

Marta Bykas-Strekowska

WDROŻENIE INNOWACYJNYCH TECHNOLOGII DO POLSKIEJ PRAKTYKI BADAŃ DNA

Implementation of innovative technology into Polish practice of DNA testing

Profil działalności Biura Badań Kryminalistycznych ABW oraz konkretne zapotrzebowania z zakresu badań DNA formułowane przez zleceniodawców usług kryminalistycznych wymusiły kierunek rozwoju naukowego w dziedzinie biologii kryminalistycznej, umożliwiającą identyfikację śladów biologicznych, pozostawionych przez kilku sprawców w aspekcie ukierunkowania na ich cechy osobnicze. Chociaż powszechnie uznaje się, że badania DNA są dzisiaj wiodącą dziedziną kryminalistyki, jednak dotychczas znane techniki badawcze w biologii kryminalistycznej nie pozwalały zidentyfikować człowieka na podstawie pojedynczych komórek ludzkich obecnych w śladzie kryminalistycznym.

Kryminalistyka nie znała również metod rozdzielania mieszaniny materiału biologicznego, stanowiącego ślad dowodowy, np. w postaci zaschniętych plam mieszanej krwi ofiary przestępstwa oraz sprawcy. Rozdział mieszanin pochodzących od więcej niż dwóch osób nie był możliwy nawet w przypadku znacznej ilości zabezpieczonego materiału biologicznego.

Innym poważnym problemem, który miał także wymiar dowodowy, była trudność uzyskania profili DNA ze śladów kontaktowych (np. komórki naskórka, obecne w substancji potowo-tłuszczowej) pozostawionych na podłożach: papierowych, szklanych, metalowych, dotykowych urządzeń elektronicznych.

Od wielu lat wysiłki naukowców skierowane były na poszukiwanie systemów pozwalających wyizolować z preparatu lub ze śladów biologicznych pojedyncze komórki bądź ich grupy do dalszych analiz w wielu dziedzinach, a w szczególności w badaniach wykorzystujących techniki biologii molekularnej, do których bez wątpienia zalicza się kryminalistyka.

Ostatnie lata w biologii kryminalistycznej zaowocowały wdrożeniem nowoczesnej techniki mikroskopowej, tzw. mikrodysekcji laserowej, umożliwiającej precyzyjne cięcie – pozyskanie materiału w postaci pojedynczych komórek do badań molekularnych przed właściwą analizą DNA¹.

¹ D. Di Martino, G. Giuffrè, N. Staiti, A. Simone, P. Todaro, L. Saravo, *Laser microdissection and DNA typing of cells from single hair follicles*. „Forensic Science International” 2004, nr 146, Suppl., s. 155; C. Murray, C. McAlister, K. Elliott, *Identification and*

Obecnie najbardziej zaawansowane systemy mikrodysekcji laserowej – LM, LMD, LAM (laser microdissection, laser assisted microdissection) – opierają się na wycinaniu pojedynczych komórek z materiału biologicznego: ludzkiego, roślinnego lub zwierzęcego (np.: preparaty cytologiczne, histologiczne, hodowli komórkowych), przy użyciu wiązki laserowej promieniowania UV lub IR, zintegrowanego z zaawansowanym mikroskopem badawczym i zmotoryzowanym stolikiem². Całość uzupełniona jest systemem komputerowym pozwalającym sterować procesem wycinania poprzez oprogramowanie, kamerę i monitor komputerowy.

Pobieranie materiału biologicznego do mikrodysekcji laserowej nie różni się w istotny sposób od standardów pozyskiwania próbek do analiz molekularnych. W celu efektywnego pozyskania materiału biologicznego ze śladów kryminalistycznych zaleca się jednak stosowanie taśm adhezyjnych umożliwiających izolację komórek bezpośrednio ze śladów kryminalistycznych zdeponowanych na ich powierzchni. Zabezpieczone w ten sposób komórki obserwuje się za pomocą odwróconego mikroskopu konfokalnego oraz sprzężonej z komputerem kamery, co umożliwia stałe monitorowanie preparatu na ekranie i precyzyjną identyfikację właściwej komórki lub struktury, którą należy zaznaczyć. Dla przykładu warto nadmienić, że obrazowanie mikroskopowe taśmy adhezyjnej z zabezpieczonymi śladami fragmentów kciuka dłoni umożliwia obserwację charakterystycznych układów grup komórkowych, a także widoczność komórek jądrzastych (np. komórki rozmieszczone wzdłuż śladów linii papilarnych). Energia wiązki odpowiedniego lasera pozwala na wyselekcjonowanie pożądanego fragmentu z taśmy adhezyjnej. Następnie tak pozyskana próbka umieszczana jest na specjalnym wieczku próbówki Eppendorfa. Zebrany w ten sposób materiał poddawany jest dalszym procesom analitycznym, zmierzającym do otrzymania pełnego profilu DNA.

Historycznie rozwój mikrodysekcji był ściśle związany z pojawieniem się zautomatyzowanych mikromanipulatorów (ruchome ramię zakończone mikropipetą), stanowiących alternatywę dla metody manualnej, polegającej na zeszkrobaniu ostrym narzędziem preparatu umieszczonego na szkiełku mikroskopowym³. Nieustanne poszukiwania precyzyjnych, szybkich i zapobiegającym zjawiskom kontaminacji metod oraz postęp technologii w zakresie inżynierii laserów

isolation of male cells using fluorescence in situ hybridisation and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault, „Forensic Science International. Genetics” 2007, nr 1, s. 247.

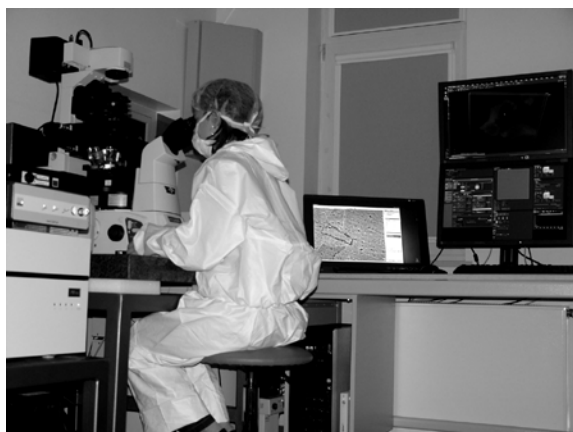
² M. Vandewoestyne, D. Deforce, *Laser capture microdissection in forensic research: a review*, „International Journal of Legal Medicine” 2010, nr 124, s. 513.

³ G. Murray, *An overview of laser microdissection technologies*, „Acta Histochemica” 2007, nr 109, s. 171.

i elektronice zaowocowały opisaniem w 1996 r. przez Emmert-Buck i wsp.⁴ możliwości systemu LCM (laser capture microdissection) – mikrodysekcji laserowej metodą wychwytywania z wykorzystaniem wiązki laserowej promieniowania podczerwonego.

Mikroskopia konfokalna jest jednym z działów mikroskopii, w której skład wchodzi zaawansowane urządzenia optyczne służące do obserwacji bardzo cienkich warstw materiałów (o grubości nawet 1 μm) w niezwykle wysokiej rozdzielczości i kontraście. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu lasera jako źródła światła. Urządzenia te analizują światło pochodzące tylko z jednej określonej płaszczyzny (warstwy), eliminując światło dochodzące z pozostałych. Specjalny system przysłon umożliwia badanie obrazów nie tylko z powierzchni materiału, ale także z głębi preparatu. Największą zaletą mikroskopów konfokalnych jest możliwość tworzenia trójwymiarowych obrazów poprzez składanie serii płaszczyzn z różnych głębokości w całość.

W 2011 r., bazując na wiedzy i doświadczeniu biologów molekularnych i onkologów, Biuro Badań Kryminalistycznych ABW zaadaptowało na potrzeby kryminalistyki system mikrodysekcji laserowej. Technika – pierwotnie zaprojektowana dla zastosowań medycznych, zwłaszcza w onkologii eksperymentalnej, umożliwiająca selektywne i bezdotykowe wycinanie pojedynczych komórek z preparatów cytogenetycznych za pomocą wiązki promieniowania laserowego – trafiła do kryminalistyki polskiej dzięki współpracy naukowców z wielu renomowanych ośrodków z ekspertami BBK ABW w ramach realizacji projektu rozwojowego na rzecz obronności i bezpieczeństwa państwa nr 0027/R/TOO/2010/12 finansowanego w latach 2010–2013 przez MNiSW/NCBiR: „Badania zmienności genetycznej na poziomie komórkowym – nowe możliwości identyfikacji kryminalistycznej AriaDNA 2010”.



Ryc. 1. Pracownia mikrodysekcji laserowej BBK ABW

⁴ M.R. Emmert-Buck, R.F. Bonner, P.D. Smith, R.F. Chuaquir, Z. Zhuang, S.R. Goldstein, R.A. Weiss, L.A. Liotta, *Laser capture microdissection*, „Science” 1996, nr 274, s. 998.

Celem niniejszego projektu było opracowanie nowoczesnego systemu identyfikacji osobniczej na poziomie pojedynczych komórek ludzkich na potrzeby kryminalistyki. Głównym założeniem badań kryminalistycznych jest identyfikacja osoby, która pozostawiła ślad biologiczny na miejscu popełnienia przestępstwa. W przypadku materiału biologicznego w postaci komórek ludzkich identyfikacji osobniczej dokonuje się na podstawie niepowtarzalnego profilu DNA komórkowego. Wśród wyzwań stawianych przez współczesną kryminalistykę na szczególną uwagę zasługuje analiza śladowych ilości materiału biologicznego w postaci mieszanin komórkowych pochodzących od różnych osób, zabezpieczonych na miejscu popełnienia przestępstwa. Niewielka użyteczność tego typu śladu biologicznego w postępowaniu dowodowym wynikała między innymi z braku możliwości typowania przynależności osobniczej komórek oraz fizycznego rozdziału mieszanin, a co za tym idzie, oznaczenia indywidualnych profili DNA. Ograniczenia te mogą stać się szczególnie dotkliwe wobec narastającej fali ataków terrorystycznych dokonywanych przez doskonale wyszkolone organizacje ekstremistyczne. Charakter tych incydentów wiąże się z koniecznością zabezpieczenia na miejscu zdarzenia mieszanin śladów biologicznych, złożonych z materiału genetycznego sprawców (często w minimalnych ilościach) oraz ofiar ataku terroryzmu.

Zespół ekspertów z Pracowni Badań Biologicznych BBK ABW, wychodząc naprzeciw zapotrzebowaniu organów ścigania i organów wymiaru sprawiedliwości, wdrożył do praktyki kryminalistycznej zaawansowany układ modułowy złożony z odwróconego laserowego mikroskopu konfokalnego, mikrodysektora laserowego i mikroselektora, umożliwiający rozróżnienie widm fluorescencyjnych oraz pozyskiwanie i fizyczny rozdział pojedynczych komórek ludzkich wraz z metodami analitycznymi pozwalającymi na otrzymanie profili DNA ze śladowych ilości materiału biologicznego.

Warto podkreślić, że wdrożona w BBK ABW technika mikrodysekcji laserowej jest pierwszą w Polsce zwalidowaną i akredytowaną na zgodność z normą europejską PE-EN ISO/IEC 17025:2005 metodą izolacji materiału biologicznego ze śladów kryminalistycznych, zastosowaną w polskiej praktyce kryminalistycznej w listopadzie 2013 r.

Wdrożenie zaawansowanego systemu mikrodysekcji laserowej umożliwiło znaczące podniesienie czułości dotychczas stosowanych metod pozwalających na uzyskanie pełnego profilu DNA z poziomu 2 ng (300 komórek) do poziomu 6,6 pg – pojedynczej komórki ludzkiej oraz identyfikację typu tkanki ludzkiej w oparciu o poziom ekspresji markerowych mRNA, metodą RealTime PCR (technika przeznaczona m.in. do identyfikacji ofiar katastrof), a także rozdział mieszanin złożonych z morfologicznie odmiennych tkanek (np. rozdział komórek męskich od komórek nabłonka pochwy, a następnie wyodrębnienie komponentu męskiego w przypadku dowodzenia przestępstw z rozdziału XXV kodeksu karnego przeciwko wolności seksualnej i obyczajowości).

OGRANICZENIA BIOLOGII KRYMINALISTYCZNEJ	EFEKTY WDROŻENIA TECHNIKI MIKRODYSEKCJI LASEROWEJ
Zabezpieczanie materiału biologicznego	
Ślady biologiczne standardowo pobierano z powierzchni za pomocą pałeczek wymazowych. Typowanie miejsca pobrania wymazu często odbywało się intuicyjnie.	Wdrożono taśmy adhezyjne o właściwościach optymalnych dla pobierania materiału biologicznego ze śladów kryminalistycznych oraz izolacji DNA. Obrazowanie mikroskopowe taśmy wraz z zabezpieczonym materiałem umożliwia wizualizację komórek jądrazstych jeszcze przed rozpoczęciem badań. Zastosowanie fluorescencyjnych barwników struktur komórkowych pozwala na identyfikację nawet pojedynczych komórek w zanieczyszczonych preparatach.
Nie istniała możliwość wyselekcjonowania ludzkich komórek jądrazstych oraz odseparowania ich od niepożądanych składników zabezpieczonego śladu (np. zanieczyszczeń oraz inhibitorów zawartych w podłożu) przed rozpoczęciem procesu izolacji DNA.	Wdrożono technologię mikrodysekcji laserowej pozwalającą na odseparowanie pojedynczych komórek jądrazstych od reszty preparatu, co znacznie poprawia czystość materiału poddawanego izolacji DNA oraz umożliwia eliminację inhibitorów utrudniających dalsze etapy analiz DNA.
Czułość metod analitycznych	
Tradycyjne sposoby zabezpieczania śladów oraz izolacji DNA wymagały obecności ok. 300 komórek ludzkich (2 ng) w celu otrzymania pełnego profilu genetycznego.	Możliwość uzyskania profilu genetycznego z pojedynczej komórki (6,6 pg): pojedyncze, wolne od zanieczyszczeń komórki pozyskiwane są z powierzchni taśmy adhezyjnej techniką mikrodysekcji, tj. wycinania za pomocą wiązki promieniowania laserowego,
Rozdział mieszanin materiału biologicznego	
Tradycyjny sposób pobierania śladów biologicznych poprzez wymaz uniemożliwiał rozdział mieszanin materiału pochodzącego od kilku dawców na poszczególne komponenty	Zastosowano fluorescencyjne znakowanie i detekcję sekwencji markerowych (hybrydyzacja FISH) umożliwiające rozróżnienie typów tkanek w mieszaninie, a następnie ich fizyczny rozdział z wykorzystaniem mikrodysekcji laserowej.
Identyfikacja materiału biologicznego	
Identyfikacja podstawowych typów tkanek odbywała się w oparciu o wyniki wstępnych testów immunochromatograficznych o ograniczonej specyficzności i czułości. Fragment materiału na którym wykonano test nie nadawał się do dalszej analizy. Brak testów na obecność śliny oraz naskórka.	Wdrożono multipleksową metodę identyfikacji tkanek ludzkich typowo występujących w śladach kryminalistycznych (krew, nasienie, ślina, naskórek) w oparciu o sekwencje markerowych mRNA, charakterystycznych dla każdej z tkanek. Metoda jest czuła, specyficzna i pozwala na zachowanie całości DNA ze śladu do dalszych badań.

Tab. I . Ograniczenia biologii kryminalistycznej w świetle wdrożeń techniki mikrodysekcji laserowej

Dzięki wdrożeniu zaawansowanej technologicznie metody mikrodysekcji laserowej obecnie polscy eksperci z zakresu badań DNA dysponują narzędziem umożliwiającym fizyczne pozyskanie pojedynczych komórek ludzkich i oddzielenie ich od zabrudzeń zanieczyszczonego śladu. Wdrożenie nowej techniki przyniosło wymierne korzyści. W większości laboratoriów kryminalistycznych do uzyskania pełnego profilu genetycznego potrzebna jest duża ilość materiału biologicznego, w BBK ABW zaś identyfikacja sprawcy jest możliwa na podstawie pojedynczej komórki ludzkiej. Te innowacyjne narzędzia są nie do przecenienia w sprawach dotyczących ustalenia profilu DNA: wytwórców anonimu, sprawców przestępstw na tle seksualnym, zamachowców czy terrorystów, co obecnie może stanowić w Polsce absolutny przełom w opiniowaniu ekspertyz biologicznych na rzecz organów procesowych.

Streszczenie

Niniejszy artykuł ma na celu zapoznanie czytelników z nowatorską techniką mikrodysekcji laserowej, stosowanej do fizycznego pozyskiwania materiału biologicznego do badań na poziomie molekularnym. Mikrodysekcja laserowa została pierwotnie opracowana na potrzeby onkologii, jednak stopniowo staje się techniką niezwykle użyteczną dla różnorodnych dyscyplin naukowych. Niniejsze opracowanie jest streszczeniem wiedzy o ogólnej zasadzie działania mikrodysekcji laserowej oraz przykładach jej zastosowania w kryminalistycznych badaniach genetycznych.

Słowa kluczowe: mikrodysekcja laserowa, kryminalistyczne badania genetyczne, mieszaniny DNA

Summary

This article aims at familiarizing the readers with a novel technique of laser microdissection, applied for physical acquisition of biological material for molecular levels of analyses. The laser microdissection derives its origin from oncology but has been becoming of substantial importance to other scientific disciplines. This publication is a summary of knowledge about the general principles of laser microdissection and its exemplary applications in forensic sciences.

Keywords: laser microdissection, forensic genetic profiling, DNA mixtures