

<https://doi.org/10.17116/sudmed20196201113>

Аспекты молекулярно-генетического исследования волос человека в зависимости от их морфологических характеристик.

I. Прогностический скрининг

К.м.н. В.Ю. АЛЕКСАНДРОВА, к.т.н. Е.А. БОГАТЫРЕВА, к.б.н. М.Ю. КУКЛЕВ, д.м.н. М.И. ЛАПЕНКОВ*, н.с. Н.В. ПЛАХИНА

Институт криминалистики (нач. — к.х.н. К.Ю. Васильев) Центра специальной техники ФСБ России, Москва, Россия, 101000

Цель исследования — создание методики отбора волос, пригодных для молекулярно-генетического исследования ядерной ДНК. Предложено разделять волосы на пять групп в зависимости от фазы роста и наличия или отсутствия эпителиальных тканей на корневом конце. Приведен алгоритм проведения прогностического скрининга, включающий морфологическое и цитоморфологическое исследования, по результатам которых определяются перспективность образца для последующего генотипирования.

Ключевые слова: волосы человека, анаген, катаген, телоген, гематоксилин, DAPI, генотипирование.

The aspects of the molecular-genetic investigations of human hair depending on its morphological characteristics. I. Prognostic screening

V.YU. ALEKSANDROVA, E.A. BOGATYREVA, M.YU. KUKLEV, M.I. LAPENKOV*, N.V. PLAKHINA

Institute of Criminal Science, Centre of Special Technologies, Federal Security Service of the Russia, Moscow, Russia, 101000

The objective of the present work was to develop the method for the selection of hairs suitable for the molecular-genetic investigation of nuclear DNA. It was proposed to distinguish between five groups of hair depending on its growth phase, the presence or absence of epithelial tissues at the root terminus. An algorithm was developed for carrying out prognostic screening including the morphological and cytomorphological investigations the results of which can be used to evaluate the possibility for further genotyping.

Keywords: human hair, anagen, catagen, telogen, hematoxylin, DAPI, genotyping.

Молекулярно-генетическое исследование волос человека широко применяется в экспертной практике и позволяет решать актуальные идентификационные задачи. Процессы кератинизации и деградации, происходящие в волосяном фолликуле в течение жизненного цикла, отражаются на состоянии корневых концов волос и соответственно на возможности выделения ядерной ДНК (яДНК) и проведении молекулярно-генетического анализа.

Волосные фолликулы в процессе своего жизненного цикла проходят три фазы: анагеновую, катагеновую и телогеновую [1]. *Фаза анагеновая* (анагена) — наиболее длительный этап, включающий период формирования нового фолликула и рост волоса. Одновременно происходит процесс кератинизации волоса, приводящий к деградации нуклеиновых кислот и органелл клеток. *Фаза катагеновая* (катагена) характеризуется остановкой синтеза меланина и постепенным прекращением митотической активности. В результате этого к началу следующей фазы разрушается нижняя часть фолликула, его длина становится меньше на $\frac{1}{3}$, а количество яДНК в луковице резко сокращается. *Фаза телогеновая* (телогена) — период покоя, в течение которого волосы находятся в пределах фолликула с лиш-

ней пигмента атрофированной луковицей в виде колбы. Необходимо отметить, что все волосы, которые выпадают самопроизвольно, — это телогеновые волосы.

Поступающие на экспертизу волосы могут находиться в разных фазах роста. Подавляющее большинство волос человека, изымаемых на месте происшествия, — выпавшие, имеют корневой конец, подвергшийся деградации различной степени. Чаще всего это делает их непригодными или ограниченно пригодными для анализа яДНК. Например, при осмотре и отборе объектов с поступившего при выполнении одной из экспертиз одеяла были изъяты 48 волос человека. После тщательного изучения только 3 из них взяли для дальнейшего исследования, и только в одном случае получили полный генетический профиль по панели Identifiler Plus.

Оценка состояния морфологических структур волосного фолликула, на наш взгляд, является необходимым этапом определения пригодности волоса для последующего генотипирования.

В литературе [2, 3] предлагают два способа решения этой задачи. Первый основывается на определении фазы роста волоса, а также количества, расположения и степе-

ни прозрачности остатков эпителиальных тканей. Другим вариантом предварительной оценки является метод окрашивания корневой части волоса различными красителями для подсчета количества ядерных клеток [4–8].

Цель исследования — создание методики отбора волос, пригодных для молекулярно-генетического исследования яДНК.

Материал и методы

Исследовали 708 волос, из них 220 получили от 29 доноров (13 были вырваны, 207 собраны с помощью вычесывания), а 488 поступили в рамках экспертиз с 2013 по 2016 г. и были отобраны после предварительного осмотра с помощью стереоувеличителя Mantis Elite фирмы «Vision Engineering» (Великобритания) как предположительно пригодные для молекулярно-генетического исследования.

Исследование микроморфологических характеристик корневых концов волос проводили в проходящем свете микроскопа DM4000B фирмы «Leica Microsystems» (Германия) при увеличении 100, 200 и 400. Устанавливали фазу роста волоса, наличие влагалищных оболочек и остатков эпителиальных тканей (оценивали их количество, прозрачность, расположение).

Окрашивание корневых концов волос выполняли двумя методами.

1. *Окрашивание гематоксилином Гarrisа Гистолайн* (готовый краситель, ООО «Компания Элемент», Россия). Для окраски ядер клеток корневой конец волоса помещали на предметное стекло, добавляли необходимое для полного покрытия количество 96% этанола и выдерживали в течение 30 мин для фиксации клеток. Затем высушивали и на предметное стекло по каплям наносили краситель в необходимом для покрытия корневого конца количестве, экспонировали 3 мин и ополаскивали волос в деионизированной воде. Количество ядерных клеток подсчитывали в проходящем свете микроскопа.

2. *Окрашивание флуоресцентным красителем DAPI* фирмы «Sigma» (США). Данный краситель способен в связанном с ДНК состоянии при облучении ультрафиолетом ($\lambda=359$ нм) продуцировать интенсивное голубое свечение ($\lambda=461$ нм), не влияя на дальнейший анализ яДНК.

На предметное стекло наносили каплю красителя, в которую помещали корневой конец волоса. Препарат накрывали покровным стеклом и непосредственно после окрашивания флуорохромированные препараты изучали на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E фирмы «Nikon» (Япония) при увеличении 100, 250 и 400 в отраженном свете с использованием соответствующего флуоресцентного блока (возбуждение 340–390 нм, эмиссия более 410 нм).

Технологии выделения и генотипирования ДНК, использованные наборы, реагенты и оборудование указаны в статье, посвященной особенностям генотипирования волос человека.

Результаты и обсуждение

Первоначально с помощью световой микроскопии определяли морфологические признаки корневых концов волос и устанавливали фазу их развития. Большинство (484) волос находилось в телогеновой, 115 — в анагеновой и 109 — в катагеновой фазе.

Затем окрашивали корни волос и подсчитывали количество ядер. При окрашивании этими двумя методами практически всегда получали идентичные результаты. На наш взгляд, преимуществом метода окраски DAPI является экспрессность. Кроме того, данный метод дает лучшие результаты при визуализации ядер в сильно пигментированных волосах. По количеству обнаруженных ядер волосы распределяли в группы менее 10, от 10 до 100, более 100 ядер.

После выделения¹ ДНК волосы группировали в соответствии с ее концентрацией: более 0,05, 0,05–0,01 и менее 0,01 нг/мкл.

Результаты последующего генотипирования соотносили с морфологическими особенностями волос, количеством ядер и концентрацией выделенной ДНК в препаратах (см. таблицу).

На основании анализа полученных данных все волосы были разделены на пять групп. Волосы каждой группы объединяют сходная морфологическая картина, единая тактика предварительного исследования, степень перспективности получения результата генотипирования.

1-я группа. Волосы в анагеновой/катагеновой фазе с просвечивающими влагалищными оболочками (рис. 1, на цв. вклейке).

2-я группа. Волосы в анагеновой/катагеновой фазе без просвечивающих влагалищных оболочек (рис. 2, на цв. вклейке).

3-я группа. Волосы в телогеновой фазе с большим количеством остаточных эпителиальных тканей, расположенных вокруг колбовидной телогеновой луковицы в виде мешочка (рис. 3, на цв. вклейке).

4-я группа. Волосы в телогеновой фазе с небольшим количеством остаточных эпителиальных тканей. Это могут быть остатки эпителиальных тканей, расположенные вокруг колбовидной телогеновой луковицы, — остатки «мешочка» (рис. 4, а, б на цв. вклейке) или только на проксимальном конце в виде хвоста (см. рис. 4, в, г, на цв. вклейке). Причем остатки эпителиальных тканей могут быть едва заметными (см. рис. 4, д, е, на цв. вклейке).

5-я группа. Волосы в телогеновой стадии с полным отсутствием эпителиальных тканей (рис. 5, на цв. вклейке).

Все волосы 1-й группы являются отличными кандидатами для генотипирования. Для всех образцов получен полный генотип. В 92% случаев полный генотип установлен для волос 3-й группы.

Следовательно, установление микроморфологических характеристик корневых концов волос, позволяющих отнести их к 1-й и 3-й группам, достаточно для принятия прогностического решения об их пригодности для генотипирования, и дальнейшего цитоморфологического исследования не требуется.

Кроме того, на этапе морфологического исследования определяется бесперспективность для генотипирования волос 5-й группы. При окрашивании корневых концов таких волос ядра отсутствуют, в полученных препаратах яДНК не обнаруживается.

Не такими однозначными оказались результаты для волос 2-й и 4-й групп. Количество ядер в их корневых кон-

¹Анализ эффективности использованных наборов реагентов для выделения ДНК будет представлен в отдельной статье.

Взаимосвязь фаз роста волос и количества ядер с результатами молекулярно-генетического исследования

Группа волос	Доля волос в данной группе, %	Количество ядер волос с указанным количеством ядер, %	Доля волос (%) с концентрацией ДНК			Полный генотип, %	Частичный генотип, %	Нет результата, %
			более 0,05 нг/мкл	0,05—0,01 нг/мкл	менее 0,01 нг/мкл			
1. Волосы в анагеновой/катагеновой фазе с обильными просвечивающимися влагалищными оболочками	16	Более 100 (100)	100	—	—	100	—	—
2. Волосы в анагеновой/катагеновой фазе без оболочек	16	Более 100 (57) 10—100 (27) Менее 10 (16)	93 48 —	5 30 —	2 22 100	62	3	34
3. Волосы в телогеновой фазе с обильными эпителиальными тканями (типа «мешочек»)	12	Более 100 (82) 10—100 (8) Менее 10 (10)	92 25 —	8 50 —	— 25 100	92	2,3	5,7
4. Волосы в телогеновой фазе с небольшим количеством остаточных эпителиальных тканей	34	Более 100 (26) 10—100 (43) Менее 10 (31)	66,7 21 —	20,8 28 —	12,5 51 100	26	4	70
5. Волосы в телогеновой фазе с полным отсутствием эпителиальных тканей	22	Ядра отсутствуют	—	—	100	—	—	100

цах значительно варьирует — от 100 и более до полного отсутствия. Нередко при этом наблюдается несоответствие микроскопической картины, наблюдаемой в проходящем свете микроскопа, с количеством ядер, определенных в результате окрашивания. Следовательно, для этих групп окрашивание клеточных структур корня волоса является необходимым этапом. В данном случае прогностическое значение имеет количество ядер. Если количество обнаруживаемых ядер 100 и более, вероятность положительного результата молекулярно-генетических исследований достаточно высока. При низких значениях данного показателя (около 10) волосы обычно непригодны для дальнейших генетических исследований.

При наличии нескольких волос с недостаточным количеством ядер (10—100) эксперт может рассмотреть возможность их объединения в один объект. Следует учитывать, что объединять можно только волосы, отобранные с одного предмета (места) и обязательно имеющие сходные морфологические характеристики. Такой подход в ряде случаев приводил к получению положительного результата. При объединении волос с количеством ядер менее 10, даже если количество волос достигало 7, достаточной концентрации ДНК получено не было. Это подтверждает тот факт, что волосы в достаточно поздней телогеновой фазе роста характеризуются не только малым количеством ядер, но и сильной деградацией ДНК.

Следовательно, объединять в один образец целесообразно морфологически сходные волосы с количеством ядер 10—100, а волосы с количеством ядер менее 10 брать в дальнейшее исследование не следует.

Важно подробнее остановиться на исследовании остатков влагалищных оболочек, которые в отличие от просвечивающихся оболочек выглядят темными в проходящем свете микроскопа (см. рис. 3, в, г, на цв. вклейке). Такие структуры могут встречаться в волосах всех групп, кроме 1-й группы. Это кератинизированные или частично кератинизированные оболочки, которые чаще всего оказываются непригодными для генотипирования яДНК. Изредка в них

могут встречаться участки, где ядра сохранились (см. рис. 3, д, на цв. вклейке), поэтому такие волосы также подлежат обязательному окрашиванию.

На этапе проведения морфологического исследования корневых концов волос можно сразу отобрать пригодные для генотипирования волосы (отнесены к 1-й и 3-й группам) и исключить абсолютно непригодные (5-я группа). Для остальных волос (2-я и 4-я группы) необходимо определение количества ядер, которое оказывается решающим фактором для выбора дальнейшей тактики исследования.

Заключение

По итогам проделанной работы разработан поэтапный алгоритм отбора волос для последующего генотипирования:

I. Установление стадии развития волоса, наличия корневых влагалищных оболочек и остатков эпителиальных тканей. Прогностическое решение может быть вынесено примерно для 50% волос. Для остальных потребуются цитоморфологическое исследование.

II. Цитоморфологическое исследование — окрашивание и подсчет ядер. Окончательное установление целесообразности выделения ДНК из корневого конца данного волоса.

III. Рассмотрение целесообразности объединения нескольких волос в один объект.

В соответствии с этим алгоритмом по результатам морфологического и цитоморфологического исследований определяются целесообразность генотипирования исследуемого волоса.

Таким образом, отработанный подход прогностического скрининга позволяет принять объективное решение о необходимости дальнейшего исследования волоса и тем самым, с одной стороны, значительно снижает объем непродуктивных исследований, а с другой — исключает возможность необоснованного отказа от генотипирования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Harding H, Rogers G. Physiology and growth of human hair. In: Robertson J eds. *Forensic Examination of Hair*. London: Taylor & Francis. 1999;40-46. <https://doi.org/10.1201/9780203483527>
- Linch CA, Smith SL, Prahlow JA. Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. *Journal Forensic Science*. 1998;43(2):305-314. <https://doi.org/10.1520/JFS16137J>
- Kouichi K, Kanako Y, Hideaki M, Hiroaki S, Hajime S. Hair root morphology and STR typing. *Japanese Journal of Forensic Science and Technology*. 2006;11(1):113-124.
- Bourguignon L, Hoste B, Boonen T, Vits K, Hubrecht F. A fluorescent microscopy-screening test for efficient STR-typing of telogen hair roots. *Forensic Science International: Genetics*. 2008;3(1):27-31. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.08.006>
- Edson J, Brooks E, McLaren C, Robertson J, McNeven D, Cooper A, Austin J. A quantitative assessment of a reliable screening technique for the STR analysis of telogen hair roots. *Forensic Science International: Genetics*. 2013;7:180-188. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.10.001>
- Boonen T, Vits K, Hoste B, Hubrecht F. The visualization and quantification of cell nuclei in telogen hair roots by fluorescence microscopy, as a pre-DNA analysis assessment. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2008;1:16-18. <https://doi.org/10.1016/j.fsigs.2007.10.098>
- Roux C, Brooks L, Masaki L, Lennard C, Robertson J. Discrimination of human hairs using color measurements and digital microscopy. Paper presented at: trace evidence symposium. Sidney 2009; August 2-7.
- Lepez T, Vandewoestyne M, Van Hoofstat D, Deforce D. Fast nuclear staining of head hair roots as a screening method for successful STR analysis in forensics. *Forensic Science International: Genetics*. 2014;13:191-194. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.08.003>

Поступила 29.03.18