

© Кривда Р.Г.

УДК: 340.6: 616-076: 577.21

Кривда Р.Г.

Одеський національний медичний університет (Валіховський провулок, 4, м. Одеса, 65083, Україна)

ОСОБЛИВОСТІ СУДОВО-МЕДИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМНОЇ ДНК, ВИДІЛЕНОЇ З БІОЛОГІЧНИХ ТКАНИН, ФІКСОВАНИХ ФОРМАЛІНОМ У ВИГЛЯДІ "ПАРАФІНОВИХ БЛОКІВ"

Резюме. В роботі проаналізовані способи депарафінізації і методи виділення ДНК, а також визначено найбільш ефективний спосіб молекулярно-генетичного дослідження біологічних тканин, фіксованих формаліном у вигляді "парафінових блоків". Показано, що існує залежність між способами депарафінізації біологічних тканин і методами виділення ДНК. Запропонований нами спосіб III депарафінізації та виділення ДНК виявився оптимальним для проведення судово-медичного молекулярно-генетичного дослідження біологічних тканин, фіксованих формаліном у вигляді "парафінових блоків".

Ключові слова: ПЛР, біологічна тканина, фіксована формаліном у "парафінових блоках", депарафінізація, геномна ДНК, судово-медична експертиза.

Вступ

Молекулярно-генетичне дослідження гістологічних препаратів у судово-медичній практиці займає шосте місце серед всіх досліджених біологічних об'єктів, що складає 2,5% від загальної кількості досліджених біологічних об'єктів. Найчастіше судово-медичне молекулярно-генетичне експертне дослідження саме таких об'єктів призначається ухвалами по цивільним справам з метою встановлення біологічного батьківства або встановлення родинних зв'язків, у разі відсутності біологічних зразків від конкретної особи, наприклад, передбачуваного батька. Внаслідок цього в якості біологічних об'єктів у 75% випадків виступає аутопсійний (трупний), у 25% випадків - біопсійний матеріал, якщо особа протягом життя страждала від захворювань, при котрих проводяться діагностичні біопсійні заходи.

Друга задача, яку вирішують при судово-генетичному дослідженні "парафінових блоків" - це встановлення тотожності між гістологічним препаратом та біологічним зразком особи, у випадках коли заявник ставить під сумнів результати саме його гістологічного дослідження, котре проведене в процесі діагностики захворювань, особливо при онкологічних процесах, де має місце активне розмноження клітин пухлини. Таке дослідження проводиться шляхом проведення порівняльного аналізу ДНК-профілю гістологічного препарату з ДНК-профілем зразка особи. Даний вид досліджень зустрічається вкрай рідко, але він існує і може бути вирішений саме таким чином.

Підстави для використання гістологічних препаратів у вигляді "парафінових блоків" в експертній практиці судово-медичних експертів-генетиків наступні: відповідно до Наказу № 6 Міністерства охорони здоров'я України від 17 січня 1995 року про проведення судово-медичних експертиз (досліджень) у відділеннях судово-медичної гістології бюро судово-медичної експертизи відібрані під час проведення судово-медичної експертизи трупів шматочки органів та тканин фіксують у 10% розчині формаліну. Біологічний матеріал у

вигляді шматочки органів та тканин, який зберігається у 10% розчині формаліну, називається "вологим архівом", особливості дослідження якого є одним з етапів нашої роботи. Зі шматочків органів та тканин, які були зафіксовані у 10% розчині формаліну, після їх зневоднення в батареї спиртів висхідної концентрації, ущільнюють заливкою у парафін. Біологічний матеріал у вигляді шматочків органів та тканин у парафіні - це гістологічні препарати у вигляді "парафінових блоків". Об'єкти, залиті у парафіні (чи целоїдині), зберігаються 3 роки в сухому місці у відповідних пакетах з етикетками, де вказують номер аналізу та рік дослідження. Після закінчення вказаного терміну препарати знищують.

Таким чином, у разі відсутності біологічних зразків від конкретної особи, біологічний матеріал у вигляді "парафінових блоків" гістологічного архіву є єдиним придатним об'єктом для проведення порівняльного дослідження та може бути використаний в якості зразків для вирішення питань встановлення біологічної спорідненості або ідентифікації біологічного матеріалу при проведенні судово-медичних експертиз молекулярно-генетичними методами. Аналогічний варіант дослідження використовують для біопсійних препаратів.

Дослідження гістологічних препаратів нами було розпочате у 2013 році. На сьогодні це є етапом науково-дослідної роботи кафедри судової медицини ОН-МедУ (УДК 340.6:616-076:577.21; № держреєстрації 0115U006636) за темою: "Оптимізація проведення судово-медичної експертизи різних біологічних об'єктів з використанням ДНК-аналізу в експертних установах МОЗ України" [1, 2, 3].

Перспективним напрямком науково-дослідної роботи, етапом якої 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 гістологічних препаратів

у вигляді "парафінових блоків", відібраних у процесі проведення біопсій у живих осіб та біологічного матеріалу, відібраного від трупів, під час аутопсій.

Перші спроби використовувати біологічний матеріал людських тканин, фіксованих формальдегідом для молекулярно-генетичних досліджень, були зроблені в медицині для вивчення генетичних захворювань у 1985 році авторами Goelz та Hamilton. Результати дослідження показали, що вихід ДНК за допомогою використаних методів був низьким, на нього впливали термін фіксації та спосіб зберігання [4, 5, 6, 7, 8, 9].

У подальших дослідженнях людських тканин, фіксованих у формаліні та ущільнених у парафіні, з використанням молекулярно-генетичних методів займалися вчені в напрямку клінічної медицини з метою отримання генетичних маркерів для діагностики онкологічних, генетичних та спадкових захворювань та виділення з тканин інфекційних маркерів [10, 11, 12].

Найбільш складною проблемою при проведенні молекулярно-генетичного дослідження біологічного матеріалу у вигляді "парафінових блоків" є етап депарафінізації фіксованих тканин - об'єктів судово-гістологічного дослідження та вибір методики виділення ДНК з цих об'єктів.

Відповідно до літературних джерел процес депарафінізації тканини може бути простим (двоетапним), складним (багатоетапним) і коштовним з використанням комерційних наборів [13, 14].

Розглянемо варіанти етапу депарафінізації фіксованих тканин в залежності від способу та механізму дії, наприклад, із застосуванням хімічних реагентів - органічних розчинників, дія яких направлена на зв'язування парафіну. На практиці використовують наступні речовини: ксилен (ксилол) - це органічна сполука ряду аренів, ізомери складу $C_6H_4(CH_3)_2$, толуол (метилбензол), хлороформ (трихлорометан, CH_3Cl), ацетон (аліфатичний кетон, $(CH_3)_2CO$, метилсаліцилат (метиловий ефір саліцилової кислоти, $C_8H_8O_3$), також можливо використовувати бензол (C_6H_6 , PhH) та бензин. Використання хімічного способу пов'язано з придбанням коштовних хімічних речовин, багато з яких є прекурсорами та в більшості є легкозаймистими та токсичними для людини при інгаляційному потрапленні та потрапленні на шкіру.

Фізичний спосіб базується на властивостях парафіну та дії високої температури, а саме, різні види вживаних парафінів мають різну температуру топлення, котра знаходиться в межах $40-60^{\circ}C$, тобто, для зменшення кількості парафіну у шматочку тканини можна його прогріти в термостаті або мікрохвильовий печі, або прокип'ятити, або обробити паром. Фізичний спосіб найдешевший, при цьому необхідно пам'ятати про негативну термічну дію на клітини досліджених об'єктів.

При дослідженні будь яких гістологічних препаратів необхідно враховувати фактори, які впливають на біо-

логічний матеріал, а саме: використання буферу, дія фіксатору, пенетрація в тканини, об'єм, температура, концентрація фіксатору, термін фіксації і проміжок від моменту відібрання біологічного матеріалу до його фіксації. При дослідженні гістологічних препаратів у вигляді "парафінових блоків" виникає проблема вибору способу депарафінізації і методу виділення ДНК. Вибір способу депарафінізації і метода виділення ДНК залежить від устаткування лабораторії, навичок фахівців-експертів, часу, відведеного на дослідження біологічного матеріалу, кількості та якості біологічного матеріалу. Основними задачами даного етапу є ефективно видалення парафіну та очистка ДНК від білків (гістонів), жирів, вуглеводів та неорганічних домішок і осадження ДНК.

У зв'язку з вищевикладеним, актуальним є систематизація отриманих раніше даних та розробка уніфікованого алгоритму по дослідженню біологічного матеріалу у вигляді "парафінових блоків" за допомогою молекулярно-генетичних методів для підвищення теоретичного та практичного рівня використання ДНК-аналізу при проведенні судово-медичної експертизи даних об'єктів.

Мета роботи - визначення найбільш ефективного способу молекулярно-генетичного дослідження об'єктів судово-гістологічного дослідження у вигляді "парафінових блоків" для встановлення ДНК-профілю та розробка тактики проведення судово-медичної експертизи гістологічних препаратів у вигляді "парафінових блоків".

Матеріали та методи

Для проведення молекулярно-генетичного експериментального дослідження була протестована група гістологічних препаратів - це біологічний матеріал шматочки печінки ($n=12$), розмірами $2,0 \times 2,0 \times 2,0$ см, відібраний від 12 померлих осіб чоловічої та жіночої статі для проведення судово-медичного гістологічного дослідження в межах судово-медичної експертизи трупів відділу СМЕ трупів Одеського обласного бюро СМЕ. Біологічні об'єкти фіксували 10% нейтральним розчином формаліну в умовах кімнатної температури ($22^{\circ}C$) протягом 6 год та аналогічну групу біологічних об'єктів ($n=12$) фіксували за допомогою 10% нейтрального розчину формаліну в умовах побутового холодильника ($4^{\circ}C$) протягом 24 год. Після фіксації 10% розчином формаліну, шматочки об'єктів обезводнювали в батареї спиртів у висхідній міцності, після чого ущільнювали методом заливки в парафін. Об'єкти зашиті у парафін зберігали у сухому місці у пакетах з етикеткою, де вказано номер аналізу. Дана група експериментальних об'єктів є моделлю, яка відображає об'єкти судово-гістологічного дослідження, виготовлені з біологічних тканин трупів.

Контрольну групу (К) біологічних об'єктів - аналогічні шматочки печінки, розмірами $2,0 \times 2,0 \times 2,0$ см,

від тих самих дванадцяти трупів досліджували за допомогою молекулярно-генетичних методів у день відбору матеріалу, через 15 хвилин після отримання матеріалу.

Досліджували три способи депарафінізації і методи виділення ДНК, які на наш погляд відображають основні моменти етапу депарафінізації і виділення ДНК, та якими користуються науковці при дослідженні гістологічних препаратів.

Спосіб I - простий та швидкий спосіб проведення етапу депарафінізації і виділення ДНК, який базується на використанні ксилолу та лізуючого буфера з м'яким детергентом - неіонною поверхнево-активною речовиною ТВІН 20 (TWEEN®20, C58H114O26, SIGMA®), спосіб який був розроблений авторами [15].

Етап депарафінізації: зрізи парафінових блоків товщиною 7,0 мкм і загальною масою 25,0 нг перенесли до стерильних мікроцентрифужних пробірок типу "Еппендорф" об'ємом 1,5 мл та додавали ксилол, інкубували 20 хв. при 60°C, періодично перемішуючи, ксилол зливали, процедуру проводили двічі. Далі до матеріалу додавали 500,0 мкл 96% етанолу для регідратації, інкубували при кімнатній температурі 20 хв., струшували, центрифугували при 3000 об/хв. 1 хв., до матеріалу додавали 1,0 мл дистильованої води та кип'ятили протягом 20 хв.

Етап виділення ДНК: пробірки з матеріалом центрифугували при 3000 об/хв. 1 хв. дистильовану воду зливали, матеріал ресуспендіровали у буфері об'ємом 100,0 мкл, який містив: 50 мМ КСІ, 1,5 мМ MgCl₂, 10 мМ Трис-НСІ, 0,5% ТВІН 20 (рН 9,0 при 25°C) та додавали протеїназу К (20 мг/мл) до кінцевої концентрації 0,1 мг/мл. Інкубували 3 год при 55°C, періодично перемішуючи. Потім проводили інактивацію протеїнази К шляхом кип'ятіння протягом 8 хв.

Спосіб II - складний та тривалий спосіб проведення етапу депарафінізації й виділення ДНК, який базується на використанні ксилолу та лізуючого буфера, до складу якого входить аніонний детергент додецилсульфат натрію (SDS) у концентрації 0,5% і протеолітичний фермент протеїназа К, котрі денатурують білки, внаслідок чого відбувається руйнування мембран клітин і вихід ДНК у розчин. Спосіб який був розроблений авторами [16].

Етап депарафінізації: зрізи парафінових блоків, товщиною 7,0 мкм і загальною масою 25,0 нг, перенесли у стерильні мікроцентрифужні пробірки типу "Еппендорф" об'ємом 1,5 мл та додавали ксилол, інкубували 20 хв. при 60°C, періодично перемішуючи, ксилол зливали, процедуру проводили двічі. Далі до матеріалу додавали 500,0 мкл 96% етанолу для регідратації, інкубували при кімнатній температурі 20 хв., струшували, центрифугували при 3000 об/хв. 1 хв.

Етап виділення ДНК: пробірки з матеріалом центрифугували при 3000 об/хв. 1 хв. дистильовану воду зливали, матеріал ресуспендіровали у буфер об'ємом

1000,0 мкл, який містив: 100 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НСІ, 25 мМ ЕДТА; 0,5% SDS (рН 8,4 при 25°C) та додавали протеїназу К (20 мг/мл) до кінцевої концентрації 0,1 мг/мл. Інкубували 5 діб, при 37°C, періодично перемішуючи. Далі лізат центрифугували при 5000 об/хв. протягом 20 хв., відокремлювали супернатант до стерильної пробірки, додавали такий же об'єм суміші фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт (25:24:1). Протягом 5 сек струшували на вортексі, центрифугували при 12000 об/хв. протягом 5 хв., перенесли водну фазу до стерильної пробірки, додавали такий же об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24:1). Протягом 5 сек. струшували на вортексі, центрифугували при 12000 об/хв. протягом 3 хв., перенесли водну фазу до стерильної пробірки, де проводили осадження ДНК холодним етанолом в присутності 3 М ацетату натрію до кінцевої концентрації 0,3 М, інкубували 60 хв. при -20°C. Пробу центрифугували протягом 2-3 хв. при 12000 об/хв., супернатант видаляли, осад ДНК розчиняли в 50,0 мкл ТЕ. Пробу зберігали при температурі +4°C.

Спосіб III - проведення етапу депарафінізації проводили відповідно до запропонованого нами способу. Видалення парафіну (депарафінізацію) проводили зі шматочків (не зі зрізів) тканини, з використанням фізичного способу, тобто нагріванням в умовах стабілізуючого буфера, до складу якого входить 10 мМ Трис-НСІ, 10 мМ ЕДТА (рН 8,5 при 25°C). Наявність у розчині Трис-НСІ забезпечує буферні властивості розчину до потрібної рН 8,5, що зупиняє активізацію хімічних реакцій окиснення і гідролізу, та дію нуклеаз, а ЕДТА хелатує іони тяжких металів, що запобігає ініціації вільнорадикальних процесів.

Об'єкти дослідження - фіксовані тканини у вигляді парафінових блоків розмірами 1,0x1,0 см за допомогою стерильних скальпелів порізали на шматочки тканини розмірами до 0,2x0,2 см, загальною масою 25,0 нг, які перенесли до мікроцентрифужних пробірок типу "Еппендорф" об'ємом 1,5 мл додали 1,0 мл стабілізуючого буфера (10 мМ Трис-НСІ, 10 мМ ЕДТА (рН 8,5 при 25°C)) та інкубували на термошейкері "Biosan TS-100" протягом 20 хв. у режимі інтенсивного ротаційного перемішування (1000-1200 об/хв.) при температурі 70°C. Після інкубації пробірки зі вмістом швидко охолоджували в умовах кімнатного холодильнику до 4°C протягом двох хвилини. Парафін утворював твердий шар на поверхні, який видаляли за допомогою одноразових пластикових наконечників. Етап депарафінізації проводили двічі, після чого шматочки тканин видаляли та просушували за допомогою стерильних серветок.

Далі проводили попередній етап виділення ДНК. Сутність його полягає в початковій депротейнізації та видалення залишків формаліну, в умовах стабілізуючого буфера з додаванням протеолітичного ферменту протеїнази К, який викликає швидко денатурацію

білків та інактивацію нуклеаз. Для підвищення ефективності депротейнізації (роботи ферменту) до стабілізуючого буферу додавали реагент тіовідновлювач - дітіотрейтол (DTT), який руйнує дісульфідні білкові зв'язки, у кінцевій концентрації до 40 мМ. Для цього висушені шматочки тканин перенесли у мікроцентрифужні пробірки типу "Еппендорф" об'ємом 1,5 мл додали 1,0 мл стабілізуючого буферу (10 мМ Трис-НCl, 10 мМ EDTA (pH 8,5 при 25°C), протеїназу К (20 мг/мл) до кінцевої концентрації 0,1 мг/мл, та дітіотрейтол (1М) до кінцевої концентрації 40 мМ) та інкубували на термошейкері "Biosan TS-100" протягом 180 хв. у режимі інтенсивного ротаційного перемішування (1000-1200 об/хв.) при температурі 60°C. Лізат центрифугували при 14500 об/хв. протягом 1 хвилини, розчин зливали. Шматочки тканин подрібнювали безпосередньо у пробірках за допомогою одноразових пластикових наконечників для забезпечення доступу лізуючих агентів до тканин.

Після проведення попереднього етапу виділення ДНК, процедуру безпосередньої очистки та виділення ДНК з досліджуваних об'єктів проводили за допомогою за допомогою комерційного спеціального набору реагентів "PrepFiler® Forensic DNA Extraction Kit" ("Applied Biosystems", США) для виділення ДНК з криміналістичних зразків, за відповідним рекомендованим виробником протоколом для дослідження біологічного матеріалу.

До пробірок типу "Еппендорф" об'ємом 1,5 мл з подрібненими тканинами об'єктів додали 300,0 мкл лізуючого буферу (PrepFiler™ Lysis buffer), який входить до складу набору, м'яко перемішували та центрифугували протягом 15 секунд при 14500 об/хв. при кімнатній температурі. Переносили пробірки в термошейкер "Biosan TS-100" та інкубували їх протягом 40 хв. у режимі інтенсивного ротаційного перемішування (1000-1200 об/хв.) при температурі 70°C. Далі м'яко перемішували та центрифугували протягом 20 секунд у центрифугу "Вортекс". Далі лізат переносили в нові пробірки які містили фільтрувальні колонки (додаються виробником), закривали кришками та центрифугували протягом 2 хв. при 14500 об/хв. при кімнатній температурі. Фільтрувальні колонки видаляли, до лізату додавали 15,0 мкл магнітних частинок, м'яко перемішували в центрифугу "Вортекс", додавали 200,0 мкл ізопропанолу кімнатної температури. Пробірки поміщали в термошейкер "Biosan TS-100" та інкубували їх протягом 10 хвилин у режимі інтенсивного ротаційного перемішування (1000-1200 об/хв.) при температурі 22°C. Далі вміст пробірок м'яко перемішували та центрифугували протягом 15 секунд при 14500 об/хв. при кімнатній температурі. Пробірки переносили до магнітного штативу та інкубували в ньому протягом 1 хв. безпосередньо в штативі, вміст пробірок відбирали за допомогою дозаторів, після чого додавали відмивочний буфер 300,0 мкл (PrepFiler™

Wash buffer A, додається виробником), перемішували в центрифугу "Вортекс", переносили пробірки до магнітного штативу та додавали 300,0 мкл (PrepFiler™ Wash buffer B, додається виробником), вміст пробірок видаляли, осад з магнітними частинками висушували при кімнатній температурі протягом 15 хв., додавали до кожної пробірки 15,0 мкл елюючого буферу (PrepFiler™ Elution buffer, додається виробником), пробірки інкубували протягом 5 хв. у режимі ротаційного перемішування (1000 об/хв.) при температурі 70°C. Пробірки переносили до магнітного штативу, далі надосадову рідину переносили до нових стерильних пробірок.

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 1хТВЕ буфері (50 мМ Трис-Н3ВО3; 2 мМ Na3ЕДТА; pH 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 рGEM® 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 генотипу 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, 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 алелей проводили відповідно до внутрішнього стандарту довжини GeneScan-600 LIZ Size Standard ("Applied Biosystems", США) та аельного 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 визначали за допомогою комп'ютерної програми Statistica-6. Вірогідною вважали різницю між порівнюваними групами при $p < 0,05$.

Результати. Обговорення

Результати проведеної науково-дослідної роботи по дослідженню експериментальних зразків біологічного матеріалу (шматочків печінки) - об'єктів судово-гістологічного дослідження у вигляді "парафінових блоків" 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.

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°C) протягом 6 год та в умовах побутового холодильника при температурі (4°C) протягом 24 год та досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою трьох способів (I, II, III). Дані про кількість виділеної ДНК (нг) показані в таблиці 1.

Відповідно до даних, наведених у таблиці 1 впливає наступне: статистичні дані показують, що існує достовірна різниця (при $p < 0,001$) відносно способів депарафінізації і методів виділення ДНК з біологічних об'єктів шматочків печінки ($n=12$) у вигляді "парафінових блоків", які фіксували в умовах кімнатної температури та в умовах побутового холодильника.

У кількісному відношенні при фіксації в умовах кімнатної температури протягом 6 годин способом II дає можливість виділити ДНК з досліджених об'єктів у 1,9 рази більше, ніж способом I, використання способу III показує вихід ДНК у 1,5 рази більше ніж способом I. При фіксації об'єктів в умовах побутового холодильника протягом 24 годин в кількісному відношенні способом II дає можливість виділити ДНК з досліджених об'єктів у 1,4 рази більше, ніж способом I, використання способу III показує вихід ДНК у 1,2 рази більше ніж способом I.

Таким чином, використання способу II є найбільш ефективним з точки зору кількості виділяємої ДНК з досліджених об'єктів, внаслідок чого даний спосіб можливо використовувати при наявності у експертів біологічного матеріалу масою до 25,0 мг та значного проміжку часу відведеного на дослідження (в середньому до 7 діб). Спосіб III дає можливість виділити достатню для проведення ПЛР кількість ДНК за невеликий проміжок часу, що продуктивно при обмеженні часу дослідження. Використання способу I не раціонально з кількісних характеристик, та є критичним критерієм при виборі способу дослідження малих кількостей біологічного матеріалу.

У зв'язку з вищевикладеним слід відмітити, що на процес отримання потрібної кількості ДНК, котру виділяють, із досліджених об'єктів, зокрема способу, вагомо впливає термін та температура фіксації біологічних тканин, котрі були відібрані під час судово-медичної експертизи трупів.

II етап. Результати електрофоретич-

Таблиця 1. Кількість ДНК (нг), виділеної із біологічних об'єктів - шматочків печінки ($n=12$), які фіксували за допомогою 10% нейтрального розчину формаліну при кімнатній температурі протягом 6 годин та досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою трьох способів (I, II, III).

№ об'єкту дослідження	К	Температура (22°C), термін фіксації, 6 год.			Температура (4°C), термін фіксації, 24 год.		
		Спосіб I	Спосіб II	Спосіб III	Спосіб I	Спосіб II	Спосіб III
1	1349,0	134,0	276,0	201,0	<5,0	<7,0	<6,0
2	1465,0	151,0	298,0	223,0	<5,0	<7,0	<6,0
3	1500,0	156,0	306,0	230,0	<5,0	<7,0	<6,0
4	1528,0	163,0	315,0	242,0	<5,0	<7,0	<6,0
5	1548,0	167,0	316,0	243,0	<5,0	<7,0	<6,0
6	1553,0	170,0	323,0	253,0	<5,0	<7,0	<6,0
7	1420,0	142,0	290,0	212,0	<5,0	<7,0	<6,0
8	1650,0	183,0	335,0	264,0	<7,0	<9,0	<8,0
9	1605,0	175,0	325,0	254,0	<8,0	<10,0	<9,0
10	1695,0	191,0	343,0	276,0	<7,0	<9,0	<8,0
11	1440,0	149,0	291,0	219,0	<5,0	<7,0	<6,0
12	1505,0				<5,0	<7,0	<6,0
M	1521,5	161,6	310,41	237,0	5,58	7,58	6,58
m	28,33	4,81	5,67	6,37	0,31	0,31	0,31
t	-	-	20,01	9,44	-	4,56	2,28
p	-	-	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,05

Примітки: тут і в подібних таблицях M - середнє арифметичне; m - стандартна похибка, t - критерій Стьюдента.

ного розділення ДНК, виділеної із біологічних об'єктів - шматочків печінки масою 25,0 мг (n=12), які фіксували за допомогою 10% нейтрального розчину формаліну при кімнатній температурі протягом 6 годин та при температурі 4°C протягом 24 год. та досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою трьох способів (I, II, III) демонструють, що при використанні II та III способу виділена ДНК - фрагментована та має молекулярну масу в межах 500 п. н., також візуалізуються фрагменти із меншою масою (від 150 до 450 п.н.). Висновок: спостерігається часткова деградація ДНК клітин досліджуваного матеріалу.

При використанні I способу виділена ДНК фрагментована, має молекулярну масу в межах 250 п.н., у більшій кількості візуалізуються фрагменти з меншою довжиною до 100-150 п.н.

III етап. Визначали придатність ДНК, виділеної з біологічних об'єктів у вигляді "парафінових блоків" методом ПЛР 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°C) протягом 6 годин та в умовах побутового холодильника протягом 24 годин і досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою II і III способів придатна для генотипування, тобто повний ДНК-профіль при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів був отриманий для 100% об'єктів, способи II і III є найбільш ефективними для дослідження таких об'єктів. Спосіб I при тих самих умовах фіксації показав негативні результати типування - профіль ДНК не був отриманий для дев'яти об'єктів, для чотирьох об'єктів (33%) був отриманий лише частковий ДНК - профіль.

IV етап. 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 одержані дані встановлено, що: всі отримані повні ДНК-профілі об'єктів, які піддавали фіксації в умовах кімнатної температури (22°C) протягом 6 го-

Таблиця 2. Результати типування ДНК, виділеної із біологічних об'єктів, які фіксували в умовах кімнатної температури та побутового холодильника та досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою трьох способів (I, II, III).

№ об'єкту дослідження	К	Температура (22°C), термін фіксації, 6 год.			Температура (4°C), термін фіксації, 24 год.		
		Спосіб I	Спосіб II	Спосіб III	Спосіб I	Спосіб II	Спосіб III
1	+	-	+	+	-	+	+
2	+	-	+	+	-	+	+
3	+	-	+	+	-	+	+
4	+	-	+	+	-	+	+
5	+	-	+	+	-	+	+
6	+	-	+	+	-	+	+
7	+	-	+	+	-	+	+
8	+	±	+	+	±	+	+
9	+	±	+	+	±	+	+
10	+	±	+	+	±	+	+
11	+	-	+	+	-	+	+
12	+	-	+	+	-	+	+

Примітка: "+" - отримання повного ДНК-профілю при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів; "±" - отримання неповного ДНК-профілю при типуванні 15 гіперваріабельних STR-локусів; "-" - повна відсутність продуктів ензиматичної ампліфікації.

дин та в умовах кімнатного холодильника протягом 24 годин і досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою II і III способів, цілком співпадають з ДНК-профілями відповідних об'єктів контрольної групи, тобто було визначено повне співпадіння ДНК-профілів, що вказує на автентичність отриманих ДНК-профілів. При проведенні порівняльного аналізу отриманих неповних ДНК-профілів об'єктів, які фіксували в умовах кімнатної температури та побутового холодильника та досліджували у вигляді "парафінових блоків" за допомогою способу I, 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 в експертній діяльності способу I для виділення ДНК з об'єктів судово-гістологічного дослідження, виготовлених з біологічних тканин трупів, внаслідок непридатності виділеної ДНК для проведення молекулярно-генетичного аналізу при використанні наявного обладнання та наявними методиками у повному обсязі.

Висновки та перспективи розробок

1. Статистична обробка отриманих результатів проведених досліджень відносно кореляції між способами депарафінізації та методами виділення ДНК з об'єктів судово-гістологічного дослідження, виготовлених з біологічних тканин трупів у вигляді "парафіно-

вих блоків", показує достовірну різницю, тобто, існує залежність між способами депарафінізації та методами виділення ДНК із вищезазначених препаратів.

2. Розглянутий в роботі спосіб II депарафінізації та метод виділення ДНК з гістологічних препаратів у вигляді "парафінових блоків" є ефективним з точки зору кількісних та якісних характеристик ДНК, але потребує набагато більше часу (більш ніж сім діб). Спосіб III дає можливість виділити достатню для проведення ПЛР кількість придатної для типування ДНК за невеликий проміжок часу, що має істотне значення при обмеженні часу дослідження. Таким чином, запропонований нами спосіб є оптимальним для проведення судово-медичного молекулярно-генетичного дослідження.

3. Використання способу I не є продуктивним з кількісними та якісними характеристиками, та являється критичним критерієм при виборі способу дослідження малих кількостей біологічного матеріалу.

Перспективою подальших досліджень 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", "парафінових блоків", "гістологічних препаратів на скельцях", відібраних у процесі проведення біопсій у живих осіб та біологічного матеріалу, відібраного від трупів під час проведення аутопсій.

Список посилань

1. Орлова О.А., Ланцман І.В. (Ред.) (2012). Використання гістологічних препаратів при проведенні судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз із метою ідентифікації особи і встановлення біологічного батьківства (материнства). Науково-практична конференція з міжнародною участю "Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини". Одеса.
2. Ланцман І.В. (2013). Судово-медичне молекулярно-генетичне дослідження мітохондріальної ДНК біопсійного матеріалу у парафінових блоках. Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених "Молодь - медицині майбутнього". Одеса.
3. Кривда, Р.Г. & Ланцман, І.В. (2013). Дослідження геномної ДНК, виділеної із гістологічних препаратів, для проведення судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз. *Буковинський медичний вісник*, 17(3) (67), ч. 1, 82-83.
4. Goelz, S.E., Hamilton, S.R., & Vogelstein, B. (1985). Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130(1), 118-126.
5. Herrmann, B., & Hummel, S. (1994). Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. New York, Berlin: Springer.
6. D?az-Cano, S.J., & Brady, S.P. (1997). DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: protein digestion as a limiting step for retrieval of high-quality DNA. *Diagn Mol Pathol.*, 6(6):342-6.
7. Impraim C.C., Saiki R.K., Erlich H.A., & Teplitz R.L. (1987). Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 142(3), 710-716.
8. Shibata, D.K., Arnheim, N., & Martin, W.J. (1988). Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*, 167(1), 225-230.
9. Goelz, S.E., Hamilton, S.R., & Vogelstein, B. (1985). Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem Biophys Res Commun.*, 130(1), 118-126.
10. Shibata, D., Martin, W.J., Arnheim, N. (1988). Analysis of DNA sequences in forty-year-old paraffin-embedded thin-tissue sections: a bridge between molecular biology and classical histology. *Cancer Res.* 48(16), 4564-4566.
11. Greer, C.E., Peterson, S.L., Kiviat, N.B., & Manos M.M. (1991). PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am. J. Clin. Pathol.*, 95(2), 117-124.
12. Giannella, C., Zito, F.A., Colonna, F., Paradiso, A., Marzullo, F., Alaibac, M., & Schittulli, F. (1997). Comparison of formalin, ethanol, and Histochoice fixation on the PCR amplification from paraffin-embedded breast cancer tissue. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 35(8), 633-635.
13. Bielawski, K., Zaczek, A., Lisowska, U., Dybikowska, A., Kowalska, A., & Falkiewicz, B. (2001). The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int. J. Mol. Med.*, 8(5), 573-578.
14. Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E.E., Jung, M., Meller, S., & Kristiansen, G. (2013). Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One.*, 8(10).
15. Sepp, R., Szabo, I., Uda, H., & Sakamoto, H. (1994). Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR. *J. Clin. Pathol.*, 47, 318-323.
16. Jackson, D.P., Lewis, F.A., Taylor, G. R., Boylston, A.W., & Quirke, P. (1990). Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.*, 43, 499-504.

Кривда Р.Г.

ОСОБЕННОСТИ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК, ВИДЕЛЕННОЙ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ, ФИКСИРОВАННЫХ ФОРМАЛИНОМ В ВИДЕ "ПАРАФИНОВЫХ БЛОКОВ"

Резюме. В работе проведен анализ способов депарафинизации и методов выделения ДНК и определен наиболее эффективный способ молекулярно-генетического исследования биологических тканей, фиксированных формалином, в виде "парафиновых блоков". Показано, что существует зависимость между способами депарафинизации биологических тканей и методами выделения ДНК. Предложенный нами способ III депарафинизации и выделения ДНК является оптимальным для проведения судебно-медичного молекулярно-генетического исследования биологических тканей, фиксированных формалином, в виде "парафиновых блоков".

Ключевые слова: ПЦР, биологическая ткань фиксированная формалином в "парафиновых блоках", депарафинизация, геномная ДНК, судебно-медицинская экспертиза.

Kryvda R.G.

FEATURES OF FORENSIC-MEDICINE INVESTIGATION OF GENOMIC DNA EXTRACTED FROM FORMALIN FIXED BIOLOGICAL TISSUES IN THE FORM OF "PARAFFIN BLOCKS"

Summary. In the work an analysis of the methods of deparaffinisation and methods of DNA extraction was carried out and it was determined the most effective method of molecular-genetic investigation of formalin fixed biological tissues in the form of "paraffin blocks". It has been shown that there is a relationship between methods of deparaffinisation and DNA extraction methods. The proposed by us method III of the deparaffinisation and extraction of DNA is optimal for conducting forensic-medicine molecular-genetic investigation of formalin fixed biological tissues in the form of "paraffin blocks".

Key words: PCR, formalin fixed biological tissue in the "paraffin blocks", deparaffinisation, genomic DNA, forensic medicine examination.

Рецензент - д.мед.н., проф. Гунас И.В.

Стаття надійшла до редакції 4.07.2017

Кривда Руслан Григорович - к. мед. н., доцент, доцент кафедри судової медицини Одеського національного медичного університету; +38(048)7238017

©Погоріла А.В., Шінкарук-Диковицька М.М., Ходаківський О.А. Черешнюк І.Л.

УДК: 615.216:616.833.16-002.4:577.13

Погоріла А.В.¹, Шінкарук-Диковицька М.М.¹, Ходаківський О.А.^{2,4}, Черешнюк І.Л.^{3,5}

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, кафедра терапевтичної стоматології¹, навчально-науково-дослідна лабораторія з доклінічної оцінки нових лікарських засобів та біологічно-активних сполук "Фармадар"², науково-дослідний центр³, кафедри фармакології⁴, кафедра очних хвороб⁵ (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21018, Україна)

ВПЛИВ АМАНТАДИНУ ГІДРОХЛОРИДУ НА АКТИВНІСТЬ АПОПТОТИЧНИХ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У НИЖНЬОМУ АЛЬВЕОЛЯРНОМУ НЕРВІ КРОЛІВ ІЗ ЙОГО ЯТРОГЕННИМ КОМПРЕСІЙНО-ТОКСИЧНИМ УРАЖЕННЯМ ПРИ ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОМУ ПЛОМБУВАННІ МАТЕРІАЛАМИ "FOREDENT" ТА "АН-PLUS"

Резюме. Використовуючи метод протоково-цитометричного аналізу встановлено факт активації апоптозу та проліферації серед клітин Гасероного вузла при попередній 30-ти денній взаємодії паст "Foredent" або "АН-Plus" з нижньощелепним нервом. Такі деструктивно-дегенеративні зміни верифікувались наростанням пулу клітин, ядерна ДНК яких перебувала у періоді відповідно Sub-G0G1 (апоптоз) та синтетичній фазі S (проліферація). Найбільшою мірою описані феномени відмічались при внесенні у трепанаційний отвір пломбувальної суміші "Foredent", $p < 0,05$. Відсутність нейрональної компресії та токсичного впливу кожної із досліджуваних паст при проведенні кістково-пластичної трепанації нижнього щелепного нерву, жодним чином, вірогідно ($p < 0,05$) не змінило співвідношення клітин у різних фазах клітинного циклу у цитометричній суспензії із Гасероного вузла. Терапевтичне внутрішньошлункове щоденне упродовж 30-ти днів ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву кролів застосування препарату амантадину сульфату дозою 10 мг/кг проявляє нейроцитопротекторну дію на клітини трійчастого вузла.

Ключові слова: амантадину гідрохлорид, апоптоз, нейропротекція, ятрогенне компресійно-токсичне ураження нижнього альвеолярного нерву.

Вступ

Ефективне лікування ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву може бути здійснено при одночасному поєднанні терапевтичних заходів, направлених на його декомпресію, із паралельним застосуванням препаратів нейропротекторної активності. Останнє, є обґрунтованим, оскільки механізм первинного пошкодження структур нервових волокон пов'язаний із формуванням глутамат-кальцієвого каскаду та активацією NMDA-рецепторів нейронів трійчастого нерву (Гасероного вузла), аксони, яких безпосередньо і формують нервовий стовбур. Продукти перекисного окиснення ліпідів, нітрозативного стресу, енергетичного дефіциту та інші фактори,

що активують апоптоз і некроз, шляхом аксонального транспорту, через певний час, вражають нейрони трійчастого нерву. Після локалізації деструктивних явищ на периферії (нерв), у самому Гасероному вузлі активними є, і апоптоз, і некроз [2]. Таким чином відбувається генералізація процесу. На користь такого твердження свідчать результати власних досліджень стосовно вмісту сироваткових нейромаркерів: нейронспецифічної енолази та білку S100 через 30-ть днів після моделювання ятрогенного компресійно-токсичного ураження нижнього альвеолярного нерву у кролів [1]. Обидва показники у тварин контрольної групи залишались достеменно вищими відносно фонових,