

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2004

УДК 340.6:616.15-07:577.21

П. Л. ИВАНОВ, Е. Ю. ЗЕМСКОВА, Н. Н. ЛЕБЕДЕВА, И. А. ЕФРЕМОВ

A DEFINITION OF THE NOMENCLATURE OF ALLELE VARIANTS AND A DESCRIPTION OF ALLELE POLYMORPHISM WITHIN A MOLECULAR-GENETIC INDIVIDUALIZATION SYSTEM BASED ON THE PENTANUCLEOTIDE TANDEM REPLICATION OF HUMCD4

P.L. Ivanov, E.Yu. Zemskova, N.N. Lebedeva, I.A. Efremov

While analyzing the available published data, we found significant differences in definition of alleles of the HUMCD4 polymorphic chromosome locus. It is an obstacle for comparing the expertise results obtained while using the locus as molecular individualization system in different laboratories and, as a consequence, it hinders the use of the said marker in building up a reference database. The structure of the HUMCD4 locus was analytically investigated and the distribution of the locus alleles was systemized in a sample of 407 persons (citizens of Russia who are not blood relatives) within the present case study for the purpose of a detailed definition of its allele's characteristics. We worked out recommendations related with the nomenclature standardization of alleles of the HUMCD4 locus and specified the main population features of the locus polymorphism on the bases of the studied sample of Russia's citizens. The results can be used as reference parameters in interpreting the findings of the molecular-genetic identification expertise and examinations and in building up databases.

Key words: *gene polymorphism, molecular-genetic individualization systems, HUMCD4 locus, population studies in Russia*

Ген CD4 кодирует T4-гликопротеин — поверхностный антиген Т-лимфоцитов. Другое название этого гена — p55. Он локализован в теломерной области короткого плеча хромосомы 12: 12 pter-p12 [1].

В интроне 1 гена CD4 локализован полиморфный пентануклеотидный микросателлит (TTTTTC)_n / (AAAAG)_n, который обозначается как HUMCD4 (GDB:180736 [2], GenBank: U47924, M86525).

К настоящему времени в разных популяциях в этом гипервариабельном локусе выявлено не менее 14 аллелей, содержащих от 4 до 16 повторов. Гетерозиготность в исследованных выборках находилась в диапазоне от 55 до 83%, распределение генотипов во всех исследованных популяциях соответствовало равновесию Харди-Вейнберга (PXB). Наибольший уровень полиморфизма по этому локусу оказался присущим неграм и арабам, у которых выявлено наибольшее число аллельных вариантов [3, 4]. У европеоидов наиболее распространены являются аллели 5, 6 и 10 (их частота составляет более 20%); также практически всегда выявляются аллели 11 и 12, а остальные аллели в европейских популяциях достаточно редки и выявляются в единичных случаях.

Микросателлит HUMCD4, хотя и не входит в панели полиморфных локусов молекулярно-генетических индивидуализирующих систем ENFSI и CODIS, широко используется в молекулярно-генетических приложениях по идентификации личности [5, 10]. Частоты аллелей по этому локусу определены для городских популяций Москвы и Томска [11]. Кроме того, он использовался в крупномасштабных (более 1600 человек) филогенетических исследованиях разных наций и народностей [4, 12], а также в ассоциативных исследованиях с такими наследственными заболеваниями, как шизофрения [13] и инсулинозависимый сахарный диабет [14, 15].

В настоящее время нами проводятся популяционно-генетические исследования локуса HUMCD4 в составе панели полиморфных микросателлитных локусов, локализованных в теломерной области короткого плеча хромосомы 12. Эти исследования касаются изучения параметров неравновесия по сцеплению между близкорасположенными генетическими маркерами и имеют конечной целью повышение эффективности молекулярно-генетического идентификационного анализа, в основе которого лежит феномен полиморфизма длины ам-

плифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК [16]. В ходе работы наше внимание привлекли обнаружившиеся в источниках литературы существенные различия при обозначении аллелей данного локуса. Это вызывает определенную путаницу в описании базовых генотипических характеристик данного маркера, является препятствием для их использования в межлабораторных исследованиях и, как следствие, не позволяет использовать локус HUMCD4 при формировании референтных баз данных.

Изучение указанного вопроса в плане уточнения номенклатуры аллельных вариантов локуса HUMCD4 стало предметом настоящего исследования. Также была поставлена задача определения основных параметров полиморфизма этого локуса в выборке российского населения с целью практического использования в качестве индивидуализирующей молекулярно-генетической системы на территории России.

Материалы и методы исследования

В качестве биологического материала для анализа использовали образцы периферической крови. Исследованная выборка объектов включала 407 неродственных человек из разных регионов РФ, преимущественно русской национальности (по паспортным данным), которые были отобраны из числа фигурантов судебно-медицинских экспертиз, назначенных для проведения в Российской центре судебно-медицинской экспертизы Минздрава РФ. По составу это была выборка русских с включенными мигрантами из других популяций. Таким образом, исследованную группу можно охарактеризовать как выборку из гетерогенной популяции, которая описывается моделью "смешанной господствующей популяции" (admixed population).

Для энзиматической амплификации аллельных фрагментов на матрице ДНК локуса HUMCD4 использовали праймерную систему, предложенную М. Edwards [2]. Разделение продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли в нативных 6—10% полиакриламидных гелях (ПААГ) с последующей окраской серебром или бромистым этидием. Аллельные варианты идентифицировали по специально полученной в настоящей работе аллельной "лестнице", содержащей аллели 5, 6, 8, 10, 11, 12, а также с использованием внешнего стандарта молекулярных масс (ДНК pBR322/MspI) с

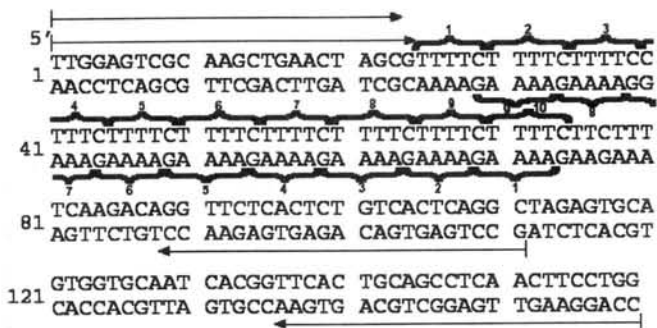


Рис. 1. Структурная организация локуса HUMCD4. Показан фрагмент последовательности U47924 с указанием локализации праймеров, описанных в работе [8] (обозначены красными стрелками) и в работе [2] (синие стрелки), а также схема нумерации tandemных повторов по "верхней" и "нижней" цепи.

помощью аппаратно-программной системы Kodak EDAS 120 ("Кодак", США).

Для вероятностно-статистического анализа данных использовали компьютерные программы RXC (G. Carmody, Ottawa, Канада), Arlequin [17], GDA [18] и PowerStats [19].

Результаты и их обсуждение

В зависимости от выбора праймеров для энзиматической амплификации ДНК-матрицы в ПЦР один и тот же аллельный вариант может иметь разную амплифицируемую длину. Применительно к локусу HUMCD4 ситуация следующая. Если, к примеру, использовать праймерную систему, описанную в работе [8], размер амплифицируемого фрагмента, соответствующего аллелю 10 (нумерация отражает число tandemных повторов), составляет 159 пар нуклеотидов (п.н.). Если же используются другие праймеры, например описанные в работе [2], то в этом случае размер аналогичного фрагмента по расчетам должен составлять 111 п. н.

При этом заметим, что в работе М. Edwards [2] длина аллеля 10 указана как 113 п. н., а у других авторов, которые использовали ту же первоначально описанную М. Edwards амплификационную систему, результаты разнятся. Так, например, в работе [13] длина амплифицируемого аллеля 10 определена как 113 п. н., а в работе [4] — как 110 п. н.

В данном случае очевидно, что несоответствие связано с ошибкой электрофоретического метода, использованного в ранней работе М. Edwards для определения размера при фрагментном анализе ДНК, тогда как величина 111 п. н. определена точно — на основании секвенирования и расшифровки первичной структуры соответствующего участка генома.

Гораздо более серьезной проблемой является то, что в зависимости от того, как именно определена структура повторяющегося звена в tandemно организованной последовательности (так называемый "мотив"), один и тот же вариант аллельного состояния такого локуса может получить разные обозначения.

В настоящее время аллели микросателлитных локусов в соответствии с международными рекомендациями [20] нумеруют по числу содержащихся в них tandemных повторов. При этом может быть применена номенклатура, основанная на нумера-

ции tandemных повторов как по одной, так и по другой цепи референтной последовательности. Для большинства локусов при выборе в качестве основы номенклатуры той или иной из двух комплементарных цепей референтной последовательности порядковые номера аллелей не меняются; комплементарно меняется только обозначение повторяющегося мотива. Между тем для локуса HUMCD4 здесь имеется принципиальная разница. На рис. 1 представлена структурная организация локуса HUMCD4. Анализ приведенной нуклеотидной последовательности показывает, что при использовании нумерации по "верхней" цепи tandemный блок содержит 10 пентануклеотидных повторов: (TTTTC)₃ (СТТТС) (TTTTC)₆. При использовании нумерации по "нижней" цепи 1 звено — повтор комплементарного мотива (AAAAG) — теряется, и в этом случае насчитывается только 9 полных повторов: (AAAAG)₆ (AAAGG) (AAAAG)₂.

Примечательно, что аллели с числом повторов 8 и менее содержат идентичные повторяющиеся мотивы (TTTTC). У аллелей с 9 повторами и более в середине повторяющегося участка встречается звено (СТТТС), что обусловлено точковой заменой — транзицией 1 нуклеотида [21, 22]. С использованием секвенирования аллелей в итальянской и австрийской популяциях выявлено 2 формы аллеля 9: более редкая (примерно 25% наблюдений) со структурой повторов (TTTTC)₃ и с модифицированным звеном в середине: (TTTTC)₃ СТТТС (TTTTC)₅ [22, 23]. Также описана другая точковая замена-трансверсия (С → А) для аллеля 5 [5, 24]. Эти данные суммированы в табл. 1 и 2.

В ряде работ, где за основу нумерации аллелей по локусу HUMCD4 принята "нижняя" цепь, также допущены неточности: например, неправильная нумерация аллелей имеет место в работе [8], в которой частые для европеоидов аллели обозначены как 7, 8 и 12 и их размеры указаны соответственно как 130, 135 и 155 п. н. Между тем при использовании описанных авторами праймеров эти частые аллели должны иметь размеры 134, 139 и 159 п. н. и при правильной нумерации по "нижней" цепи должны быть обозначены как 4, 5 и 9.

Отметим, что в ранних работах [2, 25] как основу нумерации использовали "верхнюю" цепь, но со "сдвинутым" мотивом (СТТТТ), что должно было

Таблица 1

Различия в номенклатурном числе tandemных повторов в референтной последовательности U47924, обусловленные использованием разных повторяющихся мотивов

Источник литературы	Повторяющийся мотив, используемый как основа для нумерации аллелей	Число повторов в референтной последовательности U47924 согласно номенклатуре авторов
3—6, 21, 24, 27—29, 2, 25	TTTTC СТТТТ	10 11 с учетом 3'-фланкирующей последовательности верхней цепи (СТТСТТТТ)
22, 8, 11	AAAAG AAAAG	9 12 с учетом 5'-фланкирующей последовательности нижней цепи (AAGAAAAG)

Номенклатурные различия в характеристике аллелей локуса HUMCD4

Размер п. н.		Нумерация по верхней цепи по [21, 22]	Структура повтора по верхней цепи	Нумерация по нижней цепи	Структура повтора по нижней цепи по [21, 22]
по [2]	по [8]				
86	134	5	(TTTC) ₅	4	(AAAAG) ₄
91	139	6	(TTTC) ₆	5	(AAAAG) ₅
96	144	7	(TTTC) ₇	6	(AAAAG) ₆
101	149	8	(TTTC) ₈	7	(AAAAG) ₇
106	154	9	(TTTC) ₉	8	(AAAAG) ₈
106	154	9'	(TTTC) ₃ CTTC (TTTC) ₅	8'	(AAAAG) ₅ AAAGG (AAAAG) ₂
111	159	10	(TTTC) ₃ CTTC (TTTC) ₆	9	(AAAAG) ₆ AAAGG (AAAAG) ₂
116	164	11	(TTTC) ₃ CTTC (TTTC) ₇	10	(AAAAG) ₇ AAAGG (AAAAG) ₂
121	169	12	(TTTC) ₃ CTTC (TTTC) ₈	11	(AAAAG) ₈ AAAGG (AAAAG) ₂
126	174	13	(TTTC) ₃ CTTC (TTTC) ₉	12	(AAAAG) ₉ AAAGG (AAAAG) ₂

Примечание. Выделение жирным шрифтом — см. объяснение в тексте.

бы уменьшить число повторов до 9. Однако авторы включили в нумерацию 3'-фланкирующую последовательность верхней цепи тандемного блока, а именно участок CTTCCTTC как содержащий 2 дополнительных повтора — варианты делеционный (CTT) и полный (CTTC) (см. рис. 1). Заметим, что такой вариант нумерации вряд ли можно считать корректным, так как показано [4], что 3'-фланкирующая последовательность CTTCCTTC полностью совпадает у человека и высших приматов и поэтому ее не следует рассматривать как часть вариабельной области.

Изложенная выше аналитическая разработка вопроса с очевидностью указывает на необходимость унификации номенклатуры аллельных вариантов локуса HUMCD4. Учитывая рекомендации [20, 26], представляется целесообразным в качестве стандарта для локуса HUMCD4 принять номенклатуру, основанную на нумерации повторяющихся тандемных повторов по "верхней" цепи матричной ДНК и использованную в работах [4—6, 21, 24, 27—29]. В своей дальнейшей работе мы придерживались именно этой номенклатуры. Для энзиматической амплификации аллельных фрагментов на матрице ДНК локуса HUMCD4 мы использовали

праймерную систему, предложенную М. Edwards [2]. Этот выбор в значительной мере обусловлен тем, что в практическом плане более удобным является анализ коротких амплифицируемых фрагментов (уменьшается продолжительность электрофореза, улучшается разделение соседних аллельных фрагментов).

На рис. 2 показаны репрезентативные результаты типирования ПДАФ ДНК локуса HUMCD4. Молекулярные размеры и номенклатурные обозначения аллелей локуса HUMCD4 в использованной нами системе приведены в 2 выделенных столбцах в табл. 2.

В табл. 3 представлено распределение генотипов в исследованной выборке. Представлены только те генотипы, для которых число наблюдений отличалось от нулевых значений. Всего в исследованной выборке выявлено 16 (36%) из 45 возможных различных генотипов. При этом более половины наблюдений составили только 3 гетерозиготных генотипа: 5—6, 5—10 и 6—10 с частотами 23, 17 и 18% соответственно.

Ожидаемые значения для каждого генотипа рассчитывали с использованием экспериментально полученных значений аллельных частот (табл. 4),

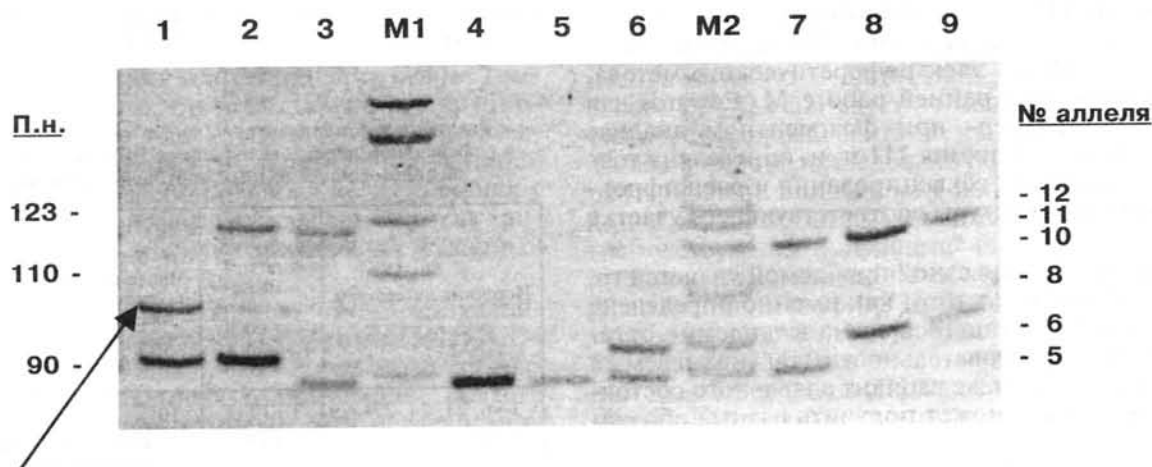


Рис. 2. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК (6% неденатурирующий ПААГ, окрашивание серебром). Результаты типирования ПДАФ ДНК локуса HUMCD4 для выборки из 9 человек, в которой представлены 5 аллельных вариантов, в том числе редкий вариант 8 (показан стрелкой). M1 — маркер молекулярных масс pBR322/MspI; M2 — аллельный маркер локуса HUMCD4, содержащий аллельные фрагменты 5, 6, 8, 10, 11, 12.

Таблица 3

Распределение генотипов локуса HUMCD4 в исследованной выборке

Генотип	Число случаев		Частота	
	наблюдаемое	ожидаемое	наблюдаемая	ожидаемая
4-10	1	0	0,002	0,001
5-5	55	50	0,135	0,123
5-6	94	102	0,231	0,249
5-7	2	1	0,005	0,002
5-9	2	1	0,005	0,002
5-10	71	71	0,174	0,175
5-11	6	8	0,015	0,021
5-12	1	2	0,002	0,005
6-6	53	51	0,130	0,126
6-7	0	1	0,000	0,002
6-8	1	0	0,002	0,001
6-9	0	1	0,000	0,002
6-10	73	72	0,179	0,177
6-11	13	9	0,032	0,021
6-12	2	2	0,005	0,005
10-10	25	25	0,061	0,062

исходя из предложения о том, что исследованная выборка удовлетворяет условию РХВ. Действительно, по результатам проведенных тестов, наблюдавшиеся распределение генотипов локуса HUMCD4 в исследованной выборке не отклонялось от РХВ ($p > 0,49$, точный тест). В целом следует отметить, что для этого маркера на большом популяционном материале показано отсутствие отклонений от РХВ.

Всего в исследованной выборке выявлено 9 аллелей. Наиболее частыми оказались аллели 5, 6 и 10, тогда как на долю остальных 6 аллелей пришлось всего 4,5% наблюдений. Распределение аллелей в целом являлось весьма сходным с аналогичными данными для других европеоидных популяций (см. например, [27]). Новые, т. е. не описанные ранее аллели не обнаружены, но следует отметить единичное наблюдение весьма редкого для всех изученных ранее популяций аллеля 4.

В порядке обсуждения отметим, что ранее [11] были определены частоты аллелей HUMCD4 в городских популяциях Москвы и Томска. Однако в этой работе приведена ошибочная номенклатура аллелей (см. табл. 1). Даже с учетом корректировки нумерации результаты авторов выглядят по меньшей мере спорными. Например, ими был выявлен аллель 2 (в обозначении авторов — аллель 4), су-

Таблица 4

Распределение аллелей локуса HUMCD4 в исследованной выборке

Аллель	Число наблюдений	Частота аллеля
4	1	0,001
5	286	0,351
6	289	0,355
7	2	0,002
8	1	0,001
9	2	0,002
10	203	0,249
11	24	0,029
12	6	0,007

Таблица 5

Значения основных популяционных характеристик локуса HUMCD4 в исследованной выборке

Оценочный параметр	Численное значение
Объем выборки	407
Выявленные аллели	4-12
Наблюдаемая гетерозиготность	0,673
Ожидаемая гетерозиготность	$0,688 \pm 0,006$
Вероятность случайного совпадения (MP)	0,156
Дискриминирующий потенциал (PD)	0,844
Потенциал исключения (PE)	0,388
Усредненный индекс отцовства (PI)	1,53
Индекс полиморфизма (PIC)	0,63

ществование которого на сегодняшний день не подтверждается ни в одной работе. Также неестественно высокой (46%) оказалась частота аллеля 5 (в обозначении аторов — аллель 7).

Значения основных популяционных характеристик локуса HUMCD4 в исследованной выборке приведены в табл. 5. Количественная оценка степени различий частотного распределения аллелей в данной выборке по сравнению с другими популяциями не являлась предметом настоящего исследования. Эта работа нами проводится, и данные будут опубликованы отдельно. Тем не менее уже сейчас на основании полученных показателей можно отметить, что значения основных популяционных параметров локуса HUMCD4 для исследованной выборки оказались сходными с аналогичными данными для некоторых других европеоидов. В целом сравнительный анализ показывает, что этот маркер является существенно более информативным для популяций негров и арабов, тогда как для монголоидов (японцев и китайцев) его информативность гораздо более низкая. Информативность HUMCD4 для русских сравнима с таковой молекулярно-генетических маркеров LPL и D5S818 [30, 31], но в разной степени уступает таким индивидуализирующим системам, как TH01, vWA, D3S1358, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D13S317, D7S820. Сходные данные по HUMCD4 в сравнении с другими микросателлитами получены для многих европейских популяций [28, 32-34].

Во всех исследованных случаях семейного анализа (более 300 мейозов) мутантные аллели не выявлены. Это согласуется с данными других авторов, свидетельствующих, что HUMCD4 наряду с такими маркерами, как FES, F13B и TH01, характеризуется редкостью мутаций и высокой стабильностью участка с тандемными повторами [21]. Это еще раз подтверждает ценность данного полиморфного хромосомного маркера как молекулярно-генетической индивидуализирующей системы.

Уточненная номенклатура аллелей и установленные в настоящей работе характеристики аллельного полиморфизма пентануклеотидного тандемного повтора HUMCD4 для выборки населения России могут быть использованы в качестве референтных параметров при интерпретации результатов молекулярно-генетических идентификационных экспертиз и исследований и создании баз данных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ansari-Lari M. A., Muzny D. M., Lu J.* et al. // *Genome Res.* — 1996. — Vol. 6, N 4. — P. 314–326.
2. *Edwards M. C., Clemens P. R., Tristan M.* et al. // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — Vol. 19. — P. 4791.
3. *Klitschar M., Kozma X., Al Hammadi N.* et al. // *Int. J. Legal Med.* — 1998. — Vol. 111. — P. 107–109.
4. *Tishkoff S. A., Dietsch E., Speed W.* et al. // *Science.* — 1996. — Vol. 271, — P. 1380–1387.
5. *Boutrand L., Egyed B., Füredi S.* et al. // *Int. J. Legal Med.* — 2001. — Vol. 114. — P. 295–297.
6. *Casarino L., Mannucci A., Kimpton C. P.* et al. // *Int. J. Legal Med.* — 1996. — Vol. 109, N 1. — P. 49–51.
7. *Cucurachi N.* // *Acta Biomed Ateneo Parmense.* — 1999. — Vol. 70, N 5–6. — P. 95–99.
8. *Hammond H. A., Jin L., Zhong Y.* et al. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1994. — Vol. 55. — P. 175–189.
9. *Klitschar M., Crevenna R.* // *J. Forens. Sci.* — 1997. — Vol. 42. — P. 907–910.
10. *Tofanelli S., Taglioli L., Varesi L., Paoli G.* // *Forens. Sci. Int.* — 2001. — Vol. 123, N 1. — P. 33–38.
11. *Туракулов Р. И., Чистяков Д. А., Одинокова О. Н., Носиков В. В.* // *Генетика.* — 1997. — Т. 33, № 7. — С. 979–985.
12. *Rolf B., Horst B., Eigel A.* et al. // *Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 102, N 6. — P. 647–652.
13. *Zamani M. G., De Hert M., Spaepen M.* et al. // *Am. J. Med. Genet.* — 1994. — Vol. 54, N 4. — P. 372–377.
14. *Ghabanbasani M. Z., Buysy I., Legius E.* et al. // *Clin. Exp. Immunol.* — 1994. — Vol. 97, N 3. — P. 517–521.
15. *Kristiansen O. P., Zamani M., Johannesen J.* et al. // *Diabetes.* — 1998. — Vol. 47, N 2. — P. 281–283.
16. *Иванов П. Л.* // *Суд.-мед. эксперт.* — 1999. № 4. — С. 35–41.
17. *Schneider S., Roessli D., Excoffier L.* // *Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland, 2000.*
18. *Lewis P. O., Zaykin D.* *Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c).* Free program distributed by the authors over the internet from <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>
19. *Tereba A.* // *Profiles in DNA.* — 1999. — Vol. 2, N 3. — P. 14–16.
20. *Gill P., Brinkmann B., d'Aloja E.* et al. // *Forens. Sci. Int.* — 1997. — Vol. 87. — P. 185–192.
21. *Brinkmann B., Klitschar M., Neuhuber F.* et al. // *Am. J. Hum. Genet.* — 1998. — Vol. 62. — P. 1408–1415.
22. *Glock B., Schwartz D. W. M., Schwartz-Jungl E. M., Nayr W. R.* // *Forens. Sci. Int.* — 1996. — Vol. 78, N 2. P. 125–130.
23. *Tagliabracci A., Buscemi L., Bianchi F.* et al. // *J. Forens. Sci.* — 1998. — Vol. 43, N 4. — P. 841–844.
24. *Watanabe G., Umetsu K., Yuasa I., Suzuki T.* // *J. Forens. Sci.* — 1998. — Vol. 43. — P. 733–737.
25. *Edwards M. C., Gibbs R. A.* // *Genomics.* — 1992. — Vol. 14, N 3. — P. 590–597.
26. *Bar W., Brinkmann B., Budowle B.* et al. // *Int. J. Legal Med.* — 1997. — Vol. 110. — P. 175–176.
27. *Huckenbeck W., Kuntze K., Scheil H.-G.* *The Distribution of the human DNA-PCR Polymorphisms.* — Verlag Dr. Köster, Berlin, 1997. — Vol. 4. — Suppl.: <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW.MedFak/Serology/dna.html>
28. *Pepinski W., Niemcunowicz-Janica A., Janica J.* et al. // *Med. Sci. Monit.* — 2001. — Vol. 7, N 1. — P. 130–133.
29. *Urguhart A., Kimpton C. P., Downes T. J., Gill P.* // *Int. J. Legal Med.*, — 1994. — Vol. 107. — P. 13–20.
30. *Корниенко И. В., Земскова Е. Ю., Фролова С. А. и др.* // *Суд.-мед. эксперт.* — 2002. — Т. 45, № 5. — С. 12–14.
31. *Kornienko I. V., Vodolazhsky D. I., Ivanov P. L.* // *Int. J. Legal Med.* — 2002. — Vol. 116, N 5. — P. 309–311.
32. *Fernandes A. T., Brehm A.* // *Forens. Sci. Int.* — 2002. — Vol. 129, N 1. — P. 72–74.
33. *Pawlowski R., Maciejewska A., Paszkowska R., Welz A.* // *Int. J. Legal Med.* — 1997. — Vol. 110. — P. 10–13.
34. *Szabo A., Achurenkamp M., Huhne J.* // *Int. J. Legal Med.* — 1998. — Vol. 111. — P. 49–51.