

5. Клименко Н. И. Криминалистика как наука : монография. Киев: Правник, 1997. 83 с.

6. Когутич І. І. Теоретичні основи використання криміналістичних знань під час розгляду кримінальних справ у суді: автореф. дис. ... д-ра юрид. наук: 12.00.09. Київ, 2010. 37 с.

7. Криміналістика. Академічний курс: підручник / [Т. В. Варфоломеева, В. Г. Гончаренко, В. І. Бояров та ін.]. Київ: Юрінком Інтер, 2011. 504 с.

Афанасьєва Ксенія Владиславівна,
судовий експерт відділу
молекулярно-генетичних досліджень
лабораторії біологічних досліджень
та обліку Київського науково-
дослідного експертно-криміналіс-
тичного центру МВС України

ДЕГРАДАЦІЯ ДНК В СУДОВІЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІЙ ЕКСПЕРТИЗІ

ДНК – одна з найважливіших макромолекул, яка включає в себе необхідну для функціонування організму інформацію та завдяки якій відбувається еволюція. Різноманітні чинники можуть викликати її деградацію [1, с. 14]. Перед тим як розпочати розгляд теми деградації ДНК давайте трошки згадаємо історію.

Відкриття ДНК відбулося в середині минулого століття за допомогою багаторічної праці чотирьох вчених – Френсіса Крика, Джеймса Уотсона, Моріса Вілкінса та Розалінд Франклін. В 1962 році троє з них, а саме – Ф. Крик, Д. Уотсон та М. Вілкінс отримали Нобелівську премію за відкриття подвійної спіралі – ДНК. За їх моделлю, ДНК – це подвійна нитка, що скручена у спіраль, та побудована з нуклеотидів. Нагадаємо, що нуклеотид – це фосфорний ефір нуклеозиду, який в свою чергу побудований з азотистої основи, з'єднаної з цукром (рибоза або дезоксирибоза).

Приблизно через двадцять років відбулись відкриття пов'язані з ДНК, котрі стали проривом для кримінальної судово-експертної діяльності. В 1984 році Алік Джеффріс відкрив метод ДНК-дактилоскопії – ідентифікацію індивідумів, на основі унікальної послідовності ДНК. В 1985 році біохімік Кері Мулліс в журналі “Science”, опублікував статтю стосовну розробленого ним експериментального метода молекулярної біології ПЛР, котрий широко використовується в криміналістичній діяльності.

Велика цінність ДНК в молекулярно-генетичному дослідженні заключається в тому, що це потужний інструмент у розслідуванні кримінальних злочинів. Також, аналіз ДНК це унікальна можливість

встановити факти батьківства чи спорідненості, оскільки за винятком однойцевих близнюків кожна людина має власну унікальну ДНК. Таким чином, об'єкти дослідження котрі були зібрані на місці злочину можуть допомогти встановити злочинців або ж навпаки зняти з невинною людини підозри [2, с. 23]. Слід відзначити, що за останні двадцять років ДНК-типуювання розширило можливості судової експертизи, що вплинуло на те, як правоохоронні органи проводять слідство.

Водночас, не зважаючи на стрімкий розвиток науки та методології досліджень існує певний спектр факторів, які створюють перешкоди у роботі експертів з ДНК-матеріалом. Різні чинники, насамперед зовнішні, можуть впливати на стан ДНК, що в свою чергу приводить до її видозмінення. Це ускладнює та впливає на подальшу роботу судового експерта або взагалі робить неможливим отримання результату.

Однією з найбільш поширених проблем є зміна стану ДНК внаслідок її деградації. Деградація ДНК в зразках та біологічних слідах дослідження відбувається через дію зовнішніх чинників або внутрішньоклітинних механізмів, а саме – гідролітичного розщеплення, хімічного окиснення та ферментативної деградації. Внаслідок вищезгаданих процесів відбувається сегментація ДНК на все більш малі фрагменти [3, с. 42].

Спочатку розглянемо вплив на деградацію ДНК внутрішньоклітинних механізмів.

Одним з таких механізмів є хімічне окиснення. Клітини організму за допомогою спеціальних ферментів постійно підтримують свій окислювано-відновлювальний стан. Коли баланс порушується, підвищується рівень активних форм кисню. Активні форми кисню це – малі активні молекули: іони кисню, перекиси, вільні радикали, вони являються побічним продуктом кисневого метаболізму. Надмірна їх кількість може негативним чином позначитись на теломерах, а вони виконують захисну функцію ДНК. Більш того, вони можуть спричинювати окислення ДНК і тоді, вона вже не може виконувати свою функцію. У випадку окислення, головною ціллю активних форм кисню є подвійні карбонові зв'язки в пуринових та піримідинових азотистих основах нуклеотидів, котрі є будівельними блоками ДНК. Це спричиняє фрагментацію кільця азотистої основи та її подальшу модифікацію. Велика кількість побічних продуктів вищезазначеного окислення в подальшу може спричиняти блокування реплікації та негативним чином впливати на ампліфікацію, що проводиться за допомогою стандартної Taq-DNA полімерази. Необхідно відмітити, що серед азотистих основ – гуанін, частіше за інші основи піддається окисленню, що в свою чергу пояснюється його низьким окисним потенціалом.

Іншим негативним впливом є ферментативна деградація. Для того щоб пояснити згубний вплив ферментів на ДНК, треба зазначити, що клітини містять багато органел – мітохондрії, ядро, рибосоми, лізосоми, ендоплазматичний ретикулум, Апарат Гольджі, центріолі. Звернемо свою увагу саме на лізосоми, котрі містять цілий спектр різноманітних ферментів,

серед яких наявні – ліпази, протеази та нуклеази. Саме смерть клітин спричинює вивільнення лізосою гідролітичних ферментів, внаслідок чого руйнуються такі біомолекули, як гістонові білки. Їх ліквідація спричинює активну дію ендонуклеаз, які розщеплюють ДНК. У випадку, коли здійснюється вплив мікроорганізмів на клітини, відбувається вивільнення нуклеаз, які додатково пошкоджують фрагменти ДНК. Разом з тим, підвищена концентрація вільного кальцію в цитозолі активує фосфоліпази, котрі руйнують мембрану, а це спричинює вивільненню ще більшої кількості гідролітичних ферментів. Тому, слід відмітити, що деградація ДНК, після смерті людини є невідворотною [4, с. 21].

До головних зовнішніх чинників, які впливають на деградацію ДНК відносять – температуру, світлові промені, підвищену вологість. Висока температура, вологість або просто наявність води сприяють появі та швидкому розмноженню бактерій, а також подальшому гниттю біологічних слідів. Світлові промені теж можуть негативним чином впливають на біологічні об'єкти дослідження.

Треба зазначити, що людський біологічний матеріал у вигляді органів, кісток, виділень містить органічні сполуки (білки, вуглеводи, ліпіди, мікромакроелементи та воду), які створюють прекрасні умови для розвитку та невинного росту мікроорганізмів, що в свою чергу прискорює деградацію ДНК.

Деградація ДНК веде до виникнення проблем з типуванням ДНК, а саме до неправильної ампліфікації або взагалі її відсутності, дисбалансу гетерозиготних піків, випаданню алелей.

Логічно зауважити, якими важливими факторами для молекулярно-генетичного дослідження є умови зберігання, транспортування та коректного відбору зразків. Також має значення тривалість зберігання об'єктів та вплив факторів зовнішнього середовища. За умови, якщо кров суха, перші ознаки деградації з'являються через декілька місяців, натомість кров у рідкому стані деградує набагато швидше, саме тому рекомендують найшвидше перенести її на марлю та висушити. Як вже було сказано пояснюється це тим, що волога середа та вода тільки пришвидшує ріст бактерій, що негативно впливає на стан ДНК. Зберігання об'єктів дослідження в морозильних умовах за рахунок зменшення кількості розкладу нуклеотидних основ допомагає уникнути деградації ДНК. Тільки треба зауважити, що повторний цикл розморожування та заморожування знову її спричинює. Кісткові фрагменти зберігають впродовж декількох років в сухому вигляді при температурі – 18-20 градусів. Якщо сліди утворені трупною кров'ю деградація ДНК вже присутня, як й при гнитті об'єктів дослідження [5, с. 18].

Також слід додати, що існують певні особливості роботи з деградованою ДНК. Перш за все це її виділення відбувається за допомогою наборів – IQ Promega, Prepfiler BTA, нуклеоспін. Ці набори використовують при обмеженій кількості деградованого біоматеріалу людини, бо інші методи просто неможливо використати. Наприклад, Prepfiler BTA використовуються

магнітні частинки, які за допомогою маленьких розмірів збільшують площу поверхні для захвату ДНК під час екстракції.

Під час Real Time краще використовувати набори «Quantifiler Human +» та «Quantifiler Trio», бо за їх допомогою можна дізнатися ступінь деградації ДНК в досліджуваних об'єктах. Це, в свою чергу, дає змогу якісно провести нормалізацію об'єктів та отримати коректні результати.

Перед тим як зупинити свою увагу на наборах для ампліфікації, треба відмітити, що біологічний матеріал, який знаходиться на речовині може бути досліджений з використанням STR (short tandem repeat) маркерів. Мікросателіти (STR-маркери) ДНК – локуси, які мають короткі послідовності у межах від 3 до 7 нуклеотидів, а довжина алелей становить від 100 до 500 п.н. Таким чином, STR локуси є найбільш перспективні для дослідження деградованої ДНК, в якій може бути незначна кількість придатних для аналізу ділянок. Невеликі розміри STR локусів дають більше шансів провести ДНК дослідження, особливо для зразків, які мають мінімальні кількості ДНК або деградовану ДНК. Не так давно з'явилася інформація про використання нових ампліфікаційних систем – «miniSTR», котрі відкривають нову еру в криміналістиці. Відрізняються «miniSTR» тим, що фланки поліморфної ділянки ДНК мають зменшену послідовність нуклеотидів, що обумовлює розмір продуктів ПЛР – менше 200 пар нуклеотидів. Основним недоліком же цього набору є отримання хибно позитивного результату – гомозиготність алелю при її гетерозиготності. Пояснюється це тим, що в ділянці розташування праймерів, на матричній ДНК, де знаходиться зменшена послідовність нуклеотидів та саме прикріплюються праймери, виявляються мутаційні заміщення [5, с. 23].

Щодо наборів для ампліфікації, «Identifiler Plus» дає більше чітку картину ДНК-профілювання аніж просто «Identifiler». Невеликий діапазон розміру амплікона в наборі «Identifiler Plus» в поєднанні з іншим набором «Minifiler» допомагає отримати набагато більше інформації про деградовану ДНК. [6, с. 42].

З часом виникла потреба в високо варіабельних STR локусах, котрі можуть максимізувати перекриття. Набор «Globalfiler» розроблений за 6-барвниковою технологією, яка дає змогу проводити пряму ампліфікацію 21 аутомосального STR-локуса, амелогеніну, Y-indel та Y-STR-локуса [7, с. 16]. В наборі «Globalfiler» є 10 mini-STR локусів, котрі розроблені для отримання оптимальних результатів навіть з сильно деградованих зразків. За рахунок збільшення кількості аналітичних ділянок, збільшується вірогідність отримання більш повного та якісного ДНК-профілю.

Отже, при роботі з деградованим біологічним матеріалом треба задіяти цілий спектр знань та проявити розуміння того, як саме з ним працювати. Саме таке особливе ставлення до об'єктів дослідження може допомогти отримати результат там, де взагалі здавалося все втрачене для дослідження.

Список використаних джерел

1. «DNA Degradation and Its Defects», Kohki Kawane“ Kou Motani“ Shigekazu Nagata, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Jun; 6(6): a016394.
2. GAUDI OF VICTIMS PROVIDE.
3. Dr. Surat P, Ph.D.Reviewed by Dr. Damien Jonas Wilson, MD, Medical Life Science.
4. «An Investigation of the Effect of DNA Degradation and Inhibition on PCR Amplification of Single Source and Mixed Forensic Samples», Bruce McCord, Kerry Opel, Maribel Funes, Silvia Zoppis, and Lee Meadows Jantz, report for U.S. Department of Justice.
5. Судово-медична експертиза об'єктів біологічного походження за STR локусами ядерної ДНК з використанням полімеразно-ланцюгової реакції (навчально-методичний посібник, затв. вченою радою НМУ імені О.О. Богомольця 28.12. 2012 р.). - Київ, 2013. - 83 с.
6. Forensic DNA typing strategy of degraded DNA on discarded cigarette ends using the AmpF ℓ STR $\text{\textcircled{R}}$ Identifiler $\text{\textcircled{R}}$, Identifiler $\text{\textcircled{R}}$ Plus and MiniFiler TM PCR amplification kits, Ip SC,Lin SW,Li C,Lai KM, Sci Justice.2014 Jul;54(4):311
7. Globalfiler TM PCR Amplification Kit, Applied Biosystems.

Аханкіна Тетяна Олегівна,

старший судовий експерт
Черкаського відділення КНДІСЕ
МЮ України

ПРОБЛЕМНІ ПИТАННЯ, ЯКІ ВИНИКАЮТЬ У РАЗІ ПРИЗНАЧЕННЯ СУДОВО-ЕКОНОМІЧНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ ЩОДО ПІДТВЕРДЖЕННЯ ВИКОРИСТАННЯ БЮДЖЕТНИХ КОШТІВ (НЕЦІЛЬОВЕ ВИКОРИСТАННЯ, ВИЗНАЧЕННЯ ЗБИТКІВ), ОТРИМАНИХ ПІДПРИЄМСТВАМИ, УСТАНОВАМИ, ОРГАНІЗАЦІЯМИ БЕЗ НАДАННЯ МАТЕРІАЛІВ ПЕРЕВІРКИ (РЕВІЗІЇ)

Відповідно до ч. 1 ст. 242 Кримінального процесуального кодексу України «Експертиза проводиться експертною установою, експертом або експертами, яких залучають сторони кримінального провадження або слідчий суддя за клопотанням сторони захисту у випадках та в порядку, передбачених статтею 244 цього Кодексу, якщо для з'ясування обставин, що мають значення для кримінального провадження, необхідні спеціальні знання. Не допускається проведення експертизи для з'ясування питань права».

Відповідно до ч. 1 ст. 243 КПК «Експерт залучається у разі наявності підстав для проведення експертизи за дорученням сторони кримінального провадження».