

Biologia w sądzie

Niewątpliwie to biologia jest nauką przyszłości. Wiedza dotycząca struktury i funkcji genomów (szczególnie genomu człowieka) jest coraz dokładniejsza, a rozwój technik biologii molekularnej i zaawansowanie technologiczne coraz bardziej imponujące. Pozwala to dziedzinom, które często można uznać za niszowe, posunąć się krok dalej, znajdując zastosowanie nie tylko w multidyscyplinarnej biotechnologii czy medycynie. Biologia zawojowała kryminalistykę i sądownictwo!

Joanna Stojak

Analizy przeprowadzone przez biologa specjalistę, podsumowane opinią pisemną lub ustną, stanowią znaczący dowód w procesie sądowym. Obecnie analizy te dotyczą nie tylko podstawowych badań materiału genetycznego (z tkanek, wydzielin, płynów ustrojowych) ujawnionego na miejscu zdarzenia – biologia może przyczynić się także do określenia czasu, miejsca, a nawet przyczyny zgonu. Mimo iż oszacowanie tych informacji oparte jest na prawdopodobieństwie, nierzadko to właśnie ekspertyzy biegłych biologów specjalistów stają się kluczowym dowodem w postępowaniu sądowym.

Genetyka molekularna na służbie

Analizę DNA przeprowadza się, by porównując materiał dowodowy (znaleziony na miejscu popełnienia przestępstwa) z materiałem pobranym od osoby zatrzymanej, potwierdzić jej winę lub wykluczyć jako sprawcę. Porównanie to obejmuje: określenie rodzaju śladu, określenie przynależności gatunkowej, izolację DNA, oznaczenie ilości DNA i badanie jego polimorfizmu.

Aby przez nieodpowiednie traktowanie nie zniszczyć śladu zabezpieczonego na miejscu zdarzenia, niezbędne jest dokładne ustalenie jego rodzaju i dalszego z nim postępowania. Ważne jest także sprawdzenie jego pochodzenia gatunkowego – musimy być pewni, że należy on do człowieka. Dopiero wtedy można przystąpić do izolacji DNA, po której należy sprawdzić czystość oraz jakość otrzymanego produktu.

Najczęściej wykorzystuje się w tym celu spektrofotometrię typu NanoDrop. Ścisłe współpracują one z komputerem, na którego ekranie od razu wyświetlane są wyniki z pomiaru absorbancji odpowiednio dla długości fali 260 nm (stężenie DNA w próbce) i 280 nm (stężenie białka w próbce). Ich stosunek (A_{260}/A_{280}) określa stopień kontaminacji białkiem DNA otrzymanego po izolacji (optymalny wynik obejmuje wartości poniżej 1,8).

Izolacja DNA jest zatem najbardziej istotnym etapem w całej procedurze – od niego zależy, czy wyniki technik użytych do badania polimorfizmu będą poprawne.

Pierwszą techniką zastosowaną w medycynie sądowej do analizy DNA było badanie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP) z użyciem technik hybrydizacyjnych. Umożliwiały one identyfikację określonych sekwencji kwasów nukleinowych w badanym materiale genetycznym. W tym celu wykorzystywano zdolność wyznakowanych izotopowo sond hybrydizacyjnych, czyli określonych cząsteczek DNA, do wiązania z homologicznymi sekwencjami obecnymi w badanym materiale. Obecnie techniki te prawie całkowicie zostały zastąpione przez łańcuchową reakcję polimerazy (PCR), której odkrycie otworzyło ogromne możliwości przed hemogenetyką sądową.

Trwałość DNA jest raczej skąpa i mimo optymistycznych wiadomości o udanej izolacji DNA z ponad 2000-letniej mumii wiadomo, że złożony proces rozkładu zachodzący po śmierci zmienia DNA dena-

ta nieodwracalnie i nie ma metod, które mogłyby temu zapobiec. Ilość materiału niezbędna do przeprowadzenia reakcji PCR może być zredukowana nawet do ilości śladowych (np. 10 μ l spermy), a co ważne – nie musi on być świeży i może pochodzić nawet ze szczątków. Reakcja ta, odzwierciedlając naturalny proces replikacji DNA, umożliwia w warunkach *in vitro* szybkie powielanie jego wybranych odcinków. Czułość metody jest zarówno zaletą, jak i wadą. Z jednej strony umożliwia to amplifikację niewielkiej ilości materiału, z drugiej jednak podczas przygotowywania reakcji należy wykazać się niezwykłą precyzją i czystością, bo nawet śladowe zanieczyszczenia będą zaamplifikowane wraz z analizowaną matrycą, co prowadzi do uzyskania fałszywych wyników.

W przypadku, gdy materiał badawczy wykazuje zdegradowany DNA i DNA jądrowy nie występuje w dostatecznej ilości do przeprowadzenia analiz mikrosatelitarnych, można wykorzystać zmienność genomu mitochondrialnego. Dzięki specyficznej replikacji mitochondrialny DNA (mtDNA) cechuje się dużą zmiennością, a do tego jest łatwo dostępny. Jeden włos z pochewką korzenia zawiera 7 tys. kopii jądrowego DNA i aż tysiąc razy więcej (7 mln) kopii mtDNA, a z 1 cm trzonu włosa można otrzymać wyłącznie mitochondrialny DNA (600 tys. kopii).

Pojedyncze ludzkie mitochondrium zawiera 4–10 kolistych cząsteczek DNA o długości 16569 par zasad. Każda z nich koduje 37 genów, z których 13 koduje białka, 22 kodują transferowe RNA (tRNA),

a dwa ostatnie – rybosomalne RNA (rRNA). Białka kodowane przez mtDNA to część mitochondrialnych białek łańcucha oddechowego, jednak większość białek wchodzących w jego skład jest kodowana przez genom jądrowy. Kod genetyczny mitochondriów różni się od kodu genetycznego w genomie jądrowym. UGA (jądrowy kodon STOP) w mitochondriach oznacza tryptofan, AUA (izoleucyna) – metioninę, a AGA i AGG (arginina) są mitochondrialnymi kodonami STOP. Geny mitochondrialne ludzi nie zawierają intronów.

Kolista sekwencja mtDNA jest mniej podatna na degradację niż jądrowy DNA. Co więcej, liczne mutacje akumulowane są w nim znacznie częściej. Wynika to prawdopodobnie z mniejszej wydajności mitochondrialnego systemu naprawy DNA, a także z częstszej replikacji zmutowanych cząsteczek mtDNA (krótsze cząsteczki powstałe w wyniku dużych delecji powielają się szybciej niż cząsteczki o wielkości prawidłowej). Ponadto oddziaływanie wolnych rodników powstających w procesie fosforylacji oksydacyjnej jest także czynnikiem sprzyjającym mutacjom.

Wynikiem mutacji jest m.in. wysoka zmienność sekwencji w regionie „kontrolnym” (ang. *control region*), nazywanym także „D-loop” (ang. *displacement loop*, pętla D). Region ten jest położony między genami tRNA proliny i tRNA fenyloalaniny oraz zawiera m.in. promotory transkrypcji łańcucha ciężkiego H (ang. *heavy*), bogatego w puryny, i lekkiego L (ang. *light*), bogatego w pirymidyny. Mimo ważnych funkcji pętla D wydaje się najszybciej ewoluującą częścią mtDNA.

Analiza mtDNA okazuje się przydatna w badaniu materiałów z ekshumacji lub katastrof i chętnie stosuje się ją w badaniach kryminalno-sądowych. Jedyną jego wadą jest sposób dziedziczenia – przekazywany jest wyłącznie od matki, dlatego w ustalaniu ojcostwa nie może być pomocny. W innych przypadkach spisuje się

Ramka 1. Entomotoksykologia i chromatografia

Entomotoksykologia umożliwia ocenę zawartości narkotyków lub innych substancji toksycznych w ciele denata, a tym samym bardzo często ustalenie przyczyny oraz czasu zgonu (niektóre używki zmieniają szybkość rozwoju larw). Identyfikację substancji przeprowadza się z wykorzystaniem **chromatografii**. Każda technika chromatograficzna zakłada początkowy rozdział badanej mieszaniny (w tym przypadku rozdrobionej masy larw), będący wynikiem przepuszczenia go przez fazę rozdzielczą (tzw. złożę) oddziałującą z analizowaną mieszaniną. Niektóre składniki wiążą się z fazą rozdzielczą na dłużej, inne na krócej, stąd przemycanie takiego złoża odpowiednim eluentem umożliwia ich nierównomierne odłączanie i separację. Wyróżnić można kilka technik chromatograficznych:

- chromatografia cieczowa, w której eluentem jest ciekły rozpuszczalnik (lub mieszanina kilku rozpuszczalników);
- chromatografia gazowa, w której eluentem jest gaz (hel, wodór, azot);
- chromatografia kolumnowa, w której fazę rozdzielczą umieszczono w kolumnie, np. cieczowa chromatografia kolumnowa HPLC (ang. *high pressure liquid chromatography*), w której eluent oddziałuje na złożę pod wysokim ciśnieniem, lub chromatografia żelowa GPC (ang. *gel permeation chromatography*), w której mieszanina rozdzielana jest na żelu/sitach molekularnych;
- chromatografia powinowactwa wykorzystująca zdolność odpowiednio dobranej fazy rozdzielczej do zróżnicowanego stopnia powinowactwa do rozdzielanych substancji;
- chromatografia jonowymienna wykorzystująca oddziaływanie jonowe, powstające pomiędzy złożem a substancjami zawartymi w mieszaninie;
- chromatografia bibułowa, w której fazę rozdzielczą stanowi bibuła filtracyjna;
- chromatografia cienkowarstwowa (ang. *thin layer chromatography*, TLC), w której cienka warstwa fazy rozdzielczej zostaje usztywniona na płytce, na którą nanoszona jest próbka mieszaniny – przepływ i rozdział są wynikiem oddziaływania sił kapilarnych, pola elektrycznego lub grawitacji.

doskonale, umożliwiając dokładne prześledzenie dziedziczenia po linii matczynej (tym bardziej że w zakresie struktury mtDNA nie zachodzi rekombinacja). Należy jednak zauważyć, że analiza na podstawie sekwencji mtDNA jest na ogół analizą typu wykluczenia. Za jej pomocą można wykluczyć czyjaś obecność na miejscu zbrodni, ale nie można jej potwierdzić.

Badania mtDNA, np. w szczątkach pomordowanych członków rodziny cara Rosji i żyjących krewnych tego rodu, potwierdziły ich podobieństwo i pochodzenie fragmentów kości. Wiadomo jednak, że segregacja mitochondriów jest losowa, a zatem mogą wystąpić istotne zmiany w sekwencji mtDNA

między pokoleniami w linii matczynej. Stwierdzenie identycznej heteroplazmii u osobników nie jest jednoznaczne ze stwierdzeniem ich pokrewieństwa. Heteroplazmia, która miała być charakterystyczna tylko dla rodziny Romanowów, została znaleziona także w jednym ze szczepów Indian amerykańskich!

Duża zmienność polimorfizmu mtDNA między osobnikami niespokrewnionymi daje szansę na różnicowanie pochodzenia śladów biologicznych lub ich osobniczą indywidualizację. Jednak ze względu na heteroplazmię oraz małą bazę danych populacyjnych analiza danych statystycznych okazuje się znacznie utrudniona i wnioski z badań są często niejednoznaczne.

Co widziała mucha?

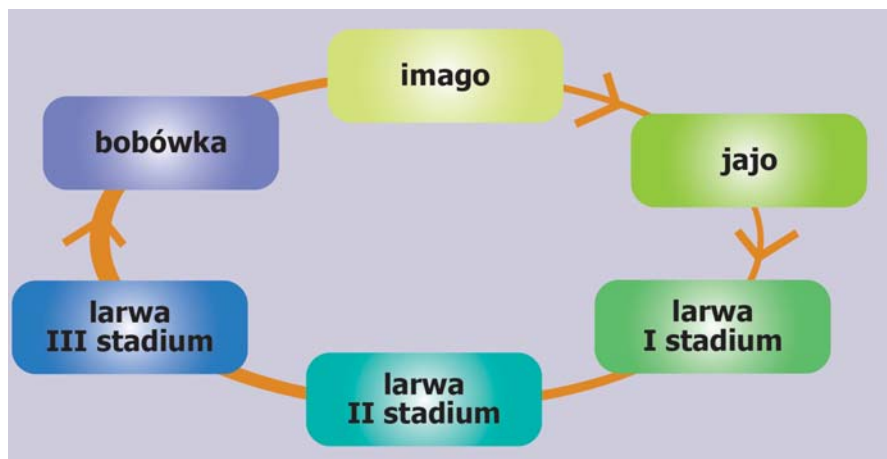
Proces rozkładu, który zaczyna się w chwili śmierci i trwa aż do całkowitego zeszkieletowania, jest procesem złożonym i nieodwracalnym, przeprowadzanym przez wiele drobnoustrojów i zwierząt. Zdawać by się mogło zatem, że każda chwila niszczy dowody pozostawione na miejscu zbrodni, uniemożliwiając rozwiązanie zagadki.

Nic bardziej błędnego! Po upływie 72 godzin od zgonu, gdy biegły patomorfolog sądowy może mieć trudności w oszacowaniu czasu zgonu, do głosu dochodzą entomolodzy sądowi.

Entomologia sądowa jest nauką wykorzystującą biologię i ekologię owadów nekrofilnych (bytujących na zwłokach) do uzyskania informacji o czasie, przyczynie (**ramka 1**), a nawet miejscu zgonu.

Aby oszacować czas, który upłynął od momentu śmierci do momentu ujawnienia zwłok (ang. *postmortem interval*, PMI), entomologia wykorzystuje dwie metody. Analiza prawidłowości rozwoju owadów nekrofilnych (**rys. 1**) umożliwia określenie PMI poprzez ustalenie wieku najstarszych form rozwojowych ujawnionych na zwłokach. W tej metodzie istotne okazują się trzy cechy: stadium rozwoju, długość i waga ciała larwy.

Najważniejszym czynnikiem wpływającym na rozwój larw jest temperatura, której spadek poniżej określonej wartości (u muchówek jest to 10°C) może zatrzymać rozwój całkowicie, a której wzrost z kolei przyspiesza cały proces. Druga metoda opiera się na analizie prawidłowości sukcesji owadów na zwłokach. Proces sukcesji przebiega zawsze według podobnych wzorców (gatunki mogą pojawiać się losowo lub następować po sobie regularnie), powtarzając się w podobnym tempie. Prowadzone liczne doświadczenia mają na celu dokładną analizę powtarzalności kolejności i czasu pojawiania się oraz długości przebywania określonych gatunków owadów na zwłokach w różnych środowiskach i warunkach klimatycznych, wyko-



Rys. 1. Cykl rozwojowy muchówek (przeobrażenie zupełne)



Fot 1. *Sarcophaga* sp.



Fot 2. *Oiceoptoma thoracicum*



Fot 3. *Tanatophilus sinuatus*

rzystywanych do tworzenia modeli prawidłowości sukcesji.

W entomologii sądowej niezwykle istotne są m.in. sposób ekspozycji ciała (i tym samym jego dostępność dla owadów) oraz jego waga, wilgotność powietrza, fotoperiod czy siła wiatru. Istotne są również obrażenia, jakich doznał denat (im więcej ran, tym więcej możliwości złożenia jaj przez muchówki), oraz substancje czynne znajdujące się w jego organizmie (użytki takie jak kokaina mogą przyspieszać rozwój form preimaginalnych).

W początkowych stadiach rozkładu zwłoki zasiedlane są głównie przez przedstawicieli muchówek (*Diptera*), jednak w późniejszych stadiach rozkładu znacznie przeważają chrząszcze (*Coleoptera*). Niektóre z nich (*Necrodes littoralis*) potrafią nawet całkowicie samodzielnie przeprowadzić rozkład zwłok w warunkach niesprzyjających rozwojowi much (np. zbyt niska temperatura).

Biografia wyczytana z kości

Jak wspomniano wyżej, proces rozkładu zwłok dobiega końca wraz z całkowitym zeszkieletowaniem. W tym momencie zastosowanie znajduje antropologia sądowa. Nauka ta pomaga ustalić (zidentyfikować) lub potwierdzić (zweryfikować) tożsamość ofiary bądź podejrzanego. Analiza materiału szkieletowego umożliwia „przywrócenie” zmarłego do życia, ustalając wiek i płeć ofiary czy określając przeżyciową masę i wyso-

kość ciała. Do najbardziej spektakularnych możliwości antropologii sądowej niewątpliwie można zaliczyć rekonstrukcję twarzy.

Analiza zmian powstałych na kościach pozwala określić ich przyczynę oraz przybliżony czas powstania (przeżyciowo, pośmiertnie), a także jak długo szkielet zalegał w miejscu ujawnienia. Umożliwia to tym samym oszacowanie przyczyny i czasu śmierci.

Metody antropologii fizycznej umożliwiają również dokonanie analiz dotyczących osób żywych (tzw. biometria). Wbrew pozorom człowieka można zidentyfikować nie tylko na podstawie odcisków palców i karty dentystycznej. Biometria, określając np. charakter pisma, sposób chodu, brzmienie głosu czy nawet zapach, prezentuje precyzyjny obraz ofiary lub przestępcy, tak niezbędny w kryminalistyce (por. **ramka 2**).

Przeminęło z wiatrem?

Stosunkowo niedawno znalazła w kryminalistyce zastosowanie aeropalinologia analizująca metody uwalniania, rozprzestrzeniania i dyspozycji ziaren pyłku oraz zarodków roślin, a także ich trwałość i zasięg występowania w zależności od budowy i gatunku. Poznanie dokładnej, unikatowej dla każdego gatunku budowy ziaren pyłku wymaga niezwykle cierpliwości i precyzji, ostatecznie umożliwiając

Ramka 2. Informacje uzyskiwane z badań biometrycznych

Cechy behawioralne	Cechy fizyczne
Sposób chodzenia	Tęcza oka
Podpis odręczny	Linie papilarne
Głos	Układ naczyń krwionośnych dłoni
Fala P300 (reakcja mózgu powstająca w czasie 300 ms od bodźca, charakterystyczna dla każdego człowieka)	Kształt dłoni, ucha
	Rozkład temperatury twarzy
	Kształt i rozmieszczenie zębów
	Zapach

przyporządkowanie analizowanej cząsteczki do jednej, konkretnej rośliny. Palinologia sądowa analizuje niepewtarzalność kształtu, wielkości czy struktury ściany komórkowej ziaren pyłku zebranych z miejsca zdarzenia, włók czy dowodów rzeczowych. Umożliwia to powiązanie podejrzanego z miejscem zdarzenia lub zabezpieczonym dowodem rzeczowym, ustalenie miejsca, w którym przebywała ofiara przed śmiercią, lub określenie charakteru miejsca zbrodni, a tym samym oszacowanie czasu i miejsca zgonu. Palinologia sądowa potrafi zatem zawęzić grupę podejrzanych, a także obalić lub potwierdzić alibi podejrzanego.

Wścig zbrojeń

Nauki biologiczne nie tylko pomogą w oszacowaniu czasu, miejsca i przyczyny zgonu. Sprawdzają się również w przypadku ataków terrorystycznych (broń biologiczna), zatruc pokarmowych, ska-

żeń środowiska czy wyjaśnieniu nagłych zgonów, gdy patomorfologia i histopatologia są bezsilne. Ustalaniem źródła zakażenia lub rozprzestrzeniania się groźnych patogenów, a nawet identyfikacją podejrzanego po specyficznej florze bakteryjnej skóry zajmują się mikrobiologia i wirusologia sądowa.

Należy podkreślić, że nie wymieniono tutaj wszystkich wykorzystywanych w naukach sądowych dziedzin biologii, określanych razem mianem biologii kryminalistycznej. Kryminalistyka niewątpliwie potrzebuje coraz to nowych, skutecznych rozwiązań, aby móc podjąć wyzwanie rzucone przez wciąż rosnącą przestępczość. Konkurencja jest ostra, a uzyskanie odpowiedzi jak najbardziej prawdopodobnych oraz wiarygodne odtworzenie scenariusza dokonanej zbrodni stanowią w każdym śledztwie priorytet.

mgr Joanna Stojak

Instytut Biologii Ssaków PAN w Białowieży

WARUNKI PRENUMERATY „BIOLOGII W SZKOLE” NA 2013 ROK

Prenumerata roczna – 117 zł, półroczna – 58,50 zł

I. PRENUMERATA ZA POŚREDNICTWEM WYDAWCY

Zamawiając roczną prenumeratę za pośrednictwem Wydawcy, otrzymujecie Państwo **rabat w wysokości 5% od ceny czasopisma**.

Prenumeratę za pośrednictwem Wydawcy można zamówić:

- **przez Internet**, zakładka „Prenumerata” na stronie www.edupress.pl; ■ **e-mail**: prenumerata@raabe.com.pl;
- **telefonicznie**, pod numerem (22) 244 84 78; ■ **faksem**, z dopiskiem „Prenumerata”, fax: (22) 244 84 10;
- **listownie**, pod adresem: Dr Josef Raabe Spółka Wydawnicza Sp. z o.o. Wola Plaza, ul. Młynarska 8/12, 01-194 Warszawa

II. PRENUMERATA DOSTARCZANA PRZEZ FIRMY KOLPORTERSKIE:

1. RUCH SA – www.prenumerata.ruch.com.pl, tel. 801 800 803 lub (22) 717 59 59, e-mail: prenumerata@ruch.com.pl
2. GARMOND PRESS – www.garmondpress.pl
3. KOLPORTER S.A. – www.kolporter.com.pl
4. POCZTA POLSKA – www.poczta-polska.pl, tel. 801 333 444 lub w urzędach pocztowych

III. PRENUMERATA ZAMAWIANA PRZEZ INTERNET – www.kiosk24.pl Katalog Edukacja, Oświata.

IV. SPRZEDAŻ NUMERÓW ARCHIWALNYCH z lat 2009–2012 w wersji elektronicznej i egzemplarzy drukowanych z lat 2011 i 2012 (po potwierdzeniu u Wydawcy) pod adresem – prenumerata@raabe.com.pl



Zamów prenumeratę przez Internet edupress.pl kiosk24.pl raabe.com.pl