

О расширении сферы молекулярно-генетических экспертных исследований и совершенствовании молекулярно-генетических технологий

• д.б.н., проф. П. Л. Иванов, к.м.н. Е. Ю. Земскова

ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы Министерства здравоохранения Российской Федерации»

Аннотация: Молекулярно-генетический анализ – наиболее доказательный метод исследования биологических объектов при производстве судебно-медицинской экспертизы. Прогресс в области фундаментальных исследований и технологий, активное внедрение их результатов в практику, предопределяет неизбежное расширение границ молекулярно-генетических экспертных исследований. В настоящей работе представлены авторские примеры, иллюстрирующие совершенствование молекулярно-генетических технологий в аспекте расширения сферы экспертных молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: молекулярно-генетическая экспертиза, биологические микрочипы, молекулярно-генетическая экспертиза, экспертиза вещественных доказательств, система ABO, масс-спектрометрическое типирование ДНК, анализ SNP, лазерная микродиссекция, анализ ДНК единичных клеток, типирование полиморфизма митохондриальной ДНК, типирование полиморфизма хромосомной ДНК, массовое параллельное секвенирование ДНК, аналитическая платформа Ion Torrent™ PGM Sequencer™ System

On the expansion of the scope of molecular genetic examinations and improvement of molecular genetic technologies

• P. L. Ivanov, E. Yu. Zemskova

Abstract: Molecular genetic analysis is the most demonstrative method for investigation of biological objects in forensic medical examination. Progress in the basic researches and technologies, active implementation of their results in practice, determines the inevitable expansion of the frontiers of molecular genetic research expert. This article presents the author's examples illustrating the improvement of molecular genetic techniques in terms of expanding the scope of expert molecular genetic investigations.

Keywords: molecular genetic examination, biological microarrays, molecular genetic examination, examination of physical evidence, ABO system, mass-spectrometric DNA typing, SNP analysis, laser microdissection, DNA analysis of single cells, polymorphism typing of mitochondrial DNA, polymorphism typing of chromosomal DNA, massively parallel DNA sequencing, analytical platform Ion Torrent™ PGM Sequencer™ System

Общепризнано, что молекулярно-генетический анализ – это наиболее доказательный метод исследования биологических объектов при производстве судебно-медицинской экспертизы. По этой причине методические подходы, направленные на разрешение задач в области судебно-медицинской молекулярно-генетической экспертизы, являются одной из горячих точек приложения современной судебной науки. Их совершенствование и повышение эффективности представляет значительный интерес для судебных и следственных органов. (Чтобы подчеркнуть эту роль, в англоязычной литературе даже появился специальный термин: «следственная генетика» (Investigative Genetics). Эти факторы, а также прогресс в области фундаментальных исследований и технологий, активное внедрение их результатов в практику, предопределяет неизбежное углубление содержания и расширение границ молекулярно-генетических экспертных исследований.

В настоящей работе представлены некоторые примеры, иллюстрирующие совершенствование молекулярно-генетических технологий в аспекте расширения сферы экспертных молекулярно-генетических исследований.

1. ТИПИРОВАНИЕ ЛОКУСА ABO С ПОМОЩЬЮ БИОЛОГИЧЕСКОГО МИКРОЧИПА – НОВЫЙ УРОВЕНЬ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКОЙ БИО-

ЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ ВЕЩЕСТВЕННЫХ ДОКАЗАТЕЛЬСТВ

Начать следует с традиционной судебно-серологической (биологической) экспертизы вещественных доказательств.

В отечественной судебно-экспертной практике, судебно-серологическое исследование вещественных доказательств обычно проводилось на начальном этапе следствия и помогало решать вопросы, которые важны для разработки его последующих этапов. Это – вопросы наличия или отсутствия в следах на вещественных доказательствах интересующих следствие компонентов биологического происхождения, определение их видовой принадлежности и, в тех относительно редких случаях, когда это интересует следствие, определение их органной или тканевой природы.

Кроме этого, обычно проводилось еще первичное дифференцирование выявленного биологического материала, которое изначально призвано было дать следствию хоть какие-то идентификационные ориентиры и, тем самым сузить круг следственных версий.

Однако хорошо известно: несмотря на то, что дифференцирующее серологическое исследование может обеспечиваться достаточно большим числом групповых систем крови – сейчас их известно около сотни, – в практической реальности доказательственная ценность такого исследования остается весьма и весьма

ограниченной. В первую очередь, потому, что индивидуализирующие возможности групповых систем крови относительно невелики, и не все из них оказываются доступными для практического экспертного применения. Многие весьма сложны в применении, или просто недостаточно технологичны для постановки в судебно-медицинской лаборатории.

Поэтому, например, в нашей стране применяется лишь весьма ограниченный круг дифференцирующих серологических тестов. Экспертные исследования сводятся к выявлению в крови групповых антигенов всего нескольких изосерологических эритроцитарных и сывороточных систем.

В развитых же зарубежных странах эти методы для целей судебной экспертизы не применяются вообще – уже, как минимум, в течение последнего десятилетия [1].

И это правильно, поскольку серологическое исследование вещественных доказательств, во-первых, утрачено целесообразность, а, во-вторых, объективно не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к современным экспертным технологиям, прежде всего, в части достоверности и доказательности экспертизы.

Действительно, традиционное судебно-биологическое исследование биологических тканей и выделений организма человека с целью их дифференцирования по групповым факторам давно потеряло свою актуальность. Уже изменилась вся концепция и целевая установка судебно-медицинской экспертизы вещественных доказательств. Сейчас это не отвлеченное диагностическое определение наличия, вида, группы, пола, каких-то иных признаков объектов биологического происхождения, но полное и доказательное решение идентификационной задачи. Иными словами, сегодня, с точки зрения удовлетворения потребностей следствия, целью экспертизы вещественных доказательств биологического происхождения является не «дифференцирование» объектов экспертизы, а доказательное установление в исследуемых объектах идентификационно значимых признаков и сравнительный анализ этих признаков как способ установления тождества или различия исследуемых биологических объектов.

Соответственно, судебно-биологические лаборатории в зарубежных странах уже стали экспертными подразделениями, отвечающими за комплексное исследование вещественных доказательств, в которых центр тяжести лежит на молекулярно-генетических технологиях, призванных обеспечить исчерпывающее решение следственной задачи, а не отдельных частных экспертных вопросов. Все другие востребованные методические составляющие судебно-медицинской биологии здесь также применяются, но – в качестве вспомогательных и дополняющих методик. (В этом контексте специально подчеркнем, что серологическое определение групповых факторов и цитологическое определение пола для целей первичного дифференцирования биологического материала в объектах экспертизы признано не просто нецелесообразным, но даже вредным – по причине неэффективного, в ущерб дальнейшим исследованиям, израсходования экспертного материала, а также из-за несовершенства методик, способных привести к экспертным ошибкам).

Что касается вопросов наличия или отсутствия в следах на вещественных доказательствах интересующих следствие компонентов биологического происхождения и определения их видовой принадлежности, то можно сказать, эти этапы исследования сейчас не являются обязательными. При необходимости эти

экспертные задачи эффективно решаются с помощью высокостандартизованных и простых в обращении иммунохроматографических (иммунохимических) экспресс-тестов – наборов реагентов, предназначенных для обнаружения и анализа микроследов крови, слюны, мочи, спермы. (Отметим, что для определения наличия следов крови, слюны и спермы в настоящее время уже доступны подтверждающие тесты, которые реагируют только на человекоспецифические компоненты крови (гликофорин А), слюны (амилаза слюны) и спермы (семеногелин).

Тем не менее, в России, например, установление групповой принадлежности по изосерологической системе АВ0 – все еще востребованный вид судебно-медицинских экспертиз вещественных доказательств.

В качестве меры, направленной на устранение опасности ложного истолкования результатов и повышения эффективности экспертизы, нами в последние годы была разработана и апробирована [2–4] принципиально новая аналитическая система определения группоспецифических признаков системы АВ0 – на уровне анализа ДНК с помощью применения технологии биологических микрочипов. В этих работах описана методика определения 5 аллелей локуса АВ0, отвечающего за соответствующие группоспецифические характеристики крови, методом гибридизации на биологическом олигонуклеотидном микрочипе. Этот метод позволяет анализировать индивидуальные варианты точкового полиморфизма (SNP) в локусе АВ0 и таким способом выявлять 5 аллелей этого локуса – А, В, 01, 01v, 02, которые являются наиболее частыми в различных популяциях.

Используемый в этом анализе так называемый матричный (англ. – microarray) микрочип представляет собой небольшую пластинку, на которой в виде дискретных зон нанесен определенный набор молекулярных зондов, каждый из которых способен связывать из анализируемой пробы только комплементарную ему молекулу. В качестве зондов используются молекулы, способные образовывать специфические комплексы – в данном случае олигодезоксинуклеотиды. С помощью таких олигонуклеотидных ДНК-чипов можно проводить обнаружение точковых мутаций в определенном участке исследуемого гена (этот подход называется «минисеквенированием»). Анализ проводят методом молекулярной гибридизации. Для такого анализа используется предварительно меченая проба. Практически все современные детектирующие устройства (т. наз. «чип-ридеры», от англ. “chip reader”) рассчитаны на использование флуоресцентных меток.

В ячейках биологического микрочипа, выпускаемого ООО «Биочип» (Россия), иммобилизованы 8 вариантов зондов, позволяющих различать вышеназванные 5 аллелей гена АВ0. По комбинации выявляемых вариантов полиморфизма образец исследуемой хромосомной ДНК можно отнести к одной из 15 групп, получающихся из комбинации этих 5 аллелей.

Схема анализа выглядит следующим образом. Исследуемую ДНК амплифицируют в ходе ПЦР с флуоресцентно мечеными праймерами. Так получают флуоресцентно меченый продукт, который гибридизуют с олигонуклеотидным микрочипом. Результаты гибридизации регистрируют с помощью флуоресцентного анализатора микрочипов, оснащенного ПЗС-камерой (ООО «Биочип», Россия). Время всей процедуры составляет примерно сутки: в течение рабочего дня проводится подготовка образца и постановка гибридиза-

ции, в течение ночи проходит гибридизация, утром анализируют результат.

Данный метод представляет потенциальный интерес для следствия в плане получения оперативной ориентирующей информации о принадлежности биологического материала конкретному индивидууму. Однако еще требуются (и нами проводятся) дальнейшие валидационные исследования, направленные на оценку специфичности, чувствительности и надежности анализа.

2. НОВЫЙ ПОДХОД К СУДЕБНО-ЭКСПЕРТНОМУ ТИПИРОВАНИЮ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ

Судебно-экспертный анализ полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) востребован в первую очередь в тех случаях, когда типирование полиморфизма ядерной ДНК оказывается проблематичным – либо по причине отсутствия подходящих объектов сравнения (генеалогических схем) для осуществления прямой идентификации, либо из-за ограничений, накладываемых физическим состоянием объекта экспертизы, например, в случае исследования костей, зубов и волос.

Стандартная технология анализа структурного полиморфизма мтДНК включает энзиматическую амплификацию двух гипервариабельных участков, обозначаемых ГВС1 и ГВС2, и последующее секвенирование полученных ампликонов – традиционно с использованием электрофоретических систем разделения олигонуклеотидов. Этот аналитический подход в целом является достаточно трудоемким, длительным и материально затратным. Дополнительные сложности могут быть вызваны особенностями структуры индивидуальных вариантов мтДНК, артефактами электрофореза, а также проявлениями феномена гетероплазии, характеризующегося одновременным присутствием разных вариантов митохондриального генома у одного индивидуума. В последнем случае, из-за имеющихся точковых (однонуклеотидных) различий и/или вариаций в длине гомополимерных (полицитозиновых) участков у анализируемых молекул мтДНК, данные, получаемые при секвенировании, с трудом поддаются интерпретации по причине наложения сигналов различающихся индивидуальных оснований. По этой же причине при стандартном подходе сильно ограничена возможность определения индивидуальных компонентов в случае анализа смесей ДНК из нескольких источников – если только индивидуальные компоненты смеси не удастся предварительно разделить, например, с помощью молекулярного клонирования и иных относительно сложных методических решений. (В частности, некоторое время назад нами был разработан методический подход на основе избирательной амплификации мтДНК, который позволяет устанавливать индивидуальные митотипы в смешанных препаратах мтДНК. Для этой цели на основании анализа неоднозначных позиций на стандартной электрофореграмме, являющихся следствием типирования смеси индивидуальных мтДНК, моделируются условия для осуществления избирательной энзиматической амплификации одного из компонентов, то есть получения этого компонента в виде монопродукта полимеразной цепной реакции. Далее проводится его секвенирование для установления индивидуально митотипа [5]).

В мировой практике имеются альтернативные подходы, направленные на преодоление методических

проблем прямого секвенирования мтДНК. Однако эти методики имеют свои недостатки. Многие из них ориентированы на так называемый адресный анализ полиморфизма ДНК, но этот подход требует, чтобы все анализируемые полиморфные варианты предварительно были охарактеризованы и для каждого индивидуально были подобраны специфичные праймеры. Другие (например, пиросеквенирование) хотя и демонстрируют достаточно высокую чувствительность и предоставляют определенные возможности для анализа смесей, тем не менее, не позволяют проводить мультиплексный анализ.

По сравнению с упомянутыми технологиями, применение масс-спектрометрии для типирования мтДНК демонстрирует определенные преимущества. Главным из них является то, что наряду с адресным анализом нуклеотидных замен возможна детекция неизученных на данный момент вариантов полиморфизма первичной последовательности анализируемых олигонуклеотидов.

В развитие этих технологий несколько лет назад появился новый методический подход к типированию мтДНК человека, который объединил мультиплексную ПЦР и высокопроизводительный масс-спектрометрический генетический анализатор. Эта аналитическая система, получившая коммерческое название PLEX-IDTM (Abbott Molecular, США) воплощала комплексное решение, так как позволяла провести генотипирование и индивидуализировать биологический объект в рамках единого рабочего процесса, начиная с момента получения образца.

Предлагаемые тест-системы были разработаны для проведения анализа ДНК в стандартном 96-луночном планшете; при этом на одном планшете можно проанализировать одновременно до 12 образцов. Процесс полностью автоматизирован на всех стадиях, включая получение и очистку ампликонов, контроль качества и интерпретацию данных. Встроенные программные средства обеспечивали весь необходимый объем анализа данных: расшифровку первичных результатов, поиск, сравнение, регистрацию получаемых профилей полиморфизма в базах данных – как непосредственно в формате нуклеотидных составов, так и опосредованно, в виде нуклеотидных последовательностей. Весь процесс – от подготовки образца до получения отчета – занимал менее восьми часов.

Нами в серии работ [6–13] были проведены валидационные исследования всех этапов технологической цепи и сравнительный анализ экспериментальной технологии PLEX-ID с традиционной электрофоретической системой анализа полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК, и дана оценка перспектив использования масс-спектрометрического анализа для решения задач современной судебно-медицинской генетики. Проведенные исследования продемонстрировали наличие ряда потенциальных преимуществ масс-спектрометрического анализа ПДАФ ДНК над традиционными методами, основанными на технологии капиллярного электрофореза. Самым значимым преимуществом масс-спектрометрического подхода можно считать повышение информативности анализа полиморфизма STR-локусов хромосомной ДНК за счет открывающейся возможности выявления в них SNP и расширения, таким образом, их аллельного спектра [8–10].

В то же время мы выявили, что платформа PLEX-ID, являющаяся на данный момент единственным примером реализации технологии масс-спектрометриче-

ского анализа ДНК для целей судебно-медицинской генетики, не лишена ряда серьезных технологических недостатков. Наличие выявленных проблем указало на необходимость дальнейшей радикальной доработки существующей технологии для ее успешного внедрения в экспертную практику. Это требует сил и времени. Поэтому в настоящее время компанией-разработчиком этот проект на неопределенное время приостановлен.

3. НОВОЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ РЕШЕНИЕ: МУЛЬТИПЛЕКСНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАССОВОГО ПАРАЛЛЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

В сложившейся ситуации, на этот период вынужденной задержки, нам представилось целесообразным продолжить исследования, начатые с использованием аналитической платформы PLEX-ID, в том же перспективном направлении, а именно, в направлении совершенствования мультиплексного типирования ДНК путем расширения аллельного спектра STR-локусов хромосомной ДНК (за счет выявления большего количества аллельных вариантов), – но не с помощью масс-спектрометрического анализа, а с использованием других, появившихся буквально в последнее время инновационных молекулярно-генетических технологий.

Например, технологии так называемого множественного или массового параллельного секвенирования, относящейся к активно разрабатываемой в последнее время области технологий «секвенирования следующего поколения» или NGS (англ.: Next Generation Sequencing).

Технологии «секвенирования следующего поколения» также, как и масс-спектрометрия, позволяют дискриминировать фрагменты ДНК, одинаковые по длине, но содержащие различающиеся нуклеотидные последовательности. Как указывалось, однонуклеотидные замены (SNP) внутри кор-последовательностей STR-локусов не могут быть обнаружены с помощью традиционных методов анализа, например, капиллярного электрофореза, в котором дискриминирующим фактором выступает только длина фрагмента. Но выявление таких ПДАФ-вариантов электрофоретически идентичных аллелей – то есть различающихся между собой по нуклеотидной последовательности форм одинаковых вариантов ПДАФ, – как раз возможно путем множественного параллельного секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК.

В последние годы несколькими зарубежными компаниями были разработаны аналитические платформы, основанные на использовании технологий «секвенирования следующего поколения» (NGS). Это – генетические анализаторы, представляющие собой инструменты для множественного параллельного секвенирования фрагментов ДНК. Один из примеров – аналитическая платформа Ion Torrent™ PGM Sequencer™ System, которая разработана компанией Life Technologies (США). Ее функционирование основано на использовании методики множественного параллельного секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК в варианте пошаговой ионной детекции (по сути – регистрации изменения pH, возникающего вследствие выделения ионов водорода при включении каждого очередного нуклеотида в новосинтезируемую последовательность ДНК).

Ion Torrent™ – это аналитический инструмент для расшифровки первичной структуры (секвенирования) одновременно большого количества амплифициро-

ванных фрагментов ДНК, работа которого основана на использовании специального микрочипа и микросфер и последовательной детекции протонов, образующихся в ходе ДНК-зависимого энзиматического синтеза ДНК.

В ходе рабочего процесса получаемый pH-сигнал конвертируется в последовательность изменения электрического потенциала, амплитуда которого пропорциональна количеству встроженных нуклеотидов, – так называемую ионограмму. На основании такой ионограммы генерируется нуклеотидная последовательность новосинтезированной цепи ДНК и соответственно, анализируемого олигонуклеотида, играющего роль ее комплементарной матрицы. Таким образом, определяют нуклеотидный состав всей анализируемой последовательности ДНК.

Нами была проведена серия пилотных аналитических экспериментов с помощью аппаратно-программного комплекса IonTorrent™ PGM Sequencer™ System (Life Technologies, США) с применением предоставленной производителем экспериментальной панели SNP-маркеров, рассчитанной на одновременный анализ 169 локусов хромосомной ДНК [14–16].

Прописанная производителем технология NGS была нами освоена в демонстрационном формате. Однако в практической реальности при постановке и решении целевых задач (например, верификации родства с помощью панели SNP-маркеров) мы столкнулись с рядом методических проблем, которые указывают на настоятельную необходимость устранения имеющей место аналитической неустойчивости аналитической платформы Ion Torrent™ PGM Sequencer™ System. По этому поводу нами были даны соответствующие рекомендации компании-производителю, которая усовершенствовала программное обеспечение. Причины некоторых остальных проблем еще ждут своего разрешения, прежде чем станет возможным дальнейшее внедрение технологии массового параллельного секвенирования в экспертную практику.

4. ТИПИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА УРОВНЕ ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК; ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОДИССЕКЦИИ

Поиск путей анализа биологического материала, содержащегося в единичной клетке, является одной из «горячих точек» современной судебно-медицинской биологии, и, в частности, генетики. Действительно, потенциальная возможность выполнения анализа генетического материала на уровне одной-единственной клетки позволяет устранить целый ряд проблем современной судебно-медицинской генетики, связанных как с исследованием сверхмалых количеств биологического материала, так и с исследованием биологического материала смешанной природы.

В 1996 году была предложена одна из таких технологий, сокращенно называемая LCM (англ. – Laser Capture Microdissection – лазерная микродиссекция с последующим захватом диссектированных образцов) [17], которая позволяет получать единичные клетки в качестве образцов биологического материала для дальнейшего молекулярного анализа.

С момента своего появления технология LCM значительно развилась и усовершенствовалась, и уже нашла широкое применение в различных областях современной биологии и медицины. Это онкология, генетически детерминированная патология, протеомика, и др. Все возрастающий интерес к технологии LCM наблюдается

и в области судебной медицины. Однако реальных экспертных методов, использующих возможности технологии LCM, пока не существует.

Основной проблемой, препятствующей ее широкому распространению, является неустойчивость результатов, получаемых с применением мультиплексных систем типирования в препаратах, содержащих крайне малое количество исходного генетического материала.

Определенные успехи в этой области были достигнуты с применением метода полногеномной амплификации клеточной ДНК с последующим типированием хромосомных STR-маркеров. Однако этот подход в целом не может считаться вполне удовлетворительным, поскольку недостаточная стабильность получаемых результатов препятствует широкому применению метода полногеномной амплификации ДНК в решении реальных практических задач.

В серии наших работ в данной области [18–26] для целей судебно-экспертного молекулярно-генетического анализа ДНК единичных клеток, полученных с помощью применения LCM, был предложен иной методический подход, не использующий полногеномную амплификацию ДНК.

Его исходной посылкой явились следующие соображения. Результативным и устойчивым методом анализа очень малого количества ДНК мог бы стать вариант монолокусного типирования, который обладал бы достаточно большим дискриминирующим потенциалом и высокой чувствительностью. В данном случае преимуществом именно монолокусной системы типирования перед мультилокусными системами является гораздо более высокая стабильность и возможность применения многораундовой амплификации, многократно повышающей чувствительность анализа без потери качества результата. Чувствительность анализа можно еще более повысить, если типировать многокопийные локусы ДНК.

В качестве подходящей системы типирования, удовлетворяющей поставленным требованиям, была выбрана система типирования мтДНК [19, 21].

На начальном этапе была осуществлена оптимизация условий амплификации полиморфных локусов мтДНК в препаратах, содержащих крайне малое количество исходного генетического материала. Для этого использовали схему двухраундовой полимеразной реакции, которая позволила получить достаточное для секвенирования количество амплифицированного материала.

Суспензию буккальных клеток наносили на предметное стекло, покрытое полимерной PEN-мембраной (Leica Microsystems, Германия). Далее проводилась лазерная диссекция неокрашенного клеточного материала с использованием микродиссектора Leica Laser Microdissection System LMD 7000 (Leica Microsystems, Германия). С диссектированным материалом проводили процедуру лизиса клеток и постановки ПЦР.

В порядке обсуждения следует пояснить, что для диссектированного материала, представленного малым числом клеток, не могут быть применены обычные методики экстрагирования и очистки ДНК – такие как фенол-хлороформная экстракция с последующей ультрамикрочистотой или осаждением ДНК спиртами, сорбентные методы выделения и очистки ДНК и др., – поскольку они сопряжены с неизбежными существенными потерями исходного генетического материала.

Минимизировать эти потенциальные потери можно, если в качестве матричного препарата для постановки генотипирующих реакций использовать не экс-

трагированную ДНК, а непосредственно клеточный лизат, который получен таким образом, чтобы содержащаяся в нем ДНК обладала матричной активностью, а остальные клеточные компоненты были разрушены и не препятствовали протеканию ПЦР. Но это не все. Малое исходное количество анализируемого материала диктует необходимость его амплификации в одной реакции. Это значит, что анализируемый клеточный лизат должен явиться составной частью реакционной смеси для ПЦР и потому иметь минимально возможный собственный объем. Этому условию наилучшим образом удовлетворяет ПЦР-сопряженный клеточный лизис, когда непосредственно в амплификационной реакционной смеси происходит разрушение клеток и высвобождение доступной для анализа клеточной ДНК.

Одним из приемлемых вариантов такой системы является термическое разрушение клеток. Мы использовали именно этот путь. Поэтому диссектированные клетки не подвергались заранее какой-либо специальной обработке с целью их разрушения и экстрагирования ДНК. Лизис клеток осуществлялся непосредственно в реакционной смеси в процессе термоциклирования в ходе ПЦР. Полученные в ходе реакции амплифицированные фрагменты мтДНК подвергали генотипированию путем стандартного секвенирования флуоресцентно меченых ампликонов (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit /ABI PRISM 3130, Applied Biosystems, США).

На последующих этапах данная система была протестирована на клеточном материале: в качестве объектов исследования послужили клетки буккального эпителия человека (свежие мазки со слизистой оболочки ротовой полости).

Амплифицированные фрагменты мтДНК, полученные из трех препаратов единичных эпителиальных клеток, были подвергнуты секвенированию. Во всех трех объектах были установлены идентичные гаплотипы ГВС1 и ГВС2 мтДНК, которые соответствовали ожидаемому известному гаплотипу донора, от которого были получены буккальные эпителиоциты.

Таким образом, можно утверждать, что описанная методика действительно позволяет успешно проводить анализ индивидуализирующих признаков мтДНК человека в одной-единственной клетке.

Приобретенный опыт был нами в дальнейшем успешно использован при разработке методики мультиплексного анализа полиморфных STR-маркеров аутосомной ДНК в объектах, полученных с помощью LCM [24].

Здесь следует пояснить, что в диссектированном материале молекулярный анализ (генотипирование) полиморфных STR-локусов аутосомной ДНК (в сравнении с мтДНК) сопряжен со значительными трудностями, из которых главная – это предельно малое количество доступных для исследования однокопийных мишеней ДНК. В этой связи отметим, что в случае использования мультиплексной амплификационной системы (которая единственная, в случае анализа хромосомных STR-локусов, способна обеспечить достижение приемлемого дискриминирующего потенциала проводимого анализа) применение многораундовой ПЦР – как это было ранее нами сделано для мтДНК – технически невозможно. Это обуславливает объективное ограничение метода.

В настоящее время заявленная производителем чувствительность лучших мультиплексных систем генотипирования хромосомных STR-локусов такова, что минимальное количество геномной ДНК, необходимое

для достоверной амплификации типичной мультилокусной панели геномных диаллельных однокопийных мишеней, составляет порядка 60–100 пг [14]. Теоретически эта величина эквивалентна 10–20 диплоидным или 30–40 гаплоидным геномам. (Отметим, что достижение столь высокой чувствительности возможно лишь при использовании современных систем капиллярного электрофореза, основанных на детекции флуоресцентно меченных амплифицированных фрагментов ДНК).

Из всего этого следует важный вывод: при имеющемся в настоящее время арсенале методов судебно-экспертного генотипирования хромосомных STR-локусов не может идти речь об анализе хромосомной ДНК единичной клетки. Для достоверного генотипирования хромосомной ДНК, в одной мультиплексной реакции должен быть амплифицирован генетический материал, содержащийся, как минимум, в двух-трех десятках диссектированных клеток.

Вышеописанная методика была апробирована на модельных препаратах буккальных эпителиоцитов. Для генотипирования хромосомной ДНК была выбрана мультиплексная 8-локусная панель полиморфных STR-маркеров хромосомной ДНК AmpFISTR® Minifiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, США), как обладающая необходимой высокой чувствительностью и стабильностью получаемых результатов в сочетании с высоким дискриминирующим потенциалом. Было показано, что данная методика позволяет проводить генотипирование хромосомной ДНК в одной мультиплексной реакции в суммарных препаратах из 10–20 диссектированных диплоидных клеток [22].

Это действительно успешная демонстрация возможностей, поскольку полученный результат близок к расчетному пределу чувствительности метода. Тем не менее мы не можем утверждать, что генотипирование хромосомной ДНК на уровне 10 клеток – это всегда стабильный и воспроизводимый результат. Стоит обратить внимание, что достаточно часто при попытках выполнить исследование с таким малым количеством исходного материала, близким к порогу возможностей используемого метода анализа, наблюдалось появление неустрашимых стохастических эффектов, вызванных предельно низким содержанием в реакционной смеси эффективных ДНК-матриц, которые проявлялись в виде артефактной амплификационной активности и, как следствие, к искажениям амплификационного профиля.

На основании этих полученных нами оценок, можно заключить, что по состоянию на сегодняшний день, количественный порог в 15–20 диплоидных клеток (30–40 гаплоидных), при их прямом генотипировании в одной мультиплексной реакции, следует считать предельно допустимым, с точки зрения достоверности результата генотипирования. [22]).

Обобщая опыт проведенных нами исследований, считаем целесообразным сформулировать следующие положения:

- Использование дорогостоящей и сложной технологии LCM оправдано в тех случаях, когда компоненты смешанного препарата не могут быть разделены иными методами, либо хотя бы один из компонентов смеси присутствует в количестве, недостаточном для анализа на макроуровне (например, в случае очень малого содержания спермального компонента в смеси с женскими эпителиальными клетками).

- Применение LCM оправдано и при анализе препаратов, содержащих, условно говоря, менее ста клеток. Расчет здесь простой: количество генетического мате-

риала, содержащегося в 100 клетках, эквивалентно приблизительно 600 пг аутосомной ДНК, что достаточно для анализа современными методами генотипирования на макроуровне даже с учетом потенциальных потерь на этапе экстракции ДНК.

- Отдельного упоминания заслуживает проблема предотвращения контаминации диссектируемых объектов посторонним генетическим материалом. Учитывая критически малые количества анализируемых биологических образцов, данная проблема стоит достаточно остро. В наших экспериментах стабильности и воспроизводимости получаемых данных удалось достичь только при строгом соблюдении очень жестких условий [25].

Не будет преувеличением сказать, что всё это – весьма успешная демонстрация возможностей LCM применительно к судебно-экспертному молекулярно-генетическому анализу, поскольку полученные результаты близки к пределам чувствительности используемых в настоящее время аналитических методов. Тем не менее следует подчеркнуть, что эти достижения были нами осуществлены на уровне лабораторных методик – в модельных условиях и на модельных объектах. Эти пилотные эксперименты лишь иллюстрируют возможность осуществления молекулярно-генетического идентификационного анализа на уровне единичной клетки, открывающуюся с использованием технологии LCM. Перенос же лабораторных технологий в сферу реальной экспертной практики таит в себе много осложнений и требует углубленных дополнительных исследований.

На самом деле наши попытки непосредственно применить разработанные ранее методики для анализа биологических следов, присутствующих на реальных экспертных объектах, во многих случаях не приводили к успеху, несмотря на то, что количество взятых для генотипирования диссектированных клеток могло быть далеко не минимальным. Последующие эксперименты, проведенные на реальных экспертных объектах, позволили нам выявить ряд проблемных аспектов применения технологии LCM в практической экспертной деятельности [19, 23, 25].

В цитируемой работе было установлено, что некоторые из этих проблем обусловлены особенностями анализируемых клеток и их физическим состоянием в объекте исследования. Полученные данные дают основания полагать, что неудачи при генотипировании отдельных клеток, полученных с помощью LCM, могут объясняться отсутствием в них пригодного для анализа генетического материала. Другой главной причиной неудач может являться снижение доступности генетического материала для ПЦР вследствие того, что клетки, подвергшиеся длительному воздействию факторов внешней среды, часто оказываются устойчивы к термическому разрушению. Для преодоления этого затруднения нами разработана высокоэффективная система ПЦР-сопряженного лизиса, совмещающая в себе преимущества протеиназного лизиса и использования ПЦР-совместимых детергентов.

Мы продолжаем работу в этом направлении с целью создания полноценных экспертных методик и внедрения LCM в судебно-медицинскую экспертную практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Иванов П. Л., Пименов М. Г., Наседкина Т. В., Лысов Ю. П., Заседателев А. С., Барский В. Е. //

- Разработка судебно-медицинских аспектов технологии биологических микрочипов // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики на современном этапе. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию РЦСМЭ, с. 190-191, Москва, 17-20 октября 2006.
- Митяева О. Н., Фесенко Д. О., Наседкина Т. В., Лысов Ю. П., Барский В. Е., Заседателев А. С., Иванов П. Л. // Разработка и применение гидrogелевых олигонуклеотидных микрочипов для судебно-медицинской идентификации личности на примере локуса АВ0 // Судебно-медицинская экспертиза, № 2, с. 21-25, 2007.
 - Иванов П. Л., Каганова Н. Л., Земскова Е. Ю., Бинько И. А., Митяева О. Н., Фесенко Д. О., Наседкина Т. В. // Типирование локуса АВ0 с помощью биологического микрочипа – новый уровень решения идентификационных задач при судебно-медицинской биологической экспертизе Судебно-медицинская экспертиза, № 2, с. 11-17, 2008.
 - Экспертное применение анализа полиморфизма последовательностей митохондриальной ДНК в судебно-медицинской практике. // Новая медицинская технология // Регистрационное удостоверение Росздравнадзора № ФС-2006-305 от 31 октября 2006 г., Москва, 2006.
 - Иванов П. Л. // Новый подход к судебно-экспертному типированию митохондриальной ДНК человека с использованием масс-спектрометрического анализа амплифицированных фрагментов: автоматизированный комплекс генетического анализа PLEX-ID // Судебно-медицинская экспертиза, № 3, с. 46-52, 2010.
 - Леонов С. Н., Земскова Е. Ю., Тимошенко Т. В., Иванов П. Л. // Масс-спектрометрический анализ в приложении к судебно-медицинской генетической экспертизе: первые оценки // Труды VII Всероссийского съезда судебных медиков «Задачи и пути совершенствования судебно-медицинской науки и экспертной практики в современных условиях». Ред. А. В. Ковалев. ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России, М. 2013. Т. 2. 118-119.
 - Ivanov P., Leonov S., Zemskova E., Timoshenko T. // Expanding the allele base for STR analysis using sequence polymorphisms // Program Book of 25th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, P-24, стр.102-103, Melbourne, Australia, 02-07.09.2013 г. [Материалы 25 Всемирного Конгресса Международного Общества Судебных Генетиков (ISFG), Мельбурн, Австралия].
 - Leonov S., Zemskova E., Timoshenko T., Ivanov P. // Enhancing forensic efficiency of STR typing using mass spectrometry-based assay // Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3, P. 47-48, 2013.
 - Земскова Е. Ю., Леонов С. Н., Тимошенко Т. В., Иванов П. Л. // Полиморфизм нуклеотидной последовательности как источник повышения информативности STR-маркеров аутосомной ДНК человека // Материалы VIII всероссийского съезда судебных медиков, «Задачи и пути совершенствования судебно-медицинской науки и экспертной практики в современных условиях», с. 231-233, Москва, 21-24 октября 2013 г.
 - С. Н. Леонов, Е. Ю. Земскова, Т. В. Тимошенко, П. Л. Иванов // Масс-спектрометрический анализ в приложении к судебно-медицинской генетической экспертизе: первые оценки // Материалы VIII всероссийского съезда судебных медиков, «Задачи и пути совершенствования судебно-медицинской науки и экспертной практики в современных условиях», с. 231-233, Москва, 21-24 октября 2013 г.
 - Леонов С. Н., Земскова Е. Ю., Тимошенко Т. В., Иванов П. Л. // Оценка перспектив применения масс-спектрометрического анализа амплифицированных фрагментов ДНК в судебно-медицинской генетической экспертизе // Судебно-медицинская экспертиза, 2014, № 4, стр. 24-28.
 - Леонов С. Н., Земскова Е. Ю., Тимошенко Т. В., Иванов П. Л. // Масс-спектрометрический анализ полиморфизма аутосомной ДНК для целей судебно-медицинской экспертизы // Материалы VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014», Том 2, с. 332-333, Москва, 2014.
 - Земскова Е. Ю., Тимошенко Т. В., Леонов С. Н., Соколов В. О., Иванов П. Л. Судебно-экспертное типирование SNP-маркеров Y-хромосомы с использованием технологии NGS // Материалы VIII всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014», Том 2, с. 335-336, Москва, 2014.
 - Тимошенко Т. В., Иванов П. Л. // Технология массового параллельного секвенирования для анализа однонуклеотидных полиморфизмов в аспекте судебно-медицинской генетической экспертизы // International Student's Journal of Medicine, стр. 767-771, Алматы, 2014.
 - Иванов П. Л., Леонов С. Н., Земскова Е. Ю. // Типирование митохондриальной ДНК в единичных клетках буккального эпителия человека // Судебно-медицинская экспертиза, № 5, с. 30-34, 2011.
 - Иванов П. Л., Леонов С. Н., Земскова Е. Ю. // Оценка возможностей применения технологии лазерной микродиссекции для целей молекулярно-генетического экспертного анализа (генотипирования) хромосомной ДНК человека // Судебно-медицинская экспертиза, № 5, с. 34-38, 2012.
 - Иванов П. Л., Леонов С. Н., Земскова Е. Ю. // Некоторые проблемные аспекты практического применения технологии лазерной микродиссекции для целей судебно-экспертного молекулярно-генетического анализа // Судебно-медицинская экспертиза, № 6, с.16-20, 2012.
 - Земскова Е. Ю., Леонов С. Н., Иванов П. Л. // Некоторые замечания по поводу практического использования лазерной микродиссекции для целей молекулярно-генетического анализа вещественных доказательств биологического происхождения // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы судебно-медицинской экспертизы», с. 196-198, Москва 17-18 мая 2012.
 - Леонов С. Н., Земскова Е. Ю., Иванов П. Л. // О возможностях технологии лазерной микродиссекции применительно к судебно-экспертному генотипированию хромосомной ДНК

- человека // Материалы научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы судебно-медицинской экспертизы», с. 205–207, Москва 17–18 мая 2012.
20. Иванов П. Л., Леонов С. Н., Земскова Е. Ю., Кобылянский А. Г., Дзюбенко Е. В. // Мультилокусное генотипирование полиморфных STR-локусов хромосомной ДНК в единичных клетках: трудности технологий // Судебно-медицинская экспертиза, № 5, с. 30–34, 2013.
 21. Леонов С. Н., Земскова Е. Ю., Иванов П. Л. // О лазерной микродиссекции в судебно-экспертном приложении (миниобзор) // Материалы VIII всероссийского съезда судебных медиков, «Задачи и пути совершенствования судебно-медицинской науки и экспертной практики в современных условиях», с. 116–117, Москва, 21–24 октября 2013.
 22. Annual Report Summary for Testing in 2004 // American Association of Blood Banks, 2004, <http://www.aabb.org>;
 23. Ivanov P. L., Leonov S. N., Zemskova E. Yu. // On the practice of single cell DNA typing applied for forensic biological evidence // //Book of Abstracts 24th World Congress of the International Society for Forensic Genetics, P-266, стр.162, University of Vienna - ISFG, Vienna, Austria, 2011 [Материалы 24 Всемирного Конгресса Международного Общества Судебных Генетиков (ISFG), Вена, Австрия, 29 авг. - 3 сент. 2011 г.].
 24. Emmert-Buck M.R., Bonner R. F., Smith P. D., Chuaqui R. F., Zhuang Z., Goldstein S. R., Weiss R. A., Liotta L. A. Laser capture microdissection. // Science, 1996, 274 (5289), 998–1001.
 25. Leonov S. N., Timoshenko T. V., Zemskova E. Yu., Ivanov P. L. // Evaluation of the Ion Torrent™M HID-by-NGS SNP typing assay v. 2.3. // “Human Identification Solutions (HIDS): Innovations and Perspectives”, Madrid, Spain, 2015 [Материалы международной конференции «Технологии молекулярно-генетической идентификации», Мадрид, Испания, 02–04 марта 2015, принято в печать].
 26. Leonov S., Zemskova E., Ivanov P. // LMD-assisted single cell DNA typing of forensic biological evidence: Issues of the cell type and sample condition // Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3, P. 47–48, 2011.

Для корреспонденции

Иванов Павел Леонидович — доктор биол. наук, профессор, лауреат Государственной премии России, заместитель директора по высокотехнологичным исследованиям ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России). Адрес: 125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13, тел/факс +7 (495) 945-00-94 • E-mail: dna@rc-sme.ru

Земскова Елена Юрьевна — канд. мед. наук, заведующая отделом молекулярно-генетических экспертиз (исследований) ФГБУ «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «РЦСМЭ» Минздрава России). Адрес: 125284, г. Москва, ул. Поликарпова, д. 12/13, тел/факс +7 (495) 945-00-94 • E-mail: zemskova@rc-sme.ru