

ТИПИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ МЕТОДАМИ ПЦР И КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА: РЕАЛЬНОСТЬ, ВОПРОСЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

А.С. Бавыкин

ООО «Ниармедик плюс», Москва

Аннотация: Целью текущего обзора является раскрытие новых перспектив для РНК- и ДНК-анализа в рутинной практике судебной биологии. В обзоре рассмотрены современные тканевые маркеры, основанные на матричных РНК (мРНК), методы их тестирования и подходы для совмещения РНК-анализа со стандартными протоколами исследования судебного материала.

Исходя из практического опыта зарубежных исследователей, новые маркеры вполне совместимы с классическими протоколами, включая использование методов ПЦР и капиллярного электрофореза, и могут быть применены после постановки иммунологических тестов, что усиливает чувствительность и не требует принципиального отказа от их использования.

На сегодняшний день сформированы относительно готовые мультиплексные тканевые наборы, подготовленные для коммерческих реализаций в скором будущем. Популяционное генетическое разнообразие в экспрессии генов определяет возможность разработки отечественных панелей мРНК-маркеров на базе существующих зарубежных панелей.

Ключевые слова: типирование тканей, тканевые мРНК-маркеры

TISSUE TYPING BY MEANS OF PCR AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS: NEW ASPECTS, REALITY AND ISSUES

Bavykin A.S.

Abstract: «When the DNA is not enough» – an issue that becoming popular among forensic biologists [1]. The reasons for that are methods of tissue typing, that have limited accuracy and gradually becoming obsolete.

The purpose of this review is to discuss the integration of new mRNA markers to the routine genetic forensic practice. The review discusses possibilities of utilizing the developed mRNA biomarkers for tissue typing as well as the approaches of combining gene expression analyses with standard sample workflow in forensic and criminal laboratories.

Based on data obtained by the foreign researches, new mRNA markers are quite compatible with classical protocols, including PCR and capillary electrophoresis, increase the specificity of immunological methods and do not require rejection of their use. In the near future we can expect commercially developed tissue specific and multiplex assays at markets abroad.

Although population diversity of genetic expression does not allow to create a universal multiplex panel, nevertheless the existing tissue mRNA panel can be enriched by the national features.

Keywords: mRNA – analysis, expression biomarkers of tissues

<http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2017-3-1-48-58>

◇ ВВЕДЕНИЕ

Судебные эксперты все чаще сталкиваются с проблемами недостаточности генетического анализа для покрытия всех нужд биологической экспертизы [1]. Поводом для дискуссий являются методы тканевой диагностики, которые обладают ограниченной точностью и постепенно устаревают.

Существующие в арсенале отечественных судебных биологов методы типирования тканей основаны на иммунологических и биохимических маркерах. Новые диагностические методы должны обладать сопоставимым удобством с уже имеющимися и не оказывать дополнительной нагрузки на эксперта.

Анализ степени выраженности (*экспрессии*) генов позволяет не только усиливать чувствительность за счет многократной амплификации целевой мишени, но и может быть интегрирован в процесс классического генетического анализа биообразцов. В 2012 г. международное сообщество судебных генетиков инициировало проект «EUROFORGEN-NoE», целью которого является поиск новых мРНК-маркеров, подлежащих адаптации к судебной практике. В текущем обзоре обобщены основные результаты, полученные зарубежными лабо-

раториями – участниками этого проекта. РНК-анализ открывает новую эпоху в биологическом картировании биообразца и новые возможности для судебных биологов, нуждающихся в современном инструментари по проведению углубленного анализа судебного материала.

◇ 1. БАЗОВЫЕ МЕТОДЫ: ОГРАНИЧЕНИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ОБНОВЛЕНИЯ

Многие судебные лаборатории располагают иммунологическими и биохимическими методами, предназначенными для оценки состава биообразцов, таких как слюна, венозная кровь, менструальная кровь, семенная жидкость, вагинальная секреция и кожа. Тем не менее каждый из них обладает рядом определенных ограничений.

■ 1.1. Определение слюны

Распространенными способами выявления следов слюны являются иммуноферментные методы (*например, коммерческий, Phadebas®*) или с использованием иммуносорбции (*например, SERATEC® Amylase Test*), нацеленные на детекцию альфа-амилазы. Однако стоит учитывать, что амилазы могут присутствовать и в секретах различных органов и тканей, включая мочеполовую систему, кровь,

поджелудочную железу и др., поэтому иммунологический метод больше полезен для первичных исследований сложных и несмешанных образцов.

■ 1.2. Определение венозной и менструальной крови

Из наиболее известных методов для определения основного маркера крови, гемоглобина, можно отметить «HemDirect» (SERATEC), который является достаточно чувствительным (от 40 нг/мл). Ограничение метода состоит в том, что им сложно дифференцировать венозную кровь от менструальной, равно как и определять тканеспецифичность, поскольку гемоглобин может выявляться и в других биологических жидкостях, таких как моча, слюна и вагинальный секрет. Кроме того, отмечена кросс-реактивность этого теста с кровью приматов и некоторых грызунов [2].

■ 1.3. Определение семенной жидкости

Иммунологические методы для тестирования следов спермы определяют антиген PSA, который хоть и считается весьма специфичным гендерным признаком, но тем не менее не лишён ограничений. Например, получены данные [3] о том, что не менее 80 % женщин с раком молочной железы могут давать положительную реакцию с данным антигеном. Это при том, что средняя частота встречаемости онкологических пациентов в России составляет 26,8 случаев на 100 000 населения [4], из которых на долю женщин приходится ~ 75 %, что грозит значительным риском ошибок определения пола в тех образцах, где невозможно определить ДНК-профиль. Кроме того, PSA присутствует в разных тканях и может встречаться, например, в крови мужчин, перенесших вазэктомию [5], а также в моче [6].

◇ ПРЕИМУЩЕСТВА И ОСОБЕННОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РНК МАРКЕРОВ

Возможно ли обновление настоящих биологических методик? Известно, что любая смена методов порождает массу трудностей, прежде всего в интерпретации значимости нового маркера. Уникальность мРНК-маркеров состоит в том, что уровень их экспрессии можно привязать к «своему» белку, который прежде являлся объектом для иммунологической диагностики.

Матричные РНК отвечают за синтез своего белка или белкового семейства с общим первичным транскриптом. Главное удобство их использования заключается в высокой концентрации РНК в клетке в расчете на молекулу целевого белка. В среднем на одну молекулу белка может приходиться 100–1000-кратное количество мРНК [7]. Следовательно, при удачном подборе кандидатных мРНК прогнозируемая чувствительность метода усиливается.

Вторым важным преимуществом в мРНК-диагностике является методика тестирования, которая основана на ПЦР, что многократно усиливает специфичность выявления нужного маркера и практически полностью минимизирует кросс-реактивность.

Третьим неоспоримым преимуществом является масштабность – возможность одновременного анализа нескольких РНК-маркеров (набора) в одной реакции. Для некоторых научных приложений существуют и белковые диагностические панели, однако при массовом решении задач судебной практики они, очевидно, уступят в себестоимости и необходимости использования дорогого оборудования.

Новая тенденция, на которую стоит обратить внимание, заключается в постепенной адаптации методов экстракции и анализа РНК-маркеров с базовой про-

цедурой пробоподготовки образцов, характерной для ДНК-типирования [3].

◇ 2. МЕТОДЫ мРНК-АНАЛИЗА АДАПТИРОВАННЫЕ ДЛЯ СУДЕБНОЙ ГЕНЕТИКИ

Классическим методом анализа мРНК является реакция обратной транскрипции (для синтеза ДНК-матрицы) и ПЦР в реальном времени. Этот метод позволяет оценить степень выраженности генов, и большинство мРНК-мишеней были подобраны именно таким образом. Первоначально группы судебных мРНК-маркёров анализировали по этому протоколу в виде небольших мультиплексов для каждого типа ткани. В дальнейшем, исходя из соображений упрощения в будущем работы экспертов и сокращения расходов на новое оборудование, стала намечаться тенденция по пути совмещения методов ДНК- и РНК-анализа. На рисунке 1 изображен основной принцип интеграции РНК-анализа в схему генетического исследования судебных образцов.

Отличительной чертой совмещённого протокола является визуализация продуктов экспрессии генов не на приборах для ПЦР – РВ, а методом капиллярного электрофореза. Этот подход даёт возможность эксперту не только оценить уникальный спектр выраженности генов для каждого типа ткани, но и уровень экспрессии отдельного маркера. Более того, добавляются новые возможности для ДНК- и РНК-анализа смешанных образцов путем использования единой классической программы типа «GeneMapper».

Адаптированный для судебной практики РНК-анализ состоит из этапов выделения РНК, освобождении от ДНК (по выбору), обратной транскрипции, ПЦР и капиллярного электрофореза.

Каждый из этапов обладает важными характеристиками, которые помогают наиболее полно оценивать экспертный образец.

■ 2.1. Выделение нуклеиновых кислот

На текущий момент методика адаптации анализа РНК для задач судебной экспертизы находится на этапе становления и поэтому рассматривается несколько вариантов, каждый из которых можно приспособить для конечного протокола. На этапе выделения нуклеиновых кислот (НК), на рисунке 1, перечислены три варианта (а, б, в).

Вариант «а» предусматривает выделение НК разными наборами. Естественно, что для каждого типа НК – это лучше, поскольку есть возможность соблюсти все условия обогащения конечной фракции экстракта (например, за счет рН отмывочных буферов) по ДНК или РНК. Однако это разделение может стать дополнительным пунктом увеличения расхода средств и времени на анализ. Исходя из этих соображений, был предложен вариант «б», который предусматривает анализ РНК, которая всё-таки присутствует в растворе ДНК при использовании классических судебных наборов для выделения ДНК [8]. Вопрос качества и достаточности этой РНК для последующих анализов пока остается спорным. С одной стороны, это удобно и выгодно, но, с другой стороны, было показано, что использование магнитных сорбентов негативно влияет на выход и качество РНК [9]. Таким образом, в настоящее время методом выбора для совместного ДНК/РНК выделения чаще является колоночная технология [8].

■ 2.1.1. РНК/ДНК чувствительность (для разных тканей)

Результаты испытания мультиплексных мРНК-панелей показали, что эффективность выявления ДНК- и РНК-маркеров в разных тканях может существенно отличаться и зависит от индивидуальных особенностей

личности. Например, в отношении такого популярного типа тканей, как кожа, РНК-анализ может оказываться в пять раз более чувствительным [10].

В целом, как следует из разных публикаций по работе с серийными разведениями, мультиплексный ПЦР на основе мРНК обладает высокой чувствительностью и может улавливать до 5–8 пг РНК, что соответствует количеству РНК в одной клетке [11, 12].

2.1.2. Выделение из старого и деградированного материала

Несмотря на распространенное мнение относительно нестабильности РНК, многочисленные испытания показали возможность выделения и получения полного РНК-профиля из деградированного и старого материала, включая сухие пятна крови, тампоны и даже парафиновые блоки. Так, в недавних исследованиях был получен удовлетворительный РНК-профиль из сухих старых пятен крови и тампонов со сроком хранения более десяти лет [13, 14]. Другой группе авторов удавалось амплифицировать РНК-маркеры из материала, который в течении 17 месяцев хранился в условиях наличия естественных гуминовых ингибиторов [15]. Эти и другие подобные данные свидетельствуют в пользу возможности использования комбинированных РНК–ДНК-анализов для работы не только со сложными и старыми образцами, но и материалом, отобранным после наступления смерти [16, 17].

2.1.3. Малые объёмы материала

Совместимость РНК и ДНК методов особенно остро проявляется при работе с малым количеством материала, что характерно для судебных эпизодов. И в этом отношении интересны работы, в которых тканеспецифичные мРНК-маркеры были успешно выделены и проанализированы из таких микроскопических по объёму образцов, как 0,001 мкл крови, 0,05 мкл слюны и 0,01 мкл семенной жидкости [18]. При таких объёмах в материале могут нередко отсутствовать клетки, что чревато неполным ДНК-профилем, и возможна компенсация за счет мРНК-маркеров.

2.2. Освобождение от ДНК

Метод используется для избавления от ДНК, которая может быть матрицей для посадки праймеров, используемых для обратной транскрипции, что может ослаблять чувствительность метода. В этом случае конечную аликвоту с НК делят пополам: одну используют для ДНК-анализа, а во второй проводят ингибирование ДНК с использованием фермента ДНКазы.

2.3. Обратная транскрипция

Обратная транскрипция (ОТ) ставит перед собой задачу получения кодирующей ДНК (кДНК), которая будет служить матрицей для последующего ПЦР-анализа.

Праймеры в ОТ необходимы для синтеза кодирующей цепи, и вопрос о выборе их типов до сих пор остается дискуссионным. Существует по крайней мере три классических варианта синтеза кДНК: (а) с использованием т.н. «рендом» праймеров, представляющих собой смесь комбинированного состава олигонуклеотидов длиной от 6 до 15 нуклеотидов (по выбору заказчика). Этот метод позволяет синтезировать кДНК размером от 20 до 500 нуклеотидов на любой РНК-матрице и может быть удобен для деградированного материала, а также параллельного получения кДНК-матрицы для работы с микроРНК; (б) олиго dT15 (олигонуклеотид из 12–15 «Т»-нуклеотидов), начинающих синтез кДНК с полиаденилированного «хвоста» матричных РНК. По сравнению с (а) этот метод позволяет производить синтез только с мРНК, а не со всех

подряд типов РНК, которые присутствуют в экстракте; (в) использование специфических праймеров – иногда полезно для работы с целевыми мишенями, но не всегда удобно, если РНК мало. По сравнению с (а) и (б) данный метод не столь удобен, однако не так давно его модификация получила продолжение в только что опубликованной работе [19], где авторы предложили использовать праймеры для консервативных участков мРНК, которые наиболее стабильны в условиях деградации.

2.4. Полимеразная цепная реакция

Среди пионерских работ по совмещению РНК – ДНК протоколов стоит отметить научный проект из новозеландского Института экологических наук и исследований (ESR) от J.D. Waele [9], в котором были обобщены возможности взаимного дополнения классических методов типирования тканей (иммунологических и биохимических) и молекулярно-биологических (РНК и ДНК анализа).

В результате этой работы было сделано, по крайней мере, два важных вывода, касающихся ПЦР. Во-первых, была расширена ранее существовавшая панель для ПЦР «CellTyper» (разработанная в ESR), которая была доукомплектована новыми к тому времени маркерами [20–22], что позволило в едином мультиплексном режиме анализировать сразу все пять основных типов тканей (венозную кровь, слюну, вагинальный секрет, менструальную кровь, сперму и семенную жидкость). Ранее существовавшие мультиплексные панели на основе ПЦР – РВ хоть и позволяли достаточно точно типировать отдельные ткани, однако в таком виде были плохо приспособлены для использования в рутинной судебной практике [23]. Во-вторых, амплификация была возможна после проведения стандартных биологических тестов Combur® и Phadebas®, что существенно расширяет возможности биологической экспертизы.

В последующие годы за счет открытия и внедрения новых маркеров появились новые версии панели «CellTyper», равно как и её аналоги [11], и настоящая, третья версия (CellTyper – v.3) включает в себя 19 мРНК-маркеров (см. табл. 1) и выполняется в режиме мультиплексного ПЦР с последующим анализом с использованием капиллярного электрофореза и программы GeneMapper ID – X [24].

2.4.1. Чувствительность и концентрация

Расчет количества вносимой кДНК в реакцию обычно соотносят с концентрацией геномной ДНК, полученной при совместном выделении. Считается, что для ОТ и последующей амплификации достаточно внести объём экстракта, который соответствует рассчитанной геномной ДНК в количестве 200 пг (для образцов крови) и 4 нг (для образцов слюны, семенной жидкости, вагинальной слизи и менструального секрета) [8]. Объём полученного образца кДНК, необходимый для последующей ПЦР в реальном времени, рассчитывают индивидуально для каждой лаборатории. Обычно стараются подобрать такие условия, при которых минимальный пик на последующем капиллярном электрофорезе был не менее 150 RFU, а максимальный – не более 8000 RFU [24].

2.4.2. Специфичность

Сам по себе ПЦР является достаточно специфичным методом, за счет комплиментарности праймеров. Однако на уровне кДНК имеется возможность увеличивать специфичность метода путём расположения праймеров на участках последовательности кДНК, соответствующим разным экзонам мРНК.

2.5. Капиллярный электрофорез

Благодаря адаптации способа визуальной оценки мультимплексного ПЦР для РНК-маркеров, появилась возможность использовать капиллярный электрофорез в качестве очень удобного инструмента для комплексного анализа образца, где оценку результатов реакции можно выполнять на том же оборудовании с программным обеспечением, что и ДНК-анализ. В настоящее время для электрофореза продуктов амплификации используется полимер POP-7 (или POP-4 – по выбору исполнителей) [24]. Требования к качеству пиков на электрофореграмме намного проще, чем для STR-профиля. Пики могут быть разной высоты, вследствие непостоянства уровня экспрессии. По этой же причине рекомендуется для каждого образца ставить не менее трёх воспроизведений на этапе постановки ПЦР. Специальных требований для базовой линии не существует, хотя условия ПЦР стараются подгонять таким образом, чтобы высота минимального сигнала была не ниже 150RFU, хотя некоторые опускают и до 50RFU [25]. Затруднения в точности установки базовой линии, в частности, обусловлены некоторой лабильностью экспрессии генов «домашнего хозяйства» (ГДХ), амплификация которых служит своеобразным внутренним контролем [26]. Было показано, что композиция их экспрессии зависит от типа тканей, поэтому в разных модификациях панели «CellTiter» и аналогов может присутствовать разный состав в виде двух-трёх типов ГДХ, которые специфично проявляются в том или ином типе тканей [8, 23].

На рисунке 2 показан пример электрофореграммы РНК-профиля. На нём можно отслеживать, как уровень экспрессии (по степени интенсивности RFU-сигнала), так и наличие самих маркеров. Так, некоторые маркеры, например, *KRT4* могут присутствовать в разных тканях, но характерно отличаться по степени выраженности.

2.5.1. Пример анализа смешанных образцов

Комбинированное ДНК- и РНК профилирование открывает новые возможности для полноценного анализа образца. Например, из смешанного профиля ДНК можно вычленивать индивидуальные генотипы, но нередко необходимо подтверждение клеточного соответствия. В некоторых случаях, например, при типировании отпечатков, метод построения РНК-профиля может оказываться чувствительнее ДНК-типирования [10, 25]. Соответственно оба метода анализа будут взаимно дополнять друг друга. Комбинирование также может оказаться полезным, когда процесс касается дискриминации представителей одного пола для исключения наличия клеток противоположного пола.

На рисунке 3 показан пример РНК-ДНК-анализа смеси слюны и крови от двух доноров. В постановочном эксперименте образцы были смешаны в разных пропорциях, и выделение НК выполнялось одним набором. В результате РНК-профиль показывает, что в смеси находятся два разных образца, а по ДНК-профилю видно, что в смеси присутствуют два разных человека, гомозиготных по локусу D2S441.

2.6. Методы отбора кандидатных РНК-маркеров

Правильный исходный выбор кандидатной мРНК позволяет в разы сократить время литературного поиска и методической селекции нужной молекулы среди гигантского разнообразия экспрессионных маркеров. Одним из подходов является использование баз данных (БД), которые предоставляют статистически обработанную информацию скрининговых анализов (например, с помощью микрочипов) и литературное подтверждение

с ссылками на публикации, эксперименты и описание самих генов в известных интернет-ресурсах (например, *GenBank*, *Ensemble* и др.).

С точки зрения судебных приложений, наиболее удобными являются две базы данных: «BioGPS» и «Human Protein Atlas», которые обладают наиболее широкими возможностями по взаимосвязи экспрессии маркеров и тканей. «BioGPS» (<http://www.biogps.gnf.org>) – это проект Института геномики компании «Новартис» (*Genomics Institute of the Novartis Research Foundation*). С помощью BioGPS можно посмотреть сравнительную экспрессию генов в кратных соотношениях в 84 различных тканях (см. рис. 4).

Другим удобным открытым интернет-ресурсом является проект Королевского технологического института Швеции (*Royal Institute of Technology*), который называется «Human Protein Atlas» (<http://www.proteinatlas.org>). Эта БД позволяет анализировать выбранный маркер по 44 типам нормальных тканей и 46 клеточным линиям. С помощью Human Protein Atlas, в разделе «Тканевой атлас», можно не только посмотреть сравнительную экспрессию маркера на уровне РНК и белка в тканях (рис. 5А), но и непосредственно видеть его внутриклеточную локализацию на фотографиях с хорошим разрешением (рис. 5Б), а также получать информацию о способах окраски, методе, типе антитела и его производителе (рис. 5В).

3. ПАНЕЛИ мРНК-МАРКЕРОВ

3.1. EUROFORGEN-инициатива.

С учетом формирования вышеизложенных тенденций по комбинированию ДНК-РНК-методов в 2012 г. на основе Виртуального центра судебно-генетических исследований стартовал международный проект (<http://www.euroforgen.eu/the-project/wp03-exemplar-research-projects>) EUROFORGEN-NoE сроком на пять лет. В проекте участвуют более двух десятков лабораторий из разных стран, в задачи которых, наряду со сравнительными испытаниями мультимплексных панелей, входит изыскание новых маркеров и условий адаптации их для судебных молекулярно-генетических анализов.

3.2. Состав мРНК-панелей

В настоящее время для задач судебной биологии сформированы группы мРНК-маркеров, по крайней мере, для 6–7 основных типов тканей. Конечно же, нижеприведенное описание экспрессионных маркеров не является полным, поскольку эти списки постоянно обновляются за счет новых данных из международных геномных проектов.

3.2.1. Кровь

На основе последних сведений в эту группу для выявления крови входит, по меньшей мере, два десятка генов-кандидатов, однако наиболее подходящими считаются маркеры *HBB*, *ALAS2*, *CD93* и *AMICA1* [8]. Гемоглобин, бета-версии локуса (*HBB*) «пришел» из белковой диагностики. Три остальных маркера обладают прямой ассоциацией с компонентами и форменными элементами крови: *CD93* и *AMICA1*. *CD93* принадлежит к XIV группе лектинов С-типа, белков трансмембранной локализации, которые отвечают за межклеточную адгезию и иммунный ответ. Сравнительный анализ экспрессии данного гена (база данных *BioGPS*) свидетельствует о его подавляющей активности в клетках моноцитарного и миелоидного ряда, а также зародышевых тканей, делая данный маркер удобным для идентификации следов цельной крови взрослых людей. В свою очередь *AMICA1* также является маркером адгезии, выраженность которого

исключительно проявляется в клетках цельной крови. Этот маркер неплохо работает в режиме моноплекса, однако в мультиплексных испытаниях его экспрессия оказалась неудовлетворительной [24], поэтому для этой задачи вместо него используют более универсальный эритроцитарный маркер *ALAS2*.

3.2.2. Менструальный секрет/менструальная кровь

Иммунологические методы позволяют определить наличие крови, однако весьма затруднительно дифференцировать тем же способом менструальную кровь от венозной. Менструальный секрет представлен, по крайней мере, тремя типами клеток, включая цельную кровь (до 50%), клетками эндометрия и вагинального эпителия [8], что на белковом уровне создавало бы серьёзные помехи для дифференциальной диагностики в судебных эпизодах. Однако на уровне мРНК картинка профильной экспрессии выглядит иначе – в сторону смещения мажорных маркеров, характерных для менструального секрета и следовых признаков мРНК-маркеров цельной крови. Это связано с тем, что в нестандартных биохимических условиях (*pH среды и бактериальные ферменты*) мРНК-маркеры цельной крови практически полностью деградируют вместе с клетками крови.

Основные маркеры менструального секрета идентифицированы в виде группы мРНК генов металлопротеаз (*MMP*) типов 8, 11 и 12. Выраженность того или иного типа варьирует в разных исследовательских группах [27, 28], однако в иных биожидкостях, кроме менструальной крови, эти маркеры не обнаружены. Возможно, это связано с тем, что экспрессия металлопротеиназ характерна для клеток вагинального эпителия, которые в отличие от клеток цельной крови в условиях менструального секрета находятся в своей естественной среде. Кроме металлопротеиназ потенциальными маркерами являются еще 5 генов, включая *CK19* [29], *PR*, *LEFTY2*, *MSX1* и *SFRP4* [18].

3.2.3. Кожа

Самым распространенным методом в судебной экспертизе является дактилоскопическое исследование отпечатков пальцев, в котором кроме анализа следовых количеств ДНК используются методы иммуноцитологии и микроскопии. Вследствие этого, клеточная диагностика на основе РНК-анализа может оказаться весьма актуальной для более полного понимания клеточного состава в образце, не говоря уже о смешанных следах [8].

Молекулярная организация клеток эпителия кожи, вагинального эпителия и, например, клеток, выстилающих ротовую полость, очень схожа, что длительное время было причиной существования довольно длинного перечня кандидатных генов кожи на роль потенциальных маркеров. Тем не менее сравнительные анализы [8, 12, 30] в рамках геной селекции для судебных задач позволили отобрать, по крайней мере, четыре наиболее удачных маркера, которые тесно функционально привязаны к данной ткани. Эти гены *LOR*, *LCE1C*, *CDSN* и *KRT9* участвуют в процессах дифференцировки эпителия и ороговения кожного покрова [30]. Продукт транскрипта гена *LOR* экспрессируется в гранулярной зоне кожного эпителия и является основным компонентом, который формирует апикальную часть кератиноцитов, что является уникальной функциональной характеристикой кожи. Схожими функциями обладает продукт экспрессии гена *LCE1C* (поздний белок *C1* ороговения), который участвует в обмене кальция и выполняет защитные функции, в частности, при ультрафиолетовом облучении. Корнеодесмоин (кодируемый геном *CDSN*), локализован в корнеодесмосомах ороговевающей и плоского эпителия волос и участвует

в процессах его созревания [31, 32]. В отношении *KRT9* установлено, что он принимает участие в организации кератиновых филаментов и специфично экспрессируется в подошвенном и ладонном эпителии [33, 34].

В целом стоит учесть, что белковые компоненты ороговевающей оболочки функционируют во многих типах эпителия, включая слизистые ротовой полости и влажлища. С учетом этой особенности кожные маркеры пока еще находятся в состоянии валидации и коррекции. Так, путём сравнительного анализа [24], который был опубликован в рамках международного проекта EUROFORGEN-NoE (*European Forensic Genetics Network of Excellence – сеть судебно-генетических исследований в Европе*), было показано, что экспрессия гена *LCE1C* более уникальна для образцов кожи, по сравнению с маркером *LOR*, который ранее, в 2012 году, был включён в единую мультиплексную панель «CellType».

К другим возможным кандидатам относятся такие маркеры как *LCE1D*, *LCE2D*, *CCL27*, *IL1F7*, *CST6*, *DSC1* и *KRT10* [12, 35].

3.2.4. Слюна и слизистая носа

Образцы слюны преимущественно содержат компоненты слизистого эпителия, выстилающего язык и полость носоглотки. Для слюны были описаны специфические маркеры: статхерин и гистатин-3, активность которых непосредственно связана с функциями ротового эпителия и клеток, выстилающих протоки слюнных желёз. Первый (*STATN*) регулирует обмен кальция в слюне [36], в то время, как *HTN3* обладает антибактериальным действием в ротовой полости [37]. Профиль экспрессии слюны может также содержать и кератиновые маркеры, такие как *KRT4* и *KRT13*, которые характерны для других типов тканей, включая вагинальный эпителий и кожу. Тем не менее общая комбинация вышеописанных маркеров будет давать профиль, специфичный только для образцов слюны. Маркер *BPIFA1* обладает специфичной экспрессией в отношении назофарингального эпителия. Ген *BPIFA1* кодирует белок, который обладает антимикробными свойствами в отношении Грамотрицательных бактерий и отвечает за развитие иммунного ответа в верхних дыхательных путях [35]. Его повышенная экспрессия ассоциирована с развитием назофарингальной карциномы [38]. К возможным дополнительным кандидатам относится ген *SPRR1A*, отвечающий за созревание эпидермиса, а также такие маркеры как *PRB4*, *SPRR3*, *KRT4*, *KRT6A*, *KRT13*, *MUC7* [39–42].

3.2.5. Вагинальный эпителий

Дифференциальная диагностика слизистой влажлища современными иммунологическими методами необычайно затруднена, поскольку, с одной стороны, на её поверхности могут находиться клетки крови, с другой стороны, маркеры вагинального эпителия перекрываются с маркерами эпителия слизистой других органов. Из общего списка судебных мРНК-маркеров профиль вагинального эпителия может содержать *CD93* (кровь), *LOR*, *CDSN* (кожа), металлопротеиназы (менструальный секрет), *KRT4* (общий маркер для слизистых). В то же время для вагинального эпителия сформирована комбинация маркеров *MYOZ1*, *MUC4* и *CYP2B7P1*, преимущественная экспрессия которых не характерна для других типов тканей [24] и наилучшим образом работает в мультиплексном ПЦР.

Характерной дополнительной чертой РНК-диагностики вагинального эпителия является включение в линейку его маркеров мРНК бактериальных генов. Эти *16S-rRNA* гены экспрессируются в лактобактериях (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lacto-bacillus jensenii* и *Lactobacillus*

iners), которые являются специфической микрофлорой для вагинальной полости [40].

■ 3.2.6. Семенная жидкость

Для дифференциальной диагностики семенной жидкости подобраны мРНК гены *PRM1* и *SEMG1*. Ген *PRM1* кодирует белок, который участвует в организации гистоновых белков в сперматозоидах [43]. Поскольку данный процесс характерен для зрелых и полноценных клеток, то данный маркер может дополнительно дифференцировать фертильных мужчин. Ген *SEMG1* экспрессируется клетками и кодирует сменгоилин, который является мажорным белковым компонентом семенной жидкости. Показано, что комбинация данных маркеров может идентифицировать вазоэктомированных мужчин [30]. Из числа дополнительных маркеров известны мРНК гены: *MSP*, *SEMG2*, *KLK3*, *PRM2*, *TGM4* [8, 22, 40, 42].

■ 3.3. Недостатки мРНК-маркеров

■ 3.3.1. Нестабильность

По сравнению с двуцепочечными молекулами ДНК, одноцепочечная матричная РНК гораздо менее стабильна. При разрушении клеток и тканей, молекулы мРНК под воздействием клеточных нуклеаз деградируют в первую очередь. Известно, что при работе с РНК важно соблюдать температурный режим не только для хранения, но и при методических манипуляциях, в частности, путём использования низкотемпературных центрифуг на этапах выделения. Соответственно, тканевая идентификация образцов с использованием мРНК-панелей преимущественно выполняется на свежем материале, который после забора должен быть сразу помещён либо в жидкий азот, либо в холодильник на -70°C . При этом стоит отметить, что размер молекул имеет значение, поэтому в случаях частично деградированного материала микроРНК оказываются более стабильными и удобными маркерами.

■ 3.3.2. Отсутствие жёстких критериев

По сравнению с генетической идентификацией личности при помощи STR-маркеров, показывающих специфичность до четвертого знака после запятой, столь строгих критериев в отношении типирования тканей с использованием РНК-маркеров, очевидно, не добиться. Однако это проблема уже не методическая, а связанная с молекулярной природой тела человека, при которой клетки разных тканей обладают одинаковым набором исходно закодированных признаков. К тому же, в судебной практике приходится иметь дело именно с такими тканями, клетки которых выполняют функционально схожие роли, например, эпителий слизистых. В этом отношении ситуация дифференциального типирования тканей очень напоминает проблемы, стоящие перед определением фенотипических признаков в судебной генетике с использованием одиночных полиморфизмов. В данном случае диагностика оказывается тем специфичнее, чем больше многообразие этих генетических маркеров, связанных с определенным признаком. С точки зрения многообразия, мРНК существенно будут уступать полиморфизмам, если только не попытаться их объединить в единую диагностическую панель, например, с использованием полногеномного секвенирования [44].

■ 3.3.3. Нестабильность экспрессии

Экспрессия генов сильно зависит от внешних, внеклеточных факторов, включая влияние гормонов [45] или медикаментозную терапию [46]. Типичным примером могут служить маркеры менструальной крови, металлопро-

теиназы, которые в минорных количествах могут также регистрироваться в профиле вагинального эпителия. При выпадении других маркеров, это может вызвать трудности в дифференциальной диагностике. Тем не менее на фоне гормонального цикла всё становится на свои места: экспрессия металлопротеиназ возрастает и дополняется типичными маркерами крови для менструальной секреции: *HBD1* и *CD93*, что не характерно для вагинальной слизистой. Кроме того, некоторые металлопротеазы являются известными маркерами онкозаболеваний [47] и аномально выявляются в крови пациентов, что существенно может повлиять на интерпретацию данных. С другой стороны, этот, казалось бы, недостаток можно обратить в преимущество, путем использования для сужения границ поиска личности.

◇ 4. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПАНЕЛИ И ВОПРОСЫ КОММЕРЦИАЛИЗАЦИИ

Благодаря разветвленным испытаниям, в последнее десятилетие сформировано основное «ядро» из двух-трёх десятков мРНК-маркёров, которые в ближайшем будущем уже могут быть использованы в качестве новых диагностических панелей, таких как «CellTyper». И хотя ещё не создано готовых коммерческих наборов, некоторые зарубежные организации, такие как Институт судебной медицины в Нидерландах (*NFI*), уже несколько лет используют РНК-маркёрами в своей рутинной практике [24].

На текущий период пока ещё остаётся ряд проблем, которые ограничивают коммерциализацию панелей. К ним, прежде всего, относится генетическая дивергенция [48]. Она связана с популяционно зависимой экспрессией генов, что потребует некоторых модификаций базовых панелей за счет национальных признаков [49]. С другой стороны, это открывает возможность отечественным исследователям разрабатывать собственные панели и наборы. Примером такой изменчивости может служить разновидность панели «CellTyper» для азиатской популяции – «XCYR1» [11].

К другим ограничителям можно отнести вопросы выбора референсных генов для точной селекции и валидации признаков, экспрессия которых, несмотря на их стабильность, в разных тканях и условиях их хранения всё-таки отличается [22].

Предваряя выход на рынок отдельных наборов на основе только РНК, вполне логично ожидать на более раннем этапе включения новых маркеров в поисковые STR и фенотипические SNP-панели для полногеномного секвенирования, которое всё активнее входит в практику судебных биологов. Анализ транскриптома может выполняться на том же оборудовании и с использованием тех же реагентов для подготовки библиотек, которые в настоящее время выпускаются такими компаниями, как Illumina и ThermoFisher. Примером подобного подхода может служить работа исследователей из Нидерландов [44], которые объединили РНК-анализ и STR/SNP-типирование на оборудовании Ion Torrent PGM и AmpliSeq™-панели. Они продемонстрировали возможность совмещения 9 наиболее известных STR- локусов и 12 мРНК-маркеров в единой панели, и результаты типирования донорских тканей этим методом оказались на 100% конкордантны с классическим определением STR-локусов коммерческим набором.

◇ ВЫВОДЫ

Станет ли когда-нибудь РНК-анализ очередным молекулярно-биологическим методом в судебной медицине? Подобные вопросы всё чаще и чаще в последнее время появляются в мировой научной литературе [1, 50].

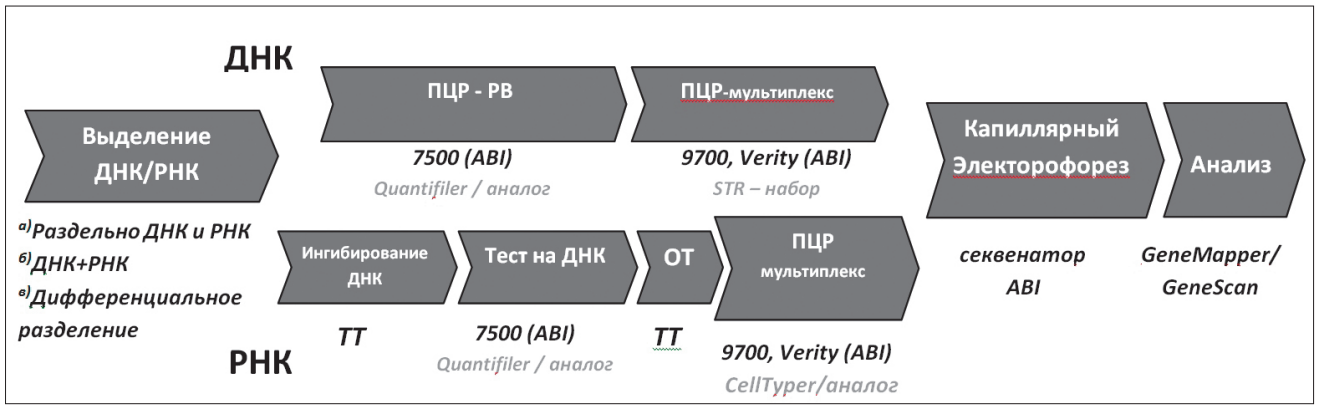


Рис. 1. РНК/ДНК-анализ в стандартной схеме рабочего процесса генетического исследования судебного образца; а) выделение нуклеиновых кислот отдельно набором для выделения ДНК и отдельно набором для выделения РНК; б) выделение ДНК и РНК одним набором; в) выделение ДНК и РНК набором для дифференциального разделения эпителия и сперматозоидов с использованием набора Differex (Promega). Напротив ДНК: ПЦР-РВ-полимеразная цепная реакция в реальном времени, выполняется на приборе Applied Biosystems (ABI) 7500 Real-Time PCR System; ПЦР-мультиплекс: выполняется с использованием STR наборов (производитель по выбору, например, Quantifiler, ABI) на приборе для ПЦР – 9700 или Verity (ABI); Напротив РНК: ТТ – твердотельный термостат (0–100 °С). Ингибирование ДНК на ТТ с использованием ДНК-азы I при температуре +37 °С, ОТ – обратная транскрипция в ТТ, при температуре +37–50 °С; капиллярный электрофорез выполняется в режиме фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI любого типа «GeneMapper» или аналог – программа для анализа результатов фрагментного анализа

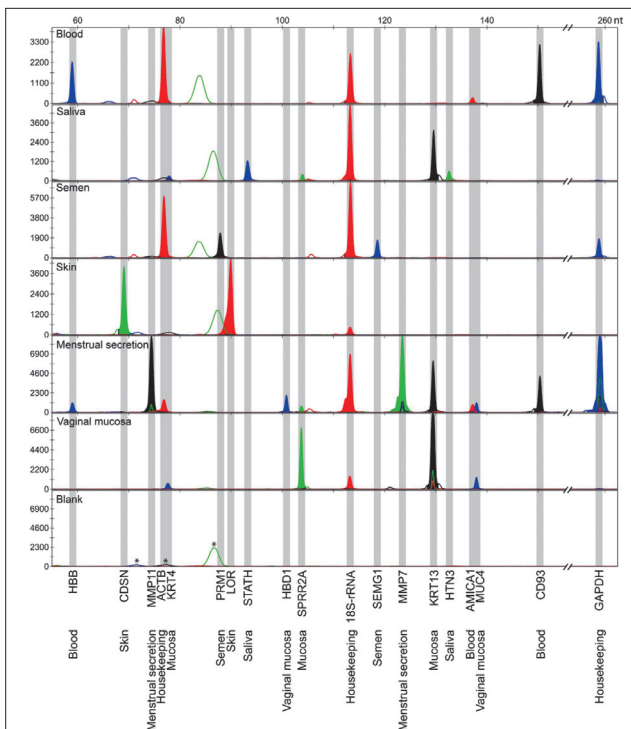


Рис. 2. Пример РНК-профиля для разных типов несмешанных образцов. РНК-профиль построен на основе амплификации б типов образцов тканей (сверху вниз: кровь, слюна, семенная жидкость, кожа, менструальная жидкость, вагинальная слизистая) с использованием одной из модификаций 19-ти плексной панели «CellTyper». Внутренними контролями служат гены 18S-rRNA и GAPDH. Сглаженные зеленые пики вне бинов и обозначенные звездочкой являются продуктами переамплификации. Отрицательный контроль (Blank) – это продукт ОТ – ПЦР без РНК. Рисунок взят из публикации Lindenbergh A. и др., 2012 [9]

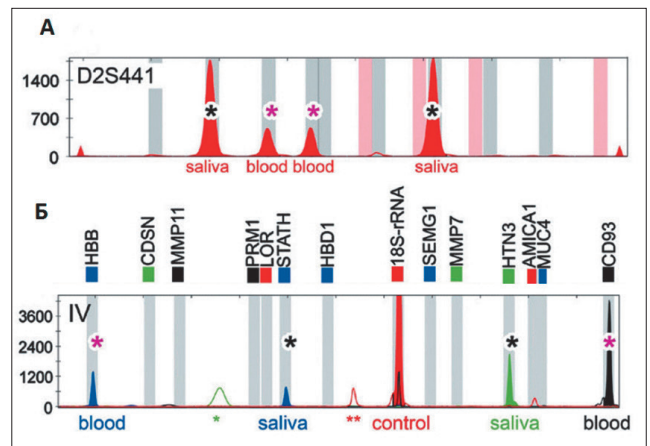


Рис. 3. Комбинированный профиль смешанного образца «кровь – слюна». А – ДНК-профиль, Б – РНК-профиль. Красными большими звездочками обозначены пики, указывающие на тканевое соответствие. Сглаженные зеленые пики, обозначенные внизу маленькими звездочками – результат переамплификации. Внутренним контролем (control) служит экспрессия гена домашнего хозяйства 18S-rRNA. Рисунок взят из публикации Hartaveld J. и др., 2013 [26]

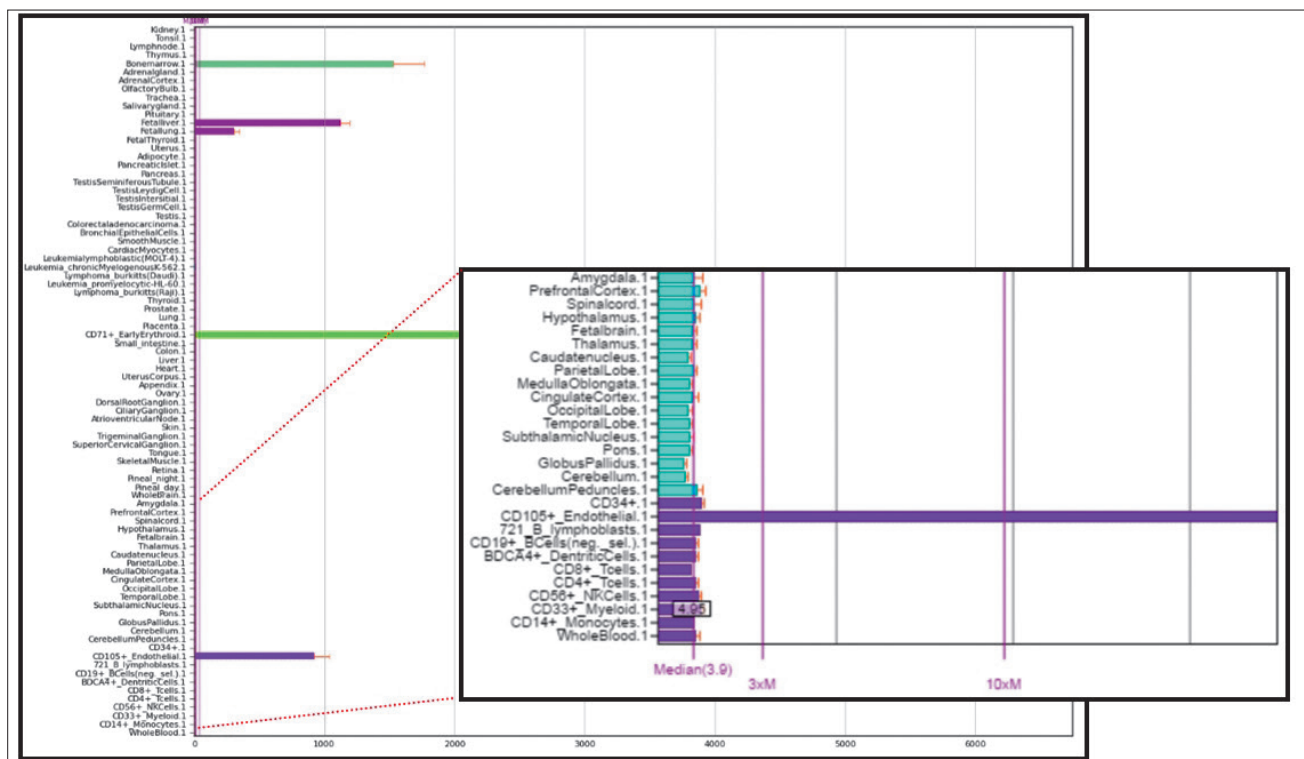


Рис. 4. Пример анализа маркера венозной крови ALAS2 с помощью БД «BioGPS». Показана сравнительная экспрессия гена ALAS2 в различных нормальных тканях. Видно, что маркер обладает избирательной экспрессией в следующих тканях: костный мозг, фетальные ткани печени и лёгких (не экспрессируются у взрослых), эритроидной популяции клеток: CD71 (максимальная экспрессия, зелёная полоска) и клетках эндотелия сосудов: CD105. На рисунке показан выбранный увеличенный диапазон (малый контур справа внизу) экспрессии гена; при этом медиана фоновой экспрессии гена в остальных тканях составляет «х3,9» что на несколько порядков отличается от специфической экспрессии маркера в популяциях клеток, характерных для венозной крови

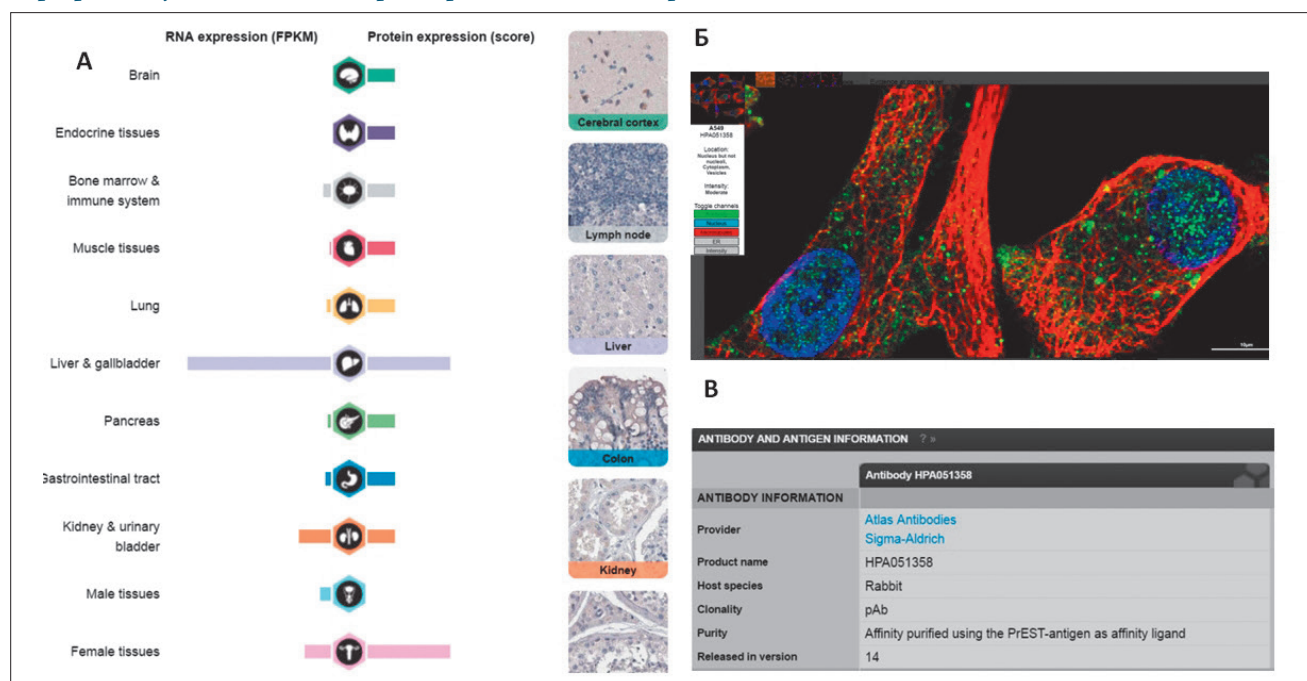


Рис. 5. Пример анализа маркера менструального секрета MMP7 с помощью БД «Human Protein Atlas». А. Сравнительная экспрессия MMP7 в различных тканях на уровне мРНК и белка. Уровень экспрессии мРНК представлен в относительных единицах FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped - число прочитанных фрагментов экзона на миллион картированных фрагментов) на основе данных RNA-seq. Б. Показана локализация MMP7 в клетках клеточной линии A549; флуоресцентная зелёная краска (точки) показывает положение белка. В. – указан производитель кроличьих антител (компания «Sigma-Aldrich») для иммуногистохимического окрашивания белка

Таблица 1

Дизайн 19-ти плексной ПЦР-панели «CellTurer» – версии 3

Ткань	мРНК – маркер	Размер	Флуорохром
Кровь, венозная	ALAS2	103	FAM
	CD93	151	NED
	HBB	61	FAM
Слюна	HTN3	134	VIC
Слюна/слизистая носа	STATH1	93	FAM
Слизистая носа	BPIFA1	131	PET
Семенная жидкость	PSA	64	PET
	SEMG1	121	FAM
Сперматозоиды	PRM1	91	NED
Вагинальная слизистая	CYP2B7P1	146	VIC
	MUC4	141	FAM
	MYOZ1	88	VIC
Менструальная кровь	MMP7	127	VIC
	MMP10	107	VIC
	MMP11	76	NED
Кожа	CDSN	71	VIC
	LCE1C	99	NED
Гены домашнего хозяйства	ACTB	75	PET
	18S-rRNA	110	PET

В столбце «Флуорохром» указаны краски, с целью анализа на генетическом анализаторе. Продукты ПЦР амплифицируются в диапазоне 60–150 пар оснований разного размера, что делает их анализ удобным в режиме фрагментного анализа в четырехцветном диапазоне. Таблица составлена на основе данных, опубликованных в работе van den Berge M и др., 2016 [25].

Современная биология переживает необычайно бурный рост за счёт развития программ исследования генома и коммерческих технологий, сопутствующих этим процессам. По стечению обстоятельств, судебная медицина и генетика остаются самыми консервативными областями биомедицины, куда современные веяния и новинки просачиваются не только с большой осторожностью, но и, как следствие, с большим опозданием. Тем не менее буквально на глазах в компетенцию судебной генетики стали входить новые течения из области фенотипирования на основе полногеномного секвенирования.

Эти же течения ведут за собой всевозможные полезные приложения на уровне транскриптомного и экзомного анализа, которые вполне могут быть совмещены с генетической идентификацией личности [44]. Кроме того, себестоимость производства наборов для мультиплексного ПЦР с целью РНК-анализа сопоставима с аналогичными ПЦР-наборами для типирования ДНК с помощью STR-локусов. Соответственно для компании – производителя вывод подобного набора на рынок равносильна рядовому обновлению своей продуктовой линейки, без необходимости изобретать новую технологию производства.

С учетом возможности совмещения процессов пробоподготовки для ДНК и РНК-анализа, типирование тканей удобно адаптировать для современных комбинированных тестов, которые уже предложены в последние годы. Примером подобных комбинаций могут служить прототипы наборов компании Promega (США) «PowerSeq™ Auto/Mito/Y» и другие, которые позволяют получать одновременно аутосомный и митохондриальный профили. Похожие совмещения могут быть реализованы

и в отношении экспрессионных маркеров, как с учетом полногеномных технологий, так и базовых методов ДНК-анализа с использованием капиллярного электрофореза.

◇ ЛИТЕРАТУРА

1. Silvia A. Extracellular microRNAs in Forensic Sciences: potential biomarkers for body fluid identification. 2015, Dissertation. Abel Salazar Biomedical Sciences Institute, University of Porto. <http://hdl.handle.net/10216/81679>
2. Misencik A., Laux D.L.: Validation Study of the Seratec HemDirect Hemoglobin Assay for the Forensic Identification of Human Blood. Midwestern Association of Forensic Science, Newsletter Spring. 2007, p: 18–26. http://www.seratec.com/docs/HemDirect_Validation_MAFS.pdf
3. Mashkoor FC, Al-Asadi JN, Al-Naama LM. Serum level of prostate-specific antigen (PSA) in women with breast cancer. Cancer Epidemiol. 2013; 37 (5): 613–618. DOI: 10.1016/j.canep.2013.06.009
4. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2016. – илл. – 236 с. ISBN 978–5–85502–226–1, УДК 616–006.04–082 (470)«2015» ББК 55.6. С59. <http://oncology-association.ru/docs/medstat/sostoyznie/2015.pdf>
5. Hochmeister MN., Budowle B., Rudin O., Gehrig C., Borer U., Thali M., Dirnhofer R. Evaluation of prostate-specific antigen (PSA) membrane test assays for the forensic identification of seminal fluid. (1999). J Forensic Sci 44: 1057–1060. DOI: 10.1520/JFS12042J

6. Sato I., Sagi M., Ishiwari A., Nishijima H., Ito E., et al. (2002) Use of the «SMITEST» PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine. *Forensic Sci. Int.* 127: 71–74. DOI: 10.1016/S0379-0738(02)00111-1
7. Maier T., Güell M., Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009; 583 (24): 3966–3973. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.036
8. Lindenbergh A., de Pagter M., Ramdayal G., Visser M., Zubakov D., Kayser M., Sijen T. A multiplex (m)RNA-profiling system for the forensic identification of body fluids and contact traces. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012; 6 (5): 565–577. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.01.009
9. De Waele J. Evaluation of factors affecting the identification of body fluids using mRNA in forensic case samples. Research Project. Institute of Environmental Science and Research Ltd, Auckland, New Zealand, 2011. <http://dare.uva.nl/cgi/arno/show.cgi?fid=333666>
10. Lindenbergh A., Maaskant P., Sijen T. Implementation of RNA profiling in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet.* 2013; 7 (1): 159–166. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.09.003
11. Xu Y., Xie J., Cao Y., Zhou H., Ping Y., Chen L., Gu L., Hu W., Bi G., Ge J., Chen X., Zhao Z. Development of highly sensitive and specific mRNA multiplex system (XCYR1) for forensic human body fluids and tissues identification. *PLoS One.* 2014; 9 (7): e100123. DOI: 10.1371/journal.pone.0100123
12. Hanson E., Haas C., Jucker R., Ballantyne J. Specific and sensitive mRNA biomarkers for the identification of skin in «touch DNA» evidence. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6 (5): 548–58. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.01.004
13. Zubakov D., Kokshoorn M., Kloosterman A., Kayser M. New markers for old stains: stable mRNA markers for blood and saliva identification from up to 16-year-old stains. *Int J Legal Med.* 2009; 123 (1): 71–74. DOI: 10.1007/s00414-008-0249-z
14. Heinrich M., Matt K., Lutz-Bonengel S. Successful RNA extraction from various human postmortem tissue. *Int. J. Legal Med.* 121 (2007) 136–142. DOI:10.1007/s00414-006-0131-9
15. Sirker M., Schneider PM., Gomes I. A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *Int J Legal Med.* 2016. p: 1–8. DOI:10.1007/s00414-016-1373-9
16. Bauer M., Polzin S., Patzelt D. Quantification of RNA degradation by semi-quantitative duplex and competitive RT-PCR: a possible indicator of the age of bloodstains? *Forensic Sci Int.* 2003; 138 (1–3): 94–103. DOI: 10.1016/j.forsciint.2003.09.008
17. Lee J., Hever A., Willhite D., Zlotnik A., Hevezi P. Effects of RNA degradation on gene expression analysis of human post-mortem tissues. *FASEB J.* 19 (2005) 1356–1358. DOI: 10.1186/1471-2164-9-91
18. Haas C., Hanson E., Anjos MJ., Ballantyne KN., Banemann R., Bhoelai B., Borges E., Carvalho M., Courts C., De Cock G., Drobnic K., Dötsch M., Fleming R., Franchi C., Gomes I., Hadzic G., Harbison SA., Hartevelde J., Hjort B., Hollard C., Hoff-Olsen P., Hüls C., Keyser C., Maroñas O., McCallum N., Moore D., Morling N., Niederstätter H., Noël F., Parson W., Phillips C., Popielarz C., Roeder AD., Salvaderi L., Sauer E., Schneider PM., Shanthan G., Court DS., Turanská M., van Oorschot RA., Vennemann M., Vidaki A., Zatkalíková L., Ballantyne J. RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet.* 2014; 8 (1): 203–212. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.09.009
19. Lin MH., Albani PP., Fleming R. Degraded RNA transcript stable regions (StaRs) as targets for enhanced forensic RNA body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet.* 2016; 20: 61–70. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.09.012
20. Bauer M., Kraus A., Patzelt D. Detection of epithelial cells in dried blood stains by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences.* 1999; 44 (6): 1232–1236. DOI: 10.1520/JFS14593J
21. Bauer M., Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *Journal of Forensic Sciences.* 2002; 47(6): 1278–1282. DOI: 10.1520/JFS15560J
22. Bauer M., Patzelt D. Protamine mRNA as molecular marker for spermatozoa in semen stains. *International Journal of Legal Medicine.* 2003; 117 (3): 175–179. DOI:10.1007/s00414-002-0347-2
23. Zubakov D., Kayser M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective Forensic Tissue Identification with Nucleic Acids. CRC Press 2014 Print, Chapter 15. Forensic Tissue Identification with Nucleic Acids; p: 385–417. ISBN: 978-1-4665-8022-0. DOI: 10.1201/b16512-19
24. Van den Berge M., Bhoelai B., Hartevelde J., Matai A., Sijen T. Advancing forensic RNA typing: On non-target secretions, a nasal mucosa marker, a differential co-extraction protocol and the sensitivity of DNA and RNA profiling. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016; 20: 119–129. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.10.011
25. Hartevelde J., Lindenbergh A., Sijen T. RNA cell typing and DNA profiling of mixed samples: can cell types and donors be associated? *Sci. Justice.* 2013; 53 (3): 261–269. DOI: 10.1016/j.scijus.2013.02.001
26. Afolabi O.A., Roeder A.D., Iyengar A., Hadi S. Reference gene study for forensic body fluid identification. *FSI Genetics.* 2015. Volume 5, p: e167–e169. DOI: 10.1016/j.fsigss.2015.09.067
27. Juusola J., Ballantyne J. Messenger RNA profiling a prototype method to supplant conventional methods for body fluid identification. *Forensic Sci. Int.* 135 (2003), p: 85–96. DOI: 10.1016/j.fsigen.2008.11.003
28. Juusola J., Ballantyne J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Forensic Sci. Int.* 152 (2005), p: 1–12. DOI:10.1016/j.forsciint.2005.02.020
29. Bauer M., Patzelt D. Evaluation of mRNA markers for the identification of menstrual blood. *J. Forensic Sci.* 2002 Nov; 47(6): 1278–1282. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.09.007
30. Visser M., Zubakov D., Ballantyne KN., Kayser M. mRNA-based skin identification for forensic applications. *Int. J. Legal Med.* 2011; 125 (2): 253–263. DOI: 10.1007/s00414-010-0545-2
31. Simon M., Montézin M., Guerrin M., Durieux JJ., Serre G. Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J Biol Chem.* 1997 12; 272 (50): 31770–31776. DOI:10.1074/jbc.272.50.31770
32. Jonca N., Guerrin M., Hadjiolova K., Caubet C., Gallinaro H., Simon M., Serre G. Corneodesmosin, a component of epidermal corneocyte desmosomes, displays homophilic adhesive properties. *J Biol Chem.* 2002 Feb 5; 277 (7): 5024–5029. DOI:10.1074/jbc.M108438200
33. Reis A., Küster W., Eckardt R., Sperling K. Mapping of a gene for epidermolytic palmoplantar keratoderma to the region of the acidic keratin gene cluster at 17q12-q21.

- Hum Genet. 1992; 90 (1–2): 113–116. DOI: 10.1007/BF00210752
34. Reis A., Hennies HC., Langbein L., Digweed M., Mischke D., Drechsler M., Schröck E., Royer-Pokora B., Franke WW., Sperling K., Wolfgang Küster. Keratin 9 gene mutations in epidermolytic palmoplantar keratoderma (EPPK). Nat Genet. 1994; 6 (2): 174–179. DOI:10.1038/ng0294-174
 35. Passali D., Sarafoleanu C., Manea C., Loglisci M., Passali FM., Cambi J., Iosif C., Panaitescu E., Bellussi LM. PLUNC proteins positivity in patients with chronic rhinosinusitis: a case-control study. ScientificWorldJournal. 2014; 2014: p: 1–5. DOI: 10.1155/2014/853583
 36. Sabatini L.M., Carlock L.R., Johnson G.W., Azen E.A. cDNA cloning and chromosomal localization (4q11–13) of a gene for statherin, a regulator of calcium in saliva, Am. J. Hum. Genet. 41 (1987) 1048–1060. PMID:3502720, PMCID: PMC1684366
 37. Oudhoff MJ., Bolscher JG., Nazmi K., Kalay H., van 't Hof W., Amerongen AV., Veerman EC. Histatins are the major wound-closure stimulating factors in human saliva as identified in a cell culture assay. FASEB J. 2008; 22 (11): 3805–3812. DOI: 10.1096/fj.08-112003
 38. Zhang W., Zeng Z., Wei F., Chen P., Schmitt DC., Fan S., Guo X., Liang F., Shi L., Liu Z., Zhang Z., Xiang B., Zhou M., Huang D., Tang K., Li X., Xiong W., Tan M., Li G., Li X. SPLUNC1 is associated with nasopharyngeal carcinoma prognosis and plays an important role in all-trans-retinoic acid-induced growth inhibition and differentiation in nasopharyngeal cancer cells. FEBS J. 2014; 281(21): 4815–4829. DOI: 10.1111/febs.13020
 39. Danaher P., White RL., Hanson EK., Ballantyne J. Facile semi-automated forensic body fluid identification by multiplex solution hybridization of NanoString® barcode probes to specific mRNA targets. Forensic Sci Int Genet. 2015;14:18–30. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.09.005
 40. Fleming RI., Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. Forensic Sci. Int. Genet. 2010; 4(4): 244–256. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.10.006
 41. Zubakov D., Hanekamp E., Kokshoorn M., van IJcken W., Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. Int J Legal Med. 2008; 122:135–142. DOI:10.1007/s00414-007-0182-6
 42. Fang R., Manohar C.F., Shulze C., Brevnov M., Wong A., Petrauskene O.V., Brzoska P., Furtado M.R. Real-time PCR assays for the detection of tissue and body fluid specific mRNAs. Progress in Forensic Genetics 11 – Proceedings of the 21st International ISFG Congress, Portugal, September 2005. DOI: 10.1007/s00414-010-0545-2
 43. Wykes S.M., Krawetz S.A. The structural organization of sperm chromatin, J. Biol. Chem. 278 (2003) 29471–29477. DOI:10.1074/jbc.M304545200
 44. Zubakov D., Kokmeijer I., Ralf A., Rajagopalan N., Calandro L., Wootton S., Langit R., Chang C., Lagace R., Kayser M. Towards simultaneous individual and tissue identification: A proof-of-principle study on parallel sequencing of STRs, amelogenin, and mRNAs with the Ion Torrent PGM. Forensic Sci Int Genet. 2015; 17:122–128. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.04.002
 45. Gaide Chevronnay HP., Selvais C., Emonard H., Galant C., Marbaix E., Henriot P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. Biochim Biophys Acta. 2012;1824(1):146–156. DOI: 10.1016/j.bbapap.2011.09.003
 46. Vialou V., Feng J., Robison AJ., Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of depression and antidepressant action. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2013; 53: 59–87. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134540
 47. Davidson B., Stavnes HT., Hellesylt E., Hager T., Zeppa P., Pinamonti M., Wohlschlaeger J. MMP-7 is a highly specific negative marker for benign and malignant mesothelial cells in serous effusions. Hum Pathol. 2016; 47 (1): 104–108. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.08.020
 48. Edge MD., Rosenberg NA. Implications of the apportionment of human genetic diversity for the apportionment of human phenotypic diversity. Stud Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci. 2015; 52: 32–45. DOI: 10.1016/j.shpsc.2014.12.005
 49. Storey JD., Madeoy J., Strout JL., Wurfel M., Ronald J., Akey JM. Gene-expression variation within and among human populations. Am. J. Hum. Genet. 2007; 80 (3): 502–9. DOI:10.1086/512017
 50. Silva SS., Lopes C., Teixeira AL., Carneiro de Sousa MJ., Medeiros R. Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids? Forensic Sci. Int. Genet. 2015;14: 1–10. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.09.002

Для корреспонденции:

БАВЫКИН Андрей Сергеевич – к.м.н., LLC «Nearmedic Plus» ÷ 125252, г. Москва • andrey.bavykin@nearmedic.ru

■ Конфликт интересов отсутствует.