
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

chromatographic method. The quantitative content of chlorophyll α , chlorophyll β and carotenoids in the aboveground and underground parts of *Portulaca oleracea* L. and *Portulaca grandiflora* Hook was determined by using spectrophotometric method.

Conclusions. The highest quantitative content of chlorophyll α ($1,168 \pm 0,015$ mg/g), chlorophyll β ($0,729 \pm 0,045$ mg/g) and carotenoids ($0,235 \pm 0,006$ mg/g) was determined in the aboveground part of *Portulaca oleracea* L. The obtained results of investigation can be used for developing methods of qualitative control on the medicinal plant material.

Key words: lipophilic extracts, chlorophylls, carotenoids, *Portulaca oleracea*, *Portulaca grandiflora*.

Відомості про авторів:

Кініченко Анна Олександрівна — аспірант кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету. Адреса: м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, тел.: (061) 224-63-85.

Тржецинський Сергій Дмитрович — доктор біологічних наук, доцент, завідувач кафедри фармакогнозії, фармакології та ботаніки Запорізького державного медичного університету. Адреса: м. Запоріжжя, проспект Маяковського, 26, тел.: (061) 224-63-85.

УДК 340.6:616-076:577.21

ОСОБЛИВОСТІ СУДОВО-МЕДИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМНОЇ ДНК, ВИДІЛЕНОЇ З БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН, ФІКСОВАНИХ ФОРМАЛІНОМ

Р. Г. Кривда

Одеський національний медичний університет, м. Одеса

Резюме. Використання молекулярно-генетичних методів при проведенні судово-медичної експертизи біологічного матеріалу у вигляді «вологого» гістологічного архіву потребує врахування певних вимог: підготовка об'єктів до ДНК-аналізу, виділення ДНК, її ампліфікація, розділення та аналіз продуктів

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ПЛР. В роботі визначали вплив терміну та температури формалінової фіксації на біологічну тканину печінки, для встановлення ступеню деградації ДНК, виділеної з цієї тканини, та можливого її використання для одержання ДНК-профілю. Показано, що оптимальний термін фіксації біологічної тканини в умовах кімнатної температури (22 °С) за допомогою 10 % розчину формаліну склав 6 годин. Фіксація біологічного матеріалу в умовах побутового холодильника при температурі 4 °С протягом 12 годин є оптимальною для отримання повного ДНК-профілю.

Ключові слова: ПЛР, гістологічні препарати, геномна ДНК, фіксована формаліном тканина, судово-медична експертиза.

Вступ. Молекулярно-генетичне дослідження гістологічних препаратів в судово-медичній практиці займає шосте місце серед всіх досліджених біологічних об'єктів, що складає 2,5 % від загальної кількості досліджених біологічних об'єктів.

У разі відсутності біологічних зразків від конкретної особи, біологічний матеріал у вигляді «вологого» гістологічного архіву може виявитися єдиним придатним об'єктом для порівняння та може бути використаний у якості зразків для вирішення питань ідентифікації особи або встановлення біологічної спорідненості при проведенні судово-медичних експертиз молекулярно-генетичними методами. Нами таке дослідження було розпочате у 2013 році, на сьогодні це дослідження є етапом науково-дослідної роботи кафедри судової медицини ОНМедУ за темою: «Оптимізація проведення судово-медичної експертизи різних біологічних об'єктів з використанням ДНК-аналізу в експертних установах МОЗ України» [1]. Перспективним напрямком науково-дослідної роботи є дослідження гістологічних препаратів у вигляді «вологого» архіву, які за певних обставин справ можуть бути єдиними речовими доказами у справі. Дані препарати готують з біологічних органів та тканин, які відбираються у трупів при проведенні СМЕ трупу для підтвердження причини смерті. Внаслідок чого необхідним є розробка та впровадження в експертну практику уніфікованого алгоритму проведення судово-медичної експертизи речових доказів — фіксованих тканин об'єктів судово-гістологічного дослідження та біологічного матеріалу у вигляді «вологого архіву».

Досвід дослідження гістологічних препаратів існує в клінічній медицині, напрямком якої направлений на використання молекулярно-генетичних методів при дослідженні гістологічних препаратів з метою отримання генетичних маркерів для діагностики онкологічних, генетичних та спадкових захворювань та виділення з тканин інфекційних маркерів. [3, 4, 5, 6, 7, 8].

При дослідженні гістологічних препаратів у вигляді «вологого архіву» існує проблема негативного впливу фіксуючої рідини на структуру молекули ДНК. Відповідно до літературних джерел, такі фіксатори, як 10 % розчин формаліну та 4 % розчин формальдегіду є найбільш вживаними гістологічними фіксаторами, при цьому вони по різному частіше негативно впливають на ДНК. Фіксація біологічних тканин в розчині формальдегіду негативно впливає на структуру ДНК — утворюються шиффови основи, що призводить до зменшення кількості придатної ДНК. Під дією розчину формаліну відбувається поперечне зв'язування з гістонами і реакція з нуклеотидами, яка виражається в зміні нуклеотидних послідовностей [2].

У зв'язку з вищевикладеним, для запобігання втрати біологічного матеріалу фіксованих тканин у вигляді «вологого архіву» в якості біологічних зразків та для підвищення ефективності проведення судово-медичних експертиз з використанням молекулярно-генетичних методів важливим є визначення оптимального способу проведення фіксації гістологічних препаратів, при якому кількість та якість виділеної ДНК буде достатньою для отримання повного ДНК-профілю.

Мета. Метою нашого дослідження було визначення та розробка тактики проведення судово-медичної експертизи гістологічних препаратів у вигляді «вологого архіву», за допомогою сучасних молекулярно-генетичних методів з урахуванням впливу тривалості та температурних умов формалінової фіксації на якість та кількість виділеної ДНК та можливість її використання для встановлення ДНК-профілю.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження — це біологічний матеріал (шматочки печінки), відібраний від дванадцяти померлих осіб чоловічої та жіночої статі для проведення судово-медичного гістологічного дослідження в межах судово-медичної експертизи трупів відділу СМЕ трупів Одеського обласного

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

бюро СМЕ. Для експериментального дослідження підготували дві групи біологічних об'єктів ($n=12$) — шматочки печінки розмірами 2,0x2,0x2,0 см, які фіксували за допомогою 10 % нейтрального розчину формаліну в умовах кімнатної температури (22 °C) протягом 0,5, 3, 6, 9, 12 год. та в умовах побутового холодильника (4 °C) протягом 12 та 24 год. Контрольну групу (К) біологічних об'єктів — аналогічні шматочки печінки, розмірами 2,0x2,0x2,0 см, від тих самих дванадцяти трупів досліджували за допомогою молекулярно-генетичних методів у день відбору матеріалу, через 15 хвилин після отримання матеріалу.

Геномну ДНК з тканин експериментальних та контрольних об'єктів виділяли за допомогою спеціального набору реагентів «PrepFiler® Forensic DNA Extraction Kit» («Applied Biosystems», США) для виділення ДНК з криміналістичних зразків, за стандартним протоколом, рекомендованим виробником реагентів. Отриману ДНК розчиняли в 10,0 мкл буферу для елюції.

Концентрацію виділеної геномної ДНК визначали за допомогою флуориметра Qubit 2.0 Instrument Q 32866 («Invitrogen», США) та набору реагентів Qubit® dsDNA BR, виробництва («Invitrogen», США), для кількісного визначення дволанцюгової ДНК, відповідно до інструкції, яка додається виробниками реагентів.

Виділену ДНК фракціонували методом горизонтального «підводного» електрофорезу в електрофорезній камері «Hoefer Scientific Instruments» (США). Електрофорез здійснювали протягом 1 год. при напрузі постійного струму 70 В у 1xTBE буфері (50 мМ Трис- H_3BO_3 ; 2 мМ Na_3EDTA ; рН 8,0) в 1 %-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл. При проведенні електрофорезу, одна або кілька доріжок містили маркер молекулярної ваги pGEM® DNA Markers («Promega», США) і контрольну високомолекулярну ДНК («Promega», США) з концентрацією 10 нг/мкл. Виділену ДНК, а також контрольну високомолекулярну ДНК наносили на гель у кількості 10,0 мкл.

Типування гіперваріабельних STR-локусів ДНК геному людини проводили в мультилокусному форматі за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), використовували набір реагентів для ПЛР-ампліфікації «AmpFISTR® Identifier® Plus» («Applied Biosystems», США), з використанням систем ензиматичної ампліфікації наступних локусів: локуси D8S1179, D21S11,

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA, Amelogenin), відповідно до інструкції, яка додається виробниками реагентів. При постановці ПЛР здійснювали негативний контроль (реакційна суміш містила всі компоненти, крім ДНК) і позитивний контроль (реакційна суміш містила ДНК із відомим набором алелів по кожному локусу). Для оцінки специфічності реакції використовували позитивний контроль (проба контрольної ДНК 9947A, яка входить до складу набору). Дослідження проводили з використанням системи «GeneAmp® PCR 2720» («Applied Biosystems», США).

Розділення та детекцію флуоресцентно мічених ампліфікованих фрагментів проводили з використанням автоматичного аналізатору ДНК «3130 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США) в середовищі полімеру POP-4, довжина капілярів — 36,0 см, час прогону 45 хв. Визначення довжин ампліфікованих фрагментів та встановлення номерів алелів проводили відповідно до внутрішнього стандарту довжини GeneScan-600 LIZ Size Standard («Applied Biosystems», США) та алельного леддери, який входить до набору, за допомогою програмного комплексу «Gene Mapper ID Software Version 3.1».

Статистичний аналіз результатів дослідження проводили з використанням t-критерію Стьюдента, який визначався за допомогою комп'ютерної програми Statistica — 6. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними групами при $P < 0,05$.

Результати. Результати проведеної науково-дослідної роботи по дослідженню експериментальних зразків біологічного матеріалу (шматочків печінки) об'єктів судово-гістологічного дослідження у вигляді гістологічного «вологого» архіву оцінювали відповідно до наступних критеріїв: кількісні та якісні характеристики виділеної геномної ДНК; придатність виділеної ДНК для аналізу методом ПЛР (можливість отримання продуктів ампліфікації на матриці виділеної ДНК та отримання повного генетичного профілю; якість ДНК-профілів експериментальних об'єктів встановлювали шляхом проведення порівняльного аналізу отриманих ДНК-профілів з ДНК-профілями контрольної групи відповідних об'єктів для встановлення тотожності за результатами генотипування).

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

I етап. Визначали кількість ДНК (нг), виділеної із біологічних об'єктів, — (шматочків печінки масою 25,0 мг) (n=12), які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну в умовах кімнатної температури (22 °С) протягом 0,5; 3; 6; 9; 12; 24 год. та в умовах побутового холодильника при температурі 4 °С протягом 12 — 24 год. Дані про кількість виділеної ДНК показані в таблиці 1.

Таблиця 1

Кількість ДНК (нг), виділеної із біологічних об'єктів, які фіксували в умовах кімнатної температури та побутового холодильника

№ об'єкту дослідження	Температура фіксації, год.									
	Кімнатна температура (22 °С)							Температура побутового холодильника (4 °С)		
	К	0,5	3,0	6,0	9,0	12,0	24,0	12,0	24,0	
1	1349,0	1300,0	855,0	423,0	68,0	9,0	< 1,0	78,0	< 10,0	
2	1465,0	1406,0	954,0	490,0	78,0	10,0	< 1,0	88,0	< 10,0	
3	1500,0	1442,0	979,0	512,0	78,0	10,0	< 1,0	88,0	< 10,0	
4	1528,0	1467,0	1010,0	537,0	80,0	10,0	< 1,0	90,0	< 10,0	
5	1548,0	1490,0	1031,0	565,0	81,0	10,0	< 1,0	91,0	< 10,0	
6	1553,0	1501,0	1065,0	595,0	82,0	11,0	< 1,0	92,0	< 10,0	
7	1420,0	1364,0	900,0	445,0	73,0	9,0	< 1,0	83,0	< 10,0	
8	1650,0	1585,0	1123,0	650,0	83,0	11,0	< 1,0	93,0	< 11,0	
9	1605,0	1540,0	1092,0	621,0	83,0	11,0	< 1,0	93,0	< 11,0	
10	1695,0	1627,0	1155,0	678,0	85,0	11,0	< 1,0	95,0	< 12,0	
11	1440,0	1382,0	927,0	468,0	77,0	9,0	< 1,0	97,0	< 10,0	
12	1505,0	1445,0	981,0	535,0	79,0	10,0	< 1,0	91,0	< 10,0	
М	1521,5	1462,4	1006	543,35	78,91	10,08	1	89,91	10,33	
m	28,33	27,08	26,36	23,42	1,36	0,22	0	1,50	0,18	
t	—	1,50	13,3	26,61	50,86	53,34	53,67	50,4	53,34	
p	—	>0,1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

Примітка. К — контрольна група сформована з біологічних об'єктів — (шматочків печінки масою 25,0 мг) (n=12), які не піддавалися фіксації та ДНК, з яких досліджували у день відбору матеріалу;

Примітка. M — середнє арифметичне

Примітка. m — стандартна похибка

Примітка. t-критерій Стьюдента.

З даних наведених у таблиці 1 випливає наступне: кількість ДНК (нг), виділеної із біологічних об'єктів — шматочків печінки масою 25,0 мг (n=12), які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну за кімнатної температури (22°C) протягом 0,5 год. зменшується в середньому на 3.6 %, тобто немає достовірної різниці в порівнянні з контрольною групою ($p > 0,1$). При фіксації за аналогічних умов протягом 3 год. кількість ДНК зменшується в середньому на 33,9 %, відносно контрольної групи об'єктів, протягом 6 год. — на 65 %, протягом 9 год. — на 94,9 %, протягом 12 год. — на 99,34 %, протягом 24 год. — 99,94 %. Достовірною вважали різницю при $p < 0,001$.

Кількість ДНК (нг), виділеної із біологічних об'єктів, які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну в умовах побутового холодильника при температурі 4°C протягом 12 год. зменшується на 95 %, а протягом 24 год. зменшується в середньому на 99.3 %, відносно контрольної групи об'єктів, результати достовірні ($p < 0,001$).

II етап. Результати електрофоретичного розділення ДНК, виділеної із біологічних об'єктів — шматочків печінки масою 25,0 мг (n=12), які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну в умовах кімнатної температури (22 °C) протягом 0,5; 3; 6; 9; 12; 24 год. демонструють, що процеси деградації ДНК мають поступовий негативний характер, відносно контрольної групи об'єктів. Якість ДНК характеризується відносно ступеню деградації. ДНК виділена з об'єктів, які фіксували протягом перших трьох годин (0,5 — 3 год.) має молекулярну масу в межах 1000 — 2500 п. н., тобто є придатною для отримання ДНК-профілю. При більш тривалій фіксації (6 — 9 год.) молекулярна маса виділеної ДНК складає до 500 п. н., що свідчить про наявність виражених процесів деградації, але отримана ДНК може бути придатною для отримання ДНК-профілю. При фіксації на протязі 12 — 24 год. молекулярна маса виділеної ДНК складає менш ніж 200 п. н., що свідчить про її фрагментацію. Таким чином, отримана ДНК є деградованою та не може слугувати матрицею для STR-локусів, на базі яких розроблені

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ідентифікуючі панелі, наприклад набір для ПЛР-ампліфікації «AmpFISTR®Identifiler®Plus» («Applied Biosystems», США).

Результати електрофоретичного розділення ДНК, виділеної із біологічних об'єктів — шматочків печінки масою 25,0 мг (n=12), які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну в умовах побутового холодильника при температурі 4 °С протягом 12 та 24 год. демонструють, що процеси деградації ДНК уповільнюються відносно контрольної групи об'єктів та відносно досліджуваних об'єктів, які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну в умовах кімнатної температури (22 °С) при аналогічному часі фіксації.

Виділена ДНК має молекулярну масу до 500 п. н., що свідчить про наявність більш повільних процесів деградації, які пов'язані з уповільненням швидкості проникнення формаліну в тканину печінки, при цьому отримана ДНК може бути придатною для встановлення ДНК-профілю.

III етап. Визначали придатність ДНК, виділеної із біологічних об'єктів — шматочків печінки, які фіксували за допомогою 10 % розчину формаліну в різних температурних умовах протягом різного часу за наступними критеріями: отримання повного ДНК-профілю при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів ДНК геному людини при використанні набору реагентів для ПЛР-ампліфікації «AmpFISTR®Identifiler®Plus» («Applied Biosystems», США), отримання часткового ДНК-профілю при типуванні, враховуючи ефекти «випадіння» алелей або повну відсутність продуктів ПЛР. Дані про придатність виділеної ДНК показані в таблиці 2.

Як видно з даних, наведених у таблиці 2, виділена ДНК із біологічних об'єктів — шматочків печінки масою 25,0 мг (n=12), які фіксували в умовах кімнатної температури (22 °С) протягом 0,5; 3; 6 та 9 годин придатна для генотипування, тобто повний ДНК-профіль при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів був отриманий для 100 % об'єктів. В той же час для чотирьох об'єктів (33 %) фіксація яких здійснювалася протягом 12 годин виявилася критичною, що виразилося в негативному результаті ампліфікації — профіль ДНК не був отриманий. Для чотирьох об'єктів (33 %) був отриманий частковий ДНК — профіль. Для трьох об'єктів з цієї дослідницької групи був отриманий повний

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ДНК — профіль. Збільшення терміну фіксації до 24 годин дає змогу встановити частковий ДНК — профіль тільки для 25 % досліджуваних об'єктів.

Таблиця 2

Результати типування ДНК, виділеної із біологічних об'єктів, які фіксували в умовах кімнатної температури та побутового холодильника

№ об'єкту дослідження	Температура (22 °С)							Температура (4 °С)	
	Термін фіксації, год.							Термін фіксації, год.	
	К	0,5	3,0	6,0	9,0	12,0	24,0	12,0	24,0
1	+	+	+	+	+	-	-	+	-
2	+	+	+	+	+	-	-	+	-
3	+	+	+	+	+	-	-	+	-
4	+	+	+	+	+	±	-	+	±
5	+	+	+	+	+	±	-	+	±
6	+	+	+	+	+	±	-	+	±
7	+	+	+	+	+	±	-	+	±
8	+	+	+	+	+	+	±	+	+
9	+	+	+	+	+	+	±	+	+
10	+	+	+	+	+	+	±	+	+
11	+	+	+	+	+	-	-	+	-
12	+	+	+	+	+	±	-	+	±

Примітка. «+» — отримання повного ДНК-профілю при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів;

Примітка. «±» — отримання неповного ДНК-профілю при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів;

Примітка. «-» — повна відсутність продуктів ензиматичної ампліфікації.

Як видно з даних, наведених у таблиці 2, ДНК виділена із біологічних об'єктів — шматочків печінки масою 25,0 мг (n=12), які фіксували в умовах побутового холодильника при температурі 4 °С протягом 12 годин була придатна для генотипування, тобто повний ДНК-профіль при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів був отриманий для 100 % об'єктів.

Збільшення терміну фіксації до 24 годин дає змогу встановити повний ДНК-профіль тільки для трьох об'єктів (25 %) та

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

частковий для п'яти об'єктів (45 %), негативний результат був отриманий для чотирьох об'єктів (30 %).

Визначали якість (автентичність) отриманих ДНК-профілів шляхом проведення порівняльного аналізу ДНК-профілів біологічних об'єктів з ДНК-профілями відповідних зразків контрольної групи для встановлення тотожності за результатами генотипування. Аналізуючи дані, можливо зробити наступні висновки: всі отримані повні ДНК-профілів досліджуваних об'єктів, які піддавалися фіксації в умовах кімнатної температури (22 °С) протягом 0,5 — 9 годин повністю співпадають з ДНК-профілями відповідних об'єктів контрольної групи, тобто було визначено повне співпадіння ДНК-профілів, що вказує на автентичність отриманих ДНК-профілів. Аналогічні результати були отримані при порівняльному аналізі ДНК-профілів досліджуваних об'єктів, які піддавалися фіксації в умовах побутового холодильника протягом 12 годин. При проведенні порівняльного аналізу отриманих неповних ДНК-профілів вищенаведених досліджуваних об'єктів з ДНК-профілями контрольної групи була визначена відсутність алелів для чотирьох «важких» локусів — CSF1PO, D2S1338, D18S51, FGA з 15 досліджених локусів, та встановлений ефект випадіння (хибної гомозиготності) для 6 локусів D7S820, D13S317, D16S539, vWA, TPOX, D5S818. Це вказує на неможливість використання отриманих неповних ДНК-профілів в експертній діяльності, тобто ДНК виділена з біологічних об'єктів, які піддавалися фіксації в умовах кімнатної температури (22 °С) протягом 12 годин, та ДНК виділена з деяких біологічних об'єктів, які піддавалися фіксації в умовах побутового холодильника (4 °С) протягом 24 годин виявилася непридатною для проведення молекулярно-генетичного аналізу при використанні наявного обладнання та наявними методами у повному обсязі.

Висновки.

1. Статистична обробка отриманих результатів проведених досліджень відносно кореляції між температурою та терміном фіксації біологічних об'єктів за допомогою 10 % розчину формаліну та кількісними і якісними характеристиками виділеної ДНК із гістологічних препаратів у вигляді «вологого» архіву, показує достовірну різницю, тобто існує залежність між термі-

ном температурою та терміном фіксації біологічних тканин, які були відібрані під час судово-медичної експертизи трупів.

2. Оптимальний термін фіксації біологічних об'єктів в умовах кімнатної температури (22 °С) за допомогою 10 % розчину формаліну відповідно до кількісних та якісних характеристик ДНК, виділеної із гістологічних препаратів у вигляді «вологого» архіву складає 6 годин, термін фіксації при відповідних обставинах може бути подовжений до 9 годин. Фіксація біологічного матеріалу в умовах побутового холодильника при температурі 4 °С протягом 12 годин є оптимальною для отримання повного ДНК-профілю, але при відповідних обставинах може бути подовжений до 24 годин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Р. Г. Кривда, І. В. Ланцман. Дослідження геномної ДНК, виділеної із гістологічних препаратів, для проведення судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз. Буковинський медичний вісник, Том 17, No 3 (67), ч. 1. — 2013.
2. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги ; пер. с англ. — М. : Мир, 1999. — 558 с.
3. Blow N. (2007) Tissue preparation: Tissue issues. *Nature* 448: 959-963.
4. Díaz-Cano S.J, Brady S.P. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol.* 1997 Dec; 6(6):342-6.
5. Impraim C.C., Saiki R.K., Erlich H.A., Teplitz R. L. Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987 Feb 13;142(3):710-6.
6. Goelz S.E., Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Jul 16;130(1):118-26.
7. Goelz S.E., Hamilton S.R., Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 Jul 16;130(1):118–126.
8. Herrmann B. Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens / B. Herrmann, S. Hummel. — New York ; Berlin : Springer, 1994. — 264 p.
9. Stein A., Raoult D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Sep; 30(9):2462–2466.

Особенности судебно-медицинского исследования геномной ДНК, выделенной из биологических тканей, фиксированных формалином

Р. Г. Кривда

Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

Резюме. Использование молекулярно-генетических методов при проведении судебно-медицинской экспертизы биологического материала в виде «влажного» гистологического архива требует учета определенных требований: подготовка объектов к ДНК-анализу, выделение ДНК, ее амплификация, разделение и анализ продуктов ПЦР. В работе определяли влияние срока и температуры формалиновой фиксации на биологическую ткань печени, для установления степени деградации ДНК, выделенной из этой ткани, и возможного ее использования для получения ДНК-профиля. Показано, что оптимальный срок фиксации биологической ткани в условиях комнатной температуры (22° С) при помощи 10 % раствора формалина составил 6 часов. Фиксация биологического материала в условиях бытового холодильника при температуре 4° С в течение 12 часов является оптимальной для получения полного ДНК-профиля.

Ключевые слова: ПЦР, гистологические препараты, геномная ДНК, фиксированная формалином ткань, судебно-медицинская экспертиза.

Features of forensic medicine investigation of genomic DNA extracted from formalin-fixed biological tissues

R. G. Krivda

Odessa National Medical University, Odessa

Summary. The use of molecular-genetic methods during conducting of forensic medicine examination of biological material in the form of a “wet” histological archive requires consideration of certain requirements such as: preparation of objects for DNA analysis, isolation of DNA, amplification, separation and analysis of PCR products. In this paper we determined the influence of the time and temperature of formalin fixation on the biological tissue of the liver to establish the degree of degradation of the DNA isolated

from this tissue and its possible use for getting of the DNA profile. It was shown that the optimal term for fixation of biological tissue at room temperature (22° C) with a 10 % solution of formalin was 6 hours. The fixation of the biological material in a household refrigerator at a temperature of 4° C. for 12 hours is optimal for obtaining a complete DNA profile.

Key words: PCR, histological preparations, genomic DNA, formalin fixed tissue, forensic medicine examination.

Відомості про автора:

Кривда Руслан Григорович — кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри судової медицини Одеського національного медичного університету. Адреса: м. Одеса, Валіховський провулок, 4, тел.: (048) 723-80-17.

УДК: 616.314-00-085.327:615.874.2:599.323.4

**ВПЛИВ ПРИРОДНИХ МІНЕРАЛЬНИХ ВОД
НА РОЗВИТОК КАРІЄСУ ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ
СИРОВАТКИ ЩУРІВ, ЯКІ УТРИМУВАЛИСЬ
НА КАРІЄСОГЕННІЙ ДІЄТІ**

І. О. Трубка

**Національна медична академія післядипломної освіти
імені П. Л. Шупика, м. Київ**

Вступ. Кальцій відіграє важливу роль у формуванні твердих тканин зубів та тканин пародонту. Основними джерелами природного надходження кальцію в організм людини є їжа та питна вода.

Мета дослідження — оцінити вплив використання природних мінеральних вод на розвиток карієсу та біохімічні показники сироватки у щурів, які утримувались на карієсогенній дієті.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження було проведено впродовж 40 днів за участю 67 щурів місячного віку вагою 50-60 грамів. Тварини розподілені на 6 груп. I група — щури утримувались на раціоні віварія; II — знаходились на карієсогенній дієті (КГД), в III групі — на КГД щури отримували