

С. В. СИРАК, И. А. ГАТИЛО, Ю. С. МАЗЕВСКАЯ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИЧНОСТИ ПО ДНК ПУЛЬПЫ ЗУБА

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ставропольский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Мира, д.310, Ставрополь, Россия, 355017.

АННОТАЦИЯ

Цель. Проведение молекулярно-генетического анализа ДНК пульпы зуба и установление генетического родства ребенка и родителя.

Материалы и методы. Для выделения ДНК предоставлен зуб 16 заявленного отца. Для изучения были даны образцы слюны предполагаемой дочери, получены препараты ДНК. В ходе исследования использовался набор реагентов «М-сорб-кость» для выделения ДНК из костного порошка.

Результаты. Проведенные исследования показали, что в препаратах ДНК, выделенных из зуба и образца слюны N, установлены следующие генотипические аллельные комбинации. Установлено, что для каждой из исследованных STP-систем в геноме заявленного отца обнаруживается аллель, который формально совпадает с аллелем условно отцовского (не материнского) происхождения в геноме ребенка.

Заключение. Как показали результаты проведенного исследования, единственным носителем ДНК при проведении судебно-медицинской молекулярно-генетической экспертизы в данном случае являлся зуб, а именно пульпа, которая защищена прочными тканями – дентином и эмалью. Уникальность этого случая заключается в том, что именно пульпа является единственной тканью, которая сохранила генетическую информацию и позволила с высокой вероятностью утверждать о кровном родстве заявленного отца и ребенка.

Ключевые слова: пульпа зуба, ДНК, идентификация личности

Для цитирования: Сирак С.В., Гатило И.А., Мазевская Ю.С. Идентификация личности по ДНК пульпы зуба. *Кубанский научный медицинский вестник*. 2018; 25(6): 154-159. DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-6-154-159

For citation: Syrak S.V., Gatilo I.A., Mazevsckaya Yu.S. Identification of a person by the DNA of the pulp of the tooth. *Kubanskij nauchnyj medicinskij vestnik*. 2018; 25(6): 154-159. (In Russ., English abstract). DOI: 10.25207 / 1608-6228-2018-25-6-154-159

S. V. SYRAK, I. A. GATILO, YU. S. MAZEVSCKAYA

IDENTIFICATION OF A PERSON BY THE DNA OF THE PULP OF THE TOOTH

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Stavropol State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, str. Mira 310, Stavropol, Russia, 355017.

ABSTRACT

Aim. The study was designed for conducting a molecular genetic analysis of DNA of the tooth pulp and establishing the genetic relationship of the child and the parent.

Materials and methods. The tooth number 16 of the claimed father was provided for the DNA extraction. Saliva samples and DNA preparations of the prospective daughter were obtained for the study. In the course of the research, the M-sorb-bone reagent kit was used to isolate DNA from the bone powder.

Results. The conducted studies have shown that the DNA preparations isolated from a tooth and the N sample of saliva have the following genotypic allelic combinations. It was established that for each of the studied STP systems in the genome of the claimed father an allele is found, which formally coincides with the allele of conditionally paternal (non-maternal) origin in the child's genome.

Conclusion. As shown by the results of the study, the only carrier of DNA in a forensic medical molecular genetic examination, in this case, was a tooth, namely, pulp, which was protected by the durable tissues – dentin and enamel. The uniqueness of this case lies in the fact that it is the pulp that is the only tissue that retains the genetic information making it possible to state the high probability of the claimed relationship of the father and the child.

Keywords: tooth pulp, DNA, identification of a person

Введение

Одной из самых значимых задач судебной медицины является идентификация личности. В связи с возросшим количеством стихийных бедствий и катастроф, остро встает вопрос опознания неизвестной личности [1, 2]. Идентификация – это определение личности человека, которому характерен индивидуальный комплекс особенностей (генетических, анатомических, функциональных), которые являются признаками личности. Идентификации подвергаются как трупы, так и живые лица [3]. В этом смысле объекты биологической природы являются наиболее востребованными и распространенными вещественными доказательствами.

При расследовании и раскрытии преступлений важнейшей доказательной базой служат результаты судебно-медицинских экспертных исследований этих объектов [1, 2]. Прогресс в области новейших технологий позволяет расширить возможности судебно-медицинских экспертиз в сфере молекулярно-генетических исследований, а именно с наибольшей вероятностью говорить о принадлежности следов на вещественных доказательствах определенному человеку [2, 3].

К молекулярно-генетическим методам относится идентификация личности и установление биологического родства на уровне геномной ДНК [1, 2].

Установлено, что мягкие ткани трупа в течение короткого времени утрачивают свои морфологические особенности. По этой причине актуальным является способ идентификации личности по ДНК пульпы зуба. Пульпа зуба является уникальной тканью, так как она устойчива к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды и защищена дентином и эмалью, которые являются самыми прочными тканями в организме [3, 4].

Пульпа представляет собой мягкую ткань зуба, которая заполняет полость коронки и каналы корней. Развитие пульпы идет параллельно с формированием коронки и корня зуба и происходит из мезенхимального зубного сосочка. Сформировавшаяся пульпа зубов построена из своеобразной рыхлой соединительной ткани с большим содержанием клеток и межклеточного аморфного вещества [1].

Волокнистые структуры представлены коллагеновыми и ретикулярными волокнами. Клеточные элементы пульпы весьма разнообразны в разных ее отделах. В наружном слое пульпы располагаются клетки вытянутой формы с резко базофильной мембраной – одонтобласты. При электронно-микроскопическом исследовании их строения установлены следующие детали: в цитоплазме выявлены хорошо развитые органеллы общего значения, четко выражены канальцы цитоплазматической сети и канальцы пластинчатого комплекса Гольджи (внутриклеточный сетчатый аппарат). На стенках канальцев обнаруживаются

рибосомы. Одонтобласты содержат большое количество митохондрий, в которых сосредоточены ферменты. За слоем одонтобластов располагается слой, бедный клетками, состоящий из волокон. В центральных слоях рыхлой волокнистой соединительной ткани содержатся фибробласты и макрофаги. Ткань пульпы обладает не только защитными свойствами, но интересна нам в качестве носителя генетической информации [1].

Методика выполнения молекулярно-генетического исследования включает проведение следующих этапов:

1. Выделение ДНК из исследуемого биологического материала
2. Проведение с выделенной ДНК реакции амплификации участков генома (ПЦР)
3. Проведение электрофореза для анализа продуктов реакции амплификации
4. Анализ результатов.

Первая задача молекулярно – генетического исследования состоит в выделении ДНК из пульпы зуба. Суть этого этапа заключается в разрушении оболочек (ядерной и клеточной) и удалении всех белковых элементов клетки [1].

Следующий этап – реакция амплификации – заключается в копировании и многократном умножении полиморфных участков исследуемой ДНК с помощью реакции ПЦР. Этот уникальный метод анализа ДНК открыт Кэри Мюлиссом в 1983 году. Он позволяет получать копии интересующих фрагментов ДНК из следовых количеств биологического материала [2].

В основе этого метода лежит природная способность ДНК к удвоению. При этом цепи ДНК расходятся и служат основой, на которой выстраивается комплементарная ей новая цепь ДНК. Копирование матрицы осуществляют ферменты ДНК – полимеразы. ДНК – полимеразы ведут синтез на одноцепочной матрице, если имеется затравка (праймер) – комплементарный матрице фрагмент растущей цепи ДНК. ДНК – полимеразы последовательно наращивают конец затравки, присоединяя к нему следующие нуклеотиды, выбор которых диктуется матрицей [1, 2].

На начальном этапе ПЦР происходит денатурация цепей ДНК исследуемого объекта, в том числе и исследуемого полиморфного локуса. Это достигается нагреванием реакционной смеси до 95°, а далее производят резкое охлаждение реакционной смеси до температуры 50-60°, в результате чего праймеры распознают комплементарные участки и присоединяются к ним. Этот процесс называется отжигом праймеров. После этого происходит удлинение праймеров (матричный синтез), в результате чего количество фрагментов ДНК удваивается. Таким образом, многократно проводя отжиг праймеров, количество копий изучаемого локуса увеличивается в геометрической прогрессии в миллионы раз [1].

Третьим этапом является анализ проведенной

ПЦР путем электрофореза и определение нуклеотидной последовательности – секвенирование. Для этого в гелевой среде под действием электрического поля полученные амплифицированные продукты разделяют по длине. Так как молекула ДНК имеет отрицательный электрический заряд, под действием электрического поля она движется в сторону положительно заряженного электрода. Участки ДНК окрашивают серебром для визуализации результатов электрофореза.

Амплифицированный профиль ДНК на электрофореграмме визуализируется в виде определенной комбинации, состоящей из одной или двух полос специфично расположенных на дорожке геля [1, 3]. С целью установления сходств и различий проводят анализ генотипов представленных образцов [4].

Эффективность работы эксперта возможно улучшить путем применения систем молекулярно-генетического типирования ДНК, изучение аналитических характеристик которого является важной и актуальной задачей.

Цель исследования: проведение молекулярно – генетического анализа ДНК пульпы зуба и установление генетического родства ребенка и родителя.

Материалы и методы

Для выделения ДНК предоставлен 16 зуб, который был единственным сохранившимся на обеих челюстях (рис. 1.1). Предварительно предпринимались попытки выделения ДНК из крови заявленного отца, но из-за давности наступления смерти, прогрессировали гнилостные изменения, и кровь к моменту проведения экспертизы была непригодна. Труп был ранее захоронен. Других носителей генетической информации, кроме 16 зуба не было.

Для изучения были даны образцы слюны предполагаемой дочери, получены препараты ДНК. В ходе исследования использовался набор реагентов «М-сорб-кость» для выделения ДНК из костного порошка. Набор реагентов включает: декальцинирующий раствор, лизирующий раствор, лизирующий компонент – 2, лизирующий компонент – 3, сорбирующий, осаждающий, промывающий и элюирующий растворы (рис. 1.2).

На начальном этапе исследования необходимо извлечь дентин с остатками пульпы, так как именно в ней содержится генетический материал. После получения дентинно-пульпарной муки, ее помещали в стерильную пробирку. Необходимый минимальный объем материала составлял 0,1 мг.

Протокол выделения ДНК из дентинно-пульпарной муки следующий:

перед началом работы набор с реагентами извлекали из холодильника и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут.

Первый этап исследования – это декальцинация.

Для приготовления рабочего раствора брали

900 мкл декальцинирующего раствора, 30 мкл лизирующего компонента 2, 40 мкл лизирующего компонента 3.

В пробирку с исследуемым материалом вносили 900 мкл рабочего раствора (рисунок 1.3), пробирку помещали в термомиксер на 24 часа при температуре 55 (рис. 1.4).

Второй этап – сорбция и осаждение ДНК.

Необходимое количество круглодонных пробирок на 2 мл маркировались, в них переносили надосадочную жидкость. Затем добавляли по 400 мкл лизирующего раствора. В пробирки с лизатом добавляли по 100 мкл сорбирующего раствора. Добавляли по 500 мкл осаждающего раствора. Тщательно перемешивали содержимое пробирки (рис. 1.5).

Третий этап – промывка ДНК.

В пробирки добавляли по 500 мкл Промывочного раствора, центрифугировали и устанавливали пробирки в магнитный штатив на 1 минуту, удаляли надосадочную жидкость. Выдерживали пробирки с открытыми крышками в течение 5 минут при комнатной температуре для удаления остатков промывочного раствора.

Четвертый этап – десорбция ДНК.

Добавляли в пробирки 50 мкл элюирующего раствора, перемешивали в центрифуге (рис. 1.6).

Выдерживали пробирки в термостате в течение 10 минут при температуре 70°, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе. Устанавливали пробирки на магнитный штатив.

Брали необходимое количество чистых 1,5 мл пробирок, маркировали, аккуратно не затрагивая магнитный сорбент, переносили раствор в чистые пробирки в соответствии с маркировкой.

Следующим этапом является проведение реакции амплификации с выделенной ДНК методом ПЦР.

Для этих целей использовали комплект реагентов для идентификации личности на основе анализа локусов AMEL, CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, F13A, F13B, FESFPS, FGA, HPRTB, LPL, TH01, TPOX, vWA геномной ДНК человека. Настоящий комплект предназначен для определения количества tandemных повторов в локусах CSF1PO, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, F13A, F13B, FESFPS, FGA, HPRTB, LPL, TH01, TPOX, vWA геномной ДНК человека, а также полиморфизма в гене амелогенина. Продукты амплификации геномной ДНК со специфическими праймерами разделяют в полиакриамидном геле в денатурирующих условиях и сопоставляют с аллельной лестницей соответствующего локуса (рис. 1.7)

Каждый набор имеет стандартный состав: комплект №1 «Набор для проведения ПЦР», Комплект №2 «Контрольные образцы». Перед на-



Рис. 1. 1.1 – вид 16 зуба после извлечения дентина и пульпы; 1.2 – набор реагентов «М-сорб-кость»; 1.3 – внесение в пробирку рабочего декальцинирующего раствора; 1.4 – пробирка, помещенная в термостат; 1.5 – проведение ПЦР, маркированные пробирки; 1.6 – пробирки, помещенные в центрифугу; 1.7 – маркированные пробирки с локусами для проведения электрофореза 1.8 – терцик с помещенными внутрь пробирками и заданными программами 1 и 2; 1.9 – горизонтальный электрофорез в 2% агарозном геле 1.10 – нанесение маркера на агарозный гель; 1.11 – проведение электрофореза в полиакриламидном геле; 1.12 – система видеодокументирования гелей «Molecular Imager Gel Doc XR» с трансиллюминатором (Bio-Rad); 1.13 – электрофореграмма; 1.14 – таблица расчета вероятности родства.

Fig. 1. 1.1 – view of the tooth number 16 after the extraction of dentin and pulp; 1.2 – M-sorb-bone reagent kit; 1.3 – introduction of working decalcification solution into the tube; 1.4 – the tube placed in a thermostat; 1.5 – PCR, labeled test tubes; 1.6 – tubes placed in a centrifuge; 1.7 – labeled tubes with loci for electrophoresis 1.8 – the tertsik with the tubes placed inside and the specified programs 1 and 2; 1.9 – horizontal electrophoresis in 2% agarose gel 1.10 – application of the marker on the agarose gel; 1.11 – conducting electrophoresis in the polyacrylamide gel; 1.12 – Molecular Imager Gel Doc XR gels video documentation system with thentransilluminator (Bio-Rad); 1.13 – electrophoregram; 1.14 – the table of calculating the probability of kinship.

чалом работы комплект вынули из морозильной камеры и разморозили содержимое пробирок при комнатной температуре. Подготовили реакционную смесь для ПЦР – анализа: ПЦР – смесь 1 – 18 мкл, ПЦР – смесь 2 – 2 мкл. Смесь перемешали и центрифугировали в течение 5 секунд при 1500-2000 об/мин для осаждения жидкости с крышек и стенок пробирок. В каждую пробирку вносили 20 мкл реакционной смеси для ПЦР и 10 мкл исследуемой ДНК. На смеси наслаивали 1-2 капли ми-

нерального масла. Пробирки помещали в терцик (рис. 1.8).

Проведение амплификации.

Для амплификации геномной ДНК человека используются следующие программы для термоциклов с активным регулированием:

Программа 1: при 60° С — D2S1338, D18S51, D19S433, F13A01, FESFPS, HPRTB, D3S1358/ D5S818, D8S1179/ TPOX, D16S539/ CSF1PO, LPL/ F13B, vWA/ TH01.

Программа 2: при 55° С — AMEL, FGA, D7S820/D13S317.

Выбор программы зависит от выбранных локусов.

Оценка выхода продуктов реакции амплификации проводится методом горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле (рис. 1.9)

В подготовленные микроцентрифужные полипропиленовые пробирки вместимостью 1 мл внесли по 5,0 мкл амплифицированных проб и добавили по 1,0 мкл раствора для внесения в агарозный гель.

Маркер молекулярной массы наносится на агарозный гель. После проведения электрофореза в 2% агарозном геле определяется область, где должны располагаться амплифицированные фрагменты ДНК (рис. 1.10).

Анализ продуктов амплификации проводится методом электрофореза в 8% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием серебром (рис. 1.11).

С помощью системы видеодокументирования гелей BIO RAD molecular Imager (рис. 1.12) получили электрофореграммы (рис. 1.13).

После чего проводили сопоставление размеров полученных ПЦР – фрагментов с соответствующими фрагментами аллельной лестницы.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что в препаратах ДНК, выделенных из зуба и образца слюны N, установлены следующие генотипические аллельные комбинации (таблица).

Установлено, что для каждой из исследованных STP- систем в геноме заявленного отца обнаруживается аллель, который формально совпадает с аллелем условно отцовского (не материнского) происхождения в геноме ребенка, а именно: D16S539 11,12; CSF1PO – 10; vWA – 15; TH01 – 6; D5S818 – 11,12; LPL – 12; F13B – 8,10; TPOX – 8; D2S1338 – 18; D7S820 – 9; D13S317 – 11; FGA – 23; D18S51 – 16; FESFPS – 11; F13A01 – 7 и Amel.

Таким образом, ПДАФ – профиль ребенка формально полностью соответствует таковому заявленного отца. Проведенная оценка статистической значимости указывает на то, что такое совпадение можно считать закономерным, т.е. обусловленным кровнородственными родительскими отношениями заявленного отца и ребенка, с вероятностью не ниже 99,91% (рис. 1.14).

Заключение

Как показали результаты проведенного исследования, единственным носителем ДНК при проведении судебно-медицинской молекулярно-генетической экспертизы в данном случае являлся зуб, а именно пульпа, которая защищена прочными тканями – дентином и эмалью. После захоронения трупа на исследование была предоставлена кровь, которая по истечении определенного срока

Таблица / Table

Генотипические аллельные комбинации

Genotypic allelic combinations, matching alleles are in bold

Объект Локус	Зуб, объект 1	Образец слюны, п
D5S818	11, 12	11, 12
D16S539	11, 12	11, 12
TPOX	8, 11	8, 8
D2S1338	18, 20	18, 23
CSF1PO	10, 11	10, 12
LPL	11, 12	10, 12
F13B	8, 10	8, 10
vWA	15, 17	15, 18
TH01	6, 7	6, 9.3
D7S820	9, 12	9, 9
F13A01	5, 7	6, 7
FESFPS	11, 11	10, 11
D18S51	16, 17	13, 16
FGA	22, 23	23, 24
D13S317	11, 11	10, 11
D3S1358	15, 16	14, 16
Amel	XY	XX

Примечание: жирным шрифтом обозначены совпадающие аллели.

подверглась необратимым изменениям, и установление родства не представлялось возможным. Уникальность этого случая заключается в том, что именно пульпа является единственной тканью, которая сохранила генетическую информацию и позволила с высокой вероятностью (99,91%) утверждать и кровном родстве заявленного отца и ребенка.

На сегодняшний день наиболее точным методом идентификации личности является анализ индивидуальных генетических отличий людей, в результате которого исследуют гипервариабельные локусы, определенная комбинация которых является уникальной характеристикой каждого человека. «Генетический паспорт» человека не может быть изменен и является характеристикой, присущей данному человеку в течение всей жизни.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Иванов П.Л., Земскова Е.Ю. О расширении сферы молекулярно-генетических экспертных исследований и совершенствовании молекулярно-генетических технологий. *Судебная Медицина*. 2015; 1(2): 2411-8729. [Ivanov P.L., Zemskova E.YU. On the expansion of the scope of molecular genetic examinations and improvement of molecular genetic technologies. *Sudebnaya Medicina*. 2015; 1(2): 2411-8729. (In Russ., English abstract)]. <https://doi.org/10.19048/2411-8729-2015-1-2-13-20>.

2. Шилов И.А., Земскова Е.Ю., Иванов П.Л. Реализация единого научно-методического подхода к проведению молекулярно-генетических экспертиз и формирование отечественной экспертной школы в области судебной генетики. *Судеб-*

ная Медицина. 2016; 2(2): 2411-8729 [SHilov I.A., Zemskova E.YU., Ivanov P.L. Realizaciya edinogo nauchno-metodicheskogo podhoda k provedeniyu molekulyarno-geneticheskikh ehkspertiz i formirovaniye otechestvennoj ehkspertnoj shkoly v oblasti sudebnoj genetiki. *Sudebnaya Medicina*. 2016; 2(2): 2411-8729. (In Russ.)].

3. Тимошенко Т.В., Земскова Е.Ю., Иванов П.Л. Изучение влияния межпопуляционных различий на вероятностную оценку результатов типирования аутомсомной ДНК. *Судебная медицина*. 2015; 2(1): 2411-8729. [Timoshenko T.V., Zemskova E.YU., Ivanov P.L. The investigation of the influence of interpopulation differences on the probabilistic assessment of autosomal DNA typing results. *Sudebnaya medicina*. 2015; 2(1): 2411-8729. (In Russ., English abstract)]. <http://cyberleninka.ru/article/n/izuchenie-vliyaniya-mezhpopolyatsionnyh-razlichiy-na-veroyatnostnuy>.

4. Земскова Е.Ю., Тимошенко Т.В., Леонов С.Н., Иванов П.Л. Межпопуляционные различия полиморфизма нуклеотидной последовательности в аллелях STR-локусов в хромосомной ДНК человека. *Судебно-медицинская экспертиза*. 2016; 5(59). 0039-4521. [Zemskova E.YU., Timoshenko T.V., Leonov S.N., Ivanov P.L. The interpopulation differences between nucleotide sequence polymorphisms in alleles of the STR-loci of human chromosomal DNA. *Sudebno-medicinskaya ehkspertiza*. 2016; 5(59) 0039-4521. (In Russ., English abstract)]. <https://doi.org/10.17116/sudmed201659528-35>.

Поступила / Received 15.09.2018
Принята в печать / Accepted 23.11.2018

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов / The authors declare no conflict of interest

Контактная информация: Сирак Сергей Владимирович; тел.: +7(8652)350551; e-mail: kafedrastom@yandex.ru; Россия, 355017, г. Ставрополь, ул. Мира, д. 310.

Corresponding author: *Sergej V. Sirak*; tel.: +7(8652)350551; e-mail: kafedrastom@yandex.ru; str. Mira, 310, Stavropol, Russia.