

ФАЛЕЕВА

Татьяна Георгиевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ
ПОТОЖИРОВЫХ СЛЕДОВ В ОТПЕЧАТКАХ ПАЛЬЦЕВ
НА КОЖЕ ЧЕЛОВЕКА**

3.3.5. Судебная медицина

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор **ИВАНОВ Игорь Николаевич**
доктор биологических наук **КОРНИЕНКО Игорь Валериевич**

Официальные оппоненты:

ПЕРЕПЕЧИНА Ирина Олеговна – доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра криминалистики, профессор кафедры
ГЛОТОВ Андрей Сергеевич – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», руководитель Отдела геномной медицины

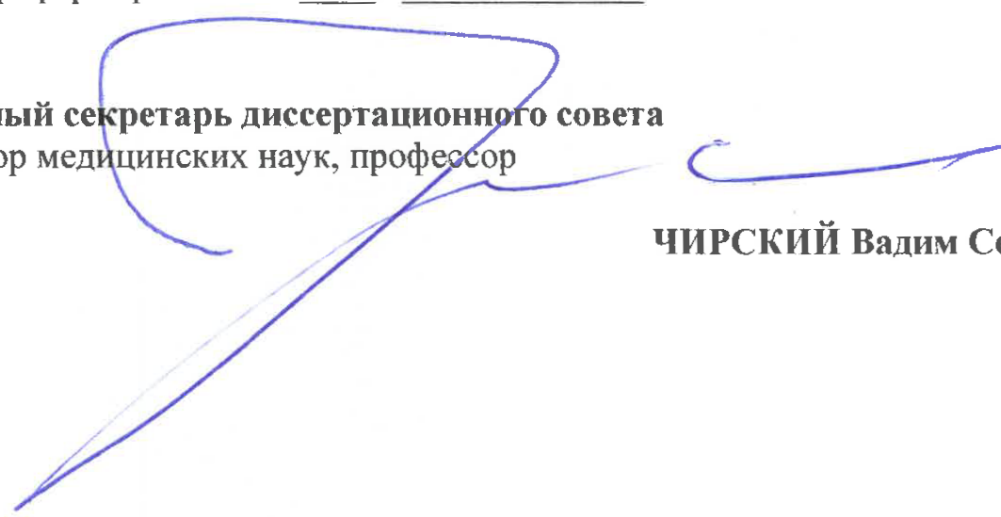
Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 24 января 2022 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета 07.2.002.02 в федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д.6)

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке и на официальном сайте ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» МО РФ

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор


ЧИРСКИЙ Вадим Семенович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Потожировые следы (ПЖС) человека, оставленные на коже другого лица во время совершения противоправных действий, являются весьма сложным объектом молекулярно-генетического исследования в судебно-медицинской экспертной практике (Перепечина И.О., 2002; Shin D.H., Argue D.G., 1976; Wiegand P., Kleiber M., 1997; Ruttly G.N., 2002). Это обусловлено низким содержанием в них генетического материала, который в значительной степени подвержен деградации из-за воздействия факторов внешней среды (Ашмарин И.П., 1977; Водолазкин Д.И. и соавт., 1987; Перепечина И.О., 1999, 2012; Schulz M.M., Reichert W., 2002; Lee S.B. et al., 2010; Quinones I., Daniel B., 2012). Идентификация следов рук также осложняется присутствием на поверхности кожи собственного потожирового вещества (ПЖВ), содержащего дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) (Моисеева Т.Ф., 2002; Водолазов А.В., Михайленко Г.В., 2014; Upadhyay S., Yadav B., 2019).

Применительно к контактными следам на коже человека молекулярно-генетический анализ представляет собой альтернативу дактилоскопии, поскольку в подобных случаях получить пригодные для криминалистического исследования отпечатки пальцев крайне сложно (Божченко А.П. и соавт., 2008; Delmas B.J., 1988; Hebrard J., Donche A., 1994; Trapecar M., Balazic J., 2007; Rozman K.B., et al., 2014; Kumar P. et al., 2015; Upadhyay S., Yadav B., 2019). К тому же специальная обработка, используемая для обнаружения латентных следов, может оказывать негативное воздействие на активность ДНК и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Родионова О.Р., Ларина А.А., 2019; Van Hoofstat D.E.O. et al., 1999; Schulz M.M., Reichert W., 2002; Van Oorschot R.A.H. et al., 2003; Raymond J.J. et al., 2004; Sewell J. et al., 2008; Thamnurak C. et al., 2011; Tozzo P. et al., 2014; Kumar P. et al., 2015; Khuu A. et al., 2018).

Изучение влияния на молекулярно-генетический анализ средств обнаружения, фиксации, сбора потожировых следов, а также условий их хранения, разработка методик выделения из них ДНК, интерпретация результатов генотипирования столь сложных объектов является актуальной научно-практической задачей. Для идентификации следов рук на коже человека необходима комплексная оптимизация подходов в методологии их исследования (Перепечина И.О., 2002, 2014, 2017, 2019).

Степень разработанности темы исследования

В судебно-медицинской практике при молекулярно-генетической идентификации личности в процессе расследования преступлений против жизни и здоровья граждан, таких как убийство, насильственные действия сексуального характера, изнасилование, причинение телесных повреждений, приходится исследовать потожировое вещество, отобранное с различных, чаще всего открытых участков тела (верхние конечности, шея, лицо) (Подпоринова Е.Э., 1997; Томилин В.В., Пашиных Г.А., 2001; Белых А.Н., 2008; Горянов Ю.И., 2010; Trapecar M., Balazic J., 2007; Trapecar M., 2009; Farash K. et al., 2015; Van den Berge M. et al., 2016), на предмет обнаружения в образцах постороннего генетического материала. Существующие методики выявления,

сбора контактных следов и экстракции из них ДНК способны затруднять получение идентификационно значимых результатов. Прежде всего, это связано с изначально малым количеством генетического материала в данных биологических объектах (Wiegand P., Kleiber M., 1997; Schulz M.M., Reichert W., 2002; Quinones I., Daniel B., 2012). Хранение отобранных следов в виде смывов без наличия защищающих от разрушения ДНК компонентов при комнатной температуре способствует значительной деградации активной ДНК-матрицы (Корниенко И.В. и соавт., 2001; Корниенко И.В., 2005; Корниенко И.В., Харламов С.Г., 2012; Lee S.B. et al., 2010).

В литературе подробно не описано влияние на ДНК-анализ средств обнаружения и изъятия потожировых следов при проведении их комплексного дактилоскопического и молекулярно-генетического исследования. Отсутствуют оптимизированные эффективные методики экстракции ДНК из потожирового вещества. Используемые методы хранения биологического материала энергоемки, требуют значительных материальных затрат и не позволяют надежно хранить ДНК в условиях комнатной температуры длительное время. Не разработаны рекомендации по оценке результатов генотипирования ДНК в смешанных следах, содержащих низкое количество генетического материала (Бадзюк И.Л. и соавт., 2012; Корниенко И.В., Харламов С.Г., 2012; Gill P. et al., 2000; Butler J.M., 2010, 2012).

Все вышеизложенное определило необходимость проведения настоящего исследования и его актуальность для идентификации личности в судебно-медицинской практике.

Цель исследования – оптимизация подходов молекулярно-генетического исследования ядерной ДНК потожировых следов в отпечатках пальцев на коже человека.

Задачи исследования

1. Оценить влияние на эффективность молекулярно-генетического исследования средств обнаружения и фиксации потожировых следов в отпечатках пальцев на коже человека.
2. Разработать методику сбора, хранения, пробоподготовки и экстракции ДНК из потожировых следов, оставленных на кожных покровах человека.
3. Оценить количество генетического материала в потожировом веществе на коже различных участков тела мужчин и женщин.
4. Установить возможности обнаружения генетического материала в потожировом веществе, оставленном на кожных покровах живых лиц и трупов.
5. Определить подходы к интерпретации результатов генотипирования препаратов ядерной ДНК, полученных из потожировых следов, оставленных на кожных покровах человека.

Научная новизна исследования

Подобраны средства обнаружения и фиксации потожировых следов человека, не оказывающие отрицательного влияния на выполнение молекулярно-генетического исследования. Предложена классификация исследованных дактилоскопических порошков по уровню ингибиторного воздействия на энзиматическую амплификацию.

Разработана оригинальная методика сбора, хранения и экстракции ДНК из потожировых следов человека на основе применения уникального ДНК-стабилизирующего раствора, позволяющая защищать генетический материал от деградации, минимизировать его потери и нивелировать действие ингибиторов в процессе пробоподготовки биологического образца.

Установлено содержание ядерной ДНК в потожировом веществе на кожных покровах различных участков тела мужчин и женщин. Оценена вероятность выявления генетического материала донора в потожировых следах, оставленных на поверхности искусственной кожи, коже живых лиц и трупов (реципиентов).

Определены подходы к интерпретации результатов генотипирования препаратов ядерной ДНК потожировых следов, оставленных на коже.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты исследования средств обнаружения и фиксации потожировых следов позволили определить материалы и реагенты, которые могут быть применены в экспертной практике при производстве комплексных дактилоскопических и молекулярно-генетических экспертиз.

Разработанный ДНК-стабилизирующий раствор обеспечивает длительный срок пригодности биологических следов, отобранных путем смыва на носитель, для проведения их молекулярно-генетического исследования. ДНК-стабилизирующий раствор может применяться в качестве растворителя в ходе судебно-биологического исследования образцов пота и не препятствует их последующему ДНК-анализу при производстве комплексной экспертизы объекта.

Потожировые следы рук мужчин более информативны для ДНК-идентификации по сравнению со следами рук женщин. Кожные покровы живых лиц выступают следовоспринимающей поверхностью, на которой выявление ДНК донора выше, чем на коже трупа при посмертном контакте.

Показано, что ДНК-идентификация потожировых следов, оставленных на коже человека, должна базироваться в основном на учете полиморфных аутосомных микросателлитных локусов размером не более 250 пар нуклеотидов (п.н.), а при исследовании локусов Y-хромосомы – размером не более 300 п.н. Сформулированные в диссертации подходы к интерпретации результатов генотипирования потожировых следов рекомендуются в качестве критериев оценки данных ДНК-анализа сложных биологических объектов в судебно-медицинской экспертной практике.

Материалы исследования могут быть применены в практической экспертной деятельности, а также в учебном процессе при профессиональной подготовке и повышении квалификации врачей судебно-медицинских экспертов, экспертов-генетиков, экспертов-криминалистов и работников правоохранительных органов.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы базируется на изучении литературы по теме исследования, использовании сравнительно-аналитических методов и статистической обработке полученных результатов.

Экспериментальные исследования выполнены в соответствии с действующим законодательством и нормативно-правовыми актами, регулирующими биомедицинские исследования с участием людей. На проведение исследований получено разрешение Локального Этического комитета ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России (протокол № 3 от 14.03.2018 г.). Используемые в работе методы исследования составили пять основных групп: методы обнаружения потожировых следов; методы фиксации, сбора и хранения потожировых следов; методы пробоподготовки и выделения ДНК из потожировых следов; генотипирование потожировых следов; ДНК-идентификация потожировых следов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Материалы и реагенты, используемые при физических и физико-химических методах выявления и фиксации потожировых следов человека, оказывающие минимальное негативное воздействие на ДНК-анализ, позволяют осуществлять комплексное дактилоскопическое и молекулярно-генетическое исследование.

2. Сбор, пробоподготовка и экстракция генетического материала из потожирового вещества с использованием разработанного ДНК-стабилизирующего раствора позволяет проводить комплексное судебно-биологическое и молекулярно-генетическое исследование, существенно увеличить сохранность ДНК в отобранных образцах, минимизировать ее потери и деградацию.

3. При молекулярно-генетической идентификации потожировых следов, оставленных на коже живых лиц и трупов, наиболее значимы полиморфные участки аутосомной ДНК размером не более 250 п.н., а при исследовании локусов Y-хромосомы – размером не более 300 п.н.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Объективность полученных результатов, обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, обеспечена достаточным количеством исследованного материала: изучением архивного материала (26546 судебно-медицинских исследований); проведением оценки влияния различных реагентов и материалов для работы со следами рук на энзиматическую амплификацию (495 объектов); анализом ДНК в потожировом веществе на коже человека (164 объекта); анализом ДНК в следах рук, оставленных на искусственной коже (199 объектов), при контакте доноров с кожными покровами живых лиц (116 объектов) и трупов (349 объектов), применением высокоинформативного молекулярно-генетического метода, выполнением компетентного статистического анализа с использованием компьютерных программ. При проведении исследования создана репрезентативная выборка данных по количеству генетического материала в образцах и результатам генотипирования в случаях контакта кожных покровов испытуемых.

Результаты исследования были представлены на заседаниях Петербургского научного общества судебных медиков (Санкт-Петербург, 2015, 2018), на региональных научных конференциях Северо-Запада России

«Актуальные вопросы теории и практики судебной медицины» (Санкт-Петербург, 2015, 2016, 2017, 2020, 2021), научно-практической конференции «Профилактическая и клиническая медицина 2021» (Санкт-Петербург, 2021), Всероссийских научно-практических конференциях «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 2017), «Аквакультура: мировой опыт и российские разработки» (Ростов-на-Дону, 2017), научно-практических конференциях с международным участием «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2013), «История Российского центра судебно-медицинской экспертизы в лицах и фактах, к 85-летию со дня образования» (Москва, 2017), «Горизонты медицинской науки» (Москва, 2017), «Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции» (Ростов-на-Дону, 2017), IV Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2018), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018).

Внедрение результатов исследования в практику

Полученные данные внедрены в практическую деятельность ГБУ РО «БСМЭ», СПб ГБУЗ «БСМЭ», Бюро судебно-медицинской экспертизы ФГБУ «СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России», филиала № 1 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО, а также в учебный процесс кафедры судебной медицины ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России.

Личный вклад автора в проведенное исследование

Автором лично исследованы 1323 объекта, полученные при контактных взаимодействиях кожных покровов 235 живых лиц и 84 трупов, а также при исследовании влияния различных реагентов и материалов для работы со следами рук на энзиматическую амплификацию (495 объектов). Выполнен анализ 21537 актов судебно-медицинских исследований (заключений эксперта) трупов по случаям насильственной смерти из архива СПб ГБУЗ «БСМЭ», а также 5009 судебно-медицинских молекулярно-генетических заключений эксперта и специалиста из архива отделения (молекулярно-генетической идентификации) филиала № 2 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО.

Проанализированы и обобщены данные отечественной и зарубежной литературы по избранной теме исследования. Выполнено планирование и проведены экспериментальные исследования, статистическая обработка и анализ полученных данных.

Публикации. Материалы диссертации изложены в 24 печатных работах, в том числе в 7 статьях в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Получен патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 208 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты собственных исследований, их обсуждение, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, который содержит 274 источника (94 отечественных и 180 зарубежных). Работа иллюстрирована одним приложением, 15 рисунками и 48 таблицами.

Конкурсная поддержка работы. Диссертационное исследование выполнено при поддержке Фонда содействия инновациям в рамках грантов по программам: «УМНИК» (тема «Разработка способа комплексной молекулярно-генетической и дерматоглифической идентификации потожировых следов», договор № 3138ГУ2/2014 от 06 августа 2014 года), «СТАРТ-1» и «СТАРТ-2» (тема «Разработка систем изъятия и длительного хранения ДНК-содержащего биологического материала», договоры № 1372ГС1/21619 от 23 июня 2016 года и № 2474ГС2/21619 от 10 апреля 2018 года).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводились на базах ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, научной лаборатории «Идентификации объектов биологического происхождения» АБиБ ЮФУ, ЮНЦ РАН, ГБУ РО «БСМЭ», СПб ГБУЗ «БСМЭ», филиала № 2 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО.

Исследовали следующий архивный материал:

- всего 21537 заключений за 2012-2016 гг., из которых 146 судебно-медицинских исследований (заключений эксперта) трупов из архива СПб ГБУЗ «БСМЭ» в случаях тупой травмы шеи при сдавлении её руками или петлей, а также закрытия отверстий рта и носа руками;

- всего 5009 заключений за 1998-2016 гг., из которых 258 судебно-медицинских молекулярно-генетических заключений эксперта и специалиста, где объектом исследования была ДНК ПЖС, из архива филиала № 2 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО.

Биологическим материалом для настоящей работы послужила ДНК мужчин и женщин в образцах ПЖВ, буккального эпителия и эпителия роговицы (у трупов), полученного у 235 живых лиц и 84 трупов, а также препараты стандартной ДНК К562 и ДНК человека из тест-набора «ХУ-Детект» (Синтол, Россия) (таблица 1).

Таблица 1. Характеристика исследуемых объектов

№ п/п	Источники ДНК	Пол	Возраст	Количество	
				человек	объектов
1	Доноры ПЖВ живые лица	мужчины	22-58	125	249
		женщины	18-46	58	235
2	Реципиенты ПЖВ живые лица	мужчины	22-48	32	116
		женщины	22-34	20	
3	Реципиенты ПЖВ трупы	мужчины	34-87	26	349
		женщины	36-91	58	
4	Стандартные препараты ДНК	нет	нет	нет	374
Всего				319	1323

Руки доноров ПЖВ не подвергались контакту с водой и очистке в среднем за 1 час до проведения эксперимента. Кожные покровы трупов, давность смерти которых составляла около суток, были исследованы до

аутопсии без предварительной санитарной обработки. В целях стандартизации количества материала, получаемого с поверхности кожи, использовали стерильные пластиковые трафареты, формирующие площадь «окна» 3 и 6 см².

Методы обнаружение ПЖС

Дактилоскопические порошки. Исследовали влияние на ПЦР широко распространенных порошков для дактилоскопии (ПД): черные немагнитный (ПД-Ч) и магнитный (ПМД-Ч); белые немагнитный (ПД-Б) и магнитный (ПМД-Б); серые магнитный (ПМД-С) и магнитный с люминофором (ПМДЛ-С); SPR – мелкодисперсный реагент (дисульфид молибдена); сажу, а также ПД фирмы «КримТехТрейд» («КТТ») (Россия): черный магнитный (ПМД-Ч), флуоресцентный зеленый магнитный (ПФМД-З), флуоресцентный красный немагнитный (ПФД-К) и двойного действия серебристый/черный немагнитный (ПДДД-СЧ).

Нингидрин. Проводили оценку влияния на ПЦР 0,1, 0,5, 2,5 и 5% растворов нингидрина на основе воды и ДНК-стабилизирующего раствора.

Цианоакрилат. Оценивали эффективность ПЦР в присутствии полимера, образующегося при взаимодействии эфиров цианакриловой кислоты (ЦАК) с ПЖВ следов, а также его растворителя – диметилсульфоксида (ДМСО), определяли эффективность извлечения ДНК из ПЖС, обработанных цианоакрилатом.

Пары йода. Проводили сравнительный анализ результатов ПЦР-РВ проб, полученных из ПЖС мужчин и женщин на искусственной коже, окуранных и неокуранных парами йода.

Методы сбора ПЖС

Дактилоскопические пленки и клейкие ленты. Исследовали влияние клейкого вещества (желатин/акрил) дактилоскопических пленок (ДП-1 (Альтаир, Россия), (SIRCHIE, США)), пленки для сбора и транспортировки микрочастиц (PCM-1) (Альтаир, Россия), дактилоскопического скотча «Fingerprint Lifting Tape» (Hangzhou Silver arrow Forensics Tech Ltd., Китай) и канцелярской клейкой ленты (BRAUBERG, Россия) на ПЦР.

Смыв на хлопчатобумажный носитель. Проводили оценку влияния материала носителя (бумаги для хроматографии FN100 и хлопчатобумажной ткани) на энзиматическую амплификацию при проведении «прямой» ПЦР.

Пробоподготовка и экстракция ДНК из ПЖС

Исследовали возможность применения разработанного ДНК-стабилизирующего раствора (патент № 2651937 от 04 мая 2017 г.) с целью установления пота и его групповой принадлежности, оценивали эффективность данного раствора в отношении сбора следов, стабилизации ДНК и влияния на ПЦР по сравнению с жидкими средами (деионизованной водой, 0,9% раствором хлорида натрия, 10% раствором уксусной кислоты), используемыми в судебно-медицинской экспертной практике. Экстракцию ДНК выполняли при помощи нуклеосорбции, органической экстракции, ионообменной смолы Chelex 100 и с использованием разработанной методики (Фалеева Т.Г. и соавт., 2017).

Определение качества и количества ДНК осуществляли при помощи ПЦР в режиме «реального времени» (ПЦР-РВ) на термоциклере с

мультиканальным детектором для оценки продуктов ПЦР iQ5 (Bio-Rad, США) с использованием наборов реагентов «ХУ-Детект» и «EVA Green» (Синтол, Россия), а также методом электрофореза в 1 и 2% агарозном геле.

Генотипирование объектов исследования выполняли с помощью тест-систем «AmpF_{STR}®IdentifilerPlus PCR Amplification Kit» (Applied Biosystems, США), «CO_rDIS Plus» и «CO_rDYS» (ГОРДИЗ, Россия). Электрофорез образцов проводили с помощью ДНК-анализатора ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, США).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программных пакетов STATISTICA 10 (Гельман В.Я., 2015), STADIA 6.5G/pro (Кулаичев А.П., 1999), EXCEL 2016. Оценку соответствия типа распределения выборок нормальному проводили путем проверки нулевой гипотезы об отсутствии различий между выборочным и нормальным распределениями. Статистически значимыми считались различия в случаях, если *p*-value в отдельно взятом тесте был ниже уровня значимости в 5% (0,05) (Лакин Г.Ф., 1990). В случаях когда распределение в выборках отличалось от нормального, рассчитывали медиану (Me) и процентилю P₂₅ и P₇₅. При оценке данных по значению критерия Манна-Уитни (U) использовали скорректированный Z-критерий Фишера. Корреляционный анализ для количественных переменных, не подчиняющихся закону нормального распределения, проводили с помощью коэффициента корреляции Спирмена (*r_s*) (Унгурияну Т.Н., Гржибовский А.М., 2011).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ архивного материала

Данные СПб ГБУЗ «БСМЭ» за 2012-2016 гг.

Исследованы случаи смерти от тупой травмы шеи в результате сдавления руками или петель, а также закрытия отверстий рта и носа руками. Полученные данные статистически однородны среди всех случаев насильственной смерти (*p* = 0,071 при $BF_{01} = 4 \times 10^{30}$) и относительно однородны среди случаев смерти от механической асфиксии (*p* = 0,043 при $BF_{01} = 3 \times 10^{13}$). Отмечено снижение смертности от удушения руками и закрытия отверстий рта и носа руками, достигшее наименьшего уровня в 2016 году (в 5,5 раз меньше по сравнению с 2012 годом) (таблица 2, рисунок 1).

Таблица 2. Анализ архивного материала СПб ГБУЗ «БСМЭ» за 2012-2016 гг.

Виды механической асфиксии	Число случаев	Процент случаев	
		относительно случаев смерти от механической асфиксии	относительно всех случаев насильственной смерти
Удушение руками, закрытие отверстий рта и носа руками	44	1,42%	0,2%
Удушение петель	102	3,3%	0,47%

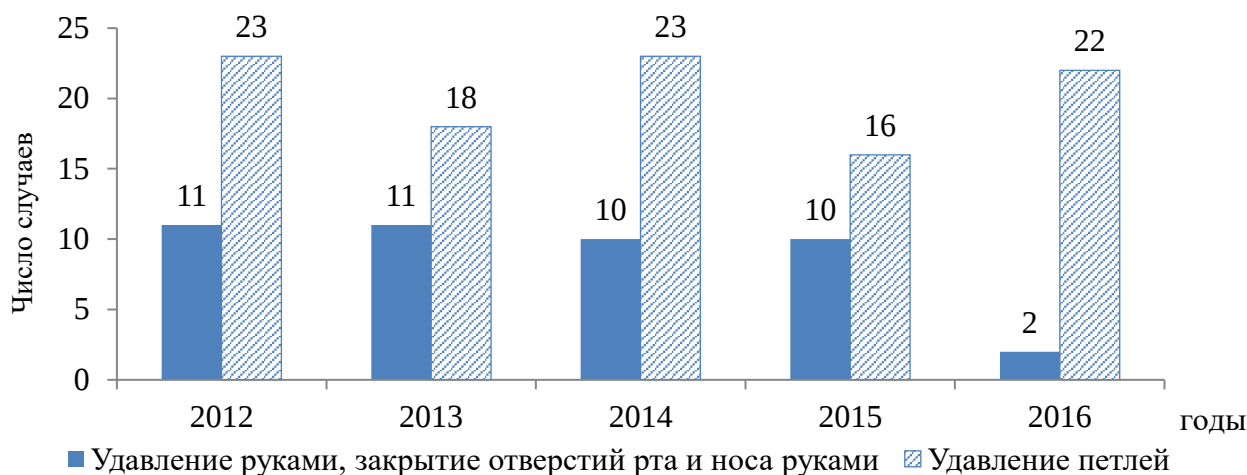


Рисунок 1. Случаи смерти от удушения руками и закрытия отверстий рта и носа руками, удушения петель в экспертной работе СПб ГБУЗ «БСМЭ» за 2012-2016 гг.

Данные филиала № 2 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО за 1998-2016 гг.

Анализ заключений отделения (молекулярно-генетической идентификации) показал, что только с 2003 года ПЖС стали рассматриваться в качестве объекта ДНК-идентификации. С 2003 по 2016 годы контактные следы были исследованы в 258 случаях (5,9%). Данные за период с 2003 по 2016 годы статистически неоднородны ($p = 7 \times 10^{-10}$ при $BF_{10} = 7 \times 10^9$). С 2012 года отмечается заметное увеличение числа исследований ПЖС. Максимальное количество таких заключений пришлось на 2013 год (16,18%). Доли объектов ПЖС в разные годы также статистически значимо высоко различались ($p = 6 \times 10^{-10}$) (рисунок 2).

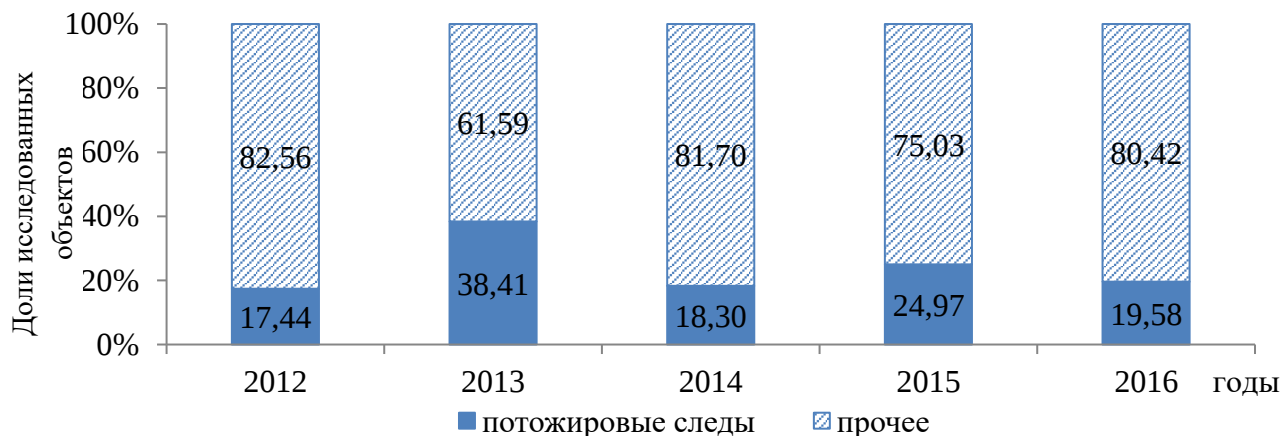


Рисунок 2. Доля ПЖС в качестве объекта ДНК-анализа по отношению к общему количеству объектов в экспертной работе отделения (молекулярно-генетической идентификации) филиала № 2 ФГКУ «111 ГГЦСМиКЭ» МО за 2012-2016 гг.

Особенности влияние средств обнаружения ПЖС на ПЦР

Исследование влияния дактилоскопических порошков на ПЦР

Установлено, что в одном отпечатке большого пальца взрослого человека в среднем может адсорбироваться от 4,7 до 12,8 мг порошка. Исследование

влияния ПД на эффективность ПЦР позволило разделить их на три группы: не ингибирующие, частично ингибирующие и ингибирующие ПЦР (таблица 3).

Таблица 3. Разделение ПД по их влиянию на эффективность ПЦР

Не ингибирующие ПЦР	Частично ингибирующие ПЦР	Ингибирующие ПЦР
<20%*	20-50%*	>50%*
1. ПМД-Ч 2. ПМД-Ч («КТТ») 3. SPR	1. ПД-Ч 2. ПМД-Б 3. ПМД-С 4. ПМДЛ-С 5. Сажа 6. ПДДД-СЧ («КТТ»)	1. ПД-Б 2. ПФМД-3 («КТТ») 3. ПФД-К («КТТ»)

Примечание: «*» – процент снижения активности ДНК-матрицы

Исследование влияния нингидрина на ПЦР

Анализ данных ПЦР-РВ проб с 0,1, 0,5, 2,5 и 5% растворами нингидрина по внутреннему положительному контролю показал наличие ингибиторного влияния на энзиматическую амплификацию уже 0,1% раствора нингидрина на основе деионизованной воды и ДНК-стабилизирующего раствора ($p = 0,008$). Бóльшее содержанием нингидрина привело к отсутствию ПЦР-продукта.

Исследование влияния цианоакрилата на ПЦР

Для исследования влияния цианоакрилата на ПЦР нами было определено, что при обработке следов, оставленных подушечками пальцев, в одном отпечатке площадью около 4 см² формируется в среднем $0,66 \pm 0,304$ мг ($n = 25$) полимера ЦАК. Проведение ПЦР-РВ с добавлением в реакционную смесь 1 мг полимера показало отсутствие снижения эффективности и ингибиторного влияния на амплификацию по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

Для оценки возможности извлечения ДНК из полимера ЦАК был испытан его эффективный растворитель – ДМСО. Добавление 4 и 8% ДМСО в амплификационную смесь привело к достоверному повышению эффективности реакции энзиматической амплификации ($p = 0,002$). Однако в пробах с 16% ДМСО, а также в смесях ДМСО с полимером ЦАК ампликон не был получен, что свидетельствует о выраженном ингибировании ПЦР.

Оценка доступности ДНК для исследования после обработки следов рук эфирами ЦАК показала возможность извлечения генетического материала из образованного полимера. Так, концентрации активной ДНК-матрицы в опытных и контрольных ПЖС не имели достоверных отличий ($p > 0,05$). Тем не менее в пробах ДНК из окуранных цианоакрилатом следов выявлено статистически значимое снижение эффективности ПЦР в 3,4 раза ($\Delta C_t = -1,89$, $p = 0,00001$) по сравнению с контролем.

Исследование влияния паров йода на ПЦР

Результаты ПЦР-РВ показали отсутствие статистически значимых отличий в количестве ДНК в следах рук, оставленных на искусственной коже, в зависимости от пола доноров ($p > 0,05$) и наличия обработки ПЖВ парами йода

($p > 0,05$). Не были получены достоверные отличия пороговых циклов кривых амплификации опытных и контрольных препаратов ($p > 0,05$), что подтвердило отсутствие ингибирования ПЦР в пробах ПЖС, окуранных парами йода.

Особенности влияния методов фиксации и сбора ПЖС на ПЦР

Исследование влияния дактилоскопических пленок и клейких лент на ПЦР

Исследование смывов клейкого вещества дактилоскопических пленок и клейких лент, используемых для сбора и фиксации ПЖС человека, методом ПЦР-РВ показало высокую активность ДНК-матрицы и отсутствие ингибиторного действия на энзиматическую амплификацию. Полученные результаты продемонстрировали отсутствие достоверных различий в пороговых циклах кривых ПЦР опытных проб по сравнению с контролем ($p > 0,05$), независимо от состава липкого слоя (желатиновый или акриловый).

Исследование влияния носителя на ПЦР

Исследование влияния на энзиматическую амплификацию предметоносителей, внесенных в реакционную смесь, по результатам «прямой» ПЦР-РВ показало отсутствие ингибиторного влияния на ПЦР проб с бумагой для хроматографии FN100 ($\Delta C_t = 0,88$, $p = 0,002$) и хлопчатобумажной тканью с плотным плетением волокон ($\Delta C_t = -0,26$, $p = 0,485$). Нити марли оказывали выраженное ингибиторное влияние на реакцию энзиматической амплификации и по внутреннему положительному контролю ПЦР-продукт не был получен. Поэтому при использовании марли в качестве предмета-носителя в процессе пробоподготовки биологического материала необходимо полностью избавиться от ее волокон перед постановкой ПЦР.

Исследование стабильности ДНК в смывах при хранении

Исследование стабильности генетического материала в сухом виде при комнатной температуре позволило выявить достоверные различия в концентрации ДНК при её хранении в течение 5, 7 и 30 суток в зависимости от растворителя, использованного при смыве – деионизованной воды или разработанного ДНК-стабилизирующего раствора ($p < 0,05$) (рисунок 3).

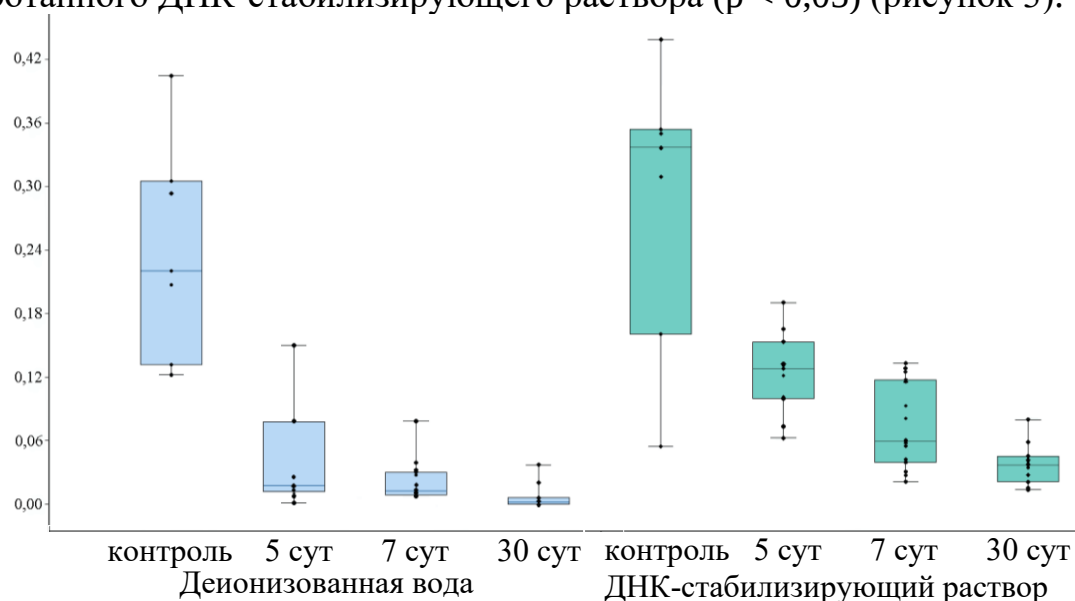


Рисунок 3. Деградация ДНК с течением времени в смывах, выполненных при помощи деионизованной воды и ДНК-стабилизирующего раствора

При применении ДНК-стабилизирующего раствора разница в концентрациях ДНК между 7 и 30 сутками была незначительной и недостоверной ($p > 0,05$). Тогда как при использовании деионизованной воды в ходе смыва на 30 сутки эксперимента ДНК-матрица практически отсутствовала на носителе.

При генотипировании ДНК, хранившейся в условиях отсутствия стабилизирующих её компонентов, отмечалось существенное уменьшение активности ДНК-матрицы с течением времени. Так, спустя 7 суток удалось идентифицировать 8,3% исследованных локусов ($n = 16$), а по истечении 30 суток – только 2% ($n = 12$). В смывах ДНК, выполненных ДНК-стабилизирующим раствором, хранившихся в аналогичных условиях, по прошествии 7 суток удалось идентифицировать аллели в 39% ($n = 32$) исследованных локусов, а через 30 суток – в 32% ($n = 24$).

Исследование жидкостей, применяемых для установления пота, его групповой принадлежности, и оценка их влияния на сохранность ДНК и ПЦР

Нами предложено применение разработанного ДНК-стабилизирующего раствора с целью установления пота и его групповой принадлежности, проведено сравнение с деионизованной водой, 0,9% раствором хлорида натрия и 10% раствором уксусной кислоты, оценено влияние данных сред на ПЦР и сохранность ДНК в сухом и жидком виде. Результаты исследований показали состоятельность всех сравниваемых жидких сред для установления наличия пота методом вертикальной тонкослойной хроматографии. Получена положительная реакция на присутствие в образцах свободного серина с равной интенсивностью. В дальнейшем во всех смывах пота, полученных в ходе данного испытания, удалось определить его групповую принадлежность.

Показано отсутствие статистически значимых отличий концентрации ДНК и пороговых циклов кривых ПЦР в препаратах на основе ДНК-стабилизирующего раствора, находящихся в жидком ($p > 0,05$) и сухом ($p > 0,05$) виде в течение суток, по сравнению с контролем. Хранение ДНК в присутствии компонентов, входящих в состав разработанного ДНК-стабилизирующего раствора, в сухом виде позволило получить более чем в 1,5 раза больше эффективной ДНК-матрицы по сравнению с препаратами ДНК, которые хранились в жидком виде ($p = 0,002$).

Подтверждено ингибиторное действие на энзиматическую амплификацию 0,9% раствора хлорида натрия в препаратах ДНК, хранившихся в жидком ($\Delta C_t = -1,98$, $p = 0,002$) виде, по отношению к контролю. Во всех препаратах ДНК на основе 10% раствора уксусной кислоты отсутствовал продукт амплификации, наблюдалось полное ингибирование ПЦР.

Сравнительная оценка эффективности методов выделения ДНК из объектов с малым её содержанием

Проводили сравнение методов выделения ДНК, основанных на нуклеосорбции в присутствии магнитных частиц (наборы реагентов «PrepFiler™» (Applied Biosystems, США) и «DNA IQ™ System» (Promega, США)), с собственной методикой с применением ДНК-стабилизирующего раствора. Результаты испытания показали, что компоненты, входящие в состав

разработанной жидкой буферной композиции, стабилизируют молекулы ДНК и обеспечивают её защиту от деградации, а также потерь в процессе пробоподготовки и экстракции. Выделение ДНК методом нуклеосорбции сопровождалось значительными её потерями и отличалось слабой защитой нуклеиновых кислот от деградации в процессе инкубации проб в условиях высоких температур. При проведении электрофореза в 1% геле агарозы это проявлялось в виде «шмера» низкомолекулярной ДНК (рисунок 4).

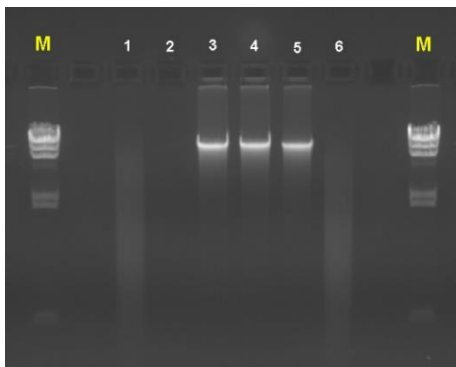


Рисунок 4. Результаты электрофореза в 1% геле агарозы препаратов ДНК, полученных при помощи наборов реагентов «PrepFiler™» (1), «DNA IQ™» (2) и ДНК-стабилизирующего раствора (3, 4): М – размерный стандарт, контроль с инкубацией в течение 30 минут при 22°C (5) и при 70°C (6)

Исследование количества ДНК в ПЖВ на кожных покровах человека

Для оценки возможности обнаружения ДНК в ПЖС, оставленных при контакте донора с кожными покровами реципиента, проведено исследование изначального содержания генетического материала в ПЖВ на подушечках пальцев и ладонях кистей рук, предплечье, шею мужчин и женщин. Определено нормированное количество ДНК (нг) в ПЖВ в пересчете на 1 см² исследуемого участка кожных покровов (таблица 4).

Таблица 4. Нормированное количество ДНК в ПЖВ на поверхности кожи различных участков тела мужчин и женщин (нг/см²)

Участок тела	Мужчины			Женщины		
	Me	P ₂₅	P ₇₅	Me	P ₂₅	P ₇₅
x1	2,252	2,135	2,935	1,983	0,654	8,182
x2	1,109	0,438	1,985	1,601	0,587	3,107
x3	0,586	0,370	0,874	3,719	1,525	5,186
x4	0,648	0,316	1,614	2,057	0,990	2,470
x5	1,199	0,723	2,174	1,709	0,750	2,142
x1-x5	0,882	0,427	2,135	1,983	0,744	3,489
x6	0,661	0,515	2,940	2,053	1,027	3,446
x7	1,150	0,632	2,280	1,211	0,458	1,905
x8	1,771	0,441	2,687	2,405	1,223	3,433

Примечание: подушечки большого (x1), указательного (x2), среднего (x3), безымянного (x4) пальцев кисти и мизинца (x5), ладонь (x6), передняя поверхность предплечья (x7), шея (x8), «x1-x5» – усредненное значение количества ДНК в ПЖВ на 1 см² поверхности всех подушечек пальцев

Установлено достоверное преобладание ДНК в ПЖВ на подушечках пальцев у женщин ($Me = 1,983$, $P_{25} = 0,744$, $P_{75} = 3,489$, $n = 46$) по сравнению с мужчинами ($Me = 0,882$, $P_{25} = 0,427$, $P_{75} = 2,135$, $n = 46$) ($U = 785$, $Z = -2,13$, $p = 0,033$). В ПЖВ ладоней, предплечий и шеи не было обнаружено различий ($p > 0,05$) по содержанию ДНК в зависимости от пола. Не наблюдались статистически значимые отличия в количестве генетического материала, содержащегося в ПЖВ, в зависимости от правой или левой верхней конечности, области шеи ($p > 0,05$) и подушечки пальца ($p > 0,05$), отдельно у мужчин и женщин. Так же установлено отсутствие различий в количестве ДНК ПЖВ на поверхности исследованных участков тела у мужчин ($p > 0,05$). У женщин наблюдалось лишь различие в количестве генетического материала на поверхности подушечек пальцев и предплечий ($U = 227$, $Z = 2,26$, $p = 0,023$).

ДНК-идентификация личности по ПЖВ на искусственной коже

Количественный анализ методом ПЦР-РВ коротких фрагментов ДНК (82 и 120 п.н.) в ПЖВ, оставленном подушечками пальцев (площадь 6 см²) на поверхности искусственной кожи, показал наличие статистически значимых различий у доноров разного пола. В следах мужчин ($Me = 0,394$, $P_{25} = 0,152$, $P_{75} = 1,087$, $n = 97$) наблюдалось большее количество ДНК (нг) по сравнению со следами женщин ($Me = 0,163$, $P_{25} = 0,036$, $P_{75} = 0,538$, $n = 45$) ($U = 1325$, $Z = 3,76$, $p = 0,0001$). При этом не отмечены различия в количестве ДНК в пробах, полученных путем смыва ПЖВ с использованием ДНК-стабилизирующего раствора или деионизованной воды ($p > 0,05$), а также в зависимости от режима температурной инкубации проб в процессе пробоподготовки (22°C в течение 30 минут (контроль), или 70°C в течение 30 минут, или 99°C в течение 8 минут) ($p > 0,05$) как у мужчин, так и у женщин.

При генотипировании аутомомных полиморфных микросателлитных локусов ДНК ПЖВ, оставленного на искусственной коже, наиболее информативные профили лиц обоего пола были получены в пробах, отобранных путем смыва с использованием ДНК-стабилизирующего раствора, по сравнению с деионизованной водой ($p < 0,05$). Применение ДНК-стабилизирующего раствора показало, что процент локусов, в которых обнаружены аутентичные генотипу донора генетические признаки, был выше у мужчин ($Me = 56,25$, $P_{25} = 31,25$, $P_{75} = 62,5$) по сравнению с женщинами ($Me = 33,33$, $P_{25} = 8,33$, $P_{75} = 50$). Выявлены достоверные отличия по половой принадлежности доноров в отношении процента обнаружения аутентичных донору аллелей ($U = 84$, $Z = 2,81$, $p = 0,004$) и процента отсутствия продукта амплификации ($U = 107$, $Z = -2,14$, $p = 0,032$). Использование деионизованной воды в качестве жидкой среды для производства смыва ПЖВ показало отсутствие статистически значимых отличий между мужчинами и женщинами в результатах типирования STR-локусов ($p > 0,05$). Отмечено, что во всех случаях появление неаутентичных аллелей в профилях не зависело ни от пола, ни от жидкой среды, которой осуществляли смыв ($p > 0,05$).

Результаты генотипирования ПЖВ, оставленного на искусственной коже, позволили определить наличие достоверной корреляции между длиной исследуемых аутомомных полиморфных микросателлитных участков ДНК и

процентом локусов, в которых были выявлены аутентичные аллели донора. Наибольшая сила связи отмечалась у доноров обоего пола в пробах ДНК, полученных из ПЖВ путем смыва с использованием ДНК-стабилизирующего раствора. Обнаружена отрицательная статистически значимая связь между процентом выявления свойственных донору аллелей и длиной исследуемых участков ДНК у мужчин умеренной (с учетом локусов длиной свыше 300 п.н.), а у женщин высокой (с учетом локусов длиной свыше 250 п.н.) силы. Наличие такой отрицательной корреляционной связи указывает на то, что процент успешных амплификаций обратно пропорционален размеру амплифицируемого локуса, то есть чем меньше длина исследуемого участка ДНК, тем выше шанс выявить аутентичный генотип донора. При отборе ПЖВ с искусственной кожи с использованием деионизованной воды такая корреляция отсутствовала.

ДНК-идентификация личности по ПЖВ на кожных покровах живых лиц

Анализ данных генотипирования аутосомных микросателлитных локусов ДНК следов контакта кожных покровов мужчин доноров ПЖВ с живыми реципиентами показал, что пол последних не оказывает влияние на результат выявления ДНК донора в смеси ($p > 0,05$). Присущие донорам генетические признаки были выявлены на теле живых мужчин реципиентов в 50%, на теле женщин – в 53,33% исследованных локусов. Эффект выпадения аллелей доноров отмечали в 20% и 16,67% локусах при контакте с мужчинами и женщинами реципиентами соответственно, а их полное отсутствие – в 26,67% локусов в отношении реципиентов обоего пола (рисунок 5).

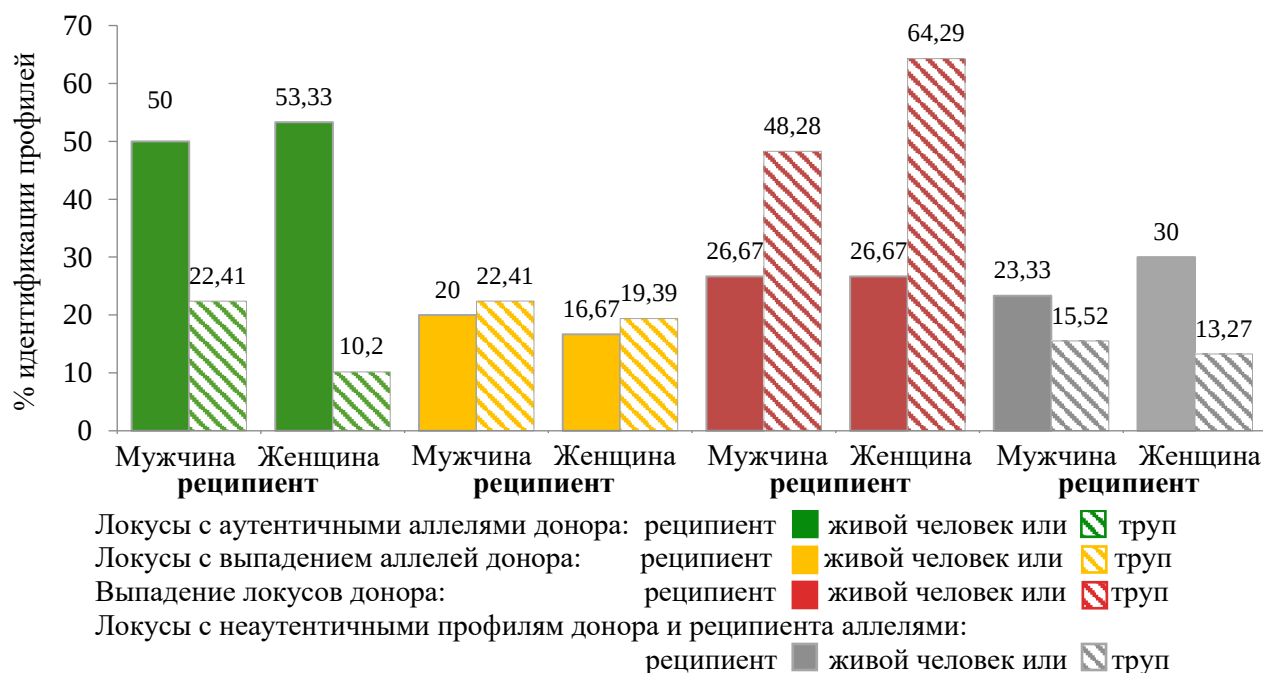


Рисунок 5. Идентификация аутосомных локусов ПЖС донора на коже живых лиц и трупов (Me, %)

Процент выявления аутентичных профилям реципиентов аллелей достоверно различался в зависимости от их половой принадлежности и был выше у мужчин (Me = 63,33, P_{25} = 60, P_{75} = 76,67) по сравнению с женщинами (Me = 53,33, P_{25} = 50, P_{75} = 63,33) (U = 86, Z = 2,76, p = 0,005). Выпадение

аллелей чаще отмечалось у женщин реципиентов (в 16,67% локусов) по сравнению с мужчинами (в 10% локусов) ($U = 88,5$, $Z = -2,70$, $p = 0,006$). Отсутствие всех аллельных комбинаций, присущих генотипам реципиентов, не отличалось по полу и наблюдалось в 20% локусов у мужчин и в 26,67% локусов у женщин ($p > 0,05$). Обнаружение несвойственных генотипам доноров и реципиентов аллелей не зависело от половой принадлежности последних ($p > 0,05$) и было выявлено в 23,33% локусов при контакте доноров с мужчинами и в 30% локусов при контакте с женщинами (рисунок 5).

Идентификация генетических признаков доноров в местах контакта с кожными покровами реципиентов зависела от размеров исследуемых фрагментов ДНК. В отношении выявления аутентичных профилей доноров аллелей отмечалась достоверная отрицательная высокая теснота корреляционной связи во всем исследованном диапазоне длин локусов ($p < 0,001$). С уменьшением размера амплифицируемого локуса наблюдалось повышение эффективности ПЦР и, соответственно, надежность для интерпретации результатов энзиматической амплификации.

Типирование полиморфных STR-локусов Y-хромосомы ПЖВ, оставленного донорами на коже женщин реципиентов, позволило идентифицировать аллели мужчин в 53,33% локусов. Несвойственные профилям доноров аллели обнаружены в 26,67% участков ДНК (рисунок 6).

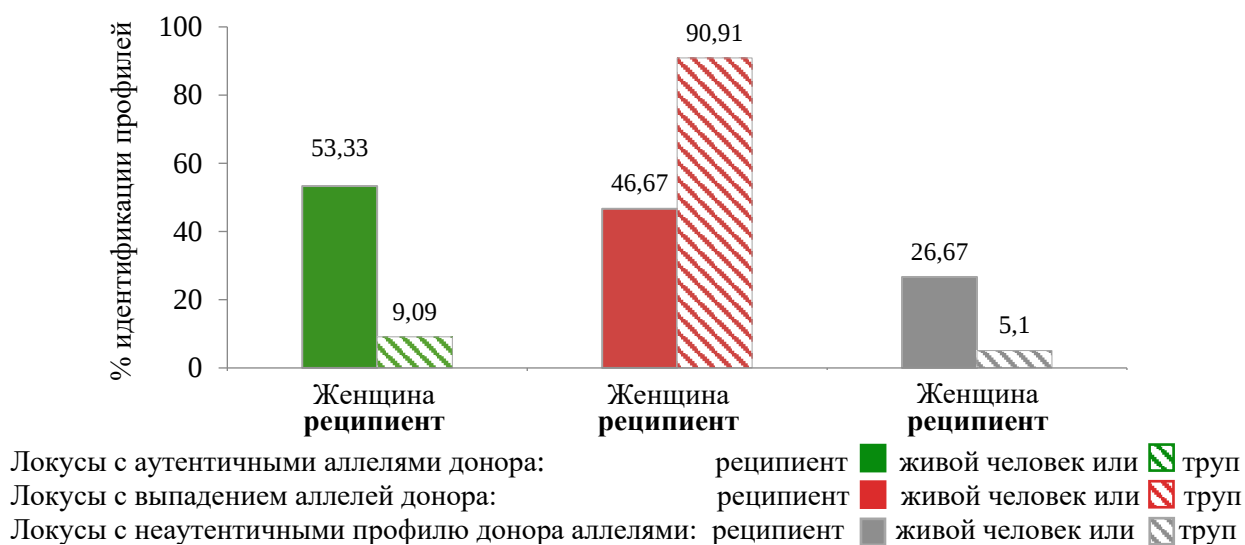


Рисунок 6. Идентификация локусов Y-хромосомы ПЖС донора на коже живых лиц и трупов женщин (Me, %)

Установлена достоверная отрицательная корреляция умеренной силы между выявлением аутентичных аллелей, свойственных Y-гаплотипам доноров, и максимальными значениями длин анализированных Y-STR локусов, размером более 300 п.н. Для STR-локусов Y-хромосомы, размер которых не превышал 300 п.н., такая корреляционная связь отсутствовала, то есть эффективность ПЦР не зависела от длины ампликонов.

ДНК-идентификация личности по ПЖВ на кожных покровах трупов

При идентификации профилей мужчин доноров в местах их контакта с кожными покровами трупов реципиентов не обнаружено достоверных различий

в результатах генотипирования микросателлитных локусов аутосомной ДНК в зависимости от пола реципиентов ($p > 0,05$). Аллели, свойственные генотипам доноров, были получены в 22,41% и 10,20% локусов, эффект выпадения аллелей доноров наблюдали в 22,41% и 19,39% локусов, а их полное отсутствие – в 48,28% и 64,29% локусов при контакте с мужчинами и женщинами реципиентами соответственно (рисунок 5).

По результатам генотипирования не было выявлено статистически значимых отличий в отношении обнаружения аутентичных профилям реципиентов аллелей (у мужчин 51,72%, у женщин 38,78% локусов), а также полного их отсутствия (у мужчин 31,11%, у женщин 41,84% локусов) в зависимости от половой принадлежности ($p > 0,05$). У мужчин реципиентов чаще наблюдали эффект выпадения аллелей (15,52% локусов) по сравнению с женщинами (7,14% локусов) ($U = 54$, $Z = 2,41$, $p = 0,015$). Появление неаутентичных профилям доноров и реципиентов аллелей не зависело от половой принадлежности последних ($p > 0,05$) и отмечалось в 15,52% локусов при контакте с трупами мужчин и в 13,27% локусов – с трупами женщин реципиентов (рисунок 5).

Установлена достоверная отрицательная корреляционная связь высокой силы в отношении обнаружения аутентичных профилям доноров аллелей и длиной локусов свыше 200 п.н. ($p < 0,05$). Соответствующая корреляционная связь наблюдалась и в отношении выявления неаутентичных профилям доноров и реципиентов аллелей, а также профилей трупов женщин реципиентов. У мужчин реципиентов отрицательная корреляция высокой силы начиналась в локусах длиной свыше 250 п.н.

Генотипирование микросателлитных участков Y-хромосомы ПЖВ, оставленного мужчинами на трупах женщин, позволило выявить аутентичные профилям доноров аллели в 9,09% Y-STR локусов, а наличие несвойственных профилю донора аллелей в 5,1% Y-STR локусов (рисунок 6).

Обнаружена достоверная отрицательная корреляция умеренной силы между процентом Y-STR локусов с аутентичными аллелями доноров и длиной ампликонов свыше 300 п.н. Полученные данные согласуются с результатами корреляционного анализа по идентификации Y-хромосомы мужчин на теле живых женщин реципиентов. Однако выявление генетических признаков доноров при типировании локусов Y-хромосомы в местах их контакта с живыми реципиентами ($Me = 53,33$, $P_{25} = 46,67$, $P_{75} = 63,33$) было значительно выше, по сравнению с теми случаями, когда в качестве реципиента выступали трупы ($Me = 9,09$, $P_{25} = 3,80$, $P_{75} = 18,99$) ($p = 0,00000004$).

Применение разработанной методики в экспертной практике

Применение разработанной нами методики сбора, пробоподготовки и экстракции ДНК из ПЖВ (Фалеева Т.Г. и соавт., 2017) в судебно-медицинской экспертной практике за 2016-2018 годы позволило снизить процент отсутствия продукта амплификации при генотипировании следов рук в 2,5 раза и повысить процент ДНК-идентификации разыскиваемого лица в среднем в 1,6 раза по сравнению с результатами, полученными без использования ДНК-стабилизирующего раствора в 2011-2015 годах.

ВЫВОДЫ

1. Комплексное исследование следов рук может включать одновременно их дактилоскопию, судебно-биологическую и молекулярно-генетическую экспертизу, требует применения материалов, которые не ингибируют ПЦР. Для выявления потожировых следов целесообразно использовать черные магнитные нелюминесцентные дактилоскопические порошки, мелкодисперсный реагент SPR и окуривание парами йода, а для фиксации контактных следов – дактилоскопические пленки и клейкие ленты.

2. Сбор и пробоподготовка потожировых следов путем смыва с использованием разработанного ДНК-стабилизирующего раствора, включающего мягкие детергенты и активаторы ПЦР, позволяют получить больше генетического материала по сравнению с использованием стандартных растворителей (деионизированной воды и 0,9% раствора хлорида натрия), обеспечивать сохранность ДНК в течение месяца в смывах без существенной ее деградации.

3. Значимых различий в концентрации ДНК на подушечках каждого пальца в отдельности как у мужчин, так и у женщин не установлено ($p > 0,05$). Вместе с тем количество ядерной ДНК на подушечках пальцев женщин выше, чем у мужчин ($p < 0,05$). Содержание ДНК на ладонях, предплечьях и шее отдельно у мужчин и женщин, а также между ними различий не имело ($p > 0,05$). Не обнаружены достоверные отличия в количестве генетического материала на всех исследованных участках тела в зависимости от доминирующей руки ($p > 0,05$) отдельно у лиц обоего пола.

4. В следах подушечек пальцев рук мужчин на искусственной коже выявлено в 2,4 раза больше ДНК, по сравнению со следами женщин ($p < 0,0005$). После контакта донора мужского пола с реципиентом вероятность обнаружения оставленного генетического профиля на коже живых лиц по аутосомным микросателлитным локусам выше в 3,2 раза ($p < 0,05$), а по микросателлитным локусам Y-хромосомы – в 5,9 раз ($p < 0,05$), по сравнению с кожей трупов.

5. При молекулярно-генетической идентификации потожировых следов на кожных покровах человека необходимо учитывать возможные артефакты, такие как отсутствие продукта амплификации, вставки и выпадения аллелей, вследствие малых концентраций ДНК. Для установления факта присутствия постороннего генетического материала в потожировом веществе на кожных покровах человека необходимо, прежде всего, оценить результаты типирования микросателлитных локусов аутосомной ДНК размером не более 250 п.н., а при исследовании Y-хромосомы – микросателлитных локусов размером не более 300 п.н.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для выявления потожировых следов на поверхности кожи человека при комплексном дактилоскопическом и молекулярно-генетическом исследовании целесообразно применять черный нелюминесцентный дактилоскопический магнитный порошок, мелкодисперсный реагент SPR, окуривание парами йода.

2. Сбор следов рук, обнаруженных на коже человека, осуществляют путем смыва на хлопчатобумажный носитель, пропитанный ДНК-стабилизирующим раствором, в состав которого входят: 10 мМ трис (гидроксиметил) аминометан, 0,5% об. Твин 20, 50 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 5% глицерин и 0,1% NaN_3 (патент № 2651937 от 04 мая 2017 г.). При фиксации и сборе потожировых следов в качестве носителя также могут быть пригодны: хроматографическая бумага, дактилоскопические пленки и клейкие ленты.

3. При комплексном судебно-биологическом и молекулярно-генетическом исследовании пота рекомендуется использовать разработанный ДНК-стабилизирующий раствор в ходе установления наличия пота, определения его групповой принадлежности и дальнейшей пробоподготовки для ДНК-анализа.

4. Пробоподготовку и экстракцию ДНК из смывов потожирового вещества, выполненных с использованием ДНК-стабилизирующего раствора, следует осуществлять согласно разработанной нами методике (Фалеева Т.Г. и соавт., 2017). Контактные следы, отобранные на хроматографическую бумагу, могут подвергаться «прямой» ПЦР без дополнительной очистки и экстракции ДНК.

5. Дальнейшие этапы молекулярно-генетического исследования выполняют согласно стандартным протоколам: определяют концентрацию экстрагированной ДНК, оценивают наличие ингибиторов в пробах, проводят генотипирование и анализ полученных генетических профилей.

6. При анализе генетических профилей в первую очередь учитывают результаты типирования микросателлитных локусов аутосомной ДНК размером не более 250 п.н., а микросателлитных локусов Y-хромосомы – размером не более 300 п.н.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Корниенко, И.В. Усовершенствованный метод выделения ДНК человека из биологических образцов, содержащих малое количество генетического материала, с помощью набора реагентов DNA IQ (PROMEGA) / И.В. Корниенко, Т.Г. Фалеева // Клинико-лабораторный консилиум. – 2013. – Т. 47, № 4. – С. 49-53.

2. Корниенко, И.В. Особенности выделения ДНК из сложных биологических образцов при помощи нуклеосорбции / И.В. Корниенко, Т.Г. Фалеева // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: мат. V Междунар. науч.-практ. конф. – Ростов н/Д, 2013. – С. 169-170.

3. Корниенко, И.В. О стабильности образцов крови, иммобилизованных на ФТА-картах при их длительном хранении / И.В. Корниенко, Т.Г. Фалеева, С.С. Бачурин, Д.А. Гудков, Е.А. Гурулева, П.Л. Иванов // Судебно-медицинская экспертиза. – 2014. – Т. 57, № 4. – С. 28-30.

4. Фалеева, Т.Г. Сравнительное исследование методов изъятия и выделения ДНК из потожировых наложений, находящихся на поверхности металлических предметов (на примере результатов судебной молекулярно-генетической экспертизы) / Т.Г. Фалеева, Е.С. Мишин, И.Н. Иванов, И.В.

Корниенко // Труды Петербургского научного общества судебных медиков (Теория и практика судебной медицины) / под ред. проф. И.Н. Иванова. – СПб.: ООО «ИПК «Береста»», 2015. – Вып. 11. – С. 124-127.

5. Захарова, Т.А. Полиморфизм микросателлитных локусов Y-хромосомы у русского населения Ростовской области / Т.А. Захарова, Т.Г. Фалеева, Н.В. Внукова, Г.И. Марьяскина, А.В. Усатов, И.В. Корниенко // Валеология. – 2015. – № 4. – С. 20-24.

6. Фалеева, Т.Г. Проблемы молекулярно-генетической идентификации потожировых следов отпечатков пальцев человека / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, Н.В. Внукова, И.В. Корниенко // Судебно-медицинская экспертиза. – 2016. – Т. 59, № 2. – С. 14-18.

7. Фалеева, Т.Г. Исследование влияния дактилоскопических порошков на ДНК / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Мечниковские чтения-2016: мат. 89 конф. студ. науч. общ. – СПб., 2016. Ч. II. – С. 125.

8. Фалеева, Т.Г. Оценка результатов молекулярно-генетических исследований потожировых следов человека в экспертной практике / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // История Российского центра судебно-медицинской экспертизы в лицах и фактах, к 85-летию со дня образования: сб. Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. уч. (Москва, 24-25 ноября 2016 г.) / под общ. ред. д.м.н. А.В. Ковалева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – Т. 2. – С. 220-224.

9. Фалеева, Т.Г. Влияние дактилоскопических порошков на эффективность энзиматической амплификации ДНК / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Библиотека криминалиста. Научный журнал. – 2017. – № 3. – С. 251-256.

10. Фалеева, Т.Г. Потожировые следы человека как объект ДНК-идентификации личности / Т.Г. Фалеева // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2017. – Т. 9, № 2. – С. 78-84.

11. Фалеева, Т.Г. Исследование количества ДНК в потожировом веществе, оставленном человеком на поверхности объектов из искусственной кожи / Т.Г. Фалеева // Горизонты медицинской науки: мат. VIII Конф. молодых ученых РМАНПО с междунар. уч. – М., 2017. – Т. II. – С. 225-226.

12. Фалеева, Т.Г. Деградация ДНК в смывах с течением времени / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Молекулярная диагностика 2017: мат. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч. / под ред. академика РАН В. И. Покровского. – М., 2017. – Т. I. – С. 413-414.

13. Фалеева, Т.Г. Определение концентрации ДНК в потожировом веществе на коже рук человека (пилотное исследование) / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Молекулярная диагностика 2017: мат. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч. / под ред. академика РАН В. И. Покровского. – М., 2017. – Т. I. – С. 421-422.

14. Бачурин, С.С. Разработка антимикробной защиты для хранения ДНК на твердом бумажном носителе / С.С. Бачурин, Т.Г. Фалеева, И.В. Корниенко //

Молекулярная диагностика 2017: мат. IX Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч. / под ред. академика РАН В. И. Покровского. – М., 2017. – Т. II. – С. 488-489.

15. Фалеева, Т.Г. ДНК-идентификация чужеродного потожирового вещества на коже человека / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Генетика – фундаментальная основа инноваций в медицине и селекции: мат. науч.-практ. конф. с междунар. уч. – Ростов н/Д, 2017. – С. 85-86.

16. Махоткин, М.А. Влияние условий хранения образцов крови осетровых рыб на сохранность ДНК / М.А. Махоткин, Т.Г. Фалеева, Д.А. Чеботарев, М.Г. Тютякина, М.В. Коваленко, Е.Н. Пономарева, И.В. Корниенко // Аквакультура: мировой опыт и российские разработки: мат. Всерос. науч. конф. – Ростов н/Д, 2017. – С. 359-362.

17. Фалеева, Т.Г. Методика сбора и пробоподготовки потожировых следов человека для молекулярно-генетического исследования: учебно-методическое пособие / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко. – СПб.: Изд-во ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2017. – 36 с.

18. Фалеева, Т.Г. Возможности ДНК-идентификации постороннего потожирового вещества на коже человека / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, Е.Э. Подпоринова, А.О. Праводелова, И.В. Корниенко // Генетика. – 2018. – Т. 54, № 6. – С. 727-734.

19. Фалеева, Т.Г. Особенности ДНК-идентификации потожировых следов на кожных покровах трупов / Т.Г. Фалеева, И.В. Корниенко, И.Н. Иванов, С.М. Кузьменко, Е.С. Мишин, Д.В. Шатов, Б.В. Ковалёв, А.А. Чеботарева, Е.Н. Ходарева // Теория и практика судебной экспертизы. – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 97-104.

20. Фалеева, Т.Г. Исследование эффективности ДНК-анализа потожировых следов, обработанных парами йода / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Труды Петербургского научного общества судебных медиков (Теория и практика судебной медицины) / под ред. проф. И.Н. Иванова. – СПб.: ООО Информационное агентство «Открытый форум», 2018. – Вып. 12. – С. 196-197.

21. Фалеева, Т.Г. Исследование влияния липкого вещества дактилоскопических пленок и клейких лент на полимеразную цепную реакцию (ПЦР) / Т.Г. Фалеева, И.В. Корниенко, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин // Лабораторная служба: мат. IV Российский конгресс лабораторной медицины. – М.: Медиасфера, 2018. – Т. 7, № 3. – Вып. 2. – С. 177.

22. Фалеева, Т.Г. Анализ эффективности энзиматической амплификации малых количеств ДНК в присутствии нингидрина / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Сб. тр. Междунар. науч.-практ. конф. «Молекулярная диагностика 2018». Минск, 2018. – С. 520-521.

23. Фалеева, Т.Г. Возможности комплексного судебно-биологического и молекулярно-генетического анализа потожировых следов / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко, А.А. Чеботарева // Мечниковские

чтения-2020: мат. 93-й Всеросс. науч.-практ. студ. конф. с междунар. уч. (СПб, 3 июня 2020 г.) / под ред. А.В. Силина, С.В. Костюкевича. Ч. II. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2020. – С. 198-199.

24. Фалеева, Т.Г. Оценка эффективности исследования ДНК в потожировых следах после их обработки цианоакрилатом / Т.Г. Фалеева, И.Н. Иванов, Е.С. Мишин, И.В. Корниенко // Мечниковские чтения-2021: мат. 94-й Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. уч. (СПб, 29 апреля 2021 г.) / под ред. А.В. Силина, С.В. Костюкевича, Н.Т. Гончара. Ч. II. – СПб.: Изд-во СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 2021. – С. 144-145.

Патент на изобретение

1. Пат. RU 2651937 С1 Российская Федерация, МПК⁵¹ С12N 15/10, С12Q 1/68, А01N 1/02. Композиция для сбора и хранения ДНК или ДНК-содержащих биологических следов (варианты) и её применение / Т.Г. Фалеева, И.В. Корниенко, И.Н. Иванов; заявители и патентообладатели Т.Г. Фалеева, И.В. Корниенко. – № 2017115864; заявл. 04.05.2017; опубл. 24.04.2018, Бюл. № 12. – 50 с.

Список использованных сокращений и условных обозначений

ДМСО – диметилсульфоксид

«КТТ» – порошок дактилоскопический фирмы «КримТехТрейд»

ПД – порошок дактилоскопический

ПД-Б – порошок дактилоскопический белый немагнитный

ПДДД-СЧ – порошок дактилоскопический двойного действия
серебристый/черный немагнитный

ПД-Ч – порошок дактилоскопический черный немагнитный

ПМД-Б – порошок дактилоскопический белый магнитный

ПМД-С – порошок дактилоскопический серый магнитный

ПМД-Ч – порошок дактилоскопический черный магнитный

ПМДЛ-С – порошок дактилоскопический серый магнитный с люминофором

ПФД-К – порошок дактилоскопический флуоресцентный красный немагнитный

ПФМД-З – порошок дактилоскопический флуоресцентный зеленый магнитный

ПЖВ – потожировое вещество

ПЖС – потожировые следы

п.н. (п.о.) – пары нуклеотидов (пары оснований)

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени»

ЦАК – цианакриловая кислота

ЭДТА – этилендиамин-N,N,N',N'-тетраацетат

SPR (small particle reagent) – мелкодисперсный реагент (дисульфид молибдена)

STR (short tandem repeat) – короткий tandemный повтор

STR-локус (маркер) – ДНК-локус, содержащий STR

ΔC_t – разница пороговых циклов ПЦР между контрольными и опытными препаратами