

МИНСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

УДК 61:67:611.781:576.8.095.52

КУХАРЬКОВ Юрий Владимирович

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК И КЕРАТИНОВ ПРИ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ
ЭКСПЕРТИЗЕ ЕДИНИЧНЫХ ВОЛОС

14.00.24. - Судебная медицина

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

МИНСК - 1998

Работа выполнена в Минском ордена Трудового Красного Знамени государственном медицинском институте.

Научный руководитель - доктор медицинских наук,
заслуженный деятель науки
Республики Беларусь,
профессор **Пучков Г.Ф.**

Официальные оппоненты -
член-корреспондент Российской
Академии медицинских наук и
Национальной Академии наук
Беларуси, доктор медицинских
наук, профессор **Лазюк Г.И.**

доктор медицинских наук,
профессор **Пяткевич М.М.**

Оппонирующая организация - Витебский государственный
медицинский институт

Защита состоится "27" мая 1998г. в 14⁰⁰ на
заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04. при
Минском ордена Трудового Красного Знамени государственном
медицинском институте Министерства здравоохранения Респуб-
лики Беларусь по адресу: 220798, г.Минск, проспект Дзержинского, 83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Минско-
го ордена Трудового Красного Знамени государственного меди-
цинского института Министерства здравоохранения Республики
Беларусь.

Автореферат разослан "21" апреля 1998г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
доктор медицинских наук,
профессор



Е.И. Скугаревская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В судебно-медицинской практике исследованию волос для решения вопроса об их принадлежности индивидууму составляют, по данным различных авторов, от 6-7% (В.И.Чарный, 1968) до 7-11% (Ю.В.Павлов, 1991) всех других видов экспертиз вещественных доказательств биологического происхождения. Экспертиза волос человека является одной из самых трудоемких и наименее результативных. Разнообразие морфологических характеристик волос на голове одного человека и сходство макро- и микроструктуры волос разных людей в ряде случаев не позволяют дифференцировать объекты от разных индивидуумов общепринятыми морфологическими методами исследования, особенно, когда в качестве вещественных доказательств представлены единичные волосы. Дополнительные трудности создает субъективность оценки большинства морфологических характеристик, вследствие чего качество и правильность результатов экспертиз часто зависят от опытности эксперта. Для устранения влияния субъективных факторов предложено оценивать биомеханические, физические, химические, серологические свойства волос, осуществлять морфометрический анализ их морфологических характеристик. Информативным способом, позволяющим получить объективные критерии при сравнительном исследовании, является типирование ДНК луковиц и кератинов стержней волос. Анализ данных литературы показал, что в настоящее время для сравнительного исследования волос еще осуществляется разработка применимых в широкой практике методов выявления полиморфизма ДНК и кератинов. Отсутствуют данные о количестве ДНК в луковицах отживших и жизнеспособных волос, полностью не унифицированы методы электрофоретического анализа полиморфизма кератинов, не определена совокупность подлежащих учету характеристик при исследовании единичных волос. Настоящая работа посвящена решению указанных проблем, ее результаты найдут практическое применение при выполнении судебно-медицинских экспертиз.

Связь работы с крупными научными программами, темами. Диссертационная работа проведена при выполнении социальных заказов Министерства здравоохранения Республики Беларусь в Центральной научно-исследовательской лаборатории Минского государственного медицинского института в рамках темы "Изучение полиморфных локусов ДНК для установления родства, идентификации человека и биологических объектов" (срок выполнения: январь 1994 года - декабрь 1996 года).

Цель и задачи исследования. Цель исследования - разработать объективные критерии для установления возможности происхождения единичных волос от индивидуума путем определения полиморфизма ДНК и кератинов.

Для достижения поставленной цели решали задачи:

1. В луковице единичного волоса определить количество ДНК и применить полимеразную цепную реакцию для выявления ее полиморфизма.
2. Применить электрофоретические методы анализа белков (ДСН-электрофорез и изоэлектрофокусирование) для установления полиморфизма кератинов, экстрагированных из стержня единичного волоса.
3. Оценить возможности выявления антигенов АВО системы и кератиновых фенотипов в одном фрагменте стержня волоса.
4. Разработать методику ферментативного гидролиза кератинов волос с последующим электрофоретическим анализом продуктов для решения вопроса о возможной принадлежности волоса индивидууму.
5. Применить методы вероятностной оценки сходства волос индивидуумов по электрофоретическим характеристикам кератинов и антигенному составу.
6. Оценить взаимосвязь между морфологической структурой исследуемых волос и электрофоретическими характеристиками кератинов и продуктов их ферментативного гидролиза.

Научная новизна полученных результатов. Предложен оригинальный вариант экстракции ДНК из луковиц единичных волос, при котором потеря материала была минимальной. Проведен сравнительный анализ количества ДНК, экстрагированной из луковиц единичных волос с сохраненными остатками влагалищных оболочек (вырванных волос) и луковиц единичных волос, лишенных влагалищных оболочек (выпавших волос). В зависимости от количества материала, экстрагированного из единичной волосистой луковицы, даны рекомендации по выбору амплифицируемых полиморфных локусов ДНК, оценены возможности проведения полимеразной цепной реакции для одного либо большего числа полиморфных регионов ДНК. Для изучения метрических показателей морфологической структуры волос предложено использовать компьютерные системы получения и анализа изображения объектов. С помощью такой системы разработан новый критерий для сравнительного микроскопического исследования волос - определение дисперсии оптической плотности коркового вещества. Впервые для сравнительного судебно-медицинского исследования волос применен электрофоретический анализ продуктов ферментативного (трипсинового) гидролиза кератинов. Определена степень экстракции кератинов из волос, предложены методики ферментативного протеолиза

кератинов в растворе и в полиакриламидных гелях в процессе электрофореза, показана возможность групповой дифференцировки волос по особенностям электрофоретического распределения в полиакриламидных гелях продуктов ферментативного гидролиза кератинов. В зависимости от длины стержня единичного волоса, определен комплекс методов исследования и совокупность характеристик, которые подлежат учету при решении вопроса о принадлежности волос индивидууму. Оценена вероятность наблюдения фенотипов волос, установленных сочетанным определением антигенов АВО системы методом абсорбции-элюции и электрофоретических характеристик кератинов методами изоэлектрофокусирования, ДСН-электрофореза, электрофоретического анализа продуктов ферментативного гидролиза кератинов. Установлено отсутствие взаимосвязи между морфологическими особенностями волос и электрофоретическими характеристиками кератинов, а также продуктов их ферментативного протеолиза.

Практическая значимость полученных результатов. Результаты исследования луковиц единичных волос дают возможность более широкого применения в судебно-медицинской практике высокоэффективного метода типирования вещественных доказательств биологического происхождения - амплификации полиморфных локусов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции. Полученные показатели количества ДНК в луковицах единичных волос позволяют оптимально выбрать локусы ДНК для их последующей амплификации и решать вопрос о проведении полимеразной цепной реакции с одним либо большим количеством полиморфных фрагментов. Предлагаемый вариант экстракции нуклеиновых кислот из луковиц единичных волос пригоден также и для выделения ДНК из других вещественных доказательств биологического происхождения малой величины (незначительных по размерам пятен крови, спермы, слюны и т.п.). Применение компьютерных систем анализа морфологического изображения при изучении структуры волос позволяет использовать в качестве дополнительного объективного критерия показатель дисперсии оптической плотности коркового вещества, а также сохранить изображение объектов, что особенно важно при уничтожении волос в дальнейшем судебно-медицинском исследовании. При производстве судебно-медицинских экспертиз волос, лишенных луковиц, полученные результаты позволяют прогнозировать эффективность используемых методов. В случае достаточного объема материала (более 15 см стержня) предлагаемый комплекс электрофоретических методов исследования кератинов (изоэлектрофокусирование, ДСН-электрофорез, электрофоретический анализ продуктов ферментативного гидролиза кератинов), в сочетании с опреде-

лением антигенов АВО, позволяет выявить 128 фенотипов волос.

Внедрения:

1. "Способ сравнительного судебно-медицинского исследования волос путем электрофоретического разделения продуктов ферментативного гидролиза кератинов." Акт об использовании предложения от 8 мая 1996г. Отдел биологических исследований экспертно-криминалистического центра МВД Республики Беларусь.

2. "Способ выделения ДНК из вещественных доказательств биологического происхождения малой величины." Акт об использовании предложения от 28 апреля 1997г. Государственный экспертно-криминалистический центр МВД Республики Беларусь.

Экономическая и социальная значимость полученных результатов.

Результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, не могут и не должны быть использованы в качестве коммерческого продукта. Социальная значимость работы заключается в следующем: при производстве экспертиз волос применение методов анализа полиморфизма ДНК и кератинов будут способствовать установлению фактических обстоятельств дела в следственном и судебном процессах, выявлению виновных в совершении преступлений либо опровержению обвинения. Предлагаемые в работе способы сравнительного судебно-медицинского исследования волос позволяют получать результаты в течение 2-4 рабочих дней, что значительно сокращает сроки выполнения экспертиз.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Экстрагирование ДНК из единичных волосинок лукович возможно независимо от сохранности на них остатков влагалищных оболочек; таким образом, наличие волосинок лукович позволяет применить высокоинформативный метод типирования - амплификацию полиморфных локусов ДНК с помощью полимеразной цепной реакции.

2. Определение дисперсии оптической плотности является самостоятельным информативным методом сравнительного исследования волос.

3. При исследовании стержня волоса длиной 5-6 см возможно комплексное исследование антигенов АВО методом абсорбции-элюции и кератинового фенотипа (K1-K8) методом ДСН-электрофореза; при наличии стержня волоса длиной 15-16 см, дополнительно возможно провести фракционирование кератинов волоса изоэлектрофокусированием и их пептидное картирование.

4. Электрофоретические характеристики не-S-карбоксиметилированных кератинов при ДСН-электрофорезе и изоэлектрофокусировании, особенностями электрофоретического фракционирования продуктов ферментативного протеолиза кератинов, морфологические характеристики явля-

ются самостоятельными признаками при сравнительном исследовании волос.

5. Единичные волосы пригодны для сравнительного судебно-медицинского исследования при решении вопроса об их принадлежности индивидууму.

Личный вклад соискателя. Цели и задачи исследования определены совместно с научным руководителем. Анализ публикаций по теме диссертационной работы, получение объектов исследования, выбор условий и выполнение лабораторных экспериментов, анализ и обобщение полученных данных произведены автором самостоятельно. В производстве экспериментов помощь оказывали эксперты биологических отделений бюро СМЭ.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований были доложены:

- на Первой международной конференции судебных медиков (Россия, Астрахань, 1995г.);

- на VI Всероссийском съезде судебных медиков (Россия, Владимир, 1996г.);

- на семинаре экспертов-биологов ЭКП МВД Республики Беларусь по теме "Комплексное исследование объектов биологического происхождения" (Минск, ноябрь 1997г.);

- на расширенном заседании кафедры судебной медицины Минского государственного медицинского института, экспертно-квалификационной комиссии при Главном государственном судебно-медицинском эксперте Минадрава Республики Беларусь, экспертов биологических отделений Главного и Минского бюро государственной службы СМЭ, сотрудников кафедры судебной медицины Академии МВД Республики Беларусь, сотрудников Государственного экспертно-криминалистического центра МВД Республики Беларусь, сотрудников НИИ наследственных и врожденных заболеваний Минадрава Республики Беларусь (28 января 1998г).

Опубликованность результатов. Положения диссертации изложены в 8 работах, из них три - в специализированных журналах. Получены удостоверения на два рационализаторских предложения.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 149 страницах машинописного текста, содержит 27 рисунков и 17 таблиц. Работа состоит из следующих разделов: перечень условных сокращений, введение, общая характеристика, одна глава обзора литературы, три главы собственных исследований, выводы, список использованных источников. Список использованных источников включает 169 публикаций, из них на русском языке - 66, на иностранных языках - 103.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Объекты и методы исследования.

Исследование луковиц волос. Экстрагировали ДНК из луковиц единичных волос головы от 18 человек: четырнадцати мужчин и четырех женщин. Волосы забирали путем вычесывания частым гребнем. Луковицу волоса с фрагментом стержня длиной до 1 см оценивали через лупу (10х), определяя наличие или отсутствие клеток влагалищных оболочек. ДНК экстрагировали 12-16 часов при 38-40°C в 50 мкл буфера, содержащего 0,05 М трис-HCl (pH 8,0), 0,05 М этилендиаминтетрауксусную кислоту, 0,1 М NaCl, 0,025 М дитиотрейтол (ДТТ), 1% тритон X-100, 500 мкг/мл протеиназы K, однократно очищали смесью фенол-хлороформ (1:1), экстракт переносили в чистую микропробирку, в которой выполняли все последующие операции, в том числе и амплификацию. Добавляли 0,1 объема (5 мкл) 3 М ацетата натрия, 0,1 объема (6 мкл) водного раствора (1 мг/мл) дрожжевой РНК (Sigma), осаждали этанолом, растворяли в 5 мкл деионизированной воды. ДНК из восьми луковиц в полном объеме анализировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле (АГ) (Т.Маниатис, 1984). Количество ДНК определяли флуориметрией в 10 пробах, используя по 2 мкл раствора каждого образца. К оставшемуся объему раствора ДНК добавляли 25 мкл амплификационной смеси. Материал типировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по локусам D1S80 (рМСТ118), APOB, кроме того, амплифицировали полоспецифичные фрагменты. Продукты амплификации анализировали электрофорезом (ЭФ) в 1,5% АГ, либо в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с применением трис-ацетатного буфера (Т.Маниатис, 1984). АГ и ПААГ окрашивали раствором бромистого этидия (1 мг/л), фрагменты ДНК визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Исследование стержней волос. Волосы брали с затылочной области головы у 100 жителей г.Минска (63-х мужчин и 37-и женщин), в возрасте 20-30 лет, не находящихся в родственных связях. Отбирали образцы, которые не подвергались косметической обработке (завивке, обесцвечиванию, окраске), состригали близко к корню в количестве 30-50 штук. Пучки волос мыли и обезжировали. По 4-5 образцов от каждого донора исследовали микроскопически. Компьютерный анализ изображения объектов проводили на системе Bioscan AT; в образцах (по 25 волос от 30 человек) определяли показатели дисперсии оптической плотности (ДОП) коркового вещества. В волосах от 96 человек (62-х мужчин и 34-х женщин) электрофорезом в ПААГ определяли фено-

типическую кератиновую группу K1-K8 (M.Gerhard, 1987); в единичных фрагментах волос от десяти мужчин предварительно определяли антигены ABO системы. Объекты измельчали, раздавливая между двумя стеклами и разрезая бритвенным лезвием на фрагменты длиной 0,5-1,5 мм. Кератины экстрагировали 48 ч. при 37°C буфером, содержащим 8 М мочевины, 0,05 М ДТТ, 2 % додецилсульфат натрия (ДСН) из расчета 100 мкл буфера на 1 мг измельченных волос; при исследовании единичных волос длиной 4-6 см измельченные фрагменты помещали в 20 мкл буфера. Определение антигенов ABO во фрагментах волос длиной 5-6 см проводили методом абсорбции-элюции по общепринятым правилам (Т.В.Стегнова и др. 1990). Использовали изогемагглютинирующие сыворотки с титром антител 1:256. После учета результатов, измельченные фрагменты волос дважды промывали дистиллированной водой, экстрагировали кератины, как указано выше. Экстракт в количестве 15-20 мкл анализировали ступенчатым ЭФ в вертикальном градиентном ПААГ (Laemmli, 1970). Разделяющий гель имел характеристики T=7,5-10%, C=2,66%, включал 0,375 М трис-HCl (pH 8,8), 6 М мочевины, 0,4% ДСН; концентрирующий гель - T=6%, C=2,66%, содержал 0,125 М трис-HCl (pH 6,8), 6 М мочевины, 0,4% ДСН.

После установления фенотипической группы (K1-K8), с кератинами волос от 72 человек (58-и мужчин и 14-и женщин) проводили ферментативный гидролиз (ФГ) и анализировали продукты протеолиза ЭФ в ПААГ; предварительно в 24 случайно выбранных образцах определяли экстрагируемость кератинов. ФГ кератинов проводили в растворе и непосредственно в ПААГ в процессе ЭФ.

Для проведения ФГ в растворе кератины экстрагировали 48 ч. при 37°C из 10 мг измельченных волос в 1 мл буфера, содержащего 8 М мочевины, 0,05 М трис-HCl (pH 10,4), 0,065 М ДТТ (R.C.Marshall и J.M.Gillespie, 1982; С.Христов, 1990). Из 100 мкл каждой пробы осаждали охлажденным (+4°C) ацетоном кератины (P.Скоупс, 1985), растворяли их в 50 мкл буфера, содержащего 2 М мочевины, 0,01 М трис-HCl (pH 8,0), 0,025 М ДТТ, 1% ДСН. Из 12 случайно выбранных образцов приготавливали одинаковые навески, экстрагировали из них кератины и спектрофотометрически определяли степень экстракции (СЭ) белков от первоначальной массы волос. Помимо этого, в 12 образцах СЭ определяли путем взвешивания оставшихся после экстрагирования волос. Для этого остатки образцов взвешивали после промывания дист. водой, 96% этанолом и высушивания. Данные СЭ использовали при расчете соотношения фермент:субстрат (Ф/С) для проведения ФГ. Соотношение Ф/С рассчитывали как 1:25, 1:50, 1:75, 1:100, 1:150. К полученным про-

бам добавляли 5 мкл раствора трипсина (Trypsin from bovine pancreas 31 U/mg, "Serva"), который приготавливали путем растворения 4 мг фермента в 1,66 мл, 3,33 мл, 5 мл, 6,66 мл, 10 мл дист. воды (соответственно необходимому вышеуказанному соотношению Ф/С). Гидролиз проводили в течение 2 ч. при 37°C, прерывали замораживанием (-20°C). Продукты ФГ кератинов в 25-50 мкл раствора анализировали при помощи ЭФ. ПААГ имел градиент концентрации мономеров T=7,5-15%, а показатель "С", концентрации мочевины и ДСН соответствовали характеристикам гелей, используемых для определения кератинового фенотипа по M.Gerhard. При проведении ЭФ в пробы добавляли бромфеноловый синий (БФС), ЭФ проводили при комнатной температуре при постоянной силе тока 30-35 мА до достижения линией БФС нижнего края геля, в качестве электродного использовали трис-глициновый буфер, содержащий мочевины и ДСН.

При проведении ФГ кератинов в ПААГ в процессе электрофореза протеины волос экстрагировали по методу M.Gerhard (1987) (см. выше). ПААГ имел следующие характеристики: разделяющий гель - T=10%, C=2,66%, включал 0,375 М трис-HCl (pH 8,8), 2 М мочевины, 0,4 % ДСН; концентрирующий гель - T=6%, C=2,66%, содержал 0,125 М трис-HCl (pH 6,8), 2 М мочевины, 0,4 % ДСН. В лунки ПААГ вносили 20 мкл экстракта, который смешивали с 5 мкл 0,2% водного (масс/объем) раствора трипсина и с 1 мкл насыщенного водного раствора БФС. Режим ЭФ имел особенности, необходимые для проведения ферментативного гидролиза: после отхождения линии БФС от лунок на 3-5 мм источник тока отключали на заданный интервал времени (5-15 мин.), в течение которого и осуществляли ферментативный протеолиз кератинов.

ПААГ после ЭФ окрашивали уксусно-спиртовым раствором Coomassie Brilliant Blue (СВВ) R-250 (по Л.А.Остерман, 1981).

Кератины из единичных волос 40 человек (30-ти мужчин и 10-ти женщин) исследовали методом изоэлектрофокусирования (ИЭФ); каждый образец анализировали при различных профилях pH. Протеины экстрагировали по методу R.C.Marshall, J.M.Gillespie (1982) и С.Христов (1990) (см. выше) из фрагментов волос длиной 5 см в 20 мкл буфера. Непосредственно перед ИЭФ к каждой пробе дополнительно добавляли 2 мкл (1/10 объема пробы) 0,25 М водного раствора ДТТ. ПААГ заливали методом выдавливания (П.Ригетти, 1986) между двумя прямоугольными стеклянными пластинами размерами 12x9 см, одну из которых обрабатывали 0,02% раствором Bind-Silane в ацетоне, вторую - покровную - 0,01% водным раствором тритона X-100. Толщина геля была не более 0,2 мм. В ходе экспериментов в ПААГ варьировали концентрации моно-

меров, мочевины, глицерина, сервалитов. Для получения градиента применяли в различных соотношениях сервалиты с узкими и широким диапазонами pH: Servalite pH 3-5; pH 4-6; pH 5-8; pH 3-10. В качестве электродных использовали 1 М растворы H₃PO₄ для анода и NaOH для катода. Образцы вносили в количестве 10 мкл экстракта на бумажные "мишени". ИЭФ проводили при температуре 8°C при возрастающем напряжении. Гели окрашивали двумя способами - нитратом серебра (С.Христов, 1990) и двойным окрашиванием нитратом серебра и СВВ G-250.

Полученные результаты и их обсуждение.

Исследование полиморфизма ДНК, экстрагированной из луковиц единичных волос. Исследуемые объекты (18 волос) были разделены на две группы. Первую группу - 13 объектов - составили волосы, луковицы которых имели остатки влагалищных оболочек (как вырванные). В пяти образцах определили количество ДНК, исследовали ее полиморфизм методом ПЦР. ДНК из остальных восьми образцов первой группы в полном объеме проанализировали ЭФ в АГ. Ко второй группе - 5 объектов - отнесли отжившие волосы с луковицами, на которых отсутствовали клетки влагалищных оболочек. Определили количество ДНК и исследовали ее полиморфизм во всех пяти объектах. Из луковиц единичных волос с сохранившимися влагалищными оболочками выделили от 55 нг до 95 нг ДНК, в среднем 71 нг. Из луковиц волос без влагалищных оболочек получили от 5 нг до 40 нг ДНК, в среднем 30 нг. При ЭФ в АГ высокомолекулярная фракция ДНК визуализирована в семи образцах из восьми. В одном случае высокомолекулярная ДНК не выявлена, однако, присутствие фракции РНК позволяет считать, что ДНК не была утрачена при выделении.

Предлагаемый вариант методики имел особенности: экстрагирующий буфер содержал неионный детергент тритон X-100 вместо ДСН; ДТТ; достаточно высокую концентрацию протеиназы К - 500 мкг/мл. Тритон X-100 в последующем легко удалялся из смеси. ДТТ вносили в смесь с целью разрыва дисульфидных связей, которыми богаты белки ороговевающих эпидермальных клеток влагалищных оболочек волосных луковиц и которые препятствуют эффективному действию пептидаз. Повышенная концентрация протеиназы К в присутствии ДТТ приводила к эффективному разрушению белковых структур волосных луковиц и высвобождению ДНК. После очистки полученного раствора ДНК смесью фенол:хлороформ все последующие операции, в том числе и амплификацию, выполняли в одной пробирке, что исключало потерю ДНК при переносе материала. Перед осаждением к полученному раствору ДНК добавляли дрожжевую

РНК; при этом экстрагированная ДНК становилась частью имеющихся в растворе нуклеиновых кислот (НК). Высокая концентрация НК в смеси способствовала их эффективному осаждению этанолом. Установили, что присутствие дрожжевой РНК в смеси не влияет на процесс и результаты ПЦР.

При производстве ПЦР количество необходимой для анализа ДНК определяется рядом факторов, в том числе, величиной исследуемого локуса. Для амплификации более длинных регионов количество материала должно быть больше. Введение избыточных количеств ДНК нежелательно и его надо избегать. Полученного нами из единичных волосяных луковиц количества ДНК оказалось достаточно для типирования с помощью ПЦР, несмотря на то, что часть материала расходовали при проведении флуориметрии. ДНК, экстрагированной из единичных волосяных луковиц с остатками влагалищных оболочек, было достаточно для амплификации локуса APOB длиной 660 - 1020 п.о.; при этом в 25 мкл реакционной смеси вводили 33-57 нг ДНК. Более короткие локусы исследовали для выявления полиморфизма ДНК из волосяных луковиц, на которых клетки влагалищных оболочек отсутствовали. Для анализа минимальных количеств ДНК - 3 нг - в 25 мкл реакционной смеси амплифицировали полоспецифичные фрагменты длиной 130 п.о. и 170 п.о. В случаях получения из образцов большего количества материала в 25 мкл реакционной смеси амплифицировали 21-24 нг ДНК по локусу D1S80 (рМСТ 118) длиной 398 - 862 п.о.

Таким образом, единичные волосы с луковицами являются объектами, пригодными для экстрагирования ДНК и ее типирования методом ПЦР. Амплификация полиморфных регионов возможна независимо от того, определяются ли на волосяной луковице клетки влагалищных оболочек. При исследовании луковиц волос предпочтительнее амплификация более коротких полиморфных локусов; при этом ДНК, полученную из луковиц волос с сохранившимися влагалищными оболочками, возможно типировать, как минимум, по двум полиморфным фрагментам. Такой вывод следует из результатов определения количества ДНК, экстрагированной из объектов: из луковиц волос с остатками влагалищных оболочек получили, в среднем, в 2,3 раза большее количество ДНК, чем из луковиц волос, на которых клетки влагалищных оболочек не были видны. В наших исследованиях объекты типировали по трем полиморфным регионам - APOB, D1S80 (рМСТ 118) и полоспецифичным фрагментам. Вместе с тем, предлагаемый вариант методики экстрагирования ДНК из луковиц единичных волос и результаты количественного исследования полученного материала применимы при исследовании других полиморфных регионов.

Исследование морфологических особенностей волос. Микроскопически оценивали количество и плотность расположения зерен пигмента, их величину, цвет, особенности распределения по толщине волоса, а также особенности сердцевин. В наших наблюдениях волосы только одного человека имели выраженные отличия. Во всех остальных случаях каждому волосу от одного человека можно было найти одну или несколько морфологически сходных пар от других людей. Иногда волосы с головы одного человека значительно отличались между собой по микроскопическим признакам. Компьютерная система получения и анализа изображения объектов позволила ускорить морфологическое исследование волос: регистрировать изображение объекта с микроскопа и сохранять его, быстро измерять толщину волоса (в течение 25 сек. в десяти полях зрения), рассчитывать средние величины (среднюю максимальную толщину). Применение ПЭВМ позволило использовать дополнительный критерий для сравнительного исследования волос - дисперсию оптической плотности коркового вещества. ДОП является интегральным показателем и определяется сочетанием морфологических характеристик: количеством зерен пигмента, их величиной, цветом, особенностью распределения пигмента в корковом веществе, а также цветом фона коркового вещества. В случае, когда показатели ДОП объектов, представленных для сравнения, находятся в интервале значений указанного показателя образцов индивидуума, возможен вывод о сходстве исследуемых волос. Напротив, при отсутствии совпадений показателей ДОП в сравниваемых образцах, верен вывод о несходстве таких объектов. В наших наблюдениях образцы от разных людей при отсутствии выраженных морфологических отличий могли иметь разные показатели ДОП.

Исследование полиморфизма кератинов волос методом ДСН-электрофореза, комплексное выявление антигенов ABO и полиморфизма кератинов. При исследовании образцов волос от 96 человек с помощью ЭФ в денатурирующих условиях в присутствии ДСН было выявлено четыре варианта электрофоретического распределения кератинов. Указанное распределение пептидов из восьми известных фенотипов (K1-K8) отмечено в литературе как кератиновые группы K1, K2, K3, K6. (M.Gerhard, 1987). При определении антигенов ABO фрагментов волос длиной 5 см от 10 человек антигены "А" и "В" выявлены в одном случае, антиген "В" - в 2 образцах, "А" выявлен в 3 случаях. При электрофоретическом анализе белков, экстрагированных из фрагментов волос после проведения реакции абсорбции-элюции, фенотипическая кератиновая группа K3 установлена в одном образце, в котором выявлен антиген "А". Фенотипическая кератиновая группа K1 была установлена в девяти образцах,

независимо от выявляемых антигенов. Из всех исследуемых фрагментов волос длиной 5 см получили экстракт кератинов в количестве, достаточном для последующего ЭФ анализа. В образцах волос, в которых предварительно определяли антигены методом абсорбции-элюции и в контрольных образцах, с которыми такое исследование не проводили, распределение пептидных фракций одинаково. По результатам наших опытов нет влияния процедуры определения антигенов АВО системы реакцией абсорбции-элюции на возможность фенотипирования кератинов волос. Схематическое изображение пептидных фракций кератинов в ПААГ представлено на рис.1. Количество наблюдений и частота встречаемости фенотипических групп указаны в таблице 1.

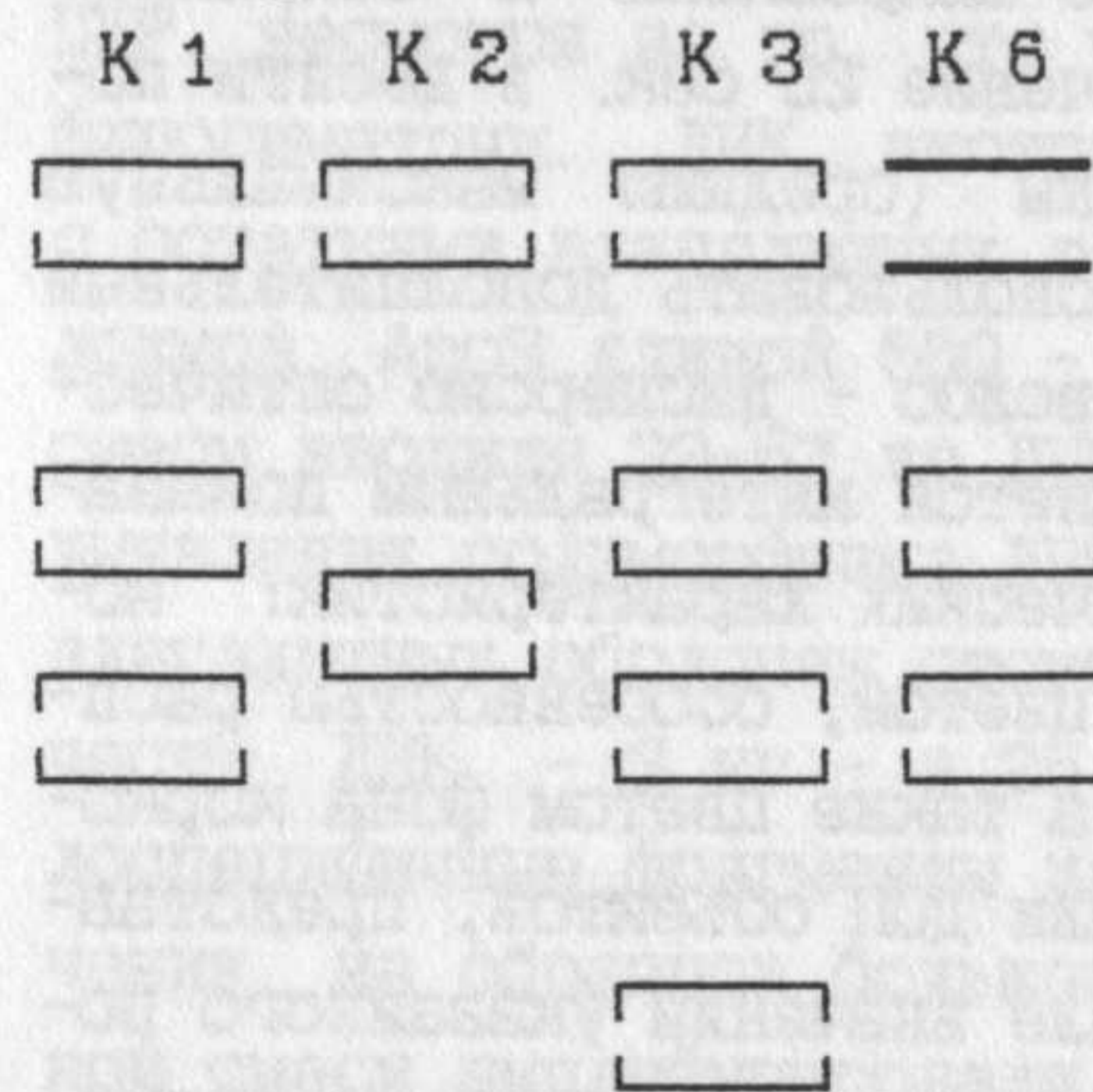


Таблица 1.

Частота встречаемости кератиновых фенотипов.

Фенотип	Количество случаев	Частота встречаемости (%)
ВСЕГО	96	100 %
К1	84	87,5 %
К2	4	4,2 %
К3	7	7,3 %
К6	1	1,0 %

Рис.1. Схема распределения пептидных фракций кератинов.

Определение степени экстракции кератинов из стержней волос.

При проведении спектрофотометрии количество белка в пробах определяли по методу Варбурга и Христиана. Концентрацию белка рассчитывали по формуле: $\text{Конц. (мг/мл)} = 1,55A_{280} - 0,76A_{260}$, где A_{280} и A_{260} - показатели поглощения растворами света с длиной волны соответственно 280 нм и 260 нм. Вычисленная указанным методом СЭ составила 29-34% от исходной массы волос, в среднем 31,6%. При определении массы сухого остатка волос СЭ колебалась в пределах от 38% до 41,2%, в среднем составила 39,4%. Установлена разница в показателях СЭ, определенных методами спектрофотометрии и по сухому остатку навески волос. Уменьшение показателей СЭ в среднем на 7,8% при спектрофотометрическом определении, по всей видимости, было обусловлено потерями материала при осаждении белка из раствора.

Исследование продуктов ферментативного гидролиза кератинов волос.

Кератины волос человека не выполняют жизненно важных функций.

Это позволяет предположить, что возможно сохранение и наследственная передача мутаций, ведущих к изменениям структуры кератинов волос. Выявление различий в аминокислотной последовательности кератинов волос разных людей позволит проводить сравнительное исследование для решения вопроса о принадлежности волоса индивидууму. При специфическом гидролизе пептидов по заданным аминокислотным связям возможно образование продуктов рестрикции с разными молекулярными массами (Mw). В качестве доступного фермента был выбран трипсин. Эксперименты проводили при различных соотношениях Ф/С. Был сделан вывод о возможности проведения группового типирования волос по электрофоретическому распределению в ПААГ продуктов трипсинового гидролиза кератинов. Схема электрофоретического распределения пептидов полученных после ФГ кератинов (Ф/С=1:75, гидролиз 2 часа при 37°C) представлена на рисунке 2.

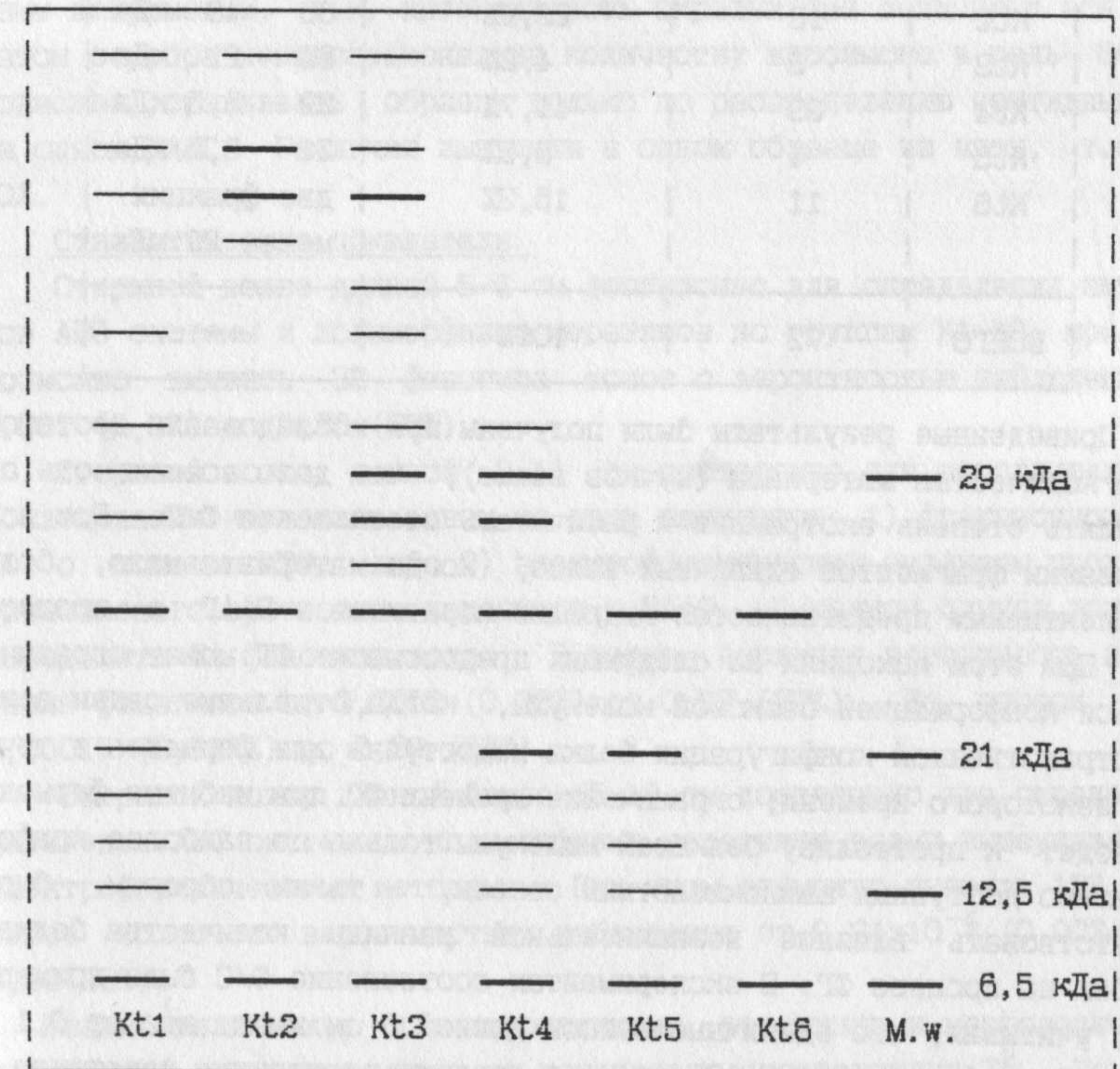


Рис.2. Схема. Электрофоретическое распределение пептидов, полученных путем трипсинового протеолиза кератинов.

Как результат ФГ наблюдали протеолиз кератинов до легких пептидов с Mw менее 29 кДа, либо преимущественно выявляли пептиды с Mw 40-60 кДа и некоторое количество продуктов с Mw 40-29 кДа. Шесть вариантов (групп) распределения пептидов были обозначены нами Kt (keratins-trypsin). Частоты наблюдения групп и их характеристики представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Частота встречаемости и обобщенные характеристики пептидов в группах Kt.

группа	количество наблюдений	частота встречаемости (%)	Mw преобладающих пептидов
Kt1	8	11,1%	60 - 6,5 кДа
Kt2	16	22,2%	60 - 40 кДа
Kt3	3	4,2%	60 - 21 кДа
Kt4	30	41,7%	29 - 6,5 кДа
Kt5	4	5,5%	21 - 6,5 кДа
Kt6	11	15,3%	две фракции менее 29 кДа
ВСЕГО	72	100%	-----

Приведенные результаты были получены при исследовании достаточного количества материала (пучков волос), что дало возможность определить степень экстракции и рассчитать соотношение Ф/С. При исследовании фрагментов единичных волос, когда материала мало, более перспективным представляется гидролиз кератинов в ПААГ в процессе ЭФ. При этом исходили из следующих предпосылок: ФГ может ограничиваться конформацией белковой молекулы, когда отдельные связи всилу пространственной конфигурации белка недоступны для фермента в течение некоторого времени; ограничение времени ФГ при избытке фермента приведет к протеолизу белковой молекулы только по наиболее конформационно доступным аминокислотным связям, - таким образом, будет отсутствовать влияние незначительной разницы количества белка в пробах на процесс ФГ. В экспериментах соотношение Ф/С было примерно 1:5, учитывая, что единичные волосы длиной 6 см имеют вес от 0,1 мг до 0,15 мг (в среднем 0,125 мг), а степень экстракции кератинов из навесок волос составляла около 40% исходной массы. Оптимальное время гидролиза в ПААГ для получения продуктов определено нами как 5-7

минут. Особенности методики ФГ в ПААГ не допускают выделения указанных выше фенотипических групп, однако, оказалось возможно сравнивать на одном геле продукты протеолиза кератинов волос от разных индивидуумов. При этом различия электрофоретических характеристик продуктов трипсинового гидролиза кератинов в ПААГ выявляли в одном случае из шести, т.е. в 16,6%.

Исследование полиморфизма кератинов изоэлектрофокусированием.

Лучшее качество фракционирования кератинов было получено в ПААГ с характеристиками T=6%, C=2,66%, содержащих 2 М мочевины, 5% глицерина, 3% сервалитов. Применение двойного окрашивания СВВ G-250 и нитратом серебра позволило эффективно визуализировать пептидные фракции, избегая при этом эффекта "полых пятен". В ходе экспериментов пришли к выводу, что при экспертном исследовании кератинов из фрагментов единичных волос денситометрический анализ электрофоретических зон неприменим, т.к. интенсивность окрашивания пептидных зон нитратом серебра непропорциональна количеству вносимого в гель белка. Возможно сравнивать образцы только по распределению пептидных зон на одном ПААГ. Различия выявляли в одном образце из пяти, т.е. в 20%.

Статистические показатели.

Стержней волос длиной 5-6 см достаточно для определения антигенов АВО системы и полиморфизма кератинов по группам K1-K8; при этом возможно выявить 32 фенотипа волос с вероятностью наблюдения от 0,001 (0,1%) до 0,35 (35%).

Стержней волос длиной 9-11 см достаточно для дополнительного исследования кератинов одним из двух вариантов: 1) фракционированием с помощью ИЭФ, либо 2) электрофоретическим анализом продуктов трипсинового протеолиза кератинов в ПААГ. В каждом случае возможно определить 64 фенотипа волос. В первом варианте вероятность наблюдения фенотипов от 0,0002 (0,02%) до 0,27 (27%). Во втором - от 0,00017 (0,017%) до 0,29 (29%).

Стержней волос длиной более 15-16 см достаточно для определения антигенов АВО системы и полиморфизма кератинов всеми вышеуказанными электрофоретическими методами. При этом возможно выявить 128 фенотипов волос с вероятностью наблюдения от $0,34 \times 10^{-4}$ (0,0034%) до 0,23 (23%).

Взаимосвязь между характеристиками кератинов и морфологической структурой волос оценивали по показателю соответствия X^2 . Не выявлено коррелятивных связей между электрофоретическими характеристиками не-S-карбоксиметилированных кератинов, особенностями электро-

форетического фракционирования продуктов их ферментативного протеолиза, морфологическими признаками волос.

ВЫВОДЫ

1. Методы определения полиморфизма ДНК и кератинов позволяют исследовать единичные волосы и устанавливать объективные критерии для решения вопроса об их возможном происхождении от индивидуума.
2. ДНК из луковиц единичных отживших и жизнеспособных волос достаточно для амплификации методом ПЦР, как минимум, одного полиморфного локуса.
3. Для сравнительного исследования стержней единичных волос пригодны методы сочетанного определения кератинового полиморфизма и антигенов АВО системы.
4. Метод ферментативного картирования кератинов единичных волос позволяет проводить их сравнительное исследование.
5. Показатель дисперсии оптической плотности коркового вещества, определяемый с помощью компьютерной системы анализа морфологического изображения, является самостоятельным критерием при сравнительном исследовании волос.
6. Отсутствуют коррелятивные связи между электрофоретическими характеристиками не-S-карбоксиметилированных кератинов и морфологическими признаками волос.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Пучков Г., Чижов В., Максимов С., Кухарьков Ю., Вожок Г., Просняк М. ДНК - в судебно-медицинской экспертизе Республики Беларусь // *Medicina Legalis Baltica* - 1992, N1-2. - С.102-105.
2. Пучков Г.Ф., Максимов С.С., Чижов В.В., Кухарьков Ю.В. Молекулярно-генетические исследования в судебной экспертизе // *Современные достижения науки и техники в борьбе с преступностью: Теа. докл. науч.-практич. конф. / НИИ проблем криминологии, криминалистики и судеб. эксперт.* - Минск, 1992. - С.153-154.
3. Пучков Г.Ф., Гусаков Ю.А., Кухарьков Ю.В. Идентификация единичного волоса по полиморфизму кератинов и ДНК // *Первая международная конференция судебных медиков: Теа. докл.* - Астрахань, Россия, 1995г. - С.14.
4. Кухарьков Ю.В., Маршин В.И., Пучкова Е.Г., Боровко С.Р., Генералов А.В. Комплексное выявление антигенов и полиморфизма кератинов при судебно-медицинском исследовании волос // *Проблемы иденти-*

фикации в теории и практике судебной медицины: Материалы IV Всероссийского съезда судебных медиков. - Часть II. - М.-Владимир, 1996. - С.64-65.

5. Пучков Г.Ф., Кухарьков Ю.В. Применение компьютерного анализа изображения для судебно-медицинской экспертизы волос // *Проблемы идентификации в теории и практике судебной медицины: Материалы IV Всероссийского съезда судебных медиков. - Часть II. - М.-Владимир, 1996. - С.72-73.*
6. Пучков Г.Ф., Кухарьков Ю.В., Боровко С.Р., Меркулова И.П. Выявление полиморфизма ДНК, выделенной из костей, фиксированного гистологического материала, луковиц единичных волос // *Проблемы идентификации в теории и практике судебной медицины: Материалы IV Всероссийского съезда судебных медиков. - Часть II. - М.-Владимир, 1996. - С.86-87.*
7. Пучков Г.Ф., Кухарьков Ю.В., Корбан В.В., Боровко С.Р. Применение полимеразной цепной реакции при судебно-медицинском исследовании волос // *Суд.-мед. эксперт.* - 1996, N1. - С.21-23.
8. Кухарьков Ю.В., Пучков Г.Ф., Боровко С.Р. Комплексное выявление антигенов системы АВ(0) и полиморфизма кератинов при судебно-медицинском исследовании волос // *Суд.-мед. эксперт.* - 1997, N1. - С.31-33.

Список рационализаторских предложений:

1. Способ сравнительного судебно-медицинского исследования волос путем электрофоретического разделения продуктов ферментативного гидролиза кератинов. Удост. на рац. предложение N1400 от 26.06.96: Минский Государственный медицинский институт.
2. Способ выделения ДНК из вещественных доказательств биологического происхождения малой величины. Удост. на рац. предложение N1406 от 23.06.97: Минский Государственный медицинский институт.

Р Е З Ю М Э

Кухаркоў Юрий Уладаіміравіч

Даследаванне ДНК і кератынаў пры судова-медыцынскай экспертызе адзінкавых валасоў

Ключавыя словы: валасы, экспертыза, дэзоксірыбануклеінавая кіслата (ДНК), кератыны, паліморфныя докусы, палімарфізм, палімерная ланцужковая рэакцыя (ПЛР), электрафарэз (ЭФ), ізаэлектрафакусіраванне (ІЭФ), поліакрыламідны гель (ПААГ), ферментатыўны гідроліз, трыпсін, дысперсія аптычнай шчыльнасці (ДАШ).

Мэта даследавання - распрацаваць аб'ектыўныя крытэрыі для ўстанаўлення магчымасці паходжання адзінкавых валасоў ад індывіда шляхам вызначэння палімарфізму ДНК і кератынаў. З цыбулін адзінкавых валасоў экстрагавалі ДНК, аналізавалі яе колькасць і якасць флуарыметрыяй і электрафарэзам. З дапамогай ПЛР ампліфікавалі докусы D1S80, AroB, поласпэцыфічныя фрагменты. З цыбулін валасоў без піхавых абалонак экстрагавалі 5-40 нг ДНК, з цыбулін з захаванымі піхавымі абалонкамі - 55-95 нг. Колькасці ДНК з адной цыбуліны дастаткова для ампліфікацыі, як мінімум, аднаго паліморфнага докусу. Выкарыстоўвалі камп'ютэрную сістэму аналізу адображэння аб'ектаў для вывучэння морфаметрычных характарыстык валасоў і вызначэння паказчыка ДАШ коркавага рэчыва, як дапаўняльнага крытэрыя пры параўнальным вывучэнні валасоў. Палімарфізм кератынаў выяўлялі ДСН-электрафарэзам, ізаэлектрафакусіраваннем, а таксама ферментатыўным гідролізам у раствору з наступным электрафарэзам прадуктаў або напрамую у ПААГ у час ЭФ. У частцы аб'ектаў вызначалі антыгены АВО метадам абсорбцыі-элюцыі. Устаноўлена магчымасць выяўлення антыгенаў АВО і палімарфізму кератынаў у адных і тых жа фрагментах стрыжання. Вызначэнне антыгенаў АВО і электрафарэтычных характарыстык кератынаў дазваляе выявіць 128 фенатыпаў валасоў з верагоднасцю назірання ад $0,34 \times 10^{-4}$ да 0,23. Не устаноўлена карэлятыўных сувязей паміж антыгеннымі характарыстыкамі валасоў, іх марфалагічнымі прыкметамі, электрафарэтычнымі асаблівасцямі кератынаў.

Атрыманыя вынікі і распрацаваныя метадычныя падыходы выкарыстаемы пры вытворчасці судова-медыцынскіх экспертызаў.

Р Е З Ю М Э

Кухарьков Юрий Владимирович

Исследование ДНК и кератинов при судебно-медицинской экспертизе единичных волос

Ключевые слова: волосы, экспертиза, дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), кератины, полиморфные докусы, полиморфизм, полимерная цепная реакция (ПЦР), электрофорез (ЭФ), изоэлектрофокусирование (ИЭФ), полиакриламидный гель (ПААГ), ферментативный гидролиз, трипсин, дисперсия оптической плотности (ДОП).

Цель исследования - разработать объективные критерии для установления возможности происхождения единичных волос от индивидуума путем определения полиморфизма ДНК и кератинов.

Из луковиц единичных волос экстрагировали ДНК, анализировали ее количество и качество флуориметрией и ЭФ. С помощью ПЦР амплифицировали докусы D1S80, AroB, полоспéцифичные фрагменты. Из луковиц волос без влагалищных оболочек экстрагировали 5-40 нг ДНК, из луковиц с сохранившимися влагалищными оболочками - 55-95 нг. Количества ДНК из единичной луковицы достаточно для амплификации, как минимум, одного полиморфного докуса. Применяли компьютерную систему анализа изображения объектов для исследования морфометрических характеристик волос и определения показателя ДОП коркового вещества как дополнительного критерия при сравнительном исследовании волос. Полиморфизм кератинов выявляли ДСН-электрофорезом, изоэлектрофокусированием, а также ферментативным гидролизом в растворе с последующим ЭФ продуктов либо непосредственно в ПААГ в процессе ЭФ. В части объектов определяли антигены АВО методом абсорбции-элюции. Установлена возможность выявления антигенов АВО и полиморфизма кератинов в одних и тех же фрагментах стержня. Определение антигенов АВО и электрофоретических характеристик кератинов позволяет выявить 128 фенотипов волос с вероятностью наблюдения от $0,34 \times 10^{-4}$ до 0,23. Не установлено коррелятивных связей между антигенными характеристиками волос, их морфологическими признаками, электрофоретическими особенностями кератинов.

Полученные результаты и разработанные методические подходы применимы при производстве судебно-медицинских экспертиз волос.

S U M M A R Y

Kukharkov Yuri Vladimirovich

**The study of DNA and keratins polymorphism
at forensic examination of single hair**

Key words: hair, expertise, deoxyribonucleic acid (DNA), keratins, polymorphic loci, polymorphism, polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis (EP), isoelectrophocusing, enzymatic hydrolysis, trypsin, optic density dispersion.

The aim of the study is to develop objective criteria to make it possible to detect the origin of individual's single hair by determination of DNA and keratin polymorphism.

DNA was extracted from the bulbs of single hairs, and its quantity and quality were analysed by fluorimetry and electrophoresis (EP). Loci D1S80, ApoB, sex-linked fragments were amplified using polymerase chain reaction. Five to 40 ng DNA were extracted from hair bulbs which were lacking vaginal tunic, and 55-95 ng DNA were extracted from hair bulbs retaining vaginal tunic. A single hair bulb gives DNA sufficient for amplification of at least one polymorphic locus. Computerised analysis of object display was used to examine hair morphometric characteristics at comparative analysis of hair. Keratin polymorphism was detected by SDS-electrophoresis and by isoelectrophocusing and additionally by enzymatic hydrolysis in a solution with subsequent EP of the products or directly in polyacrylamide gel during the process of EP. In some samples ABO antigens were detected by absorption-elution test. The possibility to reveal ABO antigens and keratin polymorphism in the same fragments of the core has been ascertained. The detection of ABO antigens and keratin electrophoretic characteristics makes possible the revealing of 128 hair phenotypes with the probability of observation from $0,34 \times 10^{-4}$ to 0,23. No correlation between antigene characteristics of hair, their morphological signs and electrophoretic patterns of keratins have been recorded. The obtained results showed that the developed methodological approaches could be used for forensic examination of hair.

Подписано в печать 09.04.98. Формат 60x84/16. Съем 1 печ.л.
Заказ 94, тираж 100. Бесплатно.

Отпечатано в МГМИ. г. Минск, ул. Ленинградская, 6.

Yuri