

На правах рукописи

ЧЕТВЕРТНОВА

Анна Павловна

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

14.03.05 – Судебная медицина

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
профессор

Эделев Николай Серафимович

Официальные оппоненты:

Гусаров Андрей Александрович – доктор медицинских наук, ФГКУ «111 Главный государственный центр судебно-медицинских и криминалистических экспертиз» Министерства обороны Российской Федерации, отделение (судебно-биологической экспертизы) отдела (медико-криминалистической идентификации), заведующий отделением

Новоселов Владимир Павлович – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра судебной медицины, заведующий кафедрой

Ведущая организация – ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «29» октября 2020 г. в «13» часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.04 ФГАО ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Конева Елизавета Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень разработанности темы диссертации

При расследовании уголовных дел по факту «детоубийств» (ст. 106 УК РФ), а именно убийства матерью новорожденного ребенка во время или сразу же после родов, необходимым является выявление в следах на вещественных доказательствах первородного кала – мекония, т.к. его обнаружение подтверждает факт имевших место родов и дает следственным органам информацию об их месте и времени.

В настоящее время выявление мекония в следах на вещественных доказательствах основано только на изучении его морфологического состава микроскопическим методом. Однако, при малом количестве исследуемого материала, неблагоприятном воздействии факторов внешней среды, что зачастую не редкость в судебно-медицинской практике, многие морфологические элементы мекония могут не выявляться. В судебно-медицинской литературе содержатся лишь единичные упоминания об исследовании мекония в следах на вещественных доказательствах, и все они посвящены изучению его морфологического состава микроскопическим методом [Бронникова М.А., Гаркави А.С., 1963; Барсегянц Л.О., 2005; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009]. Учитывая низкую выявляемость типичных морфологических элементов микроскопическим методом целесообразно изучение ферментного и пигментного составов мекония с целью разработки новых методических подходов для его обнаружения в следах на вещественных доказательствах.

При диагностике мекония также необходимо отличать его от кала. Выявление последнего основано на обнаружении типичных морфологических элементов микроскопическим методом [Бронникова М.А., Гаркави А.С., 1963; Барсегянц Л.О., 1998; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009; Сулейменова Г.М., 2013]. Кроме этого проводились исследования по изучению ферментного состава кала в следах [Ильина Е.А., 1991; Федоровцев А.Л., 2002; Федоровцев А.Л. и соавт., 2009]. Установлено, что ферменты желудочно-кишечного тракта, выявляемые в кале, присутствуют и в других биологических жидкостях, т.е. данные пробы являются

неспецифичными. В недавнее время появились результаты молекулярно-генетического исследования кала, основанные на выявлении генов бактерий, входящих в состав кишечной микрофлоры. [Verhoff M.A. et al., 2002; Andrew Carson C. et al., 2009; Hiroaki N. et al., 2013; Zou K.-N. et al., 2016; Sinelnikov et al. A., 2017]. Однако, несмотря на высокую чувствительность, данные способы не лишены недостатков.

Разработка новых подходов для диагностики кала повысит объективность и доказательную значимость судебно-медицинских биологических экспертиз, т.к. появится возможность его дифференцирования от мекония. Кроме этого, выявление кала в следах на вещественных доказательствах дает ценную информацию правоохранным органам при расследовании преступлений по поводу насильственных действий сексуального характера (ст. 132 УК РФ).

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

Цель исследования

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

Задачи исследования

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

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

Научная новизна

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

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

Предложенные способы установления наличия мекония и кала в следах на объектах внешней среды повышают объективность и доказательную значимость судебно-медицинских биологических экспертиз, что позволяет оказать более эффективную помощь правоохранительным органам в расследовании

преступлений по факту детоубийств и насильственных действий сексуального характера.

Доступность оборудования, скорость и простота выполнения используемых методик обеспечивают возможность применения разработанных способов в практической деятельности врачей – судебно-медицинских экспертов судебно-биологических отделов бюро судебно-медицинской экспертизы.

Методология и методы исследования

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

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

Положения диссертации, выносимые на защиту

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

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

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

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

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

Связь работы с научными программами и планами

Диссертационное исследование выполнено на базе кафедры клинической судебной медицины ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, ГБУЗ НО «Нижегородское областное бюро судебно-медицинской экспертизы» и ОГБУЗ «Костромское областное бюро судебно-медицинской экспертизы».

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

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

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Личный вклад соискателя

Личное участие автора осуществлялось на всех этапах диссертационной работы и заключалось в заборе материала, планировании, организации и проведении научного исследования по всем разделам диссертации, включая

аналитический обзор литературы. Автором лично проведена систематизация, статистическая обработка, анализ и интерпретация полученных результатов.

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

Степень достоверности исследования

Достоверность полученных результатов диссертационной работы подтверждается достаточным количеством объектов исследования, использованием методов и методик, адекватных поставленным задачам, с применением современных методов статистического анализа.

Первичная документация и материалы статистической обработки проверены и признаны достоверными.

Выводы логичны и адекватно отражают содержание диссертационной работы, соответствуют поставленным задачам. Основные результаты опубликованы в научных изданиях, в том числе, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации.

Апробация диссертации

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

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

национальные тенденции и перспективы развития судебной экспертизы» (Нижний Новгород, 2019).

Внедрение результатов исследования

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

Публикации по теме диссертации:

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

Структура и объем диссертации

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

Иллюстрирована 14 таблицами, 18 рисунками, 2 приложениями.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы исследования

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

В экспериментах было исследовано:

– 50 образцов мекония мертворожденных плодов без признаков гнилостных изменений, умерших в результате нарушения плацентарного кровообращения (отслойки плаценты, фетоплацентарной недостаточности), пороков развития, сроком от 20 до 41 недели внутриутробного развития;

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

– 50 образцов кала от трупов взрослых лиц без признаков гнилостных изменений в возрасте от 40 до 75 лет, без видимых при секционном исследовании болезненных изменений печени, желчного пузыря, кишечника.

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

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

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

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

Во всех экспериментах образцы мекония и кала исследовали через 3 суток, 1 и 6 месяцев, 1 и 2 года после забора материала.

Исследование проводилось в несколько этапов. На начальном этапе была изучена и проанализирована научная литература, посвященная вопросу исследования мекония и кала в следах на вещественных доказательствах. На первом этапе осуществлялся забор образцов мекония от мертворожденных плодов и живых новорожденных, а также трупов взрослых лиц. В случаях забора материала от мертворожденных плодов в рабочем журнале фиксировались время забора материала, дата рождения, вскрытия, внутриутробный возраст, причина смерти. При взятии материала от живых новорожденных отмечалось и количество дней после рождения. При заборе образцов кала от взрослых лиц указывали дату изъятия, возраст трупов, наличие сопутствующей патологии. На втором этапе исследован морфологический состав мекония и кала методами световой и люминесцентной микроскопии. На третьем этапе исследована активность амилазы и трипсина мекония и кала пробой в крахмально-агаровом геле и методом субстратной пленки соответственно, а также наличие желчных кислот

модификацией реакции Петтенкофера. На четвертом этапе изучен пигментный состав мекония и кала методами спектрофотометрии и восходящей тонкослойной хроматографии. На пятом этапе проведен анализ полученных данных и статистическая обработка с помощью статистического пакета STADIA.

Методы исследования

Метод световой и люминесцентной микроскопии

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

Препараты изучали с использованием светового микроскопа МИКМЕД-5 без окраски и после обработки раствором Люголя. Обзорную микроскопию проводили с объективом 20x и окулярами 10x. Изучение отдельных элементов – с объективом 40x и окулярами 10x.

Для исследования препаратов методом люминесцентной микроскопии препараты окрашивали 0,0005% водным раствором акрихина в течение 10 минут. Исследования проводили на люминесцентном микроскопе OLYMPUS CX-41 с объективами 20x, 40x и окулярами 10x.

Исследование активности амилазы в крахмально-агаровом геле

Во всех экспериментах по изучению пигментного состава, активности амилазы и трипсина в составе мекония и кала вырезки размерами 0,5x0,5 см из верхнего слоя тампонов из области пятен этих выделений заливали 0,5 мл физиологического раствора (при исследовании спектров поглощения вырезки заливали 2 мл физиологического раствора) и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4-8°.

Для изучения активности панкреатической амилазы в составе мекония и кала использовалась модификация методики, предложенная А.Л. Федоровцевым (1998), для установления наличия кишечного содержимого и слюны с использованием крахмально-агарового геля.

Исследование активности трипсина методом субстратной пленки

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

Установление наличия желчных кислот модификацией реакции

Петтенкофера

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

Метод спектрофотометрии

Для исследования спектров поглощения видимого и ультрафиолетового света мекония и кала использовали метод спектрофотометрии. Для этого вырезки с марлевых тампонов из пятен мекония и кала размерами 0,5x0,5 см заливали 2,0 мл физиологического раствора и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 4°, затем центрифугировали в течение 4-5 мин при 1500 об/мин и фильтровали через фильтровальную бумагу. Для исследования использовали спектрофотометр СФ-2000 со спектральным диапазоном от 190 до 1100 нМ под управлением внешнего персонального компьютера типа IBM PC с программным обеспечением

СФ-2000. Измерения производились в спектральном диапазоне от 300 до 700 нМ с шагом 1 нМ. Вытяжки из исследуемых объектов помещали в кюветы спектрофотометра с толщиной поглощающего слоя 1 см и исследовали в режиме «Сканирование». В качестве контроля использовали физиологический раствор, которым производилось экстрагирование объектов. Результаты получали в виде графиков и автоматически производили поиск экстремумов (пиков поглощения).

Метод восходящей тонкослойной хроматографии

Для исследования пигментного состава мекония и кала использован метод восходящей тонкослойной хроматографии. Для хроматографирования использовали хроматографические пластины ПТСХ-АФ-В. В качестве растворителя использовали смесь n-бутанола, ледяной уксусной кислоты и дистиллированной воды в соотношении 4:1:2. Для выявления желчного пигмента стеркобилина, пластину после элюирования помещали в термостат на 2-3 минуты при температуре 50-52° и проявляли реактивом Эрлиха (10% раствор парадиметилбензальдегида в концентрированной соляной кислоте). Затем снова, в вертикальном положении, помещали в термостат на 2-3 минуты при температуре 50-52°. При этом оранжевые полосы на хроматограммах окрашивались в красный цвет, что подтверждало факт наличия стеркобилина в исследуемых образцах.

Методы статистической обработки данных

Обработка данных производилась с помощью статистического пакета STADIA 8.0. С целью выявления зависимости между признаками использовались частотные таблицы сопряженности признаков, обрабатываемые с помощью критерия Пирсона (критерий χ^2).

С целью выявления статистически значимых различий, исследуемые количественные признаки исследовались на близость к нормальному распределению (распределению Гаусса). Анализ показал, что распределение признаков отлично от нормального, поэтому сравнение данных выполнялось с помощью непараметрических методов статистики (сравнивались медианы); т.к. изучаемые выборки являются непарными, то сравнение выполнялось с помощью критериев Вилкоксона и Ван дер Вардена.

Результаты исследования

Изучение морфологического состава мекония и кала

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

При исследовании образцов мекония мертворожденных плодов сроком с 20 по 41 неделю внутриутробного развития и живых новорожденных, родившихся на 38-41 неделе внутриутробного развития со сроком внеутробной жизни от 1 до 2 суток, были выявлены клетки рогового слоя многослойного плоского ороговевающего эпителия кожи и мекониевые тельца. При микроскопии препаратов мекония, начиная с 32 недели внутриутробного развития, обнаруживали пушковые волосы.

Клетки рогового слоя эпидермиса кожи были выявлены в 100% исследованных образцов; частота обнаружения мекониевых телец составила около 50%; пушковые волосы были выявлены в 33% образцов мекония плодов и новорожденных, начиная с 32 недели внутриутробного развития. При этом не было выявлено связи между внутриутробным возрастом плодов и частотой обнаружения морфологических элементов.

Таким образом, на основании проведенного исследования, можно сделать вывод о том, что морфологический состав мекония в следах на вещественных доказательствах довольно скуден.

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

При микроскопии кала, основную массу составлял недифференцируемый аморфный детрит, среди которого выявляли фрагменты переваренных и полупереваренных мышечных волокон, полупереваренные зерна вне- и внутриклеточного крахмала, элементы перевариваемой и неперевариваемой растительной клетчатки, йодофильную микрофлору в виде палочек и кокков.

Необходимо подчеркнуть, что частота встречаемости дифференцируемых элементов в препаратах кала была также невысока.

Сроки хранения образцов мекония и кала не влияли на выявление дифференцируемых морфологических элементов.

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

Вышеуказанные отличия морфологического состава могут быть использованы как для обнаружения мекония и кала в следах на вещественных доказательствах, так и для дифференциации этих видов выделений между собой.

Изучение активности панкреатической амилазы мекония и кала

С целью изучения активности панкреатической амилазы в составе мекония мертворожденных плодов, новорожденных и кала взрослых лиц было проведено 600 экспериментов реакцией в 2% и 1% крахмально-агаровом геле.

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

При этом получены следующие результаты:

- 1) Проба на наличие амилазы с образцами мекония давала как положительные, так и отрицательные результаты.
- 2) Положительные результаты пробы при исследовании образцов мекония наблюдали на протяжении всего срока наблюдений.
- 3) Количество положительных проб возрастало с увеличением внутриутробного возраста.

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

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

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

Изучение активности трипсина в меконии и кале

С целью изучения активности трипсина мекония и кала взрослых лиц проведено 600 экспериментов методом субстратной пленки при времени инкубации 2 и 4 часа.

Образцы мекония были разделены на 5 таких же групп, как и в предыдущем разделе.

При этом получены следующие результаты:

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

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

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

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

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

Таким образом, проба по выявлению трипсина методом субстратной пленки может быть использована как этап комплексной диагностики наличия кала в следах на вещественных доказательствах, наряду с тестом по выявлению амилазы. Однако данный способ не может быть использован для дифференциальной

диагностики мекония и кала, т.к. и при исследовании мекония проба в ряде случаев также дает положительные результаты.

Изучение желчных кислот в меконии и кале

С целью установления наличия желчных кислот в меконии и кале взрослых модификацией реакции Петтенкофера проведено 150 экспериментов. Оценка результатов реакции осуществлялась визуально, без применения каких-либо аппаратных методов.

Образцы мекония были разделены на 5 групп (которые приведены выше).

При этом получены следующие результаты:

1) При исследовании желчных кислот в образцах мекония плодов и новорожденных на протяжении всего срока наблюдений были получены положительные, отрицательные и сомнительные результаты. Полученные результаты объясняются тем, что в кишечнике новорожденных около 70-80% желчных кислот выводится с меконием, что связано с незрелостью всех этапов их печеночно-кишечной циркуляции.

2) В ходе исследования образцов мекония не было выявлено зависимости между частотой выявления желчных кислот ни с внутриутробным возрастом плодов, ни с давностью хранения материала.

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

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

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

Изучение пигментного состава мекония и кала методом спектрофотометрии

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

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

Всего проведено 300 экспериментов.

При этом получены следующие результаты:

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

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

С целью поиска различий между спектрами поглощения мекония и кала производилось их сравнение с помощью критериев Вилкоксона и Ван дер Вардена в статическом пакете STADIA – 8.0. При этом уровень значимости $\alpha \ll 0,001$, что позволяет утверждать о наличии статистически значимых различий между спектрами поглощения мекония и кала.

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

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

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

Таким образом, исследование спектров поглощения ультрафиолетового и видимого света меконием и калом может быть использовано как способ их обнаружения, так и для дифференциации данных выделений.

Изучение пигментного состава мекония и кала методом восходящей тонкослойной хроматографии

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

С целью изучения пигментного состава кала было исследовано 50 образцов кала взрослых лиц в возрасте от 40 до 75 лет.

Всего выполнено 810 экспериментов.

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

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

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

При этом установлено, что при нагревании образцов при температуре $+100^\circ$ в течение 2 часов реакция на наличие стеркобилина кала была положительной.

Также положительные результаты получены при воздействии температуры -15° в течение 1 суток.

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

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

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

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

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

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

При этом оказалось, что наибольшее разведение, при котором результат реакции был положительным, составило – 16 раз.

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

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

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

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

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

Данный способ может быть использован не только для установления наличия кала в следах на вещественных доказательствах, но и для дифференциальной диагностики мекония и кала, поскольку в меконии данный пигмент не выявляется.

ВЫВОДЫ

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

2. В кале постоянно выявлялись панкреатическая амилаза и трипсин, при этом желчные кислоты не обнаруживались. В меконии непостоянно выявлялись

панкреатическая амилаза, трипсин и желчные кислоты, что не позволяет использовать данные признаки для диагностики мекония и кала.

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

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

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

6. Используя микроскопический, спектрофотометрический методы исследования и метод восходящей тонкослойной хроматографии выявлены отличия морфологического и пигментного составов мекония и кала, а именно при исследовании мекония обнаружены безъядерные клетки эпидермиса, мекониевые тельца и пушковые волосы и зарегистрированы пики поглощения света на длинах волн $332,42 \pm 2,05$ и $399,84 \pm 2,6$ нМ; при исследовании кала обнаружены элементы пищи растительного и животного происхождения, колонии йодофильной микрофлоры, выявлен желчный пигмент – стеркобилин, не выявляющиеся в меконии, и зарегистрирован характерный пик поглощения света на длине волны $498,0 \pm 2,65$ нМ, которые могут быть использованы в качестве критериев дифференциальной диагностики данных выделений в следах на вещественных доказательствах.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления стеркобилина кала методом восходящей тонкослойной хроматографии вырезки из следов на вещественных доказательствах с

предполагаемым наличием кала размерами 0,5x0,5 см заливают 0,5 мл физиологического раствора и экстрагируют в течение 24 часов при температуре 4°. Для хроматографии используют хроматографические пластины ПТСХ-АФ-В размерами 10,0x10,0 см.

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

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

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

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

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Четвертнова А.П.** Спектрофотометрическое исследование мекония и кала в следах на вещественных доказательствах / А.П. Четвертнова, А.Л. Федоровцев, Н.С. Эделев // **Вестник судебной медицины.** – 2018. – №3. – С. 36-38.

2. **Патент на изобретение №2646813**, Российская Федерация, G01N 33/48. Способ установления наличия мекония и/или кала в следах на вещественных

доказательствах. / Эделев Н.С., Федоровцев А.Л., **Четвертнова А.П.** – №2017117541 заявл. 19.05.2017, **опубл. 07.03.2018, бюл. № 7 – 1 стр.**

3. Пох Е.В., Федоровцев А.Л., **Четвертнова А.П.** К вопросу о дифференцировании крови взрослого и новорожденного человека // Сборник трудов VIII Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием «Достижения российской судебно-медицинской науки XX-XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ». – Москва, 2018. – Т.2. – С. 51-53.

4. Эделев Н.С., Федоровцев А.Л., **Четвертнова А.П.** Современные возможности по выявлению мекония и кала в следах на вещественных доказательствах // Сборник трудов VIII Всероссийского съезда судебных медиков с международным участием «Достижения российской судебно-медицинской науки XX-XXI столетия: к 100-летию со дня образования современных судебно-экспертных школ». – Москва, 2018. – Т.2. – С. 59-61.

5. **Четвертнова А.П.**, Федоровцев А.Л., Эделев Н.С. Установление наличия кала методом восходящей тонкослойной хроматографии // **Судебная медицина.** – 2018. – №4. – С. 33-35.

6. **Четвертнова А.П.**, Федоровцев А.Л., Эделев Н.С. Установление наличия мекония в следах на вещественных доказательствах // Сборник докладов международной научной конференции «Международные и национальные тенденции и перспективы развития судебной экспертизы». – Нижний Новгород, 2019. – С. 374-378.

7. **Патент на изобретение №2691727**, Российская Федерация, G01N 33/50. Способ установления наличия кала в следах на вещественных доказательствах / **Четвертнова А.П.**, Федоровцев А.Л., Эделев Н.С. – №2018115660 заявл. 26.04.2018, **опубл. 18.06.2019, бюл. № 17 – 1 стр.**

8. **Четвертнова А.П.** Федоровцев А.Л., Эделев Н.С. Дифференциальная диагностика мекония и кала в следах на вещественных доказательствах // **Судебно-медицинская экспертиза.** – 2019 – №6. – С. 42-46.