

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ім. П. Л. ШУПИКА**

КРИВДА РУСЛАН ГРИГОРОВИЧ

УДК 340.64:577.213.32:572.2

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ОСОБИ
В СУДОВІЙ МЕДИЦИНІ НА ОСНОВІ
ПЛР-АНАЛІЗУ ГЕНОМНОЇ ДНК
КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**

14.01.25 — судова медицина

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук**

Київ — 2009

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі судової медицини і медичного законодавства Одеського державного медичного університету МОЗ України і в Центрі судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи Управління охорони здоров'я та медицини катастроф Одеської обласної державної адміністрації.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Михайличенко Борис Валентинович,
Національний медичний університет
імені О. О. Богомольця МОЗ України,
завідувач кафедри судової медицини

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Дідковська Софія Петрівна,
Київський університет туризму, економіки
і права МОН України, професор кафедри
кримінально-правових дисциплін
кандидат медичних наук
Войченко Валерій Володимирович,
начальник бюро судово-медичної експертизи
Управління охорони здоров'я
Дніпропетровської обласної адміністрації

Захист відбудеться «25» вересня 2009 р. о 12 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.613.03 при Національній медичній академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України за адресою: 04112, м. Київ, вул. Оранжерейна, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національної медичної академії післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України за адресою: 04112, м. Київ, вул. Дорогожицька, 9.

Автореферат розісланий «20» серпня 2009 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради,
кандидат медичних наук

Г. А. Зарицький

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність роботи. Одним із важливих завдань судово-медичної експертизи є ідентифікація особи невіданих, гнильно змінених, скелетованих, розчленованих трупів, а також кісткових залишків окремих частин тіла (Томилин В. В., 1999; Дідковська С. П., Сагайдак П. Г., 2004).

У судово-імунологічній ідентифікаційній експертизі застосовуються традиційні методи, що базуються на дослідженні біохімічних маркерів, які виступають у ролі індивідуальних ознак людини. До таких методів належить визначення антигенних характеристик крові та тканин організму, а також ізоформ деяких ферментів. Індивідуалізуючі можливості маркерних систем залежать від їхньої поліморфності, тобто ступеня варіабельності та кількості варіантів у популяції. Наприклад, деякі біологічні характеристики, що виявляються серологічними маркерами — еритроцитарними антигенами системи АВ0, трапляються у кожного третього або четвертого індивідуума, тобто вірогідність випадкового збігу ознак у різних людей велика, і така система характеризується низьким індивідуалізуючим потенціалом (Иванов П. Л., 2003).

Ефективність розв'язання судово-медичних експертних завдань з ідентифікації особи може бути підвищена при використанні нових технологій, пов'язаних із вивченням молекулярно-генетичного поліморфізму. Молекулярно-генетичний аналіз дозволяє дослідити особливі ділянки ДНК і одержати практично унікальний генетичний «паспорт» для кожного індивідуума. Індивідуалізуючі ознаки, що визначаються на рівні ДНК, характеризуються стійкістю, зберігаються незмінними й тотожними в усіх клітинах і тканинах організму, а головне — у біологічних слідах. Типування ДНК є одним із найбільш доказових методів аналізу біологічного матеріалу при виконанні судово-медичної ідентифікаційної експертизи (Войченко В. В., Мішалов В. Д., 2008).

Визначальним моментом при проведенні молекулярно-генетичних досліджень з ідентифікації особи є характеристика початкового (постмортального) біологічного матеріалу. Як правило, більша частина об'єктів дослідження має виражені деструктивні зміни внаслідок впливу бактеріальної мікрофлори, а також різних фізичних (висока температура, УФ-опромінення), хімічних (кислоти, луги) факторів, несприятливих умов зовнішнього середовища (вологість, температура, зміна значень рН), через що не може бути використана при дослідженні. За цих умов оптимальним і часто єдиним можливим є дослідження таких біологічних об'єктів, як кістки скелета людини (Шупик Ю. П., Хоменок Т. О., 2004; Кривда Р. Г., Кривда Г. Ф., Сиволап Ю. М., 2002).

Кісткова тканина відносно стійка у зовнішньому середовищі, що визначається її будовою, деполімеризація ДНК в остеокитах відбувається пізніше, ніж у м'яких тканинах і рідинах тіла людини. Кісткова тканина містить достатню кількість ДНК для молекулярно-генетичної ідентифікації.

Сьогодні при проведенні судово-медичної молекулярно-генетичної ідентифікації застосовується чутливий і специфічний метод аналізу варіабельності ДНК, який базується на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) (Mullis K. B., 1994; Innis M. A. et al., 1995).

Дослідження складається з таких етапів: виділення геномної ДНК із біологічного об'єкта, ампліфікація і подальший аналіз гіперваріабельних ділянок ДНК, які суто специфічні для кожного індивідуума і можуть служити ознаками, що індивідуалізують особу (Jeffreys A. J. et al., 1988; Гыске Л. И., Иванов П. Л., 1995; Перепечина И. О. и др., 1993).

Висока чутливість ПЛР-аналізу висуває жорсткі вимоги до правил вилучення і зберігання біологічного матеріалу. Особливу увагу слід приділяти методам екстракції та очищення ДНК. Методи виділення геномної ДНК із кісткової тканини описані у деяких вітчизняних і зарубіжних публікаціях, проте у практичному використанні дані методи малоефективні, не дозволяють виділити ДНК для якісного проведення судово-медичного ідентифікаційного дослідження методом ПЛР. На практиці виникає необхідність індивідуально обирати методіку залежно від виду об'єкта (губчасті або трубчасті кістки) і його стану (Кривда Р. Г., 2007). Існуючі методи виділення ДНК із кісткової тканини є стандартними і не розраховані на змінені «проблемні» об'єкти дослідження, тому застосування одних і тих самих методів екстракції ДНК без урахування специфіки біологічного матеріалу не дозволяє одержати препарати, що відповідають усім умовам якісної експертизи. Це зумовлює необхідність вдосконалення базових методів виділення геномної ДНК із кісткової тканини, зокрема для дослідження об'єктів, що зазнали дії агресивних факторів зовнішнього середовища (часових, фізичних). Необхідною є оптимізація ключових моментів проведення ПЛР, матрицею в якій є ДНК, часто виділена з «проблемних» кісткових об'єктів, отже, у деградованому стані й у незначній кількості (Akane A., Matsubara K., Nakamura H., 1994; DeFranchis R., Cross C. P., Foulkes N. S., Cox T. M., 1988).

Отже, актуальність дисертаційного дослідження зумовлена необхідністю вдосконалення базових методів виділення геномної ДНК із кісткової тканини, зокрема для дослідження об'єктів, що піддалися дії агресивних факторів зовнішнього середовища (часових, фізичних), а також необхідною є оптимізація ключових моментів проведення ПЛР, матрицею в якій є ДНК кісткових об'єктів у деградованому стані й у незначній кількості.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Проведені дослідження є частиною науково-дослідної роботи кафедри судової медицини і медичного законодавства Одеського державного медичного університету за темою «Розробка методик виділення ДНК із кісткової тканини різного стану і давності з метою ідентифікації особи шляхом типування методом ПЛР» (№ держреєстрації 0105U008873). Дисертант є одним із виконавців основних розділів даної науково-дослідної роботи.

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи є розробка основних методологічних аспектів судово-медичної молекулярно-генетичної

ідентифікації особи за допомогою ПЛР-типування геномної ДНК кісткової тканини.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити такі завдання:

1. Провести порівняльний аналіз ефективності основних широко використовуваних методів виділення геномної ДНК із кісткової тканини.

2. Розробити модифікації основних етапів виділення геномної ДНК із кісткової тканини та її ПЛР-типування.

3. Оцінити ефективність запропонованих модифікованих методик для молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження кісткових об'єктів, узятих від гнильно змінених, ексгумованих, скелетованих, підданих дії високих температур трупів.

4. Розробити методичні рекомендації з відбору та зберігання кісткових об'єктів.

5. Скласти алгоритм проведення судово-медичного молекулярно-генетичного дослідження з метою ідентифікації особи за кістковими залишками.

Об'єкт дослідження: молекулярно-генетична ідентифікація особи у судовій медицині.

Предмет дослідження: виділення і ПЛР-типування геномної ДНК кісткової тканини.

Методи дослідження: молекулярно-генетичні: методики виділення геномної ДНК із кісткової тканини, які застосовуються у прикладних судово-медичних дослідженнях; метод ампліфікації геномної ДНК із застосуванням ПЛР; електрофоретичні методи; методи статистичної обробки і комп'ютерного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблені методологічні аспекти судово-медичного молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження, об'єктом якого є кісткова тканина різного структурного типу і ступеня збереження.

Вперше запропоновано модифікації основних етапів виділення геномної ДНК із кісткової тканини та її типування за допомогою ПЛР.

Вперше визначено найоптимальніші для проведення молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження кісткові об'єкти.

Доведено ефективність запропонованих методичних розробок для дослідження кісток, узятих від гнильно змінених, ексгумованих, скелетованих, підданих дії високих температур трупів. Складено рекомендації для практичного використання результатів дослідження при проведенні судово-медичного ідентифікаційного дослідження.

За результатами проведених досліджень отримано 2 деклараційні патенти України на винахід «Спосіб ідентифікації особи», в основу яких покладено завдання вдосконалення способу ідентифікації особи шляхом виділення ДНК із кісткової тканини, що є етапом геномної дактилоскопії методом ПЛР. Запропоновані способи ідентифікації особи передбачають: оптимізацію етапів виділення ДНК, поєднання механічного впливу та хімічних агентів на кісткову тканину, за рахунок чого збільшується поверхня взаємодії часток

тканини і лізуючих агентів, у результаті чого відбувається повний лізис тканин, з оптимальною щільністю хімічних агентів для лізису кісткової тканини і осадження ДНК.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані під час досліджень наукові результати дозволяють проводити судово-медичне молекулярно-генетичне ідентифікаційне дослідження, об'єктом якого є кісткова тканина різного структурного типу і ступеня збереження, й отримувати об'єктивні та науково обґрунтовані дані. Дотримання рекомендованого алгоритму дослідження забезпечує досягнення максимально повного розв'язання задач з ідентифікації особи за кістковими залишками. Одержані результати вперше дали змогу проводити дослідження кісток, узятих від гнильно змінених, ексгумованих, скелетованих, підданих дії високих температур трупів.

Розроблені модифіковані методики виділення ДНК з кісткової тканини і її ПЛР-типування були використані при проведенні на сучасному рівні більш ніж 156 судово-медичних досліджень в Одеському обласному бюро судово-медичної експертизи на підставі постанов, ухвал, направлень органів МВС, прокуратур і судів Донецької, Дніпропетровської, Закарпатської, Миколаївської, Одеської, Херсонської, Черкаської, Чернівецької областей України протягом 2003–2008 рр.

Модифіковані методики виділення ДНК із кісткової тканини і її ПЛР-типування використовуються у практиці відділень судово-медичної імунології Одеського, Дніпропетровського і Луганського обласних бюро судово-медичної експертизи з метою ідентифікації особи невпізнаних, гнильно змінених, скелетованих, розчленованих трупів, а також кісткових залишків і окремих частин тіла.

Дані досліджень і зібраний матеріал, опублікований у дисертації, використовуються у курсі лекцій та практичних занять на кафедрі судової медицини і медичного законодавства Одеського державного медичного університету для підготовки курсантів за фахом «Судово-медична імунологія» та «Судово-медична цитологія», а також у Національній медичній академії післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, Дніпропетровській державній медичній академії та Луганському державному медичному університеті.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто виконана вся експериментальна частина роботи. Вперше в Україні проведено молекулярно-генетичні дослідження кісткових об'єктів, узятих від гнильно змінених, ексгумованих, скелетованих, підданих дії високих температур трупів. Проаналізовано одержані дані та сформульовано висновки. Здобувач особисто провів пошук тематичної наукової літератури. Спільно з науковим керівником проф. Б. В. Михайличенком сформульовані мета і завдання роботи, розроблена стратегія проведення дослідження, обговорено одержаний фактичний матеріал.

Особисто автором розроблені протоколи досліджень, карти експериментальних і експертних спостережень, проведено відбір біоматеріалу, його подальше дослідження, статистична обробка, узагальнення отриманих результатів дослідження.

Автором написані всі розділи дисертаційної роботи, викладені основні наукові положення, сформульовані висновки та практичні рекомендації.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися на семінарі-наradі «Впровадження ДНК-аналізу в судово-медичну практику» (Одеса, 2002); на міжнародній науково-практичній конференції молодих учених «Вчені майбутнього» (Одеса, 14–16 жовтня 2003); на міжнародній науково-практичній конференції судових медиків, присвяченій 165-річчю кафедри судової медицини з післядипломною підготовкою Одеського державного медичного університету і 85-річчю заснування Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи (Одеса, 7–8 червня 2007); на IV Міжнародному конгресі з інтегративної антропології (Вінниця, 4–6 жовтня 2007); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Вчені майбутнього» (Одеса, 15–16 жовтня 2007); на засіданнях вченої ради медичного факультету № 2 Одеського державного медичного університету; на спільному засіданні кафедри судової медицини і медичного законодавства Одеського державного медичного університету та медичної наради Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 14 робіт, з яких: дві монографії (у співавторстві), 5 статей у фахових виданнях, затверджених ВАК України, з яких 3 індивідуальні, 5 тез наукових конференцій і конгресів, отримано 2 деклараційні патенти України на винахід.

Структура дисертації. Текст дисертаційної роботи викладено на 171 сторінці комп'ютерного друку, він складається з 6 розділів: вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, трьох розділів експериментальних досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури.

Дисертація містить 27 таблиць, 39 рисунків. Список джерел літератури налічує 290 позицій. Бібліографічний опис джерел літератури викладений на 27 сторінках і містить 161 позицію кирилицею та 129 — латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Під час виконання даної роботи матеріалом для дослідження служили фрагменти діафізів та епіфізів довгих трубчастих кісток (стегнових, великогомілкових, плечових), а також фрагменти ребер від трупів невідомих осіб чоловічої та жіночої статі віком від 20 до 65 років. Матеріал був отриманий із відділу судово-медичного дослідження трупів, судово-медичного імунологічного та медико-криміналістичного відділень Одеського обласного бюро СМЕ. Усього досліджено 72 кісткові об'єкти.

Підготовку об'єктів до дослідження здійснювали відповідно до рекомендацій (Корниенко И. В., Водолажский Д. И., Вейко В. П. и др., 2001).

Використовували такі способи руйнування кісткової тканини і види обладнання. Для руйнування кісткової тканини й отримання кісткового порошку застосовували: напилки з різними за розміром абразивами — дрібним

(бархатним), середнім і крупним; пилку з металевим полотном; стоматологічний бор; абразивну речовину (порошок скла); ультразвук.

Для виділення ДНК із компактної та губчастої речовин кісткової тканини використовували чотири протоколи: протокол I (автори Новоселов В. П., Шаронова Д. А., 1999), протокол II (Hoss M., Raabo S., 1993), протокол III (Walsh S. P., Metzger D. A., Higuchi R., 1991), протокол IV (Кривда Г. Ф., Кривда Р. Г., 2005). Вдосконалені нами модифіковані методи виділення ДНК із кісткової тканини викладені в експериментальному розділі.

Вимірювали концентрацію виділеної ДНК у 1x TNE у присутності інтеркалюючого барвника Hoechst 33258 (10 мг/мл) за допомогою флюориметра Hoefer DyNA Quant™ 200 ("Hoefer Scientific Instruments", США).

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 1xTBE буфері (50 мМ трис-Н₃ВО₃; 2 мМ Na₃ЕДТА; рН 8,0) в 1%-му агарозному гелі з додаванням бромистого етидію до кінцевої концентрації 0,5 мкг/мл.

Для оцінки придатності виділеної ДНК проводили її типування за локусом для визначення статевої належності Amel (Xp22.3–p22.1, Yp11) за допомогою ПЛР. Ампліфікацію ДНК здійснювали на термоциклері "MJ Research PTC-200" (США). Для ампліфікації ДНК використовували набори реагентів виробництва «ТАПОТИЛИ» (Державний науковий центр Російської Федерації «РосНИИгенетика», Росія) і "Promega" (США). Панель мікросателітних локусів: HUMTPOX (хромосома 2p23-pter), HUMD3S1358 (хромосома 3p21.3), HUMCSF1PO (хромосома 5q33.3-q34), HUMLIPOL (хромосома 8p22), HUMD8S1179 (хромосома 8q24.1-q24.2), HUMTH01 (хромосома 11p15.5), HUMvWFII (хромосома 12p13.3), HUMPAH (хромосома 12q22–q22.4), HUMCYAR04 (хромосома 15q21.1), HUMD16S539 (хромосома 16q24-qter), HUMD19S253 (хромосома 19p13.1), HUMF13B (хромосома 1q31-q32.1), HUMF13A (хромосома 6p24.3-p25/1), HUMFESFPS (хромосома 15q25-qter). Набори реагентів містили 10xПЛР буфери, суміші праймерів, Taq-полімерази, деіонізовану воду, розчин контрольної ДНК. Їх використовували відповідно до інструкцій виробників. Для ПЛР використовували до 100 нг виділеної ДНК.

Ампліфіковані фрагменти виділеної ДНК розділяли (фракціонували) методом вертикального електрофорезу в скляних пластинах у 10%-х денатуруючих поліакриламідних гелях. Використовували прилад для вертикального електрофорезу моделі "VE-3M" (ТОВ «Хеликон», Москва, Росія). Електрофорез здійснювали протягом 2,5–3,5 год при напрузі постійного струму 550 В у 1xTBE буфері (50 мМ трис-Н₃ВО₃; 2 мМ Na₃ЕДТА; рН 8,0).

Фрагменти ДНК, розділені у поліакриламідних гелях, забарвлювали нітратом срібла згідно з методичними рекомендаціями "DNA Silver Staining System for Technical Manual" ("Promega", США).

Статистичну обробку одержаних даних для визначення основних статистичних показників для характеристики сукупності проводили за рекомендаціями (Рокицкий П. Ф., 1974; Серенко А. Ф., Ермакова В. В., 1984).

Для порівняльного аналізу методів виділення ДНК із компактної речовини фрагмента діафіза — об'єкт № 1 і губчастої речовини ребра — об'єкт № 2 використовували чотири основних протоколи (I, II, III і IV) отримання препаратів ДНК кісткової тканини для ПЛР-типування. Як об'єкти дослідження відбирали «свіжу» кісткову тканину стегнової кістки і ребра, які були взяті через добу після настання смерті. Основним завданням при цьому була розробка модифікацій ключових етапів процедури виділення ДНК для підвищення ефективності проведення експертного дослідження.

При аналізі протоколів для виділення ДНК із кісткової тканини розглядали вплив способів руйнування кісткової тканини, можливості використання мінімальних кількостей досліджуваного матеріалу, визначали оптимальну кількість кісткового порошку, необхідного для аналізу, вивчали вплив температурно-часових параметрів етапу лізису, підбирали кількість протеолітичного ферменту — протеїнази К, розглядали застосування співосаджувачів для преципітації ДНК і методи очищення розчину виділеної ДНК від домішок.

Критеріями ефективності методів виділення ДНК із кісткової тканини служили: кількісний і якісний вихід ДНК (ступінь лізису тканини і клітин, оцінка ступеня деградації ДНК); придатність виділеної ДНК для аналізу методом ПЛР (можливість отримання продуктів ампліфікації на матриці виділеної ДНК); тривалість і трудомісткість процедури екстракції; можливість тривалого зберігання проб виділеної ДНК; відсутність необхідності використання токсичних речовин; зниження ризику контамінації.

Перший етап процедури виділення ДНК із кісткової тканини — одержання кісткового порошку з компактної та губчастої речовин об'єктів дослідження. Ефективність екстракції ДНК залежить від ступеня лізису тканини і клітин. Способом підвищення ефективності лізису є збільшення поверхні контакту кісткових часток із лізуючими агентами за рахунок зменшення їхнього розміру. Кістковий порошок одержували за допомогою різних за розміром абразивів напилків, пилки з металевими полотнами, стоматологічного бора і шляхом розтирання з абразивною речовиною, а також гомогенізації та руйнування за допомогою ультразвуку.

Виділяли ДНК з 50,0 мг кісткового порошку об'єктів № 1 і № 2, отриманого за допомогою різних способів руйнування кісткової тканини з використанням протоколів I, II, III і IV.

Одержані експериментальні результати виявили, що кількість ДНК, виділеної з губчастої речовини ребра (об'єкт № 2), у середньому втричі більша, ніж кількість ДНК із компактної речовини діафіза стегнової кістки (об'єкт № 1) при використанні будь-якого способу руйнування і протоколу виділення: наприклад, кількість ДНК, виділеної з кісткового порошку об'єкта № 2 при використанні дрібного абразиву, дорівнює $(4400,0 \pm 21,6)$ нг, а кількість ДНК, виділеної з об'єкта № 2, — $(1400,00 \pm 17,32)$ нг.

Іншим показником ефективності способу руйнування кісткової тканини є якість виділеної ДНК. Якісно виділена ДНК у гелі візуалізується у вигляді високомолекулярної фракції (близько 10 000 п. н.) без «шлейфа» і додаткових фрагментів. Дані попередньої оцінки якості виділеної ДНК із кісткового порошку об'єкта № 1, одержаного за допомогою різних способів руйнування кісткової тканини при використанні протоколу I, відображені на рис. 1.

Рис. 1. Електрофореграма виділеної ДНК (об'єкт № 1, протокол I): М — маркер молекулярної маси рGEM; К — контрольна високомолекулярна ДНК, запропонована фірмою "Promega" (США); 1 — дрібний абразив; 2 — стоматологічний бор; 3 — розтирання і гомогенізація з абразивом; 4 — гомогенізація і руйнування за допомогою ультразвуку

Виділена ДНК має молекулярну масу більше 10 000 п. н., тобто високомолекулярною.

Основним показником ефективності способу руйнування кісткової тканини є придатність виділеної ДНК для типування методом ПЛР. Для оцінки придатності (якості) виділеної ДНК проводили її ПЛР-типування за локусом Amel.

Отримані дані дозволяють визначити спосіб руйнування кісткової тканини шляхом розтирання кісткового порошку з абразивом як найефективніший, що дає можливість виділити з високою концентрацією ДНК, придатну для ПЛР-типування, при використанні будь-якого з аналізованих протоколів виділення ДНК.

Визначали мінімальну масу кісткового порошку, необхідну для виділення достатньої для проведення ідентифікаційного дослідження кількості ДНК. Керувалися таким: для аналізу за одним локусом необхідно використовувати не менше 70,0 нг виділеної ДНК, при проведенні експертизи з ідентифікації особи необхідно досліджувати 14 гіперваріабельних локусів, отже, мінімальна кількість виділеної ДНК повинна становити 980,0 нг. Для одержання такої кількості ДНК теоретично необхідно 23 мг кісткового порошку (Корниенко И. В., Водолажский Д. И., Вейко В. П. и др., 2001). Для даного дослідження використовували такі наважки кісткового порошку: 25,0; 50,0; 75,0 і 100,0 мг. Наважки кісткового порошку переносили у стерильні пробірки «Еппендорф» об'ємом 1,5 мл, далі проводили екстракцію ДНК із кісткової тканини відповідно до протоколів I, II, III і IV і визначали концентрацію виділеної ДНК. Результати виділення ДНК із різних наважок кісткового порошку наведено в табл. 1 і 2.

Таблиця 1

Кількість ДНК, виділеної з різних наважок кісткового порошку
об'єкта № 1, нг, n = 11

Протоколи виділення	Маса наважки, мг			
	25,0	50,0	75,0	100,0
I	1127,50 ± 8,63	2050,0 ± 12,4	3177,5 ± 16,7	3423,50 ± 16,23
II	632,50 ± 8,47	1150,0 ± 9,8	1782,5 ± 10,3	1919,0 ± 11,8
III	440,0 ± 7,6	800,0 ± 9,8	1240,0 ± 11,8	1336,00 ± 10,86
IV	825,0 ± 7,3	1500,0 ± 13,8	2325,0 ± 13,9	2505,00 ± 13,05

Таблиця 2

Кількість ДНК, виділеної з різних наважок кісткового порошку
об'єкта № 2, нг, n = 11

Протоколи виділення	Маси наважки, мг			
	25,0	50,0	75,0	100,0
I	3327,50 ± 17,48	6050,00 ± 27,79	9377,50 ± 40,85	10105,5 ± 44,2
II	1842,50 ± 12,69	3350,00 ± 18,15	5191,5 ± 23,7	5594,5 ± 24,5
III	1265,00 ± 12,57	2300,00 ± 14,07	3565,0 ± 19,4	3841,0 ± 19,8
IV	2420,00 ± 12,93	4400,00 ± 21,62	6820,0 ± 31,1	7348,0 ± 34,4

На підставі даних, наведених у табл. 1 і 2, можна зробити висновок, що мінімальна маса наважки кісткового порошку, одержана з компактної речовини кісткової тканини (об'єкт № 1), яка дає можливість виділити достатню кількість ДНК, придатної для ПЛР-аналізу за 14 локусами без урахування повторів, при використанні стандартного протоколу I виділення становить 25,0 мг, при використанні протоколів II і IV маса наважки повинна дорівнювати не менше 50,0 мг і при виділенні ДНК за допомогою протоколу III вона становить 75,0 мг.

Для губчастої речовини кісткової тканини (об'єкт № 2) мінімальна маса наважки кісткового порошку, яка дає можливість виділити достатню кількість ДНК, придатної для ПЛР-аналізу за 14 локусами без урахування повторів, становить менше 25,0 мг незалежно від використовуваного протоколу виділення.

Для підвищення ефективності лізису кісткового порошку визначали оптимальне співвідношення об'єму лізуючого буфера до наважки об'єктів № 1 і № 2 масою 25,0 мг. Аналізували ефективність лізису при таких співвідношеннях: 1:12; 1:10; 1:7; 1:5; 1:3.

Результати виділення ДНК при використанні різних співвідношень маси кісткового порошку й об'єму лізуючого буфера показали, що ефективність лізису кісткового порошку поліпшується при проведенні даного

етапу в термошейкері, який забезпечує постійне і повноцінне перемішування суміші при заданій температурі. Оптимальне співвідношення маси до об'єму лізуючого буфера становить 1:12. Кількість ДНК, що виділяється, у середньому на 20 % більша порівняно з використанням стандартних методик.

Для підвищення ефективності протоколів виділення ДНК підбирали оптимальні температурні та часові параметри етапу лізису. Для цього проводили екстракцію в термошейкерах за різними температурно-часовими режимами: інкубували при температурах 37 і 56 °С протягом 6–48 год.

Встановлено, що проведення етапу лізису при температурі 56 °С протягом 12 год при використанні протоколу I дозволяє виділити більшу кількість ДНК, ніж за аналогічний період часу при температурі 37 °С. Лізис кісткової тканини з температурно-часовими режимами варіантів 1–6 (температура 37 °С, 6–48 год) при використанні протоколів II, III і IV не дозволяє виділити достатню кількість ДНК.

Результати електрофоретичного розподілу виділеної ДНК із кісткового порошку об'єктів № 1 і № 2 при використанні протоколів I, II і IV і температурно-часових режимів варіантів 9–12 показали, що ДНК, виділена при використанні температурно-часових режимів 9 і 10 (18 і 24 год відповідно), є високомолекулярною, без ознак деградації.

З аналізу отриманих даних випливає, що оптимальною температурою проведення етапу лізису кісткової тканини об'єктів № 1 і № 2 є 56 °С, час інкубації — 18 год (протоколи II, III і IV), 12 год (протокол I). Запропоновані параметри є найефективнішими за кількістю й якістю виділеної ДНК.

При виділенні ДНК із кісткової тканини на етапі лізису застосовуються речовини, що сприяють ефективній денатурації та деполімеризації білків у розчині, наприклад протеолітичний фермент — протеїназа К, що використовується у різних концентраціях у складі лізуючого буфера. Однак ефективність протеолізу може бути недостатньою у разі використання неоптимізованих концентрацій цього ферменту в лізуючому буфері. Нами були використані такі варіанти концентрацій протеїнази К, що у кінцевому об'ємі становили: 1) 0,1 мг/мл; 2) 0,3 мг/мл; 3) 0,5 мг/мл; 4) 1,0 мг/мл.

Дані про кількість ДНК (у нанограмах), виділеної з об'єктів № 1 і № 2 при використанні різних концентрацій протеїнази К у лізуючих буферах, наведені у табл. 3.

Визначені найефективніша концентрація протеолітичного ферменту протеїнази К і спосіб її внесення в лізуючий буфер. Запропонована схема дозволяє збільшити кількість виділеної ДНК у середньому на 2,5 % порівняно зі стандартними протоколами.

Для підвищення ефективності виділення ДНК із кісткової тканини деякими авторами запропоновано використання співосаджувачів ДНК, які застосовуються для її преципітації. Вони поліпшують ефективність осадження і зменшують імовірність випадкової втрати осаду. Як співосаджувачі використовують: глікоген (концентрація 20–50 мкг/мл) і Декстран блакитний

(1 мг/мл). З цією метою при виділенні ДНК за допомогою протоколів I і IV застосовували співосаджувачі — глікоген (20 мкг/мл) і Декстран блакитний (1 мг/мл).

Таблиця 3
Кількість ДНК, виділеної з об'єктів № 1 і № 2, нг, n = 11

Протоколи виділення	Концентрація протеїнази К, мг/мл							
	Об'єкт № 1				Об'єкт № 2			
	0,1	0,3	0,5	1,0	0,1	0,3	0,5	1,0
I	1500,0 ± 25,7	1561,0 ± 24,2	1599,00 ± 29,96	1638,0 ± 25,5	4364,5 ± 15,1	4473,1 ± 13,4	4582,7 ± 14,7	4691,8 ± 15,6
IV	1065,0 ± 18,7	1091,6 ± 21,8	1118,3 ± 17,9	1145,0 ± 19,1	3204,4 ± 10,1	3284,5 ± 10,3	3364,6 ± 11,5	3444,7 ± 13,0

Доведена ефективність використання співосаджувачів — глікогену і Декстрану блакитного, застосування яких дозволяє виділити ДНК на 8 і 10 % відповідно більше, ніж без їх застосування. Виділена ДНК є придатною для ПЛР-аналізу.

Розроблено спосіб очищення «проблемних» препаратів ДНК з об'єктів, що потенційно містять полімеразні інгібітори. Нами запропоновано додатковий етап очищення ДНК, що містить розчинення одержаного осаду ДНК у 5%-й суспензії Челекс-100, з подальшою інкубацією протягом 2 год при температурі 60–65 °С і кип'ятінням. Очищена у такий спосіб ДНК зберігає придатність для ПЛР-аналізу протягом кількох місяців.

Проведений порівняльний аналіз чотирьох основних протоколів виділення ДНК із компактної та губчастої речовин кісткової тканини дозволив: 1) визначити губчасту речовину кісткової тканини ребер як переважний об'єкт для проведення молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження; 2) показати ефективність протоколів I і IV для виділення ДНК із нативної кісткової тканини; 3) модифікувати основні етапи екстракції ДНК. Запропоновані модифікації підвищують ефективність існуючих методик виділення ДНК із кісткової тканини, практично усувають основні їх недоліки, дають можливість збільшити кількість виділеної ДНК, яка успішно ампліфікується у ході ПЛР.

Для підвищення якості проведення експертиз з метою ідентифікації особи за кістковими залишками, узятими від гнильно змінених і ексгумованих трупів, які перебували в різних стадіях гнильної зміни, проводили добір ефективної методики виділення ДНК із кісткової тканини об'єктів.

Для дослідження відбирали фрагменти стегнової кістки і ребер, узяті від трупів через 1, 6 та 12 міс. з моменту смерті (об'єкти №№ 1–6), а також фрагменти кісток, узятих від ексгумованих трупів з давністю поховання 1 та 2 роки (об'єкти №№ 7–10). Усі кісткові фрагменти були підготовлені до дослідження, як описано у другому розділі дисертаційної роботи.

Використовуючи модифіковані варіанти протоколів I–IV, провели виділення ДНК із компактної та губчастої речовин кісткової тканини об'єктів дослідження, оцінювали її придатність для подальшого ПЛР-аналізу.

Результати дослідження дозволили встановити, що кількість ДНК, виділеної з кісткової тканини, узяті від гнильно змінених трупів (об'єкти №№ 1–6), зменшується у середньому на 50,0 нг, що становить 3 %. Для компактної речовини кісткової тканини зміна кількості виділеної ДНК становить 1,1–8,1 % залежно від протоколу, для губчастої — 0,6–7,2 %. Із кісткової тканини, узяті від ексгумованих трупів (об'єкти №№ 7–10), виділяється така ж кількість ДНК, як і з кісткової тканини гнильно змінених трупів (об'єкти №№ 3–6).

Найбільш універсальними (щодо виду об'єкта) й ефективними (у кількісному і якісному відношенні) протоколами виділення ДНК із кісткової тканини гнильно змінених і ексгумованих трупів виявилися модифіковані протоколи I, II і IV.

Наступний етап дослідження присвячений добору та підготовці кісткових об'єктів для зберігання й екстракції ДНК. Нами проведена оцінка можливого впливу умов зберігання об'єктів (у сухому і замороженому вигляді), а також тривалості зберігання на збереження ДНК кісткової тканини впродовж трьох років.

Результати дослідження показали, що кісткові фрагменти можуть зберігатися у сухому вигляді в паперових пакетах при температурі 18–20 °С протягом 3 років, при цьому ДНК клітин кісткової тканини зазнає незначних деструктивних змін. Переважним способом тривалого зберігання об'єктів (понад 3 роки) є зберігання при температурі -20 °С у морозильній камері. Даний спосіб необхідно визнати обов'язковим для зберігання первинно деградованого біоматеріалу.

Для удосконалення методологічних аспектів проведення експертиз з метою ідентифікації особи за кістковими залишками, узятими від скелетованих трупів, проводили оцінку ефективності модифікованих протоколів виділення ДНК.

Як об'єкти дослідження були вибрані кісткова тканина (компактна та губчаста речовина) кісток, узятих від скелетованих трупів із різною давністю настання смерті (від 1 до 12 років) і умовами знаходження або поховання.

Результати проведеного дослідження свідчать про те, що тривале перебування кісток скелета людини (більше 1,5 роки з моменту настання смерті) на поверхні землі (грунту) призводить до зміни стану клітин кісткової тканини та деградації ДНК. Кількість ДНК, виділеної за допомогою модифікованих протоколів із губчастої речовини ребер, у 2,5 рази більша, ніж кількість ДНК, виділеної із компактної речовини діафізів трубчастих кісток, і вдвічі більша, ніж кількість ДНК, що виділяється з губчастої речовини епіфізів трубчастих кісток. Стан досліджуваного кісткового матеріалу, зумовлений як часом від моменту смерті, так і давністю й умовами поховання, потребує

внесення додаткових модифікацій на етапі генотипування. Встановили, що для підвищення ефективності проведення ПЛР, при роботі з деградованими препаратами ДНК, необхідно використовувати термостабільну Smart Taq-полімерази («ТАПОТИЛИ», Росія) з підвищенням її концентрації в реакційній суміші до 0,7–1,0 одиниць активності, а також збільшувати кількість основних циклів ампліфікації зі стандартних 36 до 45. Вищевказані модифікації дозволили одержати продукти ампліфікації виділеної ДНК практично для всіх об'єктів дослідження. Найефективнішими, з точки зору кількості виділеної ДНК, є модифіковані протоколи I і IV. За результатами дослідження, доведена можливість виділення для проведення ПЛР-аналізу ДНК із кісткової тканини скелетованих трупів із давністю смерті більше 10 років. Для проведення молекулярно-генетичної ідентифікації особи скелетованих трупів рекомендується як об'єкт дослідження використовувати губчасту речовину кісткової тканини ребер і/або губчасту речовину епіфізів довгих трубчастих кісток.

За допомогою модифікованих протоколів I і IV була показана можливість виділення ДНК із кісткової тканини (губчастої речовини) кісток, узятих від скелетованих трупів із давністю поховання більше 60 років. Встановлено, що ДНК, виділена з губчастої речовини епіфізів трубчастих кісток і губчастої речовини ребер, характеризується як деградована, однак результати типування за локусом Amel довели її придатність для ПЛР-аналізу.

Наступний етап роботи був присвячений дослідженню кісткових об'єктів, що піддалися дії високих температур. Вивчали вплив змін губчастої речовини кісткової тканини, що відбулися в результаті дії високих температур (відкритого вогню і виварювання). Проводили оцінку можливості виділення ДНК з кісткової тканини (губчастої речовини) кісток, що піддалися дії високих температур і знаходилися в різному ступені розжарювання, та її придатності для ПЛР-аналізу. Для виділення ДНК використовували модифіковані протоколи I і IV.

Одержані під час досліджень результати дозволили встановити таке: модифіковані протоколи I і IV ефективні при виділенні ДНК із губчастої речовини епіфізів трубчастих кісток і губчастої речовини ребер, спалених до чорного розжарювання. Виділена ДНК успішно ампліфікується в ході ПЛР за локусом Amel. Молекулярно-генетичне дослідження кісткових об'єктів, спалених до чорного розжарювання, обмежене визначенням статевої належності об'єктів. Використання модифікованих протоколів I і IV дозволяє виділити ДНК, придатну для ПЛР-типуювання, із виварених кісток. Доведена можливість визначення генотипу виварених кісткових об'єктів за 5–7 локусами геному людини.

Далі наведені приклади судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз з метою ідентифікації особи та встановлення тотожності кісткових залишків, у яких були використані модифіковані методики виділення та типуювання ДНК з кісткової тканини.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі пропонується і обґрунтовується комплекс нових найбільш ефективних підходів до проведення судово-медичного молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження, об'єктом якого є кісткова тканина різного структурного типу та ступеня збереження. З результатів виконаної дисертаційної роботи випливають такі висновки:

1. Результати власних досліджень дозволили розробити основні методологічні аспекти проведення судово-медичної ідентифікації особи за допомогою ПЛР-типуювання ДНК кісткової тканини.

2. На підставі проведеного порівняльного аналізу ефективності основних методів виділення ДНК із нативної кісткової тканини (компактної та губчастої речовини) запропоновані оптимальні модифікації ключових етапів виділення геномної ДНК із кісткової тканини: спосіб руйнування кісткової тканини; співвідношення лізуючого буфера і кісткового порошку; температурно-часові режими проведення етапу лізису; кількість протеолітичного ферменту в лізуючому буфері; застосування співосаджувачів; спосіб очищення ДНК.

3. До найефективніших модифікованих протоколів виділення ДНК із кісткової тканини різного вигляду і стану належать: протокол I, заснований на застосуванні у складі лізуючого буфера аніонного детергента — додецилсульфату натрію і протеолітичного ферменту — протеїнази K, а також протокол IV — заснований на застосуванні ацетату калію у високій концентрації для очищення від білків і полісахаридів.

4. Губчаста речовина кісткової тканини ребра визначена як переважний об'єкт для проведення молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження.

5. Використання термостабільної Smart Taq-полімерази зі зростанням її концентрації в реакційній суміші до 0,7–1,0 одиниць активності, а також збільшенням кількості основних циклів ампліфікації до 45 підвищує ефективність ПЛР-аналізу при роботі з деградованими препаратами ДНК, виділеної з кісткової тканини.

6. Розроблені модифіковані методики виділення ДНК з кісткової тканини ексгумованих трупів, а також трупів, що перебували на різній стадії гнильного розкладу, є ефективними для виділення ДНК, придатної для ПЛР-аналізу.

7. Показана можливість проведення молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження кісткової тканини, взятої від скелетованих трупів із різною давністю після настання смерті й поховання, зокрема понад 60 років. Для проведення дослідження переважним об'єктом є губчаста речовина кісткової тканини епіфізів довгих трубчастих кісток.

8. Кістки, що піддалися дії високих температур (відкритого вогню і виварювання), можуть бути об'єктами для проведення молекулярно-генетичного ідентифікаційного аналізу. Використання розроблених модифікованих методик виділення ДНК є ефективним при визначенні статевої належності кісток, спалених до чорного розжарювання. Виділення ДНК за допомо-

гою модифікованих методик дозволяє отримати необхідну кількість якісної ДНК з виварених кісткових об'єктів і провести достатньо повне ідентифікаційне дослідження.

9. За результатами досліджень розроблені рекомендації з відбору, підготовки й умов зберігання кісткового біоматеріалу.

10. Результати роботи дозволяють визначити, що головним шляхом оптимізації проведення судово-медичної молекулярно-генетичної ідентифікаційної експертизи кісткових залишків є використання запропонованого алгоритму проведення молекулярно-генетичного дослідження.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для проведення судово-медичної молекулярно-генетичної експертизи з метою ідентифікації особи за кістковими залишками необхідно:

1. Від невпізнаних гнильно змінених, ексгумованих і скелетованих трупів відбирати епіфізи довгих трубчастих кісток та ребра.

2. Транспортування доцільно здійснювати в пластиковому маркованому й опечатаному термоконтейнері з льодом при температурі ≈ 0 °С.

3. Підготовку об'єктів до зберігання здійснювати шляхом механічного видалення нашарувань і стерилізації з використанням хлораміну.

4. Біологічний матеріал до початку дослідження зберігати у морозильній камері при температурі -20 °С.

5. Кістковий порошок одержувати за допомогою пилки з металевим полотном, далі розтирати його з абразивом, маса наважки об'єктів має становити 25,0 мг.

6. Виділення ДНК слід здійснювати за допомогою модифікованих протоколів I і IV.

7. Кількість виділеної ДНК визначати за допомогою флюориметра.

8. Оцінку якості виділеної ДНК здійснювати шляхом електрофорезу в 1%-му агарозному гелі.

9. Оцінювати придатність ДНК для ПЛР-аналізу слід шляхом типування виділеної ДНК за локусом для визначення статевої належності Amel.

10. Проводити ампліфікацію виділеної ДНК необхідно з використанням наборів реактивів «ТАПОТИЛИ» (Росія) і «Promega Technical Manual» (США) не менш ніж за 14 локусами.

11. Провести порівняльний аналіз отриманих ампліфікованих фрагментів виділеної ДНК і зразків крові за досліджуваними локусами. Сформулювати експертний висновок.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Кривда Р. Г. Виділення ДНК із кісткової тканини різного терміну зберігання / Р. Г. Кривда, Г. Ф. Кривда, Ю. М. Сиволап // Одеський медичний журнал. — 2002. — № 5 (73). — С. 20-23. (Особисто здобувач сформулював завдання досліджень і провів експериментальні дослідження.)

2. Кривда Р. Г. Використання аналізу ДНК у судово-медичних експертизах / Н. Е. Кожухова, Г. Ф. Кривда, Р. Г. Кривда, Ю. М. Сиволап, Ю. Ю. Суліма, С. В. Чеботар ; за ред. Ю. М. Сиволапа і Г. Ф. Кривди. — Одеса : ОДМУ, 2001. — 92 с. (Особисто здобувач сформулював завдання досліджень і провів обґрунтування виконаних самостійно експериментальних результатів.)

3. Кривда Р. Г. Ідентифікація особи шляхом геномної дактилоскопії / Р. Г. Кривда // Вчені майбутнього : міжнар. наук.-практ. конф. молодих вчених, 14–16 жовтня 2003 р., Одеса : тези доп. — Одеса, 2003. — С. 15-16.

4. Кривда Р. Г. Тактика використання спеціальних знань у формі судової експертизи в процесі розслідування і розкриття злочинів / В. О. Комаха, Г. Ф. Кривда, В. В. Антонюк, В. В. Гузенко, В. Я. Гуцул, О. А. Зотаєва, О. Ю. Калиновський, В. В. Комаха, О. В. Комаха, Р. Г. Кривда, М. І. Куруц, О. А. Кулачинський, С. М. Миргородський, Ф. П. Нікітіна, В. В. Попа, А. М. Соцький, Л. М. Чернобай, П. Г. Шнаревич, І. В. Яковенко ; за ред. В. О. Комахи. — Чернівці, 2004. — С. 205-211. (Особисто здобувач теоретично обґрунтував тактику підготовки, вилучення, зберігання біологічного матеріалу та експериментальних зразків для судово-медичного молекулярно-генетичного дослідження.)

5. Кривда Р. Г. Перезахоронение праха светлейшего князя М. С. Воронцова и его супруги княгини Е. К. Воронцовой / Г. Ф. Кривда, Ю. В. Загоруйко, Р. Г. Кривда // Интегративна антропология. — 2005. — № 1/2. — С. 64-73. (Особисто здобувач провів експериментальні дослідження.)

6. Кривда Р. Г. Вирішення питання щодо судово-медичної ідентифікації особи при дослідженні скелетованих трупів шляхом проведення молекулярно-генетичного аналізу / Р. Г. Кривда // Український судово-медичний вісник. — 2007. — № 1 (20). — С. 31-34.

7. Кривда Р. Г. Идентификация личности в судебной медицине на основе ПЦР-анализа геномной ДНК костной ткани / Р. Г. Кривда // Международная научно-практическая конференция судебных медиков, посвященная 165-летию кафедры судебной медицины с последипломной подготовкой Одесского государственного медицинского университета и 85-летию основания Одесского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, Одесса, 7–8 июня 2007 г. — Одесса : Одес. гос. мед. ун-т, 2007. — С. 54-56.

8. Кривда Р. Г. Молекулярно-генетическая идентификация личности скелетированных трупов, обнаруженных в криминальном захоронении / Р. Г. Кривда, А. Е. Солоденко // Международная научно-практическая конференция судебных медиков, посвященная 165-летию кафедры судебной медицины с последипломной подготовкой Одесского государственного медицинского университета и 85-летию основания Одесского областного бюро судебно-медицинской экспертизы, Одесса, 7–8 июня 2007 г. — Одесса : Одес. гос. мед. ун-т, 2007. — С. 57-59. (Особисто здобувач сформулював завдання досліджень і провів обґрунтування виконаних самостійно експериментальних результатів.)

9. Кривда Р. Г. Ефективність виділення ДНК із кісткової тканини для проведення молекулярно-генетичної ідентифікації особи / Р. Г. Кривда // Зб. наук. праць НМАПО ім. П. Л. Шупика. — К., 2007. — Вип. 16, кн. 1. — С. 937-946.

10. Кривда Р. Г. Виділення ДНК із кісткової тканини гнильно змінених трупів для молекулярно-генетичної ідентифікації особи в судовій медицині / Р. Г. Кривда // Зб. наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика. — К., 2007. — Вип. 16, кн. 2. — С. 483-490.

11. Кривда Р. Г. Исследование костных останков князя М. С. Воронцова и его супруги княгини Е. К. Воронцовой / Г. Ф. Кривда, Ю. В. Загоруйко, Р. Г. Кривда // 4-й міжнар. конгр. з інтегративної антропології, Вінниця, 4–5 жовтня 2007 р. : тези доп. — Вінниця, 2007. — С. 64-73. (Особисто здобувач провів експериментальні дослідження.)

12. Кривда Р. Г. Судебно-медицинское генотипоскопическое исследование костных останков, подвергшихся воздействию высоких температур / Р. Г. Кривда // Вчені майбутнього : наук.-практ. конф. молодих вчених з міжнар. участю, Одеса, 15–16 жовтня 2007 р. — Одеса : Одес. держ. мед. ун-т, 2007. — С. 25-26.

13. Пат. 53564 А Україна МПК 7 : А61В 5/117. Спосіб ідентифікації особи / Кривда Г. Ф., Сиволап Ю. М., Кривда Р. Г., Кожухова Н. Е. ; заявник і патентовласник Одес. держ. мед. ун-т ; заявл. 31.07.2002 ; опубл. 15.01.2003, Бюл. № 1. — 4 с.

14. Пат. 10445 Україна, МПК 7 : А61В 5/117. Спосіб ідентифікації особи / Кривда Г. Ф., Кривда Р. Г. ; заявник і патентовласник Одес. держ. мед. ун-т. — № u 200504118 ; заявл. 29.04.2005 ; опубл. 15.11.2005, Бюл. № 11. — 4 с.

АНОТАЦІЯ

Кривда Р. Г. Ідентифікація особи в судовій медицині на основі ПЛР-аналізу геномної ДНК кісткової тканини. — Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.25 — судова медицина. — Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України. — Київ, 2009.

Дисертація присвячена питанням ідентифікації особи в судовій медицині на основі ПЛР-аналізу геномної ДНК кісткової тканини. У роботі проведений порівняльний аналіз основних методів виділення ДНК із кісткової тканини та її ампліфікації. На основі отриманих результатів були розроблені методологічні аспекти проведення судово-медичного молекулярно-генетичного дослідження, об'єктом якого є кісткова тканина різного структурного типу та ступеня збереження. Запропоновано модифікації основних етапів виділення геномної ДНК із кісткової тканини кісток, узятих від гнильно змінених, ексгумованих, скелетованих, підданих дії високих температур трупів. Розроблені принципи й умови ПЛР-типуювання виділеної ДНК кісткової тка-

нини. Визначено найоптимальніші для проведення ідентифікаційного дослідження кісткові об'єкти. У роботі пропонуються методичні рекомендації з відбору, підготовки й умов зберігання кісткового біоматеріалу. Складено практичні рекомендації з проведення судово-медичної молекулярно-генетичної ідентифікаційної експертизи за кістковими залишками. Модифіковані протоколи виділення ДНК із кісткової тканини та її ПЛР-типування впроваджені в практику судово-медичної експертизи різних регіонів України.

Ключові слова: судово-медична молекулярно-генетична ідентифікаційна експертиза, ДНК, кісткова тканина, ПЛР.

АННОТАЦИЯ

Кривда Р. Г. Идентификация личности в судебной медицине на основе ПЦР-анализа геномной ДНК костной ткани. — Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.25 — судебная медицина. — Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика МЗ Украины. — Киев, 2009.

Диссертация посвящена вопросам идентификации личности в судебной медицине на основе ПЦР-анализа геномной ДНК костной ткани. В работе предлагается и обосновывается комплекс новых методологических аспектов проведения судебно-медицинского молекулярно-генетического идентификационного анализа.

Исследованы четыре основных протокола выделения ДНК из разных типов «свежей» костной ткани. При анализе протоколов рассматривали влияние способов разрушения костной ткани, определяли оптимальное количество костного порошка, изучали влияние температурно-временных параметров, подбирали количество протеолитического фермента, исследовали возможность использования соосадителей, а также методов очистки раствора ДНК.

На основе полученных данных были разработаны методологические аспекты проведения молекулярно-генетического исследования, объектом которого является костная ткань. Нами определена минимальная масса навески костного порошка, которая составляет 25,0 мг; установлено оптимальное соотношение количества костного порошка и объема лизирующего буфера — 1 : 12; оптимизированы температурно-временные параметры проведения этапа лизиса: 56 °С, время инкубации — 12 ч (протокол I); 56 °С, время инкубации — 18 ч (протоколы II, III, IV); определены эффективная концентрация протеиназы К — 0,3 мг и способ ее дробного внесения; доказана эффективность применения соосадителей — гликогена и Декстрана голубого; разработан способ очистки «проблемных» препаратов ДНК с помощью 5%-й суспензии Челекс-100.

Исследовано и обосновано применение модифицированных протоколов выделения ДНК из костной ткани, взятой от трупов, которые находились на разных стадиях гнилостного разложения. Установлены универсальные кост-

ные объекты — ребро и бедренная кость, а также эффективные модифицированные протоколы — I, II и IV.

В работе предлагаются методические рекомендации по отбору, подготовке и условиям хранения костного биоматериала, определены наиболее оптимальные условия хранения биологического материала — в сухом виде в бумажных пакетах при температуре 18–20 °С. Предпочтительным способом хранения являются условия морозильной камеры при температуре -20 °С.

Установлено, что оптимальными костными объектами, взятыми от скелетированных трупов, являются эпифизы длинных трубчатых костей и ребра. Наиболее эффективные протоколы выделения ДНК из губчатого вещества костной ткани — I и IV. Разработана схема проведения ПЦР-анализа деградированной ДНК, включающая использование термостабильной Smart Taq-полимеразы («ТАПОТИЛИ», Россия) с повышением ее концентрации до 0,7–1,0 единиц, а также увеличение количества циклов амплификации до 45.

Оценена возможность использования костных объектов, которые подверглись воздействию высоких температур (открытого огня и вываривания) для проведения молекулярно-генетического анализа. Экспериментально показано, что протоколы I и IV эффективны при выделении ДНК из губчатого вещества эпифизов трубчатых костей и ребер, вываренных или сожженных до черного каления.

Определены наиболее оптимальные для проведения идентификационного исследования костные объекты. Составлены практические рекомендации по проведению судебно-медицинской молекулярно-генетической идентификационной экспертизы костных останков. Модифицированные протоколы выделения ДНК из костной ткани и ее ПЦР-типирования нашли применение в практике судебно-медицинской экспертизы различных регионов Украины.

Ключевые слова: судебно-медицинская молекулярно-генетическая идентификационная экспертиза, ДНК, костная ткань, ПЦР.

ANNOTATION

Krivda R. G. Identification of person in forensic medicine on the basis of PCR-analysis of genomic DNA of the bone tissue. — Manuscript.

The thesis for candidate of medical sciences degree by speciality 14.01.25 — forensic medicine. — The National Medical Academy of Postgraduate Education after P. L. Shupik of the Ministry of Health of Ukraine. — Kyiv, 2009.

The thesis is devoted to questions of person identification in forensic medicine on the basis of PCR-analysis of genomic DNA of bone tissue. In the work it was conducted comparative analysis of basic methods for DNA extraction from the bone tissue and its amplification. The methodological aspects of conducting forensic-medicine molecular-genetic research the object of which is the bone tissue of a different structural type and degree of saving were developed. A number of modifications of basic stages of the genomic DNA extraction from the bone tissue of putrescent, exhumed, skeletonized corpses and corpses from fireplace were

proposed. The principles and terms of PCR-typing of DNA extracted from the bone tissue have been developed. The most optimum bone objects for conducting the identification research were chosen. Methodical recommendations for selection, preparation and terms of storage of bone biological material are offered in the work. Practical recommendations for conducting the molecular-genetic forensic-medicine identification examination after bone remains were composed. Modified protocols of the DNA extraction from the bone tissue and its PCR-typing are successfully applied in practice of forensic-medicine examination of different regions of Ukraine.

Key words: forensic-medicine molecular-genetic identification examination, DNA, bone tissue, PCR.

Підписано до друку 20.08.2009. Формат 60×84/16.
Папір письмовий. Друк різнографічний. Обл.-вид. арк. 0,9.
Тираж 100. Зам. 1306.

Одеський державний медичний університет
65082, Одеса, Валіховський пров., 2.
Свідоцтво ДК № 668 від 13.11.2001.