

ОСОБЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ СТАТЕВОСПЕЦИФІЧНИХ ЦИТОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ПРИ ПРОВЕДЕННІ ЕКСПЕРТИЗИ

Новікова Єлизавета, Боброва Марія

Центральноукраїнський державний університет імені Володимира Винниченка,
м. Кропивницький, Україна.

***Анотація:** у статті розглядається цитологічні особливості слідів біологічного походження, що мають найбільш інформативне значення при проведенні експертних ідентифікаційних робіт. Окреслено методики роботи з ідентифікаційними матеріалами людського походження, визначено переваги, недоліки та специфіку застосування кожного із слідів під час проведення цитологічної експертизи. Охарактеризовано особливості статевого хроматину та статевоспецифічних змін клітин, що слугують маркерами при інтерпретації результатів цитологічної експертизи. Досліджено здатність до збереження статевоспецифічних ознак зразків в залежності від впливу факторів зовнішнього середовища.*

***Ключові слова:** цитологія, статевий хроматин, експертиза, мікроскопія, ідентифікація.*

. Features of the use of sex-specific cytological markers in examination

E. Novikova, M. Bobrova

Volodymyr Vynnychenko Central Ukrainian State Pedagogical University, Kropyvnytsky, Ukraine

***Abstract:** the article considers the cytological features of traces of biological origin, which have the most informative value when conducting expert identification work. The methods of working with identification materials of human origin are outlined, the advantages, disadvantages and specifics of using each of the traces during cytological examination are determined. The features of sex chromatin and sex-specific changes in cells, which serve as markers when interpreting the results of cytological examination, are characterized. The ability to preserve species-specific characteristics of samples depending on the influence of environmental factors was investigated.*

***Key words:** cytology, sex chromatin, examination, microscopy, identification.*

Постановка проблеми. Одним із важливих питань дослідження слідів біологічного походження є встановлення їх статевої належності. Вирішення цього питання засновано на виявленні в інтерфазних ядрах клітин специфічних

для статі структур – статевого хроматину [1]. В умовах воєнного часу все більш актуальним постає питання збереження біологічного матеріалу, виявленого в слідах на речових доказах при проведенні цитологічних експертиз, адже правильне вилучення та пробопідготовка визначають достовірність результатів експертизи. Все вищенаведене підкреслює актуальність теми дослідження і вказує на її вагомое практичне значення.

Аналіз досліджень і публікацій. Виникнення і розвиток судової медицини тісно пов'язані з розвитком держави і права. Формуванню судової медицини як науки передував тривалий період експертної практики. В збережених пам'ятках писемності Стародавнього Риму, Стародавньої Греції, Індії є відомості щодо практичного використання медичних обстежень для суду і слідства. Ще Гіпократ (народ. у 460 р. до н. е.) вивчав питання, які ставляться в експертній практиці й тепер (аборт, термін вагітності, життєздатність недоношених немовлят, тяжкість і смертельність різних ушкоджень тощо) [1, 2]. У рукописах Мойсея, Талмуді (1 ст. до н.е.) вже докладно обґрунтовувалась необхідність запрошення лікарів для встановлення терміну зачаття, особливостей пошкодження тощо. У деяких країнах Азії (Китай, Японія, Корея) судова медицина почала розвиватися з 13 ст. Уже в 1247 р. в Китаї вийшов у світ трактат із судової медицини Сун-ци "Сі-Юнань-Лу", в якому знайшли відображення питання судово-медичної діагностики у випадках насильницької і раптової смерті. У трактаті вперше були описані трупні плями, трупне залякання, ознаки смерті від удару блискавки, техніка огляду трупа, були визначені точки на тілі людини, в ділянках яких пошкодження небезпечні для життя, тощо [3].

Виникнення наукової судової медицини в Європі (Німеччині) пов'язане з ім'ям імператора Карла, який ввів у 1532 р. Карний кодекс, відомий під назвою "Кароліна". За цим кодексом, судді були зобов'язані запрошувати лікарів для обстеження трупів, огляду осіб з тілесними пошкодженнями, а також у випадках дітовбивства, отруєння, лікарської помилки тощо [2].

На особливу увагу заслуговує перший посібник із судової медицини, створений французьким хірургом А.Паре (1517-1590) під назвою "Порадник до

складання судово-медичних ускладнень", а також "Трактат про висновки лікарів і бальзамування трупів", в яких наводяться важливі відомості з різних питань судової медицини [4].

Судова медицина в Україні розвивалась як складова частина медицини в Російській імперії, збагачуючи її видатними науковими досягненнями, що належать, зокрема, Київській і Харківській школам судових медиків. У довоєнні і післявоєнні роки в Україні було відкрито чимало медичних вузів та інститутів удосконалення лікарів, до складу яких увійшли кафедри судової медицини. Вони стали базами створення наукових медичних шкіл і підготовки судових медиків до практичної діяльності. Тепер в Україні налічується 14 медичних вузів, які мають кафедри (курси) судової медицини. Крім того, аналогічні кафедри є також в закладах удосконалення лікарів Києва і Харкова, а також при медичному факультеті Ужгородського університету [1].

Мета статті: дослідити ідентифікаційні властивості біологічних слідів при проведенні цитологічних експертиз.

Виклад основного матеріалу (результатів) дослідження.

Морфологічним субстратом X-хроматину є сильно спіралізована гетеропікнотична X-хромосома. При цьому, в неактивному (гетеропікнотичному) стані може знаходитися як материнська, так і батьківська X-хромосома. В клітинах жіночого організму одна X-хромосома репродукується одночасно з аутосомами, друга – сильно запізнюється і під час інтеркінезу залишається в спіралізованому (гетеропікнотичному) стані. Лише на дуже короткий час ця хромосома переходить у деспіралізований стан. У стадії профазі при поділі клітин X-хромосома дуже швидко стає знову гетеропікнотичною. Ця X-хромосома розташовується частіше на периферії ядра (біля оболонки), причому гетеропікнотичний стан X-хромосоми зберігається, очевидно, на протязі багатьох клітинних поколінь [2].

Таким чином, X-хроматин являє собою гетерохроматинове утворення ядра, розташоване частіше біля ядерної оболонки, має розміри 1-1,5 мкм і гомогенне темне забарвлення. Крім того, деякі дослідники відзначають

наявність зони просвітління (німба) навколо брилки Х-хроматину (рис. 1). Ця особливість зустрічається у 80-90% випадків. Форма Х-хроматину (тільца Барра) може бути різноманітною, частіше за все зустрічаються напівкругла, овальна, трикутна, плосковипукла форми (рис. 2). В тканинах жінок ядра клітин, що містять напівкруглу форму Х-хроматину, складають від 1/2 до 3/4 усіх ядер із Х-хроматином. Відхилення в розмірах Х-хроматину свідчить про наявність аномалій у спіралізованій Х-хромосомі [6].

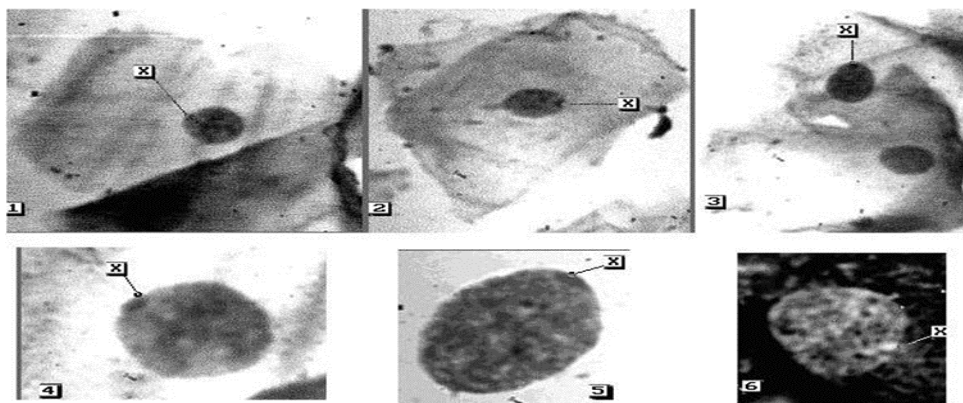


Рис. 1. Х-хроматин в клітинах слизової оболонки порожнини рота

1-5 – фарбування азур-еозиновою сумішшю (1-3 -світловий мікроскоп, об.20х; 4,об.100х),6 - люмінесцентний мікроскоп, (фарбування акридиновим оранжевим, об.90х)

Частота Х-хроматину в жіночих клітинах коливається від 62 до 82%, причому у ядрах клітин трупа жінки його менше і складає він – 31-77%. Х-хроматин у слизовій оболонці порожнини рота та внутрішніх органах жінки розподіляється нерівномірно.

Так, в зіскобі слизової болонки порожнини рота в трупах жінок Х-хроматин виявляється у кількості 48% (коливання - 20-79%), в клітинах епітелію слизової оболонки піхви - 43% (коливання 1065%), в клітинах паренхіми внутрішніх органів і тканин - 39%.

У чоловіків наявна одна Х-хромосома, яка завжди знаходиться в активному стані, тому у чоловіків можлива лише імітація Х-хроматину за рахунок аутосомних хромоцентрів, головним чином спіралізованих ділянок 1,16 і 9 хромосом. В клітинах буккального епітелію чоловіків брилки, подібні Х-хроматину, не перевищують 21%, а в ядрах клітин трупів чоловіків

зустрічаються не більше, чим в 14% клітин. Ці утворення мають менші розміри і у них відсутня зона просвітлення.

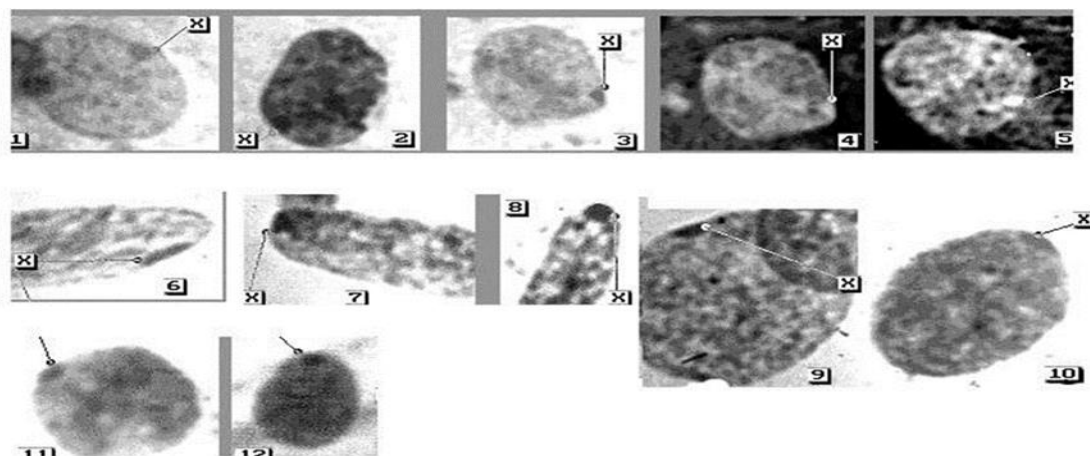


Рис. 2. Різні форми Х-хроматину: 1,2,12 – напівкругла; 3,4,7 - трикутна; 9,10,11 – овальна (подовжена) 6 – плоска; 5 –поперечна; 8 – кругла.

Особливості використання статевоспецифічних виростів нейтрофілів крові при проведенні експертиз з ідентифікації особи. У 1954 році Davidson і Smith, вивчаючи різноманітні вирости ядер сегментоядерних лейкоцитів, дійшли до висновку, що деякі з виростів мають статевоспецифічні ознаки. До таких виростів відносяться вирости типу А ("барабанні палички") і вирости типу В ("вузлики") [7].

Вирости типу А являють собою хроматинові утворення округлої або краплевидної форми, із чіткими контурами, гомогенно пофарбовані, розміром 1,5-2 мкм, які прикріплюються до ядра сегментоядерного лейкоцита за допомогою довгої тонкої нитки.

Вирости типу В – хроматинові утворення овальної або округлої форми з чіткими контурами, темнопофарбовані, розмірами, аналогічними типу А, але на відмінність від виростів типу А, вони або сполучені з ядром товстою хроматиною перемичкою, або виступають з ядра та мають явно виражене звуження в місці прикріплення до ядра (рис. 3).

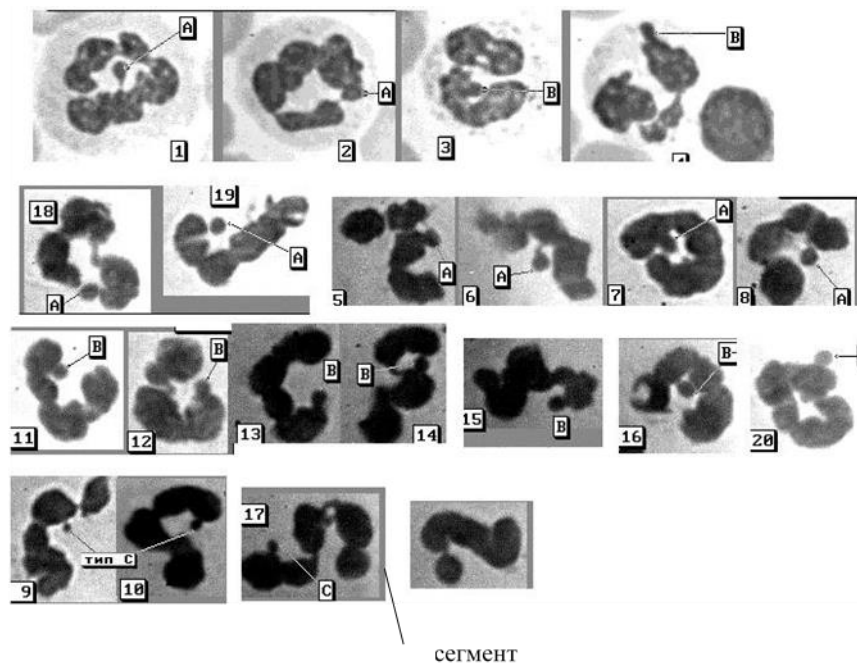


Рис. 3. Статевоспецифічні вирости в ядрах сегментоядерних лейкоцитів
 1-4 - мазки крові; 5-20 - витяжки з плям крові (Світлова мікроскопія, фарбування азур-еозиною сумішшю, масляна імерсія, об.90х)

В залежності від статі людини кількість вищевказаних статевоспецифічних ознак різна. Так, в жіночій крові кількість виростів типу А коливається від 11,4 до 16,1, а виростів типу В - від 19,2 до 28,7 на 500 сегментоядерних лейкоцитів. В крові чоловіків вирости типу А практично не зустрічаються (0,3-0,6 на 500 сегментоядерних лейкоцитів), при цьому багато авторів відзначають, що такі утворення у чоловіків більш дрібні за розмірами, їх форма сплюснена, ніжка часто набуває булавовидного потовщення. Виходячи з цього, більшість авторів вважає, що вирости типу А зустрічаються тільки в клітинах жіночої крові. Вирости типу В в крові чоловіків виявляються, в середньому, з частотою 2,2 на 500 сегментоядерних лейкоцитів. Крім статевоспецифічних виростів в ядрах сегментоядерних лейкоцитів зустрічаються також і інші вирости, які не мають чіткої статевої специфічності. Серед них можна виділити такі відростки:

- тип "С" - різноманітні хроматинові утворення, розміром менше 1 мкм, у вигляді паличок, ниточок, гачків, вузликів, кийків. Вони зустрічаються як у жіночій, так і чоловічій крові, можна лише відмітити незначне їх збільшення в крові чоловіків;

- тип "Д" або ракетки - утворення, аналогічні за розмірами і формою типу "А", але відрізняються від них наявністю просвітління в центрі. До статевого диморфізму дане утворення відношення не має і являє собою лише додатковий сегмент.

У 1954 році W. Davidson, D. Smith було висловлене припущення, що вирости типу А і В є гетерохроматином Х-хромосоми, проте прямого підтвердження це висловлення не одержало [7]. Зв'язок Х-хромосоми і виросту типу А доводиться лише непрямыми даними. Так, існує деяка залежність між розміром виросту та аномалією будови Х-хроматину. Частота виявлення виростів типу А залежить від ступеню сегментування ядер лейкоцитів. Кількість статевоспецифічних виростів зростає при зсуві формули вправо. Враховуючи це, була висловлена думка, що в процесі сегментації ядра відбувається виштовхування з нього брилки Х-хроматина з утворенням виросту типу В, що поступово трансформується у вирост типу А.

Цитологічні особливості У-хроматину, що використовуються при проведенні експертиз з ідентифікації особи. В кінці 70-х років ХХ століття був розроблений новий люмінесцентно-мікроскопічний метод дослідження хромосом. Було відмічено, що при фарбуванні барвниками, що флюоресціюють, спостерігається дуже яскраве світіння дистальних відділів довгих плечей У-хромосоми.

У 1970 р. Р. Pearson у препаратах буккального епітелію чоловіків та в лейкоцитах їх крові при фарбуванні атебрином виявив тільця, що яскраво світилися. Таке світіння було відсутнє в ядрах жіночих клітин. Згодом такі тільця були названі У-хроматином.

Визначення У-хроматину в ядрах клітин проводять на люмінесцентному мікроскопі зі збудливим фільтром ФС1-2 або ФС 1-4 та замикаючими фільтрами ЖС-18 та ЖЗС-19 (зелена пластинка), окуляр 5х або 10х, об'єктив 90х (імерсія під олією) або 60х (водна імерсія).

У-хроматин являє собою брилку розмірами від 0,6 до 0,8 мкм, яка розташована в ядрі та яскраво світиться (рис. 4). Розмір її індивідуальний, успадковується та не змінюється при різноманітних захворюваннях.

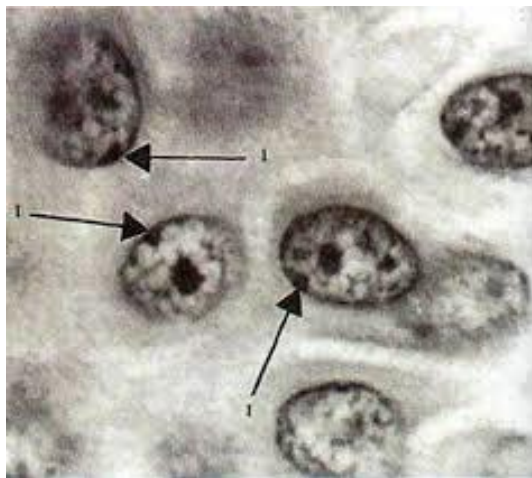


Рис. 4. У-хроматин в ядрах епітеліальних клітин (Люмінесцентна мікроскопія, фарбування розчином квінакриндихлоріда, масляна імерсія, об.90х).

Подальшими дослідженнями було доведено, що існує залежність між У-хромосомою і У-хроматином. Визначно індивідуальною ознакою У-хромосоми є абсолютна довжина плеча і довжина ділянки, що флюоресціює. У більшості випадків У-хромосома має приблизно рівні за довжиною частини, одна з яких світиться яскраво, а інша має не яскраву флюоресценцію.

При цьому, 80% ядер клітин осіб чоловічої статі мають одну велику брилку У-хроматину, 11% ядер чоловічого організму містять У-хроматин у вигляді 2-х великих розташованих поруч брилок. В останньому випадку частіше за все має місце деконденсація довгої ділянки У-хромосоми, що яскраво світиться.

У частини людей зустрічаються випадки, коли довжина ділянки У-хромосоми, яка світиться яскраво, збільшена, тоді У-хроматин у ядрах клітин буде представлений великою та дрібною брилками. Кількість У-хроматину в клітинах чоловічого організму складає 34-98%. В інтерфазних ядрах клітин можуть бути виявлені також дрібні брилки, що світяться, розмірами від 0,1 до 0,4 мкм, т. зв. Ф-хроматин, який не має статевої специфічності і є ділянками

аутосом, які флюоресціюють. У жіночих клітинах іноді зустрічаються ядра з одною маленькою брилкою Ф- хроматину розмірами від 0,2 до 0,3 мкм. Цей хроматин частіше пов'язаний з ділянками 3-ої, 13-15-ої пар аутосом, які яскраво світяться, і можуть імітувати світіння У-хроматину. Кількість Ф-тілець, що імітують У-хроматин, у клітинах жіночих тканин коливається від 0,4 до 5-7%.

Локалізація У-хроматину в ядрах різноманітна і залежить від виду тканин. У лімфоцитах У-хроматин частіше розташовується по периферії ядра у вигляді серповидної брилки біля внутрішньої поверхні ядерної мембрани або у вигляді вибухання з ядра. В ядрах клітин кори головного мозку найбільше характерним є розташування У-хроматину біля ядерця. В ядрах м'язової тканини У-хроматин в переважній частині випадків знаходиться біля одного з полюсів ядра. В більшості інших клітин У-хроматин виявляється в будь-якій частині ядра. Дослідження У-хромосоми серед різних тварин показало, що спроможність гетерохроматину У-хромосоми мати постійну яскраву флюоресценцію притаманна лише для людини і самців горил. Ця ознака є відсутньою в інших видах тварин. Виходячи з цього, можна вважати, що наявність світіння У-хроматину в ядрах клітини свідчить про належність цих клітин людині.

Висновки та перспективи подальших пошуків у напрямі дослідження.

Особливістю слідів біологічного походження являється те, що встановлення джерела їх походження засновано на аналізі компонентів, біологічна активність яких втрачається під дією: часового фактору, взаємодії з зовнішнім середовищем (волога, температура, сонячне світло і т. д.). В силу специфічності слідів біологічного походження та здатності їх до самознищення, велике значення мають кваліфіковані попередні дослідження, фіксація і правильне вилучення таких об'єктів на місці події, а також правильність упаковки, умови збереження речових доказів, їх направлення для експертних досліджень. Маркерами при інтерпретації результатів цитологічної експертизи за статевими ознаками є тільця Бара, У-хроматин, статевоспецифічні вирости нейтрофілів типу А ("барабанні палички") і типу В ("вузлики"). Здатність до збереження статевоспецифічних ознак зразків залежить від типу ткани, часу та місця

відбору зразків, температури збереження зразків, рН, вологості, наявності контамінуючої мікрофлори.

Перспективи подальших досліджень вбачаємо у вивченні здатності до збереження статево специфічних ознак зразків в залежності від впливу факторів зовнішнього середовища.

Список використаної літератури

1. Романюк Б. В. Участь спеціаліста на стадії до судового слідства: навч. посіб. МОН України. МНДЦПБОЗ при РНБО України. К., 2010. 303 с.
2. Енциклопедія криміналістики в особах/під ред. В. Ю. Шепітька. Харків: Апостиль, 2014. 400 с.
3. Криміналістика : підручник / за ред. проф. В.Ю. Шепітька. Харків: Право, 2008. 464 с.
4. Старовойтова Р.О., Дручініна І.М., Бурчинський В.Г., Кривда Г.Ф., Ліщенко О.П. Судово-цитологічний атлас тканин та органів людини. Херсон: Наддніпряночка, 2011. 28 с.
5. Особливості збирання, зберігання та направлення біологічних слідів людини на молекулярно-біологічну експертизу: Метод. рекомендації / А. О. Єрмолаєва, В. І. Лагус; ДНДЕКЦ МВС України. К., 2006. 24 с.
6. Ellegren, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat. Rev. Genet.* 2011. Vol. 12. P. 157-166.
7. Ворсанова С.Г. Медична цитогенетика. М.: Медпрактика, 2006. 376 с.