
Сучасні молекулярно-генетичні методи визначення віку у криміналістиці

Дар'я Федорівна Милостива

Дніпропетровський науково-дослідний інститут судових експертиз, м. Дніпро, Україна

ORCID: 0000-0002-3609-776X

Анна Валентинівна Бабченко

Дніпропетровський науково-дослідний інститут судових експертиз, м. Дніпро, Україна

ORCID: 0000-0002-3491-931X

Анотація: В Україні значну увагу приділяється розвитку сфери інноваційної діяльності, швидкими темпами відбувається науково-технічний розвиток науки і техніки. Насамперед сучасні цифрові та інноваційні технології, їх впровадження і використання стосуються галузі судово-експертної діяльності як додатковий інструментарій і розширення можливостей досліджень різноманітних об'єктів і речових доказів з метою отримання доказової інформації в інтересах розслідування. Зараз ДНК-аналіз використовується не лише в криміналістиці, де цей метод став основним методом ідентифікації людини, а й для встановлення батьківства та інших видів спорідненості, навіть етнічного походження. Судово-експертна діяльність за допомогою ДНК-аналізу допомагає виявити істотні ознаки злочину та створити цілісну доказову базу відносно спорідненості й ідентифікації невпізнаних трупів, походження біологічного сліду від конкретної особи, статевої приналежності біологічного матеріалу тощо. ДНК-інформація особи, на відміну від інших її ознак, що індивідуалізують, не охоплюється повністю поняттям персональних даних, а виходить за межі цього визначення. З молекулою ДНК, крім її індивідуальності, пов'язана й інша її основна властивість – спадковість як засіб передачі. Сучасні методи дослідження ДНК дозволяють отримувати не тільки ідентифікаційну генетичну інформацію про конкретної особи, а й низку значущих відомостей про ознаки його біологічних родичів, які можуть передаватися в спадок. Таким чином, молекула ДНК є не лише носієм індивідуальної інформації про конкретну особу, але й здатна передавати спадкову інформацію про родичів цієї особи. Генетична інформація дозволяє з високою точністю здійснювати ідентифікацію особи людини і, відповідно, має велике практичне значення в питаннях запобігання, розслідування, розкриття злочинів та встановлення осіб, які їх вчинили, дозволяє покращити роботу з розшуку зниклих безвісти та ідентифікації невпізнаних трупів людей тощо.

Ключові слова: генетика, ДНК, мітохондрії, гени, біологічні об'єкти, криміналістична експертиза.

1. Вступ

Одним з етапів ідентифікації особистості в криміналістиці є визначення віку особи. Збільшення віку людини, або старіння, можна уявити як поступовий процес накопичення змін у біомолекулах, наприклад, на рівні ДНК і білків. Аналіз таких змін дає змогу визначати вік живих людей або останків. Оцінка віку може використовуватися для отримання інформації, актуальної при розслідуванні кримінальних справ, при проведенні юридичних та антропологічних досліджень. Крім безпосередньої інформації про вік індивідуума можна передбачити пов'язані з віком фенотипічні ознаки, наприклад, колір волосся або обличчя. Крім того, це важливий фактор для ідентифікації невпізнаних останків (зниклих безвісти, жертв масових заворушень або стихійних лих), а також при проведенні археологічних досліджень.

2.Об'єкт і предмет дослідження

Об'єктом дослідження є необхідність системного підходу до проблематики методів криміналістичних молекулярно-генетичних експертних досліджень, розроблення спеціальної теорії, що систематизує різні аспекти цих питань.

Предмет дослідження –характеристики сучасних методів судової молекулярно-генетичної експертизи визначення віку в криміналістичних впровадженнях.

3. Мета та задачі дослідження

Метою статті є висвітлення обзору сучасних молекулярно-генетичних методів визначення віку на основі аналізу зразків різних біологічних об'єктів у криміналістичній практиці. Визначена мета дослідження зумовила постановку та розв'язання таких задач: проаналізувати огляд основних методів у судовій молекулярно-генетичній експертній практиці.

4. Аналіз літератури

Багато дослідників приділяли увагу удосконалення молекулярно-генетичних методів визначення віку судово-біологічної експертизи. Цим питанням ролі некротичної фауни були присвячені роботи Meng HT [5], які приводять наукові дані щодо молекулярної ідентифікації людського фенотипу Márquez-Ruiz AB, González-Herrera L, Luna JD, Valenzuela A. досліджували роль ДНК метілювання у зубній тканини людини [12], Liu B, Song F, Yang Q, Zhou Y, Shao C, Shen Y, Zhao Z, Tang Q, Hou Y, Xie J. навели характеристику тканинно-специфічних біомаркерів з експресією circRNAs у біологічно значущих рідинах організму [14].

5. Методи досліджень

Стратегія дослідження пояснює особливості актуальності проблематики судової молекулярно-генетичної експертизи визначення віку.

6. Результати досліджень

Традиційно для оцінки віку в судово-медичній експертизі застосовують морфологічні методи дослідження решток (наприклад, оцінка морфологічних особливостей зубів або частин скелета), а також біохімічний метод визначення віку, заснований на ефекті збільшення рацемізації аспарагінової кислоти в дентині при старінні. Помилка під час визначенні віку морфологічними методами становить близько десяти років, а при застосуванні біохімічного методу складає близько трьох років [1]. Однак за відсутності достатньої кількості матеріалу (наприклад на місці злочину) або високого ступеня його деградації застосування перелічених методів є скрутним.

Крім того, не всі типи тканин підходять для проведення аналізу. У таких випадках застосовуються молекулярно-генетичні методи аналізу, які дають змогу використовувати для оцінки віку матеріали людини, що не містять морфологічних ознак віку, а також зразки, що містять дуже малу кількість матеріалу. До них належать зразки крові, сперми, слини та інших біологічних виділень, зокрема в формі висушених мазків і плям; м'які тканини (фрагменти шкіри, епітеліальні клітини слизової оболонки, інші фрагменти м'яких тканин); волосся з волосяними фолікулами; ДНК, що залишилася на сигаретних недопалках і особистих речах, наприклад, на зубній щітці [2]. Основним матеріалом у молекулярно-генетичних дослідженнях є саме ДНК, оскільки вона є відносно стабільною та довгоживучою молекулою і зберігається навіть у переробленому біологічному матеріалі (сухі плями біологічних рідин, перероблені харчові продукти, копроліти, муміфіковані тканини тощо) [3]. Крім того, вона присутня у всіх

біологічних рідинах, що дає змогу проводити аналіз із майже всіх видів біологічних субстратів (слина, фекалії, молоко тощо).

Нарешті, через виродженість генетичного коду та існування довгих некодуючих ділянок, аналіз ДНК може бути більш інформативним, ніж аналіз білків [4]. Основними молекулярно-генетичними методами визначення віку індивідуума, у яких як досліджуваний матеріал використовується ДНК, є: 1) оцінка накопичення мутацій у мітохондріальній ДНК, 2) оцінка довжини теломер, 3) оцінка кількості повторів у ДНК, 4) оцінка експресії генів, 5) оцінка рівнів метилювання ДНК та її окремих випадок – оцінка метилювання рибосомальної ДНК [5].

Оцінка віку за швидкістю накопичення мутацій у мітохондріальній ДНК

Мітохондрії є напівавтономними органелами і мають свій власний геном, який має певні особливості, які роблять його більш стійкішим до стресових впливів навколишнього середовища, ніж ядерний геном. Перш за все геном мітохондрії має кільцеву форму, що робить його менш схильним до деградації нуклеазами. По-друге, він присутній у кожній соматичній клітині у великих кількостях (від 3000 копій мітохондріального геному на клітину і більше), тому в несприятливих умовах мітохондріальна ДНК (мтДНК) зберігається набагато краще, ніж ядерна [6]. Мітохондріальна ДНК людини успадковується по материнській лінії і не піддається рекомбінації, завдяки чому вона може бути використана при передбаченні етнічного походження індивідуума.

У клітині мітохондрії є енергетичними центрами, у яких відбуваються реакції окисного фосфорилування, що супроводжуються вивільненням вільних радикалів. Тому геном мітохондрій постійно перебуває в умовах окислювального стресу, що призводить до активного мутагенезу. Соматичні мутації в мітохондріях можуть накопичуватися з віком, проявляючи тканиноспецифічний малюнок. Накопичення мутацій у мтДНК, у тому числі числі делецій, дуплікацій і точкових мутацій, було виявлено в безлічі тканин під час старіння у людей, мавп і гризунів. У криміналістиці накопичення мутацій у мтДНК здебільшого застосовується для оцінки віку на момент смерті, при цьому застосовується як оцінка накопичення точкових мутацій, так і накопичення мітохондріальних делецій [7].

Мітохондріальний геном містить некодуючу регуляторну ділянку, D-петлю, яка важлива для реплікації важкого ланцюга і транскрипції обох ланцюгів мтДНК. У різних дослідженнях виявлено накопичення точкових мутацій у цій ділянці, зокрема заміни A189G, T408A і T414G, асоційованих зі старінням. Так, під час дослідження мутації A189G у м'язовій тканині осіб у віці 1-97 років було виявлено, що у літніх людей спостерігається вищий відсоток мутацій.

Однак, оскільки накопичення мутацій може сильно варіювати між індивідуумами, а також між тканинами одного індивідуума, застосовність цього методу при оцінці віку в судово-медичній експертизі обмежена. Накопичення дуплікацій у мтДНК також спостерігається зі збільшенням віку. Оскільки даний тип маркерів характеризується нестабільністю між різними індивідуумами, здебільшого він досліджується в контексті асоціацій з різними захворюваннями, насамперед з онкологічними захворюваннями [8], і мало підходить для потреб криміналістики.

Іншим недоліком використання мітохондріальних делецій для визначення віку індивідуумів є їх накопичення через клональну експансію, причому в клітинах в одній і тій самій тканині одного індивідуума може спостерігатися гетерогенність за кількістю делецій. Крім того, у різних індивідуумів на швидкість виникнення делецій можуть впливати стресові фактори: УФ-радіація, іонізуюча радіація, токсичні впливи, а також різні захворювання (гіпоксія/реперфузія, ішемія та термінальна ниркова недостатність).

Таким чином накопичення мутацій у мтДНК є досить грубим маркером при визначенні віку і дає змогу лише розділити зразки за віковими групами, але не оцінити вік індивідуума з рівнем точності, достатнім для завдань криміналістики.

Оцінка віку зразків за довжиною теломер

Хромосоми еукаріотів захищені від деградації та порушень рекомбінації теломерами - спеціалізованими структурами спеціалізованими структурами, розташованими на кінцях

хромосом. Теломери хребетних, у тому числі людини, містять до кількох тисяч повторів послідовності TTAGGG. З кожним поділом клітини довжина теломер зменшується, оскільки ДНК-полімераза не може реплікувати 3'-кінець батьківського ланцюга ДНК за відсутності праймера, а може лише додавати нуклеотиди до наявної 3'-гідроксильної групи. Поступове вкорочення теломер призводить до старіння і, врешті-решт, до загибелі клітин, чого не спостерігається в ракових і стовбурових клітинах, де активний фермент теломераза, що добудовує теломери. Недостатня активність телорази призводить до більш раннього старіння і різних патологій: фіброзу та емфіземи легень, фіброзу і емфіземи легень, гіпоплазії кісткового мозку, цирозу.

Важливою перевагою цього маркера порівняно з маркерами віку, аналізованими за мтДНК, є чутливість, тобто для оцінки довжини теломер немає необхідності в великому обсязі досліджуваного зразка або в якихось певних типах тканин, а достатньо мазка або невеликої плями крові [9].

Для оцінки довжини теломер розроблено кілька методів: аналіз довжин рестрикційних фрагментів теломер (TRF), різні варіанти ПЛР (ПЛР у реальному часі, монохромний ПЛР (ПЛР у реальному часі, монохромна мультиплексна ПЛР у реальному часі - *monochrome multiplex quantitative polymerase chain reaction* (MMqPCR); вимірювання абсолютної довжини теломер - *absolute telomere length PCR* (aTLqPCR).

Також застосовується метод флуоресцентної гібридизації *in situ* (FISH) і різні його варіації (кількісна флуоресцентна гібридизація, *quantitative FISH* – Q-FISH; флуоресцентна гібридизація з проточною цитометрією – *Flow-FISH*; метод аналізу довжини одиночних теломер - *single telomere length analysis* – STELA). Аналіз довжин рестрикційних фрагментів теломер (TRF) є свого роду «золотим стандартом». Цей метод полягає в обробці геномної ДНК сумішшю часто щеплячих ферментів рестрикції, які не впізнають (і не фрагментують) теломерні та субтеломерні послідовності. Потім отримані фрагменти, що містять послідовності теломер усіх хромосом, розділяють за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Фрагменти візуалізують за допомогою Саузерн-блотингу або гібридизації з використанням зонда, специфічного для теломерної ДНК. Однак для успішного застосування цього методу необхідні великі кількості ДНК (кілька мікрограмів) і висока якість ДНК, що не завжди доступно в судово-медичній практиці. Для методів, заснованих на кількісній ПЛР, потрібно менше ДНК, і результати, отримані в різних лабораторіях із застосуванням цього методу, є більш відтворюваними. Оскільки методи із застосуванням флуоресцентної гібридизації використовують специфічні проби, вони дозволяють оцінювати довжину теломер окремих хромосом, застосовні тільки для мітотично-активних клітин. *Flow-FISH*, у якій використовуються пан-теломерні проби, що зв'язуються з усіма теломерами, дає змогу здійснювати високопродуктивний аналіз довжини теломер і широко застосовується для оцінювання їхньої довжини в популяціях гематopoетичних клітин. Однак для цього типу аналізу необхідна високоякісна малодеградована ДНК, і найкращі результати можна отримати при аналізі ізольованих ядер клітин, тому в даний час його застосування обмежене свіжими зразками крові [10, 11].

При оцінці довжини теломер у зразках зубів (91 зразок від 77 індивідумів обох статей у віці від 15 до 85 років) за допомогою ПЛР у реальному часі було з'ясовано, що цей показник варіює навіть у різних типах зубів, при цьому найдовші теломери в молярах.

Середня помилка визначення віку становила 13 років. Тому було зроблено висновок, що визначення віку за довжиною теломер може бути додатковим методом дослідження, який не дає точної оцінки віку, але застосовним у тих випадках, коли для дослідження доступні лише зразки зубів [12].

Загалом можна зазначити, що довжина теломер безпосередньо пов'язана не тільки з віком, а й з рівнем окисного стресу, серцево-судинними захворюваннями, ожирінням, різними формами раку. Також показано зв'язок укорочення теломер із психологічним стресом, хоча різні дослідження по-різному оцінюють значущість цього взаємозв'язку.

Таким чином можна зробити висновок, що довжина теломер скоріше є показником, важливим для медицини, ніж для криміналістики, оскільки цей показник асоційований з різними захворюваннями і варіює як між окремими індивідуумами, так і між різними типами клітин і тканин одного індивідуума.

Оцінка віку за частотою повторів ДНК

Ще однією групою показників, які використовуються в криміналістиці, є повтори в ДНК. Геном людини містить понад три мільярдів пар основ, при цьому кількість генів, що кодують білок, у геномі становить до 1.5%. Решту ДНК довгий час вважали «сміттєвою», однак пізніші дослідження показують, що найчастіше така ДНК, яка не кодує, містить важливі регуляторні області, некодуючі РНК, повтори, транспозони і псевдогени. Частина цієї «некодуючої» ДНК являє собою повторювані послідовності – тандемні повтори (сателіти, міні-мікросателіти), а також довгі та короткі дисперговані повтори. Для оцінки представленості повторів використовують такі підходи, як аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (restriction fragment length polymorphisms (RFLP) і його похідна – ДНК дактилоскопія (DNA fingerprinting), VNTR-аналіз (variable-number tandem repeat analysis), типування коротких повторюваних послідовностей (short tandem repeat, STR) [13].

Аналіз повторів у судово-слідчій практиці насамперед застосовується під час ідентифікації індивідуума, оскільки для будь-якої людини можна знайти таке поєднання повторів, яке буде індивідуальним і відрізнятиме її від будь-якого іншого індивідуума.

Оскільки частота повторів у ДНК зазвичай не змінюється протягом життя індивідуума, вона не інформативна для оцінки віку. Однак аналіз соматичних перебудов підходить для оцінки віку індивідуума і одним із варіантів такого аналізу є кількісне визначення специфічних перебудов рецепторів Т-клітин (δ Rec- ψ Ja signal-joint/T-cell receptor excision circle (sjTREC) genomic DNA, sjTREC) при аналізі зразків крові. У ході розвитку Т-клітин відбувається перебудова генів Т-клітинних рецепторів, що призводить до утворення епісомальних кільцевих молекул ДНК (sjTREC). Було показано, що з віком кількість sjTREC зменшується в результаті процесу інволюції тимуса, що починається вже в перший рік життя людини і прогресує протягом усього життя.

Оцінка віку за аналізом змін експресії генів

Оскільки матрична РНК (мРНК) поза організмом сильно схильна до деградації, довгий час вважалося, що оцінка експресії генів непридатна в криміналістичній практиці. Однією з проблем називали можливість виникнення хибнонегативних результатів через високу швидкість деградації зразків. С іншого боку, низька стабільність мРНК може розглядатися як позитивний фактор, оскільки швидкість деградації мРНК та інших типів РНК може бути використана при розробці методів оцінки віку біологічного матеріалу. Іншим фактором, що обмежує застосовність цього підходу, є тканинна специфічність експресії, внаслідок чого необхідно використовувати тканинспецифічні маркери, а також нормалізувати зразки за їхнім збереженням, оскільки рівень деградації РНК відрізняється в різних тканинах і ця відмінність може призвести до виникнення помилкових результатів. Як маркер нормалізації за збереження можна використовувати транскрипт низькоекспресованого гена, який піддається деградації з тією ж або більшою швидкістю, ніж аналізований ген. Розвиток методів і підходів призвів до того, що на сьогоднішній день оцінка представленості транскриптів за допомогою ПЛР за кінцевою точкою або кількісної ПЛР у реальному часі є поширеними методами, а для збільшення точності та відтворюваності результатів застосовують зважені бальні системи оцінки, багатовимірне шкалювання, використання контролів і стандартів [32].

Оскільки мікроРНК є більш стабільними, ніж мРНК, деякі автори пропонують застосовувати цей клас молекул для ідентифікації різних типів біологічних рідин [14, 15]. Було виявлено маркерні мікроРНК, які дозволяють розрізняти зразки крові, сперми, слини та вагінального секрету [16, 17]. Однак успішних досліджень щодо застосування даного типу РНК для оцінки віку індивідуума при підготовці цього огляду виявлено не було.

У окремому дослідженні для оцінки віку зразків периферичної крові застосовувався метааналіз експресії генів. Загалом було оцінено профілі експресії генів у 14 983 індивідуумів європейського походження. На першому етапі було використано результати шести досліджень, до яких увійшли 7074 зразки крові, проаналізовані із застосуванням різних платформ. До «консенсусного» списку генів, експресія яких була ідентифікована на всіх платформах, увійшло 11908 генів. Після введення поправки на стать, кількість клітин крові та куріння, 2228 з них були асоційовані з віком ($p < 4.2E-6$). На другому етапі було проаналізовано 7909 зразків крові, на яких асоціація з віком підтвердилася для 1497 генів ($p < 2.2E-5$). Результати двох етапів дослідження добре корелювали один з одним ($r = 0.972$). Для того, щоб оцінити можливість поширення результатів дослідження на більшу кількість випадків, автори проаналізували профілі експресії обраних 1497 генів на зразках стародавньої ДНК, зразках ДНК із тканин мозку та в різних типах клітин крові. В американських індіанців ($n = 1457$) спостерігалася експресія 95% із 1497 генів, а 71% (1005 генів) були асоційовані з хронологічним віком ($p < 0.05$). У американців іспанського походження ($n = 1244$) спостерігалася експресія 40% із 1497 генів, а 74% (440 генів) були асоційовані з хронологічним віком ($p < 0.05$). В афроамериканців ($n = 1359$) спостерігалася експресія 99% із 1497 генів, а 27% (440 генів) були асоційовані з хронологічним віком ($p < 0.05$). У проаналізованих зразках тканин мозку (тканини мозочка та лобової кори) спостерігалася експресія 58% генів, з них 19 (163 гени) і 26% (229 генів) відповідно, були асоційовані з хронологічним віком. Серед 50 найбільш асоційованих генів було виявлено три - SERPINE2, LDHB та BZW2, які були асоційовані з віком у всіх проаналізованих тканинах ($p < 0.05$).

Потім дослідники проаналізували вплив змін профілів метилювання на асоціації 1497 генів із віком. Проводили оцінку профілів метилювання 135230 CpG-сайтів у ділянці ± 250 тпн від генів, асоційованих із віком. Аналіз проводили на зразках цільної крові або мононуклеарних клітинах периферичної крові (PBMC) із семи когорт ($n = 3073$). Для 31331 CpG-сайтів було встановлено асоціації метилювання з хронологічним віком, а для 12280 сайтів - асоціації між метилюванням і рівнем експресії розташованих поруч генів ($p < 3.7E-7$). Із 1497 асоційованих із віком генів спостерігалися асоціації для 1248 генів, водночас у ділянці ± 250 тпн спостерігалася слабка збагачення диференційно метильованими CpG, асоційованими з віком (відношення шансів OR = 1.04; 95%-вий довірчий інтервал CI = 1.02-1.06; $P = 7.9E-5$), але при цьому сильне збагачення CpG-сайтами, асоційованими з експресією генів. Дослідники порівняли розроблений ними транскриптомний предиктор віку з двома опублікованими дослідженнями, в яких хронологічний вік визначали за профілями метилювання [39, 40] шляхом аналізу 1396 зразків. Транскриптомний предиктор показував нижчу кореляцію з хронологічним віком, ніж епігенетичні маркери [18].

Таким чином можна зробити висновок, що в даний час підходи, засновані на оцінці профілів метилювання ДНК, є більш перспективними для передбачення хронологічного віку зразків впливати на когнітивні функції.

Уперше зміни рівня метилювання ДНК в онтогенезі були ідентифіковані при аналізі різних тканин ДНК в онтогенезі та під час старіння були ідентифіковані при аналізі різних тканин і життєвих стадій лосося [19]. Пізніше було показано, що вікове глобальне ДНК-гіпометилювання спостерігається в найрізноманітніших видів, включно з щурів, мишей і людину. Однак це правило не є універсальним для всіх генів – наприклад, з віком збільшується рівень метилювання промоторних областей генів-мішеней білків групи Polysomb, так само як і рівень метилювання промоторів ключових генів, пов'язаних з розвитком організму [20].

Поява мікрочипів, розвиток технологій масштабного паралельного секвенування та розширення їх застосування в епігенетиці дало змогу виявити більш специфічні вікові зміни профілів метилювання певних генів або геномних областей. Було виявлено маркери, рівні метилювання яких можуть бути використані для визначення віку індивідуума. Важливим моментом при використанні даних метилювання для передбачення віку індивідуумів є оцінка якості пробопідготовки зразків, а саме – якості бісульфитної конверсії.

В останні роки кількість публікацій, що описують взаємозв'язок профілів метилювання з віком, зростає лавиноподібно. Більшість дослідників використовують аналіз крові індивідуумів, проте трапляються й публікації з результатами аналізу інших біологічних рідин, а також різних типів клітин [21]. Точність деяких моделей для передбачення віку індивідуумів за профілями метилювання вже досягла вищого рівня, ніж при застосуванні вищеописаних методик (оцінки довжини теломер та ін.) і досягає помилки передбачення менше чотирьох років.

Найчастіше під час пошуку інформативних локусів дослідники намагаються знайти гени з профілями метилювання, що змінюються з віком, які мали б біологічні функції, релевантні для процесів старіння (наприклад, беруть участь у процесах репарації, метаболічних каскадах або онкогенезі). Такі спроби не завжди успішні, оскільки хороший маркер не завжди пов'язаний із функцією. Однак спроба пошуку таких інформативних локусів, обґрунтованих біологічною функцією, виявилася досить успішною. Звертає на себе увагу те, що профілі метилювання генів рибосомальної ДНК, які є висококонсервативною областю. Оскільки гени рибосомальної ДНК багаті на повтори, точне збирання і картування цього локуса довгий час були ускладнені, тому не проводилося оцінювання рівнів метилювання та їхніх вікових змін. Однак у більш ранніх дослідженнях розмір і активність ядерця, що є частиною ядра клітини і відповідає за утворення рибосомних субодиниць, механістично вже асоціювали з віком і довголіттям [22].

Для того, щоб оцінити, чи CpG рибосомальної ДНК є достатніми для передбачення віку зразків, дослідники проаналізували 816 локусів із застосуванням регресійної моделі, заснованої на алгоритмі Elastic Net. Кінцева модель включала 736 локусів і передбачала вік із медіанним значенням коефіцієнта Спірмена $\rho = 0.92$ та MAE = 3.15 місяців. Модель із найменшим рівнем MAE була заснована на оцінці статусу 72 CpG, розташованих у рибосомальній ДНК. Потім автори показали, що рівень метилювання рибосомальної ДНК є досить робастним показником, та під впливом генетичних факторів та факторів навколишнього середовища, що впливають на тривалість життя, його зміни добре узгоджуються із віком [23].

Враховуючи високу консервативність аналізованого локусу, припускалось можливість екстраполяції результатів, отриманих на *Mus musculus* на інші види (*Homo sapiens* та *Canis lupulus*). Для створення математичних моделей були використані CpG миші, які мали гомологи в геномах собаки та людини. При аналізі гомологічних CpG (88 локусів) отримано медіанне значення коефіцієнта Спірмена $\rho = 0.48$. Повногеномний аналіз гомологічних локусів показав нижчий результат ($\rho = 0.22$). Коли модель, розроблена при дослідженні препаратів ДНК із зразків крові та тканин миші, була використана з метою оцінки зразків людини (зразки шкіри шести дорослих індивідуумів), було отримано досить висока кореляція показників віку ($\rho = 0.79$, $P = 0.0041$). Отримані результати дозволили авторам говорити про застосовність розробленого ними методу для дослідження інших об'єктів [24].

За останні роки з'явилося велике кількість досліджень, присвячених пошуку універсальний старіння маркерів. На сьогоднішній день найбільш точними та робастними в умовах обмеженої кількості вихідного матеріалу є методи, що ґрунтуються на оцінці профілів метилювання в різних тканинах, в той час, як методи транскриптоміки та метаболоміки є менш точними, а оцінка довжини теломер сильно варіює між індивідуумами та окремими тканинами.

Ймовірно, у найближчому майбутньому розвиток технологій передбачення віку йтиме в двох напрямках: частина дослідників зосередяться на аналізі максимальної кількості точок та на об'єднанні результатів проведених досліджень у великі метааналізи із застосуванням нових математичних моделей, інша частина зосередить свою увагу на зменшенні вартості та зниженні тимчасових витрат на аналіз, що може бути досягнуто вибором невеликого консенсусного набору локусів і включенням в аналіз більшої кількості сайтів CpG з одного і того ж локусу. Дослідження профілів метилювання при різних захворюваннях, у тому числі асоційованих з більш раннім старінням окремих тканин і всього організму, також можуть

зробити свій внесок у розвиток технології та розробку нових, більш точних методів передбачення віку на основі оцінки профілів метилювання.

7. Перспективи подальшого розвитку досліджень

Подальшими дослідженнями будуть удосконалення методів молекулярно-генетичних досліджень в області криміналістичних експертиз.

Список літератури:

- 1) Wochna K, Bonikowski R, Śmigielski J, Berent J. Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample. *Forensic Sci Med Pathol*. 2018;14(3):285-294. doi: 10.1007/s12024-018-9984-8.
- 2) Dumache R, Ciocan V, Muresan C, Enache A. Molecular DNA Analysis in Forensic Identification. *Clin Lab*. 2016;62(1-2):245-8. doi: 10.7754/clin.lab.2015.150414.
- 3) Bictash M, Ebbels TM, Chan Q, Loo RL, Yap IK, Brown IJ, de Iorio M, Daviglus ML, Holmes E, Stamler J, Nicholson JK, Elliott P. Opening up the "Black Box": metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology. *J Clin Epidemiol*. 2010;63(9):970-9. doi: 10.1016/j.jclinepi.2009.10.001.
- 4) Hu Z, Zhang SH, Wang Z, Bian YN, Li CT. Progress of DNA-based Methods for Species Identification. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2015;31(2):129-31.
- 5) Meng HT, Lan Q, Zhu BF. DNA Molecular Identification of Human Phenotypic Characteristics-New Progress Over the Past Five Years. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2019;35(5):512-518. English, Chinese. doi: 10.12116/j.issn.1004-5619.2019.05.002.
- 6) Becker J, Mahlke NS, Reckert A, Eickhoff SB, Ritz-Timme S. Age estimation based on different molecular clocks in several tissues and a multivariate approach: an explorative study. *Int J Legal Med*. 2020;134(2):721-733. doi: 10.1007/s00414-019-02054-9.
- 7) Kayser M, Branicki W, Parson W, Phillips C. Recent advances in Forensic DNA Phenotyping of appearance, ancestry and age. *Forensic Sci Int Genet*. 2023;65:102870. doi: 10.1016/j.fsigen.2023.102870.
- 8) Zapico SC, Ubelaker DH. mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. *Aging Dis*. 2013;4(6):364-80. doi: 10.14336/AD.2013.0400364.
- 9) de Punder K, Heim C, Wadhwa PD, Entringer S. Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;101:87-100. doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.019.
- 10) Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*. 2010;75(13):1563-83. doi: 10.1134/s0006297910130055.
- 11) Harada M, Hu B, Lu J, Wang J, Rinke AE, Wu Z, Liu T, Phan SH. The dual distinct role of telomerase in repression of senescence and myofibroblast differentiation. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(13):16957-16973. doi: 10.18632/aging.203246.
- 12) Márquez-Ruiz AB, González-Herrera L, Luna JD, Valenzuela A. DNA methylation levels and telomere length in human teeth: usefulness for age estimation. *Int J Legal Med*. 2020;134(2):451-459. doi: 10.1007/s00414-019-02242-7.
- 13) Keerti A, Ninave S. DNA Fingerprinting: Use of Autosomal Short Tandem Repeats in Forensic DNA Typing. *Cureus*. 2022;14(10):e30210. doi: 10.7759/cureus.30210.
- 14) Liu B, Song F, Yang Q, Zhou Y, Shao C, Shen Y, Zhao Z, Tang Q, Hou Y, Xie J. Characterization of tissue-specific biomarkers with the expression of circRNAs in forensically relevant body fluids. *Int J Legal Med*. 2019;133(5):1321-1331. doi: 10.1007/s00414-019-02027-y.
- 15) Lindenbergh A, van den Berge M, Oostra RJ, Cleypool C, Bruggink A, Kloosterman A, Sijen T. Development of a mRNA profiling multiplex for the inference of organ tissues. *Int J Legal Med*. 2013;127(5):891-900. doi: 10.1007/s00414-013-0895-7.

- 16) 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.
- 17) Sauer E, Reinke AK, Courts C. Differentiation of five body fluids from forensic samples by expression analysis of four microRNAs using quantitative PCR. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;22:89-99. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.01.018.
- 18) Peters MJ, Joehanes R, Pilling LC, Schurmann C, Conneely KN, Powell J, Reinmaa E, Sutphin GL, Zhernakova A, Schramm K, Wilson YA, Kobes S, Tukiainen T; NABEC/UKBEC Consortium; Ramos YF, Göring HH, Fornage M, Liu Y, Gharib SA, Stranger BE, De Jager PL, Aviv A, Levy D, Murabito JM, Munson PJ, Huan T, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, van Rooij J, Stolk L, Broer L, Verbiest MM, Jhamai M, Arp P, Metspalu A, Tserel L, Milani L, Samani NJ, Peterson P, Kasela S, Codd V, Peters A, Ward-Caviness CK, Herder C, Waldenberger M, Roden M, Singmann P, Zeilinger S, Illig T, Homuth G, Grabe HJ, Völzke H, Steil L, Kocher T, Murray A, Melzer D, Yaghootkar H, Bandinelli S, Moses EK, Kent JW, Curran JE, Johnson MP, Williams-Blangero S, Westra HJ, McRae AF, Smith JA, Kardina SL, Hovatta I, Perola M, Ripatti S, Salomaa V, Henders AK, Martin NG, Smith AK, Mehta D, Binder EB, Nylocks KM, Kennedy EM, Klengel T, Ding J, Suchy-Dicey AM, Enquobahrie DA, Brody J, Rotter JI, Chen YD, Houwing-Duistermaat J, Kloppenburg M, Slagboom PE, Helmer Q, den Hollander W, Bean S, Raj T, Bakhshi N, Wang QP, Oyston LJ, Psaty BM, Tracy RP, Montgomery GW, Turner ST, Blangero J, Meulenbelt I, Ressler KJ, Yang J, Franke L, Kettunen J, Visscher PM, Neely GG, Korstanje R, Hanson RL, Prokisch H, Ferrucci L, Esko T, Teumer A, van Meurs JB, Johnson AD. The transcriptional landscape of age in human peripheral blood. *Nat Commun.* 2015;6:8570. doi: 10.1038/ncomms9570.
- 19) Jung SE, Shin KJ, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Rep.* 2017;50(11):546-553. doi: 10.5483/bmbrep.2017.50.11.175.
- 20) Mozhu K, Pandey AK. Conserved effect of aging on DNA methylation and association with EZH2 polycomb protein in mice and humans. *Mech Ageing Dev.* 2017;162:27-37. doi: 10.1016/j.mad.2017.02.006.
- 21) Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu MV. Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. *Forensic Sci Rev.* 2017;29(2):121-144.
- 22) Vidak S, Foisner R. Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochem Cell Biol.* 2016;145(4):401-17. doi: 10.1007/s00418-016-1411-1.
- 23) Stubbs TM, Bonder MJ, Stark AK, Krueger F; BI Ageing Clock Team; von Meyenn F, Stegle O, Reik W. Multi-tissue DNA methylation age predictor in mouse. *Genome Biol.* 2017;18(1):68. doi: 10.1186/s13059-017-1203-5.
- 24) Wang M, Lemos B. Ribosomal DNA harbors an evolutionarily conserved clock of biological aging. *Genome Res.* 2019;29(3):325-333. doi: 10.1101/gr.241745.118.

Modern molecular genetic methods of age determination in forensic science

Daria Mylostiva

Dnipropetrovsk Research Institute of Forensic Expertise, Dnipro, Ukraine
ORCID: 0000-0002-3609-776X

Anna Babchenko

Dnipropetrovsk Research Institute of Forensic Expertise, Dnipro, Ukraine
ORCID: 0000-0002-3491-931X

Abstract: In Ukraine, considerable attention is paid to the development of innovation, and scientific and technological development is taking place at a rapid pace. First of all, modern digital and innovative technologies, their implementation and use relate to the field of forensic science as an additional tool and expansion of the possibilities of researching various objects and material evidence

in order to obtain evidentiary information in the interests of the investigation. Today, DNA analysis is used not only in forensic science, where it has become the main method of human identification, but also to establish paternity and other types of kinship, even ethnicity. Forensic activities using DNA analysis help to identify essential signs of a crime and create a comprehensive evidence base regarding the relationship and identification of unidentified corpses, the origin of a biological trace from a particular person, the sex of biological material, etc. DNA information of a person, unlike other individualizing features, is not fully covered by the concept of personal data, but goes beyond this definition. In addition to its individuality, the DNA molecule is associated with its other main property - heredity as a means of transmission. Modern methods of DNA research allow obtaining not only identifying genetic information about a particular individual, but also a number of significant information about the characteristics of his or her biological relatives that can be inherited. Thus, the DNA molecule is not only a carrier of individual information about a particular person, but is also capable of transmitting hereditary information about the relatives of that person. Genetic information allows for high accuracy in the identification of a person and, accordingly, is of great practical importance in the prevention, investigation, detection of crimes and identification of the perpetrators, improves the search for missing persons and identification of unidentified corpses.

Keywords: genetics, DNA, mitochondria, genes, biological objects, forensic examination.
