

mal phalanx of I-V toes. Sexual differences especially clearly manifested at the age of 8, 10, 11, 13-15, 17-18, and 20-21 with certainty $P < 0.001$ for values of total thickness of cortical layer of body and at the age 1, 13-16 and 18-21 years with certainty $P < 0.001$ for values of

cortical-diafyzal index. These data should be considered when conducting forensic examinations on establishing sex differences.

Key words. Sex, foot bones, proximal phalanx, roentgenogrammetry.

ОСОБЛИВОСТІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ОБ'ЄКТІВ, ЯКІ МІСТЯТЬ СЛІДОВУ КІЛЬКІСТЬ ДНК

Б. В. Михайличенко, А. М. Біляков, О.В. Дунаєв

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Резюме. У статті розглядаються питання особливостей проведення молекулярно-генетичного дослідження біологічних об'єктів, які містять слідові кількості ДНК. Наведено відомості про пошуку таких об'єктів, їх вилученню, проведенню полімеразно-ланцюгової реакції, а також особливості інтерпретації результатів. Запропоновано використання під час огляду місця події спеціального проєктивного засобу для попередження контамінації зразків сторонньою ДНК.

Ключові слова: біологічні об'єкти, ДНК, слідова кількість, пошук, вилучення, ПЛР, інтерпретація, попередження контамінації.

ВСТУП. Останнім часом у судово-медичній експертній практиці все більшого поширення набувають молекулярно-генетичні дослідження, які мають більший, в порівнянні з судово-імунологічними дослідженнями, потенціал. Їх проведення базується на полімеразно-ланцюговій реакції з використанням мікросателітних ДНК, які ще називаються STR маркерами. Вони мають короткі у межах від 3 до 7 нуклеотидів послідовності, що дає більше шансів провести ДНК дослідження, особливо для зразків, які мають мінімальні її кількості або деградовану ДНК.

Надзвичайно висока чутливість ПЛР *теоретично* дозволяє ампліфікувати та виявити необхідну послідовність нуклеотидів навіть у випадку, якщо вона зустрічається один раз на 100000 клітин. Однак, практично, можливість проведення ПЛР в об'єктах судово-медичної експертизи завжди обмежується кількістю наявного біологічного матеріалу. Тому, зазвичай, ДНК-аналізу підлягають біологічні об'єкти, які мають прийнятну для дослідження кількість клітинного матеріалу з достатнім вмістом ДНК. Встановлено, що для отримання її профілю необхідно не менш, ніж 250-500 нг ДНК, що з урахуванням її втрат під час процедури виділення відповідає наявності близько 50 ядерних клітин.

Однак, трапляються випадки, коли на речових доказах незначного розміру наявний слідовий вміст ДНК у незначній кількості клітинного матеріалу. Поняття «слідова кількість ДНК» відноситься до таких біологічних зразків, які є досить обмеженими у своїх розмірах або невидимі та мають вміст ДНК, який менше за 100 рг. Це стосується, зокрема, слідів крові та слину,

поодинокого волосся, слідів від губ людини, відбитків пальців на різних предметах-носіях (7,8).

Зараз вже розроблено технологію проведення молекулярно-генетичних досліджень, яка дозволяє виявити генетичний профіль ДНК при наявності її слідовою вмісту.

Досить важливим етапом огляду місця події є пошук біологічного об'єкту, на якому може бути присутня ДНК. Вважають, що ідеальним методом для виявлення біологічних слідів є інструментальна детекція. Наприклад, використання джерела ультрафіолетового чи люмінесцентного випромінювання, що дозволяє виявити біологічні об'єкти, наприклад, пальцеві відбитки, нашарування рідин тіла та інші речові докази на різних предметах-носіях. Що ж стосується відбитків пальців рук, то вони являють собою потожирові нашарування, і їх найчастіше під час огляду місця події візуалізують за допомогою дактилоскопічних порошків.

Після виявлення об'єкту, на якому може бути ДНК, проводять її наступне вилучення.

Відбір зразків з поверхонь, де може бути наявна ДНК у мінімальній чи слідовій кількості, проводять шляхом отримання мазків. Для цього використовують вологий марлевий тампон, яким декілька разів протирають із натисканням необхідну поверхню. Однак, вологі марлеві тампони не дозволяють вилучити весь клітинний матеріал. Вважають, що таким чином можливо вилучити лише половину, а то й меншу кількість біологічного об'єкту. У зв'язку із цим рекомендується проведення подвійного вилучення, а саме: спочатку ділянку протирають першим вологим тампоном, а потім цю ж саму поверхню протирають сухим тампоном. В подальшому ці два тампони об'єднують для отримання ДНК. Крім обробки поверхні зволоженим водою тампоном використовують також тампони зволожені 0,01% розчином натрію додецилсульфату чи ізопропанолом (5, 6, 8).

Необхідно враховувати, що із тампону, який виготовлений із бавовни, не вся кількість наявної на ньому ДНК може бути в подальшому вилучена, а також те, що ДНК із вологого тампону вилучається краще, ніж із сухого. Тому рекомендують зразу ж після обробки поверхні-носія ДНК вологим тампоном його заморожувати, а не висушувати. Це дозволяє за умов такого зберігання зразку майже повністю вилучити ДНК.

Крім того, існує можливість вилучення біологічного об'єкту на спеціальну адгезивну плівку (2).

Процедуру виділення ДНК проводять відповідно до вимог діагностичного набору.

Після виділення ДНК із об'єктів проводять її концентрацію з використанням відповідних колонок, що сприяє більш повному отриманню ДНК. Для мінімізації втрат ДНК використовують додаткове введення, наприклад, Poly A RNA або ДНК сперми лосося (8).

Важливим етапом з'ясування профілю ДНК є її ампліфікація, під час якої при діагностиці мінімальних кількостей ДНК застосовують більшу кількість циклів ПЛР, наприклад 34. Крім того, рекомендується дещо змінити процедуру проведення ПЛР, а саме, після 28 циклів ПЛР додають додаткову кількість ТАQ полімерази, а потім проводять ще 6 циклів ПЛР. Такі зміни дозволяють напрацювати необхідну кількість матеріалу для подальшого аналізу (3). Крім того, зараз вже розроблено регламенти проведення досліджень та розроблено діагностичні набори, за допомогою яких можливо з'ясувати профіль із 17 локусів ДНК, кількість якої становить 60 pg.

Важливою особливістю аналізу біологічних об'єктів із слідовою кількістю ДНК є суворе попередження контамінації. Оскільки під час ампліфікації таких об'єктів можливе випадіння одного із алелів у гетерозиготному локусі або поява алеля (алелів), яка обумовлена контамінацією, необхідне застосування спеціального підходу до інтерпретації результатів, при якому отриманий профіль ДНК має інтерпретуватися з точки зору можливої контамінації. Такий зразок може вміщувати фонову кількість ДНК, внесена під час скоєння злочину ДНК та контаміновану ДНК, яка потрапила вже після події.

Враховуючи наведене, рекомендується застосовувати низку заходів з попередження контамінації. Так, біологічні об'єкти, які можуть бути використані для виявлення ДНК, необхідно під час огляду місця події якнайшвидше відмежувати від зовнішнього середовища. Для цього нами рекомендовано використовувати спеціальну поліетиленову плівку, яка безпосередньо не контактує з об'єктом дослідження та дозволяє уникнути контамінації зразку сторонньою ДНК і дещо відстрочити процедуру вилучення зразка з об'єкта-носія.

Досить важливим аспектом ДНК-досліджень являється інтерпретація результатів ПЛР (1, 4). Причому, оцінка результатів профілю ДНК зі слідової її кількості потребує іншого підходу. Встановлено, що при ампліфікації 250 пг ДНК, що відповідає приблизно 35 ядерним соматичним клітинам, не завжди можливо отримати якісний профіль ДНК. Це пов'язане з тим, що оцінити піки алелів можливо тільки тоді, коли їх інтенсивність складає не менше 150 RFU (Relative Fluoresc. Unit). При ампліфікації

125 пг ДНК та менше висота піків наближається до фоновому рівня шумів приладу і становить близько 50 RFU. Тому рекомендований поріг і складає 250 пг ДНК.

Дослідження менш, ніж 100 пг ДНК, має назву Low Copy Number (LCN). За рекомендаціями провідних країн оцінка результату має ґрунтуватися на двох окремих ампліфікаціях такого об'єкту, а для США - на трьох. Причому, в кожній ампліфікації мають бути виявлені однакові алелі, а для США - однакові алелі в 2-х із 3 проведених паралельних ампліфікаціях.

Таким чином, проведення ДНК-дослідження біологічних об'єктів, в яких наявна слідова кількість ДНК, потребує врахування низки особливостей, які стосуються пошуку біологічного об'єкту з його візуалізацією, використання заходів для суворого попередження контамінації, вилучення зразку та самої ДНК, проведення ПЛР та інтерпретації її результатів. Тільки дотримання вказаних особливостей забезпечує доказове виявлення профілю ДНК у біологічних об'єктах, в яких наявна слідова її кількість.

Література

1. **Balding D.J.** Interpreting low template DNA profiles / D.J. Balding, J. Buckleton // *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2009 – V.4.- P.1-10.
2. **Barash M.** The use of adhesive tape for recovery of DNA from crime scene items / M. Barash, A. Reshef, P. Brauner // *J. Forensic Sci*, 2010 – V. 55- 1058-1064.
3. **Foster L.** Direct comparison of post-28 –cycle PCR purification and modified capillary electrophoresis methods with the 34-cycle “low-copy-number (LCN) method for analysis of trace forensic DNA samples / Foster L., Thomson J., Kutanov S. // *Forensic Sci. Int. Genet.*, 2008 – V.2.- P.318-328.
4. **Gill P.** An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA / P. Gill, J. Whitaker, C. Flaxman, N. Brown, J. Buckleton // *Forensic Sci Internat.*, 2000 – V.112. – P. 17-40.
5. **Van Oorschot RAH.** Improving collection methods can improve the ability to obtain typing from trace amounts of DNA from touched objects / Van Oorschot RAH, R.A. Schulz, N.L. Holding, M. Cummins, D. Phelan, R.J. Mitchell // *The XIX Congress of Genetics*, 2003 – Proceedings. – 324 p.
6. **Pang BCM, Cheung BKK.** Double swab technique for collecting touched evidence // *Legal Med*, 2007 – V.9 – P.181-184.
7. **Raymond J.J.** A criminalistic Approach to biological evidence: trace DNA and volume crime offences / J.J. Raymond // *Sydney*, 2010, 266 P.
8. **Roland A.H.** van Oorschot Forensic trace DNA: a review / A.H. Roland van Oorschot, N.Kaye Ballantine, R. John Mitchel // *Investigative Genetics*, 2010. – 1:14 doi:1186/2041-2223-1-14.

**ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ
ОБЪЕКТОВ, КОТОРЫЕ СОДЕРЖАТ СЛЕДОВОЕ КОЛИЧЕСТВО ДНК**

Михайличенко Б.В., Биляков А.М.

Резюме. В статье рассматриваются вопросы особенностей проведения молекулярно-генетического исследования биологических объектов, в которых присутствует следовое количество ДНК. Представлены сведения по обнаружению, изъятию, проведению полимеразно-цепной реакции, а также особенности интерпретации результатов.

Предложено использование во время осмотра места происшествия специального протективного средства для предупреждения контаминации образцов посторонней ДНК.

Ключевые слова: биологические объекты, ДНК, следовое количество, обнаружение, изъятие, ПЦР, интерпретация, предупреждение контаминации.

**PECULIARITIES OF MOLECULAR-GENETIC INVESTIGATION OF BIOLOGICAL
OBJECTS WITH TRACE AMOUNT OF DNA**

Mykhailychenko B.V., Biliakov A. M.

Summary. Main peculiarities of molecular-genetic investigation of biologic objects in forensic medical material with a trace amount of DNA are observed: targeting, sampling, improving amplification in PCR and interpretation. The special protective agent to prevent

contamination of biological objects by foreign DNA that can be used during inspection of a scene is proposed.

Key words: biological objects, DNA, trace amount, targeting, sampling, PCR, interpretation, prevention of contamination.