

ВИКОРИСТАННЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЇ РЕАКЦІЇ НА АМІЛАЗУ В ЕКСПЕРТИЗАХ, ПОВ'ЯЗАНИХ ЗІ СТАТЕВИМИ ЗЛОЧИНАМИ

І.В. Холоділова

Відділення судово-медичної цитології Київського міського бюро судово-медичної експертизи

Резюме: Експериментальним шляхом з'ясована специфічність, чутливість ферментативної реакції на амілазу, залежність результатів реакції від стану слини, періоду екстрагування висушеної слини та часу обліку результатів.

Ключові слова: амілаза, ферментативна реакція, виділення, судово-медична експертиза.

ВСТУП. При проведенні судово-медичної експертизи, а саме, в справах по зґвалтуванню та насильницьких діях сексуального характеру, основним завданням цитологів є мікроскопічне дослідження клітинного складу накладань біологічного походження з визначенням статеві, регіональної належності та групові характеристики. Також треба враховувати, що дослідженню підлягає матеріал, на який ще мали вплив фактори зовнішнього середовища, мікробна флора та час. Тому, клітини в об'єкті можуть втратити свої виражені цитохімічні та морфологічні особливості. Так, пористу цитоплазму клітини можна прийняти за спіненість лише тільки із-за наявності порожнин, які в нашому випадку, скоріше за все, є наслідком дії мікробної флори, тому що дослідженню підлягає матеріал, відібраний не безпосередньо від пацієнта та і мікроорганізми виступають супутником всього живого, населяють порожнини та зовнішню поверхню тіла людини. Так, напівлізоване ядро клітини може бути результатом дії руйнівних факторів зовнішнього середовища, а не знаходиться в стані аутолізу (дане явище відноситься до живих клітин). Лише виявленої паралельної складчастості цитоплазми в епітеліальних клітинах слизових оболонок недостатньо для віднесення їх до епітеліальних клітин порожнини рота. Білкові включення навколо ядра, які характерні для цитоплазми епітеліальних клітин слизових оболонок порожнини рота, знаходяться в поверхневих шарах, а в об'єкт можуть потрапити клітини глибоких шарів, тобто без цих включень.

Враховуючи, що клітини багат шарового плаского незроговілого епітелію мають схожі морфологічні особливості, а цитохімічні властивості можуть бути «змазані», для більш повної характеристики об'єкту та визначення/підтвердження регіональної належності епітеліальних клітин повинно бути проведено їх дослідження біологічними методами. Так, для підтвердження походження епітеліальних клітин

за рахунок порожнини рота необхідно провести ферментативну реакцію на наявність амілази. Але, на жаль, при постановці даної реакції доволі часто отримуються сумнівні результати: неповне просвітлення вмісту пробірок або забарвлення коричневатого чи фіолетового кольору.

Все це наводило на думку, наскільки неоднозначно веде себе ця реакція в наших дослідженнях. Так, матеріалом при дослідженні змиву зі статевого члену, як правило, виступає сумарний склад, в якому обов'язково може бути присутній піт, можливі – слина, піхвові виділення, кров, сеча, сперма, вміст прямої кишки.

Тому, *метою дослідження* було з'ясування: 1) впливу на чутливість ферментативної реакції стану слини (свіжа слина, витяжка з висушеного на марлі зразка слини), сечі (свіжа сеча, витяжка з висушеного на марлі зразка сечі); 2) як проявляє себе слина в суміші з іншими можливими виділеннями, тобто перевірка специфічності реакції; 3) яку мінімальну кількість слини (свіжої або з витяжки висушеної на марлі) виявляє дана реакція; 4) який оптимальний час екстрагування витяжки з об'єкта; 5) протягом якого часу необхідно враховувати результати реакції.

Матеріали і методи дослідження. Для визначення впливу на чутливість ферментативної реакції стану слини, сечі і сперми та визначення максимального розведення вказаних виділень, при якому ферментативна реакція дає позитивний результат, використовувалися: свіжі зразки слини в розведенні від цільної до 1:131072; витяжки з висушених на марлі зразків слини, отримані при екстрагуванні фізіологічним розчином, у розведенні від цільної до 1:131072; свіжі зразки сечі в розведенні від цільної до 1:32; витяжки з висушених на марлі зразків сечі при екстрагуванні у фізіологічному розчині з послідовним розведенні до 1:32; свіжі зразки сперми в розведенні від цільної до 1:8; витяжки із висушених на марлі зразків сперми при екстрагуванні у фізіологічному розчині в розведенні від цільної до 1:8.

Для визначення оптимального часу екстрагування та часу обліку результатів використовувались: висушені на марлі зразки слини та сечі, які екстрагували фізіологічним розчином протягом 1 та 20 годин.

Для перевірки специфічності ферментативної реакції наявності амілази матеріалом були: зразки сечі; зразки сечі + слини; зразки крові; зразки крові + слини; зразки сечі +

крові; зразки сечі + слини + крові; зразки сперми.

Реакція по визначенню чутливості даної ферментативної реакції проводилась двома методиками (в агарі та пробірках), а визначення оптимального часу екстрагування, часу обліку результатів та перевірка специфічності – одним (в пробірках).

Реакція на амілазу в агаровому гелі проводилась в модифікації Баймакової О.А.(1975): на предметні скельця наносили шар товщиною \approx 1 мм розплавленого крохмально-агарового гелю (2 г картопляного крохмалю і 1 г агару розчиняють при нагріванні в 100 мл фізіологічного розчину), в якому після охолодження робили отвори діаметром 3 мм і вносили до них досліджувані зразки свіжої слини та витяжки з висушених на марлі зразків слини. Дана реакція в пробірках проводилась таким чином: в пробірки з 2% розчином крохмалю, який готували на фізіологічному розчині, вносили вищевказані експериментальні зразки у співвідношенні - 1 крапля розчину крохмалю + 1 крапля досліджуваних зразків свіжої слини, сечі, сперми та витяжки з висушених на марлі зразків слини, сечі, сперми.

В якості контролю використовували: крохмально-агаровий гель з додаванням в лунки фізіологічного розчину та розчин крохмалю з додаванням фізіологічного розчину.

Скельця з агаром у вологих камерах, пробірки під гумовими пробками поміщали в термостат на 18-20 годин при температурі 37⁰ С. Контроль розщеплення крохмалю проводили шляхом додавання розчину Люголя в розведенні 1:6 або 1:3, який виступав в якості індикатору. Позитивним результатом є прозорий або світло-жовтий вміст пробірки та прозоре коло агару навколо лунки, що вказує на розщеплення крохмалю. Синій колір вмісту пробірки або кола агару навколо лунки є негативним результатом (розщеплення крохмалю не відбулось). Дослідженню підлягали 584 проби.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

I. При визначенні чутливості ферментативної реакції зі зразками **свіжої слини** після додаванням розчину Люголя спостерігалось: 1) агар навколо лунок залишався прозорим в розведенні 1:2048, а в розведенні 1:4096 – ледь фіолетовим; 2) в пробірках вміст залишався прозорим в розведенні 1:4096, а в розведенні 1:8192 – ледь фіолетовим.

При визначенні чутливості ферментативної реакції зі зразками **свіжої сечі** після додаванням розчину Люголя спостерігалось: - в пробірках вміст залишався прозорим при розведенні 1:2 - 1:4, з фіолетово-коричневатим забарвленням вмісту в розведенні 1:8, в розведенні 1:16 вміст пробірок мав фіолетовий колір.

При визначенні чутливості ферментативної реакції зі зразками **свіжої сперми** після додаванням розчину Люголя спостерігалось: - в пробірках вміст залишався прозорим в нерозведеному стані

сперми, а в розведенні 1:2 - мав фіолетовий колір.

II. При визначенні чутливості ферментативної реакції з **витяжками з висушених на марлі зразків слини** після додавання розчину Люголя спостерігалось: - вміст пробірок залишався прозорим в розведенні 1:512, а агар навколо лунок в цьому розведенні мав ледь помітне фіолетове забарвлення.

При визначенні чутливості ферментативної реакції з **витяжками з висушених на марлі зразків сечі** після додавання розчину Люголя спостерігалось: - вміст пробірок залишався прозорим в нерозведеному стані, в розведенні 1:2 мав коричневе або коричнєво-фіолетове забарвлення, а в розведенні 1:4 – став фіолетовим.

При визначенні чутливості ферментативної реакції з **витяжками з висушених на марлі зразків сперми** після додавання розчину Люголя спостерігалось: - вміст в пробірках з нерозведеною спермою став прозорим після відстоювання протягом години, а в розведенні 1:2 мав фіолетовий колір.

III. При дослідженні витяжок з висушених на марлі зразків **слини та сечі з різним часом** (1 та 20 годин) екстрагування та часом, протягом якого проводився облік, були отримані такі результати: 1) вміст пробірок зі зразками **слини** після **1 години** екстрагування став прозорим в розведенні 1:32, а після 3-х годин спостереження знебарвлення вмісту пробірок відмічалось в розведенні на ступінь вище; 2) вміст пробірок зі зразками **сечі** після **1 години** екстрагування став прозорим в цільному стані, а в розведенні 1:2 мав ледь помітне коричневате забарвлення, а після 1 години відстоювання вміст пробірок в більшості пробірок не змінився; 3) вміст пробірок зі зразками **слини** після **20 годин** екстрагування став прозорим в розведенні до 1:512; 4) вміст пробірок зі зразками **сечі** після **20 годин** екстрагування в цільному стані став прозорим, а в розведенні 1:2 мав ледь помітне коричневате забарвлення, а після відстоювання вміст пробірок в більшості пробірок не змінився.

На відміну від цього, пробірки з контролем марлі ані відразу, ані після відстоювання з додаванням розчину Люголя свій колір не змінили.

Отже, виявилось, що стан слини, а також час екстрагування витяжок грають важливу роль, а саме впливають на чутливість реакції: **свіжа слина** проявляє більш виражену ферментативну активність, ніж витяжки, отримані з висушених на марлі зразків слини і становить в агарі 1:2048, а в пробірках - 1:4096. В зв'язку з тим, що об'єктом наших досліджень є висохлі сліди виділень, важливе значення мають результати, отримані при дослідженні саме висушених зразків. При дослідженні **витяжок з висушених на марлі зразків слини** чутливість реакції знижується і титр максимального розведення в пробірках з позитивним результатом в більшості випадків становить 1:512, в одиничних випадках - 1:256.

Зразки свіжої сечі дають позитивний

результат в розведенні 1:4-1:8 в переважній кількості проб, а при дослідженні витяжок з висушених на марлі зразків сечі реакція є позитивною відразу в нерозведеній витяжці у переважній кількості проб, та у одиничних випадках в розведенні 1:2.

Сперма: як свіжі зразки сперми так і витяжки з висушених на марлі зразків сперми проявляють себе позитивно лише в нерозведеному стані, причому в нерозведених зразках знебарвлюється вміст пробірки одразу після додавання розчину Люголя, а витяжки проявляють себе після відстоювання вмісту пробірок протягом години.

При порівнянні результатів проведення ферментативної реакції наявності слини в агарі та в пробірках позитивний результат в пробірках мав більш виражений характер і спостерігався на ступень вище, ніж в агарі. При неодноразовому повторенні реакції результати не змінилися. Що ж стосується використання агару, то він в даному випадку виступає щільним середовищем та дає можливість досягнення максимального контакту розчину крохмалю з досліджуваним матеріалом, але як відмічено вище, чутливість реакції, проведеної в пробірках, зі свіжою слиною та її витяжкою на ступінь вище реакції в агарі. Отже, відмова від агару дозволяє виявляти наявність слини в мінімальних об'ємах витяжки та підвищує чутливість реакції, знижує вартість та трудоемкість процесу.

Окрім цього, спостерігалось знебарвлення вмісту пробірок та агару навколо лунок на ступінь вище при продовженні спостереження за пробірками протягом 3-х та більше годин після додавання розчину Люголя. В контрольних пробірках та в агарі після додавання розчину Люголя знебарвлення не відбувалось на протязі всього часу спостереження, що наводить на думку, що необхідно проводити облік результатів не тільки безпосередньо після додавання розчину Люголя, а й протягом 3-х та більше годин.

IV. При перевірці специфічності ферментативної реакції при дослідженні можливих біологічних накладань та суміші їх в нерозведеному стані після додавання розчину Люголя виявлено: 1) вміст пробірок зі зразками **сечі** став прозорим; 2) вміст пробірок зі зразками **сечі** та **слини** став прозорим; 3) вміст пробірок зі зразками **крові** залишився синім; 4) вміст пробірок зі зразками **крові та слини** став прозорим; 5) вміст пробірок зі зразками **сечі та крові** став прозорим; 6) вміст пробірок зі зразками **сечі, слини та крові** став прозорим; 7) вміст пробірок зі зразками **сперми** став прозорим.

Що ж стосується дослідження сперми на наявність амілази, то отримані позитивні результати могли бути обумовлені домішками сечі. Однак, при їх перевірці, були отримані негативні результати.

ВИСНОВКИ

1. При отриманні позитивних результатів

ферментативної реакції на амілазу, необхідно відокремити джерело її походження: за рахунок слини, сечі або сперми.

2. Припускаючи сумарний склад слідів-накладань при проведенні експертиз, пов'язаних зі статевою недоторканністю людини, необхідно, по-перше, проводити дослідження на наявність сечі з метою виключення її домішок, по-друге, враховуючи, що максимальний титр розведень витяжок зразків слини та сечі, які дають позитивний результат на амілазу та дозволяють її виявити, різко відрізняється - з метою запобігання отримання хибно-позитивного результату за рахунок домішок сечі необхідно розвести витяжку з об'єкту до 1:2.

2. При дослідженні сперми, у випадках наявності в об'єктах лише сперматозоїдів або голівок сперматозоїдів (наприклад, вміст презервативу) і відсутності епітеліальних клітин в препаратах, приймати позитивний результат ферментативної реакції на амілазу за наявності слини не треба.

Література

1. **Шалаев Н.Г.** Судебно-медицинская экспертиза подозреваемых в половых преступлениях /Н.Г. Шалаев // Автореф. дис... канд.мед.наук, - Горький, 1966. - 28 с.

2. **Барсегянц Л.О.** Судебная медицина / Л.О. Барсегянц - М., - 1997.

3. **Науменко В.Г.** Гистологический и цитологический методы исследования в судебной медицине /В.Г. Науменко, Н.А. Митяева. - М.: Медицина, 1980. - 303 с.

4. **Сидоров Л.В.** Цитологические и люминисцентные методы при судебно-медицинском исследовании вещественных доказательств / Л.В. Сидоров, Г.И. Заславский, М.В. Маяцкая, В.Л. Попов. - СПб., 2003. - 41-54 с.

5. **Баймакова О.А.** Определение слюны в следах на вещественных доказательствах по амилазной активности / О.А. Баймакова, Н.В. Литвиненко, И.В. Теплухова. - Саранск, 1999.- 31 с.

6. **Методические указания** об установлении наличия и групповой принадлежности слюны, наличия мочи, спермы. М., 1975. - 25 с.

7. **Федоровцев А.Л.** Современные возможности исследования следов-наложений на вещественных доказательствах / А.Л. Федоровцев. - Суд.-мед. эксперт. - 2005. - №1 - с. 39-42.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ НА АМИЛАЗУ В ЭКСПЕРТИЗАХ, СВЯЗАННЫХ С ПОЛОВЫМИ ПРЕСТУПЛЕНИЯМИ

Холодилова И.В.

Резюме: Опытным путем определена специфичность, чувствительность ферментативной реакции на амилазу, зависимость результатов реакции от состояния слюны, времени экстрагирования высушенной слюны, периода

учета результатов реакции.

Ключевые слова: амилаза, ферментативная реакция, выделения, судебно-медицинская экспертиза

APPLICATION OF FERMENTATION PROCESS FOR PRODUCTION OF AMYLASE IN EXPERT REPORTS ON SEXUAL CRIMES

Kholodilova I.

Summary: By way of experiment the following has been determined: specifics, sensitivity of fermentation process for production of amylase; inter-connection between the test results and the composition of saliva at

the moment of extraction from dried saliva when analysing the reaction test results

Key-words: amylase, fermentation process, secretion, forensic medical examination