

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ КАЗЕННОЕ
ПРЕДПРИЯТИЕ
«ЦЕНТР СУДЕБНЫХ ЭКСПЕРТИЗ
МИНИСТЕРСТВА ЮСТИЦИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН»



МЕТОДИКА

ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТОВ

(шифр специальности – 25.1)

ПАСПОРТ МЕТОДИКИ

1. Наименование методики	Методика цитологического исследования биологических объектов
2. Шифр специальности методики	25.1(13)
3. Информация о разработчике методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК, Матвеева В.Н. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по Карагандинской области ЦСЭ МЮ РК
4. Сущность методики	Микроскопическое исследование окрашенных клеток
4.1. Объекты исследования	Любые предметы, на которых могут находиться клетки и микрочастицы поврежденных органов и тканей, в том числе содержимое половых органов, ротовой полости и заднего прохода, подногтевое содержимое, волосы с луковицей
4.2. Методы исследования	Микроскопирование
4.3. Краткое поэтапное описание методики	1. Экстрагирование в раствор уксусной кислоты или дистиллированной воды с последующим извлечением и фиксированием на предметные стекла; 2. Приготовление отпечатков на предметных стеклах; 3. Окраска и микроскопирование
5. Дата одобрения методики Ученым Советом ЦСЭ МЮ РК	Протокол №1 от 18.06.2020г.
6. Информация о составителях паспорта методики	Итбаева Ж.Ж. - судебно-медицинский эксперт высшей квалификационной категории ИСЭ по г.Нур-Султан ЦСЭ МЮ РК

ОГЛАВЛЕНИЕ

МЕТОДИКА ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Метод приготовления цитологических препаратов	
Приготовление препаратов жидкой крови и органов.....	5
Выявление и способы изъятия объектов из орудий травмы.....	5
Приготовление цитологических препаратов из пятен крови и корочек.....	6
Исследование окурков.....	7
При исследовании слюны на почтовом конверте.....	7
Исследование ногтевых пластинок.....	7
Исследование волос.....	8
Исследование костей, хрящей.....	9
Мазки - отпечатки с полового члена.....	9
Методы фиксации и окраски цитологических препаратов	
Методы фиксации препаратов.....	10
Методы окраски, применяемые для определения полового хроматина.....	10
Методы, применяемые экспертами при перекрашивании препаратов.....	14
Приготовление буферных растворов.....	14
Рекомендация.....	15
Метод последовательной окраски.....	15
Метод судебно-цитологической диагностики половой принадлежности крови, слюны и волос по У-хроматину	
Приготовление препаратов.....	15
Мазок крови.	15
Микроскопическое исследование	17
Оценка результатов исследования (диагностика пола).....	17
Метод диагностики половой принадлежности крови в следах на вещественных доказательствах	
Характеристика половых особенностей строения ядер сегментоядерных лейкоцитов.....	19
Приборы и реактивы, необходимые для исследования.....	20
Методика исследования пятен крови	20
Микроскопическое исследование препаратов.....	21
Оценка результатов исследования, (диагностика пола).....	21
Метод диагностики происхождения изолированных клеток из слизистой оболочки прямой кишки	
Введение.....	22
Признаки дифференцировки.....	24
Метод судебно-цитологической диагностики половой принадлежности слюны и волос по Х-хроматину	

Введение.....	24
Х-хроматин в эпителиальных клетках слюны и волос.....	24
Оборудование и реактивы.....	26
Методисследования .Приготовление препаратов.....	26
Микроскопическое исследование.....	27
Оценка исследования (диагностика пола).....	27
Комплексный метод цитологического исследования объектов в судебно-медицинской экспертизе (Е.И. Королева)	
1 этап.....	29
2 этап.	29
3 этап.....	29
4 этап.....	29
Методдиагностики менструального происхождения крови в пятнах на вещественных доказательствах цитологическим методом	
Оборудование:.....	29
Реактивы:.....	29
Выбор материала для исследования.....	29
Проведение предварительной (ориентировочной) пробы на менструальную кровь.	30
Микроскопическое исследование цитологического препарата.....	30
Методика окраски АО.....	30
Клетки вагинального эпителия.....	31
Цитологическая картина мазков из пятен крови иного происхождения.....	32
Метод определения группоспецифических антигенов системы АВ0 в окрашенных гистологических и цитологических препаратах органов и тканей человека	
Введение.....	32
Объекты исследования.	33
Подготовка материала к исследованию	33
Постановка реакции «смешанной агглютинации».....	34
Метод выявления антигенов системы АВ0 в клетках с определенными морфологическими свойствами	
Введение.....	35
Постановка реакции....	35
Методдиагностики регионального происхождения клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия (МПНЭ)	
Введение.....	36
Влагалищный эпителий.....	37
Буккальный (зашечный) эпителий.....	38
Уретральный и ректальный эпителий.....	38
Перечень использованных источников.....	39

МЕТОДИКА ЦИТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Метод приготовления цитологических препаратов

Приготовление препаратов жидкой крови и органов

1. Из жидкой крови делаются мазки на предметных стёклах, лучшие результаты получаются при взятии из крови лейкоцитарной пленки, которая находится между осадком и сывороткой крови (после центрифугирования).

2. Из кусочков органов и тканей (при расчленении трупа) готовятся мазки - отпечатки. Для этого, кусочки разрезом прижимают на фильтровальной бумаге, а затем этой же стороной прикладывают на обезжиренные предметные стёкла.

Выявление и способы изъятия объектов из орудий травмы

На орудиях, используемых для нанесения механической травмы человеку, нередко остаются различные следы-наложения и среди них - частицы поврежденных тканей и органов. Эти частицы могут быть разными по размерам, но чаще они незначительные по величине (менее 1мм), в связи, с чем их относят к категории микрочастиц, т.е. к мелким телам, невидимым или слабо видимым при нормальных условиях наблюдения (М.Б. Вандер, 1978). Поэтому для выявления микрочастиц необходим тщательный осмотр поверхности орудий травмы под стереомикроскопом с увеличением 16-25*.

На клинках колющие - режущих орудий микрочастицы встречаются главным образом в выемках, зазубринах и других дефектах клинка, на границе с ручкой или ограничителем, на тупых орудиях, в том числе и на транспортных средствах - в местах контакта их с телом человека, на рубящих «топорах» - по щекам клина и в дефектах лезвия.

Встречаемость микрочастиц зависит от вида орудия травмы. Так, на острых орудиях они выявляются в 6,3%, на тупых - в 8,8%, на рубящих - в 30,6% случаев.

Микрочастицы, как правило, располагаются в следах высохшей крови и имеют вид желтоватых, красновато - коричневатых, желтовато-коричневых полупрозрачных комочеков и пленок различной формы.

Хотя в микрочастицах сохраняется структура органа или ткани, но в связи с крайне малыми размерами целесообразно подвергать их не гистологическому, а цитологическому исследованию, при котором могут быть разрешены вопросы о природе частиц (т.е. о животном или растительном происхождении), тканевой (или органной), видовой, групповой и половой принадлежности, о возможности происхождения от конкретного человека.

Мелкие кусочки неустановленных тканей для цитологического исследования рекомендуется раздавливать между двумя предметными стеклами, после их предварительного набухания.

Отмечено, что на орудиях травмы чаще выявляются микрочастицы эпидермиса, мышечной, жировой, соединительной и нервной тканей.

Изъятие микрочастиц с орудий проводят под контролем стереомикроскопа. На место расположения микрочастицы для растворения крови наносят небольшую каплю физиологического раствора и через 10-15 минут частицу осторожно снимают препаратальной иглой, помещают в пробирку и заливают физ. раствором. При исследовании кусочков ткани, их заливают физ. раствором (уксусная кислота уничтожает видоспецифический белок) с небольшим избытком на сутки при комнатной температуре, в дальнейшем в холодильнике (если сильно высохшие кусочки ткани, тогда заливают физ. раствором и диет, водой в соотношении 1:1). Если кусочки расправились, их аккуратно прополаскивают в этом же растворе и пипеткой переносят жидкую часть в другую пробирку и центрифугируют 5-10 минут. После центрифугирования надосадочную часть переносят в третью пробирку и используют для определения наличия, видовой и групповой принадлежности крови. Оставшиеся кусочки или клетки заливают диет, водой или уксусной кислотой и держат на столе 1-2 часа. Затем удаляют надосадочную жидкость. Вновь добавляют уксусную кислоту, центрифугируют и удаляют надосадочную жидкость. Таким образом, осуществляют промывку кусочка ткани (клеток) до удаления мутности уксусной кислоты. Полученная в результате отмывания смесь должна быть слегка опалесцирующая. Пробирки слегка встряхивают, в результате грязь падает на дно, а клетки остаются сверху. Надосадочный (верхний) слой насылаивают на стекла. Капля не должна быть более 1 см в диаметре. Если взвесь концентрированная (для чего нужно посмотреть под малым увеличением без покровного стекла), то достаточно наслойить 1 раз. Если клеток мало, тогда после высыхания капли сверху еще раз наслойте каплю и т.д. (методом накопления).

Существует еще один метод приготовления препарата *-вдавленный препарат*. Если в первом случае из кусочка ткани не смогли получить клеточный материал, тогда его вновь заливают уксусной кислотой и оставляют при комнатной температуре на сутки. Затем выкладывают его на стекло, тщательно разволокняют другим предметным стеклом раздавливают. Таким образом, получится два вдавленных препарата. Этот метод хорош для мышц.

Приготовление цитологических препаратов из пятен крови и корочек

Лучше исследовать мазки, чем насыщенные участки пятна. Вырезается пятно размером 1x1,5 см, не измельчается и целиком помещается в центрифужную пробирку. Если не надо определять видовую принадлежность, тогда сразу заливают уксусной кислотой от 5-25%. При сроке давности пятна 3 недели - 1месяц заливается 4% раствором уксусной кислоты. Свыше одного месяца (1,5-2 месяца) заливают 10% уксусной кислотой. Свыше двух месяцев -15-20% раствором. Уксусная кислота способствует распрямлению клеток после высыхания. Заливают на сутки уксусной кислотой в количестве 3-5 мл, закрывают пробкой и оставляют при комнатной температуре (18-22° С). Допускается легкое помешивание кусочка ткани в пробирке. При более высокой температуре (в условиях жаркого климата или лета (40°С и выше) Чимкент,

Алматы) пробирки желательно на ночь поместить в комнатный холодильник для предотвращения размножения микрофлоры. Кусочки ткани иглой выводят к краю пробирки, промывают струёй уксусной кислоты того же процента, отжимают тщательно (этот метод добавляет еще 15% клеток), затем кусочки материала удаляют (или используют для других исследований), край пробирки опять промывают уксусной кислотой, центрифугируют в течение 5-10 минут при 1500-2000 об/минуту. Надосадочную жидкость удаляют пипеткой, если в экстракте содержится много гемоглобина или других включений, то промывают этим же раствором уксусной кислоты несколько раз до тех пор, пока надосадочный слой не будет прозрачным. При наличии в осадке крупных плотных включений (грязь) после ресуспензирования выждать некоторое время, пока крупные частицы не оседут на дно пробирки, но сама взвесь будет мутноватой. Надосадочную жидкость, содержащую взвесь клеток, наносят на предварительно обезжиренные и подписанные предметные стекла по 1-2 капли вытяжки.

Корочки пятен крови смывают одним из растворов уксусной кислоты в пробирку, собирая так весь материал с не впитывающей поверхности, экспозиция от нескольких часов до 24 часов(3 - 24 часа) при комнатной температуре, с последующим отмыванием с помощью центрифугирования, осадки переносят на предметные стекла. Мазки высушивают при комнатной температуре, фиксируют в течение 15 минут метанолом (это лучший фиксатор), или 96°

этиловым спиртом (лучше стекла погружать в спирт). Препарат лучше высушить на плитке (плитка нагревается до температуры, когда рука «терпит»), на подоконнике (тепло солнечных лучей), на горячей батарее, т.е. главной задачей является быстро высушить препарат. Стеклографом по контуру очертить круг на обратной стороне стекла.

Препараты высушивают и окрашивают одним из красителей (см. ниже).

Исследование окурков

Для исследования берут наружный слой папиросной бумаги (тонкий) из тех мест, где имеются следы прикуса, для этого окурок разрезают вдоль и аккуратно снимают пинцетом фрагмент, размером 1x1 см. Делят его на 2-3 части и помещают в пробирку. Фильтр нельзя трогать, т.к. под действием уксусной кислоты он превращается в клейкую массу. Заливают уксусной кислотой (при давности образования пятна до 1 месяца -10%, свыше месяца — 25%). Далее работают как с кровью, т.е. экспозиция сутки при комнатной температуре и т.д.

При исследовании слюны на почтовом конверте

вырезают полоску склейки верхнего клапана конверта, разрезают на 2-3 части, помещают в пробирки и заливают уксусной кислотой. Далее работают аналогично крови.

Исследование ногтевых пластинок

Присланные на исследование ногтевые пластиинки без измельчения помещают в пробирки и заливают физиологическим раствором или дистиллированной водой с небольшим избытком, пробирки помещают в условия комнатного холодильника на 18-24 часа. Пипеткой путем бужирования отделяют

ногтей содержимое, жидкость переносят в другие пробирки, центрифугируют при 1500 об/минуту в течение 5-10 минут, надосадочный слой переносят в другую пробирку для использования в дальнейших реакциях. Ресуспензированные осадки исследуют на наличие клеток плоского эпителия, а затем заливают 10-25% раствором уксусной кислоты на 4-24 часа. По истечении времени осадок отмывают этим же раствором уксусной кислоты до получения прозрачной надосадочной жидкости, которую после последнего центрифугирования удаляют, а из осадков готовят цитологические препараты на предметных стеклах. В полученных препаратах определяют наличие клеток плоского эпителия и устанавливают групповую принадлежность методом РСА

Исследование волос

Исследуются волосы, в которых имеется луковица с наружной влагалищной оболочкой. Корневой участок такого волоса фиксируют на обезжиренном предметном стекле с помощью тонкой полоски скотча и заливают луковицу с влагалищными оболочками 10-25% раствором уксусной кислоты, выдерживая препараты при комнатной температуре во влажных камерах до 24 часов. Периодически просматривают влагалищную оболочку под микроскопом. Если она набухла, то с помощью препаровальных игл оболочку расщепляют на более мелкие кусочки. Лучше эту процедуру проводить под контролем микроскопа.

Практический совет:

- необходимо осмотреть все волосы, чтобы отыскать с влагалищными оболочками;
- волосы смотреть с помощью дистиллированной воды, а не ксиола.

Существует несколько методов приготовления препарата:

1 метод: корневой участок волоса фиксируют на обезжиренном предметном стекле с помощью липкой ленты и заливают 25% раствором уксусной кислоты (можно 10% р-р, если свежая, рыхлая луковица). Экспозиция от 30 минут до 24 часов при комнатной температуре во влажных камерах. Хорошо набухшие оболочки становятся белого цвета и их можно рассмотреть под микроскопом, луковица увеличивается в размере в 3-4 раза. Их можно разволокнить с помощью препаровальной иглы.

Если наружная влагалищная оболочка не разрыхляется, то препарат оставляют во влажных камерах еще на 1-2 часа при комнатной температуре. При этом, если уксусная кислота высыхает - ее можно под капать, но нельзя переливать, т.к. теряются клетки.

Когда луковица готова, волос со стороны пластиря аккуратно поднимают, слегка встряхивают в уксусной кислоте на этом же предметном стекле с целью стряхивания клеток. Затем препарат сушат на воздухе, фиксируют, очерчивают контуры пятна снизу стеклографом, окрашивают.

2 метод волочения: подготовка волоса аналогична первому методу. Дать уксусной кислоте почти полностью испариться, так чтобы сохранилась влажность, затем удалить пластирь и волос аккуратно протаскивают по стеклу оболочки аккуратно уложились в дорожку.

3 метод по Шалаеву: корни волос обрабатываются 0,25 % раствором трипсина 30 минут. Трипсин либо удаляют, либо волос переносят на другое стекло и закапывают 15-30% раствором уксусной кислоты на 20-30 минут. При этом волос не промывают, а фильтровальной бумагой не касаясь оболочек удаляют трипсин. Если в трипсине оболочка хорошо разбухла, то можно взять 15% уксусную кислоту.

4 метод Санкт-Петербург (Маяцкая М.В., Сидоров В.Л.)

рекомендуют опустить корневые участки волос в пробирки с 10-25% раствором уксусной кислоты на 18-20 часов.

Затем выкладывают волос на предметное стекло, измельчают заточенными препаратальными иглами или глазным скальпелем, отделяя наружные оболочки от внутренних. При отсутствии наружной оболочки эксперт указывает фразой: «*Установить половую принадлежность волоса не представлялось возможным из-за отсутствия наружного корневого влагалища*». Только при набухании видна структура, а так только единичные чешуйки.

Подготовленные препараты сушат, подвергают фиксации и окраске. При отсутствии у волоса наружного корневого влагалища, эксперт указывает на этот факт и о том, что установить половую принадлежность волоса не представляется возможным.

Исследование костей, хрящей

Кость очищают от тканей и оставляют при комнатной температуре на сутки. С помощью скальпеля с поверхности кости соскабливают чешуйки, которые помещают в мешочек и погружают на 15-20 минут в декальцинирующую жидкость: 15 мл концентрированной азотной кислоты + 85 мл 5% водного раствора формалина. К 100 мл полученной смеси добавляют 5 граммов уксусно-кислого калия. Промывание мешочка проводят в проточной воде в течение 40-60 минут. Из полученной массы готовят препараты на предметных стеклах, предварительно измельчив крупные части. Окрашивание проводят 1% спиртовым раствором толуидина голубого (гидролиз не требуется). Содержание полового хроматина устанавливают из расчета 100 ядер, которые хорошо просматриваются.

Хрящ— сухой размачивают в 1-5% растворе уксусной кислоты до 24 часов, фиксируют в 10% растворе формалина. Из него готовят гистологические срезы на микротоме. Гидролиз препаратов осуществляют в 5Н растворе соляной кислоты в течение 15- 20 минут при комнатной температуре и окрашивают в 1% спиртовом растворе толуидина голубого в течение 1-2 минут или 1% водным раствором крезилового фиолетового, затем промывают водой, высушивают и микроскопируют. Расчет проводят на 100 ядер.

Мазки - отпечатки с полового члена

Как правильно взять смыв с полового члена.

А) Если свежий случай и половой член имеет влажность, то предметным стеклом делают прокатку по половому члену.

1) В районе венечной борозды и головки делают второй отпечаток.

2) Стекло контрольное. Надавливают на головку, чтобы получить каплю из мочеиспускательного канала.

Ватной палочкой берут содержимое ладьевидной ямки и делают мазок на предметном стекле. Ватку сохраняют.

В) Если сухая поверхность и прошло до пяти дней, тогда двухслойную марлю размером 5x5см, 5x7см смачивают физ. раствором, дистиллированной водой или проточной водой и промывают половой член, венечную полосу и крайнюю плоть.

По истечении 5 дней брать смыв не рационально, после проведения туалета - также нецелесообразно.

Мазок из ладьевидной ямки обязателен! Т.о. сравнивается содержание гликогена в клетках из ладьевидной ямки и содержание гликогена в клетках смыва. У мужчин в клетках содержание гликогена в меньшем количестве, нежели у женщин. Если содержание гликогена в мужских клетках приблизительно равно 50%, ТО это очень критично.

Соскоб из ладьевидной ямки можно брать ватным тампоном, намотанным на спичку. По последнему опыту судят о наличии гликогенсодержащих клеток у самого хозяина.

Методы фиксации и окраски цитологических препаратов

Методы фиксации препаратов

В качестве фиксирующей жидкости используют метанол, этанол, смесь метанола с ледяной уксусной кислотой (3:1), смесь Никифорова, смеси этанола с ацетоном (1:1) растворы ряда спиртов понижающей концентрации. Лучший фиксатор метанол В этаноле 5 молекул воды и поэтому быстро испаряется, поэтому хуже.

Приготовление абсолютного спирта: 5 г Си8О4 белый, обезвоженный на 100 г спирта.

Си8О4 поглощает излишек воды в спирте (2-3 дня - до тех пор пока не побелеет Си8О4)

Способ фиксации открытый. На препарат капают спирт, по мере его улетучивания капают вновь и т.д. в течение 15 минут до полного испарения спирта.

Методы окраски, применяемые для определения полового хроматина

Гидролиз в уксусной кислоте, в 5Н НС1: Происходит окрашивание только хроматина, а остальные субстанции остаются бледными. Если окрашивание препаратов проводится красителями, приготовленными на уксусной кислоте, тогда необходимость в гидролизе отпадает.

Для того чтобы получить хорошие результаты при любом методе окраски необходимо соблюдать определенные **правила:**

1. Красящие растворы должны быть чистыми, поэтому любой краситель необходимо перед употреблением отфильтровать, а водный раствор готовят только на дистиллированной воде.

2. Отдавать предпочтение:

- окрашиванию красителями низкой концентрации в течение длительного

времени перед кратковременной окраской красителями высокой концентрации;

- применению регрессивных методов. Препараты вначале перекрашивают, а затем доводят до требуемой окраски путем отмывания в соответствующей жидкости, что позволяет более отчетливо выделить отдельные элементы ткани. Однако применение этих методов требует определенных навыков.

3. Тщательно выполнять все процедуры при подготовке препарата к окраске и последующей его обработке.

Два варианта окраски флюорохромами:

1) Зафиксированные препараты обработать буфером Зеренсена, затем слить и окрасить препарат приготовленным красителем (атебрин, акрихин, квинакрин) в течение 10-20 минут. Препарат промывают в проточной воде в течение 1 минуты (иногда больше, если есть желтоватые клетки). Следующий этап промывка буфером кренсена. Заключить в смесь глицерина и фосфатного буфера в соотношении 1:1 и микроскопировать под покровным стеклом. Избыток глицерина убрать фильтровальной бумагой, чтобы покровное стекло плотно прилегало к предметному стеклу.

2) Зафиксированный препарат подвергнуть гидролизу в течение 3 минут в 5Н НСЬ, промыть в течение 1 минуты под проточной водой, окрасить 0,0005% раствором атебринана дистиллированной иоде в течение 10-20 минут. Вновь промыть под проточной водой в течение 1 минуты и заключить в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:1). Гидролиз необходим, т.к. в данном случае клетки без обработки обладают свечением, а гидролиз уменьшает интенсивность этого свечения.

Для Х-хроматина применяют основные красители и флюоро-хромы.

Базофилия и ацидофилия:

Базофилией называют средство к основному красителю, а ацидофилией - средство к кислому красителю. На препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином, вещества, окрашивающиеся гематоксилином в синий цвет, называют базофильными, а вещества, окрашивающиеся эозином в разные тона розового или красного, -ацидофильными.

Красители:

I. Романовского-Гимза используют в клиниках и у нас:

1) 30 капель этого красителя в 10 мл диет воды. Окрашивание в течение 20-25 минут с последующим промыванием в проточной воде, пока не пойдет светлая вода (не более 1 минуты)

2) 3-4 капли краски растворить в 1 мл воды для небольшого количества стекол, тогда окраска только 30 минут, отмывание до 5 минут по ребру стекла.

1 капля краски + 3 капли этилового спирта и окрашивают в течение 3 минут и не убирая краски капают сверху 6 капель диет. воды и оставляют еще на 15 минут при комнатной температуре. Промывание не менее 1 минуты.

II. Майн-Грюнвальд в равных соотношениях краска Романовского-Гимза и дистиллированная вода с pH=7. Окраска препаратов в течение 10-20 минут с последующей промывкой под проточной водой. Если при смешивании красителя и воды появились хлопья - значит, pH

воды не соответствует 7. В этом случае необходимо довести pH воды либо едким №, либо фосфатным буфером (pH 6,5-7).

III. Азур -эозин:

1) 0,1 % раствор эозина: 100 мг порошка довести до 100 мл дист. водой и тщательно перемешать.

2) 0,1% водный раствор азура II: 100 мг азура II и доводят до 100 мл диет, водой с pH=8-9

3) диет, вода pH=8-9 : 1 часть эозина + 3,5 части диет, воды pH+8-9 и 1,5 части азура. Смешиваем последовательно и наносим на препарат. Готовится непосредственно перед окраской и не хранится (ex 1етроге), т.к. возможно образование хлопьев. Для окраски одного стекла необходимо приблизительно 20 капель азур-эозиновой смеси. Окраска в течение 20 мин, затем промыть .

IV. Ацетарсein- 2 варианта приготовления краски (не пригоден для крови): окраску производят без гидролиза препаратов.

1) сначала готовят 60% раствор уксусной кислоты (130 мл ледяной уксусной кислоты +70 мл диет, воды и нагревают смесь до образования паров). Затем 3 г добавляют ацетарсина, смешивают, нагревают до образования паров, охлаждают и дважды фильтруют. Препараты окрашивают в течение 5-10 минут и промывают под проточной водой.

2) 1% раствор ацетарсина на 45% растворе уксусной кислоты. Время окрашивания 5-8 минут, промывка в течение 1 минуты в 15-30% растворе уксусной кислоты.

Картина: цитоплазма розовая, ядро красноватое, половой хроматин в виде малиновых глыбок.

Краски хранятся, пока не выпадет осадок.

Метод приготовления тиазинового красителя (это органические красители, к которым относятся метиленовый синий, толуидино-вый синий, толуидиновый голубой, азур) - готовят 0,2-0,5% раствор одного из тиазиновых красителей на дистиллированной воде с pH4, 5-4,7 (указанное pH воды доводят буфером Зеренсена). К 10 мл дистиллированной воды добавляют 20-50 мл красителя, время окраски не больше 10 секунд.

Картина препарата - цитоплазма бесцветная или слегка голубо-нагая, ядро бледно-фиолетовое, а половой хроматин красновато-фиолетовый.

V. Толуидиновый голубой:

Фиксированный препарат подвергнуть гидролизу в течение 20-30 минут в 5Н НСЬ. Промыть в проточной воде 1-2 минуты, и высуширь и окраска 1% толуидиновым голубым 2-4 минуты. Затем промыть в проточной воде.

1% толуидиновый голубой: 1 г красителя растворить в 100 мл 50% раствора этанола с добавлением фосфатного буфера (pH =5,6-5,8) в количестве 1-2 мл

Картина: цитоплазма бледно-голубая, ядро синего или голубого цвета, ПХ темно-синего цвета.

VI. Азур, метиленовый синий, толуидиновый синий:

Маточный раствор: 0,2-0,5% раствор одного из красителя (азур М.б. либо I, либо II) на дистиллированной воде (рН=4,5-4,7) рН доводится буфером Зеренсена. На 10 мл воды +20-50 мл красителя (маточного раствора). Окраска в течение 10 секунд-10 минут. Затем промывка в проточной воде.

Картина: цитоплазма бесцветная или слегка голубая, ядро оледено-фиолетовое, ПХ фиолетово-красный.

VII. Кризиловый фиолетовый:

1 г кризилового фиолетового растворить в 100 мл 40% раствора уксусной кислоты. Время окраски зафиксированных препаратов 2-4 минуты. Промывка в проточной воде. Можно применить не 40%, а 20% раствор уксусной кислоты, увеличив время окраски до 10 минут.

Картина: цитоплазма бледно-фиолетовая, ядро бледно-фиолетовое, ПХ темно-фиолетовый.

VIII. Окраска по Захарову:

0,2% раствор метиленового голубого (Азур II) на дистиллированной воде. Время окраски не более 10 секунд. Препараты залить краской, покрыть покровным стеклом, излишки промокнуть фильтровальной бумагой

IX. Окраска по Докумову:

После фиксации препарата провести гидролиз в 5Н НСЬ в течение 15 минут, промыть водой, высушить, окрасить любым тиозиновым красителем в течение 30-40 минут. Вновь промыть водой, микроскоировать.

Окраска флюорохромами для выявления Х и У - хроматина: применяют несколько методов, которые имеют общие черты, отличаясь деталями окраски. Обычно используют акрихин и его производные - акрихин - иприт, пропил - акрихин - иприт, атебрин, мепакрин. Многие авторы рекомендуют обрабатывать препараты до окраски и после буферным раствором с рН от 4,0 до 7,4. Следует отметить, что свечение У - хроматина возможно только при наличии воды. Применяют водные растворы акрихина в 0,5% концентрации, другие красители применяют в различных концентрациях - от 0,1 до 0,0005 %. Сначала готовят маточный раствор: 1 таблетка акрихина (0,01 г) разводится в 100 мл дистиллированной воды. Применяют 0,0005 % раствор, для этого берут 0,1 мл маточного раствора (ориентировочно 2 капли) на 10 мл дистиллированной воды. Чаще всего применяется следующий вариант окраски: зафиксированные препараты (одним из выше указанных способов) 10-20 минут 0,05% - 0,0005 % раствором атебрина, приготовленном на фосфатном буфере с рН 6,0, промывают 1 минуту в проточной воде, и помещают в смесь глицерина с фосфатным буфером в соотношении 1:1. Так как производство акрихина и его производных в стране не налажено, то в целях экономии применяют следующую методику окраски: предварительно зафиксированные препараты, в течение 3 минут подвергают гидролизу в 5 н. соляной кислоте, затем промывают в проточной воде 1 минуту и окрашивают 0,0005% раствором атебрина, приготовленного на дистиллированной воде. Промывание в течение 20-30 секунд в проточной воде с последующим заключением препарата в смесь глицерина с буфером (1:1). Применение гидролиза уменьшает яркость свечения ядра и цитоплазмы, что

способствует выявлению У - хроматина. Следует изучать только изолированные и хорошо просматриваемые клетки.

Время окраски препаратов является ориентировочным, он подбирается экспериментально на приготовленных заранее образцах

Методы, применяемые экспертами при перекрашивании препаратов:

- при перекрашивании азуром на препарат наносят раствор уксусной кислоты (1-10%) до тех пор, пока не уйдет синева (приблизительно 1-3 минуты).
- для удаления избытка эозина препарат обрабатывают 10% раствором аммиака (время обработки приблизительно 1-5 минут).

Приготовление буферных растворов

1) Фосфатный буфер pH=6

Готовят два раствора:

- *раствор A* — 11,9 г двухзамещенного фосфорнокислого Na (Na₂HPO₄) на 100 мл диет.воды.
- *раствор B* - 9,1 г однозамещенного фосфорнокислого K(KH₂PO₄) на 1000 мл диет.воды.

Смешать 8 частей раствора B и 2 части раствора A.

2) Фосфатный буфер pH=6

раствор A- 1,78 г Na₂HPO₄ (двузамещенный фосфорнокислый №) на 1 липр диет. воды

- *раствор B* - 1,36 г KH₂PO₄ на 1 л диет.воды. Для буфера смешать 12 мл р-ра A + 88 мл р-ра B.

3) Фосфатный буфер pH = 8, 90 мл р-ра A и 10 мл р-ра B (имеется ввиду фосфатный буфер под номером 2.)

4) Фосфатный буфер pH = 6,8 - 7

- *раствор A*- 72 г Ш2HPO₄ на 1 л диет. воды

- *раствор B*- 19 г лимонной кислоты на 1 л диет. воды, прокипятить и остудить.

Для буфера : 1 часть р-ра A +4,5 части раствора B.

5) диет. вода с pH = 7:

а) 300 мл диет. воды + 2-3 капли 10% едкого N, проверять pH после каждой капли.

б) 100 мл диет. воды + 5-10 мл фосфатного буфера с pH = 6,8-7.

6) Приготовление забуференного физиологического раствора: К 900 мл физиологического раствора добавляют 75 мл раствора

A и 25 мл раствора B (см. вторая пропись буфера pH 6,0)

7) Буфер Зеренсена:

1)Приготовление 1Д5M раствора Ш₂HPO₄: 10 мл диет. воды+94мг Na₂HPO₄.

2)Приготовление 1,15M раствора KH₂PO₄: на 10 мл диет. воды 90 мг KH₂PO₄.

3)Приготовление буфера: 10 мл 1Д5M раствора №₂HPO₄+0,25 мл 1Д5M раствора KH₂PO₄.

8) Приготовление 5N раствора соляной кислоты: 42,5 мл соляной кислоты довести до 100 мл диет. водой.

Рекомендация

Необходимо приготовить не менее 2-3 препаратов. Лучше 2 стекла с двумя пятнами, одно стекло окрасить флюорохромом, другое - основным красителем.

Метод последовательной окраски

Используют в случае, если приготовлен лишь один препарат и его необходимо следовать на Х и У хроматин:

- сначала окрасить флюорохромом;
- затем необходимо отмыть глицерин в воде;
- подсушить препарат;
- обработать в течение 15 минут этанолом (должен испариться);
- подвергнуть гидролизу в течение 20 минут 5Н НСЬ;
- промыть и подсушить;
- окрасить основным красителем.

Метод судебно-цитологической диагностики половой принадлежности крови и слюны и волос по У-хроматину

1. Приготовление препаратов

1) Для контроля работы микроскопа (лампы) и красителя необходимо иметь в запасе мазки крови или соскобы защечного эпителия лиц мужского пола. Контрольные препараты должны содержать достаточное количество неповрежденных клеток, расположенных в один слой. Готовят их следующим образом.

Мазок крови. Каплю крови (диаметр 3—4 мм) нанести на конец предметного стекла. Держа стекло двумя пальцами левой руки за короткие грани и повернув конец стекла с каплей к себе, взять правой рукой чистое стекло с зашлифованными гранями (границы, стекла не должны иметь выбоин). Коснуться стеклом капли, поставив его на короткую грань впереди капли и наклонив над ней под углом в 45° к поверхности предметного стекла. Как только кровь распределится вдоль грани зашлифованного стекла, сделать им быстрое скользящее движение вперед по поверхности предметного стекла. Для получения тонкого мазка при движении следует держать зашлифованное стекло под углом не более 45°; при увеличении угла мазок будет короче и толще. Для флуоресцентного исследования оставляют концевой участок мазка, размером 1—1,5 см², содержащий большую часть лейкоцитов. **Соскоб** защечного эпителия. Концом деревянной палочки (спички), заточенной в виде лопатки, сделать соскоб эпителия и обмыть конец в капле 30° спирта, нанесенной на предметное стекло. Диаметр капли— 1—1,5 см.

2) Препараты из следов крови и слюны, из корневой части волос готовят в соответствии с ранее опубликованными рекомендациями .Кроме того, для получения более тонких препаратов используют следующие приемы. Содержимое, извлекаемое из следа, переносят напредметное стекло в виде мелкой капли, распределяя ее затем на площади в 1—1,5 см² или сделав каплю диаметром 1,5 см, оттягивают пипеткой часть содержимого из ее центра (из этой части делают каплю на другом стекле). Во время подсыхания препарата тщательно удаляют из капли волокна и частицы небиологического

происхождения.

3) Препараты, высушенные при комнатной температуре или в термостате (37° С), фиксируют 10—15 мин в бюксе соспиртом (метиловым или 100° этиловым). После фиксации их можно хранить неопределенно долгое время или сразу окрасить для исследования.

4) Перед окраской препараты смачивают дистиллированной водой (рН 7,0), опустив в бюкс на 1—2 мин.

5) Влажный препарат помещают в бюкс с красителем. Время оптимальной окраски определяют с помощью контрольных препаратов. Свежеприготовленный раствор флюорохрома окрашивает практически мгновенно; в использованном растворе, уже обводненном, необходимо держать препарат до 15 мин. Чтобы упростить определение времени окраски, можно пользоваться красителем, нанося его на предметное стекло, а затем сливая через воронку с фильтром в другой сосуд. Когда свежий раствор кончится, определяют время окраски для использованного (однократно, двухкратно и т. д.) красителя.

6) Излишок красителя смывают слабой струей проточной воды — 10—15 сек.

7) Опускают препарат в бюкс с дистиллированной водой (рН 7,0) на 1—2 мин.

8) Вынув мокрый препарат, накрывают его покровным стеклом (следует избегать пузырьков воздуха между стеклами). Излишок воды удаляют фильтровальной бумагой, промокнув несколько раз, чтобы покровное стекло лежало неподвижно. Толстый слой жидкости между стеклами, как и большая толщина препарата, мешают исследованию, увеличивай «вуаль» (количество «рассеянного» света, который снижает контрастность изображения).

9) Оценка качества препарата под микроскопом. Скопления клеток и ядер находят под объективом 20*: они выделяются на темном фоне зеленым цветом флюоресценции. Наносят капельку иммерсионного масла и рассматривают клетки с объективом 90*. В правильно окрашенном препарате фон темный или слегка зеленоватый; цитоплазма окрашена бледно, прозрачная. Ядра желтовато-зеленые, хроматин в них распределен неравномерно, в виде более или менее конденсированных плотных участков; участки большей плотности окрашены сильнее, а меньшей — представляются темными. Яркой флюоресценцией выделяются глыбки Ф-хроматина и самая крупная из них — У-хроматин, имеющая более четкие контуры.

Если цитоплазма клеток светится слишком ярко, необходимо промыть препарат в проточной и дистиллированной воде (рН 7,0); если ядра светятся слабо, надо докрасить препарат несколько минут.

10) Окрашенный препарат можно оставить заключенным в дистиллированную воду или перезаключить в смесь воды с глицерином (1 : 1), в которой он дольше не подсыхает. В первом случае с этой же целью края покровного стекла обязательно заплавить парафином с помощью нагретого

на горелке скальпеля. Чтобы сохранить препарат в течение 1—2 недель, можно, заключив его в смесь, также заплавить парафином. Для более длительного хранения препарата покровное стекло следует снять (соскоблить парафин и, не сдвигая, приподнять стекло за угол лезвием скальпеля). Глицерин и попавшее в препарат иммерсионное масло можно удалить, сполоснув препарат в бюксе со спирт-эфиром (оставшиеся капельки глицерина или масла будут мешать при повторном исследовании). Дифференцированное свечение хроматина ядер, окрашенных акрихином, наблюдается при заключении препарата только в водные растворы. При высыхании клеток или попадании на них масла, глицерина и т. п. У-хроматин не выявляется, а ядра начинают флюоресцировать гомогенно ярким желто-зеленым светом. Это явление обратимо, если удалить масло, глицерин и т. п. и снова смочить клетки водой.

2. Микроскопическое исследование

При микроскопировании препаратов следует соблюдать определенный порядок, чтобы последовательно изучить весь препарат или нужную его часть. Поиск клеток и ядер производят с объективом 20*, а анализ их структуры — с объективом 90*. Изучение структуры важно для правильной оценки сохранности ядра и, следовательно, пригодности его для диагностики. Каждое пригодное ядро исследуют на наличие У-хроматина и регистрируют как У-хроматин-положительное или У-хроматин-отрицательное.

В препаратах, приготовленных из объектов экспертизы, как правило, имеется большее или меньшее количество измененных клеток и ядер, непригодных для диагностики. Изменения могут быть обусловлены механическим повреждением ядер (разрушение оболочки и верхнего слоя хроматина), физиологической дегенерацией поверхностных слоев защечного эпителия, отмиранием волоса или аутолитическим процессом. В зависимости от воздействия неблагоприятных условий среды аутолиз проявляется разнообразными морфологическими изменениями, от едва уловимых до резко выраженных. В следах крови выраженными изменениями можно считать округление ядер сегментоядерных лейкоцитов, утрату части сегментов, полное исчезновение этих ядер: в лимфоцитах, более устойчивых к аутолизу, — гомогенизацию ядра, значительное ослабление окраски хроматиновых структур. В эпителиальных клетках основными типами морфологических изменений являются кариопикноз, кариорексис и кариолизис. Ядра, где эти изменения выражены в сильной степени, учету не подлежат.

Непригодными для диагностики также приходится считать ядра, структуру которых невозможно рассмотреть ввиду наложения частиц, наложения клеток друг на друга, обилия микробов.

Каждое ядро необходимо рассматривать внимательно, перемещая его к центру поля зрения и производя непрерывную фокусировку, чтобы выявить четко У-хроматин и отличить от него посторонние частицы или микробы, нередко ярко флюоресцирующие, но лежащие вне фокуса ядра.

3. Оценка результатов исследования (диагностика пола)

Для оценки результатов исследования предлагается таблица, в которой даны числовые соотношения клеток с У-хроматином и без него. Применение ее позволяет выносить объективное (в пределах заданной вероятности) решение о принадлежности крови, слюны и волос мужчине или женщине по наименьшему в каждом конкретном случае числу исследуемых клеток. В расчетах использованы данные о частоте У-хроматина, где минимальная частота У-хроматин положительных клеток у мужчин составила 22%, а максимальная у женщин — 3%- Расчеты произведены с помощью метода математической статистики — последовательного анализа с 99% надежностью.

В левой половине таблицы даны числовые соотношения клеток с У-хроматином и без него для диагностики мужского пола; в правой половине приведены аналогичные данные для диагностики женского пола. Мужской пол может быть установлен, если при исследовании не более 9-ти ядер клеток обнаружено не менее 3-х с У-хроматином. При этом три У-хроматин-положительных ядра могут быть найдены среди первых трех, четырех, пяти и т. д. клеток. Следовательно, мужской пол можно диагностировать и раньше, чем будет исследовано 9 клеток, а минимальное число, при котором диагностика возможна, — 3 клетки, если все они содержат У-хроматин. Если из первых 9 исследованных клеток только одна или две оказались У-хроматин-положительные, то исследование продолжают, пока не находят 4 клетки с У-хроматин положительным ядром не более чем на 19 клеток. Если 4 клетки, содержащие У-хроматин, обнаружены среди меньшего, чем 19, числа исследованных клеток, то исследование можно прекратить, остановившись на диагнозе мужского пола, и т. д. (см. таблицу).

Таблица

СООТНОШЕНИЕ У-ХРОМАТИН-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ
И У-ХРОМАТИН-ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ ЯДЕР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
ПОЛА КЛЕТОК КРОВИ, СЛЮНЫ И ВОЛОС

Число У-хроматин-положительных ядер (не менее)	Число ядер, подлежащих исследованию (не более)	Число У-хроматин-положительных ядер (не более)	Число ядер, подлежащих исследованию (не менее)
мужской		женский	
3	9	0	22
4	19	1	32
5	29	2	42
6	39	3	52
7	49	4	62
8	60	5	72

Е

сли
среди 22 исследованных клеток не обнаружено ни одной с У-хроматин-положительным ядром, можно диагностировать женский пол (см. правую

половину таблицы). Если встретилась хотя бы одна клетка с ядром, содержащим глыбку, похожую на У-хроматин, то необходимо продолжать анализ до 32-х клеток, чтобы остановиться на диагнозе женского пола клеток. Если в процессе анализа 32-х клеток обнаружено 2 ядра с У-хроматин-подобными глыбками, исследование продолжают до 42 клеток и т. д. (см. таблицу).

Рекомендуемая методика предназначена для определения половой принадлежности объектов, произошедших от людей, хромосомный пол которых совпадает с паспортным. Источником ошибок могут быть крайне редкие случаи аномалий полового развития или aberrаций У-хромосомы, такие, как набор половых хромосом XY у женщины, резко уменьшенное тельце У-хроматина или его отсутствие у мужчины.

Метод диагностики половой принадлежности крови в следах на вещественных доказательствах

Характеристика половых особенностей строения ядер сегментоядерных лейкоцитов

Ядра нейтрофильных, эозинофильных и базофильных лейкоцитов состоят из сегментов, число которых варьирует от 1 до 5. От сегментов некоторых лейкоцитов крови любого пола отходят различной формы выросты. Среди этих выростов в ядрах лейкоцитов женской крови имеются выросты, обладающие половой специфичностью. Эти образования характеризуются формой, размерами, окраской и другими признаками, которые отличают их от других выростов, не имеющих значения для диагностики пола. 1. Наиболее характерным образованием, имеющим половую специфичность, является вырост, напоминающий барабанную палочку и условно обозначенный буквой А. Утолщенная часть такой палочки - это скопление хроматина, прикрепленного к сегменту подковообразного ядра тонкой, слабо окрашивающейся хроматиновой нитью. Примерно, в 10% случаев "барабанная палочка" занимает в цепочке ядерных сегментов концевое положение и чрезвычайно редко прикрепляется к перемычке, связывающей сегменты.

Наиболее близко "барабанная палочка" напоминает свисающую каплю, однако очертания довольно разнообразны. Диаметр головки составляет 1,5 -2 мк, в среднем она меньше ядра в 10-12 раз.

Величина ядер лейкоцитов значительно варьирует и это зависит от толщины мазка - в тонком ядра распластаны, а в толстом - сжаты. Отсюда и изменение в размерах "барабанных палочек". Этот факт необходимо учитывать, чтобы не принять за полоспецифический отросток иной вырост.

Одна из особенностей отростка типа А - это большая интенсивность окрашивания утолщенной части по сравнению с окраской ядра. В то же время могут встретиться ядра, одинаковые по окраске с отростком, но в этом случае отличием служит гомогенная окраска утолщенной части выроста. Могут встретиться лейкоциты, у которых малый сегмент ядра в концевом положении может имитировать отросток типа А и в этом случае следует учитывать окраску. Выросты типа А в принципе свойственны только женщинам.

2. Специфичным для пола является отросток типа В. Это – выпуклость края ядра ("узелки"), характеризующаяся разнообразием форм. Сюда относятся и все переходные формы между А и В, отличающиеся от барабанной палочки тем, что они соединены с сегментом ядра более толстой и укороченной ножкой. Скопления хроматина типа В имеют размеры и местоположение, свойственные типу А, и также окрашиваются. Образования типа В также характерны для женской крови, но изредка могут встречаться в ядрах лейкоцитов мужской крови в виде небольших выступов края ядра.

3. Кроме образований типов А и В в ядрах нейтрофильных лейкоцитов мужской и женской крови обнаруживается множество разнообразных отростков в виде крючков, ниточек, столбиков, дубинок (образования, похожие на "барабанные палочки", но меньшего размера), не имеющих половой специфики и условно обозначенных буквой С.

Исследованию подвергают ядра нейтрофилов, так как они представляют собой большинство сегментоядерных лейкоцитов. В ядрах, извлеченных из пятен крови, нередко трудно отличить специфичные для пола выросты по окраске, так как все ядро окрашивается интенсивно. Тем не менее эти выросты можно дифференцировать по форме, размерам и расположению в ядре.

Образования типа С могут быть сходны по форме с выростами типов А или В. В таких случаях необходимо учитывать размеры этих выростов относительно величины ядра, имея виду, что размеры образований типа С не превышают 1 мк. Выросты типа С можно отличить также по слабой способности воспринимать окраску.

В одном нейтрофиле крови женщин, не отклоняющихся в половом развитии от нормы могут встретиться одно образование типа А или В и неопределенное количество выростов типа С.

Приборы и реактивы, необходимые для исследования

1. Микроскоп МБИ-, или иной аналогичного типа.
2. Тщательно обезжиренные предметные стекла/ стекла прокипятить в мыльном растворе, промыть водопроводной и дистиллированной водой и обработать смесью спирта с эфиром/.
3. Уксусная - 0,5% или иная концентрация - до 40%.
4. Метиловый спирт.
5. Азур-эозин (первоначально готовят основные раствор из азура и растворимого воде эозина, каждый из расчета 1 мг на 1000 мл дистиллированной воды. Растворы устойчивы хранятся в посуде из темного стекла. Перед употреблением основные растворы красителей разводят дистиллированной водой с pH 7,0. К одной части эозина добавляют 3,5 части воды, а затем приливают 1,5 части раствора азура II (два), осторожно смешивают ингредиенты. Цвет темно-фиолетовый. Смесью окрашивают препараты).

Методика исследования пятен крови состоит в следующем:

1. Извлечение ядер лейкоцитов из пятна крови раствором уксусной кислоты.
2. Отмывание ядер от гемоглобина путем центрифугирования.
3. Концентрирование ядер лейкоцитов и отделение их от жидкости.

4. Приготовление препарата из осадка (фиксация и окраска).
5. Микроскопическое исследование препарата.
6. Оценка результатов исследования (диагностика пола).

Кусочек пятна крови помещают в центрифужную пробирку и заливают уксусной кислотой, концентрация которой не имеет решающего значения, однако при исследовании пятен большой давности лучше использовать более концентрированный раствор. Допускается концентрация от 0,5% до 40%. Маленькие следы крови до 0,7 x 0,7 см лучше экстрагировать в преципитирующую пробирку. Количество уксусной кислоты - в уленгутку примерно 0,5 мл, а в центрифужную - 1,5 мл (покрыть вырезку). Пробирки закрывают и помещают в термостат при температуре +37°C. Срок пребывания в термостате зависит от давности образования пятна. Для полного растворения гемоглобина пятна давностью в пределах месяца требуется от 2 до 8 часов. Более старые пятна оставляют до 20 часов при комнатной температуре. Кусочки извлекают из пробирок, а содержимое центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин. Уксусную кислоту осторожно отсасывают пипеткой, оставляя над осадком небольшое количество жидкости. Если отсасываемая жидкость интенсивно окрашена, в пробирку наливают новую порцию уксусной кислоты, взбалтывают осадок и вновь центрифугируют. Это отмывание повторяют до тех пор пока надосадочный слой не станет прозрачным (бесцветным). Осадок в виде капли переносят на предметное стекло, не размазывая его высушивают при комнатной температуре, затем следует фиксация спиртом 3 минуты и окраска азур-эозином в течение 20-30 минут. Препараты промывают струей водопроводной воды и высушивают. На одном из концов препарата делают надпись, в которой указывают номер экспертизы, наименование вещественного доказательства, номер объекта. При микроскопии применяют объектив 90^x (масляная иммерсия) и окуляры 10^x.

и кровь находится на тонком стекле или прозрачной пленке, ее можно исследовать, не отделяя от предмета-носителя так, как обычный мазок крови.

Микроскопическое исследование препаратов.

Положение препарата на столике микроскопа должно быть всегда одинаково ориентировано относительно надписи на стекле. Это облегчит при повторном исследовании нахождение в препарате ядер отдельных лейкоцитов, морфология которых вызвала сомнение у эксперта.

При микроскопии необходимо соблюдать определенную последовательность в изучении ядер лейкоцитов, имеющихся на предметном стекле. Беспорядочное исследование препарата может привести к ошибкам в диагностике пола, так как отдельные ядра могут учитываться неоднократно, а другие - совсем не попадут в поле зрения.

Найдя левый край объекта при малом увеличении, переходят к микроскопии с масляной иммерсией. Исследование начинают с нижнего участка этого края объекта. Затем препарат постепенно передвигают по вертикали до верхнего края объекта, после чего сдвигают по горизонтали на расстояние одного поля зрения микроскопа и идут по вертикали вниз и т.д. При микроскопии очень важно дать правильную оценку состояния того или иного ядра

с точки зрения его пригодности для изучения. Нельзя исследовать все ядра подряд, не отбрасывая поврежденные, разрушенные, сжатые и т.п., так как это может привести к ошибкам в диагностике. Следует учитывать только хорошо сохранившиеся и нежно прокрашенные ядра.

Оценка результатов исследования, (диагностика пола).

Необходимо пользоваться методом математической статистики - последовательным анализом Вальда. Особенность метода заключается в том, что исследование проводят последовательно и после каждого наблюдения делают расчеты на основании которых приходят к выводу о половой принадлежности крови или решают продолжать наблюдение. Исследование прекращают после того: как выясняется, что полученные данные обеспечивают надежную диагностику. Этот метод в значительной степени сокращает число наблюдений. Метод Вальда позволяет в процессе последовательного исследования каждого мазка крови объективно решить вопрос - достаточно ли имеющихся в препарате ядер для диагностики пола и ставить этот диагноз.

Анализ чаще всего используют в виде полосы испытаний, ограниченной двумя прямыми, проведенными в диагональном направлении по отношению к осям координат (графическая форма). Расстояние между прямыми, ограничивающими полосу испытаний установлено расчетами по формуле, в которую входят значения вероятностей обнаружения образований, специфичных для пола - максимальной вероятности в мужской крови и минимальной - в женской крови. Поскольку вероятность обнаружения указанных образований в высохшей крови уменьшается за счет изменений ядер нейтрофилов, расстояние между прямыми полосы испытаний для высохшей крови иное, чем для жидкой (в первом случае оно больше, чем во втором). На оси абсцисс отмечают общее число исследованных ядер нейтрофилов ("к"), а на оси ординат - число ядер, содержащих отростки типа А или В ("а"). После исследования каждого ядра на графике откладывают отрезок прямой в принятом масштабе: если ядро не имеет образований А или В, отрезок откладывается по оси абсцисс вправо на одно деление; если есть вырой А или В, отрезок откладывают на одно деление вправо и вверх (для удобства на оси ординат масштаб в десять раз больший, чем на оси абсцисс). Исследование заканчивают, когда получающаяся ломанная кривая дойдет до одной из границ полосы испытаний. Если достигнута верхняя граница, устанавливается женский пол, если нижняя - мужской. Если исследованию подвергнуты все ядра, имевшиеся в препаратах, а ломанная кривая не достигла ни одну из границ полосы испытаний, то пол крови считается не установленным

Метод диагностики происхождения изолированных клеток из слизистой оболочки прямой кишки

Введение

При проведении судебно-медицинских цитологических экспертиз по делам о половых преступлениях нередко возникает необходимость в выявлении клеток слизистой оболочки прямой кишки в смывах или мазках-отпечатках с полового члена, а также в под ногтевом содержимом пальцев рук подозреваемых.

На первый взгляд диагностика происхождения клеток из слизистой оболочки прямой кишки не представляет значительных трудностей: достаточно выявить в исследуемом материале клетки трех видов эпителия (призматического, выстилающего большую часть прямой кишки, многослойного кубического, покрывающего столбчатую зону, и многослойного плоского неороговевающего эпителия, содержащегося в промежуточной зоне и переходящего в области анального отверстия в эпидермис). Однако в большинстве случаев в исследуемом материале клетки всех видов эпителия, выстилающего слизистую оболочку прямой кишки, не обнаруживается. Кроме того, клетки некоторых видов эпителия могут происходить не только из слизистой прямой кишки, но и из мочеиспускательного канала, т.к. большая часть его покрыта призматическим эпителием, а конечный отдел, (ладьевидная ямка), как и слизистая оболочка влагалища, - многослойным неороговевающим эпителием. По морфологическим и размерным характеристикам эти виды эпителия практически не отличаются от соответствующих клеток, происходящих из прямой кишки.

В связи с отмеченным, факт обнаружения клеток призматического и многослойного плоского неороговевающего эпителия не может иметь диагностического значения при решении вопроса о происхождении их из слизистой оболочки прямой кишки (исключение составляют случаи, когда в ядрах этих клеток выявляется X- хроматин и, следовательно, они немогут произойти из слизистой оболочки мочеиспускательного канала подозреваемого).

Что же касается выявления клеток эпидермиса, представленных, как правило, безъядерными чешуйками, то они постоянно и в большом количестве содержаться в подногтевом содержимом и смывах (мазках-отпечатках) с половых органов и поэтому диагностического значения не имеют.

Таким образом, для диагностики происхождения клеток из слизистой оболочки прямой кишки решающую роль приобретает обнаружение клеток кубического эпителия, которые специфичны именно для клеточного состава прямой кишки, т.к. не встречаются в слизистых оболочках мочеиспускательного канала, влагалища и ротовой полости.

Клетки кубического эпителия столбчатой зоны прямой кишки встречаются в препаратах как изолированно, так и небольшими группами по 2-5 клеток, имеют полигональную форму (чаще в виде четырех - шестиугольников), четко выраженные углы и прямолинейные края. Ядра клеток преимущественно оvoidной формы, обычно располагаются центрально.

Для изучения цитологических характеристик клеток кубического эпителия наиболее подходящей является окраска азур-эозиновой смесью, при которой цитоплазма окрашивается базофильно в сине-фиолетовые тона и более интенсивно в центральных частях клеток, чем на периферии. Вокруг ядер различается мелкая базофильная зернистость с расплывчатыми контурами. Ядра окрашиваются интенсивно, рисунок хроматиновой субстанции в них слабо различим, ядрышки отсутствуют. Ядерно-цитоплазматический индекс составляет 1:2 - 1:3. Размеры клеток кубического эпителия колеблются в пределах 14,7 - 42,1 мкм, их ядер - 7,1 - 12,3 мкм (в среднем $27,8 \pm 4,65$ мкм и $9,4 \pm 0,89$ мкм, соответственно).

Диагностика происхождения клеток из слизистой оболочки стольчатой зоны прямой кишки осуществляется по следующей схеме: в препаратах отыскивают клетки полигональной формы с выраженным углами и прямолинейными краями и определяют их ядерно-цитоплазматический индекс. Если величина его находится в пределах 1:2 - 1:3, проводят измерение размеров клеток и их ядер. В случаях, когда размеры клеток составляют 14,7 - 42,1 мкм, ядер - 7,1 - 12,3 мкм, препараты окрашивают азур-эозиновой смесью (если до этого они были окрашены другими красителями или флюорохромами) и изучают интенсивность окраски цитоплазмы, наличие в ней базофильной зернистости, состояние хроматиновой субстанции ядра и т.д.

При наличии всех вышеописанных признаков может быть сделан вывод о том, что клетки являются кубическим эпителием и происходят из слизистой оболочки прямой кишки.

В соответствующих случаях клетки кубического эпителия необходимо дифференцировать от клеток базального и парабазального слоев многослойного плоского неороговевающего эпителия слизистых оболочек влагалища и мочеиспускательного кала, которые по размерам и величине ядерно-цитоплазматического индекса практически не отличаются от клеток кубического эпителия.

Признаки дифференцировки

-клетки кубического эпителия имеют вид многоугольников с выраженным углами и прямолинейными сторонами; базальные и парабазальные клетки обладают окружной и овальной формой;

-клетки кубического эпителия окрашиваются азур-эозиновой смесью базофильно и более интенсивно в центре, чем на периферии, в цитоплазме их вокруг ядер различается базофильная зернистость; базальные и парабазальные клетки имеют равномерно окрашенную базофильную цитоплазму без включений.

Таким образом, обнаруженные в смыках (мазках-отпечатках) с половых органов или в подногтевом содержимом пальцев рук мужчин, подозреваемых в совершении половых преступлений, даже единичных клеток кубического эпителия позволяет диагностировать происхождение их из слизистой оболочки прямой кишки.

Метод судебно-цитологической диагностики половой принадлежности слюны и волос по X-хроматину

Введение

При исследовании вещественных доказательств со следами слюны (окурки папирос, сигарет, заклеенные конверты и др.) и волос, обнаруженных на месте происшествия, па одежде или теле преступника и жертвы, бывает важно решить вопрос: кому принадлежат слюна или волосы — мужчине или женщине.

Определение половой принадлежности слюны возможно по эпителиальным клеткам слизистой полости рта, которые постоянно отделяются и вместе со слюной попадают на различные предметы.

Половую принадлежность волос можно устанавливать при наличии на корневой части волоса наружного корневого влагалища, состоящего из эпителиальных клеток.

Метод установления половой принадлежности слюны и волос основан на исследовании структурного образования в ядрах эпителиальных клеток — X-хроматина (полового хроматина).

X-хроматин в эпителиальных клетках слюны и волос

X-хроматин представляет собой глыбку величиной около 1 микрона, окрашивающуюся ядерными красителями более интенсивно, чем остальные хроматиновые структуры ядра клетки. Располагается он в эпителиальных клетках, главным образом, на внутренней поверхности ядерной оболочки и может иметь треугольную, плоско-выпуклую, трапециевидную, V-образную и др. формы; иногда он имеет вид утолщения или зубца ядерной мембранны. При локализации внутри кариоплазмы X-хроматин трудно отличим от других скоплений хроматина, имеющих такой же размер, но не специфичных для пола. Поэтому в целях диагностики половой принадлежности необходимо учитывать хроматиновые глыбки, расположенные только у ядерной мембранны.

У человека X-хроматин выявляется в клетках почти всех органов и тканей, а также в клетках опухолей. Он имеется в различных тканях и органах позвоночных.

X-хроматин состоит из дезоксирибонуклеиновой кислоты. Ныне существующая гипотеза его происхождения сводится к следующим положениям:

—тельце X-хроматина образует одна из X-хромосом, находящаяся в гетеропикнотическом состоянии (инактивация),

—его может образовывать либо материнская, либо отцовская (по происхождению) X-хромосома.

Формирование X-хроматина происходит на ранней стадии эмбрионального развития (у зародыша человека он появляется на 16 день развития).

Число клеток с X-хроматином положительным ядром в слизистой рта у женщин, по данным литературы, колеблется от 20 до 79%, при средних значениях — 40-51%. У мужчин такие ядра встречаются редко — от 0 до 4%. Различия в получаемых цифрах частоты X-хроматина отражают прежде всего индивидуальные особенности этого признака. Существует также ряд факторов, оказывающих большое влияние на результаты определения частоты: опытность исследователя, техника приготовления и окраски препаратов, а также физиологическое состояние слизистой рта.

В эпителии слизистой рта различают три слоя: базальный, средний (шиповатый) и поверхностный. Базальный слой состоит из небольших клеток цилиндрической формы, с относительно крупными сферическими и оvoidными ядрами, богатыми хроматином. В среднем слое размеры клеток увеличиваются, форма их становится полиэдральной (неправильный многогранник). Ядра сферические и оvoidные, в верхних рядах — крупные, окрашивающиеся бледно. Поверхностный слой представлен уплощенными полигональными или овальным и клетками с дисковидными ядрами. Клетки самых верхних рядов содержат дегенерирующие ядра в состоянии кариопикноза или кариолизиса, реже — кариорексиса. Эти клетки слущиваются в полость рта.

В следы слюны попадают клетки поверхностного и отчасти среднего слоев, поэтому частота X-хроматина зависит, главным образом, от его количества в поверхностном слое. X-хроматин наиболее часто встречается в клетках нижних рядов этого слоя, а в верхних — его содержание понижается. Это объясняется тем, что регенерация клеток в поверхностном слое осуществляется за счет амитоза, при котором X-хромосома остается в одном из дочерних ядер. Чем выше амитотическая активность, тем больше X-хроматин отрицательных ядер. Как показывают наблюдения, у лиц с «рыхлой» слизистой, что является результатом высокой активности процесса физиологической регенерации, частота X-хроматина в соскобе значительно ниже, чем у лиц с более упругим и менее слущивающимся эпителием слизистой рта.

В корневой части волос различают внутреннее и наружное корневое влагалище, характерные для вырванного жизнеспособного волоса. Внутреннее — состоит из трех слоев, клетки которых либо ороговевшие, либо содержат гранулы трихо-гиалина. Они непригодны для цитологического анализа на X-хроматин. Клетки наружного корневого влагалища содержат ядра, в которых X-хроматин выявляется хорошо.

По данным литературы, минимальная частота X-хроматин положительных ядер у женщин в волосах составляет 20%, у мужчин — максимальная частота 7%.

Оборудование и реактивы

1. Микроскопы МБИ-6 и МБС-1 (или другие аналогичного типа).
2. Центрифуга, дающая до 2—3 тыс. об/мин.
3. Иглы препаровальные, заточенные.
4. Бюксы с притертymi крышками (8—10 см, диам. 3—3,5 см).
5. Пипетки пастеровские.
6. Пипетки градуированные, емк. 2 мл и 5 мл.
7. Пробирки с коническим концом (дл. 8—9 см, диам. 7—9 мм).
8. Стекла покровные.
9. Стекла предметные, тщательно обезжиренные.
10. Стекло часовое, емк. 6—10 мл.
11. Азур-эоаниновая смесь.

Первоначально готовят основные растворы из азура II и растворимого в воде эозина, каждый из расчета 1 г на 1000 мл дистиллированной воды. Эти растворы устойчивы и сохраняются в посуде из темного стекла многие месяцы. Основной раствор азура II необходимо до употребления выдержать две недели.

Смесь для окраски препаратов готовят в часовом стекле непосредственно перед тем, как перенести ее с помощью пипетки на предметные стекла. Обязателен следующий порядок приготовления смеси: к I части эозина добавляют 3,5 части дистиллированной воды с pH = 7,0—7,4, а затем приливают 1,5 части раствора азура II. Осторожно покачивая посуду, смешивают ингредиенты. Смесь должна иметь темно-фиолетовый цвет.

12. Вода с pH = 7,0—7,4.

Ее готовят, добавляя к 300 мл дистиллированной воды пастеровской пипеткой 2—3 капли 10% раствора едкого натра. Воду можно употреблять в течение одной-двух недель, храня ее в холодильнике.

13.Метиловый спирт.

14.Едкий натр (10% раствор).

15.Уксусная кислота (1%, 5%, 10%, 25% растворы).

МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Приготовление препаратов

1) Из следов слюны препараты готовят, помещая кусочки предметно-носителя в пробирку и заливая 2—3 мл 5—10% раствора уксусной кислоты. При исследовании почтового конверта вырезают полоску склейки верхнего клапана, разрезают ее на 2—3 части, которые помещают в пробирки с раствором уксусной кислоты. При исследовании окурков отделяют наружный слой папиросной бумаги свободного конца мундштука и. также помещают его в пробирку. Отверстие пробирки закрывают пробкой из ваты; выдерживают предмет-носитель в уксусной кислоте не менее чем 4 часа при комнатной температуре (максимальный срок не регламентируется).

После извлечения предмета-носителя (при этом должны быть тщательно удалены отделившиеся волокна бумаги или текстильной ткани) содержимое пробирки центрифугируют 5 мни. при 1500 об/мни. Уксусную кислоту отсасывают под контролем глаза пастеровской пипеткой, оставляя небольшое количество надосадочной жидкости. Осадок в виде капли переносят на предметное стекло. Если в капле видна механическая взвесь (волокна, разнообразные частицы небиологического происхождения) каплю следует распределить на большей площади предметного стекла, но не превосходящей по размерам покровное стекло.

2) Из волос препараты готовят, помещая корень одного волоса в каплю 10—25%, раствора уксусной кислоты на предметном стекле.

Под контролем микроскопа МБС-1 отрезают верхнюю часть стержня волоса, а предметное стекло с корнем помещают во влажную камеру (10—15 мин. для свежевырванного волоса, 40—60 мин. для волос большой давности). Набухшее наружное корневое влагалище (рис. 2) под контролем стереомикроскопа измельчают (рис. 3) заточенными препаратальными иглами, отделяя его от внутреннего, от остатка стержня и луковицы (последние удаляют из препарата).

Препараты, приготовленные из волос и следов слюны, высушивают, фиксируют в бюксе 10—15 мин. метиловым спиртом и окрашивают азур-эозиновой смесью в течение 30—40 мин. Краску смывают слабой струей водопроводной воды. Дифференцируют, опуская препараты на 2—3 сек. в бюксы с подкисленной водой (на 100 мл дистиллированной воды —1 мл 1% раствора уксусной кислоты), споласкивают дистиллированной водой с pH = 7,0—7,4 и высушивают. На одном крае препарата делают надпись, в которой указывают номера экспертизы, объекта и препарата. Препарат, приготовленный таким

образом, можно исследовать неоднократно и его следует хранить в течение срока, предусмотренного правилами хранения гистологических препаратов.

2. Микроскопическое исследование

При микроскопическом исследовании препаратов применяют объектив 90x (масляная иммерсия) и окуляр 10x. Микроскопируют первоначально при малом увеличении, а найдя скопление клеток, продолжают исследование с объективом 90x.

При правильной окраске азур-эозином ядра большинства клеток фиолетовые. Ядра изолированных клеток или клеток, расположенных в один слой, могут иметь розово-фиолетовый цвет. Ядра клеток, лежащих в 2—3 слоя, окрашиваются в сине-фиолетовый цвет.

Интенсивность окраски X-хроматина, как правило, больше, чем других участков хроматина ядра; тельце X-хроматина, кроме того, выделяется при любой его форме четкими контурами

3. Оценка результатов исследования (диагностика пола)

При исследовании очень важно дать правильную оценку состояния того или иного ядра с точки зрения его пригодности для учета. Учет всех ядер подряд может привести к ошибкам в диагностике.

В эпителиальных клетках слизистой рта учитывают только неповрежденные ядра с нежной хроматиновой структурой, лишенные признаков дегенерации. Следует внимательно анализировать ядра при наличии микроорганизмов, которые, располагаясь по оптическому краю ядра, могут имитировать X-хроматин. При исследовании клеток наружного корневого влагалища волоса наилучшие результаты получаются при изучении крупных светлых ядер, с сетчатой структурой хроматина). Эти клетки расположены в верхней области корня волоса. В мелких, интенсивно окрашивающихся ядрах X-хроматин выявляется плохо, поэтому клетки с такими ядрами являются менее пригодными для исследования

X-хроматин в ядрах эпителиальных клеток сохраняется в течение значительного времени. Максимальный срок давности следов слюны, в которых был диагностирован женский пол по X-хроматину, составил 15 лет. X-хроматин в ядрах эпителиальных клеток обнаруживали в волосах, вырванных более чем за год до исследования.

Для диагностики половой принадлежности предлагается таблица, в которой даны числовые соотношения клеток с X-хроматином и без него. В расчетах использованы суммарные данные о частоте X-хроматина в эпителии слизистой рта и оболочек волос, где минимальная частота X-хроматин-положительных клеток у женщин составляла 20%, а максимальная у мужчин - 7%. Расчеты произведены с помощью метода математической статистики: последовательного анализа, с 99% — надежностью.

Таблица. Соотношение X-хроматин-положительных и X-хроматин-отрицательных ядер для диагностики пола эпителиальных клеток

Число X-хроматин-	Число ядер, Подлежащих	Число X-хроматин-	Число ядер, подлежащихиссл
-------------------	------------------------	-------------------	----------------------------

положительных ядер(не менее)	исследованию (не более)	Положительных ядер (не более)	едованию (не менее)
Женский			мужской
3	4	0	25
4	14	1	35
5	24	2	45
6	34	3	55
7	44	4	65

В левой половине таблицы даны числовые соотношения клеток с Х-хроматином и без него для диагностики женского пола. **Женский** пол может быть диагностирован при 4 исследованных клетках, если не менее 3 из них имеют Х-хрома-тин-положительное ядро; при 14 исследованных — не менее 4, при 24 исследованных — не менее 5 и т. д. В правой половине таблицы даны числовые соотношения клеток с Х-хроматином и без него для диагностики мужского пола. Мужской пол можно установить при исследовании 25 клеток, если ни одна из них не содержит Х-хроматин-положительное ядро. Если встретилась хотя бы одна клетка с Х-хроматином, то для диагностики мужского пола необходимо проанализировать не менее 35 клеток « т. д. (см. таблицу).

Комплексный метод цитологического исследования объектов в судебно-медицинской экспертизе (Е.Н. Королева)

В основе метода лежит люминесцентная микроскопия. Состоит из нескольких этапов.

1 этап - окраска препаратов 0,0005% раствором атебрина. Основан на выявлении У-хроматина в изолированных клетках, что позволяет высказаться о половой и видовой принадлежности.

2 этап - решает вопрос органо-тканевой принадлежности, что достигается в сочетании двух принципов диагностики - морфологического (окраска амидочерным) и цитохимического, путем применения окраски акридиновым оранжевым, раствором Люголя.

После окраски препаратов атебрином промывают их в проточной воде 2-3 минуты, высушивают, окрашивают в течение 2 минут 0,01 % раствором акридинового оранжевого (приготовление красителя и метод окраски см. в разделе «дифференцирование клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия»).

3 этап - установление видовой принадлежности методом РИФ, если не обнаружен У-хроматин. Для чего перед постановкой реакции препараты после акридинового оранжевого промыть водой 15 минут, затем препарат погрузить в 50% этанол дополнительная фиксация). Можно проводить РИФ.

4 этап - определение групповой принадлежности клеток:

-РИФ

-PCA.

Т.к. в РИФ были применены кроличьи реагенты, необходимо обработать препарат 25% раствором уксусной кислоты в течение минут (убивает видоспецифичность).

Метод диагностики менструального происхождения крови в пятнах на вещественных доказательствах цитологическим методом

Оборудование: микроскоп биологический (серии МБИ или «БИОЛАМ») и люминесцентный (МЛ, МЛ-3, серии ЛЮМАМ); пинцеты, ножницы, препаровальные иглы; 1 пробирок; предметные и покровные стекла, центрифужные пробирки (объемом 10 мл) пипетки пастеровские, мерная посуда, колбы, флаконы различной емкости.

Реактивы: 20-25% раствор уксусной кислоты, раствор Люголя, готовый краситель Романовского или Май-Грюнвальда, 0,01% раствор акридинового оранжевого (АО), 5-10% хлорида кальция, 96° этиловый спирт.

Выбор материала для исследования.

Для цитологического исследования выбирают наиболее насыщенный, уплотненный участок пятна (как правило, из центра), при пропитывании нескольких слоев ткани предмета-из первого (верхнего) слоя. Вырезают кусочек размерами около 1,5x1,5 см (при ограниченных размерах пятна можно исследовать кусочки меньшего размера - до 0,5x0,5 см), которые целиком помешают в центрифужную пробирку емкостью 10 мл, заливают с избытком 20-25% уксусной кислоты и экстрагируют сутки при комнатной температуре. Через сутки пробирку с кусочком пятна подвергают вибрации в течение 5 минут (для возможно большего извлечения клеток), затем его извлекают и отжимают. Пробирку с вытяжкой центрифугируют при 1000-1500 об/мин в течение 5-7 минут. Если надосадочная жидкость интенсивно окрашена (в желтый, темно-желтый или коричневый цвет), то ее осторожно отсасывают, оставив слой высотой 0,5-1 см, добавляют новую порцию уксусной кислоты, осадок ресуспензируют и снова центрифугируют. Процедуру повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет бесцветной.

Проведение предварительной (ориентировочной) пробы на менструальную кровь.

Поскольку пятна менструальной крови содержат большое количество клеток, в пробирках после центрифугирования обычно наблюдается осадок высотой до 20 мм и более (в пробирках емкостью 10 мл). В вытяжках из пятен крови иного происхождения (в том числе из половых) такой осадок не появляется. Исследование по выявлению и изучению этого осадка является предварительный (ориентировочной) пробой на менструальную кровь,

Техника проведения пробы заключается в следующем: вначале измеряют высоту осадка в мм (обязательно указывая объем пробирки). Затем к части его, после ресуспензирования в небольшом количестве надосадочной жидкости, добавляют 3-4 капли раствора Люголя (проба на наличие гликогена в клетках), в течение 5-7 минут наблюдают изменение цвета осадка от белого (желтоватого, желтого) до коричневого. Далее каплю окрасившего осадка

помещают на предметное стекло и покрывают покровным и микроскопируют при увеличении 100-150x.

Пробу следует считать положительной при наличии осадка высотой от 2 до 20 мм (в центрифужной пробирке емкостью 10 мл) и большого количества гликогена содержащих клеток в нем.

Микроскопическое исследование цитологического препарата.

Из оставшейся части ресусспензированного осадка готовят мазок-каплю на обезжиренном предметном стекле, высушивают при комнатной температуре и фиксируют течение 10 минут. Если по ходу экспертного исследования необходимо определить половую принадлежность крови и клеток, препарат вначале окрашивают раствором (А.П.Загрядская.А.Л.Федоровцев. Е.М.Королева, 1984). После учета результатов окрасить по Романовскому или красителем Май-Грюнвальда. При использовании этих красителей цитоплазма клеток окрашивается в голубой или бледно-фиолетовый цвет. Ядра в синий или интенсивно-фиолетовый цвет. Целесообразнее, однако, флюорохромирование препаратом акридиновым оранжевым (АО), применение которого позволяет получить более четкую микроскопическую картину, т.к. этот флюохром, реагируя с ДНК- и РНК-содержащими структурами придает им способность по разному светиться: при наличии РНК - кирпично-красным ДНК - ярко-зеленым.

Методика окраски АО: на зафиксированный (или отмытый после атебрина) мазок наносят 0,01% раствор АО на 30 секунд, смывают проточной водой, затем на 2 мин и раствор хлорида кальция, снова смывают проточной водой. Окраска проводится микроскопа, ориентиром служат ядра клеток - они должны люминесцировать цветом.

Микроскопию препаратов осуществляют с помощью светового (объективы 40-90хокуляр 7-10x или люминесцентного (при окраске флюорохромом) микроскопа. Параметры для люминесцентной микроскопии: отраженный свет, пропускающий фильтр СС-15-2, ЖС-18+ЖЗС-19; окуляр 7x, объектив водной иммерсии 40 или 60x, иммерсионная среда дистиллированная вода, забуференная до pH 6,0.

В препаратах из пятен менструальной крови обнаруживаются клетки всех вагинального эпителия, эндометрия, форменные элементы крови (в основном, ядра гранулоцитловмикробная флора - кокки, дрожжи, палочки Дедерлейна.

Клетки вагинального эпителия: а) - поверхностные, имеют полигональную завернутые и мелкие, однородные, интенсивно окрашенные ядра сферической или формы. Ядерно-цитоплазматический индекс равен 1:6-1:7; б) - промежуточные клетки встречаются наиболее часто), окружной, полигональной, овальной или треугольной формы обычно овощной формы в 1,5-2 раза крупнее, чем у поверхностных клеток, хроматиновая субстанция имеет вид нежно-петлистной сети, на фоне которой четко различается Х-хроматин. Ядерно-цитоплазматический индекс равен 1:4: в) - парабазальные клетки имеют меньшие размеры по сравнению с поверхностными и промежуточными клетками, форма их овальная или окружная. Ядра крупные, сферические окрашиваются неярко, хорошо различима хроматиновая субстанция

и X-хроматин. Ядерно-цитоплазматический индекс составляет 1:3; г) -клетки по морфологическим особенностям сходны с парабазальными, но меньше их и чаще округлой формы, ядерно-цитоплазматический индекс равен 1:1-1:2.

При окраске препаратов по Романовскому и Май-Грюнвальду клетки вагинального эпителия различаются только по размерам, форме, интенсивности окраски ядер и величине ядерного цитоплазматического индекса. При флюорохромировании АО цитоплазма клеток из всех слоев эпителия влагалища женщин репродуктивного возраста имеет зеленое свечение (от включения РНК), у девочек и женщин, близких к менопаузе, цитоплазма парабазальных клеток имеет красноватый оттенок (присутствие РНК, критерий недостаточной эстрогенной стимуляции).

Клетки эндометрия: встречаются не часто - в 13% по нашим данным - и представлены отдельными клетками призматического эпителия, а пластами или группами их. Поэтому микроскопическая картина определяется ориентацией пластины клеток в препарате. Так, если он расположен боковой поверхностью к наблюдателю. То видны клетки однослойного призматического эпителия, прилегающего боковыми поверхностями друг к другу, эллипсоидные ядра которых находятся на одном уровне. При этом пласт клеток по внешнему виду напоминает «частокол». Если наблюдатель видит клеточный пласт сверху. То в основном различаются ядра. Окруженные узким ободком цитоплазмы. При такой ориентации пласт имеет вид «торцовой мостовой»

При флюорохромировании препаратов АО ядра клеток эндометрия имеют зеленый цвет цитоплазма - ярко-красную люминесценцию. В препаратах окрашенных по Романовскому или Май-Грюнвальду, клетки эндометрия можно выявить только в том случае, если они имеют пласт, который можно рассматривать сверху (т.к. «торцовая мостовая»), то клетки в неморазмеру выглядят также, как и скопление базальных клеток эпителия влагалища. .

особенности микроскопический картины мазков вагинальных клеток, извлеченных из пятен менструальной крови, в зависимости от возраста женщины.

В препаратах, приготовленных из вытяжек из пятен менструальной крови женщин репродуктивного возраста, выявляется большое количество клеток всех слоев эпителия влагалища преобладанием промежуточных (их больше) и поверхностных клеток. У девочек и девушек(12-16 лет, особенно с неустановившимся менструальным циклом) отмечается значительно меньше количество клеток в препаратах по сравнению с женщинами репродуктивного возраста наблюдается уменьшение числа промежуточных и поверхностных клеток, что свидетельствует недостаточной эстрогенной стимуляции. При флюорохромировании АО цитоплазма и парабазальных клеток, содержание которых в препаратах больше, чем у женщин репродуктивного периода, имеет красноватый оттенок.

Цитологическая картина мазков из пятен крови иного происхождения

В мазках из пятен неменструальной крови, излившейся из половых путей женщин, встречаются немногочисленные клетки преимущественно верхних

слоев эпителия влагалища и ядра лейкоцитов. Клетки эндометрия отсутствуют.

В препаратах из пятен крови из различных других источников кровотечения содержатся в основном ядра лейкоцитов и эпидермальные чешуйки, иногда - единичные клетки плоского эпителия с мелкими, интенсивно окрашенными пикнотичными ядрами. Клетки, свойственные тому или иному источнику кровотечения, встречаются очень редко.

Метод определения группоспецифических антигенов системы АВ0 в окрашенных гистологических и цитологических препаратах органов и тканей человека

Введение

Необходимость определения группоспецифических антигенов системы АВ0 в органах и тканях человека возникает при обнаружении частиц тканей на орудиях, использованных с целью нанесения повреждений человеку, на различных частях транспортных средств при дорожно-транспортных происшествиях, в подногтевом содержимом потерпевшего и преступника, на одежде и иных предметах, фигурирующих по делу в качестве вещественных доказательств.

Однако ввиду ограниченного количества материала, нередко представляемого на судебно-медицинскую экспертизу, вопрос о групповой дифференцировке тканей остается неразрешенным.

В указанном аспекте представляет интерес возможность обнаружения антигенов системы АВ0 в окрашенных гистологических или цитологических препаратах, изготовленных из тканей трупа с целью установления болезненных изменений в органах или для определения тканевой принадлежности частиц, найденных на орудиях травмы.

Определение группоспецифических антигенов в окрашенных гистологических и цитологических препаратах заслуживает внимания и потому, что при отсутствии образцов крови, волос, костей иногда такие объекты могут оказаться единственными источниками информации о групповой принадлежности трупа после захоронения или разложения его.

Настоящими методическими рекомендациями предлагается определение антигенов А, В и Н в окрашенных гистологических и цитологических препаратах реакцией «смешанной агглютинации».

Объекты исследования

Объектами исследования являются окрашенные гистологические или цитологические препараты органов и тканей человека. Способ и продолжительность фиксации материала, способы получения срезов, окраска (кроме тех способов окраски, в пропись которых входят сильные окислители — йодная кислота, перманганат калия), заключающая среда и ее растворители, давность изготовления препаратов (в пределах 1,5 лет) (отрицательного влияния на выявление группоспецифических антигенов А, В и Н не оказывают.)

Подготовка материала к исследованию

Для определения антигенов А, В и Н достаточно одного окрашенного гистологического среза размерами 0,5x0,5 см толщиной в 20 микрометров или 4—5 цитологических препаратов-мазков. При меньшей площади срезов для исследования необходимы 2—5 препаратов.

Если гистологические препараты используются в качестве образца, то, учитывая неодинаковую абсорбционную активность антигенов в различных органах и тканях, исследованию целесообразно подвергать срезы от нескольких органов. Установлено, что группопротивные антигены А, В и Н четко и легко выявляются в окрашенных гистологических и цитологических препаратах почек, селезенки, стенки желудка, скелетных мышц, легких; несколько хуже — в препаратах мышцы сердца, матки, печени; с трудом они обнаруживаются в препаратах кожи; очень плохо или почти не выявляются в срезах мозга.

Для освобождения от предметных и покровных стекол и заключающей среды гистологические препараты помещают в чашки Петри, заполненные эфиром (если препараты заключены в бальзам), на срок от 10 до 60 минут в зависимости от давности изготовления срезов, или ксилолом, если заключающая среда — полистирол (до полного его растворения).

Освобожденные срезы в небольшом количестве растворителя растирают пестиком в ступке до однородной взвеси, которую помещают в конусообразную пробирку и трижды с помощью центрифугирования (при скорости вращения 3000 об/мин — но 10 минут) отмывают 96° этиловым спиртом (для растворения красителя). Отмечено, что гематоксилин, эозин, фуксин, конгорт, суданIII, орсеин, бензидин, акридиновый оранжевый, атебрин (т. е. красители, наиболее часто используемые в гистологической и цитологической практике), являясь спирто- и водорастворимыми, в процессе отмывания полностью или почти полностью удаляются из препаратов. Если же какая-то часть их остается, то отрицательного влияния на обнаружение антигенов А, В и Н не оказывает.

Целлоидиновые срезы после освобождения от заключающей среды растирают смеси спирт-эфир (1:1) для растворения целлоида. Однородную взвесь центрифицируют с целью удаления целлоида.

Клеточную взвесь, полученную после обесцвечивания материала, ресуспензируют в новых порциях спирта. Из полученной взвеси на 5 обезжиренных предметных стеклах готовят тонкие круглые мазки диаметром до 1 см. Наличие клеток в мазках контролируется с помощью фазово-контрастной микроскопии.

Мазки в течение 10 минут фиксируют метиловым спиртом, подливая его по мере подсыхания. При исследовании окрашенных цитологических препаратов следует лишь освободить их от покровных стекол и заключающей среды (способы те же, что и при исследовании гистологических препаратов). Фиксация мазков не производится, так как она проводилась перед окраской.

Постановка реакции «смешанной агглютинации»

Подготовленные (описанными способами) для проведения реакции «смешанной агглютинации» препараты заливают следующими реагентами: 2 мазка — сывороткой альфа, 2 мазка — сывороткой бета, 1 мазок — экстрактом

анти-Н. Следует заметить, что при исследовании препаратов, изготовленных из свежих тканей, может быть использован экстракт анти-Н как из плодов бузины травянистой," так и из семян ракитника сидячелистного; для исследования препаратов из гнилостно-изменённых тканей пригоден лишь экстракт анти-Н из семян ракитника сидячелистного.

В опыт вводят изогемагглютинирующие сыворотки альфа и бета, имеющие наибольшую активность, которую устанавливают при исследовании окрашенных гистологических препаратов различных органов и тканей со слабо выраженными антигенными свойствами. Специально подготовленный набор таких препаратов тканей разной (но известной) групповой специфичности постоянно должен иметься в лаборатории.

Абсорбцию антител проводят в течение 18—20 часов при температуре 4—8°C (в холодильнике). Во время абсорбции препараты содержат во влажных камерах.

Следующий этап реакции «смешанной агглютинации» -удаление несвязанных во время абсорбции антител. Оно проводится в течение 1,5 часов путем нанесения на препарат изотонического раствора хлорида натрия, хранящегося в холодильнике при температуре 4—8°C. Порции раствора меняют каждые 15 минут (предыдущая порция удаляется с препарата путем стряхивания или отсасывания). Объем раствора на одно отмывание равен 0,5—0,8 мл (одна порция). Отмывание проводят при комнатной температуре 18—25°C.

На отмытые и просушенные затем на воздухе препараты наносят соответственно по 2 капли 0,3% взвеси свежевзятых (неотмытых) эритроцитов в изотоническом растворе хлорида натрия. Эритроциты А и В — на два мазка, инкубированные с сыворотками альфа и бета (соответственно); эритроциты группы О—на мазки, инкубированные с сыворотками альфа и бета (контрольные мазки) и с лектином анти-Н. Препараты накрывают покровными стеклами и вновь помещают во влажные камеры. Препараты микроскопируют (микроскоп МБИ, МБР с объективом 8^s, окуляром 15^x, конденсор микроскопа максимально опущен) для выявления агглютинации первый раз через 30 минут и до появления первых признаков подсыхания.

При учете реакции «смешанной агглютинации» за положительный результат принимают подвижное присоединение 2-х и более эритроцитов как по краю клеточных элементов в виде «розетки», так и на поверхности их.

Метод выявления антигенов системы АВ0 в клетках с определенными морфологическими свойствами

Введение

Одним из этапов судебно-медицинской цитологической экспертизы изолированных клеток, выявляемых в различных следах биологического происхождения, является установление их групповой принадлежности по системе АВО. Обычно для этой цели используются высокочувствительные реакции смешанной агглютинации и иммунофлюоресценции.

Однако применение этих реакций в том виде, как они описаны в соответствующих методических рекомендациях, далеко не во всех случаях

позволяет решить вопрос о наличии искомого антигена в конкретных клетках, интересующих эксперта (например, в вагинальных, находящихся в смеси с уретральными клетками и эпидермальными чешуйками). Это связано с тем, что для постановки реакции смешанной агглютинации (PCA) используются неокрашенные мазки (а если они и были окрашены, то в процессе инкубации с сыворотками и последующих отмываний от свободных антител происходит их обесцвечивание), в которых выделить по морфологическим и цитохимическим особенностям конкретную клетку практически невозможно. При постановке реакции иммунофлюоресценции также используются неокрашенные или контрастирование бычьим альбумином, меченным родамином, мазки и, кроме того, в случае положительного результата реакции наблюдается свечение клеточной мембранны, что маскирует морфологические особенности клеток.

В связи с отмеченным, разработана методика выявления антигенов системы АВО в клетках с определенными морфологическими особенностями, интересующими эксперта цитолога.

Постановка реакции

- в мазках, приготовленных из смызов следов на вещественных доказательствах, с использованием соответствующих окрасок отыскивают клетки и устанавливают их органотканевое происхождение. Например, в смызах с половых органов лиц, подозреваемых в половых преступлениях -клетки влагалищного эпителия (при совершении половых актов в извращенной форме - букального или ректального эпителия), при исследовании следов - наложения на орудиях травмы - клетки поврежденных органов и тканей и т.д.;

-с мазками, в которых выявлены клетки, ставят PCA: препараты в течение 18 час инкубируют во влажной камере при температуре 4°C с изосыворотками анти-А и анти-В или моноклональными антителами анти-А, В и Н с титром 1:128 - 1:256. Затем мазки отмывают ледяным физиологическим раствором 5 раз по 5 мин. от непрореагировавших антител. После этой операции препараты 2 мин. окрашивают 0,01% раствором акридинового оранжевого, приготовленном на забуференном (рН 5,5 - 6,0) физиологическом растворе, 20 -30 сек. промывают физиологическим раствором и добавляют к мазкам 0,25% взвесь тест-эритроцитов А. В и Н(О). Экспозиция с тест - эритроцитами во влажной камере 2 часа при температуре 18 - 22 С;

-мазки накрывают покровными стеклами и в отраженном свете люминисцентного микроскопа типа ЛЮМАМ серии И или Р-8 с объективом водной иммерсии 40 - 65 х отыскивают клетки с определенным морфологическими особенностями и в проходящем свете, именно по ним оценивают результаты PCA. Для объективов водной иммерсии в качестве иммерсионной среды применяют физиологический раствор, т.к. при использовании воды, возможно попадание ее под покровное стекло , что приводит к гемолизу эритроцитов.

Окрашивание мазков раствором акридинового оранжевого позволяет изучить морфологические и цитохимические свойства клеток, а также выявить в ядрах половую метку - Х-хроматин. Поэтому использование данной методики наиболее

эффективно при определении антигенов системы АВО в вагинальных клетках (в ядрах которых хорошо выявляется X - хроматин), а также в клетках органов и тканей, цитоплазма которых богата РНК и окрашиваете акридиновым оранжевым в оранжево-красные тона (например, нейроны коры головного мозга, гепатоциты, альвеолоциты и т.д.).

Методика диагностики регионального происхождения клеток многослойного плоского неороговевающего эпителия

Введение

Клетки многослойного плоского неороговевающего эпителия (МПНЭ) являются частыми объектами судебно-медицинской цитологической экспертизы, т.к. выстилают слизистые оболочки влагалища, ротовой полости, промежуточной зоны прямой кишки и конечного отдела мочеиспускательного канала.

Наиболее четко различия между клетками поверхностного и промежуточного слоев имеющими разное региональное происхождение, выявляются при окраске амидочерным 10Б, который селективно окрашивает белки.

Методика окраски сводится к следующему: предварительно готовят 1% маточный раствор амидочерного 10Б на дистиллированной воде, который сохраняется длительное время.

Красящую смесь приготовляют перед употреблением путем смешивания 1 части маточного раствора с 19 частями смеси Карнуса (60 мл этилового спирта, 30 мл хлороформа и 10 мл ледяной уксусной кислоты). Красящая смесь одновременно является фиксатором, поэтому можно окрашивать незафиксированные мазки. Время окраски 10 мин., затем следует 10-15 секундная промывка проточной водой. Препараты

микроскопируют в проходящем свете при увеличении 40х. Использование водной иммерсии не желательно, т.к. краситель растворяется в воде. Необходимо отметить, что при окраске амидочерным 1 ОБ X- хроматин в ядрах не определяется.

Влагалищный эпителий.

Клетки поверхностного слоя имеют вид тонких пластинок многоугольной (полигональной) формы размерами 40-91 мкм (в среднем 68 мкм) с гомогенно и интенсивно окрашенными черно-синие тонапреимущественно округлыми ядрами величиной 4,5-10,5 мкм (в среднем 7 мкм), которые чаще расположены центрально. Ядерно-цитоплазматический индекс 1:7-1:10. Края клеток мелкозубчатые, часто завернутые. Цитоплазма окрашивается интенсивно и неравномерно в синие тона, имеет грубозернистое строение, включения в ней отсутствуют, встречаются мелкие (до 2 мкм) немногочисленные белковые включения темно-синего цвета, в цитоплазме в 10-15% клеток вокруг ядра имеется просветление. Иногда встречаются клетки, у которых цитоплазма в клетках как бы «вспенена» - этот признак встречается исключительно в клетках поверхностного слоя влагалищного эпителия.

В ядрах Х- хроматин не определяется (при использовании соответствующих окрасок).

Клетки промежуточного слоя имеют аналогичное строение и размеры, ядра их крупнее (8-13 мкм, в среднем 11 мкм), овальной формы, локализация в клетках произвольная. Ядерно - цитоплазматический индекс составляет 1:4-1:6. В ядрах при соответствующих окрасках выявляется Х- хроматин.

В цитоплазме клеток поверхностного и промежуточного слоев при обработке раствора Люголя (на препарат наносят каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом и микроскопируют) выявляется гликоген - цитоплазма окрашивается в красновато-коричневые тона. Число гликогеносодержащих клеток и интенсивность окраски цитоплазмы зависят главным образом от уровня содержания эстрогенов в организме женщины.

На клеточный состав вагинального содержимого значительное влияние оказывает возраст, так, в репродукционный период, когда содержание эстрогенных гормонов в организме женщины наиболее высокое, во влагалищном содержимом встречаются только клетки поверхностного и промежуточного слоев. Созревание которых стимулируется эстрогенами. При этом, в фолликулиновую фазу менструального цикла преобладают поверхностные клетки с сильно пикнотическими (сморщенными) ядрами. Клетки располагаются изолированно, распластаны, во многих из них содержится гликоген. В лuteиновую фазу менструального цикла возрастает общее количество клеток, кроме поверхностных появляется значительное число промежуточных клеток. Часто клетки лежат не изолированно, а группами, реже - пластами. В препаратах выявляется много деформированных клеток, а также клеток с завернутыми краями. Содержание гликогена в клетках (т.е. интенсивность окраски цитоплазмы при обработке раствором Люголя) снижается, но количество гликогеносодержащих клеток не уменьшается. Клетки базального слоя отсутствуют, встречаются лишь единичные парабазальные клетки.

У девочек, до становления менструального цикла и женщин, находящихся в менопаузе, вагинальное содержимое представлено преимущественно парабазальными клетками и небольшим числом базальных и промежуточных клеток. Гликоген в клетках практически не определяется или содержится в малых количествах.

Буккальный (зашечный) эпителий.

Клетки поверхностного слоя имеют вид тонких пластинок овальной или неправильно-овальной формы размерами 48-142 мкм (в среднем 90 МКМ) с овальными гомогенно окрашенными в черно-синие тона ядрами, расположенными эксцентрично. Размеры ядер колеблются в пределах 8-15 мкм. (среднем 11 мкм). Ядерно-цитоплазматический индекс 1:7-1:10. Края клеток ровные, незавернутые. Цитоплазма окрашивается неинтенсивно и равномерно в голубые или светло-синие тона, имеет своеобразное строение в виде мелких параллельных полосок, которые лучше различаются по периферии клеток. В цитоплазме содержится большое количество крупных (величиной 3-6 мкм), интенсивно окрашенных в темно-синий или черно-синий цвет белковых

включений чаще неправильной формы, локализующихся обычно вокруг ядра. Просветления цитоплазмы вокруг ядер не имеется. Гликоген отсутствует. В ядрах при соответствующих окрасках половые метки (Х- и У- хроматин) не определяются.

Клетки промежуточного слоя имеют такие же размеры и морфологические характеристики, но ядра их более крупные - 10-17 мкм (в среднем 14 мкм) и окрашиваются не столь интенсивно. Ядерно-цитоплазматический индекс 1:4-1:6. В ядрах клеток при соответствующих окрасках выявляются половые метки.

Клетки буккального эпителия обычно лежат в мазках изолированно (редко группами по 2-3 клетки), в препаратах практически не встречаются деформированные и разрушенные клетки.

Клетки буккального эпителия являются самыми крупными среди клеток МПНЭ. Поэтому диагностика наличия поверхностных клеток буккального эпителия возможна по их размерам. Так, клетка является буккальной, если имеет величину более 100 мкм, а ее ядро более 10 мкм (вероятность ошибки при этом составляет 0,1%).

Уретральный и ректальный эпителий.

Как уже отмечалось выше, слизистые оболочки конечного отдела мочеиспускательного канала (ладьевидная ямка) и промежуточной зоны прямой кишки выстланы клетками МПНЭ.

Клетки поверхностного слоя уретрального и ректального эпителия имеют полигональную или овальную форму, ровные незавернутые края. Ядра преимущественно овальной формы, лежат эксцентрично. Размеры клеток и их ядер такие же, как у вагинальных клеток. Ядерно-цитоплазматический индекс 1:7-1:10. Цитоплазма окрашивается неинтенсивно и равномерно в голубые или светлосиние тона, имеет мелкозернистую структуру, или однородная. В цитоплазме большинства клеток встречаются интенсивно окрашенные белковые включения неправильной формы величиной 2-4 мкм, не имеющие определенной локализации. У 20-25% клеток в цитоплазме вокруг ядра имеется просветление. Половые метки в ядрах не определяются.

Клетки промежуточного слоя обладают такими же морфологическими особенностями. Размеры клеток и их ядер такие же как и у вагинальных клеток. В ядрах при соответствующих окрасках выявляются Х- и У- хроматин. Гликоген в цитоплазме отсутствует или встречается в небольшом количестве в единичных клетках.

Описанные морфологические признаки являются относительными (за исключение «вспененной» цитоплазмы у вагинальных клеток и строения цитоплазмы в виде полосок у буккальных, которые присущи только этим видам эпителия), поэтому во избежание ошибок при диагностике необходимо учитывать их в комплексе при изучении не одной, а нескольких клеток, что позволит установить наличие клеток влагалищного и буккального эпителия в следах, дифференцировать их между собой, отличить от ректального и уретрального эпителия.

Следует подчеркнуть, что наиболее информированными признаками являются: наличие белковых включений и гликогена, строение цитоплазмы и состояние краев клеток.

Морфологические признаки клеток МПНЭ, имеющих различное региональное происхождение, представлены в таблице.

Таблица *Дифференциация некоторых видов многослойного плоского неороговевающего эпителия (при окраске амидочерным 10Б)*

Признаки	Буккальный	Вагинальный	Уретра	Ректал
Форма	Овальная	Полигонал	Полигональная	
Форма ядра	Овальная	Округлая	Овальная	
Локализаци	Эксцентричн	Центральн	Эксцентричная	
Состояние краев	Ровные незавернутые	Мелкозубч атые завернутые	Ровные незавернутые	
Строение цитоплазмы	Мелкозерни стая	Грубозерн истая	Мелкозернистая	
Наличие включений	Имеются крупные	Отсутству ют	Имеются мелкие	
Просветлен ие вокруг	Отсутствует	Имеется в 10-15%	Имеется в 20-25% клеток	
Наличие	Отсутствует	Имеется	Отсутствует	

Перечень использованных источников:

1. «Инструкция по организации и производству судебно-медицинской экспертизы» (Приказ МЗ РК от 20 мая 2010г. № 368) – Астана, 2010
2. Методические указания Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Судебно-цитологическая диагностика половой принадлежности слюны и волос по Х- хроматину. –М, 1975. -16с.
3. Методические указания Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. О судебно-цитологической диагностике половой принадлежности крови, слюны и волос по У- хроматину. –М, 1977. 12с.
4. Методическое письмо Главного судебно – медицинского эксперта Минздрава СССР. Диагностика половой принадлежности крови в следах на вещественных доказательствах. –М, 1969. -14с.
5. Цитологические методы исследования. Астана 2009
6. Методические рекомендации Главного судебно-медицинского эксперта Минздрава СССР. Об выявлении на орудиях механической травмы клеточных элементов животного происхождения с установлением видовой, групповой и половой принадлежности клеток.