

УДК 340.64:577.213.32:572.2

Б.І. Яворський, Р.Г. Кривда

**ДОСЛІДЖЕННЯ АЛЕЛЬНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ 15 АВТОСОМНИХ
МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ, ЩО ВХОДЯТЬ ДО СКЛАДУ
МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ІНДИВІДУАЛІЗУЮЧОЇ ПАНЕЛІ
«AMPFLSTR®IDENTIFILER» («APPLIED BIOSYSTEMS», США),
У ЗМІШАНИХ ПОПУЛЯЦІЯХ МЕШКАНЦІВ ДЕЯКИХ РЕГІОНІВ УКРАЇНИ**

Одеське обласне бюро судово-медичної експертизи

Резюме. Наведені дані про дослідження алейного поліморфізму 15 автосомних мікросателітних локусів, які складають індивідуалізуючу панель, що широко використовується в судово-медичних молекулярно-

генетичних дослідженнях в Україні, та практичне використання цієї панелі в судово-медичній практиці.

Ключові слова: алейний поліморфізм, індивідуалізуюча панель, мікросателітні локуси, популяція.

Вступ. Можливості, що відкривають молекулярно-генетичні технології для вирішення актуальних питань судової медицини, вражають та захоплюють. Тому впровадження молекулярно-генетичного аналізу в роботу судово-медичної служби України, безсумнівно, є одним із найважливіших завдань сьогодення. Але практичне впровадження в судово-медичну повсякденність методів молекулярно-генетичної біології трапляється з деякими перешкодами, які заслуговують пильної уваги для їх найшвидшого усунення. Так, ініціативне, децентралізоване та безсистемне впровадження судово-медичних молекулярно-генетичних досліджень в Україні упродовж двадцяти років призвело до того, що ці методи використовуються в судово-медичній практиці без належного наукового обґрунтування; зараз у експертній практиці країни переважно використовуються дві індивідуалізуючі панелі, одна з яких, розроблена в Одеському обласному бюро СМЕ у 2005 році, складається з 13 мікросателітних локусів, а друга – мультиплексна індивідуалізуюча панель «AmpFISTR®Identifiler» («Applied Biosystems», США).

Втім, етнічна різноманітність населення України є чинником, що примушує задаватися питаннями про ефективність і достовірність локалізації використовуваних у світовій практиці методів молекулярно-генетичних досліджень. Через відсутність систематизованих даних щодо основних популяційних та інформаційних (дискримінаційних) характеристик індивідуалізуючих панелей для української популяції експерти використовують для розрахунку ймовірностей середні (консервативні) дані про розподіл частот зустрічальності алелей локусів для популяцій Росії, Європи та США, які надаються виробниками реагентів. Внаслідок цього можуть виникати помилки, пов'язані з переоцінкою або заниженням ідентифікаційної значущості отриманих даних у експертних висновках.

Тому впровадження цього методу в судово-медичну практику конкретної країни, у тому числі України, повинно супроводжуватися комплексом науково-дослідницьких, юридичних та еко-

номічних заходів, метою яких є створення відповідної бази для обґрунтування та формалізації роботи фахівця з молекулярно-генетичного аналізу.

Першим та одним із найважливіших етапів наукового обґрунтування використання будь-якої молекулярно-генетичної індивідуалізуючої системи на основі багатоалельних локусів геному людини для конкретної країни є дослідження алейного поліморфізму локусів, що входять до її складу, у тих популяціях, що проживають на території країни, з подальшим обчисленням параметрів інформативності (інформаційної значущості) цих локусів. Таке дослідження дозволяє визначити інформаційну значущість індивідуалізуючої системи в цілому, науково обґрунтувати і підвищити доказове значення експертних висновків при проведенні судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз із метою ідентифікації особи або встановлення біологічної спорідненості. Подібні дослідження ведуться в багатьох країнах, зокрема, у Російській Федерації.

На даний час проведено експертну оцінку індивідуалізуючої панелі з 13 монолокусних систем мікросателітних локусів, яка використовується у практиці Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи [1]. На даний час працівниками Одеського обласного бюро СМЕ проводиться дослідження алейного поліморфізму 15 автосомних мікросателітних локусів, що входять до складу популярної в Україні індивідуалізуючої панелі «AmpFISTR®Identifiler» («Applied Biosystems», США) [2-4]. Дана індивідуалізуюча мультиплексна панель була розроблена спеціалістами фірми "Applied Biosystems" у 2002 р. для використання в судово-медичних молекулярно-генетичних експертних дослідженнях.

Мета дослідження. Для науково обґрунтованого та ефективного використання вищеписаної індивідуалізуючої панелі при виконанні судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз та досліджень необхідним є дослідження алейного поліморфізму локусів, які складають цю панель.

Матеріал і методи. Створено банк зразків рідкої крові неспоріднених представників змішаних популяцій мешканців міст Одеси, Києва, Донецька, Дніпропетровська і відповідних областей. Вибірки з 237 неспоріднених представників змішаної популяції міста Одеси і Одеської області, з 208 – міста Києва і Київської області, з 311 – міста Дніпропетровська і Дніпропетровської області були сформовані із зразків рідкої крові, отриманих в Одеському обласному, Київському міському та Дніпропетровському обласному бюро СМЕ в ході проведення судово-медичних досліджень. Вибірка з 144 неспоріднених представників змішаної популяції міста Донецька і Донецької області була сформована із зразків крові, отриманих у науково-дослідному експертно-криміналістичному Центрі МВС України в Донецькій області при проведенні судово-медичних молекулярно-генетичних досліджень.

Зразки крові зберігалися з антикоагулянтом (0,5 М розчин ЕДТА, рН 8,0 або 3,8 % розчин цитрату натрію) у холодильнику не більше 2-3 днів за температури +4 °С.

Геномну ДНК виділяли зі зразків рідкої крові за допомогою набору «NucleoSpin®Blood» для виділення геномної ДНК фірми «MACHEREY-NAGEL» (Німеччина) відповідно до рекомендацій, які додаються виробниками.

Концентрацію виділеної при використанні набору «NucleoSpin®Blood» ДНК вимірювали флуориметрично за допомогою ДНК-флуориметра «Hoefer DyNA Quant™200» («Hoefer Scientific Instruments», США), згідно з інструкцією до приладу.

Виділену геномну ДНК типували методом ПЛР за 15 гіперваріабельними мікросателітними локусами, які входять до складу мультиплексної системи індивідуалізуючої панелі "AmpFISTR®Identifiler" ("Applied Biosystems", США). При проведенні ПЛР здійснювали негативний і позитивний контроль. Використовували розчини контрольної ДНК, надані виробниками реагентів. Дослідження здійснювали з використанням термоциклерів «GeneAmp® PCR 2720» («Applied Biosystems», США), «PTC-220 DNA Engine Dyad» («Bio-Rad», США) та «MJ Research PTC-200» (США), згідно з наведеними інструкціями.

Проводили автоматичний аналіз продуктів ампліфікації 15 мікросателітних локусів індивідуалізуючої панелі і розділення флуоресцентно-мічених ПЛР-фрагментів у чотирьох капілярних матрицях методом капілярного гелелектрофорезу з полімером POP-4™ за допомогою автоматичного генетичного аналізатора «3130-Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США), згідно з наведеними інструкціями.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням програмних продуктів PowerStats V12 ("Promega Corporation", USA) [6] і Arlequin ver. 2.000 [5].

Результати дослідження та їх обговорення.

Для кожної досліджуваної популяційної вибірки встановлені частоти зустрічальності алелей локусів, які входять до складу вказаної індивідуалізуючої панелі. Аналіз алельного поліморфізму вказаних локусів при дослідженні представників змішаних популяцій показав, що усі локуси є поліморфними. Характер розподілу частот зустрічальності алелей не відрізняється від аналогічних у світових популяціях та має уні- або бімодальний характер.

При проведенні порівняльного аналізу генетичного поліморфізму 15 автосомних STR-локусів чотирьох популяційних вибірок не виявлено статистично значущих відмінностей розподілу частот алельних варіантів, що дає змогу зробити висновки про високу гомогенність популяційних вибірок представників змішаних популяцій мешканців зазначених міст і відповідних областей.

Дані поліморфізму досліджених 15 мікросателітних локусів вказують, по-перше, на можливість формування змішаного популяційного масиву, що являє собою адекватний зріз із реально існуючої популяційної ситуації в Україні; по-друге, дає змогу використання частотного розподілу змішаного популяційного масиву для розрахунку ймовірностей при проведенні судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз із метою ідентифікації особи та встановлення біологічної спорідненості в експертних установах України.

На підставі результатів цього аналізу сформовано об'єднаний популяційний масив України (900 осіб).

Частоти зустрічальності алелей 15 досліджуваних STR-локусів, які входять до складу мультиплексної індивідуалізуючої панелі, в об'єднаному популяційному масиві розраховували з використанням програмного продукту PowerStats V12 ("Promega", США). Дані про розподіл алелей наведені в таблиці.

Перевірка на відхилення генотипних частот 15 досліджуваних локусів від РХВ не виявила значного відхилення від рівноважного стану.

Значення Но та Не статистично не відрізняються, що підтверджує вірність нульової гіпотези, тобто досліджувана популяційна вибірка відповідає рівновазі Харді-Вайнберга. Змішана популяція об'єднаного популяційного масиву мешканців України є збалансованою, її генетична структура не порушена. Аналіз алельного поліморфізму локусів вказаної індивідуалізуючої панелі при дослідженні цього масиву показав, що всі локуси є високополіморфними. Характер розподілу частот зустрічальності алелей не відрізняється від аналогічних у світових популяціях та має уні- або бімодальний характер. Таким чином, отримані дані можуть використовуватися як референтна база даних частот зустрічальності алелей 15 мікросателітних локусів індивідуалізуючої

Таблиця

Частоти зустрічальності алелей 15 мікросателітних локусів ДНК об'єднаного популяційного масиву України

Алель	Локуси															FGA
	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA	
4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	0,000556	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	0,000556	-	0,23291	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
7	-	-	0,012778	0,000556	-	0,1423	-	-	-	-	-	0,001111	+	0,003889	-	-
8	0,006111	-	0,15056	0,002778	-	0,10339	0,14778	0,015556	-	-	-	0,57	-	0,003333	-	-
8,3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0,007778	-	0,14111	0,04333	-	0,20845	0,073333	0,094444	-	+	-	0,10444	+	0,054444	-	-
9,3	-	-	-	-	-	0,30739	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	0,07	-	0,28333	0,25889	-	0,005003	0,057778	0,057222	-	0,000556	-	0,055656	0,006111	0,067778	-	-
10,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0,077222	-	0,22111	0,28611	0,000556	+	0,37278	0,26833	-	0,00444	+	0,24111	0,01111	0,33667	-	-
11,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000556	-	-	-	-	-	-
11,3	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	0,15833	-	0,15056	0,32611	0,000556	-	0,22944	0,325	-	0,092778	0,000556	0,025556	0,087778	0,35667	-	-
12,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001667	-	-	-	-	-	-
13	0,325	-	0,036667	0,066667	0,002222	-	0,076111	0,195	-	0,21889	0,001667	0,001111	0,11833	0,16167	-	-
13,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,020556	-	-	+	-	-	-
13,3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	0,22944	-	0,003333	0,012778	0,12056	-	0,04	0,042778	-	0,35056	0,10611	-	0,15611	0,013333	-	-
14,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,021667	-	-	+	-	-	-
15	0,097778	-	0,000556	0,001667	0,24722	-	0,002222	0,000556	0,001111	0,16222	0,10389	-	0,16833	0,001667	-	-
15,2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	0,039444	-	-	-	-	-	-
16	0,026667	-	-	-	0,25444	-	-	-	0,050556	0,039444	0,20389	-	0,16222	+	0,001111	-
16,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
16,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,027788	-	-	-	-	-	-
17	0,001111	-	-	-	0,21722	-	-	-	0,20389	0,003333	0,26556	-	0,12	+	0,001111	-
17,2	-	-	-	-	-	-	-	-	0,006667	-	-	-	-	-	+	-
18	+	-	-	-	0,145	-	-	-	0,095556	-	0,22667	-	0,07	-	0,013333	-
18,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,007778	-	-	-	-	-	+
19	0,000556	-	-	-	0,012222	-	-	-	0,11778	-	0,076667	-	0,042778	-	0,089444	-
19,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Таблиця (продовження)

20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,013333	-	-	0,028333	-	-	0,15167	
20.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001667	-	-	0,017778	-	-	0,185
21.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,002222	
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0,19944	
22.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	
22.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0,12667	
23.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,006111	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0,11944	
24.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000556	
24.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,070556	
25.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	0,018889	
26.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	0,00333	
28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001111	
28.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
29.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
30.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
34.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

панелі та аналогічних монолокусних систем для інформаційно-довідкового забезпечення експертного ДНК-аналізу мешканців України.

Висновки

1. На матеріалі 900 неспоріднених представників змішаної популяції мешканців України створено референтну базу даних частот зустрічальності алелей 15 автосомних мікросателітних локусів (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, FGA), що входять до складу індивідуалізуючої мультиплексної панелі «AmpF1STR® Identifier» («Applied Biosystems», США).

2. Дослідження алельного поліморфізму локусів, що складають вказану індивідуалізуючу панель, показало, що для об'єднаного популяційного масиву України характер розподілу частот зустрічальності алелей вказаних локусів дозволяє використовувати встановлені частотні характеристики досліджуваних локусів індивідуалізуючої панелі як опорні параметри при розрахунках ймовірностей у ході судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз з метою ідентифікації особи та встановлення біологічної спорідненості в експертній практиці України.

3. Для підвищення доказового значення та ступеня наукової обґрунтованості експертних висновків при обчисленні ймовірностей у ході проведення судово-медичних молекулярно-генетичних експертиз із метою ідентифікації особи та встановлення біологічної спорідненості

доцільно використовувати значення частот зустрічальності алелей вибірки об'єднаного популяційного масиву України, що дозволяє найбільш адекватно оцінити результати ДНК-аналізу саме для української популяції.

Література

1. Яворський Б. І. Експертна оцінка індивідуалізуючої панелі 13 монолокусних систем мікросателітних локусів, яка використовується у практиці Одеського обласного бюро судово-медичної експертизи / Б.І. Яворський // Укр. мед. альманах. – 2012. – Т. 15, № 4. – С. 104-107.
2. Яворський Б. І. Варіабельність 15 автосомних мікросателітних локусів геномної ДНК у змішаній популяції мешканців Одеського регіону / Б.І. Яворський // Інтегративна антропологія. – 2009. – № 2 (14). – С. 12-17.
3. Яворський Б.І. Варіабельність 15 автосомних мікросателітних локусів геномної ДНК у змішаній популяції мешканців Київського регіону // Зб. наук. праць співробітників НМАПО імені П.Л. Шупіка. – 2010. – Випуск 19, книга 3. – С. 469-477.
4. Яворський Б.І. Варіабельність 15 автосомних мікросателітних локусів геномної ДНК у змішаній популяції мешканців Донецького регіону / Б.І. Яворський, І.Г. Долгих // Укр. мед. альманах. – 2011. – Т. 14, № 1. – С. 228-231.
5. Schneider S. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetic data analysis / S. Schneider, D. Roessli, L. Escoffier // University of Geneva, Switzerland: Genetic and Biometry Laboratory, 2000. – P. 212-217.
6. Tereba A. Tools for Analysis of Population Statistics / A. Tereba // Profiles in DNA. – 1999. – Vol. 2, Promega Corporation. – Mode of access: <http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats/>

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО ПОЛИМОРФИЗМА 15 АВТОСОМНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ, КОТОРЫЕ ВХОДЯТ В СОСТАВ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ИНДИВИДУАЛИЗИРУЮЩЕЙ ПАНЕЛИ «AMPFLSTR®IDENTIFILER» («APPLIED BIOSYSTEMS», США), В СМЕШАННЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ЖИТЕЛЕЙ НЕКОТОРЫХ РЕГИОНОВ УКРАИНЫ

Б.И. Яворский, Р.Г. Кривда

Резюме. Приведены данные об исследовании аллельного полиморфизма 15 автосомных микросателлитных локусов, составляющих индивидуализирующую панель, которая широко используется в судебно-медицинских молекулярно-генетических исследованиях в Украине.

Ключевые слова: аллельный полиморфизм, индивидуализирующая панель, микросателлитные локусы, популяция.

INVESTIGATION OF ALLELIC POLYMORPHISM OF 15 AUTOSOMAL MICROSATELLITE LOCI, FORMING THE MULTIPLEX INDIVIDUALIZED SYSTEM FOR PCR-AMPLIFICATION "AMPFLSTR®IDENTIFILER" ("APPLIED BIOSYSTEMS", USA), IN MIXED POPULATIONS OF INHABITANTS OF SOME REGIONS OF UKRAINE

B.I. Yavorskyi, R.G. Kryvda

Abstract. We present data about an investigation of allelic polymorphism of 15 autosomal microsatellite, making up an individualizing panel that is widely used in forensic medical molecular-genetic researches in Ukraine.

Key words: allelic polymorphism, individualizing panel, STR loci, population.

Regional Bureau of Forensic Medical Examination (Odessa)

Рецензент – проф. В.Т. Бачинський

Buk. Med. Herald. – 2013. – Vol. 17, № 3 (67), part 1. – P. 188-192

Надійшла до редакції 08.06.2013 року