

УДК 340.6:616-076:577.21
 © Уманський Д.О., 2012

СУДОВО-МЕДИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ОСОБИ ЗА ДОПОМОГОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМНОЇ ДНК У ЦИТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТАХ, ПРИГОТОВЛЕНИХ З МІКРОСЛІДІВ КРОВІ

Уманський Д.О.

Одеський національний медичний університет; Одеське обласне бюро судово-медичної експертизи

Впровадження в експертну практику судових медиків молекулярно-генетичних методів, які базуються на застосуванні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), зробило можливим досліджувати біологічний матеріал, який містить надзвичайно малу кількість ДНК [1, 2], в тому числі і мікрооб'єкти, які піддавалися дії факторів зовнішнього середовища (хімічних, фізичних, біологічних) та антропогенних факторів (кримінальних, спрямованих на знищення біологічних мікрослідів).

За класифікацією М.Б. Вандера (1978) до мікрочасток відносять різноманітні дрібні тіла, а також невелику кількість речовини та матеріалів, невидимих або слабо видимих за нормальних умов спостереження, для виявлення та дослідження яких необхідні спеціальні технічні засоби та методи [3]. Мікрочастки в сукупності з об'єктами-носіями є мікрослідами, тобто при цьому відбуваються зміни в матеріальних об'єктах, які викликані присутністю мікрочасток.

У більшості випадків здійснення протиправних дій на одязі та взутті злочинців, на предметах, якими наносили пошкодження, залишаються мікросліди крові потерпілої особи, та навпаки – на речах потерпілого залишаються мікросліди крові злочинця. Пошук необхідно проводити в специфічних місцях, а вилучати такі мікросліди потрібно спеціальними способами із використанням спеціальних методик. Найчастіше мікросліди крові локалізуються у тих місцях, які важко відчистити або відіпрати: на швах, клапанах кишень, застібках, під петлями гудзиків, на внутрішній поверхні манжети; на взутті – на рельєфних елементах підошви, внутрішній стороні шнурків, кільцях, пряжках, швах.

Основною і найбільш складною задачею судово-медичних експертів при дослідженні мікрослідів крові є ідентифікація осіб, причетних до скоєння злочину. Для вирішення цього питання і необхідно використовувати нові та сучасні методи ДНК-аналізу.

Метою нашого дослідження було визначення можливості використання ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, які були приготвлені з мікрослідів крові на речових доказах, для ідентифікації особи із застосуванням методу ПЛР.

Нами був запропонований алгоритм спільної взаємодії судово-медичних експертів-цитологів та експертів-генетиків, який дозволив би ефективно досліджувати мікросліди крові на речових доказах, з метою встановлення їх належності конкретній особі.

На нашу думку, це приведе до підвищення ефективності ідентифікаційного дослідження при розслідуванні кримінальних справ, та відкриє можливість використання цитологічних

препаратів як єдиного наявного об'єкту дослідження за допомогою ДНК-аналізу.

Запропонований алгоритм включав наступні етапи: вивчення супровідної документації та обставин справи; огляд, пошук та опис мікрослідів, схожих на кров; вилучення мікросліду; судово-цитологічне дослідження – приготування цитологічних препаратів з вилучених мікрослідів, визначення наявності крові в мікрослідах і встановлення її видової належності, та визначення кількості ядровмістимих клітин в цитологічних препаратах; судово-медичне молекулярно-генетичне дослідження – виділення ДНК з даних клітин у цитологічних препаратах, її ампліфікація та отримання ДНК-профілю з метою ідентифікації особи

Для досягнення мети вирішували наступні **завдання**:

1. Визначали кількість ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, приготвлених з мікрослідів крові, які в подальшому планувалося досліджувати із застосуванням молекулярно-генетичних методів;

2. Визначали мінімальну кількість ядровмістимих клітин у цитологічному препараті, з яких можливо отримати ДНК-профіль за 15 мікросателітними локусами та локусом для визначення статевої належності Amel;

Критеріями ефективності проведення ідентифікаційного дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних методів були:

1. Мінімальна необхідна кількість ядровмістимих клітин, з яких було можливим отримати повний ДНК-профіль;
2. Кількісний вихід ДНК;
3. Придатність виділеної ДНК для аналізу методом ПЛР (можливість отримання продуктів ампліфікації на матриці виділеної ДНК);
4. Відтворюваність результатів дослідження;
5. Тривалість і трудомісткість процедури судово-медичного ідентифікаційного дослідження мікрослідів крові.

Матеріали та методи дослідження

Методи дослідження: стереомікроскопічні, хроматографічні, флюорометричні, метод ПЛР, статистична обробка.

Дослідження виконувалося згідно із запропонованим алгоритмом.

Першим етапом дослідження було ознайомлення із супровідною документацією та вивчення обставин справи. Експертний матеріал було відібрано враховуючи обставини справи та без наявності на речових доказах видимих неозброєним оком слідів крові.

Для дослідження було відібрано 32 речових докази з мікрослідами, схожими на кров, які фігурували у процесі розслідування кримінальних злочинів, спрямованих проти життя та здоров'я особи, серед яких були ножі з пластмасовими та дерев'яними рукоятками, автоматичні складані

ножі, жіночі та чоловічі предмети одягу та взуття.

Наступним етапом був спільний огляд речових доказів судово-медичними експертами-цитологами та експертами-генетиками у косопадаючому прохідному світлі із застосуванням змішаних джерел світла (природного та штучного) для вирішення питання щодо придатності та доцільності відібраних речових доказів для подальшого судово-медичного дослідження. При цьому також використовували стереомікроскопію місць ймовірної локалізації мікрослідів з метою виявлення слідів, які б містили речовину, схожу на кров, із застосуванням стереомікроскопу марки MICROmed модель XS-3320. Після огляду речового доказу детально описували його та об'єкти, фотографували.

Третім етапом було вилучення мікросліду з речовиною, схожою на кров, з речового доказу з урахуванням конструктивних особливостей предмету-носія (розміри, невсмоктуюча або всмоктуюча поверхня).

Змиви проводили стерильним тампоном, який складався з декількох ниток марлі, змоченим у фізіологічному розчині з ножів (в місцях прилягання заклепок та з'єднання клинка та рукоятки, стиків між частинами рукоятки, замків, рельєфних елементів клинка та рукоятки) та металевих деталей одягу. Зіскоби проводили з рельєфних елементів дерев'яних рукояток ножів та рельєфних елементів підосви взуття. Вирізки з об'єктами дослідження проводили з матеріалом предмету-носія.

На наступному етапі змиви, вирізки та зіскоби переносили в пробірки типу «епендорф» об'ємом 1,5 мл і додавали по 1,0 мл ТЕ-буферу, який містив 10 мМ Трис-НСІ, 1мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), рН=9,0. Інкубували в термощейкері «Biosan TS-100» протягом 24 годин в режимі інтенсивного ротаційного перемішування (1000-1200 об/хв) при температурі 18°C.

Залишки предмета-носія видаляли. Пробірки з вмістом центрифугували протягом 5 хв при 1500 об/хв на центрифугі Biosan «Фуґа/вортекс мікро-спін FV-2400». Надосадову рідину видаляли та залишали для визначення наявності крові та її видової належності за допомогою судово-біологічних методів дослідження.

До отриманого осаду додавали 50,0 мкл ТЕ-буферу, вструшували. З одержаної суспензії клітин відбирали 25 мкл для подальшого ідентифікаційного дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних методів та формували таким чином контрольну групу, до складу якої увійшло 32 об'єкти; 25 мкл суспензії клітин направляли у відділення судово-медичної цитології для визначення кількості ядровмістимих клітин, їх придатності для подальшого дослідження з урахуванням структурних характеристик (пошкодження цілісності ядра). Результати дослідження контрольної групи використовували для порівняльного аналізу ефективності виділення, ампліфікації та отримання повного ДНК-профілю з ядровмістимих клітин, які були знайдені у цитологічних препаратах.

Вищевказані етапи дослідження речових доказів виконувались на базі відділення судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз Одеського обласного бюро СМЕ.

Виходячи з того, що в подальшому планувалося проводити ідентифікаційне дослідження цитологічних препаратів із застосуванням молекулярно-генетичних методів, визначення групової належності крові не виконувалося. Визначали в мікрослідах на речових доказах наявність крові і встановлювали її видову належність згідно методичних рекомендацій «Дослідження рідкої крові та її слідів на речових доказах» (Київ, 2010) [4].

Для встановлення наявності крові в мікрослідах застосовували метод тонкошарової горизонтальної хроматографії (її мікробаріанти), який використовується у відділеннях судово-медичної цитології. В усіх об'єктах було виявлено наявність крові.

Для визначення видової належності білка крові застосовували реакцію електропреципітації (РЕП) в мікробаріанті. В результаті дослідження було виявлено, що уся виявлена кров належить людині.

Наступним етапом було приготування цитологічних препаратів з вилучених мікрослідів для визначення кількості ядровмістимих клітин в цих препаратах. Матеріал поміщали в центрифужну пробірку, заливали 1,0 мл фізіологічного розчину та залишали на 18 годин при кімнатній температурі. В подальшому з метою екстракції вміст пробірки центрифугували 5 хв при 1500 об/хв. Надосадову рідину видаляли, а з осаду готували цитологічні препарати у вигляді крапель на предметному склі, підсушували та фіксували розчином ацетону та 70% етанолу. Після фіксації одержаний матеріал фарбували азуроєозиною сумішшю [5].

Після фарбування та висушування препарату облік кількості ядровмістимих клітин у цитологічному препараті проводили на світловому мікроскопі з використанням імерсійного об'єктиву (90х). Після підрахунку була визначена кількість клітин в об'єктах досліджуваної групи. Менше 50 ядровмістимих клітин в полі зору було виявлено в 1 об'єкті, від 50 до 100 ядровмістимих клітин в полі зору – в 8 об'єктах, більше 100 ядровмістимих клітин в полі зору – в 23 об'єктах.

Наступним етапом експериментальної роботи було виділення ДНК з ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах.

Виділення геномної ДНК з цитологічних препаратів, а саме лізис клітинної мембрани та структурних елементів клітин крові проводили безпосередньо на предметному склі із використанням набору «Wizard® Genomic DNA Purification Kit», фірми «Promega Corporation» (США) згідно протоколу «Genomic DNA Isolation» [6].

До кожного експериментального цитологічного препарату, розташованого на предметному склі, який досліджувався, додавали по 250,0 мкл лізуючого нуклеїнового розчину та 60,0 мкл 0,5 М розчину ЕДТА (рН 8.0). Додавали 8,75 мкг 20 мг/мл протеїнази К. Інкубували в термостаті при температурі 56 °С впродовж 20-40 хвилин в чашках Петрі в умовах вологого середовища.

Отриманий осад ДНК розчиняли в 10,0 мкл ДНК-регідратаційного розчину. Зберігали ДНК при температурі +2 - +8 °С.

Для визначення концентрації ДНК використовували флюориметричний метод із застосуванням флюориметра Hoefer DyNA Quant™200 («Hoefer Scientific Instruments», США).

Кількість ДНК, виділена з ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, менше 1,0 нг була визначена в 9 об'єктах досліджуваної групи та 1 об'єкті контрольної групи, більше 1,0 нг – в 23 об'єктах досліджуваної групи та 31 об'єкті контрольної групи.

Виділену ДНК досліджували за допомогою набору для ПЛР-ампліфікації «AmpFISTR® Identifier Plus» («Applied Biosystems», США), з терміном придатності не менш ніж 10 місяців, відповідно до інструкції, яка додається до набору виробниками реагентів [7]. Геному ДНК типували за допомогою методу ПЛР за наступними гіперваріабельними локусами: D8S1179 (хромосома 8), D21S11 (хромосома 21q11.2-q21), D7S820 (хромосома 7q11.21-22), CSF1PO (хромосома 5q33.3-34), D3S1358 (хромосома 3p), TH01 (хромосома 11p15.5), D13S317 (хромосома 13q22-31), D16S539 (хромосома 16q24-qter), D2S1338 (хромосома 2q35-37.1), D19S433 (хромосома 19q12-13.1), vWA (хромосома 12p12-pter), TPOX (хромосома 2p23-2pter), D18S51 (хромосома 18q21.3), AMEL (хромосома X: p22.1-22.3; хромосома Y: p11.2; D5S818 (хромосома 5q21-31), FGA (хромосома 4q28).

При постановці ПЛР здійснювали негативний контроль (реакційна суміш містила всі компоненти, крім ДНК) і позитивний контроль (реакційна суміш містила ДНК із відомим набором алелів за кожним локусом). Зразки контрольної ДНК надані виробником реагентів. Дослідження проводили з використанням системи «Gene Amp® PCR 2720» («Applied Biosystems», США). Кількість циклів реакції збільшували з 28 до 32.

Розділення продуктів ампліфікації проводили з використанням пристрою 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США). Аналіз продуктів ампліфікації з встановленням алелів проводили за допомогою програми «Gene Mapper ID Software Version 3.1».

В контрольній групі з частини клітин в осаді, яка була залишена для порівняльного дослідження молекулярно-генетичним методом, ДНК виділяли згідно з вищеописаними методами [8].

Останнім етапом дослідження було проведення порівняльного генетичного аналізу отриманих характеристик ДНК-профілів об'єктів досліджуваної та контрольної груп для встановлення відтворюваності результатів.

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні контрольної групи необроблених біологічних зразків позитивний результат був одержаний в 97 % випадків (n=31), тобто одержані продукти ампліфікації за всіма 15 мікросателітними локусами та локусом для визначення статеві належності (Amel).

В 3 % випадків (n=1) отримати продукти ампліфікації виявилось можливим за 8 мікросателітними локусами та локусом для визначення статеві належності (Amel), що, ймовірно, можна пояснити недостатньою кількістю генетичного матеріалу, придатного для визначення профілю ДНК використаними методиками в умовах даного експерименту.

В досліджуваній групі фарбованих цитологічних препаратів позитивний результат був одержаний в 72 % випадків (n=23).

В 25 % випадків (n=8) отримані продукти ампліфікації за 8 мікросателітними локусами та локусом для визначення статеві належності (Amel). В 3 % випадків (n=1) продукти ампліфікації виявилось можливим отримати тільки за локусом для визначення статеві належності (Amel). Це було зумовлено недостатньою кількістю генетичного матеріалу, придатного для визначення профілю ДНК використаними методиками в умовах даного експерименту, і втратою клітин при проведенні судово-цитологічних досліджень.

Методика виділення ядровмістимих клітин та їх подальше дослідження є відтворюваними, про що свідчить одержання позитивних результатів в контрольній групі в умовах даного експерименту

Висновки: Запропонований алгоритм дослідження показав можливість використання ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, виготовлених з мікрослідів крові, для проведення ідентифікаційного дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних методів.

Ефективність дослідження ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, виготовлених з мікрослідів крові із використанням вищеописаних алгоритму, методик та устаткування, складає 72%, що в умовах відсутності будь-якого іншого біологічного матеріалу надасть можливість з достатньо високою вірогідністю провести ідентифікаційне дослідження представленого матеріалу.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact / R.A. Wickenheiser // *Forensic Sci.* – 2002. – V. 47(3). – P.442–450;
2. van Oorschot R.A.H. Forensic trace DNA: a review [Електронний ресурс] / van Oorschot R.A.H., Ballantyne K.N., Mitchell R.J./ *Investigative Genetics.* – 2010. – V. 1(14). – Режим доступу до журн.: <http://www.investigativegenetics.com/content/1/1/14>;
3. Загрядская А.П. Судебно-медицинское исследование клеток и тканей / А.П. Загрядская, А.Л. Федоровцев, Е.И. Королева. – М.: Медицина, 1984. – 104 с.;
4. Дослідження рідкої крові та її слідів на речових доказах: метод. рекомендації / уклад.: В.Г. Бурчинський, А.П. Дем'янчук, Т.В. Хохолєва – К.: Видавничо-поліграфічний відділ ЛВЦНТЕІ, 2010. – 33 с.;
5. Судово-цитологічні дослідження мікронакла-

день на знаряддях травми та в піднігтьовому вмісті: інформ. лист. / Головне бюро суд.-мед. експертизи МОЗ України – К., 2004. – 16 л.

6. Протокол для виділення ДНК «Genomic DNA Isolation» набору для виділення ДНК «Wizard® Genomic DNA Purification Kit» («Promega», США). – 2005. – С. 5 – 7;

7. Руководство пользователя набора для ПЦР-амплификации «AmpFISTR® Identifier Plus» («Applied Biosystems», США). – 2010. – С. 44 – 54;

8. Пат. 56521 Україна, МПК (2011.01) А61В 5/00 А61В 10/00 Спосіб ідентифікації особи / Кривда Г. Ф., Кривда Р. Г., Уманський Д.О., Константиновська І.О., Яворський Б.І.; заявник і патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. - № U 201013439; заявл. 12.11.2010; опубл. 10.01.2011, Бюл. № 1. – 3 с.

Уманський Д.О. Судово-медична ідентифікація особи за допомогою дослідження геномної ДНК у цитологічних препаратах, приготуєваних з мікрослідів крові // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 4. – С. 101-104.

У роботі вивчалась можливість використання ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, виготовлених з мікрослідів крові на речових доказах, для ідентифікації особи із застосуванням молекулярно-генетичних методів дослідження. Розроблений алгоритм спільної взаємодії судово-медичних експертів-цитологів та експертів-генетиків, який дозволяє ефективно досліджувати мікрослиди крові на речових доказах з метою встановлення їх належності конкретній особі. Запропоновано нову методику екстракції та лізису ядровмістимих клітин. Показано, що ефективність дослідження ядровмістимих клітин у цитологічних препаратах, приготуєваних з мікрослідів крові, методом ДНК-аналізу склала 72%, що в умовах відсутності будь-якого іншого біологічного матеріалу надасть можливість з достатньо високою вірогідністю провести ідентифікаційне дослідження представленого матеріалу.

Ключові слова: мікрослиди крові, цитологічний препарат, ДНК-ідентифікація, алгоритм проведення ідентифікаційного дослідження

Уманский Д.А. Судебно-медицинская идентификация личности с помощью исследования геномной ДНК в цитологических препаратах, приготуєваних из микроследов крови // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 4. – С. 101-104.

В работе изучалась возможность использования ядродержащих клеток в цитологических препаратах, приготуєваних из микроследов крови на вещественных доказательствах, для идентификации личности с использованием молекулярно-генетических методов исследования. Разработан алгоритм совместного взаимодействия судебно-медицинских экспертов-цитологов и экспертов-генетиков, который позволяет эффективно исследовать микроследы крови на вещественных доказательствах с целью установления их принадлежности конкретному лицу. Предложена новая методика экстракции и лизиса ядродержащих клеток. Показано, что эффективность исследования ядродержащих клеток в цитологических препаратах, приготуєваних из микроследов крови, методом ДНК-анализа составила 72%, что в условиях отсутствия любого другого биологического материала предоставит возможность с достаточно высокой вероятностью провести идентификационное исследование представленного материала.

Ключевые слова: микроследы крови, цитологический препарат, ДНК-идентификация, алгоритм проведения идентификационного исследования.

Umanskiy D.A. Forensic-medical person's identification researching the genomic DNA in cytological specimens, produced from blood microtraces // Український медичний альманах. – 2012. – Том 15, № 4. – С. 101-104.

The possibility of application of nucleus-containing cells in cytological specimens, produced from blood microtraces on the material evidences, was studied for person's identification with molecular-genetic methods. Algorithm of cooperation between forensic medical experts-cytologists and experts-geneticists was developed, what resulted the effective examination of blood microtraces on the material evidences to determine their origin from defined person. New method of nucleus-containing cells extraction and lysis was developed. The effectiveness of nucleus-containing cells examination in cytological specimens, produced from blood microtraces, using DNA-analysis is 72%, what in conditions of absence of any other biological material will give an opportunity to perform the identification of the material on high likelihood level.

Key words: blood microtraces, cytological specimens, DNA-identification, algorithm of identification research.

Надійшла 16.05.2012 р.

Рецензент: проф. І.В.Лоскутова

УДК 340.64:577.213.32:572.2

© Яворський Б.І., 2012

ЕКСПЕРТНА ОЦІНКА ІНДИВІДУАЛІЗУЮЧОЇ ПАНЕЛІ 13 МОНОЛОКУСНИХ СИСТЕМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ, ЯКА ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У ПРАКТИЦІ ОДЕСЬКОГО ОБЛАСНОГО БЮРО СУДОВО-МЕДИЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ Яворський Б.І.

Одеський національний медичний університет

Вступ. Відсутність у законодавчій базі України нормативно-правових документів в частинах регламентації проведення судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз, а також використання молекулярно-генетичних технологій, методик аналізу, тест-систем або наборів для ампліфікації призводить до того, що спеціалісти кожної існуючої лабораторії на території України розробляють та використовують «свою» індивідуалізуючу панель згідно зі своєю матеріально-технічною базою.

У 2009 році співробітниками кафедри судової медицини та медичного законодавства ОНМедУ та експертами Одеського обласного бюро СМЕ була запропонована для використання у судово-медичних молекулярно-генетичних експертних дослідженнях з метою ідентифікації особи кісткової тканини індивідуалізуюча панель яка складається з 13 мікросателітних локусів, представлених тетра-

леотидними повторюваними послідовностями. Панель містить 10 індивідуалізуючих систем виробництва «ТАПОТИЛІ» (ГосНІИгенетика, Росія) – D8S1179, HUMLIPOI, D3S1358, HUMTH01, HUMVWFII, HUMCYAR04, HUMCSF1PO, HUMTPOX, D19S253, PAH-STR, та 3 – виробництва «Promega» (США) – HUMF13B, HUMFES/FPS, HUMF13A. Дана індивідуалізуюча панель до сьогоднішнього дня успішно застосовується при проведенні генетичних експертиз з метою ідентифікації особи та встановлення біологічної спорідненості. При вирішенні такого роду питань доказовість і достовірність висновків прямо залежить від інформативності досліджуваних локусів, яку можливо оцінити на основі популяційних даних про генетичне різноманіття (частоти зустрічаємості алелів). Точність оцінки буде тим вища, чим ближче відповідність популяційних даних і даних по розподілу алелів для індивідуумів, які відносяться до певної популяційної вибірки.