



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56521 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61B 5/00
A61B 10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ОСОБИ

1

(21) u201013439

(22) 12.11.2010

(24) 10.01.2011

(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.

(72) КРИВДА ГРИГОРІЙ ФЕДОРОВИЧ, КРИВДА РУСЛАН ГРИГОРОВИЧ, УМАНСЬКИЙ ДМИТРО ОЛЕКСАНДРОВИЧ, КОНСТАНТИНОВСЬКА ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ЯВОРСЬКИЙ БОРИС ІГОРЕВИЧ

(73) ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб ідентифікації особи шляхом виконання судово-медичних цитологічних та молекулярно-генетичних досліджень мікрослідів біологічного походження, який **відрізняється** тим, що спочатку проводять судово-цитологічне дослідження одиначних ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів, які знаходяться в мікрослідах на речових доказах, для чого на етапі екстракції клітин з матеріалу-носія в екстрагуючий розчин 0,5 М етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) застосовують інтенсивне ротаційне перемішування, наприклад термошейкером, у режимі 1000 об./хв. протягом 24-48 годин при температурі 18 °С, після

2

чого з 1/5 частини екстрагованих клітин осаду, отриманого шляхом центрифугування у режимі 1500 об./хв. протягом 3-5 хвилин, готують цитологічний препарат і за наявності ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів проводять їх судово-медичне молекулярно-генетичне ідентифікаційне дослідження, для чого решту осаду центрифугують при 14500 об./хв. протягом 10-20 хвилин, а з отриманого осаду, який містить ядровмісні клітини, виділяють геномну ДНК, ампліфікують її, отримують ДНК-профіль, виконують порівняльний аналіз ДНК-профілів ядровмісних клітин мікрослідів та ДНК-профілів зразків, що підлягають ідентифікації, при цьому геномну ДНК, виділену з ядровмісних клітин і зразків, типують за допомогою методу ПЛП з використанням індивідуалізуючої системи "AmpFISTR® Identifier" фірми Applied Biosystems (США), отримані продукти ампліфікації розділяють за допомогою генетичного аналізатора "3130 Genetic Analyzer" фірми Applied Biosystems (США) і за співпадіння ДНК-профілів мікрослідів і зразків особи, яку ідентифікують, судять про належність мікрослідів конкретній особі.

Корисна модель відноситься до області судової медицини, і може бути використана для ідентифікації особи при проведенні судово-медичної експертизи мікрослідів біологічного походження.

Одним із видів експертизи речових доказів є судово-медичне цитологічне дослідження мікрослідів біологічного походження, наприклад, крові, сперми, епітеліальних клітин та ін. на речових доказах, а також у піднігтьовому вмісті рук осіб, що проходять за справою. При проведенні судово-цитологічних експертиз дуже важливою є правильна та оптимальна екстракція клітин при приготуванні цитологічних препаратів, які в подальшому можуть бути використані для ідентифікації. Це призводить до того, що при дослідженні мікрослідів біологічного походження виникає необхідність збереження ядерних клітин для подальшого генетичного аналізу.

На сьогоднішній день ефективність розв'язання судово-медичних експертних завдань з ідентифікації особи може бути підвищена при використанні нових технологій, пов'язаних із вивченням молекулярно-генетичного поліморфізму. Молекулярно-генетичні методи дослідження наділені суттєво найбільш високим індивідуалізуючим потенціалом, ніж традиційні методи, які засновані на дослідженні біохімічних маркерних систем крові та тканин організму (2).

На практиці при проведенні судово-медичної молекулярно-генетичної ідентифікаційної експертизи застосовується чутливий і специфічний метод аналізу варіабельності ДНК, заснований на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Визначальним моментом при проведенні судово-медичних молекулярно-генетичних досліджень з ідентифікації особи є характеристика біологічного матеріалу, який надходить після су-

U
(13)

56521
(11)

UA
(19)

дово-цитологічного дослідження та визначається кількістю та якістю ядровмісних клітин.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є метод екстрагування клітинних елементів з біологічних об'єктів при цитологічному дослідженні, який проводиться за допомогою 10-25 % розчину оцтової кислоти (наприклад, з недопалків цигарок), що дозволяє максимально виділити клітинні елементи зі слідів на речових доказах і вирішити питання встановлення наявності клітин крові та біологічного походження, визначення їх видової, статевої та органно-тканинної належності [1].

Осад, який залишився після проведення реакцій, заливають невеликою кількістю фізіологічного розчину і переносять до центрифужної пробірки, де залишилися різні нитяових пластинок (зіскоб або змив з мікросліду крові). Промивання пробірки таким чином здійснюють декілька разів. Центрифужні пробірки закривають ватними пробками і залишають на одну добу в умовах побутового холодильника. Потім вилучають предмети-носії, а в центрифужні пробірки додають 10 % розчин оцтової кислоти і центрифугують протягом 5 хв. при 1500 об/хв. Надосадову рідину видаляють, а осад ресуспензують у нових порціях оцтової кислоти до повного їх відмивання (2-3 рази).

Однак, вказаний метод екстракції має ряд недоліків: він виключає можливість у подальшому проведення етапу виділення ДНК із мікрослідів крові та клітин біологічного походження, оскільки під впливом оцтової кислоти у даній концентрації відбувається деградація і хімічна модифікація ДНК досліджуваних клітин. Крім того, екстракція клітин в розчин оцтової кислоти не забезпечує максимального вилучення достатньої кількості ядровмісних клітин з предмета-носія для подальшого дослідження. Також перенос клітин із однієї пробірки в іншу обумовлює можливу втрату придатних для дослідження клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу вдосконалення способу ідентифікації особи при дослідженні мікрослідів біологічного походження шляхом використання запропонованої комплексної методики виявлення і вилучення клітин з мікрослідів біологічного походження та їх подальшого використання для ДНК-аналізу, що підвищить доказовість ідентифікації особи за рахунок збільшення кількості ядровмісних клітин і ядерних клітинних елементів, які екстрагуються з предмету-носія, та покращення якості проведення молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження. Поставлена задача вирішується тим, що, згідно корисної моделі, у способі ідентифікації особи спочатку проводять судово-цитологічне дослідження одиничних ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів, які знаходяться в мікрослідах біологічного походження на речових доказах, для чого на етапі екстракції клітин з матеріалу-носія в екстрагуючий розчин 0,5 М етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) застосовують інтенсивне ротаційне перемішування, наприклад термошейкером, у режимі 1000 об/хв протягом 24-48 годин при температурі 18 °С, після

чого з 1/5 частини екстрагованих клітин осаду, отриманого шляхом центрифугування у режимі 1500 об/хв протягом 3-5 хвилин готують цитологічний препарат, і за наявності ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів проводять їх судово-медичне молекулярно-генетичне ідентифікаційне дослідження, для чого решту осаду центрифугують при 14500 об/хв протягом 10-20 хвилин, а з отриманого осаду, який містить ядровмісні клітини, виділяють геномну ДНК, ампліфікують її, отримують ДНК-профіль, виконують порівняльний аналіз ДНК-профілів ядровмісних клітин мікрослідів та ДНК-профілів зразків, що підлягають ідентифікації, при цьому геномну ДНК, виділену з ядровмісних клітин і зразків, типують за допомогою методу ПЛР з використанням індивідуалізуючої системи "AmpFISTR® Identifier" фірми Applied Biosystems (США), отримані продукти ампліфікації розділяють за допомогою генетичного аналізатора 3130 Genetic Analyzer" фірми Applied Biosystems (США), і за співпадіння ДНК-профілів мікрослідів і зразків особи, яку ідентифікують, судять про належність мікрослідів конкретній особі.

Спосіб здійснюється наступним чином. Фрагмент предмета носія з мікрослідом біологічного походження подрібнювали, отриману масу переносили в 1,5 мл пробірку фірми "Eppendorf" і додавали 1,0 мл 0,5 М ЕДТА рН 8,0. Інкубували в термошейкері фірми "Biosan", модель "TS-1000", протягом 24-48 годин в режимі інтенсивного ротаційного перемішування (1000 об/хв) за температури 18 °С.

Залишки фрагменту предмета-носія видаляли. Пробірку з вмістом центрифугували протягом 5 хвилин у режимі роботи 1500 об/хв. Супернатант переносили на стерильну марлю для подальшого визначення групової належності за ізосерологічною системою ABO.

Частину осаду використовували для приготування цитологічного препарату з метою визначення наявності ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів.

За присутності у препараті ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів наступним етапом дослідження було виділення геномної ДНК з рештків осаду в пробірці та подальша її ампліфікація.

ДНК виділяли з ядровмісних клітин та ядерних клітинних елементів, які знаходились в осаді після екстракції за допомогою набору «NucleoSpin®Tissue» для виділення геномної ДНК фірми «MACHERY-NAGEL» (Німеччина). Виділення ДНК проводили згідно протоколу «Genomic DNA Purification from tissue».

Геномну ДНК типували за допомогою методу IMP за наступними гіперваріабельними локусами: D8S1179 (хромосома 8), D21S11 (хромосома 21q11.2-q21), D7S820 (хромосома 7q11.21-22), CSF1PO (хромосома 5q33.3-34), D3S1358 (хромосома 3p), TH01 (хромосома 11p15.5), D13S317 (хромосома 13q22-31), D16S539 (хромосома 16q24-qter), D2S1338 (хромосома 2q35-37.1), D19S433 (хромосома 19q12-13.1), vWA (хромосома 12p12-pter), TPOX (хромосома 2p23-2pter),

D18S51 (хромосома 18q21.3), AMEL (хромосома X: p22.1-22.3; хромосома Y: p11.2; D5S818 (хромосома 5q21-31), FGA (хромосома 4q28).

Виділена ДНК досліджується за допомогою набору для ПЛП-ампліфікації "AmpFISTR® Identifier" (Applied Biosystems", США), з терміном придатності не менш ніж 10 місяців, відповідно до інструкції, яка додається до набору виробниками реагентів. При постановці ПЛП здійснювали негативний контроль (реакційна суміш містила всі компоненти, крім ДНК) і позитивний контроль (реакційна суміш містила ДНК із відомим набором алелів за кожним локусом). Зразки контрольної ДНК надані виробником реагентів. Дослідження проводили з використанням системи «GeneAmp® PCR 2720» ("Applied Biosystems", США).

Розділення продуктів ампліфікації проводили з використанням пристрою 3130 Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США). Аналіз продуктів ампліфікації з встановленням алелів проводили за допомогою програми «Gene Mapper ID Software Version 3.1».

Останнім етапом було проведення порівняльного генетичного аналізу отриманих характеристик ДНК-профілів біологічних слідів і зразків крові.

Приклади конкретного використання запропонованого способу:

Гр. К. скоїв вбивство гр. С. На місці злочину була знайдена трикотажна спортивна шапка за типом «лижної маски» з отворами для очей. Для

вирішення питання про належність знайденого об'єкта підозрюваному гр. К. необхідні спеціальні дослідження.

За даною справою була призначена судово-медична цитологічна та судово-медична молекулярно-генетична експертиза, виконання якої було доручено експертам Одеського обласного бюро СМЕ.

Під час дослідження на внутрішній поверхні шапки під час судово-цитологічного дослідження були виявлені епітеліальні клітини слизової оболонки ротової порожнини. При молекулярно-генетичному аналізі встановлено, що ДНК-профіль зразка крові гр. К. співпадає з ДНК-профілем епітеліальних клітин, що виявлені на шапці, з вірогідністю 99,999999999 %. Отримані результати дозволили довести присутність гр. К. на місці злочину.

В порівнянні з найближчим аналогом, запропонований спосіб ідентифікації особи при дослідженні мікрослідів біологічного походження дозволяє суттєво підвищити точність і якість проведення судово-медичного молекулярно-генетичного ідентифікаційного дослідження.

Література:

1. Інформаційний, лист «Судово-цитологічні дослідження мікронакладень на знаряддях травми та в піднігтьовому вмісті»

2. Деклараційний патент на Корисна модель «Спосіб ідентифікації особи» Кривда Г.Ф., Сиволап Ю.М., Кривда Р.Г., Кожухова Н.Е.