

**Д.О. Уманський, асистент**

*Одеський національний медичний університет*

## **ВИКОРИСТАННЯ ЦИТОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ В ЯКОСТІ ОБ'ЄКТІВ ІДЕНТИФІКАЦІЙНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ**

Розглянуто можливість використання цитологічного препарату в якості об'єкту молекулярно-генетичного дослідження новим способом.

---

---

Однією з найважливіших і найскладніших задач судово-медичної експертизи є отримання даних для всебічної характеристики об'єкту при дослідженні мінімальної кількості біологічного зразка. Впровадження в судово-медичну практику цитологічних методів дослідження дозволило вивчати мікросліди біологічного походження, природу яких раніше не могли визначити через відсутність необхідних адаптованих методик дослідження саме мікрослідів [1]. Морфологічна, видова та статева різноманітності надали можливість диференціювати клітинні елементи різних органів та тканин організму людини, які виявляються на предметах-носіях [2].

Дослідження слідів біологічного походження в цілому залежить від їх розміру та кількості. У випадку виявлення мікрослідів на речових доказах перевага надається судово-цитологічному дослідженню, якість якого залежить від кількості та структурних характеристик клітин (наявності неушкодженого ядра та клітинної оболонки), проведення якого, однак, не дозволяє ідентифікувати особу на достатньому ймовірнісному рівні.

У той же час, перед проведенням судово-медичних досліджень із використанням молекулярно-генетичних методів, які надають можливість провести ідентифікацію особи із ймовірністю на рівні 99,99%, необхідно виконання первинних досліджень для визначення наявності біологічного матеріалу, його видової належності та наявності ядровмісних клітин з метою надання висновку експерта повноти та обґрунтованості відносно об'єкту, з якого виявилось можливим виділити геномну ДНК та провести її подальший аналіз. Крім того, проведення лише молекулярно-генетичних досліджень не завжди виправдано, оскільки при одержанні негативного результату залишається не визначеним питання, чим це може бути викликано: деградацією геномної ДНК,

втратою біологічного матеріалу під час підготовки проб або дослідженням об'єкту, що не походить від людини [3].

Саме тому проведення сучасної ідентифікаційної експертизи за допомогою молекулярно-генетичних методів при дослідженні мікрослідів неможливо без попереднього застосування судово-цитологічних методів. У випадку надзвичайно малого розміру мікросліду, проведення попередніх досліджень вимагає використання всієї кількості наявного матеріалу для відповіді на поставлені перед експертами запитання у повному обсязі, і тому єдиним наявним речовим доказом по справі у таких випадках залишається цитологічний препарат на предметному склі.

Для визначення можливості застосування цитологічних препаратів у якості об'єктів для ідентифікаційного дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних методів були проведені експериментальні дослідження, в якості об'єктів яких виступали цитологічні препарати, виготовлені експериментальним шляхом з мікрослідів крові та пото-жирових виділень. Критеріями ефективності проведення ідентифікаційного дослідження із застосуванням молекулярно-генетичних методів були:

1. Мінімальна необхідна кількість ядровмісних клітин, з яких було можливим отримати “повний” ДНК-профіль, тобто одержання продуктів ампліфікації за 15 мікросателітними локусами та локусом для визначення статевої належності Amel;

2. Кількісний вихід ДНК;

3. Придатність виділеної ДНК для аналізу методом ПЛР (можливість отримання продуктів ампліфікації на матриці виділеної ДНК).

Екстракцію біологічного матеріалу проводили із застосуванням розробленого співробітниками кафедри способу, який передбачає використання спеціального пристрою — термошейкери.

Облік клітин проводили із застосуванням світлового мікроскопу: враховували лише клітини з неушкодженою клітинною оболонкою та наявністю ядра у таких клітинах.

З метою підвищення ефективності ідентифікаційного дослідження була розроблена методика проведення етапу лізису клітинної та ядерної оболонок безпосередньо на предметному склі, яка сприяє мінімізації втрат матеріалу при переносах з пробірки в пробірку. Виділення ДНК проводили з використанням набору “Wizard® Genomic DNA Purification Kit” згідно модифікованого протоколу “Genomic DNA Isolation”.

Вимірювання концентрації виділеної ДНК визначали флюорометричним методом. Оцінювання якості виділеної ДНК не проводили у зв'язку з малою кількістю виділеної ДНК з метою уникнення втрат при проведенні електрофорезу в агарозному гелі.

Виділену геномну ДНК типували методом ПЛР за 15 гіперваріабельними мікросателітними локусами та локусом для визначення статевої належності Amel. Кількість циклів реакції становила 32. Розділення продуктів ампліфікації проводили з використанням пристрою 3130 Genetic Analyzer. Аналіз продуктів ампліфікації з встановленням алелів проводили за допомогою програми “Gene Mapper ID Software Version 3.1”.

Для проведення “позитивної” ідентифікації особи, тобто одержання продуктів ампліфікації за 15 мікросателітними локусами та локусом для визначення статевої належності Amel, із використанням модифікованих методик виділення геномної ДНК з ядромісних клітин, необхідно щонайменше 50 ядромісних клітин в цитологічному препараті.

Як показали результати досліджень, кількісний вихід ДНК із використанням розробленого способу проведення етапу лізису, збільшився на  $30,8 \pm 0,9\%$  у порівнянні зі стандартними способами виділення. Зменшення втрат при виділенні ДНК пов'язано із мінімізацією переносу біологічного матеріалу з пробірки в пробірку за рахунок проведення процедури лізису клітинної мембрани та оболонки ядра безпосередньо на предметному склі.

У роботі Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи існує практика проведення дослідження надзвичайно малих за розмірами мікрослідів біологічного походження, які в подальшому плануються використовувати для ідентифікаційного аналізу молекулярно-генетичними методами, коли наявність, вид та групу не визначають. У таких випадках з метою уникнення неминучих втрат біологічного матеріалу судово-цитологічне дослідження зводиться лише до констатації факту наявності ядромісних клітин, які можна буде дослідити молекулярно-генетичними методами. Це, в свою чергу, підвищує ймовірність “позитивної” ідентифікації особи та ефективність вирішення поставлених судово-слідчими органами завдань перед судово-медичним експертом.

### **Список використаної літератури**

1. *Загрядская А.П.* Судебно-медицинское исследование клеток и тканей / А.П. Загрядская, А.Л. Федоровцев, Е.И. Королева. — М.: Медицина, 1984. — 104 с.

2. *Самищенко С.С.* Судебная медицина: учебник для юридических вузов / С.С. Самищенко. — М.: Юрайт, 2010. — 480 с.
3. *Лапенков М.И.* Комплексный подход к исследованию микроследов человека / М.И. Лапенков, В.Ю. Александрова, А.Ф. Законова // Судебно-медицинская экспертиза. — 2009. — № 2. — С. 18–24.

### **Резюме**

Показана возможность использования цитологического препарата в качестве объекта молекулярно-генетического исследования. Новый способ проведения выделения ДНК из ядросодержащих клеток в цитологических препаратах позволяет увеличить количественный выход ДНК на  $30,8 \pm 0,9\%$  в сравнении со стандартными методиками.

### **Summary**

It was proved, that cytological specimens can be examined using molecular-genetic methods. New developed method of DNA extraction from nuclei-containing cells in cytological specimens, decreases the loss of nuclei-containing cells on  $30,8 \pm 0,9\%$  in comparison with standard methods.

**Б.І. Яворський, судово-медичний експерт**  
**Р.Г. Кривда, канд. мед. наук, доцент, зав. відділенням**

*Одеське обл. бюро судово-медичної експертизи*

## **ЕКСПЕРТНА ОЦІНКА ІНДИВІДУАЛІЗУЮЧОЇ ПАНЕЛІ З 15 МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ, ЯКА ВИКОРИСТОВУЄТЬСЯ У СУДОВО-МЕДИЧНІЙ ПРАКТИЦІ УКРАЇНИ**

Одним з найбільш актуальних напрямків удосконалення роботи судово-медичної служби як в Україні, так і в усьому світі на даний час є підвищення доказових можливостей експертизи, що є можливим завдяки активному впровадженню у експертну практику науково обґрунтованих високотехнологічних методів дослідження. Для судової медицини як однієї з провідних експертних дисциплін переднім краєм науково-дослідницької діяльності можна вважати використання у практиці молекулярно-генетичних методів, серед яких найважливіше місце займає використання мікросателітних локусів геному людини та індивідуалізуючих панелей на їх основі [1].

Але практичне впровадження у судово-медичну повсякденність методів молекулярно-генетичної біології зустрічається з деякими перешкодами, які заслуговують пильної уваги для їх найскорішого усунення.