

СУЧАСНИЙ СТАН ТА ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ІДЕНТИФІКАЦІЙНОГО АНАЛІЗУ

Козань Н.М., Волошинович В.М.

ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Масова міграція населення, локальні збройні конфлікти, техногенні катастрофи призводять до зростання кількості експертиз, спрямованих на ідентифікацію особи [1]. Робота судових медиків у даному напрямку, навіть при використанні сучасних методів ототожнення особи, часто буває утруднена через значні ушкодження чи розчленування тіл загиблих, їх обгорання, а також різко виражені посмертні зміни.

Одним з найефективніших на сьогоднішній день методом ідентифікації особи є молекулярно-генетичний аналіз. У судово-медичній експертній практиці використовується кілька базових технологій молекулярно-генетичного ідентифікаційного аналізу. Спільним для них є дослідження особливих, так званих гіперваріабельних (ГВ) ділянок геномної ДНК людини, які є строго специфічними для кожного індивідуума, і тому можуть слугувати індивідуалізуючими ознаками [2].

Сучасні технології молекулярно-генетичної індивідуалізації відрізняються високою диференціюючою здатністю - завдяки використанню в якості маркерних (діагностичних) елементів високополіморфних генетичних локусів, а також надзвичайно високою чутливістю - завдяки застосуванню процесу ензиматичної ампліфікації молекул ДНК, відомому як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Одним з таких методів є молекулярно-генетичний аналіз, який дозволяє проводити переконливу судово-медичну ідентифікацію при дослідженні речових доказів у випадках вбивств, звалтувань, при встановленні кровної спорідненості, при ексгумації гнилісно змінених трупів невідомих осіб, масових катастрофах коли ідентифікація особи не може бути проведена іншими методами [2,3,4].

Існує кілька варіантів технології проведення досліджень молекули ДНК з метою ідентифікації людини. Один з варіантів заснований на аналізі поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів ДНК (фрагментів, одержуваних шляхом розсічення молекули). Скорочено його називають ПДРФ аналіз і використовують для дослідження рідкої крові. Метод дозволяє порівнювати між собою результати дослідження незмінних молекул ДНК з ядер клітин крові, сперми і будь-яких інших тканин тіла людини. Відомо, що «картинка» розташування ГВ-фрагментів не змінюється протягом усього життя людини, вона індивідуальна, повна схожість «ДНК-візерунків» спостерігається тільки у однояйцевих близнят, а у родичів виявляється схожість генотипових візерунків, що дозволяє встановлювати спорідненість.

Останнім часом розроблений і активно впроваджується в експертну практику метод, що дозволяє проводити дослідження дуже малих кількостей зруйнованих молекул ДНК. Метод заснований на тому, що перед дослідженням ГВ-ділянок наявні фрагменти

ДНК багаторазово копіюються, тим самим нарощуються до необхідного обсягу. Цей метод отримав назву методу ампліфікації (реакції ланцюгової полімеризації, або ПЛР-аналізу). Науково обгрунтоване застосування цього методу в експертизах спірного батьківства стало можливим тільки завдяки проведеному аналізу частоти алелей гіперваріабельних ділянок ДНК для певних популяцій населення [5,6,7].

Роздільна здатність геномної дактилоскопії збільшилася в значній мірі з введенням аналізу мікросателітів - невеликих варіабельних, а значить, специфічних, ділянок ДНК, за допомогою яких типується у невеликі ділянки деградована ДНК. Якщо біологічний об'єкт пролежав кілька місяців (років) у сухих умовах і там збереглися хоча б фрагменти ДНК, то за допомогою мікросателітів можливо ідентифікувати особу. З впровадженням у практику цієї модифікації генотипоскопії було усунуто одну з найбільш істотних перешкод на шляху судово-медичного ототожнення особи - обмеженні матеріалу, придатного для проведення результативного дослідження.

Ще одним сучасним генетичним методом є флуоресцентна гібридизація *in situ*, або метод FISH (англ. Fluorescence *in situ* hybridization - FISH) - цитогенетичний метод, який застосовують для детекції та визначення положення специфічної послідовності ДНК на метафазних хромосомах або в інтерфазних ядрах *in situ* та виявлення специфічних мРНК в зразку тканини. Однак, основним недоліком FISH-методу є його надзвичайно висока вартість та необхідність підготовки фахівців відповідної кваліфікації.

У зв'язку з цим, виникає потреба спрямувати дослідження на пошук нових біомаркерів (генетичних тестів), які б допомогли ідентифікувати генотип людини (а через нього - і фенотип). В даний час існують молекулярно-цитогенетичні методи, які не є дорогими і, поряд з ПЛР, можуть бути використані в судово-медичній практиці для ідентифікації загальних фенотипічних ознак людини. Мова йде про цитоденситометричне дослідження інтерфазного та метафазного гетерохроматину ядер соматичних клітин периферичної крові.

Окрім фундаментальних робіт з організації гетерохроматинових ділянок на молекулярному, субмікроскопічному і мікроскопічному рівнях, їх локалізації в хромосомах людини, є повідомлення про зв'язок колоцентромерного гетерохроматину з розвитком онкологічних процесів [8], серцево-судинної та бронхо-легеневої патології [9], стоматологічних захворювань [10]. Особливим напрямком вивчення стану гетерохроматину є діагностика екологічної безпеки навколишнього середовища [11].

Гетерохроматин - це ділянки нуклеотидних послідовностей, що містять здебільшого нейтральні повтори, а не унікальні білок-кодуєчі гени і мають

високу мінливість. В останні роки проблема дослідження гетерохроматину набуває не тільки теоретичного, але й медико-генетичного значення. Зокрема, висловлюється думка про те, що в гетерохроматині локалізовані гени - регулятори проліферації і клітинного росту, необхідні для нормального розвитку, а також фактори його регуляції [12].

Оскільки робочою одиницею будь-яких проявів фенотипу людини є клітина, життєдіяльність якої визначає клітинний геном і його морфофункціональний субстрат - ДНК, вивчення структури генів та епігенетичної регуляції є вкрай актуальним з точки зору встановлення зв'язку між цитоденситометричними характеристиками гетерохроматину та фенотипічними ознаками людини, що може послужити новим біомаркером (генетичним тестом), який би міг допомогти ідентифікувати генотип людини (а через нього - і фенотип).

Таким чином, цитоденситометричне дослідження клітин периферійної крові є перспективним напрямком молекулярно-генетичного аналізу і може бути запропоноване для подальшої розробки та впровадження в судово-медичну практику як простий у використанні та матеріально необтяжливий метод діагностики генетичного статусу біологічних об'єктів.

Таким чином, цитоденситометричне дослідження клітин периферійної крові є перспективним напрямком молекулярно-генетичного аналізу і може бути запропоноване для подальшої розробки та впровадження в судово-медичну практику як простий у використанні та матеріально необтяжливий метод діагностики генетичного статусу біологічних об'єктів.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Щербаков В. В. Идентификация личности по исходам событий с массовыми человеческими жертвами / В. В. Щербаков, Е. В. Щербакова // Судебно-медицинская экспертиза. - 2012. - № 1. - С. 52-55.
2. Щербакова Е. В. Молекулярная идентификация личности по исходам событий с массовыми человеческими жертвами: новый подход на основе компьютерной обработки данных : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. мед. наук : спец. 14.00.24 "Судебная медицина" / Е. В. Щербакова. - Москва, 2005. - 16 с.
3. Земскова Е. Ю. Изучение аналитических характеристик молекулярно-генетических индивидуализирующих систем в аспекте судебно-экспертного типирования ДНК : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. мед. наук : спец. 14.00.24 "Судебная медицина" / Е. Ю. Земскова. - Москва, 2008. - 18 с.
4. Разработка тест-системы для количественной и качественной оценки содержания ДНК в криминалистических образцах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени / М. И. Лапенков, Н. В. Плахина, Я. И. Алексеев [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. - 2011. - № 2. - С. 34-37.
5. Кривда Г. Ф. ПЛР-анализ молекулярно-генетического полиморфизма людини в судовій медицині : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. мед. наук : спец. 14.01.25 "Судова медицина" / Г. Ф. Кривда. - Київ, 2003. - 32 с.
6. Кривда Р. Г. Идентификация особи в судовій медицині на основі ПЛР-анализу геномної ДНК кісткової тканини : автореф. дис. ... канд. мед. наук : спец. 14.01.25 "Судова медицина" / Р. Г. Кривда. - Київ, 2009. - 20 с.
7. Слепцова Ж. В. Судебно-медицинская идентификация личности с использованием полиморфизма ряда молекулярно-генетических локусов генома человека : автореф. дис. на соиск. науч. степени канд. мед. наук : спец. 14.01.25 "Судебная медицина" / Ж. В. Слепцова. - Барнаул, 2005. - 21 с.
8. Швачко Л. П. Зміни патерну структурного гетерохроматину при онкологічному процесі / Л. П. Швачко // Доповіді Національної академії наук України. - 2009. - № 1. - С. 150.-154.
9. Чернюк Н. В. Зміни цитоденситометричних показників та епігенетичних модифікацій геному під впливом диференційованої терапії хронічного обструктивного захворювання легень, поєданого з артеріальною гіпертензією / Н. В. Чернюк, С. Б. Герашенко, Л. Є. Ковальчук // Галицький лікарський вісник. - 2011. - Т. 18, № 2. - С. 126-129.
10. Палійчук І. В. Цитогенетичні показники функціонального стану геному нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові у хворих на протезні стоматити / І. В. Палійчук, Л. Є. Ковальчук, О. С. Ястребова // Вісник стоматології. - 2010. - № 3. - С. 59.-64.
11. Состояние хроматина клеток человека как цитологический показатель экологической безопасности среды / Ю. Г. Шкробатов, В. Н. Пасога, А. Л. Савенкова [и др.] // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. - 2010. - № 893. - С. 66-69.
12. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina / K. L. Reddy, J. M. Zullo, E. Bertolino [at. al.] // Nature. - 2008. - Vol. 452. - P. 243-247.

Козань Н.М., Волошинович В.М. Сучасний стан та перспективи розвитку молекулярно-генетичного ідентифікаційного аналізу // Український медичний альманах. - 2013. - Том 16, № 1. - С. 78-79.

В статті викладено основні сучасні напрями молекулярно-генетичного аналізу, коротко охарактеризовані методики їх проведення та об'єкти, що підлягають дослідженню. Розглянуто питання пошуку нових біомаркерів (генетичних тестів), які б допомогли ідентифікувати генотип людини, зокрема методу цитоденситометричного дослідження гетерохроматину клітин периферійної крові.

Ключові слова. Ідентифікація особи, молекулярно-генетичний аналіз

Козань Н.Н., Волошинович В.М. Современное состояние и перспективы развития молекулярно-генетических идентификационных анализа // Український медичний альманах. - 2013. - Том 16, № 1. - С. 78-79..

В статье изложены основные современные направления молекулярно-генетического анализа, кратко охарактеризованы методики их проведения и объекты, подлежащие исследованию. Рассмотрены вопросы поиска новых биомаркеров (генетических тестов), которые помогли идентифицировать генотип человека, в частности метода цитоденситометричного исследования гетерохроматина клеток периферической крови.

Ключевые слова. Идентификация личности, молекулярно-генетический анализ.

Kozan N.M., Voloshynovych V.M. The modern state and development prospects of molecular genetic analysis identification // Український медичний альманах. - 2013. - Том 16, № 1. - С. 78-79..

The article presents the basic modern trends of molecular genetic analysis, briefly describes methods of their conduction and objects that are to be investigated. The problem of finding new biomarkers (genetic tests) is analyzed that would help to identify the genotype of human (and through him - and phenotype), including method of cytodensitometric research of heterochromatin peripheral blood cells.

Key words. Identifying persons, molecular genetic analysis