

Magdalena Dębska, Magdalena Spólnicka,
Renata Zbieć-Piekarska

Badania jądrowego DNA w materiale kostnym – opis wybranych przypadków

„Trzeba było czekać, aż roztwór octu zrobi swoje. Ciało stopniowo zaczęło oddzielać się od kości. Na powierzchnię wypłynęły strzępy mięśni, wiązki nerwów i ścięgna unoszące się na wrzątku. [...]

I znowu musieli czekać. August dorzucił drewna do ognia. Uplynęły dwie godziny. Kilkadziesiąt chochli rozmiękłej skóry i wnętrzości wylądowało w lesie. Ciało biskupa zdawało się bez końca zrzucić swą ziemską powłokę.

We dwóch unieśli kocioł i mocno go przechylili. Czerwonawa, cuchnąca ciecz stopiła śnieg i popłynęła tłustą strugą ku rzece. Na wilgotnej ziemi kości Haquina piętrzyły się niczym sterta drewna. Niektóre były gładkie, dokładnie oczyszczone, białe, inne natomiast wciąż oplatały ścięgna i kawałki ciała.

Zakonnicy przenieśli szczątki na brzeg rzeki. Tu, na kłęczkach, w ciszy, wikariusz i młody diakon przystąpili do starannego szorowania w czystej rzecznej wodzie każdego kawałka szkieletu Jego Ekscelencji Haquina”.

Romain Sardou „I odpuść nam nasze winy”



Hieronim Bosch, *Sąd ostateczny* (fragment)

Wstęp

Konieczność identyfikacji N.N. zwłok dyktowana jest przez względy prawne, społeczne i kulturowe. Ma ona również duże znaczenie dla prowadzonych postępowań.

Od 2007 r. do 15.01.2013 r. do Bazy Danych DNA wprowadzonych zostało 420 profili N.N. zwłok [1]. Zgodnie z danymi statystycznymi Wydziału Poszukiwań i Identyfikacji Osób Biura Kryminalnego Komendy Głównej Policji w roku 2011 na terenie kraju ujawniono łącznie 691 zwłok o nieustalonej tożsamości, z czego 217 zidentyfikowano w ciągu 14 dni od ich znalezienia. W 2012 roku liczba znalezionych N.N. zwłok wynosiła 750, a w 193 przypadkach nastąpiła identyfikacja w ciągu 14 dni od ich znalezienia [2]. Na przestrzeni ostatnich lat ujawnianie N.N. zwłok na

terenie kraju utrzymuje się na podobnym poziomie. Zastosowanie zaawansowanych i precyzyjnych metod identyfikacyjnych opierających się np. na badaniach DNA z materiału kostnego zwiększa szansę na rozwiązanie dotąd niewyjaśnionych spraw.

W zależności od stanu, w jakim są zwłoki, i okoliczności ich znalezienia, stosowane są następujące sposoby identyfikacji:

- rozpoznanie przez krewnych,
- analiza cech szczególnych (blizny, tatuaże itp.),
- identyfikacja po ubraniach i rzeczach osobistych (biżuteria, dokumenty itp.),
- autopsja (przebyte zabiegi lecznicze i chirurgiczne),
- antropologia kryminalistyczna (np. przebyte złamania),
- rekonstrukcja twarzy na podstawie czaszki.

Wymienione metody można określić jako pośrednie, natomiast sposoby bezpośrednie to:

- badanie odcisków palców,
- analiza danych dentystrycznych,
- badania DNA.

W przypadku zwłok w znacznym stanie rozkładu, gdy niemożliwe jest przeprowadzenie identyfikacji daktyloskopijnej lub nie dysponuje się dokumentacją stomatologiczną, pozostaje jedynie identyfikacja bazująca na badaniach genetycznych.

Przez długi czas jedynym wykorzystywanym w przypadku zeszkieletowanych szczątków ludzkich źródłem materiału genetycznego pozwalającym na identyfikację było mitochondrialne DNA (mtDNA). Wynika to z jego właściwości, takich jak liczba kopii w komórce czy struktura przestrzenna, pozwalających na zachowanie wystarczającej ilości i jakości DNA, nawet po bardzo długim czasie. Na przestrzeni lat rozwój metod biologii molekularnej umożliwił wykorzystanie również jądrowego DNA (nDNA) w postaci sekwencji STR (*short tandem repeat* – krótkie powtarzalne sekwencje tandemowe), które charakteryzują się znacznie większą siłą dyskryminacji w porównaniu z badaniami mtDNA. Najbardziej doświadczoną instytucją na polu wykorzystania materiału kostnego w badaniach identyfikacyjnych DNA jest Międzynarodowa Komisja do Spraw Osób Zaginionych (The International Commission on Missing Persons – ICMP). Została ona utworzona w 1996 roku na Szczycie G-7 w Lyonie. Jej kluczową rolę jest lokalizowanie i identyfikacja osób, które zaginęły podczas konfliktów zbrojnych, między innymi na terenie byłej Jugosławii w latach 1992–1999. Szacuje się, że zaginęło wtedy nawet 40 000 osób. Od roku 2001 do chwili obecnej zostało przebadanych ponad 29 109 próbek należących do 15 000 różnych osób. Materiał porównawczy stanowiło 89 086 próbek krwi pochodzących od rodzin zaginionych. Raporty dopasowania na poziomie prawdopodobieństwa wyższym niż 99,95% otrzymano w wypadku 16 289 zaginionych osób. ICMP bada dziennie 105 próbek kości zmodyfikowaną metodą absorpcji-elucji przy wykorzystaniu kolumn krzemionkowych i zastosowaniu komercyjnego zestawu QIAamp DNA Blood Maxi Kit [3].

Metodyka wykorzystywana w Centralnym Laboratorium Kryminalistycznym Policji oparta jest na doświadczeniu ICMP. W niniejszym artykule przedstawiono przegląd najciekawszych przypadków, w których jako materiał badawczy wykorzystano materiał kostny. Przy doborze spraw autorzy kierowali się różnorodnością badanego materiału kostnego oraz rodzajem czynników egzogennych, jakim był on poddany.

Możliwość typowania STR z kości wystawionych na działanie czasu i różnych czynników środowiskowych staje się cennym narzędziem w identyfikacji osób zaginionych oraz N.N. szczątków. Trzeba jednak zaznaczyć, że pozyskiwanie DNA z tego typu materiału wciąż stanowi duże wyzwanie, co wynika ze stosunkowo niewielkiej ilości

endogenego DNA, negatywnego oddziaływania czynników środowiskowych, uszkodzeń DNA powstających post mortem, jak również koekstrahowanych podczas izolacji inhibitorów reakcji PCR.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiło 14 fragmentów kostnych różnego pochodzenia o zróżnicowanym stopniu rozkładu:

- trzy fragmenty kości potylicznej,
- trzy fragmenty kości udowej, 1 nasada niższa kości udowej,
- dwa fragmenty mostka,
- dwa fragmenty żeber,
- fragment talerza biodrowego,
- fragment żuchwy,
- fragment trzonu kości długiej.

W analizowanych sprawach na materiał kostny wpływały różne czynniki środowiskowe, w zależności od miejsca zalegania zwłok. W przedstawionych przypadkach różna też była korelacja pomiędzy momentem ujawnienia zwłok a czasem przeprowadzenia badań.

Fragmenty kostne poddano procesowi oczyszczania metodą mechaniczną i chemiczną, a następnie sproszkowano je przy użyciu młynka kriogenicznego.

DNA izolowano metodą absorpcji-elucji przy użyciu zestawu QIAamp DNA Blood Maxi Kit firmy QIAGEN. Ilościowe oznaczenie DNA przeprowadzono metodą Real Time PCR za pomocą aparatu ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System i zestawu odczynników Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems. Otrzymane ekstrakty amplifikowano z wykorzystaniem multiplexowej reakcji PCR przy użyciu następujących zestawów odczynników: AmpFISTR® SGM Plus, AmpFISTR® Identifier, AmpFISTR® Identifier Plus, AmpFISTR® MiniFiler firmy Applied Biosystems i aparatu GeneAmp PCR System 9700 firmy Applied Biosystems. Produkty reakcji PCR poddano elektroforezie przy użyciu sekwencjatora ABI PRISM® 3130xl. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono, używając programu GeneMapper ID 3.2.1.

Opisy przypadków

Przypadek 1. Zwłoki znalezione w kompleksie leśnym, zakopane w ziemi

Zwłoki były zeszkieletowane, a kości poprzeraśnięte drobnymi korzeniami. Szacowany czas pozostawiania zwłok w ziemi wynosił 24 miesiące, natomiast badania wykonano 3 lata od przypuszczalnego czasu zgonu. Materiał badawczy stanowiła czaszka ludzka, z której pobrano fragment kości potylicznej.

Sprawa ta była interesująca ze względu na długotrwałe działanie na zwłoki niekorzystnych warunków środowisko-

wych, takich jak pH, wilgotność i temperatura gleby oraz oddziaływanie mikroorganizmów. Wszystkie te czynniki mogą powodować fragmentację (degradację) nici DNA. Stosując opisaną w niniejszym artykule metodykę badań, udało się oznaczyć pełny profil DNA w systemie MiniFiler w wypadku próbki pobranej z kości potylicznej, który był zgodny z profilem DNA oznaczonym w innym laboratorium. Badania pozwoliły stwierdzić, że materiał kostny zabezpieczony do dwóch spraw pochodził od jednej osoby.

Na podstawie uzyskanych pozytywnych wyników badań w opisanym przypadku można potwierdzić dane literaturowe, że kość potyliczna, jedna z kości płaskich, jest dobrym materiałem do badań genetycznych i może zawierać odpowiednią ilość DNA nadającego się do profilowania, pomimo długo działających czynników degradujących [4].

Przypadek 2. Zwłoki znalezione w okresie letnim w kompleksie leśnym, leżące na ziemi

Zwłoki były częściowo zeszkieletonowane i rozczłonkowane. Szacowany czas zgonu to trzy miesiące przed ujawnieniem zwłok. Badania wykonano po roku od przypuszczalnego czasu zgonu. Materiał badawczy stanowił mostek. Dotychczasowe badania wskazują, że kości mające dużą gęstość są lepszym źródłem DNA ze względu na większą odporność na czynniki degradujące [4]. W omawianym przypadku materiał badawczy – mostek należący do kości gąbczastych – był bardziej podatny na niszczące czynniki środowiskowe [5]. Mimo to w badaniach wykonanych w systemie SGM Plus uzyskano z niego pełny profil DNA, który był zgodny z profilem oznaczonym z maszyny do golenia, uzyskany w opinii sporządzonej w innym laboratorium. Prawidłowe zabezpieczenie kości mostka oraz przechowywanie jej do momentu wykonania badań w zamrożeniu były najprawdopodobniej dodatkowymi korzystnymi czynnikami, które umożliwiły uzyskanie z tego rodzaju materiału badawczego pełnego profilu DNA.



Ryc. 1. Fragmenty trzonu kości udowej zabezpieczone podczas sekcji zwłok N.N. mężczyzny po wstępnym oczyszczeniu do badań
Fig. 1. Fragments of femur secured during the autopsy of unknown male body after pre-cleaning
Źródło (ryc. 1–10): autorzy

Przypadek 3. Ekshumowane zwłoki pochowane w 1990 roku na cmentarzu miejskim

Za materiał badawczy do tej sprawy posłużyła czaszka wypreparowana w 1990 roku w Zakładzie Medycyny Sądowej. Badania wykonano 20 lat od przypuszczalnego czasu zgonu. Z czaszki pobrano fragment kości potylicznej. W wyniku przeprowadzonych badań genetycznych, przy zastosowaniu systemu SGM Plus, uzyskano częściowy profil DNA (7 loci + AMG), natomiast w wyniku badań przeprowadzonych w systemie MiniFiler uzyskano pełny profil DNA. Ten przypadek dowodzi, że stosowana metodyka jest skuteczna nawet w przypadku bardzo starego, archiwalnego materiału biologicznego, dodatkowo poddanemu obróbce termicznej i chemicznej w czasie preparacji.

Przypadek 4. Zwłoki znalezione na terenie sadu

Zwłoki znalezione na terenie sadu były przerośnięte trawą, mchem i grzybnia. Uważa się, że grzyby nie są w stanie rozkładać kolagenu stanowiącego element budulcowy kości i rozkładają resztki strawione przez bakterie. Grzyby mogą delikatnie penetrować kości, tak jak kutikule roślin, w miejscach gdzie zostały one lokalnie zdeminiaralizowane przez działanie bakterii [6].

W analizowanej sprawie szacowanego czasu zgonu nie ustalono, jednakże ze względu na stan kości, które poprzerastane były grzybnia i elementami roślinnymi można przypuszczać, że zwłoki były w zaawansowanym stopniu rozkładu. Materiałem badawczym był trzon kości udowej (ryc. 1) i fragment lewego talerza biodrowego (z widocznymi początkami rozkładu kości – procesem gnilnym, z larwami owadów na powierzchni i wewnątrz) (ryc. 2). Z obu typów kości uzyskano pełny profil DNA pochodzenia męskiego przy zastosowaniu systemu IdentiFiler. W wyniku analizy statystycznej potwierdzono pokrewieństwo niezidentyfikowanego mężczyzny z jego żyjącym synem.





Ryc. 2. Fragment trzonu talerza biodrowego zabezpieczony podczas sekcji zwłok N.N. mężczyzny po wstępnym oczyszczeniu do badań
Fig. 2. Fragment of pelvic disc secured during the autopsy of unknown male body after pre-cleaning



Przypadek 5. Zwłoki znalezione w okolicy jeziora

Sekcję zwłok N.N. mężczyzny przeprowadzono dwa lata od szacowanego czasu zgonu. Zabezpieczono nasadę niższą prawej kości udowej (ryc. 3) i przesłano do badań genetycznych. Cała kość pokryta była pleśnią i niewielką ilością tkanki miękkiej. Środowisko podmokłe, w jakim odnaleziono zwłoki, wpływa bardzo niekorzystnie na materiał kostny, przyczyniając się do degradacji DNA. Ba-

dania przeprowadzono około 3,5 roku od momentu zgonu i uzyskano z tej kości pełny profil DNA przy zastosowaniu systemu IdentiFiler.

Przypadek 6. Zwłoki znalezione w cieku wodnym

W sprawie dotyczącej zwłok znalezionych w cieku wodnym w okresie jesiennym materiał badawczy stanowiły kości, które narażone były na niekorzystne oddziaływanie środowiska wodnego. Podczas sekcji zwłok zabezpieczono dwa fragmenty żeber (ryc. 4). Kości pokryte były tkanką mięśniową w stanie rozkładu z widocznymi larwami owadów. Badania genetyczne przeprowadzono w systemie – IdentiFiler otrzymując pełny profil DNA.

Przypadek 7. Zwłoki znalezione na terenie podmokłym, przy brzegu rzeki

W tej sprawie również zwłoki poddane były degradującym czynnikom zewnętrznym ze strony środowiska wodnego. Materiał do badań stanowiły:

- fragment trzonu mostka w rozkładzie, bez tkanek miękkich (ryc. 5),
- fragment trzonu lewej kości udowej bez tkanek miękkich, z larwami owadów na powierzchni i w części szpikowej (ryc. 6),



Ryc. 3 Fragment trzonu kości udowej wraz z nasadą zabezpieczony podczas sekcji zwłok
Fig. 3. Fragment of femur with epiphysis secured during the autopsy



Ryc. 4. Dwa fragmenty żeber pobrane podczas sekcji zwłok
Fig. 4. Two fragments of ribs collected during the autopsy



- czaszka dobrze zachowana, z fragmentami skóry i zabrudzeniami pochodzącymi od gleby i trawy (ryc. 7),
- żuchwa dobrze zachowana, bez tkanek miękkich (ryc. 8).

Badania genetyczne wykonano po około roku od szacowanego czasu zgonu. Z trzonu mostka, kości udowej oraz żuchwy uzyskano pełny profil DNA przy zastosowaniu systemu IdentiFiler Plus. Z czaszki pobrano do badań fragment potylicy, uzyskując niepełny profil DNA w tym samym systemie.

Przypadek 8. Zmumifikowany fragment trzonu kości długiej

Materiał do badań stanowił całkowicie zmumifikowany fragment trzonu kości długiej (ryc. 9). Szacowany czas zgo-

nu N.N. osoby był nieznany. W wyniku przeprowadzonych badań genetycznych w systemie IdentiFiler otrzymano z badanej kości pełen profil DNA pochodzenia męskiego, odpowiadający w zakresie oznaczonych układów profilowi DNA oznaczonemu z materiału porównawczego w postaci włosa pobranego z pędzla do golenia należącego do osoby zaginionej.

Przypadek 9. Szczątki N.N. osoby ujawnione na polu

Z uwagi na stan szczątków ujawnionych na polu w okresie letnim, niemożliwe było ustalenie tożsamości N.N. osoby. Podczas sekcji zwłok, która odbyła się dwa miesiące od momentu ujawnienia zwłok, pobrano materiał genetyczny w postaci fragmentu kości długiej (udowej) (Fot. 10). Kość



Ryc. 5. Fragment trzonu mostka
Fig. 5. Fragment of sternum diaphysis



Ryc. 6. Fragment trzonu lewej kości udowej
Fig. 6. Fragment of left femur



Ryc. 7. Czaszka, z której pobrano do badań fragment potylicy
Fig. 7. Skull from which fragment of occiput was collected for examination



Ryc. 8. Żuchwa, której fragment pobrano do badań
Fig. 8. Mandible from which fragment was collected for examination

pokryta była niewielkimi fragmentami tkanki oraz pleśnią. W jamie szpikowej kości znajdowały się larwy owadów. Badania identyfikacyjne rozpoczęto około 5 miesięcy od momentu ujawnienia zwłok. W ich wyniku uzyskano pełny profil DNA przy zastosowaniu systemu Identifiler. Zwłoki zidentyfikowane zostały przez porównanie oznaczonego profilu DNA z kości z profilem oznaczonym z uprawdopodobnionego materiału porównawczego w postaci wymazu pobranego z grzebienia należącego do denata.



Ryc. 9. Fragment trzonu kości długiej pobrany w trakcie sekcji zwłok
Fig. 9. Fragments of long bone diaphysis collected during the autopsy



Ryc. 10. Fragment trzonu kości długiej (udowej)
Fig. 10. Fragment of long bone (femur) diaphysis

Podsumowanie

We wszystkich opisanych przypadkach, w których materiał stanowiło 13 różnego pochodzenia fragmentów kostnych, uzyskano pełne profile DNA. Jedynie w przypadku kości potylicznej pochodzącej z czaszki znalezionej na terenie podmokłym uzyskano w badaniach niepełny profil DNA. W analizowanych przypadkach nie zanotowano wystąpienia kontaminacji. Pozwala to na stwierdzenie, że stosowana w CLKP metodyka jest efektywna i umożliwia uzyskanie pozytywnych wyników badań materiału kostnego.

Profile oznaczone z kości w niewyjaśnionych sprawach są rejestrowane w Bazie Danych DNA. Liczba profili oznaczonych z materiału pochodzącego z N.N. zwłok jest znacznie mniejsza w porównaniu z policyjnymi statystykami. Powtórna analiza materiałów archiwalnych i typowanie spraw, w których jedynym dostępnym materiałem do badań biologicznych jest materiał kostny, wydaje się więc zasadne. Rozwój nowoczesnych metod, jakimi dysponuje obecnie genetyka sądowa, umożliwia przeprowadzenie analizy takiego właśnie materiału, co w konsekwencji może doprowadzić do rozwiązania niewyjaśnionych dotychczas spraw.

BIBLIOGRAFIA

1. Dane statystyczne uzyskane z Bazy Danych DNA Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji, stan na dzień 15.01.2013.
2. Dane statystyczne za lata 2011 i 2012 uzyskane z Biura Poszukiwań i Identyfikacji Osób Biura Kontroli Komendy Głównej Policji.
3. Oficjalna strona ICMP <http://www.ic-mp.org/>.
4. Miloš A., Selmanović A., Smajlović L., Huel L.M., Katzarzyk C., Rizić A., Parsons T. J.: Success Rates of Nuclear Short Tandem Repeat Typing from Different Skeletal Elements. *Croat Med.* 2007; J. 48:486 – 93.
5. Misner L.M., Halvorson A.C., Dreier J.L., Ubelaker D.H., Foran D.R.: The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci.* 2009 Jul;54(4):822–828.
6. Nicholson R.A.: Bone degradation, burial medium and species representation: debunking the myths, an experiment based approach, *Journal of Archaeological Science*, 1996: 23, 513–534.

Streszczenie

Kości niejednokrotnie stanowią jedyne źródło materiału biologicznego pozwalającego na typowanie DNA w przypadku spraw archiwalnych, identyfikacji zaginionych osób czy też identyfikacji ofiar katastrof. Wynika to z unikalnych cech budowy kości, stanowiących swoistą barierę fizyczną i chemiczną dla czynników powodujących degradację. W artykule przedstawiono kilka przypadków, w których jedynym dostępnym materiałem badawczym był materiał kostny. Dzięki zastosowaniu metodyki

badan kości, stosowanej w Centralnym Laboratorium Kryminalistycznym Policji, możliwe było uzyskanie pozytywnych wyników badań. Spośród 13 badanych próbek, dla różnego rodzaju kości, we wszystkich przypadkach uzyskano pełne profile DNA. Jedynie w przypadku badań kości potylicznej otrzymano niepełny profil DNA. Badane kości różniły się budową w zależności od tego, jaki stanowiły element szkieletu. W prezentowanych sprawach różny był także wpływ czynników zewnętrznych mających znaczenie w przypadku degradacji DNA.

Słowa kluczowe: identyfikacja szczątków ludzkich, badania DNA materiału kostnego.

Summary

It happens quite often that bones constitute the only source of biological material allowing for DNA profiling in old cases, identification

of missing individuals or unknown remains. This is due to a bone structure providing unique physical and chemical barrier for degrading factors. The aim of this article was to describe cases where the only biological material for examination involved bone samples. Methods routinely used for bone and teeth examination by experts from the Central Forensic Laboratory of the Police allowed for obtaining positive results. Out of 13 examination samples (bones), in all cases full DNA profiles were obtained. The exception was the examination of occipital bone which resulted in partial profile. Examined bones differed in terms of structure depending on which part of skeleton they originated from. In the discussed cases, the impact of external factors contributing to degradation of DNA also varied.

Keywords: identification of human remains, DNA typing, bone samples