

Современные возможности судебной биологии в исследовании следов спермы. Сообщение 2. Генотипоскопические методы исследования

ГУ «80 Центральная военная судебно-медицинская лаборатория»¹, Центральная судебно-биологическая лаборатория Государственной службы медицинских судебных экспертиз²

В статье приведена расшифровка основных терминов и понятий, которые используются при исследовании ДНК и часто встречаются в заключениях генотипоскопических экспертиз. Доступно описаны сущность и этапы проведения полимеразной цепной реакции. Указаны оптимальные сроки забора биологического материала у живых лиц для генотипоскопического исследования. Произведена группировка вещественных доказательств в зависимости от их следственной значимости. Представлены различные методики исследования смешанных пятен (постановка ПЦР на матрице смешанной ДНК и метод дифференциального лизиса). Разъяснена идентификационная значимость У-хромосомной ДНК

На сегодняшний день исследование ДНК, выделенной из объектов биологического происхождения, является общепринятой и наиболее информативной и доказательной практикой при расследовании различных преступлений против личности, в том числе и при половых преступлениях. Необходимо отметить, что в настоящее время генотипоскопические методы исследования являются прямым продолжением судебно-биологического исследования вещественных доказательств. Не заменяя собой традиционные серологические методы, а расширяя их, генотипоскопические методы дают следствию конкретизировать полученные результаты и установить возможность происхождения биологических объектов от определенных лиц. [2] Применение биостатистического метода расчета вероятности позволяет выразить эту возможность в цифровом виде.

Молекулярно-генетический, или генотипоскопический, или ДНК-анализ относится к одним из наиболее доказательных и достоверных методов исследования. Прежде всего, хотим напомнить некоторые основные термины и понятия, которые используются при исследовании ДНК и часто встречаются в заключениях генотипоскопических экспертиз. Это ДНК, генотип, полиморфный локус, аллельные варианты.

ДНК – это молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты, носитель генетической информации обо всех признаках живого организма. Ядерная ДНК находится в ядре любой клетки, митохондриальная – в митохондриях, расположенных в цитоплазме клетки.

Все последовательности ДНК, составляющие геном ядра, организованы в хромосомы. У человека таких хромосом 23 (в обычных клетках каждая хромосома представлена парой гомологичных хромосом, поэтому общее число хромосом 46). Точнее у человека 22 пары хромосом (аутосом) и две половые хромосомы: у женщин это пара X-хромосом, у мужчин X и Y-хромосомы. В хромосоме последовательности ДНК располагаются линейно, при этом каждая специфическая последовательность (генетический признак) занимает определенный участок хромосомы, который называют локусом. [7]

У разных индивидуумов одни и те же генетические признаки часто представлены альтернативными формами. Данные формы называют аллелями. Наличие в популяции нескольких стабильных аллелей одного локуса называется полиморфизмом. [6]

Полиморфный локус, таким образом, – это строго определенный участок молекулы ДНК, который у разных людей может отличаться по длине или составу. При этом какой-то конкретный, определенный тип этого участка называется аллельным вариантом. Каждый аллельный вариант имеет условное, чаще цифровое обозначение.

Генотип – совокупность множества характеристик, выявляемых в разных полиморфных локусах.

Генотип является признаком, характеризующим каждого конкретного человека, и, соответственно, знание генотипа человека или установление генотипа в пятне (а равно и в любом другом объекте биологического происхождения) может быть использовано для решения вопроса о принадлежности этого пятна конкретному человеку или при решении вопроса об идентификации личности.

Известно, что половину генетического материала ядерной ДНК человек наследует от матери, половину от отца. Следовательно, генотип человека по каждому конкретному локусу складывается из двух аллельных вариантов, которые могут совпадать (гомозиготный профиль) или отличаться друг от друга (гетерозиготный профиль).

В основе генотипоскопических методов исследования лежит технология полимеразной цепной реакции (ПЦР), за разработку которой американский ученый Кэрри Мюллис в 1994 году был удостоен Нобелевской премии. Полимеразная цепная реакция представляет собой циклический процесс, осуществляемый при участии фермента ДНК-полимеразы и обеспечивающий амплификацию (умножение) определенного участка ДНК. В процессе реакции данная последовательность накапливается экспоненциально, и к концу реакции ее количество измеряется миллионами копий. Границы амплифицируемого участка ДНК определяются двумя праймерами, комплементарными 3-концам интересующей последовательности двухцепочечной молекулы ДНК. [6] При помощи ПЦР практически из одной клетки можно получить достаточно большое количество генетического материала, которое можно в дальнейшем визуализировать, зафиксировать и сравнить с необходимыми образцами. Метод позволяет исследовать минимальные количества биологического материала, в том числе и в объектах, подвергшихся разрушительному воздействию факторов внешней среды.

Генотипоскопическое исследование любых биологических объектов можно условно разделить на несколько этапов:

1. Выделение ДНК. Для выделения ДНК необходимо разрушить клеточные и ядерные мембраны (что чаще всего достигается с помощью протеолитических ферментов либо температурного воздействия), а также по возможности очистить полученный препарат от белковых примесей, различных загрязнений и веществ, препятствующих в дальнейшем проведению полимеразной цепной реакции (ингибиторов ПЦР). Традиционными методами выделения ДНК являются: метод фенольной экстракции; выделение ДНК при помощи 5% водной взвеси комплекса ионообменных смол - реагента «Chelex 100». [3] В последнее время широкое распространение получили методы, позволяющие экстрагировать высокоочищенную ДНК, а также автоматизировать процесс ее выделения. Это широкий спектр коммерческих наборов реагентов, производимых американскими и европейскими

компаниями. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Выбор наиболее оптимального метода зависит от вида и количества биологического объекта, характера предмета-носителя, наличия загрязнений.

2. Проведение полимеразной цепной реакции (то есть выборочного копирования, размножения определенного участка ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы) с использованием наборов реагентов, специфичных к ДНК человека. Условия амплификации, как правило, соответствуют рекомендациям производителя реагентов, они зависят от характеристик исследуемых локусов, праймеров, качества анализируемой ДНК.

3. Аллельные характеристики ДНК после ПЦР выявляют с помощью электрофореза. В зависимости от длины (массы) и, соответственно, подвижности в электрическом поле полученные амплифицированные фрагменты ДНК распределяются в геле на различном расстоянии от старта. Разделение амплифицированных фрагментов выполняют методом капиллярного электрофореза в автоматических анализаторах ДНК или методом вертикального электрофореза в 4-6% денатурирующем полиакриламидном геле с последующей окраской нитратом серебра. [4]

4. Учет результатов и последующий расчет вероятности происхождения биологического объекта от конкретного лица.

Вещественные доказательства, подлежащие отбору и исследованию при половых преступлениях, можно условно разделить на следующие группы:

1. Вещественные доказательства, имеющие отношение к потерпевшей (потерпевшему). Цель исследования данных объектов - это поиск чужеродного биологического материала (спермы, крови, слюны, клеток, волос), а также установление возможности происхождения следов от конкретного лица.

Таковыми вещественными доказательствами прежде всего являются тампоны с содержимым влагалища, ротовой полости, прямой кишки; смывы с тела потерпевшей со следов, подозрительных на наличие спермы либо другого биологического материала; подногтевое содержимое рук потерпевшей; счесы с лобка. При изъятии данных вещественных доказательств необходимо отметить важную роль эксперта, который проводит судебно-медицинскую экспертизу потерпевшей (исследование трупа в случае убийства). От грамотного и своевременного изъятия подобных объектов может зависеть положительный результат исследования ДНК. Необходимо напомнить, что существует определенный временной интервал, по истечении которого забор образцов с целью обнаружения чужеродного материала у живых лиц нецелесообразен:

- содержимое влагалища – до 7 суток с момента происшествия;
- содержимое ротовой полости – в течение 1 суток;
- содержимое прямой кишки – до первого акта дефекации.

В полостях трупа биологический материал (сперма) может сохраняться более длительное время при условии отсутствия гнилостных процессов, например, в холодное время года.

К этой же группе вещественных доказательств, имеющих отношение к потерпевшему, необходимо отнести предметы одежды жертвы полового преступления. Обнаружение на указанных предметах чужеродного биологического материала (и прежде всего спермы) может иметь большое доказательное значение.

2. Вещественные доказательства, имеющие отношение к подозреваемому. Цель исследования данных объектов - это поиск биологического материала (крови, слюны, клеток, волос), происходящего от потерпевшего, с вероятностной оценкой данного события.

Таковыми вещественными доказательствами являются смывы и мазки-отпечатки с полового члена подозреваемого (целесообразно изъятие данного объекта не позднее 3 суток с момента происшествия); подногтевое содержимое его рук; расчески с лобка. Также к этой группе относятся белье и другие предметы одежды подозреваемых лиц. Обнаружение на указанных вещественных доказательствах биологического материала, происходящего от потерпевшего, а также определение типа этого материала (клетки, кровь, слюна), способствует установлению картины происшествия.

3. Вещественные доказательства, изъятые при осмотре места происшествия. Цель исследования данных объектов – прежде всего обнаружение следов, образованных в результате смешения биологического материала потерпевшего и подозреваемого с оценкой вероятности случайного согласования генетических признаков.

Также важным является исследование объектов, происходящих от потерпевшего либо подозреваемого по отдельности. Следственная значимость этих объектов зависит от места, где произошло преступление. Например, если изнасилование совершено в доме подозреваемого, наибольший интерес представляет обнаружение следов (крови, клеток) потерпевшего и наоборот.

Таковыми вещественными доказательствами могут быть презервативы, окурки, смывы и соскобы с места происшествия, пятна на простынях, пододеяльниках и т.д.

В связи с высокой чувствительностью методов генетического исследования при изъятии вещественных доказательств одним из важнейших моментов является соблюдение всеми участниками следственных действий определенных правил, позволяющих предотвратить загрязнение (контаминацию) объектов чужеродной ДНК.

От любого лица, соприкасавшегося с вещественными доказательствами на этапе их изъятия, может попасть «чужая» ДНК (брызги слюны при разговоре, частички кожи, потожировые наслоения). [4] Поэтому необходимо отметить, что изъятие вещественных доказательств, приготовление смывов, соскобов, изъятие образцов для сравнительного исследования должны проводиться в перчатках, с использованием чистых, обработанных дезинфицирующим раствором инструментов. Вещественные доказательства не должны проходить через множество рук, над ними нельзя громко разговаривать, смеяться, чихать и т.д. По возможности быстро вещественные доказательства должны быть осмотрены и надлежащим образом упакованы. От соблюдения этих несложных правил зачастую может зависеть успешное проведение судебно-генетической экспертизы.

По типу биологического материала следы на вещественных доказательствах можно также разделить на две группы:

1. Содержащие сперму объекты, характерные для половых преступлений. Это, прежде всего, тампоны с содержимым влагалища, ротовой полости, прямой кишки, пятна на различных предметах одежды, презервативы и т.д.

2. Объекты, не содержащие сперматозоиды (могут встречаться при любых видах преступлений, в том числе и при половых) Это пятна крови, слюны, подногтевое содержимое, окурки и т.д.

От типа и характера биологического материала зависит тактика эксперта при работе с этими вещественными доказательствами.

Содержащие сперму объекты.

Первым этапом исследования является поиск следов спермы на представленных на экспертизу объектах. Для этого используют общепринятые судебно-биологические методики. [5]

Затем проводят генетическое исследование с целью установления мужского генотипа и решения вопроса о возможности происхождения спермы от конкретного лица.

Чувствительность современных методов ДНК-анализа очень высока. Для получения результата достаточно, чтобы в исследуемом объекте были хотя бы единичные сперматозоиды. Оптимальная концентрация ДНК составляет от 500 пг/мкл до 1 нг/мкл (для сравнения 4 ядерные клетки содержат около 23 пг ДНК). Таким образом, успешное выделение ДНК из единичных сперматозоидов является вполне реальной и разрешимой задачей.

Давность образования пятен, содержащих сперму, на получение результата значительного влияния не оказывает. Гораздо более проблематичными являются ситуации, когда исследуемые объекты подвергались разрушительному воздействию факторов внешней среды (например, гниение, либо воздействие высокой температуры, каких-либо химических реагентов), в том числе из-за неправильного изъятия, упаковки и хранения вещественных доказательств. Для выделения ДНК из подобных объектов используют специальные приемы и методики, которые, тем не менее, не всегда оказываются достаточно эффективными.

В большинстве случаев пятна, содержащие сперму, представляют собой объекты, в которых присутствует биологический материал от двух и более лиц. Часто в исследуемом объекте смешаны разные выделения (сперма, клетки влагалищного эпителия), имеется примесь крови. Определение принадлежности компонентов смешанных пятен конкретным лицам становится затруднительным.

Для решения вопроса о принадлежности компонентов смеси определенному лицу могут быть использованы различные приемы.

1. Один из методов – постановка ПЦР на матрице смешанной ДНК и последующий расчет вероятности происхождения от конкретного лица, с учетом всех возможных вариантов. Величина вероятности случайного совпадения признаков, рассчитанная таким образом, бывает недостаточно высокой. То есть теоретически такие генетические признаки, которые могли бы согласоваться с выявленными в смешанном объекте, могут встречаться в популяции у одного человека из десятков либо сотен тысяч.

2. Для смешанных пятен спермы и влагалищных выделений, крови целесообразно применение методики "дифференциального лизиса". [1]

Данный метод основан на различии в химическом строении клеточных мембран сперматозоидов и клеток крови или эпителия. Мембраны сперматозоидов содержат большое количество метионина и, соответственно, дисульфидных связей по сравнению с клетками эпителия и крови, что повышает устойчивость сперматозоидов к воздействию внешних факторов. Для разрушения дисульфидных связей помимо протеолитических ферментов используют восстановитель дитиотрейтол (DTT) или меркаптоэтанол. Методика "дифференциального лизиса" представляет собой два этапа разрушения клеточных элементов и промежуточный этап отмывания.

I этап – разрушение клеток крови и эпителия с использованием лизирующих агентов и протеолитического фермента протеиназы К. Лизат клеток, полученный на

этом этапе, условно называют “женской” или эпителиальной фракцией, т.к. разрушению подвергаются преимущественно клетки крови и эпителия (женский компонент смешанного пятна). Из полученного лизата при необходимости можно выделить ДНК эпителиальной фракции, то есть установить генотип женщины.

II этап – отмывание сперматозоидов, оставшихся в осадке, от продуктов лизиса клеток крови и эпителия.

III этап – лизис клеток “мужской” фракции (т.е. оставшихся сперматозоидов) с использованием восстановителя дисульфидных связей дитиотреитола и последующее выделение ДНК из продуктов лизиса. [1]

В результате данная методика позволяет либо выделить генотип спермы в чистом виде, либо (при значительном преобладании в смеси эпителиальных клеток) получить смешанный профиль, в котором четко учитываются варианты обоих компонентов.

Таким образом, если в результате использования методики дифференциального лизиса клеток эпителия и сперматозоидов удастся установить генотип спермы, вероятность случайного совпадения его с генотипом подозреваемого снижается на несколько порядков по сравнению с аналогичной величиной, рассчитанной по смешанному пятну. То есть теоретически такие генетические признаки, которые могли бы случайно совпасть с выявленными в объекте, могут встретиться в популяции у одного человека из сотен миллиардов, что является практически индивидуализирующим результатом. [5]

Не содержащие сперму объекты.

Судебно-генетическое исследование выявленных при половых преступлениях объектов, не содержащих сперму, практически не отличается от исследования подобных объектов, найденных при любых других видах преступлений. Для исследования крови, слюны, волос, клеточного материала используются стандартные методы выделения и исследования ядерной ДНК, с последующей оценкой полученных результатов и применением методов биостатистического анализа вероятности случайного совпадения.

Одним из новых методов судебно-генетической экспертизы при половых преступлениях является исследование полиморфных участков У-хромосомной ДНК. [7]

У-хромосомная ДНК по сравнению с аутомсомной (т.е. не половой) обладает некоторыми особенностями. Она содержится в ядрах клеток только лиц мужского генетического пола, наследуется по отцовской (мужской) линии на протяжении поколений в неизменном виде, наследуется гаплотипически, то есть совокупностью генетических признаков – гаплотипом.

Идентификационная значимость исследования У-хромосомной ДНК существенно ниже по сравнению с аутомсомной. Для статистического анализа необходим массив данных о частотах встречаемости У-хромосомных гаплотипов в той или иной популяции. Кроме того, у родственников по мужской (отцовской) линии характеристики У-хромосомной ДНК будут одинаковы, что не позволит конкретно высказаться о происхождении биологического материала в пятне от подозреваемого лица (все его родственники по мужской линии будут иметь такой же гаплотип).

Тем не менее, анализ полиморфизма У-хромосомной ДНК остается перспективным. При проведении судебно-генетической экспертизы смешанных пятен при половых преступлениях исследование У-хромосомной ДНК позволяет:

- оценивать количество мужчин, биологический материал (клетки, сперма) которых присутствует в пятнах;
- выявлять генетические характеристики «мужской» составляющей пятен в случаях многократного преобладания клеток женщины и невозможности выделить отдельные составляющие смеси (например, в подногтевом содержимом жертвы);
- устанавливать гаплотип мужчины в содержимом половых путей потерпевшей даже в случаях, когда насильственный половой акт не заканчивался семяизвержением, либо если преступник ранее подвергся операции по вазэктомии.
- при невозможности предоставить образцы подозреваемых, например, если они находятся в розыске, сравнение полученных результатов можно проводить с образцами слюны (крови) их родственников по мужской линии. Это позволяет косвенно ответить на вопрос о происхождении спермы на вещественных доказательствах от подозреваемого.

Таким образом, на сегодняшний день трудно переоценить значимость судебно-генетических исследований вещественных доказательств при половых преступлениях. Среди неоспоримых преимуществ анализа ДНК по сравнению с традиционными биологическими методами можно указать на следующие:

1. Современные способы ДНК-типирования отличаются высокой чувствительностью, позволяют анализировать незначительное количество содержащего ДНК биологического материала, даже при его частичном разрушении.
2. В результате проведения генотипоскопического исследования можно исключить либо с высокой степенью вероятности подтвердить возможность происхождения биологического материала от определенного лица.
3. Методы исследования ДНК позволяют идентифицировать лиц, анализируя объекты, содержащие смешанный биологический материал от разных людей. Так в смешанных пятнах спермы и влагалищного содержимого применение методики дифференциального лизиса позволяет отдельно установить генотип спермы и эпителиальной фракции.

Литература

1. Гомончук, А. Н., Корбан, В. В., Боровко, С. Р. Дифференцирование смешанных пятен спермы и влагалищных выделений: материалы съездов, международных симпозиумов, научно-практических конференций: в 2 т. Минск: Медисонт, 2005. Т. 2.
2. Гусаков, А. Ю., Громова, В. Ф., Боровко, С. Р., Аккалаева, О. Х. К вопросу о взаимодействии при проведении судебно-биологических и генотипоскопических экспертиз в Государственной службе медицинских судебных экспертиз Республики Беларусь. Актуальные вопросы сотрудничества судебно-медицинских служб государств-участников Содружества Независимых Государств: материалы Междунар. конф. Минск: Медисонт, 2007.
3. Корниенко, И. В., Водолажский, Д. И., Вейко, В. П., Щербаков, В. В., Иванов, П. Л. Подготовка биологического материала для молекулярно-генетических идентификационных исследований при массовом поступлении неопознанных тел. Ростов н/Д: ООО «Ростиздат», 2001.
4. Кухарьков, Ю. В., Пучков, Г. Ф., Боровко, С. Р., Миклевич, Н. А. ДНК-типирование в судебной медицине: научное издание. Минск: БелАКК, 2003.

5. Организация и производство медицинских судебных экспертиз. Инструкции и методические указания: сб. нормат. док. Т. 2. Экспертиза вещественных доказательств. Судебная биология, судебная генетика, судебная цитология. Минск: Белсудмедобеспечение, 2004.
6. Пименов, М. Г., Культин, А. Ю., Кондрашов, С. А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: учеб. пособие. М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001.
7. J.M.Butler. Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Elsevier. 2005.