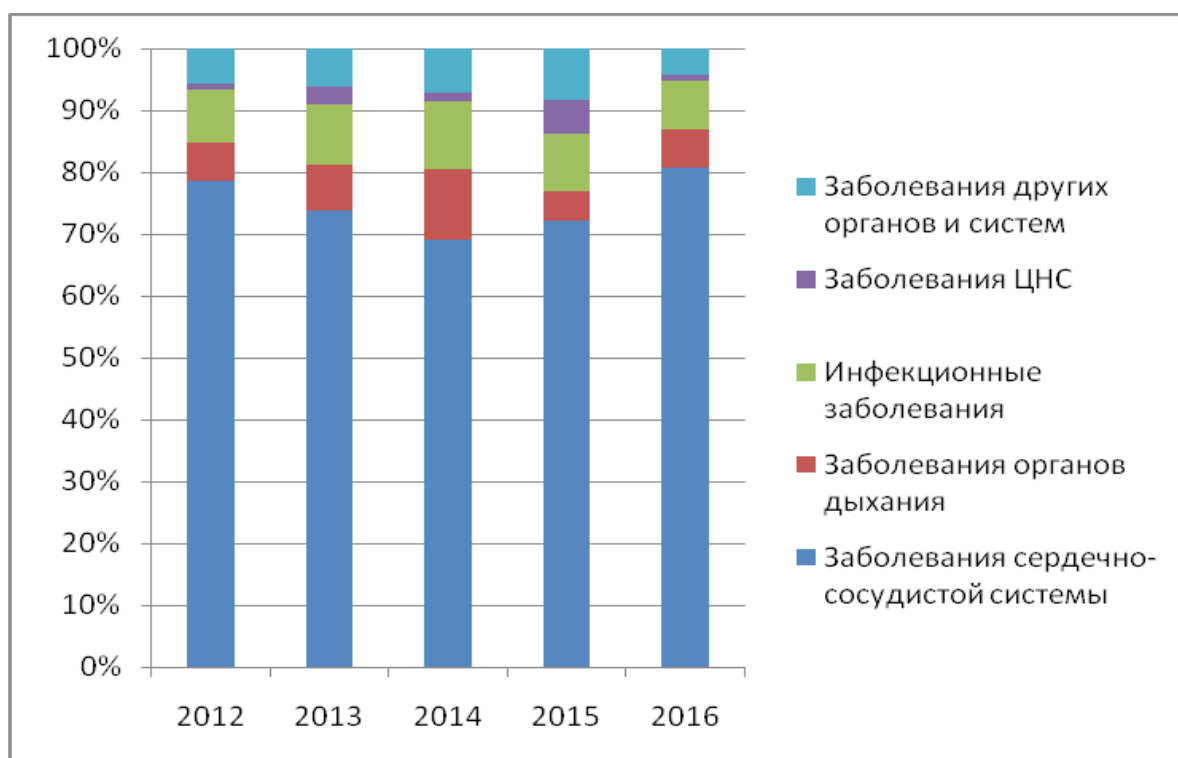


Рисунок 7 – Удельная доля причин ненасильственной смерти неопознанных лиц за период 2012-2016 гг.

Подавляющее количество случаев ненасильственной смерти составила смерть от заболеваний сердечно-сосудистой системы, включающая в себя острую сердечную недостаточность и сердечно-сосудистую патологию (536 случаев, 75,0%).

3.2 Общая характеристика современных методов изучения неопознанных трупов в медико-криминалистическом отделении

В медико-криминалистическом отделении было проанализировано данные 1489 экспертиз. Общее количество экспертиз медико-криминалистического отделения отражено в табл. 6.

Таблица 6 – Виды и количество экспертиз, выполненных в медико-криминалистическом отделении Бюро СМЭ г. Москвы в отношении неопознанных лиц за период 2012-2016 гг.

	2012 г	2013 г	2014 г	2015 г	2016 г
1. Экспертиза костных останков, зубов зольных останков и частей расчлененных трупов для установления пола, возраста, роста и др.	119 56,1%	119 52,9%	164 45,8%	154 44,0%	154 44,8%
2. Установление давности захоронения	11 5,2%	24 10,7%	35 9,8%	22 6,3%	6 1,7%
3. Отождествление личности:					
- по черепу, фотоснимкам и другим материалам дела	26 12,3%	27 12,0%	24 6,7%	25 7,0%	40 11,6%
- идентификация личности по частям тела	1 0,5%	0	0	1 0,3%	0
- идентификация личности по рентгенограммам	0	0	1 0,3%	0	1 0,3%
- идентификация личности по стоматологическому статусу	0	0	2 0,6%	1 0,3%	0
- идентификация личности по особым приметам	0	1 0,4%	0	0	0
- идентификация личности по видеозаписи	13 6,1%	25 11,1%	65 18,0%	73 20,9%	72 21,0%
- дактилоскопия	10 4,7%	7 3,1%	6 1,7%	33 9,4%	11 3,2%
- графическая реконструкция	28 13,2%	14 6,2%	46 12,9%	36 10,3%	42 12,2%
- восстановление татуировок	0	0	0	1 0,3%	0
- расчленение	4 1,9%	8 3,6%	7 2,0%	1 0,3%	9 2,6%
4. Определение видовой принадлежности	0	0	8 2,2%	3 0,9%	9 2,6%
Всего экспертиз	212	225	358	350	344

44,4% случаев проведения экспертизы имели целью непосредственное отождествление личности тем или иным методом. В 54,7% случаев задача эксперта состояла в определении лишь общих признаков личности в связи со значительными посмертными изменениями трупов. За последние 5 лет среди объектов, представленных на экспертизу, встречаются скелетированные останки, а также обугленные, гнилостно измененные и фрагментированные трупы. Практически во всех случаях установление общих признаков личности проводилось по костям трупа. Наибольшую ценность для экспертов (84% случаев) представляли череп и таз, а также длинные трубчатые кости (плечевые и бедренные). При установлении половой принадлежности частей трупа мужской пол был установлен в 75,4% случаев, женский – в 24,6% случаев ($\sigma = 3,6\%$). В 32% экспертиз был установлен молодой возраст трупа, примерно в 24% - средний возраст. Пожилой возраст был установлен в 16% случаев.

Общее количество применений различных методов подготовки, наблюдения и фиксации материалов в медико-криминалистическом отделении представлено в табл. 7.

Таблица 7 – Общее количество методов исследования неопознанных лиц, примененных в медико-криминалистическом отделении Бюро СМЭ г. Москвы за период 2012-2016 гг.

	2012 г	2013 г	2014 г	2015 г	2016 г
1. Подготовительные методы					
Мацерация	21 0,08%	39 0,12%	25 0,07%	112 0,35%	140 0,45%
Препаровка	1011 4,05%	1340 4,01%	922 2,65%	516 1,63%	521 1,66%
Метод Ратневского	101 0,4%	71 0,21%	49 0,14%	281 0,89%	95 0,3%
Дистиллированная вода	6 0,02%	6 0,02%	1 <0,01%	21 0,07%	1 <0,01%

Продолжение Таблицы 7

Анатомическая реконструкция	667 2,67%	458 1,37%	1027 2,95%	499 1,57%	709 2,25%
Другие методы, применяемые для изучения костей	3 0,01%	16 0,05%	22 0,06%	0	0
Изготовление слепков, реплик с поверхности поврежденных объектов	0	6 0,02%	0	1 <0,01%	0
Высушивание	171 0,69%	831 2,49%	637 1,83%	667 2,1%	907 3,0%
Реставрация фрагментов одежды	0	0	0	33 0,1%	0
Удаление следов наложений, в т.ч. крови	46 0,18%	490 1,47%	264 0,76%	226 0,71%	0
2. Методы наблюдения и фиксации					
2.1 Визуальные методы					
Исследование документов	300 1,2%	333 1,0%	440 1,3%	489 1,54%	457 1,5%
Простой визуальный	5045 20,22%	7624 22,84%	7230 20,76%	6899 21,72%	7951 25,27%
Обследование	1 <0,01%	0	0	7 0,02%	3 0,01%

Продолжение Таблицы 7

Остео-краниоскопия	10 0,04%	69 0,21%	34 0,1%	75 0,24%	2 <0,01%
Макроскопия в ИК-лучах	0	65 0,2%	65 0,19%	4 0,01%	10 0,03%
Макроскопия в УФ-лучах	12 0,05%	223 0,67%	40 0,11%	151 0,48%	169 0,54%
Исследование видеоматериалов	0	0	0	0	26 0,08%
2.2 Измерительные методы					
Простой измерительный	461 1,85%	747 2,24%	772 2,22%	1353 4,26%	1782 5,66%
Остеометрический	460 1,84%	1292 3,87%	1378 3,96%	1585 4,99%	1298 4,13%
Антропометрический	759 3,04%	376 1,13%	341 0,98%	348 1,1%	297 0,94%
Микрометрический	0	3 <0,01%	16 0,05%	10 0,03%	1 <0,01%
Определение массы	0	16 0,05%	8 0,02%	27 0,09%	9 0,03%
3. Микроскопические методы					
Простая микроскопия	6 0,02%	2 <0,01%	9 0,03%	143 0,45%	117 0,37%
Непосредственная стереомикроскопия	2310 9,26%	4629 13,87%	3993 11,46%	2816 8,87%	2543 8,08%
Сравнительная стереомикроскопия	0	37 0,11%	0	14 0,04%	0
Фазово-контрастная микроскопия	0	0	7 0,02%	0	0
Телевизионная стереомикроскопия	0	2 <0,01%	4 0,01%	0	0
Люминесцентная стереомикроскопия (Радуга 2-2)	0	3 <0,01%	13 0,04%	3 <0,01%	0
ИК- микроскопия	0	0	1 <0,01%	0	0

Продолжение Таблицы 7

4. Фотографические методы					
Обзорное фото цифровое	503 2,02%	574 1,72%	904 2,56%	1108 3,49%	1315 4,18%
Макрофото цифровое	310 1,24%	342 1,02%	269 0,77%	426 1,34%	229 0,73%
Микрофото цифровое	0	7 0,02%	9 0,03%	0	0
Инфракрасная телескопия фото (Радуга 2-2)	0	1 <0,01%	0	5 0,02%	0
Ультрафиолетовая телескопия фото (Радуга 2)	0	2 <0,01%	0	5 0,02%	0
Репродукционное фото	36 0,14%	122 0,37%	0	24 0,08%	17 0,05%
Сканирование фотографий	7 0,03%	0	0	0	0
Отпечатки с цифрового носителя	20 0,08%	7 0,02%	0	0	0
5. Рентгенографические методы					
Обзорная рентгенография	67 0,27%	53 0,16%	64 0,18%	105 0,33%	132 0,42%
Макрорентгенография	23 0,09%	30 0,09%	17 0,05%	41 0,13%	17 0,05%
Микрорентгенография	11 0,04%	23 0,07%	9 0,03%	0	0
Компьютерная томография	1 <0,01%	0	0	0	0
Магнитно-резонансная рентгенография	1 <0,01%	0	0	0	0
6. Химические методы					
Пробы на кровь	0	5 0,02%	0	0	0
Другие	6 0,02%	0	14 0,04%	6 0,02%	0

Продолжение Таблицы 7

7. Экспериментальные методы					
Экспертный эксперимент	7 0,03%	0	50 0,14%	31 0,1%	0
Следственный эксперимент	0	0	0	1 <0,01%	0
Получение нативных образцов для сравнения (копий)	210 0,84%	134 0,4%	106 0,3%	732 2,31%	200 0,64%
8. Аналитические методы					
Сопоставление	2049 8,21%	1578 4,73%	1193 3,43%	447 1,4%	1018 3,24%
Наложение	0	0	2 <0,01%	4 0,01%	1 <0,01%
Скольжение	12 0,05%	2 <0,01%	2 <0,01%	6 0,02%	0
Репераж	660 2,65%	507 1,52%	855 2,46%	1736 5,45%	1233 3,92%
Фотосовмещение	43 0,17%	17 0,05%	8 0,02%	11 0,04%	4 0,01%
Сопоставление относительных величин	117 0,47%	74 0,22%	56 0,16%	156 0,49%	872 2,8%
Сравнительно-анатомический	241 0,97%	316 0,95%	595 1,71%	412 1,3%	73 0,23%
Анатомо-морфологический	849 3,4%	2100 6,29%	3995 11,47%	4452 14,02%	1935 6,15%
Установление целого по частям	26 0,1%	19 0,06%	76 0,22%	36 0,11%	42 0,13%
Векторографический	0	0	0	0	2 <0,01%
Математический	95 0,38%	272 0,82%	160 0,46%	80 0,25%	77 0,25%
Статистический	26 0,1%	205 0,61%	173 0,5%	85 0,27%	13 0,04%
Методы с использованием компьютера	1141 4,57%	1607 4,81%	1254 3,6%	0	146 0,46%

Продолжение Таблицы 7

Описательная реконструкция ранящего предмета	0	0	26 0,08%	32 0,1%	0
Графическая реконструкция лица по черепу	1536 6,16%	901 2,7%	1637 4,7%	91 0,29%	1004 3,19%
Описательная реконструкция признаков внешности	156 0,63%	104 0,31%	28 0,08%	60 0,19%	72 0,23%
Иллюстрация механизм и условий слеодообразования	0	0	39 0,11%	2 <0,01%	10 0,03%
Оцифровка	179 0,71%	126 0,38%	31 0,09%	48 0,15%	36 0,11%
Захват	4 0,02%	0	537 1,54%	123 0,39%	411 1,3%
Маркировка	1192 4,78%	1115 3,34%	1330 3,82%	1511 4,76%	1839 5,84%
Диагностический	489 1,96%	557 1,67%	462 1,33%	406 1,28%	381 1,21%
Оценочный	2527 10,13%	2785 8,34%	1787 5,13%	713 2,25%	564 1,79%
Специальная компьютерная обработка, направленная на улучшение качества цифрового изображения	639 2,56%	699 2,09%	1378 3,96%	1586 4,99%	1755 5,58%
Схемы-рисунки	0	0	0	161 0,51%	0
9. Другие методы исследования					
Спектральный	0	0	11 0,03%	0	0
Определение степени высыхания костей	0	0	1 <0,01%	0	0
Молекулярно-генетический	0	0	13 0,04%	0	0
Всего применений методов	24949	33386	34830	31760	31470

Среди подготовительных методов преобладает препаровка (27,4% от общего числа подготовительных манипуляций), высушивание (20,3%) и

анатомическая реконструкция (21,3%) образцов, среди методов наблюдения выделяются визуальный осмотр и изучение документов (26,2% исследований), измерение антропометрических и остеометрических показателей (9,4%) и стереомикроскопия (11,6%). В 30,5% случаев в работе эксперта были применены сопоставление и анатомо-морфологический метод. Полученные данные позволяют сделать вывод о резком преобладании простых и наименее затратных по ресурсам методик, которые являются методиками выбора при проведении медико-криминалистических исследований. Однако подобный подход также имеет ряд существенных недостатков, в том числе возможность субъективизации полученных данных в случаях их экспертной трактовки. Данный факт и относительная простота выбираемых методов исследования могут влиять, в том числе и на точность получаемых результатов установления биологического возраста человека. Использование более сложных методов зачастую требует дополнительных ресурсов, как человеческих, так и финансовых, однако такие подходы могли бы повысить качество проводимых экспертиз и оказать благоприятное влияние на статистику, связанную с отождествлением личности.

Таким образом, за последние годы наметились определенные закономерности в судебно-медицинской характеристике неопознанных трупов. Выяснено, что среди исследуемых трупов преобладают мужчины, преимущественно молодого возраста. Многие из них были обнаружены на улице и в общественных местах, а также поступили из стационаров лечебных учреждений. Среди категорий смерти преобладает насильственная, представленная преимущественно отравлениями и механической травмой. Подавляющее количество случаев ненасильственной смерти связано с заболеваниями сердца и сосудов.

Работа медико-криминалистического отделения касательно отождествления личности занимает лишь половину случаев проведения экспертиз. Большая доля экспертиз приходится на установление пола, возраста и других общих признаков, при этом применяются преимущественно визуальные и аналитические методы.

ГЛАВА IV

РЕЗУЛЬТАТЫ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ДЕНТИНА

4.1 Разработка биохимической методики диагностики аминокислотного состава дентина с помощью хромато-масс-спектрометрического исследования твердых тканей зуба

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

В процессе частичной дериватизации при условиях, указанных в предыдущей главе, происходит метилирование аспарагиновой кислоты по карбоксильным группам (Рис. 8). При этом образуется большое количество производных аспарагиновой кислоты, которые так же могут быть легко обнаружены при хромато-масс-спектрометрическом исследовании.

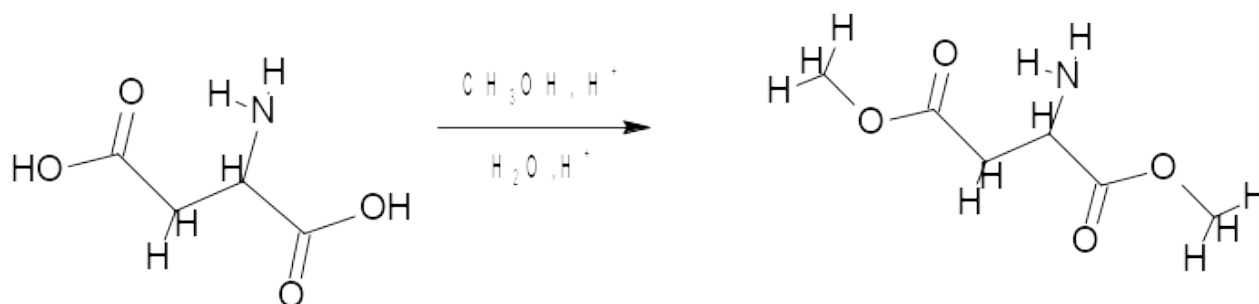


Рисунок 8 – Схема метилирования аспарагиновой кислоты по карбоксильным группам

Молекулы D- и L-метильных производных, как и самой аспарагиновой кислоты, не отличаются по молекулярной формуле и весу, однако имеют различную пространственную ориентацию атомов вокруг хирального углеродного центра (Рис. 9).

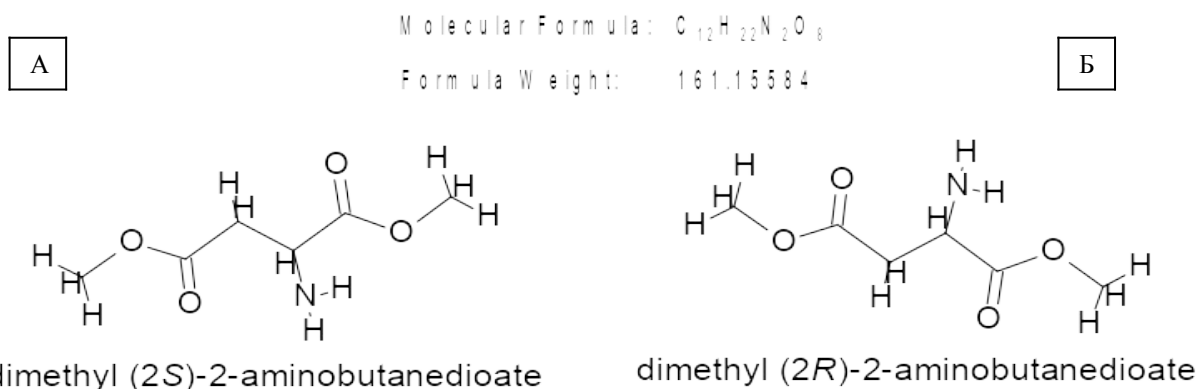
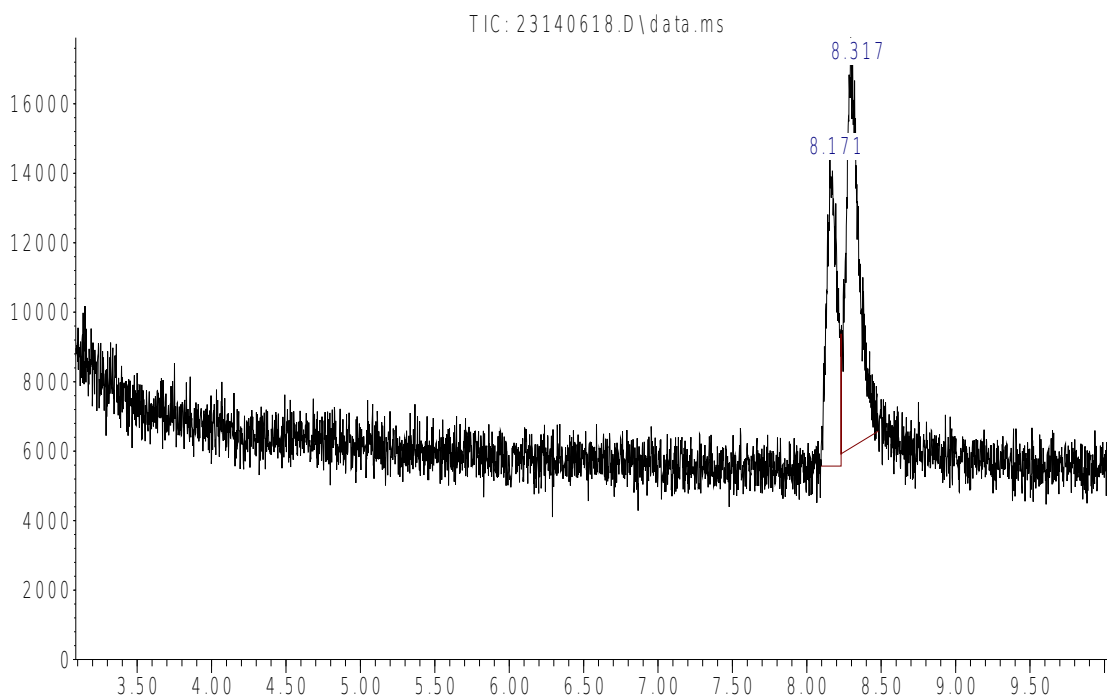


Рисунок 9 – Схематические изображения пространственной ориентации атомов в молекулах диметилowych эфиров аспарагиновой кислоты (А – L-изомер, Б – D-изомер) с указанием общей молекулярной формулы и веса для обеих молекул

Получение метилированных производных облегчает газохроматографическое исследование деривата, поскольку эфирные производные аспарагиновой кислоты являются более летучими соединениями благодаря тому, что в них полностью, либо частично отсутствуют высокополярные группы, такие как NH_2 и $COOH$. Высокая летучесть эфиров в сравнении с самими аминокислотами позволяет получить более сильный и достоверный ответ на хроматограмме (Рис. 10).

Abundance



Time-->

Рисунок 10 – Хроматограмма разделения метиловых эфиров энантиомеров (D и L) аспарагиновой кислоты. Время выхода: 8,171 минут – диметиловый эфир D - аспарагиновой кислоты, 8,317 минут – диметиловый эфир L- аспарагиновой кислоты

Ось ординат на хроматограммах выражает так называемый выходной сигнал изучаемого вещества: сигнал образуется при его выходе из колонки. В случае, если сигнал достаточно велик, он может быть зарегистрирован на хроматограмме в виде графика треугольной формы, или пика. Нулевая отметка на хроматограмме соответствует отсутствию выхода анализируемого вещества из хроматографической колонки в заданный момент времени.

Хроматографический пик оценивается по нескольким характеристикам. Одними из базовых параметров являются высота, ширина и площадь пика. Высота пика – перпендикуляр, опущенный на ось абсцисс на хроматограмме из точки максимального отклика детектора. Ширина пика оценивается с помощью отрезка, проведенного у основания пика между точками максимального перегиба восходящей и нисходящей ветвей пика на хроматограмме. Площадь пика – площадь участка на хроматограмме, отграниченная самим пиком и его

основанием. Площадь пика рассчитывается с помощью его высоты и ширины и косвенно отражает количество исследуемого вещества, что и было использовано в работе для анализа аминокислотного соотношения в дентине. Отдельное внимание уделяется коэффициенту асимметрии, поскольку подобное явление может затруднять количественную обработку получаемого результата. На асимметрию пика могут повлиять заданные параметры хроматографирования, чистота анализируемого образца дентина, коэлюируемые вещества и др., поэтому для более точного анализа исследуемых веществ был применен масс-селективный детектор.

В масс-спектрометре аспарагиновая кислота и ее производные ионизируются электронами, испускаемыми накаливаемым катодом (принцип «электронного удара»). В результате молекула вещества распадается на разнообразные частицы, имеющие свою собственную массу и заряд. Отношение массы частицы к ее заряду обозначается как « m/z ». Соответственно, регистрируя после «электронного удара» те или иные массы частиц, можно идентифицировать изучаемое соединение.

Полученные при оценке спектральной характеристики результаты сравнивали с контрольными растворами D- и L-аминокислот и их смеси (Рис. 11), либо с библиотекой масс-спектров, в том числе, NIST MS 2014 (Рис. 12).

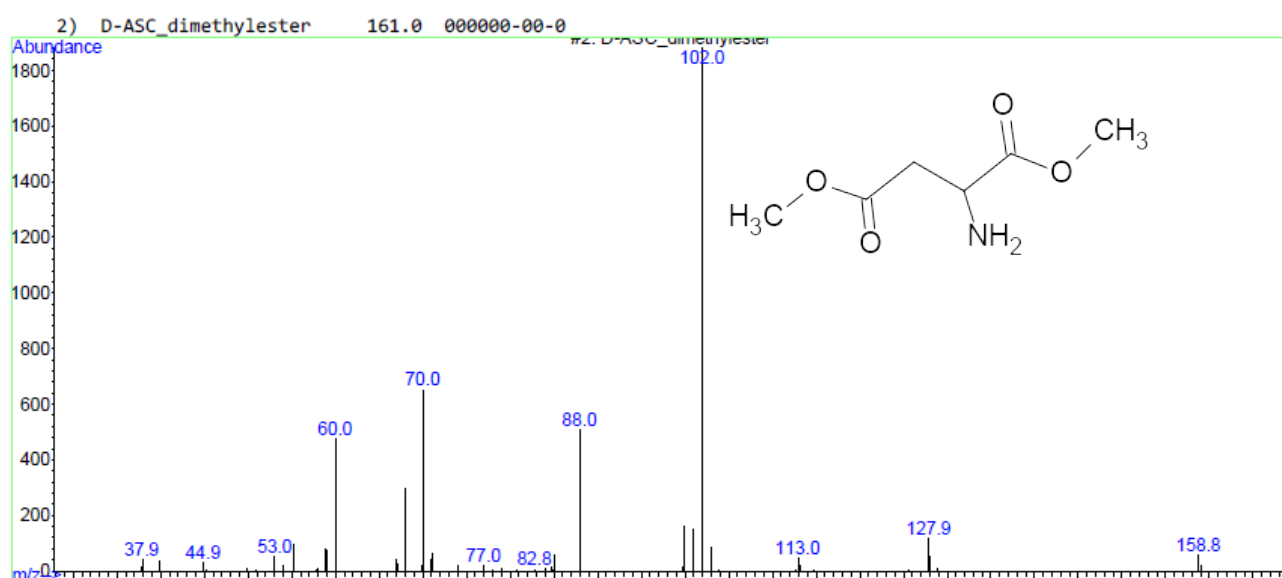
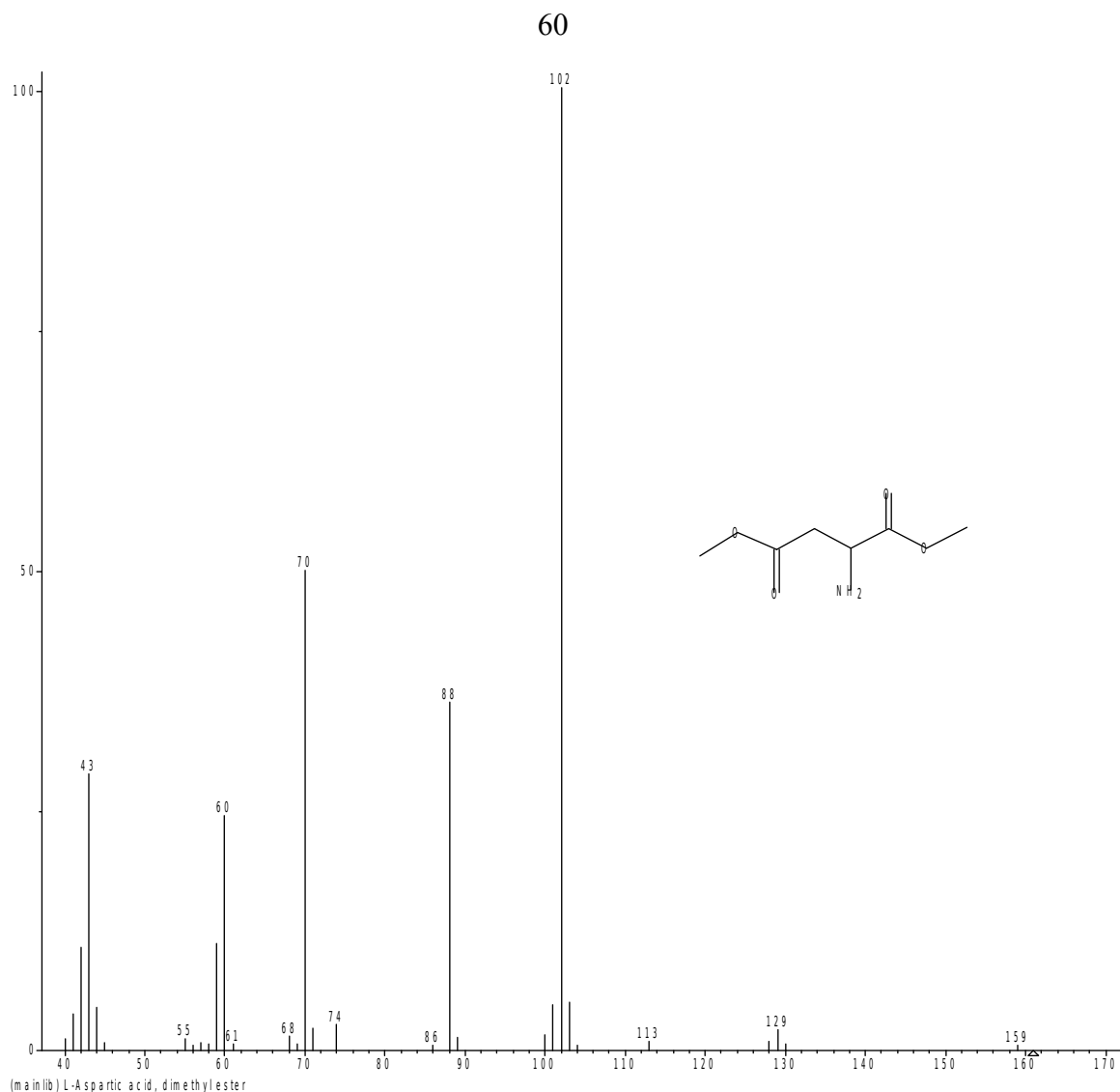


Рисунок 11 – Масс-спектр D-аспарагиновой кислоты (получен с использованием стандарта Sigma-Aldrich)



10 ОСНОВНЫХ ПИКОВ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ:

102	999	70	498	88	361	43	286	60	243
59	111	42	106	103	50	101	47	44	44

Рисунок 12 – Масс-спектр диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты с указанием характеристических ионов и их интенсивности, взятый из библиотеки NIST MS 14

Аспарагиновая кислота и ее дериваты распадаются в ходе «электронного удара» согласно определенным химическим закономерностям. Исходя из особенностей масс-спектров изучаемых веществ (Рис. 11 и 12), можно сделать предположение, что легче всего в неразветвленных боковых радикалах по спиртовой группе, таких как метильные производные, идет «аминный» β -разрыв (Рис. 13).

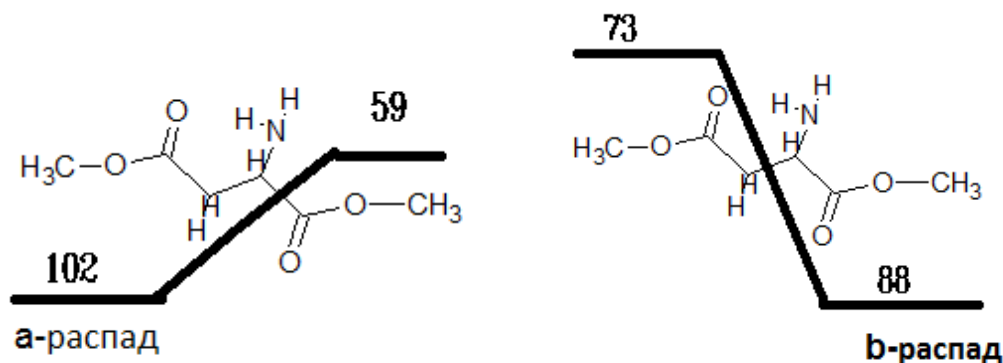
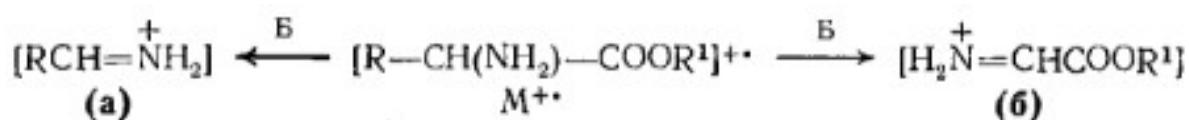


Рисунок 13 – Схема фрагментации при формировании масс-спектра диметилового эфира аспарагиновой кислоты

Разрыв может происходить с обеих сторон от углерода, связанного с аминогруппой, однако исследования показали, что выброс карбоксильной группы (а-распад на рис. 6) происходит несколько легче, иногда с миграцией положительного заряда от атома азота к атому углерода, в связи с этим закономерно появление в деривате обоих фрагментов, несущих положительный заряд.

Дальнейший распад обеспечивается за счет окончательного отрыва аминогруппы от радикала (Рис. 14).

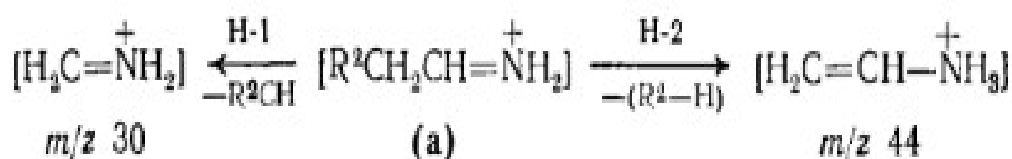


Рисунок 14 – Схема обособления аминогруппы при дальнейшем распаде иона-производного аспарагиновой кислоты

После подробного изучения спектра изучаемых веществ и определения их характеристических ионов в SCAN-режиме, были подобраны условия для SIM-режима с целью максимально эффективной и точной оценки количества

производных в рацемате. В SIM-режиме спектр диметилового эфира аспарагиновой кислоты определяли, используя данные молекулярных масс наиболее характерных ионов: m/z 161 (159) m/z 102 (осн) и m/z 88. В данном случае ион с отношением массы к заряду, равным 102, имел наибольшую интенсивность, что позволило успешно использовать его для количественного определения диметиловых эфиров D- и L- энантиомеров аспарагиновой аминокислоты.

Хромато-масс-спектрометрическое исследование также позволяет разделить и полные метилированные производные аспарагиновой кислоты, когда метилирование происходит и по amino-, и по карбоксильным группам (Рис. 15). Однако разделение полных дериватов протекает тяжелее, и их оценку затрудняет обязательное присутствие в смеси частично метилированных форм (Рис. 16).

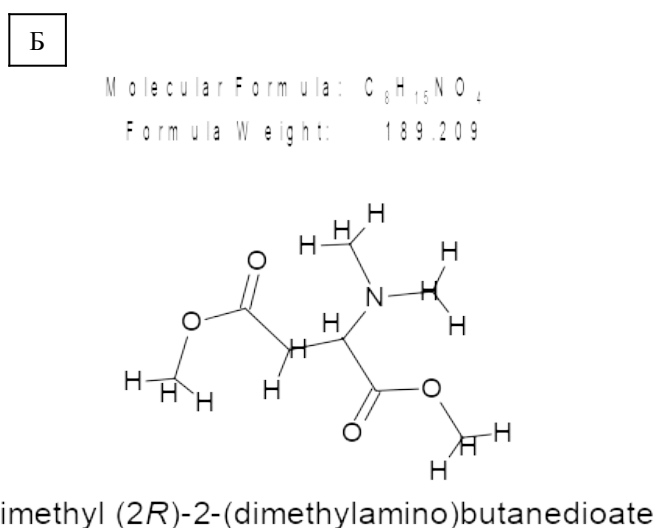
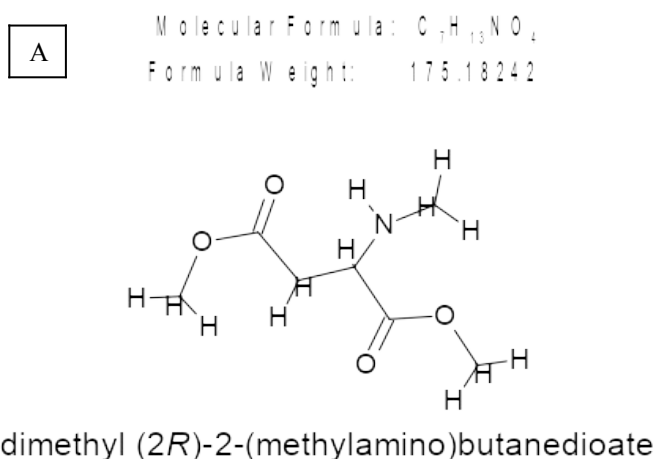


Рисунок 15 - Структурные формулы частичного (А) и полного (Б) по аминогруппе диметилового эфира аспарагиновой кислоты

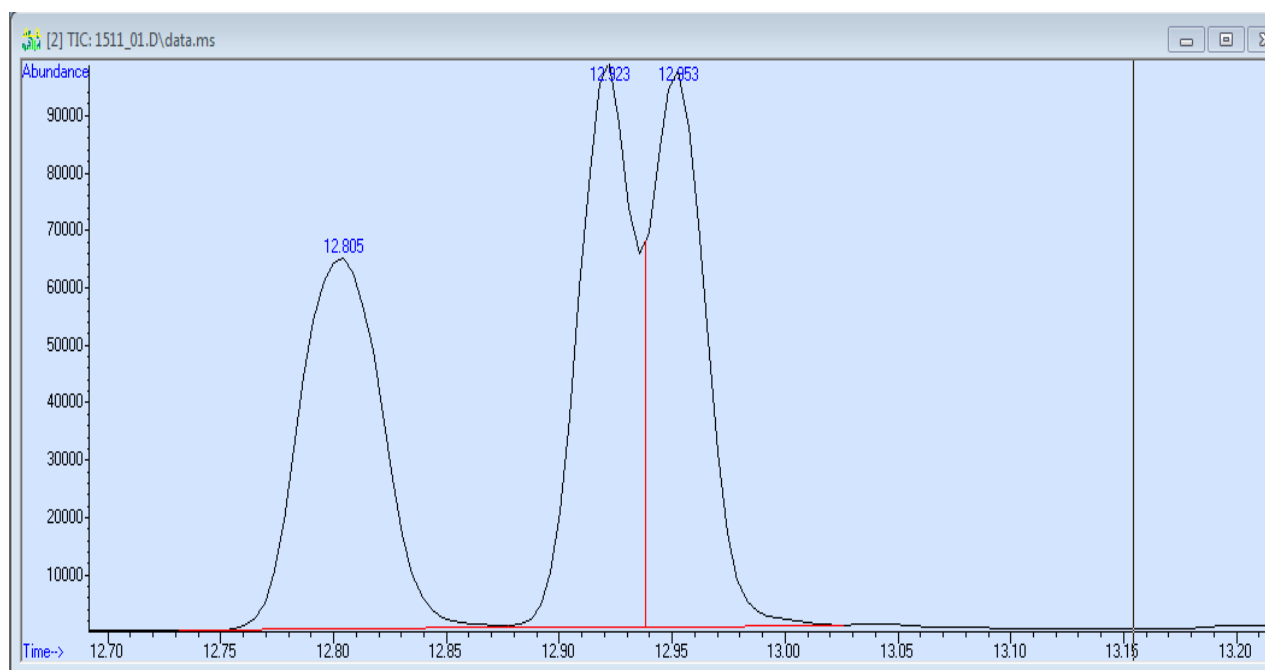


Рисунок 16 – Хроматограмма разделения D- и L-метиловых эфиров, энантимеров N-диметил аспарагиновой кислоты. Время выхода: 12,805 мин. – N-метил D- и L-аспарагиновой кислоты диметиловый эфир, 12,923 мин. – N-диметил D-аспарагиновой кислоты диметиловый эфир, 12,953 мин. – N-диметил L - аспарагиновой кислоты диметиловый эфир

При изучении хроматограммы в SIM-режиме могут так же возникать трудности интерпретации данных, связанные с тем, что продукты неокислительного дезаминирования аспарагиновой кислоты (фумаровая кислота и др.) имеют сходные с ней фрагментарные ионы (Рис. 17 и 18). В этом случае особенно большое внимание стоит уделять такой хроматографической характеристике, как время удерживания элюируемого вещества.

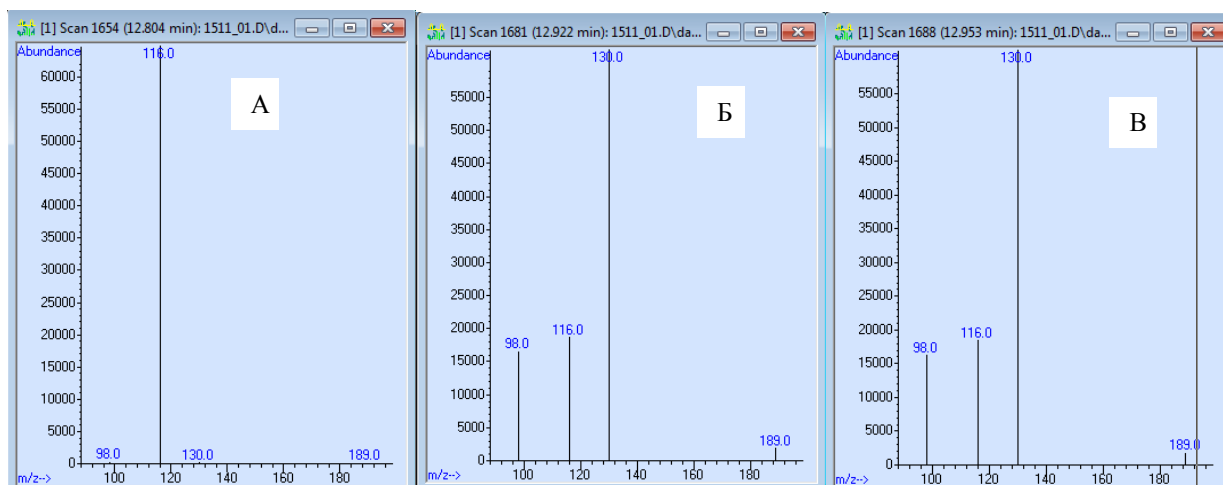


Рисунок 17 – Масс-спектры в SIM-режиме полного и частичного дериватов аспарагиновой кислоты (получены с использованием стандарта Sigma-Aldrich) А-частичный дериват по аминогруппе (m/z 189, m/z 130, m/z 116 (осн), m/z 98), Б (D-форма) и В (L-форма) - полный дериват по аминогруппе аспарагиновой кислоты (m/z 189, m/z 130 (осн), m/z 116, m/z 98)

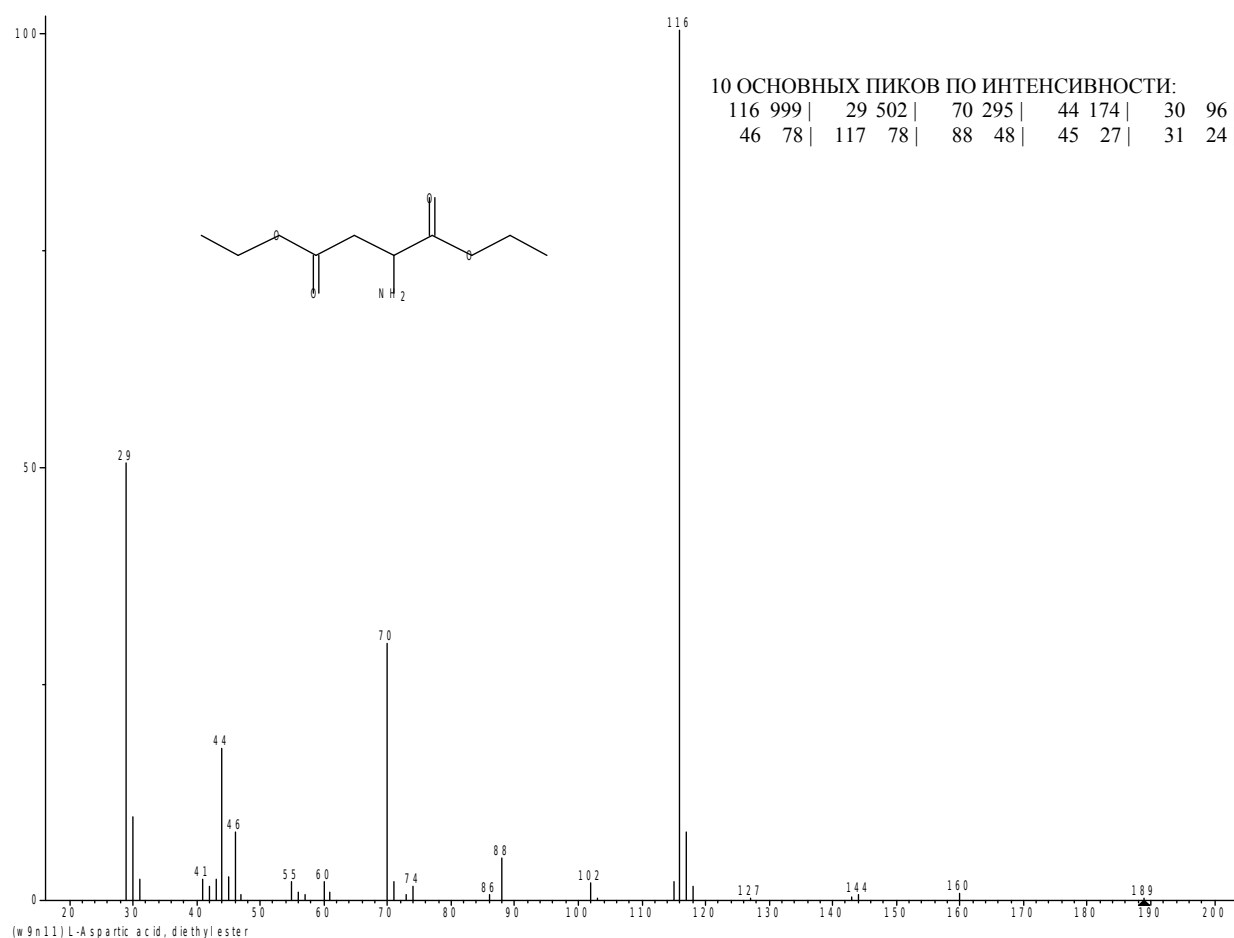


Рисунок 18 – Масс-спектр диэтилового эфира L-аспарагиновой кислоты с указанием характеристических ионов и их интенсивности, взятый из библиотеки NIST MS 14

Принцип разделения веществ при хроматографическом исследовании заключается в сорбции анализируемого соединения во время его движения по хроматографической колонке. Чем выше сорбируемость изучаемого вещества, тем медленнее оно продвигается по колонке, и наоборот, если вещество физически не взаимодействует со слоем сорбента, то его скорость выхода будет высокой и примерно сравнимой со скоростью потока элюента. В случаях, если вещество никак не задерживается колонкой, формирование пика на хроматограмме невозможно. При этом чем сильнее вещество задержано в колонке, тем более выражен будет пик на хроматограмме.

Таким образом, сорбируемость вещества является показателем интенсивности взаимодействия его молекул с сорбентом. Однако при анализе рацемата возникает проблема разделения стереоизомеров, которые его составляют, поскольку оба типа молекул абсолютно одинаковы по структуре и молекулярной массе, а различаются лишь своей конформацией. Поэтому характеристики взаимодействия L- и D-аспарагиновых кислот со слоем сорбента подавляющего большинства стандартных хроматографических колонок абсолютно одинакова. В связи с этим в исследовании была использована хиральная колонка с фазой 20% циклодекстрина в метилполисилоксане. Материал такой колонки обладает неодинаковым сродством к изомерам и задерживает правовращающие вещества, что обеспечивает на хроматограмме разделение пиков веществ с одинаковой молекулярной массой и формулой. Время, которое вещество затрачивает на прохождение через хроматографическую колонку, называется временем удерживания (t_R). На хроматограмме оно представляет участок оси абсцисс от момента ввода пробы до максимума пика и зависит от времени, которое молекулы находятся в элюенте (t_M) и в сорбируемом состоянии (R'):

$$t_R = t_M + R'$$

Обычно при хроматографическом анализе, где элюентом является газ, время нахождения анализируемого вещества в элюенте зависит от структуры слоя сорбента в колонке. Высокая плотность колонки меньше задерживает вещество,

что приводит к снижению величины t_m . Чтобы исключить влияние структуры колонки на время удерживания, использовалась величина t_R' - так называемое приведенное время удерживания:

$$t_R' = t_m - t_R.$$

Время нахождения вещества в элюенте определялось с помощью анализа вещества, несорбируемого в данной хроматографической колонке. Однако скорость потока элюента оказывает существенное влияние на приведенное время удерживания, поэтому скорость потока должна быть тщательно выверена. В некоторых случаях удобнее использовать такую величину, как удерживаемый объем (V_r) - произведение времени удерживания на объемную скорость элюента (Fr):

$$V_r = t_R \cdot Fr.$$

Удерживаемый объем характеризует количество газа, которое понадобится для прохода вещества через хроматографическую колонку. Приведенный удерживаемый объем ($V'R$) соответственно равен:

$$V'r = (t_R - t_m) Fr = t_R Fr - t_m Fr = V_r - V_d,$$

где V_d - объем пустот в колонке (мертвый объем).

Объемную скорость элюента можно измерить на выходе из колонки, однако при работе с газом-носителем следует помнить, что в силу его сжимаемости возникает перепад давления в начале и в конце колонки. Поэтому целесообразным представилось измерять среднюю объемную скорость движения в колонке с учетом поправочного коэффициента (j) для перепада давления:

$$j = 3/2((p_1/p_0)^2 - 1)/((p_1/p_0)^3 - 1),$$

где p_1 - входное давление; p_0 - давление на выходе колонки.

Приведенный удерживаемый объем с поправкой на перепад давления в хроматографической колонке называется чистым удерживаемым объемом (V_N):

$$V_N = V'R \cdot j.$$

Чистый удерживаемый объем можно считать физико-химической константой, так как он не зависит от скорости элюента при постоянной температуре и доли пустот в колонке. Чистый удерживаемый объем зависит от

количества сорбента в колонке, поэтому для точных физико-химических измерений использовалось понятие удельного удерживаемого объема (VT_g). Величина V_g - это чистый удерживаемый объем, отнесенный к массе сорбента g в колонке или к площади поверхности адсорбента SK при усредненном давлении в хроматографической колонке и температуре T колонки:

$$VT_g = V'R_j/g, VT_g = V'R_j/SK.$$

Незначительные изменения заданных параметров хроматографического исследования, в том числе возникающие спонтанно, могут влиять на все рассмотренные выше величины. Чтобы нивелировать влияние таких изменений на результат, использовали относительные параметры удерживания. Относительные время и объем удерживания аспарагиновых аминокислот в экспериментах (например, $V_{NВ}$, $t'R$) были рассчитаны с использованием данных параметров удерживания контрольных растворов аминокислот ($V_{Nс}$, $t'Rс$):

$$V_{отн} = V_{NВ}/V_{Nс}; t_{отн} = t'R/t'Rс.$$

Часто при расчете относительного параметра удерживания (времени или объема) в газовой хроматографии в качестве стандартных соединений используют n -алканы, с параметрами удерживания, близкими к параметрам удерживания исследуемого вещества. В этом случае при случайных колебаниях расхода или температуры абсолютные параметры удерживания будут изменяться, а их отношения - практически нет. В качестве относительного параметра использовался индекс Ковача:

$$I = 100[(\lg t'_k/t'_n)/(\lg t'_{n+1}/t'_n)] + 100n,$$

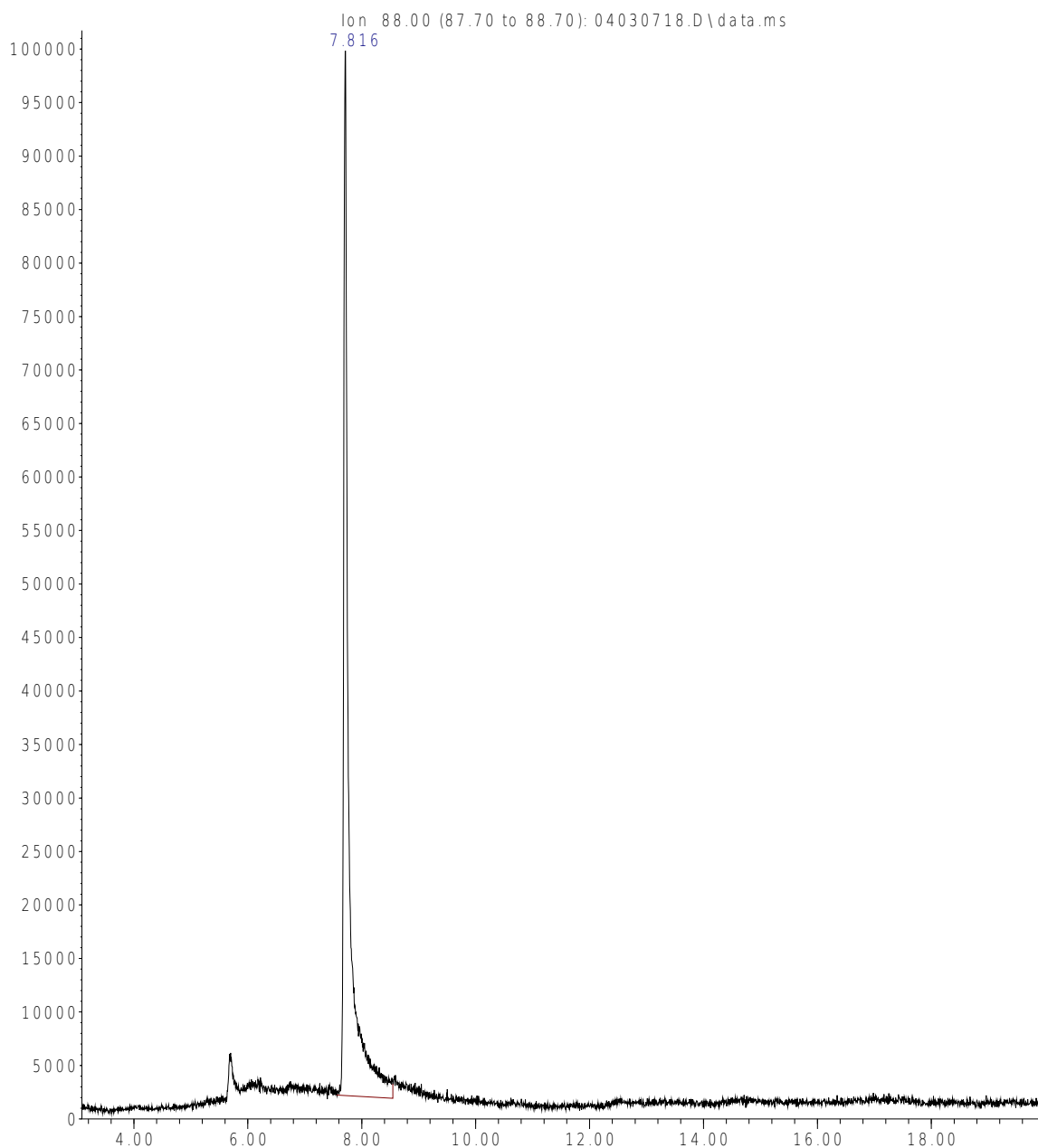
где t_n , t_{n+1} - приведенные времена удерживания n -алканов, с числом атомов углерода в молекуле n и $n + 1$; t'_k - приведенное время удерживания исследуемого соединения.

Индекс Ковача - безразмерная величина и может быть подсчитана с большой точностью, например в капиллярных колонках - до сотых долей процента. Индексы Ковача в первую очередь применяют для идентификации неизвестных веществ (проведение качественного анализа). Изменения индексов Ковача для соединений, отличающихся природой функциональной группы,

используют для оценки межмолекулярных взаимодействий. Индексами удерживания определенного набора стандартных веществ характеризуют полярность неподвижных жидких фаз и адсорбентов.

В процессе масс-спектрометрического исследования были получены данные о большинстве дериватов аспарагиновой кислоты, при этом некоторые масс-спектры изучаемых веществ отсутствуют в общедоступных масс-спектрометрических библиотеках. В частности, данные хромато-масс-спектрометрии диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты представлены на рис. 19 и рис. 20. В ходе работы были вручную рассчитаны закономерности распада диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты на характеристические ионы (Рис. 21). Основываясь на теоретических расчетах и данных, получаемых при хромато-масс-спектрометрическом исследовании диизопропиловых эфиров, для SIM режима были выбраны следующие характеристические ионы: m/z 158 m/z , m/z 130 и m/z 88 (осн).

Abundance



Time-->

Рисунок 19 – Хроматограмма изопропиловых эфиров энантиомеров (D и L) аспарагиновой кислоты (без разделения). Время выхода - 7,816 минут

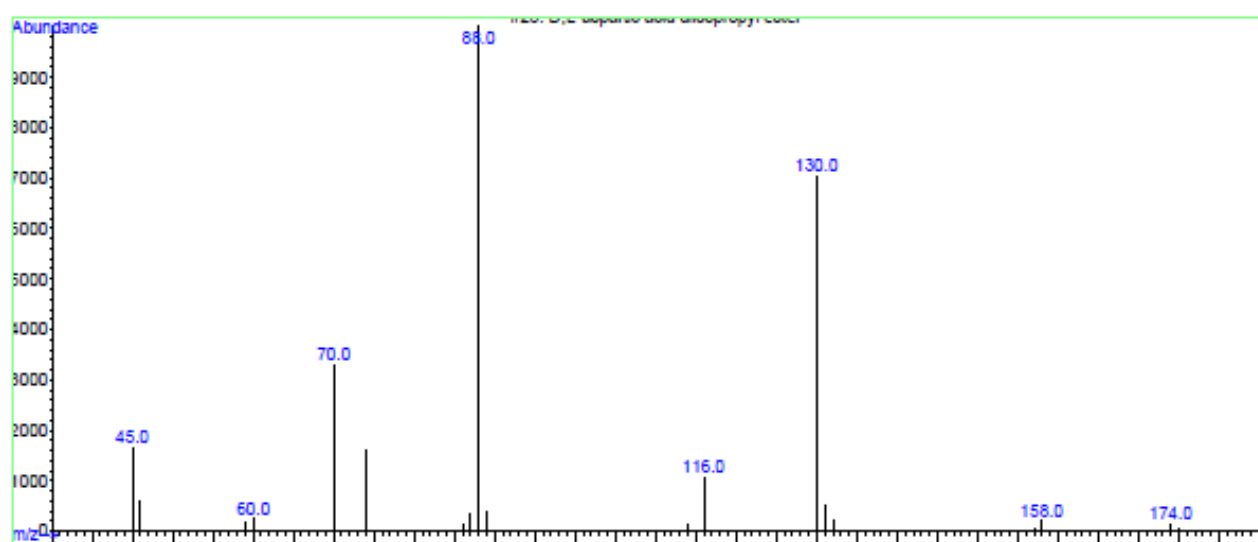


Рисунок 20 – Масс-спектр диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты в кислой среде (энантиомер на данном этапе не определен)

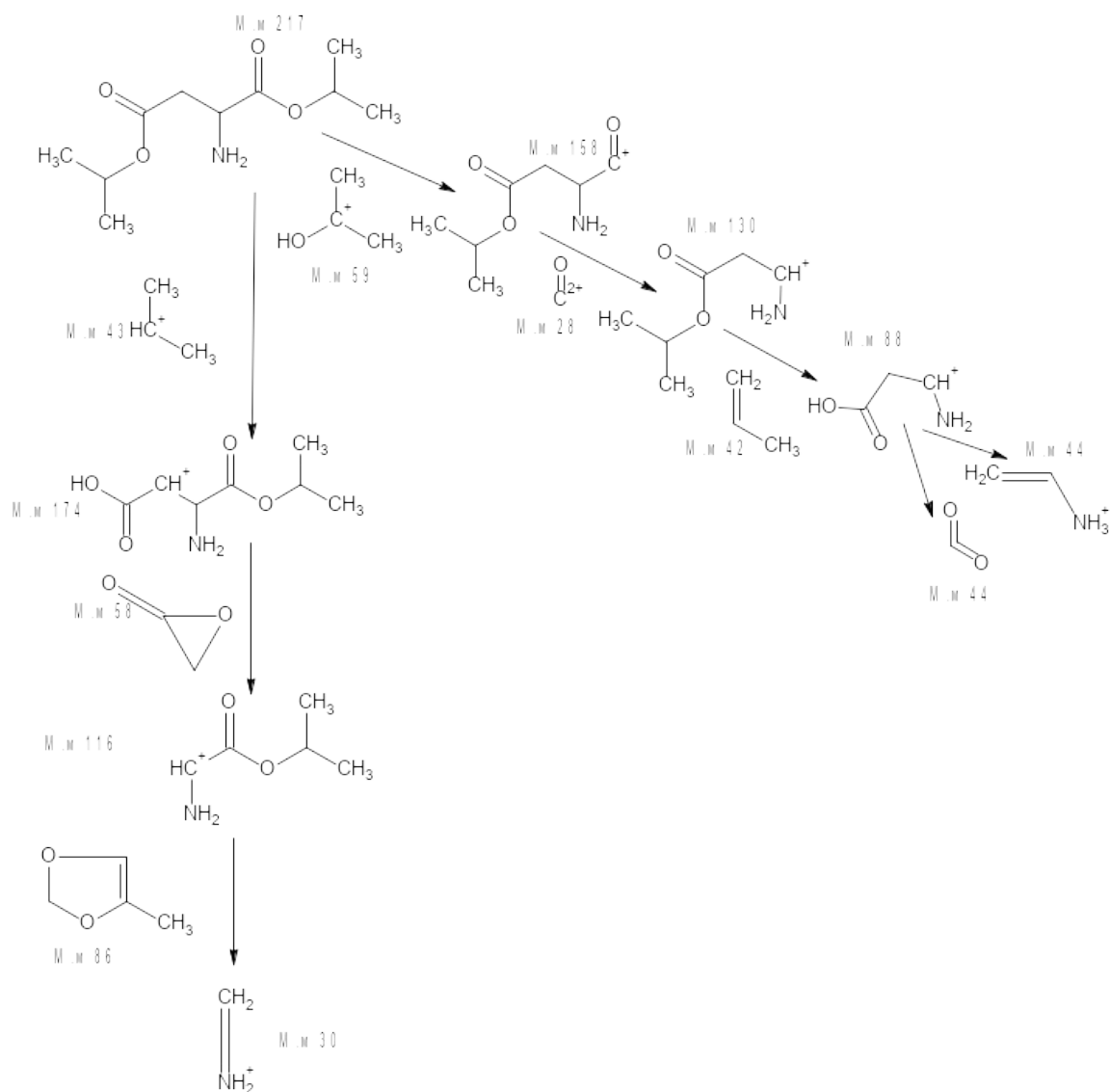


Рисунок 21 – Рассчитанная схема фрагментации при формировании масс-спектра D - диизопропилового эфира аспарагиновой кислоты

Полученные данные о фрагментации производных с вовлечением карбоксильных групп были наглядно подтверждены при изучении масс-спектральной характеристики изобутильных эфиров аспарагиновой кислоты (Рис. 22-24).

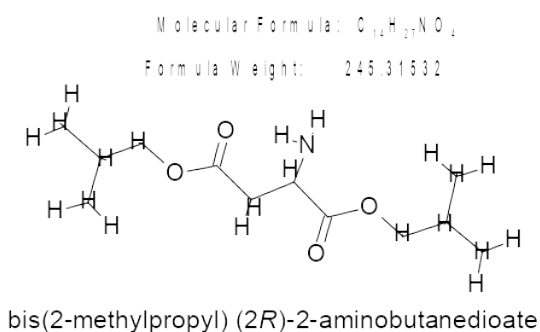


Рисунок 22 – Структурная формула диизобутильного эфира аспарагиновой кислоты

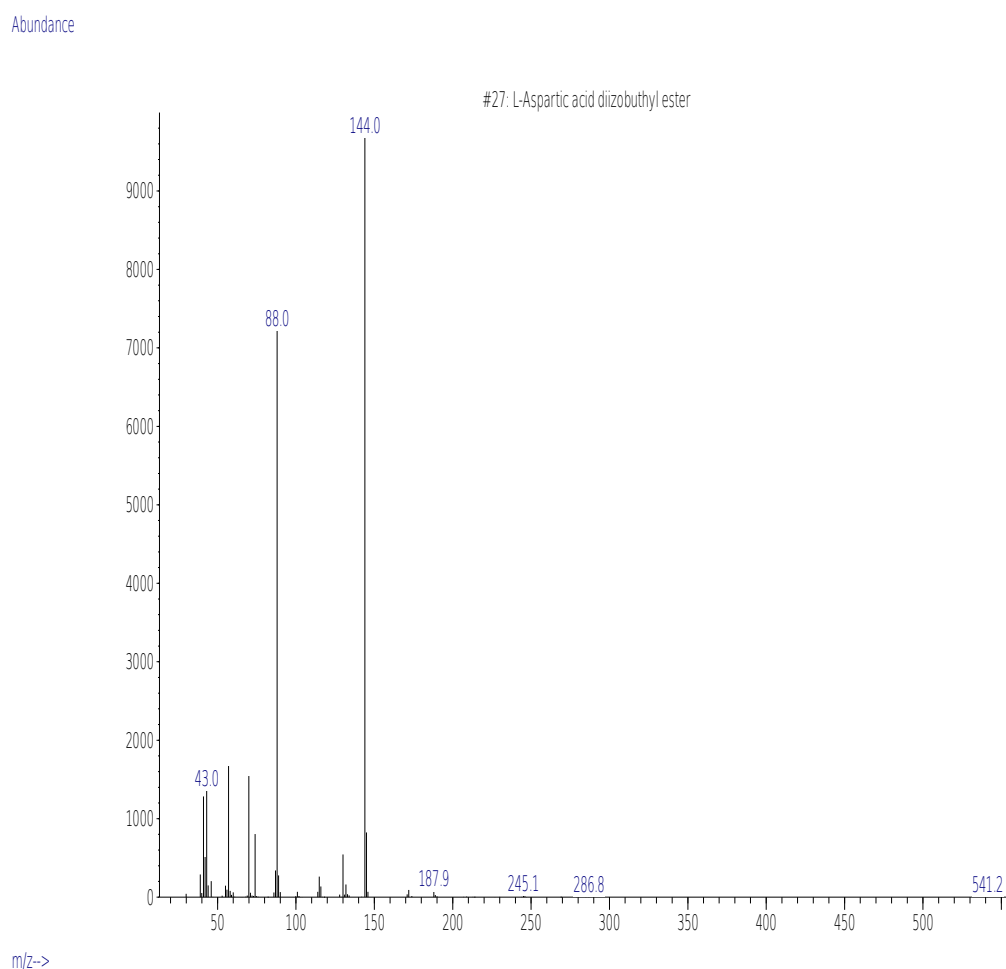


Рисунок 23 – Масс-спектр диизобутильного эфира L-аспарагиновой кислоты в кислой среде

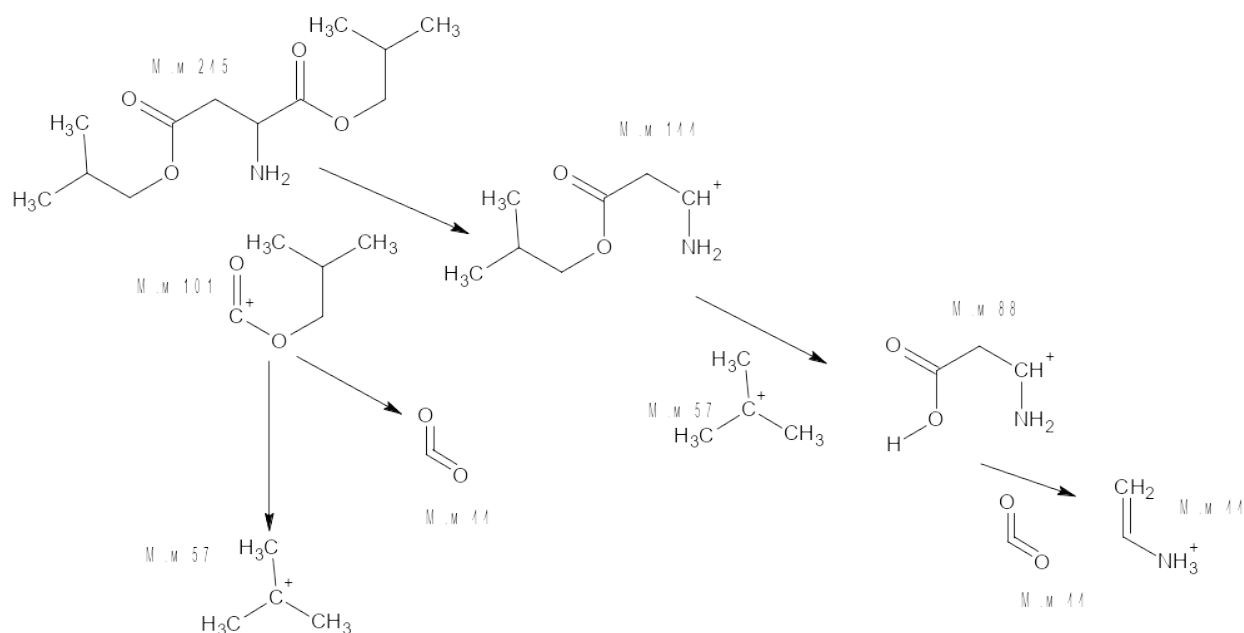


Рисунок 24 – Рассчитанная схема фрагментации при формировании масс-спектра диизобутильного эфира аспарагиновой кислоты

В дальнейшем для определения наличия и количественного содержания изобутиловых эфиров зубных тканей в SIM-режиме в качестве характеристических были признаны следующие ионы: (m/z 245 m/z , m/z 144 (осн) и m/z 88).

В ходе исследования также были изучены виды распада N-замещенных производных аспарагиновой кислоты (Рис. 25-27).

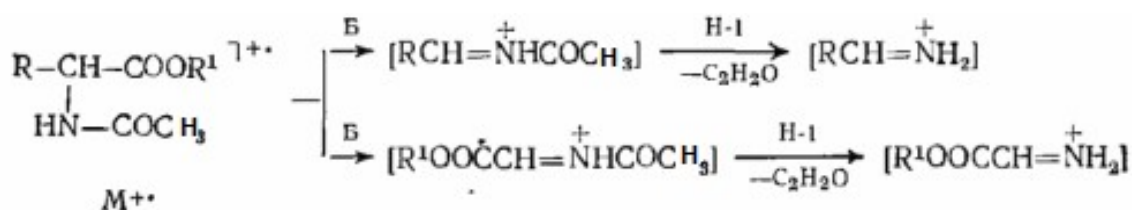


Рисунок 25 – Схема распада производных аминокислот, замещенных по аминогруппе

Было выяснено, что при ацетилировании фторпроизводными в различной pH среде (Рис.28-29) производные аспарагиновой кислоты имеют незначительные

отличия при фрагментации, и схема фрагментации была рассчитана вручную (Рис. 30). Для верификации полученных данных были использованы данные масс-спектров N-трифлуороацетил, диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты (Рис.31) и самой N-трифлуороацетил L-аспарагиновой кислоты (Рис.32), взятые из библиотеки масс-спектров.

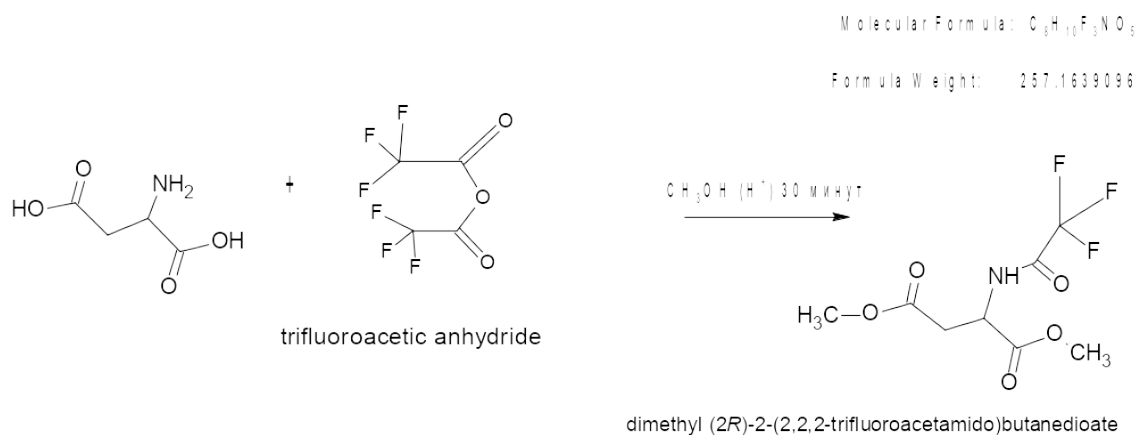
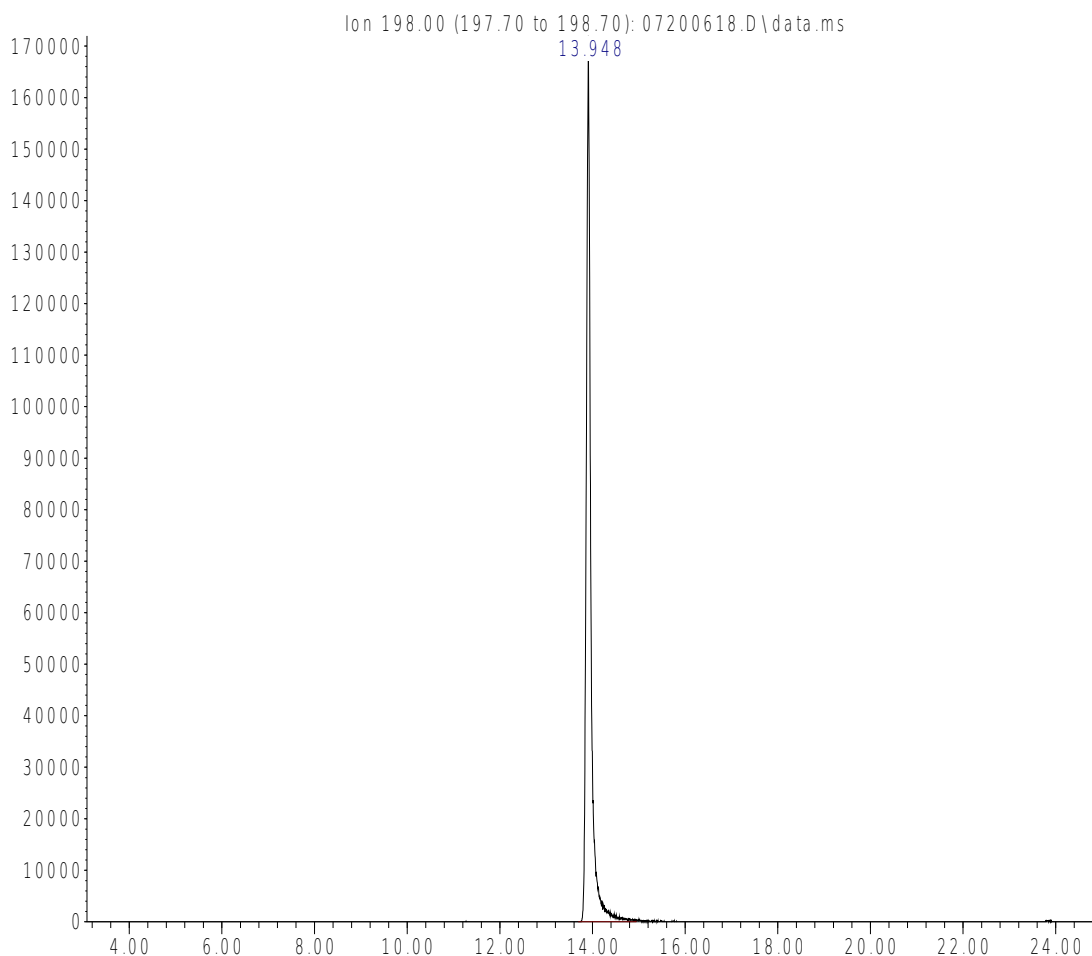


Рисунок 26 – Схема и условия реакции дериватизации при получении N-трифторацетил диметилового эфира аспарагиновой кислоты. В качестве дериватизирующего агента использован трифтороуксусный ангидрид

Abundance



Time-->

Рисунок 27 – Хроматограмма N-трифлуороацетил диметилового эфира D-аспарагиновой кислоты. Время выхода 13.948 мин. Изменение в условиях хроматографирования: температура инжектора 240 °С, начальная температура колонки 120 °С, выдержка 2 минуты, скорость подъема 2 °С в минуту до 130 °С; температура интерфейса 230 °С, время задержки на растворитель перед сканированием – 3 минуты, интервал сканируемых масс 45-550 m/z.

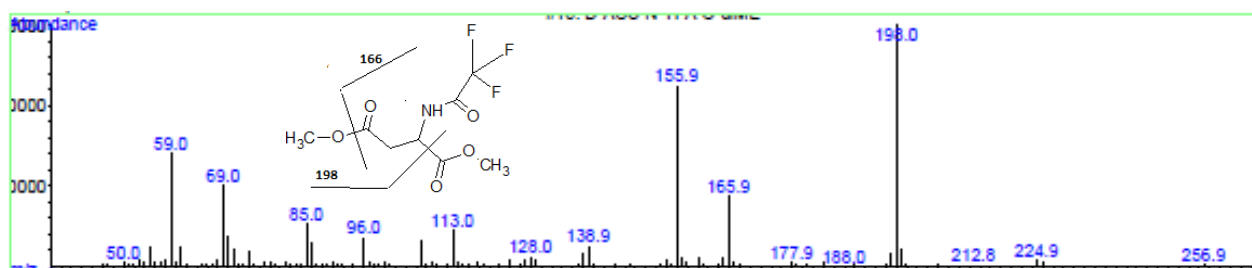


Рисунок 28 – Масс-спектр N-трифлуороацетил диметилового эфира D-аспарагиновой кислоты в кислой среде с изображением схемы разрывов и получения характеристических ионов

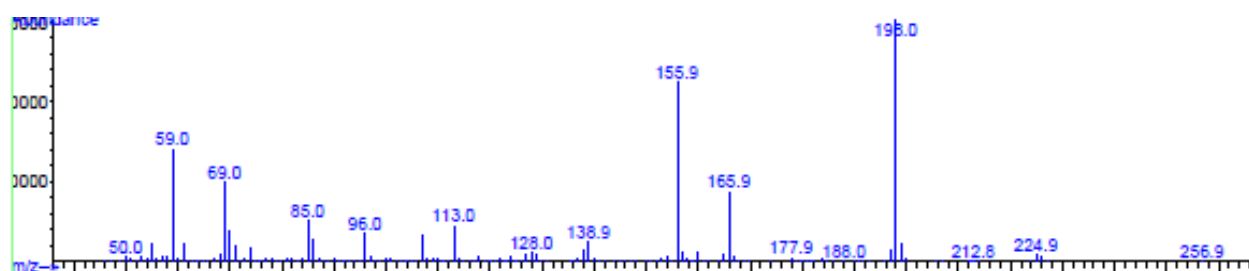


Рисунок 29 – Масс-спектр N-трифлуороацетил диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты в кислой среде

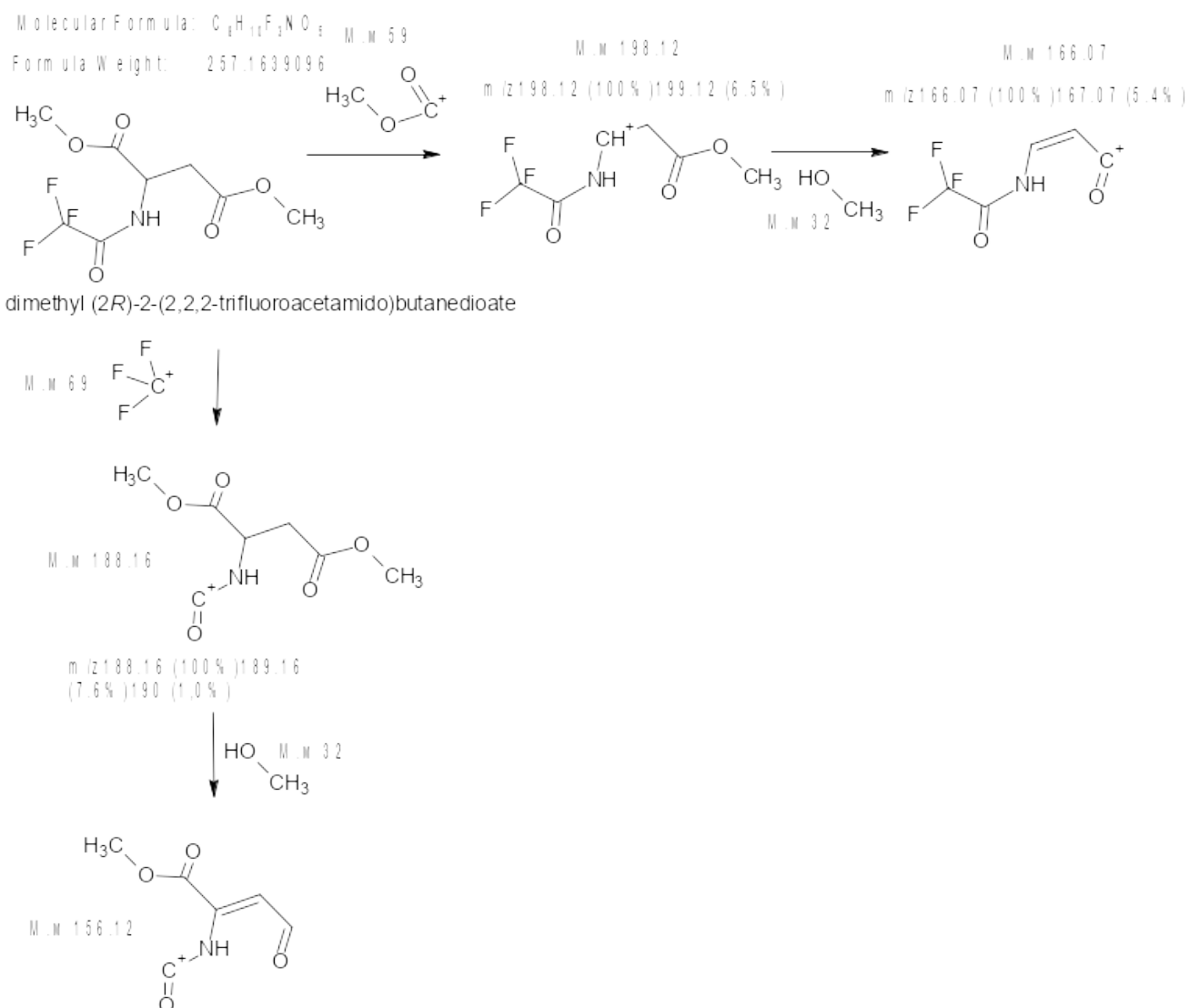


Рисунок 30 – Рассчитанная схема фрагментации при формировании масс-спектра N-трифлуороацетил-производных аспарагиновой кислоты, растворенной в подкисленном метаноле

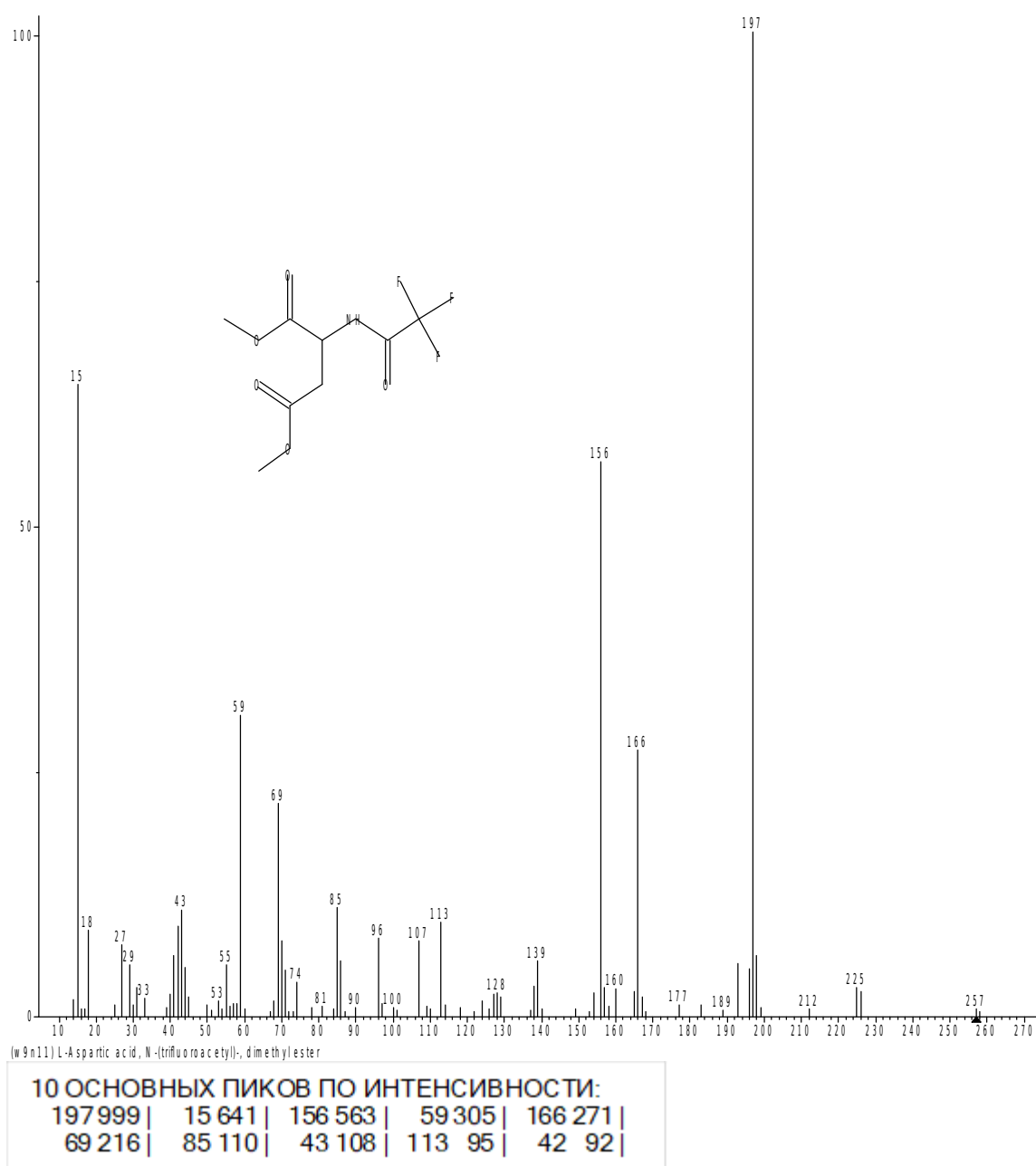
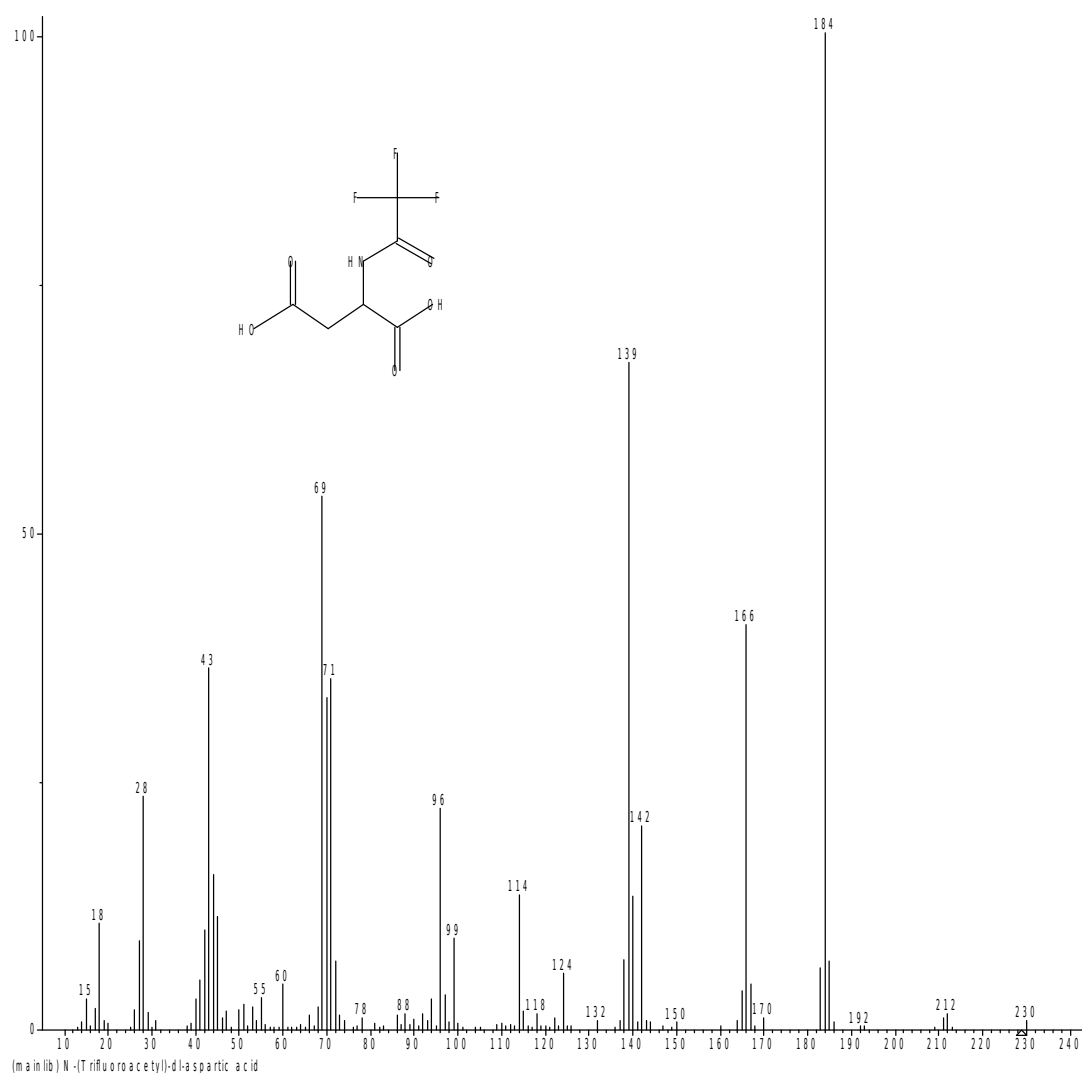


Рисунок 31 – Масс-спектр и схема молекулы N-трифлуороацетил, диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты с указанием характеристических ионов и их интенсивности, взятые из библиотеки NIST MS 14



10 ОСНОВНЫХ ПИКОВ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ:

184999		139669		69535		166406		43362
71351		70332		28234		96222		142204

Рисунок 32 – Масс-спектр N-трифлуороацетил, L-аспарагиновой кислоты с указанием характеристических ионов и их интенсивности, взятый из библиотеки NIST MS 14

Данные некоторых фторпроизводных аспарагиновой кислоты, ацелированные по атому азота с помощью 3,5-бис(трифлуорометил) бензоил хлорида, представили большую ценность вследствие своей большой массы, в частности, N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоил диметилвый эфир аспарагиновой кислоты. Подобные соединения дают наиболее высокий выход при дериватизации, что облегчает их визуализацию на хроматограмме. Однако при

изучении этих веществ понадобилось изменить условия хроматографирования, поскольку при условиях, заданных в предыдущей главе, вариация используемой в исследовании хиральной колонки по температурному режиму оказалась недостаточна для обеспечения разделения подобных производных аспарагиновой кислоты.

Новые условия хроматографирования:

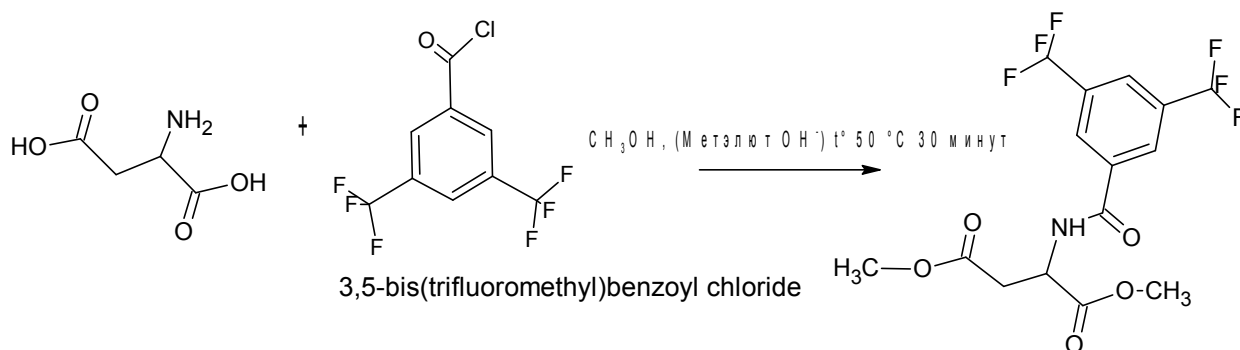
- ввод пробы: импульсный, без деления потока;
- температура инжектора: 240°C;
- температура интерфейса: 230°C;
- время задержки для растворителя перед сканированием – 4,5 минуты;
- интервал сканируемых масс 45-650 m/z;
- импульсное давление: 50.00 psi;
- время импульса: 0.50 мин;
- поток продувки: 20.0 мл/мин;
- время продувки: 1.00 мин;
- начальная температура колонки: 50°C, либо 180°C;
- объем вводимой пробы: 1 мкл;
- общий поток: варьирует;
- скорость потока: варьирует;
- выдержка и скорость подъема: варьирует.

N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоил диметиловый эфир аспарагиновой кислоты получается в результате дериватизации аспарагиновой кислоты 3,5-бис(трифлуорометил) бензоил хлоридом в течение 30 минут при температуре 50°C (Рис.33).

А

Molecular Formula: $C_{15}H_{13}F_6NO_5$

Formula Weight: 401.2578392

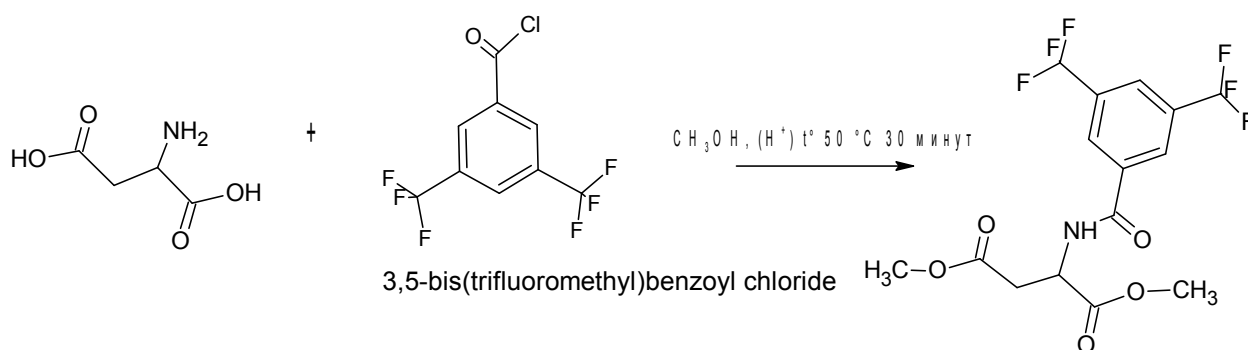


dimethyl (2R)-2-[3,5-bis(trifluoromethyl)benzamido]butanedioate

Б

Molecular Formula: $C_{15}H_{13}F_6NO_5$

Formula Weight: 401.2578392

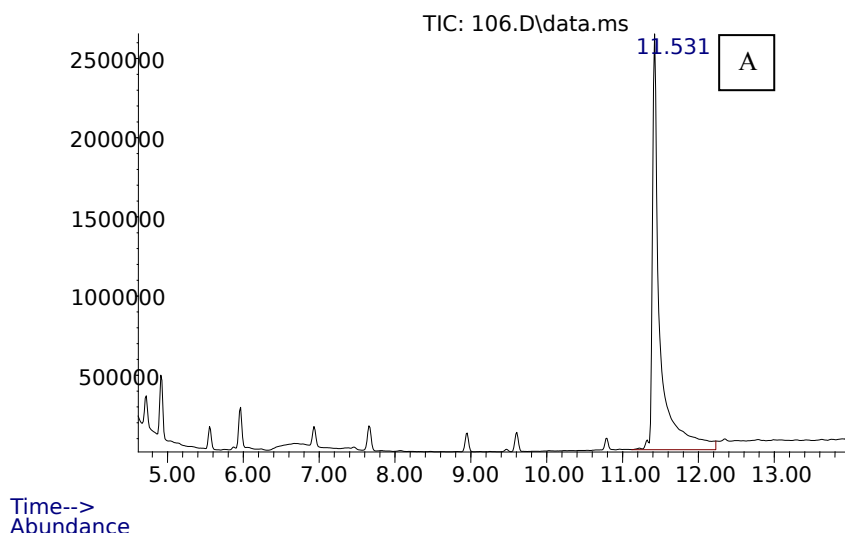


dimethyl (2R)-2-[3,5-bis(trifluoromethyl)benzamido]butanedioate

Рисунок 33 – Схемы и условия реакции дериватизации (А – в щелочной и нейтральной среде, Б – в кислой) при получении N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоил диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты. В качестве дериватизирующего агента использован 3,5-бис(трифлуорометил) бензоил хлорид

После исследования хроматограммы N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоила диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты и определения масс-спектра в SCAN-режиме (Рис.34А) были определены характеристические ионы и сформированы условия для SIM-режима (Рис.34Б).

Abundance



TIC: 106.D\datasim.ms

Б

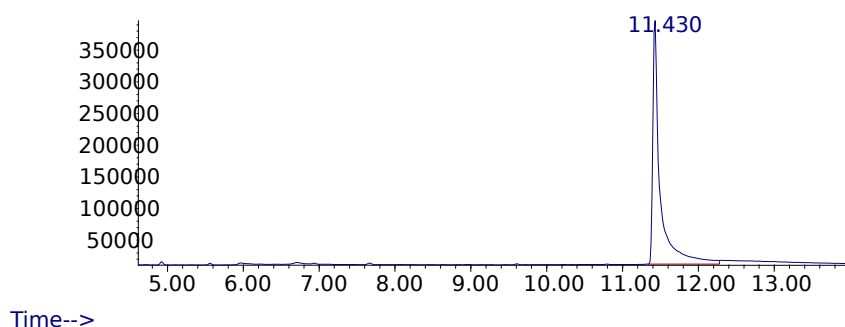


Рисунок 34 – Хроматограммы в SCAN- (А) и SIM- (Б) режимах (для SIM-режима выбраны характеристические ионы: m/z 342, m/z 241 (осн) и m/z 213) N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоила диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты. Время выхода 11.531 минут

Для верификации полученных данных было произведено сравнение масс-спектра полученного вещества (предполагаемого из расчетов на рис. 33 N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоила диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты) с масс-спектром данного эфира, найденным в библиотеке масс-спектров NIST 14 (Рис. 35), а также с контрольным раствором L-аспарагиновой кислоты (стандарт Sigma-Aldrich), дериватизированной 3,5-бис(трифлуорометил) бензоил хлоридом

(Рис. 36-37). В обоих контрольных исследованиях обнаружено полное совпадение масс-спектров веществ, что подтверждает правильность теоретических расчётов.

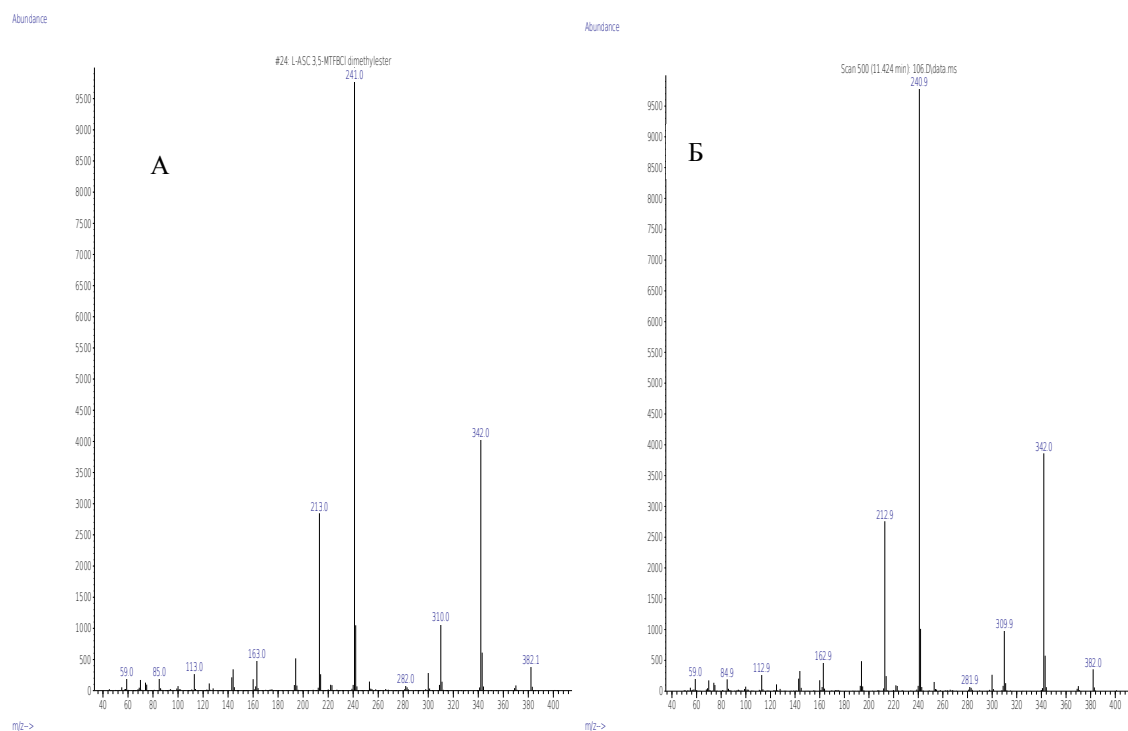


Рисунок 35 – Сопоставление масс-спектра N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоила диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты (получен из пользовательской библиотеки) (А) с анализируемым соединением (Б)

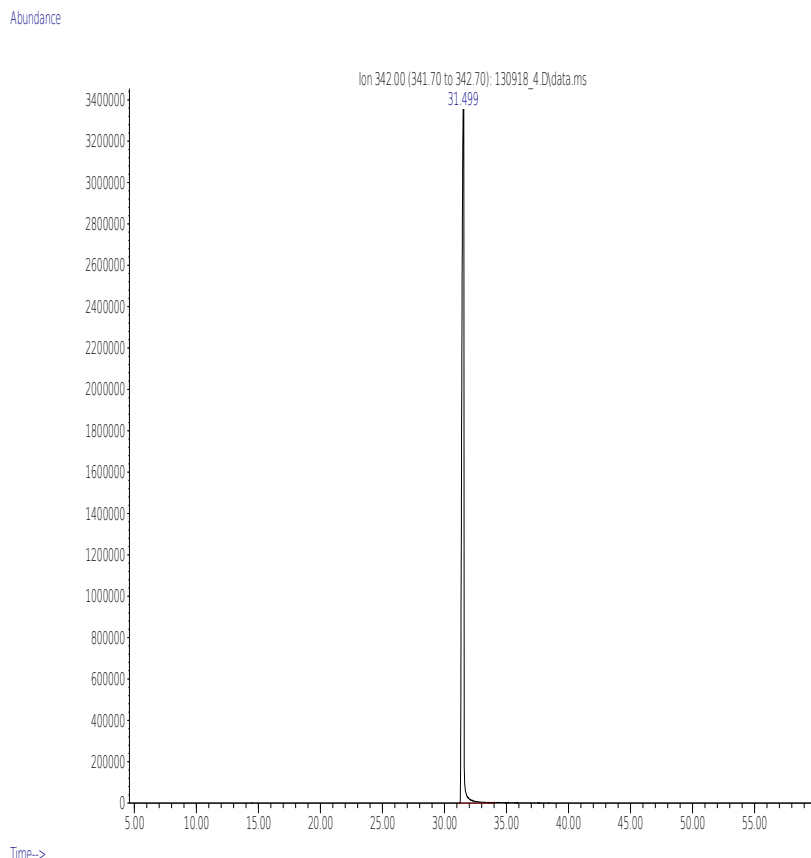


Рисунок 36 – Хроматограмма в SIM-режиме N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоила L-аспарагиновой кислоты (получен с использованием контрольного раствора L-аспарагиновой кислоты (Sigma-Aldrich)). Время выхода 31,499 мин. Условия хроматографирования: давление 11,75 psi, общий поток 24.3 мл/мин, скорость потока 1,4 мл/мин, выдержка 2 минуты, скорость подъема 5°C в минуту до 235°C

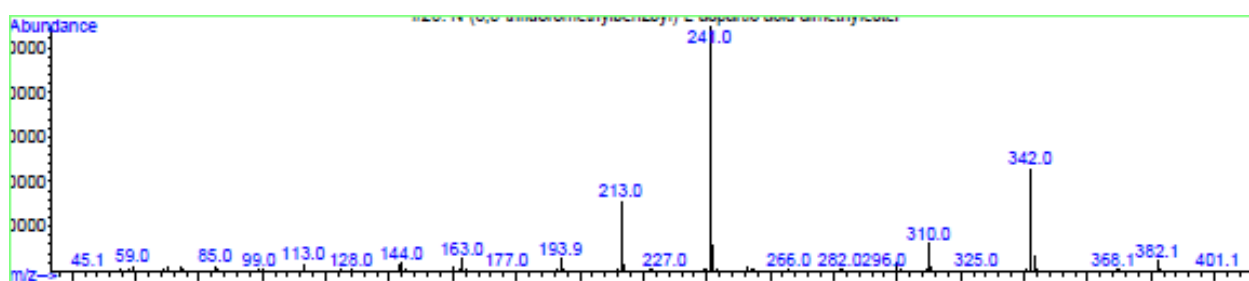


Рисунок 37 – Масс-спектр N-бис (3,5-трифлуорометил) бензоила L-аспарагиновой кислоты (получен с использованием контрольного раствора L-аспарагиновой кислоты (Sigma-Aldrich))

При дериватизации аспарагиновой кислоты пентафлуоробензоил хлоридом был получен N-пентафлуоробензоил диметилвый эфир L- и D-аспарагиновой кислоты. Дериватизация происходила при тех же условиях, что и в предыдущей серии исследований (Рис. 38). Полученные хроматограммы были проанализированы на предмет выявления характеристических ионов, пригодных для формирования SIM-режима (Рис. 39).

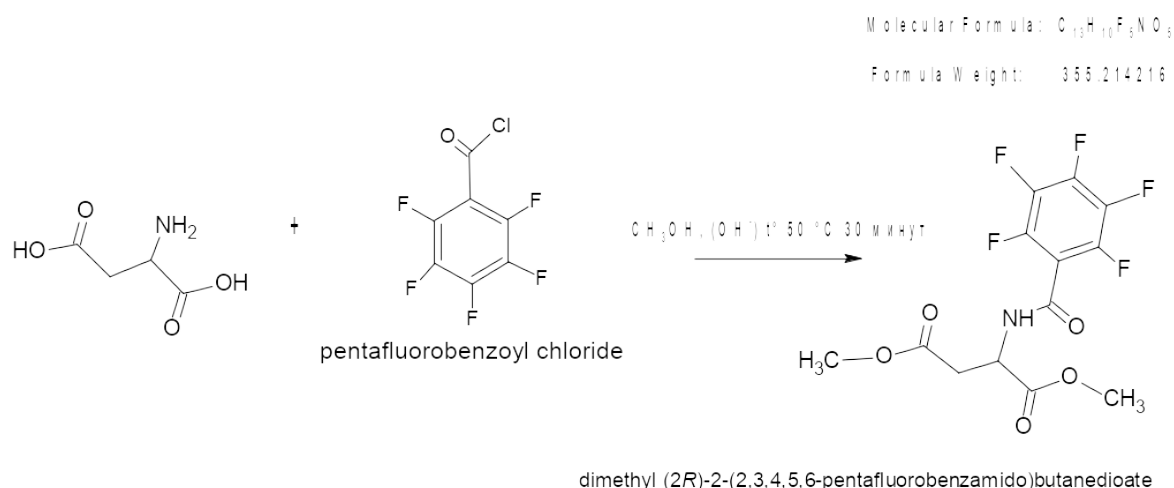


Рисунок 38 – Схема и условия реакции дериватизации при получении N-пентафлуоробензоил диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты. В качестве дериватизирующего агента использован пентафлуоробензоил хлорид

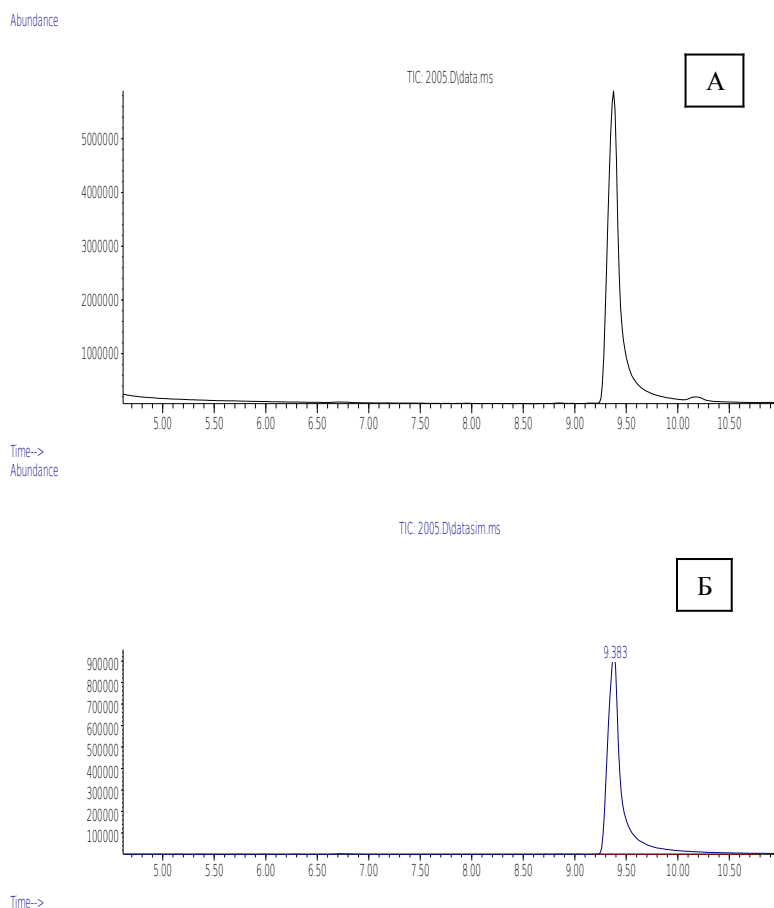


Рисунок 39 – Хроматограмма в SCAN- (А) и SIM- (Б) режимах N-пентафлуоробензоил диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты. Время выхода: 9,383 мин. Условия хроматографирования: давление: 22,86 psi, общий поток: 24.5 мл/мин, объем вводимой пробы 5 мкл, скорость потока 1,6 мл/мин, начальная температура колонки 180°C выдержка 2 минуты при скорости подъема 5°C в минуту до 220°C

Для верификации полученных данных также производилось сравнение полученного масс-спектра с таковым у N-пентафлуоробензоил диметилловых эфиров аспарагиновой кислоты, полученными в контрольных растворах, либо взятых из пользовательской библиотеки масс-спектров (Рис. 40).

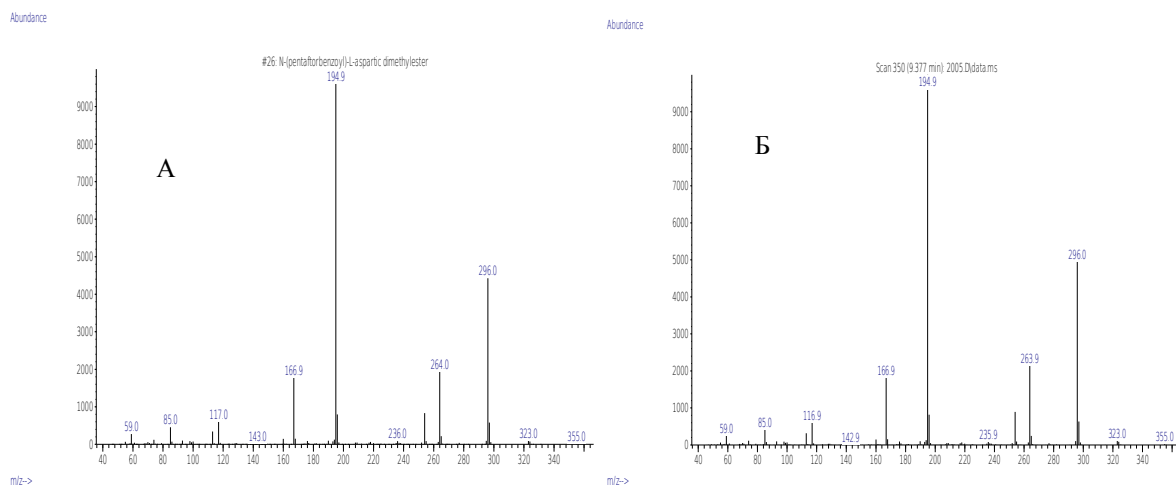


Рисунок 40 – Сопоставление масс-спектра N-пентафлуоробензоил диметилового эфира L-аспарагиновой кислоты (получен из пользовательской библиотеки) (А) с анализируемым соединением (Б)

Полученные в ходе хромато-масс-спектрометрического исследования данные о содержании D- и L-форм аспарагиновой кислоты и ее производных в дентине зуба предоставляют большие возможности для изучения возрастных особенностей изменения аминокислотного состава в твердых тканях зуба. Помимо этого, детальное изучение производных аспарагиновой кислоты с использованием различных дериватизирующих агентов позволило выявить характеристические ионы и сформировать оптимальную тактику выявления на хроматограмме тех веществ, которые являются наиболее подходящими для целей определения биологического возраста человека.

4.2 Разработка цифровой методики определения биологического возраста человека на основании возрастной динамики форм аспарагиновой кислоты

Данные о содержании энантиомеров аспарагиновой кислоты в 140 премолярах от лиц обоих полов разного возраста были статистически обработаны и проанализированы с целью выявления связи между биологическим возрастом доноров и степенью рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине их зубов.

Всего на предмет корреляции с биологическим возрастом было выбрано два хроматографических параметра: относительную площадь пика D-аспарагиновой

кислоты (DaspRPS) и логарифм соотношения количеств D- и L-форм энантиомеров аспарагиновой кислоты: Dasp/Lasp.

Расчет количества энантиомеров производных аспарагиновой кислоты на основе площади их пиков возможен, если предположить, что все вещества, которые находятся в исследуемой смеси, дают отклик на хроматограмме. В этом случае количество вещества в смеси можно считать пропорциональным доли площади его пика от площадей всех зарегистрированных на хроматограмме пиков, и оно может быть выражено в относительных величинах, обычно в процентах. При этом в расчет суммы площадей пиков на хроматограмме не стоит включать пики, образуемые растворителем и другими реактивами, а также веществом подвижной фазы.

Содержание каждого вещества в смеси было рассчитано методом внутренней нормализации, результаты получены в относительных величинах (процентах). Вычисление производилось по формуле:

$$\text{DaspRPS} = \text{DaspPS} * 100 / \sum S, \text{LaspRPS} = \text{Lasp} * 100 / \sum S,$$

где DaspPS, LaspPS – абсолютная площадь пика исследуемого вещества на хроматограмме (D-формы и L-формы производных аспарагиновой кислоты соответственно), $\sum S$ – сумма абсолютных площадей всех пиков на хроматограмме.

Калибровочные результаты хроматографического исследования приведены в табл. 8.

Таблица 8 – Распределение исследуемых зубов по возрасту и полу донора и результаты хроматографического исследования образцов дентина при калибровочном исследовании

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

График уравнения линейной регрессии при использовании в качестве изучаемого параметра относительной площади пика D-формы (DaspRPS) аспарагиновой кислоты представлен на рис. 41, полученное уравнение имеет вид $DaspRPS = 0,1x + 2,8362$; где x – возраст человека.

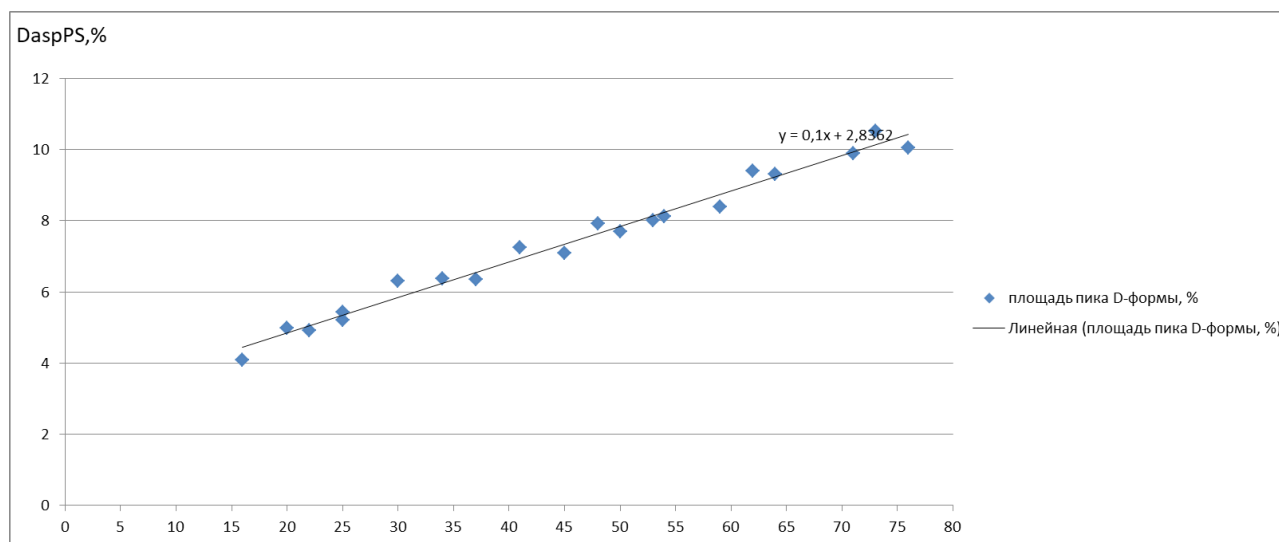


Рисунок 41 – График регрессии, показывающий линейную зависимость между возрастом человека (ось x) и площадью пика D-энантиомера аспарагиновой кислоты на хроматограмме (ось y)

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

$$\ln(1+D/L)-0,045 = 0,0008x + 0,0047,$$

где x – возраст человека, D/L – соотношение относительных площадей пиков любых энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине зуба (Рис.42).

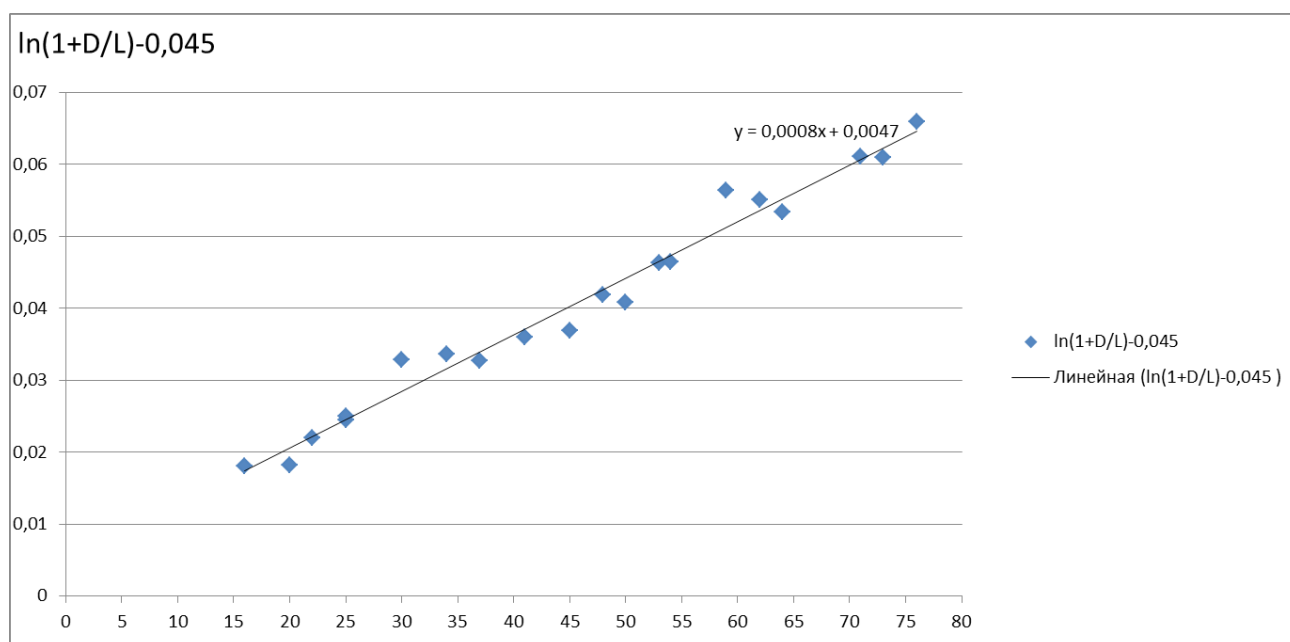


Рисунок 42 – График регрессии, показывающий линейную зависимость между возрастом человека (ось x) и логарифмом соотношения относительных площадей энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине зуба (ось y)

После калибровочного исследования и регрессионного анализа дальнейшие результаты исследования образцов зубной ткани имели целью создание базы данных значений исследуемых хроматографических параметров, общий вид которой представлен в табл. 9.

Таблица 9 – Усредненные значения хроматографических критериев определения биологического возраста человека в дентине зубов по пятилетним возрастным интервалам

Возрастной интервал	DaspRPS, %	Dasp/Lasp
16-20	4.509 ± 0.43	0.01809 ± 0.00092
21-25	5.094 ± 0.24	0.02217 ± 0.00314
26-30	5.611 ± 0.28	0.02908 ± 0.00542
31-35	6.273 ± 0.32	0.03219 ± 0.0047
36-40	6.715 ± 0.27	0.03437 ± 0.00229
41-45	7.149 ± 0.2	0.03652 ± 0.00091

Продолжение Таблицы 9

46-50	7.689 ± 0.42	0.04091 ± 0.00101
51-55	$8.106 \pm 0,45$	0.04612 ± 0.00265
56-60	8.623 ± 0.33	$0,05133 \pm 0.0024$
61-65	9.35 ± 0.28	0.05685 ± 0.00306
66-70	9.597 ± 0.42	0.05899 ± 0.00474
71-76	10.281 ± 0.33	0.06278 ± 0.00276

Таким образом, наибольшую корреляцию с биологическим возрастом показали следующие хроматографические параметры: относительная площадь пика D-аспарагиновой кислоты и логарифм соотношения относительных площадей пиков D- и L-форм энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине с погрешностью в ± 2.4 года. Для определения количества энантиомеров аспарагиновой кислоты в дентине зубов человека следует оценивать следующие производные аспарагиновой кислоты: диметиловый эфир, диэтиловый эфир, диизопропиловый эфир, диизобутиловый эфир, N-трифлуороацетил диизобутиловый эфир, N-пентафлуоробензоил диметиловый эфир, N - бис (3,5-трифлуорометил) бензоил диметиловый эфир.

ГЛАВА V

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Проведенный аналитический обзор источников литературы доказывает, что степень рацемизации аспарагиновой кислоты в дентине дает достаточно точное и адекватное представление о возрасте зуба. Выявлены основные проблемы существующих методик. В первую очередь, в мировой литературе не было найдено единого подхода к исследованию аминокислотного состава дентина зуба. Это ведет к накоплению большого количества хаотичных данных о динамике аминокислот в тканях зуба, полученных с помощью различного оборудования и реактивов, которые невозможно применить в рутинной судебно-медицинской практике. Большинство исследований за рубежом выполнены с применением дорогостоящего оборудования и реагентов, что делает процедуру определения возраста затратной в финансовом и ресурсном планах. Установление возраста в таких исследованиях проводится лишь в рамках научных проектов и мало согласовано с практикой. К тому же, предлагаемые методики слишком трудоемки и требуют большого количества времени, что делает их малоприменимыми в случаях с большим количеством исследуемого материала. Все это диктует необходимость искать оптимальное сочетание точности метода с простотой его исполнения.

Исследования в направлении рацемизации аспарагиновой кислоты дентина зуба в комплексе с другими методами для установления возрастного интервала являются весьма перспективными. Применение данного метода обеспечит системный подход и учет всей информации, которая могла бы, в конечном счете, повысить точность экспертного заключения. В настоящее время решение основных идентификационных задач невозможно без широкого и комплексного использования достижений различных отраслей наук, так как лучшие прикладные результаты достигаются на стыке пограничных научных дисциплин. В процессе идентификации личностей неопознанных трупов необходимо строго дифференцировать место и значение различных методов исследования,

определить их последовательность, оценить достоверность полученных результатов, выявить вопросы, требующие дополнительной научной разработки.

Из приведенных результатов видно, что основную часть неопознанных трупов в Бюро СМЭ ДЗ г. Москвы, составляют трупы мужчин молодого и среднего возраста. Помимо этого, относительно стабилен и ежегодный возрастной состав неопознанных трупов. Стоит отметить, что определенную роль в таком возрастном распределении играет тот факт, что возраст при судебно-медицинском исследовании трупа зачастую устанавливается экспертом с большой погрешностью.

Главной причиной смерти среди неопознанных трупов обоих полов за последние пять лет является отравление, в том числе этиловым спиртом. Отчасти это связано с тем, что чрезмерное употребление алкоголя широко распространено среди лиц обоих полов, ведущих асоциальный образ жизни. У многих из них отсутствуют документы, удостоверяющие личность, и поэтому они зачастую поступают в танатологические отделения в качестве неопознанных. Кроме того, случаи отравления этанолом часто сопровождаются криминальными обстоятельствами, в связи с которыми в равной степени и мужчины, и женщины могут остаться неопознанными.

Значительную долю в структуре смертности неопознанных лиц занимают заболевания сердечно-сосудистой системы, механическая травма, заболевания органов дыхания и механическая асфиксия, что, в целом, характерно для структуры смертности населения в Российской Федерации.

Обращает на себя внимание большой объем работы, выполняемой медико-криминалистическим отделением Бюро СМЭ ДЗ г. Москвы. За изученные 5 лет увеличилось количество экспертиз, проводимых по видеозаписям, фотоснимкам и другим материалам уголовных дел. Ежегодно количество экспертиз, проводимых в отношении костных останков, расчлененных тел и других объектов, неуклонно растет. Причиной тому является увеличение количества природных и техногенных катастроф с массовыми человеческими жертвами, когда на экспертизу одномоментно поступает большое количество фрагментов тел. В связи

с этим эксперт часто вынужден прибегать к однотипным методикам установления признаков личности на различных частях одного и того же трупа.

В настоящее время в медико-криминалистическом отделении возраст устанавливают по степени облитерации швов черепа, инволюционным изменениям черепа, рентгенографии распилов эпифизов трубчатых костей, а также – путем совокупной оценки степени стертости зубов. Пол устанавливают по остеометрическим показателям черепа, таза, плечевой и бедренной костей. Раса зачастую устанавливается по краниометрическим, краниоскопическим и анатомо-морфологическим показателям черепа. Расчет длины тела производится по максимальным длинам длинных трубчатых костей для мужчин и для женщин. Подобный подход связан с высокой сохранностью костной ткани и наличии достаточного количества устойчивых морфологических параметров. Тем не менее, достоверно показано, что применение нескольких методов на одном объекте или одного метода на многих объектах существенно повышает точность определения признака. Поэтому для определения общих признаков личности, и особенно возраста, в случаях проведения экспертизы неопознанных трупов можно рекомендовать комплексный анализ различных тканей из разных областей тела с подбором наиболее точных и достоверных методик. В частности, предпочтение стоит отдавать максимально объективным методикам, результаты применения которых не основаны на субъективной оценке исследователя. Биохимическое определение соотношения форм аспарагиновой кислоты в тканях зуба дает максимально точный и независимый от оценки эксперта ответ, который имеет надежную корреляцию с биологическим возрастом человека.

По масс-спектрам производных аспарагиновой кислоты, образующихся в ходе дериватизации, были вычислены характеристические ионы ее дериватов: m/z 159, 102 (осн), 88 для диметилового эфира аспарагиновой кислоты; m/z 173, 155 (осн), 117 для диизобутилового эфира аспарагиновой кислоты; m/z 189, 130 (осн), 116, 98 для диметилового эфира N-диметил аспарагиновой кислоты; m/z 189, 130, 116 (осн), 98 для диметилового эфира N-метил аспарагиновой кислоты. Указанные массы облегчают обнаружение пиков искоемых веществ на

хроматограмме и существенно повышают точность исследования при изучении тканей зуба.

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

По результатам исследования была определена возможность использовать аминокислотный состав дентина для установления возраста человека в условиях стандартной биохимической лаборатории. Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией позволяет определять стереоизомеры аспарагиновой кислоты, содержащиеся в твердых тканях зуба. Сведения об обнаруженных

особенностях аминокислот в тканях зуба отсутствуют как в отечественной, так и в зарубежной литературе. С учетом установленных в работе стандартов пробоподготовки и параметров хромато-масс-спектрометрического анализа, методика оценки степени рацемизации аспарагиновой кислоты является легковоспроизводимой. Это позволяет рекомендовать ее для исследования возрастной динамики биохимического состава зубов человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Судебно-медицинская диагностика биологического возраста человека требует максимальной точности, поскольку от этого напрямую зависит полезность любого метода в рамках идентификации личности. В то же время для максимальной эффективности на практике исполнение методики не должно быть трудоемким или длительным по времени. Приведенные зарубежные данные слабо систематизированы и представлены единичными исследованиями, направленными на теоретическое обоснование возможности определения возраста человека, а не на практическое применение метода. Большинство исследований выполнено с применением оборудования и материалов, отсутствующих в стандартной биохимической, либо медико-криминалистической лаборатории, в связи с этим существующие на сегодняшний день методики отличаются дороговизной и сложностью исполнения. Помимо этого, в данных мировой литературы отсутствует единый стандарт хроматографического исследования твердых тканей зуба, что еще больше осложняет процесс воспроизведения методик. В изученных научных работах, которые были представлены выше, не было найдено подробного протокола подготовки образцов эмали, дентина и цемента зуба к хроматографии, равно как и протокола с указанием подробных параметров самого хроматографического исследования, что представляет особую ценность при воспроизведении методик для практического применения.

Анализ литературных источников касательно методов определения возраста убедительно доказывает, что вопрос поиска универсального, точного, недорогого и легко воспроизводимого метода с наименьшей затратой времени и ресурсов остается открытым. Изучение аминокислотного состава твердых тканей зубов человека открывает большую область для перспективных исследований. Разработанная методика должна отвечать современным требованиям идентификации личности в нашей стране, а полученные результаты подлежат строгой систематизации и анализу с последующим созданием научной базы данных.

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

8. Хроматомасс-спектрометрическое исследование рекомендуется проводить в SIM-режиме, ориентируясь на характеристические ионы дериватов

аспарагиновой кислоты, в частности, (m/z 159, 102 (осн), 88) для диметилового эфира аспарагиновой кислоты; (m/z 173, 155 (осн), 117) для диизобутилового эфира аспарагиновой кислоты; (m/z 189, 130 (осн), 116, 98) для диметилового эфира N-диметил аспарагиновой кислоты; (m/z 189, 130, 116 (осн), 98) для диметилового эфира N-метил аспарагиновой кислоты. Значения отношений массы к заряду приведены в порядке убывания интенсивности на спектрограмме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аболмасов Н.Г. Ортодонтия: Учебн. пособие / Н.Г.Аболмасов, Н.Н.Аболмасов. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 424 с.
2. Антонова И.Н, Гончаров В.Д., Кипчук А.В., Боброва Е.А. Опыт исследования твердых тканей зуба с помощью атомно-силовой микроскопии // Стоматология. – 2014. – №4. – С. 11-14.
3. Алексеева Л.Н., Кинзерский А.Ю. Определение костного возраста у детей с использованием ультразвукового метода исследования // Гений ортопедии. – 2012. – №2. – С. 123-127.
4. Алексеева Л.Н., Кинзерский А.Ю. Эхографическая визуализация ядер окостенения кисти и запястья для определения костного возраста у детей // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №3. – С. 87.
5. Бишарян М.С., Баринов Е.Х., Манин А.И., Ромодановский П.О. Идентификации личности по особенностям зубочелюстной системы с учетом этнической и расовой принадлежности человека // Судебная медицина. – 2017. – № 4. – С. 4-7.
6. Витер В.И. Судебно-медицинская гистология. Руководство для врачей: изд. 6-е перераб. и доп. – Ижевск. – 2018. – С. 249.
7. Гажва С.И. Изучение стоматологического статуса представителей различных расово-этнических групп с целью идентификации личности // Нижегородский медицинский журнал. – 2002. – №2. – С. 135-138.
8. Глыбочко П.В., Пиголкин Ю.И., Николенко В.Н., Золотенкова Г.В., Ефимов А.А., Алексеев Ю.Д., Федулова М.В., Савенкова Е.Н., Курзин Л.М., Гончарова Н.Н., Юрченко М.А., Мирошниченко Н.В. Судебно-медицинская диагностика возраста: монография. – М.: Издательство Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, 2016. – 318 с. с илл.
9. Голубович Л.Л. Современные возможности идентификации личности по костям, подвергшимся воздействию высокой температуры: автореф. дис. ...д-ра мед. наук. – М., 1991. – 29 с.

10. Дмитриева О.А. Судебно-медицинская экспертиза живых людей. / О.А. Дмитриева, Г.В. Золотенкова, М.А. Юрченко // Судебная медицина и судебно-медицинская экспертиза: национальное руководство / под общ. ред. Ю.И. Пиголкина. – Москва, 2014. – С. 525-558.
11. Долгов А.А. Определение пола по лобковому симфизу, возраста по методике SUCHEY-BROOKS. Экспертные возможности и принципы работы с остеологическим набором // Судебная медицина. – 2015. – №1. – С. 95.
12. Долгов А.А. Абрамов А.С. Веселкова Д.В. Романько Н.А. Определение биологического профиля по морфологическим признакам ребер // Судебная медицина. – 2015 – №1. – С. 21-25.
13. Долгов А.А., Золотенкова Г.В., Титаренко Е.Н. Структурированный анализ антропологических экспертиз, выполненных в медико-криминалистическом отделе ГБУЗ МО «Бюро СМЭ» в период с 2007 по 2016 год // Судебная медицина. – 2018. – №1. – С. 17-21.
14. Звягин В.Н., Анушкина Е.С. — Установление видовой принадлежности костных останков // Полицейская и следственная деятельность. – 2014. – № 1. – С. 178 - 193.
15. Золотенкова Г.В., Федулова М.В. Пути совершенствования микроостеометрического метода судебно-медицинского установления возраста // Проблемы экспертизы в медицине. – 2002. – №4. – С. 30-34.
16. Золотенкова Г.В, Горелкин Д.Г., Полетаева М.П. Судебно-медицинская идентификация личности по возрастным особенностям щитовидного хряща // Судебная медицина. – 2016. – №2. – С. 161-162.
17. Казанджян Г.К., Ромодановский П.О., Бишарян М.С., Баринов Е.Х. Новые возможности использования данных ортопантограмм и гипсовых моделей зубов и твердого неба для идентификации личности // Современные технологии в медицине. – 2012. – №4 – С. 108-111.
18. Клевезаль Г.А., Клейненберг С.Е. Определение возраста млекопитающих по слоистым структурам зубов и кости. – М.: Наука, 1967. – 144 с.

19. Конев В.П., Московский С.Н., Коршунов А.С., Шестель И.Л., Голошубина В.В. Алгоритмы использования современных подходов при микроскопическом исследовании костей для судебно-медицинских целей // Вестник судебной медицины. – 2018 – №1. – С. 50-55.
20. Конев В.П., Шестель И.Л., Московский С.Н. Современные возможности использования атомно-силовой микроскопии в исследовании плотных тканей человека // Вестник судебной медицины. – 2015. – № 2. – С. 17–20.
21. Конев В.П., Шестель И.Л., Коршунов А.С. Взаимоотношение органического матрикса и минерального компонента в костях и эмали зубов при дисплазии соединительной ткани // Сибирский медицинский журнал (Томск). – 2011. – № 2. – С. 77–80.
22. Конев В.П., Шестель И.Л., Московский С.Н. Современные представления о структуре костной ткани: новые методы исследования и возможности использования в судебной медицине // Вестник судебной медицины. – 2016. – № 2. – С. 40-44.
23. Костенко Е.Я., Клевно Р.В. Медико-информационный анализ в программе дентальной идентификации личности по цифровым ортопантомограммам // Судебная медицина. – 2015. – №1. – С. 16-18.
24. Костиленко Ю.П., Бойко И.В. Метод изготовления препаратов прижизненно сохраненных зубов для многоцелевых исследований // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2004. – № 2. – С. 63–65.
25. Костиленко Ю.П., Саркисян Е.Г., Аветиков Д.С., Бойко И.В. Структура эмали и её конфигурационные отношения с дентином жевательных зубов человека // Вестник биологии и медицины. – 2014. – №107. – С. 193-197.
26. Кузина Ю.Г. Анатомо-морфологические исследования зубов с целью выявления индивидуальных особенностей человека: Дис... канд. мед. наук – М., 2002. – 188 с.
27. Манин А. И., Ромодановский П. О., Баринов Е. Х. Современные возможности идентификации личности по стоматологическому статусу // ПЭМ. – 2014. – №1. – С. 45-46.

28. Павловский О.М. Биологический возраст человека. – М.: изд-во МГУ, 1987. – 280 с.
29. Пашинян Г.А. Идентификация личности по комплексному исследованию особенностей строения зубов и зубных рядов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2005. – №5. – С. 26-29.
30. Пиголкин Ю.И., Гончарова Н.Н., Самоходская О.В., Черепов А.В. Дифференцированная балловая оценка возрастных изменений костей кисти (новые методические приемы) // Вестник Московского университета. Серия XXIII. Антропология. – 2010. – №3. – С. 32-45.
31. Пиголкин Ю.И., Федулова М.В., Золотенкова Г.В. Определение возраста человека по костной ткани. // Судебно-медицинская экспертиза. – 2012. – №1. – С. 49-51.
32. Пиголкин Ю.И., Юрченко М.А., Гончарова Н.Н. Применение планиметрического и планиграфического методов для определения возраста человека по рентгенограммам костей кисти // Морфологические ведомости. – 2012. – №2. – С. 118-125.
33. Пиголкин Ю.И., Юрченко М.А., Золотенкова Г.В., Ластовицкий А.Г. Планиметрический и планиграфический методы для определения возраста человека по рентгенограммам костей кисти // Вестник Авиценны. Таджикистан. – 2012. – №3. – С. 115-122.
34. Пиголкин Ю.И., Юрченко М.А., Федулова М.В. Основные закономерности возрастной инволюции костей кисти // Судебно-медицинская экспертиза. – 2012. – №6. – С. 13-15.
35. Пиголкин Ю.И., Юрченко М.А., Золотенкова Г.В., Гончарова Н.Н., Мосоян А.С. Оценка биологического возраста человека по рентгенологическим признакам костей кисти // Вестник судебной медицины. – 2015. – №2. – С. 27-30.
36. Пиголкин Ю.И. Планиграфический метод определения возраста по рентгенограммам костей кисти. / Ю.И. Пиголкин, Г.В. Золотенкова, М.В. Федулова, Н.Н. Гончарова, М.А. Юрченко // Судебно- медицинская диагностика возраста / под ред. П.В. Глыбочко, Ю.И. Пиголкина. – Москва, 2016. – С. 115-139.

37. Пиголкин Ю.И., Николенко В.Н., Золотенкова Г.В., Даллакян В.Ф. Возможности использования морфологических методов при установлении общих и специфических признаков судебно-медицинской идентификации личности // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2012. – №4. – С. 900-905.
38. Пиголкин Ю.И., Гарсия Корро М.А., Золотенкова Г.В. Возрастные изменения турецкого седла, лобных и клиновидных пазух // Судебно-медицинская экспертиза. – 2016. – № 6. – С. 48-53.
39. Плишкина А.А. Установление возраста и пола человека по степени стираемости зубов с учетом наличия ряда патологических состояний и вредных условий труда: дис... канд. мед. наук – М., 2006. – 132 с.
40. Позовская Е.В. Вариативная изменчивость зубочелюстной системы человека // Современные проблемы науки и образования. – 2018. – №4. – С. 242.
41. Попов В.Л. Судебно-медицинская экспертиза. Справочник. / В.Л. Попов. – СПб: Специальная литература, 1997. – 330 с.
42. Привес М.Г., Машкара К.И., Рохлин Д.Г. Влияние труда на старение скелета // Проблемы геронтологии и гериатрии в ортопедии и травматологии. – Киев: Здоров'я, 1966. – С. 135-136.
43. Пятчук С.В. Судебно-медицинское определение возраста человека по инволютивным изменениям бедренной и большеберцовой костей: автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Барнаул, 2001. - 20 с.
44. Ротова А.А. Определение степени искажения на ортопантомограммах // Смоленский медицинский альманах. – 2018. - №1. – С. 91-93.
45. Саидов М.Т., Бишарян М.С. Исследование особенностей зубочелюстной системы жителей Дагестана и Армении с целью идентификации личности // Судебно-медицинская экспертиза. – 2008. – Т. 51. – №6. – С. 30-33.
46. Семенов В.В.. К вопросу об определении половой принадлежности фрагментированных нативных и озоленных костей // Вопросы криминологии, криминалистики и судебной экспертизы. – 2017. – Т.41. – №1. – С. 201-208.
47. Станчев Н.А. Одонтологические критерии судебно-медицинской диагностики возраста человека: автореф. дис. ...канд. мед. наук. – М., 1987. – 27с.

48. Судебно-медицинская экспертиза возраста у живых лиц: справочно-методическое пособие / Курск: ОБУЗ «БСМЭ» КЗ Курской области, ГОУ ВПО «КГМУ», 2012. – 48с.
49. Трезубов В.Н., Арутюнов С.Д. Клиническая стоматология. Учебник / В.Н. Трезубов, Л.М. Мишнев, С.Д. Арутюнов. – М.: Практическая медицина, 2015. – 788с.
50. Удальцова К.А. Структура интактных дентина и эмали молочных зубов человека // Свет медицины и биологии. – 2008. – №4. – С. 70-76.
51. Фейгин А.В., Япаров С.С., Пойлов С.А. Использование прижизненных ортопантомограмм в целях идентификации личности // Проблемы экспертизы в медицине. – 2006. – Т.6. – №1(21). – С. 50-51.
52. Шалина Т.И., Васильева Л.С., Исаев Ю.С. Особенности роста костей кисти как критерий определения биологического возраста детей в различных экологических условиях проживания // Судебно-медицинская экспертиза. – 2009. – Т. 52. – №4. – С. 20-24.
53. Шехтер И.А., Воробьев Ю.И., Котельников М.В. Атлас рентгенограмм зубов и челюстей в норме и патологии. М.: Медицина, 1968. – 256с.
54. Эделев Н.С., Воробьев В.Г. Об определении возраста неопознанных трупов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – №6. – С. 27-28.
55. Юрченко М.А. Судебно-медицинское определение возраста на основании изучения рентгенограмм кисти: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2018. – 25 с.
56. Янковский В.Э., Киселев В.Д., Пятчук С.В. Исследование остеопоротических изменений длинных трубчатых костей нижних конечностей для определения биологического возраста человека // Судебно-медицинская экспертиза. – 2006. – №3. – Р. 9-13.
57. Ajmal M. Amino Acid Racemization from Tooth for Age Estimation – An Overview // Malaysian J Forensic Sci. – 2012. – №3(1). – Р. 41-45.
58. Antunovic M., Galic I., Zelic K., Nedeljkovic N., Lazic E., Djuric M., Cameriere R. The third molars for indicating legal adult age in Montenegro // Legal Med. – 2018. – №33. – Р. 55–61.

59. Asami R., Aboshi H., Iwawaki A., Ohtaka Y., Odaka K., Abe S., Saka H. Age estimation based on the volume change in the maxillary premolar crown using micro CT // *Legal Med.* – 2019. – №37. – P. 18–24.
60. Asif M.K., Nambiar P., Mani S.A., Ibrahim N.B., Khan I.M., Lokman N.B. Dental age estimation in Malaysian adults based on volumetric analysis of pulp/tooth ratio using CBCT data // *Legal Med.* – 2019. – №36. – P. 50–58.
61. Asif M.K., Nambiar P., Mani S.A., Ibrahim N.B., Khan I.M., Sukumaran P. Dental age estimation employing CBCT scans enhanced with Mimics software: Comparison of two different approaches using pulp/tooth volumetric analysis // *J Forensic Leg Med.* – 2018. – №54. – P. 53–61.
62. Avelar Toledo L.E., Cardoso M.A., Santos Bordon L., de Miranda Avelar L., de Miranda Avelar J.V. Aging and sexual differences of the human skull // *Plast Reconstr Surg Glob Open.* – 2017. – №5(4). – P. e1297.
63. Bayrak S., Halicioglu S., Kose G., Halicioglu K. Evaluation of the relationship between mandibular condyle cortication and chronologic age with cone beam computed tomography // *J Forensic Leg Med.* – 2018. – №55. – P. 39–44.
64. Bonicelli A., Xhemali B., Kranioti E.F., Zioupos P. Rib biomechanical properties exhibit diagnostic potential for accurate ageing in forensic investigations // *PLoS ONE.* – 2017. – №12(5). – P. e0176785.
65. Bunch P.M. Skeletal development of the hand and wrist: digital bone age companion – a suitable alternative to the Greulich and Pyle atlas for bone age assessment? // *Skeletal Radiol.* – 2017. – №46. – P. 785–793.
66. Cardoso H., Meyers J., Liversidge H.M. A Reappraisal of Developing Deciduous Tooth Length as an Estimate of Age in Human Immature Skeletal Remains // *J Forensic Sci.* – 2019. - №64(2). – P. 385-392.
67. Carolan V.A., Gardner M.L., Lucy D., Pollard A.M. Some considerations regarding the use of amino acid racemization in human dentine as an indicator of age at death // *J Forensic Sci.* – 1997. – Vol.42. – №1. – P. 10-16.
68. Cameriere R., Ferrante L., Cingoloni M. Age estimation in children by measurement of open apices in teeth // *Int J Leg Med.* – 2006. – №120. – P. 49-52.

69. Demarchi B. Geochronology of coastal prehistoric environments: a new closed system approach using amino acid racemization: PhD Thesis. – York, 2009.
70. Edmondston S.J., Price R.I., Valente B., Singer K.P. Measurement of vertebral body heights: ex vivo comparisons between morphometric X-ray absorptiometry, morphometric radiography and direct measurements // *Osteoporos Int.* – 1999. – №10(1). – P. 7-13.
71. Fisher E., Austin D., Werner H.M., Chuang Y.J., Bersu E., Vorperian H.K. Hyoid bone fusion and bone density across the lifespan: prediction of age and sex // *For Sci Med Pat.* – 2016. – №12. – P. 146–157.
72. Gelderman H.T., Kruiver C.A., Oostra R.J., Zeegers M.P., Duijst W.L.J.M. Estimation of the postmortem interval based on the human decomposition process // *J Forensic Leg Med.* – 2019. – №61. – P. 122–127.
73. Greulich W.W., Pyle S.I. Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist. (2nd ed.). – California: Stanford University Press, 1959.
74. Griffin R.C., Penkman K.E.H., Moody H., Collins M.J. The impact of random natural variability on aspartic acid racemization ratios in enamel from different types of human teeth // *For Sci Int.* – 2010. – №200(1-3). – P. 148–152.
75. Griffin R.C., Moody H., Penkman K.E.H., Collins M.J. Application of amino acid racemization in enamel to the estimation of the age of human teeth // *For Sci Int.* – 2008. – №175(1). – P. 11-16.
76. Gilsanz V., Ratib O. Bone age atlas. – USA: Springer, 2004. – 110pp.
77. Hare P.E., Mitterer R.M. Laboratory Simulation of Amino-Acid Diagenesis in Fossils // *Yearbook Carnegie Institution of Washington.* – 1969. – №67. – P. 205-208.
78. Helfman P.M., Bada J.L. Aspartic Acid Racemization in Dentin as a Measure of Ageing // *Nature.* – 1976. – №262. – P. 279-281.
79. Hendy E.J., Tomiak P.J., Collins M.J., Hellstrom J., Tudhope A.W., Lough J.M., Penkman K.E.H. Assessing amino acid racemization variability in coral intra-crystalline protein for geochronological applications // *Geochim Cosmochim Ac.* – 2012. – №86. – P. 338-353.

80. Hishama S., Abdullah N., Noor M.H.M., Franklin D. Quantification of secondary dentin formation based on the analysis of MDCT scans and dental OPGs in a contemporary Malaysian population // *Legal Med.* – 2019. – №36. – P. 59–66.
81. Jaffe H.L. Metabolic, degenerative and inflammatory diseases of bones and joints. – Philadelphia: Lea and Febiger, 1972.
82. Juan L.P., Abe G.G., Alvaro L.R., Patria L.L., Rafael G.D. Dental Methods Forage corpses Identification (Review) // *J Forensic Sci & Criminal Invest.* – 2017. – Vol.6. – №1. – P. 555-686.
83. Kapoor P., Jain V. Comprehensive Chart for Dental Age Estimation (DAEcc8) based on Demirjian 8-teeth method: Simplified for operator ease // *J Forensic Leg Med.* – 2018. – №59. – P. 45–49.
84. Kaufman D.S. Temperature sensitivity of aspartic and glutamic acid racemization in the foraminifera Pulleniatina // *Quat Geochronol.* – 2006. – №1(3). – P. 188-207.
85. Kelmendi J., Vodanović M., Koçani F., Bimbashi V., Mehmeti B., Galić I. Dental age estimation using four Demirjian's, Chaillet's and Willems' methods in Kosovar children // *Legal Med.* – 2018. – №33. – P. 23-31.
86. Kiran K. Dental age estimation using amino acid racemization // *Ind J Dent Res.* – 2008. – №19. – P. 172-174.
87. Koranne V.V., Mhapuskar A.A., Marathe S.P., Joshi S.A., Saddiwal R.S., Nisa S.U. Age estimation in Indian adults by the coronal pulp cavity index // *Journal of Forensic Dent Sci.* – 2017. – №9(3). – P. 177.
88. Kraus B.S., Jordan R.E. The human dentition before birth. – Philadelphia: Lea and Febiger, 1965. – 218pp.
89. Lopes L.J., Nascimento H.A.R., Lima G.P., dos Santos L.A.N., Queluz D.P., Freitas D.Q. Dental age assessment: Which is the most applicable method? // *For Sci Int.* – 2018. – №284. – P. 97–100.
90. Macchiarelli R., Bondioli L. Linear densitometry and digital image processing of proximal femur radiographs: implications for archaeological and forensic anthropology // *Am J Phys Anthropol.* – 1994. – №3(1). – P. 109-122.

91. Mânica S., Gorza L. Forensic odontology in the 21st century – Identifying the opinions of those behind the teaching // *J Forensic Leg Med.* – 2019. – №64. – P. 7–13.
92. Mânica S., Wong F.S.L., Davis G., Liversidge H.M. Estimating age using permanent molars and third cervical vertebrae shape with a novel semi-automated method // *J Forensic Leg Med.* – 2018. – №58. – P. 140-144.
93. Mansourvar M., Ismail M., Kareem S.A., Raj R.G., Nasaruddin F., Aik S., Gunalan R., Antony C. Bone Age Estimation Using Clavicle Bone // *Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology* [serial online]. – 2017. – Vol.18. – №1.
94. Mazzilli L.E.N., Melani R.F.H., Lascale C.A., Palacio L.A.V., Cameriere R. Age estimation: Cameriere's open apices methodology accuracy on a southeast Brazilian sample // *J Forensic Leg Med.* – 2018. – №58. – P. 164-168.
95. Melo M., Ata-Ali J. Accuracy of the estimation of dental age in comparison with chronological age in a Spanish sample of 2641 living subjects using the Demirjian and Nolla methods // *For Sci Int.* – 2017. – №270. – P. 276.e1–276.e7.
96. Orem C.A., Kaufman D.S. Effects of basic pH on Amino Acid Racemization and leaching in freshwater mollusk shell // *Quat Geochronol.* – 2010. – №6. – P. 233-245.
97. Page M., Lain R., Kemp R., Taylor J. Validation studies in forensic odontology – Part 1: Accuracy of radiographic matching // *Science and justice.* – 2018. – №58. – P. 185–190.
98. Panchbhai A.S. Dental radiographic indicators, a key to age estimation // *Dentomaxillofac Radiol.* – 2011. – №40. – P. 199-212.
99. Pate R.S., Tingne C.V., Dixit P.G. Age determination by spheno-occipital synchondrosis fusion in Central Indian population // *J Forensic Leg Med.* – 2018. – №54. – P. 39–43.
100. Pe´rez-Mongiovi D., Teixeira A., Caldas I.M. The radiographic visibility of the root pulp of the third lower molar as an age marker // *Forensic Science, Medicine and Pathology.* – 2015. – №11. – P. 339–344.
101. Pinchi V., Deluca F., Ricciardi F., Focardi M., Piredda V., Mazzeo E., Norelli G.A. Skeletal age estimation for forensic purposes: A comparison of GP , TW2 and TW3 methods on an Italian sample // *For Sci Int.* – 2014. – №238. – P. 83-90.

102. Predko-Engel A., Kaminek M., Langova K., Kowalski P., Fudalej P.S. Reliability of the cervical vertebrae maturation (CVM) method // Bratisl Lek Listy. – 2015. – №116(4). – P. 222-226.
103. Priyadarshini C., Puranik M.P., Uma S.R. Dental Age Estimation Methods: A Review // Int J Adv Health Sci. – 2015. – №1(12). – P. 19-25.
104. Ritz-Timme S., Rochholz G., Schütz H.W., Collins M.J., Waite E.R., Cattaneo C., Kaatsch H.J. Quality assurance in age estimation based on aspartic acid racemization // Deut Z Ges Geric Med. – 2000. – №114(1-2). – P. 83-86.
105. Sakuma A., Ohtani S., Saitoh H., Iwase H. Comparative analysis of aspartic acid racemization methods using whole-tooth and dentin samples // Forensic Science International. – 2012. – №223. – P. 198–201.
106. Sarajlic N., Gradiscevic A. Morphological characteristics of pubic symphysis for age estimation of exhumed persons // Bosn J Basic Med Sci. – 2012. – №12(1). – P. 51-54.
107. Schmeling A., Dettmeyer R., Rudolf E., Vieth V., Geserick G. Forensic Age Estimation: Methods, Certainty, and the Law // Dtsch Arztebl Int. – 2016. – №113. – P. 44-50.
108. Schoretsaniti L., Mitsea A., Sifakakis I. Karayianni K. Age estimation using cervical vertebral maturation // Journal of Forensic Odonto-Stomatology. – 2017. – Vol.35Suppl. – №1. – P. 45.
109. Sehrawat J.S., Singh M. Willems method of dental age estimation in children: A systematic review and meta-analysis // J Forensic Leg Med. – 2017. – №52. – P. 122–129.
110. Sharma¹ S. Hand wrist radiograph: A Critical Review / S. Sharma¹, S. Sharma, A.K. Goyal // International Journal of Oral Health Dentistry. – 2016. – №2(2). – P. 106-109.
111. Sironi E., Pinchi V., Pradella F., Focardi M., Bozza S., Taroni F. Bayesian networks of age estimation and classification based on dental evidence: A study on the third molar mineralization // J Forensic Leg Med. – 2018. – №55. – P. 23–32.

112. Stavrianos C., Mastagas D., Stavrianou I., Karaiskou O. Dental age estimation of adults: A review of methods and principles // *Res J Med Sci.* – 2008. – №2. – P. 258-268.
113. Tanner J.M., Whitehouse R.H., Healy M.J.R. A new system for estimating skeletal maturity from the hand and wrist, with standards derived from a study of 2600 healthy british children. – Paris: International Children's Centre, 1962.
114. Teivens A., Mörnstad H., Pfeiffer H. Estimation of dental age using HPLC-technique to determine the degree of aspartic acid racemization // *J Forensic Sci.* – 1994. – №39(6). – P. 1425-1431.
115. Torimitsu S., Makino Y., Saitoh H., Ishii N., Inokuchi G., Motomura A., Chiba F., Yamaguchi R., Hoshioka Y., Urabe S., Iwase H. Age estimation based on maturation of the medial clavicular epiphysis in a Japanese population using multidetector computed tomography // *Legal Med.* – 2019. – №37. – P. 28–32.
116. Ubelaker D.H., Khosrowshahi H. Estimation of age in forensic anthropology: historical perspective and recent methodological advances // *Forensic Sciences Research.* – 2019. - №4(1). – P. 1-9.
117. UNDRR (2019), Global Assessment Report on Disaster Risk Reduction, Geneva, Switzerland, United Nations Office for Disaster Risk Reduction (UNDRR) [Accessed October 29, 2019]. – <https://gar.unisdr.org>.
118. Wei X. An Evaluation of “Old Age” Traits in Transition Analysis and Mandibular Ridge Resorption in Age Estimation of Older Individuals. A Thesis Submitted to the School of Graduate Studies in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Arts. – Hamilton, 2016.
119. Williamson R.A. Histological preparation of teeth and tooth growth // *Oral Biology and Dentistry.* – 2015. - №3(1). – art.№3.
120. Wochna K., Bonikowski R., Śmigielski J., Berent J. Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample // *Forensic Science, Medicine and Pathology.* – 2018. – №14. – P. 285–294.

121. Wolf M., Streit B., Dokládál M., Schultz M. Determining Human Age at Death Using Cremated Bone Microstructure // Biomed J Sci & Tech Res. – 2017. – №1(3). – P. 785-791.
122. Yekkala R., Meers C., Van Schepdael A., Hoogmartens J., et al. Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age // Forensic Science International. – 2006. – №159. – P. S89–S94.