

Таблиця 1. Зустрічальність преморбідного фону в дітей, хворих діарейними захворюваннями (відносно всіх обстежених) М±т

Фонові захворювання	ВІК					Всього
	Немовлята	Хворі діти до 1 року	Хворі діти від 1 до 3 років	Хворі діти від 3 до 7 років	Хворі діти від 7 до 15 років	
Анемія	2	201	159	54	56	472
	0,4±0,2	42,6±2,2	33,7±2,1	11,4±1,4	11,9±1,4	13,6±0,5
Рахіт	5	187	128	9	-	329
	1,5±0,6	56,8±2,7	38,9±2,6	2,8±0,9	-	9,5±0,4
Гіпотрофія	9	289	213	28	-	539
	1,7±0,5	53,6±2,1	39,5±2,1	5,2±0,9	-	15,6±0,6
РАЗОМ:	16	677	500	91	56	1340 від 3463
	1,2±0,2	50,5±1,3	37,3±1,3	6,8±0,6	4,2±0,5	38,7±0,5

Примітка: у чисельнику – абсолютні, у знаменнику – відносні (%) значення.

Відсоток купірування симптомів діарейних захворювань у хворих 1 групи склав 79,8 %, у 2 групі - 98,9 %, у 3 групі - 99,4 % (p<0,002).

**ВИСНОВКИ 1.** У Південному Приараллі в 1/3 хворих дітей на діарейні захворювання виявляють преморбідний фон (анемію, рахіт, гіпотрофію), що, очевидно, є основними причинами ускладненого перебігу захворювань у дітей цього регіону. **2.** Відзначено високий клінічний ефект від включення у комплекс традиційного антидіарейного лікування вітчизняного бактерійного препарату «Біфідумбактерину PL» і імунокоректора вітчизняного виробництва «Імуномодуліну» у хворих дітей діарейними захворюваннями з преморбідним фоном. **3.** Використання антидіарейної біологічно активної добавки «Бектит-М» (виробництво РУЗ) у комплекс загальноприйнятого лікування з «Біфідумбактерином PL» і «Імуномодуліном» підвищує клінічну ефективність препаратів і знижує відсоток ускладнень від діарейних захворювань у хворих дітей з фоновими захворюваннями.

1. Грейси М. Диарейные заболевания // Мед. журнал Узбекистана. – 1996. - № 1. – С. 5-9.

2. Махмудова Д.И. Современные подходы к профилактике и лечению острых диарей у детей // Вопрос питания и диарейных заболеваний у детей: Матер. Респ. Научн.-практ. конф. с международным участием. – Ташкент. – 1997. – С. 144-147.

3. Мусабаев И.К., Шавахабов Ш.Ш. Важнейшие итоги изучения инфекционной патологии, ее профилактика и задачи по снижению // Мед. журнал. Узбекистана. – 1995. - № 5. – С. 3-5.

4. Мухина Ю.Г., Большер С.В. Диарея у детей. Дифференциальная диагностика и лечение // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатол. и колопроктологии. – 1997. - № 7. – С. 7-12.

5. Нуралиев Н.А., Садуллаев О.К. Диареяли касалликларда имунодиагностики усулларининг клиник ахамияти (Клиническое значение методом иммунодиагностики при диарейных заболеваниях // Инфекция, иммунитет и фармакология (Узбекистан). – 2000. - № 3. – С. 44-46.

6. Упорная диарея у детей в развивающихся странах. Меморандум совещания ВООЗ // Бюллетень ВООЗ. – 1988. – Т. 66, № 8. – С. 22-33.

Кривда Г.Ф.

## ОСОБЛИВОСТІ ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК ІЗ СЛІДІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА РІЗНИХ МАТЕРІАЛАХ

Одеське обласне бюро судово-медичної експертизи, Одеський державний медичний університет

ОСОБЛИВОСТІ ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК З СЛІДІВ БІОЛОГІЧНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА РІЗНИХ МАТЕРІАЛАХ – У роботі наводяться особливості та характеристики ДНК, що було виділено з слідів біологічного походження на різних предметноносій (кров, сперма, відбитки, слина, волосся, кісткова тканина). Окрім цього, викладаються дані визначення якості та кількості одержаної ДНК, виділення якої є одним з відповідальних етапів ідентифікації слідів біологічного походження як речових доказів. Демонструється порівняна кількісна ефективність виділення ДНК біологічних об'єктів, акцентуються основні етапи методик, а також фактори, які впливають на властивості ДНК, що виділяється.

ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК СО СЛЕДОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛАХ – В работе приводятся особенности и характеристики ДНК, выделенной со следов биологического происхождения на различных предметноносителях (кровь, сперма, отпечатки, слюна, волосы, костная ткань). Кроме того, излагаются данные определения качества и количества полученной ДНК, выделение которой является одним из ответственных этапов идентификации следов биологического происхождения в качестве вещественных доказательств. Демонстрируется сравнительная количественная эффективность выделения ДНК биообъектов, акцентируются основные этапы методик, а также факторы, влияющие на свойства выделяемой ДНК.

PECULIARITIES OF THE EXCRETION AND DNA'S CHARACTERISTIC FROM THE TRACKS OF BIOLOGICAL ORIGINS ON THE DIFFERENT MATERIALS – In the work are adduce the peculiarities and characteristic of DNA, excreted from

tracks of biological origins on the different objects' bearers (blood, sperm, saliva, hair, bone's tissue). Besides that, the facts of determination of receiving DNA's quality and quantity are state. It's excretion is one of the main stages of biological origin tracks' identification as a material evidences' quality. The comparative quantitative effectiveness of DNA bioobjects' excretion is demonstrated. The main stages of methodics and also factors which have an influence on excreted DNA's properties are accentuated.

**Ключові слова:** ДНК, біооб'єкти, виділення, ефективність.

**Ключевые слова:** ДНК, биообъекты, выделение, эффективность

**Key words:** DNA, bioobjects, excretion, effectiveness.

**ВСТУП** Важливим фактором розвитку теорії й практики судової медицини є використання досягнень біологічних наук. Дослідження специфічності біологічного матеріалу речових доказів і встановлення їх належності до особи певною мірою залежить від рівня розвитку генетики. При ідентифікації особи, встановленні спірного батьківства велику роль відіграють біохімічна й молекулярна генетика. За аналізом відбитків пальців дослідженню підлягли різні макромолекули і найбільше білки крові. Використання білкового аналізу і тепер знаходиться на озброєнні судових ек-

спертів. У той же час на результат аналізу білків можна розраховувати тільки тоді, якщо порівнювані об'єкти мають різні показники, наприклад, неоднаковий антигенний склад. У цьому випадку можна зробити висновки про розходження об'єктів дослідження. Ідентифікувати об'єкти, ґрунтуючись на даних білкового аналізу, практично неможливо. Іншим слабким моментом білкового аналізу в судовій медицині є швидка денатурація білків, які є сприятливим субстратом для мікроорганізмів.

Останнім часом створені ефективні підходи дослідження специфічності ДНК, що характеризують сучасний рівень розвитку методології судової медицини. Піонером використання аналізу поліморфізму ДНК у судовій медицині вважається англійський учений Алекс Джеффріс, який перший у світі вирішив проблему визначення спірного батьківства за допомогою аналізу "сателітної" ДНК. Завдяки цим роботам у практику судової медицини введено поняття "геномної дактилоскопії" або "геномного фінгенпрінтингу". З 1985 року типування ДНК стає одним із найбільш ефективних засобів ідентифікації особи. На початку 90-х років минулого століття розроблено метод типування ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який є основою сучасних технологій визначення специфічності ДНК [1, 2].

Дослідження специфічності ДНК при визначенні особи людини в кримінальних справах нами почалися з 1992 року в Одеському обласному бюро судово-медичної експертизи. На цей час тільки починались роботи з вдосконалення методів виділення ДНК з біологічних об'єктів речових доказів і розробці технології ПЛР аналізу стосовно задач судової медицини. Тому одним із значних напрямків нашої роботи є виділення і характеристика ДНК із плям крові на різних матеріалах.

Об'єктом дослідження є речові докази біологічного походження.

**Предмет дослідження** – виділена з біологічних об'єктів (кров, м'язи, епітелій, сперма, слина, волосся, кістки та ін.) ДНК.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** Методи – центрифугування, електрофорез, флуорометричний аналіз, полімеразна ланцюгова реакція та комп'ютерний аналіз.

На вибір методу виділення ДНК зі слідів крові на різних матеріалах впливає стан плями і предметоносія. У випадках з невеликими і слабонасиченими плямами чи у випадках із змивами з твердих предметів позитивний результат можна одержати шляхом прямої ампліфікації ДНК без її виділення. Пряма ампліфікація без виділення ДНК: квадрат розміром 2x2 мм, вирізаний із плями крові, оброблено метанолом протягом 15 хв, зливали метанол, а зразок висушували; у пробірку зі зразком додавали компоненти ампліфікаційної суміші, крім Таq-полімерази; пробірку прогрівали на киплячій водяній бані протягом 15 хв, охолодили до кімнатної температури; конденсат осаджували короткочасним центрифугуванням; додавали 2,5 одиниці Таq-полімерази, нашаровували 20 мкл мінеральної олії. Ампліфікацію приводили в умовах, оптимізованих для використання пари праймерів.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ**  
**Виділення ДНК із плям крові з використанням Chelex 100.** У 1,5-мл епендорф, що містить 1 мл бідистильованої води, поміщали здрібнену частину плями розміром 9-25 мм<sup>2</sup>. Наступні етапи виділення здійснювали за розробленою методикою: предметоносій залишали в епендорфі, якщо він був індуферентним, незабарвленим матеріалом, наприклад, марля, папір, поліетилен, скло; якщо пляма була слабвиражена; якщо пляма піддавалася обробці, наприклад, пранню. При виділенні ДНК із плям на пофарбованих матеріалах, наприклад, джинсовому чи шкіряному одязі, предметоносій видаляли з епендорфа [3].

**Виділення ДНК із сперми та епітеліальних клітин.** Сліди сперми як речові докази фігурують в експертизах,

проведених у зв'язку зі злочинами на сексуальному ґрунті – зґвалтуванням, розпусними діями та ін. Сперма є сировиною, яке містить у собі морфологічні елементи – сперматозоїди, що є характерною і специфічною складовою частиною насінної рідини. В одному сперматозоїді міститься в середньому 2,5\*10<sup>-6</sup> мкг ДНК [4].

При висиханні сперми, а також при впливі на пляму деяких реагентів, у тому числі і миючих засобів, хвіст сперматозоїда може зруйнуватися. Для ДНК-типуювання важлива схоронність голівки сперматозоїда, тому що саме там знаходиться ядро.

При статевих злочинах практично завжди відбувається змішування сперми злочинця з піхвовими виділеннями, слиною, калом та епітеліальними клітинами потерпілої та осіб, що підозрюються. Тому для встановлення індивідуальної належності в змішаних зразках використовують диференціальний клітинний лізис, заснований на переважному лізисі сперми в присутності агентів, що редукують.

В основу методики покладений принцип збереження цілості сперматозоїдів після лізису інших клітин. Використовували метод диференціального виділення ДНК сперми й епітеліальних клітин, заснований на застосуванні лізуючих агентів – протеїнази ДО, додецилсульфату натрію (SDS-NA) і хелатного полімеру Chelex 100.

**Виділення і характеристика ДНК із слини.** У судово-медичній експертній практиці досліджують сліди слини, виявлені на недопалках, поштових конвертах, різному посуді, на одязі гвалтівника і потерпілої у випадку боротьби, на шматках тканини при підозрі на використання їх як кляп. У 1,5 мл епендорф, що містить 1 мл бідистильованої води, поміщали здрібнену частину плями розміром 9-25 мм<sup>2</sup>. При дослідженні змивів для виділення ДНК використовували 1 мл. Наступні етапи виділення здійснювали за стандартною методикою.

**Виділення й характеристика ДНК із волосся.** Волосся часто є речовим доказом у кримінальних справах при розслідуванні убивств, крадіжок, дорожньо-транспортних випадків, статевих злочинах. Волосся можна знайти в руках трупа, знаряддях злочину, одязі і тілі потерпілого і підозрюваного.

Для виділення ДНК із волосся необхідно мати його кореневу частину, тому що саме циліндричні клітки кутикули нижньої частини кореня й клітки серцевини кореня мають ядра. Перед тим як почати виділення ДНК, волосся оброблено ксилолом, абсолютним етиловим спиртом і деіонізованою водою для очищення від поверхневих забруднень і контамінантів, потім висушені на повітрі. Стерильним скальпелем відрізували частину волоса довжиною 1 мм з кореневого кінця разом з цибулиною. Суміжна частина волоса слугувала контролем, тому що волосся може містити на поверхні клітинний матеріал, що має походження від донора даного волосся або від іншого джерела.

Методика виділення ДНК із волосся складалася з наступних етапів: відрізану порцію волосся поміщали в 1,5 мл епендорф, що містить 200 мкл 5 %-ного Chelex 100; інкубували при 56 °С не менше 6-8 год чи протягом ночі; перемішували на вортексі при високій швидкості 5-10 с; центрифугували 2-3 хв при 10,000-15,000xg.; супернатант використовували для ПЛР-аналізу. Зберігали зразок при 2-8 °С чи замороженим.

**Виділення ДНК із кісткових останків.** Дослідження кісток проводили у випадку неможливості аналізу інших тканин, наприклад, при ексгумації трупа, спалюванні трупа, обробці черепа кип'яченою водою та ін. Вихід ДНК при виділенні з 100 мг стегнової кістки складав: через 76 год після смерті 6 мкг, через 123 год – 0,1-1,5 мкг. Перед початком процедури виділення ДНК кістки протирали хлораміном для видалення поверхневих забруднень і контамінантів і висушували на повітрі. Автоклаванням напилком, чи свердлом або надфілем подрібнювали кістку (якщо мож-

ливо вибирали кості губчастої будівлі) до стану пудри. Для виділення ДНК використовували одну з наступних методик: з використанням Chelex 100 чи протеїнази К.

**Виділення ДНК із кісток із використанням протеїнази.** До 2 мг здрібненої кості додавали 5 мл лізуючого буфера, що містить 0,5 М ЕДТА, рН 8,0; 0,1 % твін 20; 1 мг/мл протеїнази К. Інкубували при 56 °С протягом 1 год, а потім при 37 °С протягом двох діб до повної мацерації тканини. Тричі проводили очищення сумішшю хлороформ-ізоамілового спирту (24:1). Наступні етапи здійснювали відповідно до стандартного протоколу виділення ДНК із використанням Chelex 100.

**Виділення ДНК із відбитків і змивів з статевих органів.** Якщо змиви представлені в рідкому вигляді, то виділення ДНК починали з центрифугування протягом 2-

3 хв при 10,000-15,000хg. Потім до 20 мкл осаду додавали 5 % розчин Chelex 100 до кінцевого об'єму 100 мкл і далі процедуру продовжували відповідно до стандартного протоколу. Якщо змиви адсорбовані шматочком стерильної марлі, змоченої ізотонічним розчином хлориду натрію і потім висушені, то марлю поміщали в пробірку і заливали невеликою кількістю бідистильованої води. Термін екстрагування складав 1 добу. Потім марлю віджимали й видаляли з пробірки. Виділення ДНК проводили за стандартною методикою.

В цьому напрямку нами були досліджені наступні об'єкти.

Плями крові на різних поверхнях – 385 ; епітелій слини на недопалках - 7; плями сперми на різних носіях – 46; змішані зразки вмісту піхви при згвалтуванні; змиви з різних поверхонь – 30; кісткові останки і хрящі – 25.

**Таблиця 1. Об'єкти біологічного походження на речових доказах, досліджені ПЛР-методом за період 1992-2002 рр.**

№ за/п	Об'єкт досліджень	Кількість зразків	% одержання позитивного результату
1	Плями крові на різних носіях	385	93
2	Слина і плями слини	7	90
3	Плями сперми на різних носіях	46	70
4	Змішані зразки вмісту піхви при згвалтуванні	64	75
5	Змиви з різних поверхонь	30	85
6	Кісткові останки і хрящі	25	70
7	Волосся	48	67
8	Інше (піхвові виділення, змішані зразки вмісту прямої кишки, змішані зразки вмісту ротової порожнини, нігті, зуби, потові виділення)	40	60

**ВИСНОВКИ 1.** На вибір методики виділення ДНК зі слідів крові на різних матеріалах впливає стан плями і предмети носія. **2.** При виділенні ДНК із сперми та епітеліальних клітин головне перевести диференціацію ДНК сперматозоїдів та епітеліальних клітин. **3.** ДНК епітеліальних клітин, відбитків із слини на недопалках, як правило, виділяється без проблем. **4.** Виділення ДНК із волосся та кісткової тканини має свої особливості, ефективність методик залежить від стану біоматеріалу, терміну та умов знаходження в зовнішньому середовищі.

1. Стегнова Т., Погаєв Є., Йоанесян., Сирокашова Є., Піменов М. Исследование крови человека методом генотипоскопии (ДНК-дактилоскопия) // Методические рекомендации. – Москва: ВНИИ МВД СССР, 1991. – 24с.

2. Jeffreys A., Wilson V., Theins. Hypervariable, minisatellite regions in human DNA // Nature. 1985. V. 314 P. 67-73.

3. Mercier B., Gaucher C., Feugeas O., Mazurier C. Direct PCR from whole blood, without DNA extraction // Nukl. Acids Res. 1990.V.18 (19). P. 5908.

4. Giusti A., Baird V., Pasquale S., Application of DNA polymorphisms to the analysis of DNA recovered from sperm // J. Forensic Sci. 1986. V.31, N 2. P. 409-417.