



Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) i metoda laserowego pozyskiwania mikroskrawków (LCM) w genetycznych badaniach kryminalistycznych

Wstęp i cel pracy

Głównym celem kryminalistycznych badań genetycznych jest dostarczenie danych umożliwiających identyfikację osoby, która pozostawiła ślad biologiczny na miejscu popełnienia przestępstwa. Ze względu na to, że na podstawie wniosków z opinii biegłego składu orzekające sądów karnych podejmują decyzje procesowe, konieczne jest stosowanie takich metod analitycznych, które cechują się pewnością i powtarzalnością uzyskanych wyników oraz spełniają warunek powszechnej akceptacji środowiska naukowego. Naturalną drogą rozwoju kryminalistycznych badań genetycznych jest dostosowanie do swoich potrzeb technologii badawczych, które wykorzystywane są podczas innych badań molekularnych. Drugim czynnikiem, który wpływa na konieczność stosowania nowoczesnych technik badawczych, jest zmiana taktyki popełniania przestępstw. Sprawcy przykładają coraz większą wagę do zabezpieczenia się przed pozostawieniem śladów, na podstawie których można byłoby ich zidentyfikować. Biorąc pod uwagę tylko te najważniejsze czynniki, postęp genetycznej metody identyfikacyjnej jest ściśle skorelowany z rozwojem, jaki dokonuje się w innych gałęziach nauk przyrodniczych. Pozwala to na analizę śladów biologicznych, które dotychczas nie mogły zostać wykorzystane do kryminalistycznej identyfikacji indywidualnej.

Jeszcze do niedawna eksperci wykonujący badania na potrzeby wymiaru sprawiedliwości nie byli w stanie uzyskać wiarygodnych rezultatów, izolując DNA z małej liczby komórek, pomimo istnienia takiej możliwości. Nawet jeśli w toku oględzin miejsca popełnienia przestępstwa zabezpieczono ślad powstały w wyniku krótkotrwałego kontaktu sprawcy z ofiarą czy przedmiotem, to taki materiał był często bez wartości dla toczącego się postępowania. W związku z tym wysiłki genetyków zmierzają w stronę modyfikacji istniejących procedur badawczych albo zastosowania innych technologii, niż standardowo wykorzystywanych w kryminalistycznych badaniach genetycznych.

Z tych właśnie powodów, bazując na doświadczeniu i wiedzy cytogenetyków molekularnych i onkologów,

wprowadzono do praktyki kryminalistycznej dwie metody analityczne: fluorescencyjną hybrydyzację in situ (FISH) oraz mikrolaserowe pozyskiwanie komórek (LCM) [9]. Możliwe stało się oznaczenie profilu DNA z materiału, który do tej pory stwarzał duże trudności podczas procesu identyfikacji indywidualnej. Połączenie tych dwóch metod badawczych, od wielu lat wykorzystywanych w cytogenetyce molekularnej oraz w onkologii, jest szczególnie użyteczne podczas wykonywania ekspertyz genetycznych, w których istnieje konieczność oznaczenia typów komórek i ich odseparowania od siebie. Najczęściej taka sytuacja powstaje w toku badania materiału dowodowego zabezpieczonego po popełnieniu przestępstwa zgwałcenia. Zarówno, gdy analizowany jest wymaz z pochwy ofiary, wymaz z powierzchni penisa pobrany od podejrzanego, czy z prezerwatywy zabezpieczonej w toku oględzin miejsca zdarzenia, zastosowanie standardowych procedur postępowania często nie przynosi pozytywnych rezultatów. W takich sytuacjach konieczne staje się zidentyfikowanie komórek żeńskich i odseparowanie ich od komórek męskich. Zastosowanie obu metod analitycznych umożliwia oddzielenie materiału genetycznego ofiary przestępstwa oraz sprawcy czynu zabronionego.

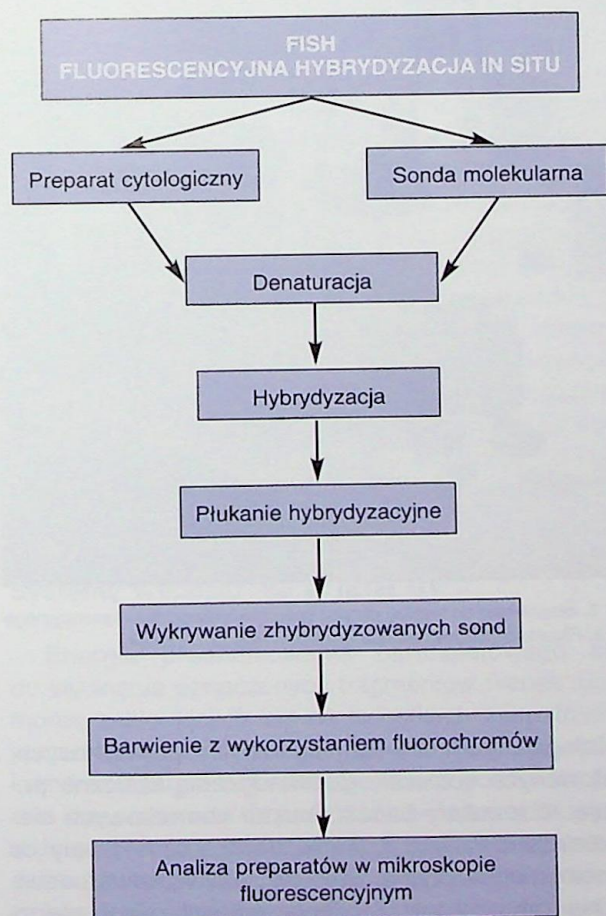
Głównym celem łącznego zastosowania tych technik badawczych na potrzeby wymiaru sprawiedliwości jest dowodzenie przestępstw z rozdziału XXV kodeksu karnego, jednak spektrum ich wykorzystania jest znacznie szersze. Połączone metody FISH i LCM doskonale nadają się do identyfikacji i oddzielenia diploidalnych komórek męskich od żeńskich w zaschniętych, mieszanych plamach krwi. Dzięki wykorzystaniu tych technologii badawczych, po nielegalnym zabiegu aborcji, określono profil DNA biologicznego ojca [2]. Także w celu oddzielenia komórek różnych gatunków taksonomicznych można stosować metody poprzedzające badania genetyczne. Ma to znaczenie podczas dowodzenia przestępstw związanych z nielegalnym obrotem chronionymi gatunkami roślin i zwierząt oraz ich przetworzonymi fragmentami.

Stosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz mikrolaserowego pozyskiwania komórek stało się

konieczne także ze względu na tworzenie i rozwijanie bazy danych DNA, w których główną rolę odgrywają profile osób oparte na niekodujących fragmentach DNA, typu STR, o wysokim polimorfizmie, zlokalizowanych na chromosomach autosomalnych. Mimo iż możliwe jest uzyskanie informacji (w postaci układu alleli) tylko o mężczyźnie (polimorfizm fragmentów ulokowanych na chromosomie Y) czy o kobiecie (polimorfizm fragmentów znajdujących się na chromosomie X), to jednak moc dyskryminująca takiego wyniku jest stosunkowo niewielka. Wspólne zastosowanie obu opisywanych metod pozwoli na określenie profili autosomalnego DNA, które można będzie porównać z rekordami zgromadzonymi w genetycznej bazie danych.

Celem artykułu jest ukazanie zastosowania dwóch metod badawczych: fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz laserowego pozyskiwania mikroskrawków w nowoczesnych badaniach kryminalistycznych.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)



Ryc. 1. Schemat metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ [autorzy za M. Achrem wg 11]

Fig. 1. Scheme of fluorescence in situ hybridization (FISH) method [by 11]

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych in situ, czyli w miejscu ich naturalnego występowania, polega na łączeniu znakowanego polinukleotydu – sondy molekularnej – z komplementarnymi sekwencjami kwasów nukleinowych w komórce. Początkowo znacznikami sondy molekularnej były izotopy, jednak stosunkowo szybko radioaktywna hybrydyzacja kwasów nukleinowych została wyparta przez metodę immunofluorescencyjną. Zaletą FISH jest jej wykonywanie bezpośrednio na szkiełku mikroskopowym. Metoda umożliwia wykrycie poszukiwanej sekwencji DNA lub RNA oraz, co jest szczególnie istotne z kryminalistycznego punktu widzenia, lokalizuje daną sekwencję w komórkach czy nawet na chromosomach. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ charakteryzuje się wysoką czułością, szybkością uzyskania wyników oraz możliwością zastosowania, podczas jednego badania, wielu fluorochromów o różnym zabarwieniu [1, 10, 11, 12].

Pierwszym etapem jest denaturacja kwasu deoksyrybonukleinowego chromosomowego oraz DNA sondy molekularnej na powierzchni podstawowego szkiełka mikroskopowego. Po zapewnieniu odpowiednich warunków termicznych następuje proces łączenia się sondy molekularnej z komplementarną sekwencją DNA badanych komórek. Następnie słabo hybrydizowane sondy DNA zostają wypłukane z preparatu. Miejsca hybrydyzacji wykrywa się metodami immunochemicznymi lub poprzez bezpośrednią obserwację preparatu pod mikroskopem wyposażonym w lampę fluorescencyjną (ryc. 1) [11].

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ pozwala między innymi na: lokalizację konkretnych genów lub ich fragmentów w obrębie poszczególnych chromosomów, identyfikację addycji chromosomowych, wykrywanie obcego materiału genetycznego w komórkach, identyfikację chromosomów markerowych, lokalizację mikrodelekcji oraz identyfikację chromosomowych pęknięć i translokacji, identyfikację chromosomów płci oraz ich regionów, ocenę ekspresji określonych genów w komórkach, badania z zakresu ewolucjonizmu porównawczego, analizę aberracji chromosomowych w badaniach z zakresu genetyki toksykologicznej [11].

W kryminalistycznych badaniach genetycznych szczególnie przydatnymi właściwościami tej metody badawczej są: identyfikacja sekwencji markerowych charakterystycznych dla danego gatunku oraz identyfikacja chromosomów płci. Możliwość zastosowania różnobarwnych znaczników fluorescencyjnych sond komplementarnych do sekwencji fragmentów DNA zlokalizowanych na chromosomie X i Y pozwala, podczas analizy mikroskopowej, na rozróżnienie komórek żeńskich od męskich [9].

Metoda może być z powodzeniem stosowana w genetycznych laboratoriach kryminalistycznych. Nie ma

konieczności tworzenia nowej pracowni, lecz istniejącą należy wyposażyć w dodatkowy sprzęt. Warunkiem niezbędnym do przeprowadzenia udanej hybrydyzacji jest zapewnienie optymalnych warunków termicznych denaturacji oraz późniejszego łączenia się sond molekularnych z komplementarnymi sekwencjami DNA. Można to zrealizować, wyposażając termocykler – standardowo stosowany w badaniach genetycznych – w przystawkę do hybrydyzacji *in situ*. Dzięki temu jedno urządzenie będzie wykorzystywane do łańcuchowej reakcji polimerazy i do procesu łączenia się oligonukleotydów z komplementarną sekwencją DNA. Termocykler z blokiem umożliwiającym wykonanie hybrydyzacji przedstawia rycina 2.



Ryc. 2. Termocykler z przystawką do hybrydyzacji *in situ*
Fig. 2. Thermocycler equipped in with *in situ* hybridization heater
źródło (ryc. 2–3): autorzy

Kolejnym elementem wyposażenia laboratorium jest mikroskop optyczny z lampą fluorescencyjną, sprzężony z systemem komputerowym za pomocą toru wizyjnego. Obrazy mikroskopowe są zapisywane na nośniku magnetycznym komputera. Stanowisko do analizy obrazów mikroskopowych przedstawiono na rycinie 3.

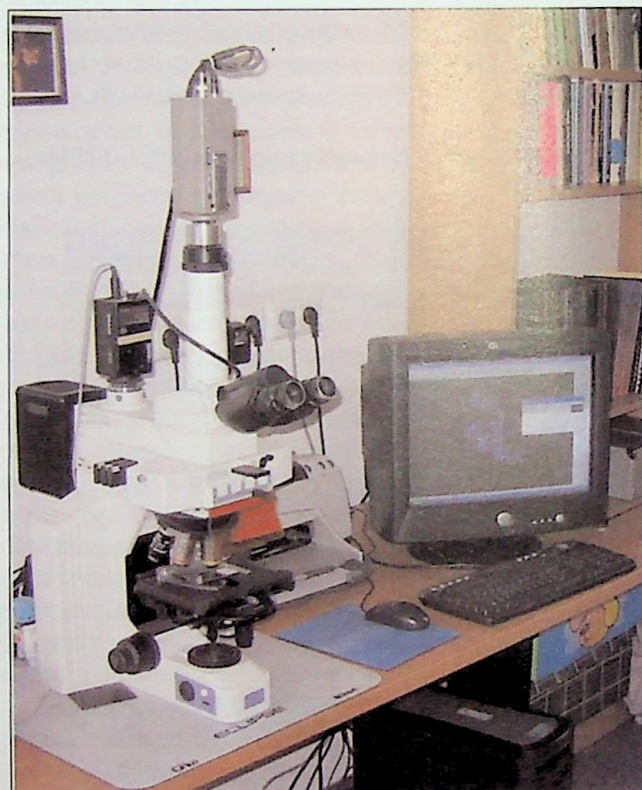
Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* jest procesem niewymagającym dużej liczby specjalistycznych urządzeń. Zastosowanie wielu fluorochromów jednocześnie podnosi jej wartość jako metody do zastosowania

w badaniach kryminalistycznych. Co ważne, po procesie łączenia się sond molekularnych z komplementarnymi sekwencjami istnieje możliwość amplifikacji oznakowanego fragmentu DNA [11].

Metoda ma pewne ograniczenia. Podczas procesu hybrydyzacji może dojść do renaturacji helisy DNA, a powstałe hybrydy bardzo często są niestabilne [1, 11].

Laserowe pozyskiwanie mikroskrawków (LCM)

Istotnym problemem w nowoczesnych badaniach onkologicznych jest heterogeniczna natura struktur tkankowych. Uniemożliwia to dokonanie analizy cech



Ryc. 3. Stanowisko do analizy obrazu spod mikroskopu fluorescencyjnego
Fig. 3. Fluorescence microscope equipped with LCD camera

morfologicznych czy fizjologicznych pojedynczych, zmutowanych komórek. Doświadczenia kliniczne pokazują, iż rezultaty badań struktur komórkowych niewyselekcjonowanych z tkanki bardzo często były co najmniej nieprecyzyjne. Stąd też, aby wpływ środowiska nie zaburzał toku leczenia, pojawiła się konieczność selekcjonowania fragmentów tkanek lub poszczególnych komórek, w celu poddania ich dokładnej analizie w warunkach pozaustrojowych. Rozwój technik mikroskopowych umożliwia precyzyjną selekcję

materiału, w związku z tym zdecydowano się na połączenie ich z fizycznym oddzielaniem komórek od innych struktur za pomocą energii lasera [3, 7].

Metoda laserowego pozyskiwania mikroskrawków pozwala na izolację tych struktur biologicznych bezpośrednio z preparatu mikroskopowego. Aktualnie stosowane są dwie techniki: z wykorzystaniem lasera podczerwonego oraz lasera ultrafioletowego. Pierwszym etapem metody jest wizualizacja preparatu pod mikroskopem. Następnie określone są współrzędne położenia komórek, które mają być usunięte ze szkiełka mikroskopowego. Po zatwierdzeniu przez operatora wprowadzonych danych laser rozpoczyna oddzielanie oznaczonej struktury od środowiska i następuje jej transfer. Metoda charakteryzuje się bardzo dużą precyzją. Za pomocą energii lasera możliwe jest wycinanie i przenoszenie fragmentów tkankowych oraz pojedynczych komórek. Wysoka selektywność pozwalająca na separację pojedynczych komórek jest cechą szczególnie predysponującą metodę do badań kryminalistycznych [7].

Systemy wyposażone w laser podczerwony

Po bezpośredniej wizualizacji komórek i oznaczeniu ich położenia na szkiełku mikroskopowym uruchamiany jest laser pulsujący, którego zadaniem jest zmiana właściwości fizycznych filmu polimerowego przymocowanego do przezroczystego stolika zamontowanego w osi optycznej mikroskopu. Pod wpływem energii błona polimerowa przykleja się do wybranej komórki. Siły adhezji są na tyle duże, że komórka jest odrywana od struktury tkankowej. Następnie jest ona przenoszona do próbki i zalewana buforem ekstrakcyjnym. Umożliwia to oddzielenie filmu polimerowego od wyciętych komórek. W wyniku procesu otrzymuje się jednorodny materiał biologiczny, który jest zakwalifikowany do dalszych badań genetycznych [7].

Systemy wyposażone w laser UV

Energia promieniowania ultrafioletowego służy do wycinania oznaczonych fragmentów tkanek lub komórek znajdujących się na szkiełkach zaopatrzonych w membrany polietylenowe (PEN lub PET). Po wycięciu komórek energia tego samego lasera powoduje, że są one katapultowane do próbki z buforem adhezyjnym. Zaletą tej techniki jest to, iż podczas wycinania i przenoszenia materiału biologicznego nie dochodzi do kontaktu komórek z membraną. Dzięki temu ryzyko kontaminacji innym materiałem biologicznym jest znikome. Podobnie jak w poprzedniej metodzie otrzymuje się komórki, które można poddać procedurom stosowanym w genetycznych badaniach kryminalistycznych [6, 7, 9].

Stosowanie metody laserowego pozyskiwania mikroskrawków pozwala na precyzyjną selekcję materiału biologicznego, wcześniej zdiagnozowanego metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Oddzielenie od siebie komórek różnej płci zapobiega występowaniu mieszaniny DNA (o dominującym komponencie) czy zjawisku amplifikacji preferencyjnej. Wyposażenie laboratorium kryminalistycznego w tego typu urządzenie jest jednak kosztowne. Wymaga to bowiem stworzenia oddzielnej pracowni oraz zatrudnienia osoby, która specjalizowałaby się w obsłudze tych urządzeń.

Wykorzystanie metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) i laserowego pozyskiwania mikroskrawków (LCM) w badaniach kryminalistycznych

Połączenie zalet obu metod, które standardowo są wykorzystywane od wielu lat w cytogenetyce molekularnej i onkologii, pozwala na przekroczenie kolejnej granicy w genetycznych badaniach kryminalistycznych. Dzięki fluorescencyjnej analizie mikroskopowej oraz precyzyjnemu pobieraniu komórek z preparatu mikroskopowego możliwe jest uzyskanie profilu DNA, na podstawie którego możliwa jest identyfikacja kryminalistyczna osoby. Pominięcie tego etapu przed badaniami genetycznymi niektórych śladów czy dowodów rzeczowych skutkuje najczęściej tym, iż biegły we wnioskach swojej opinii nie może jednoznacznie się wypowiedzieć o dawcy DNA na podstawie wyników badań z zabezpieczonej próbki substancji.

Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* oraz metody laserowego pozyskiwania mikroskrawków jest szczególnie przydatne podczas wykonywania badań genetycznych zleconych przez organy procesowe w postępowaniach dotyczących przestępstw na tle seksualnym. Jeśli materiałem dowodowym jest wymaz pobrany od ofiary i gdy po badaniu mikroskopowym rozmazu na szkiełku nie stwierdzono obecności plemników, to standardowe sposoby postępowania są bezcelowe. W takim przypadku zastosowanie procedury lizy preferencyjnej nie spowoduje oddzielenia się frakcji męskiej od żeńskiej, ponieważ w materiale do badań znajdują się tylko komórki o podobnym ciężarze. Analiza danych statystycznych pokazuje, iż azoospermia występuje coraz częściej w populacji. Oznacza to, iż także większa liczba gwałtów cierpi na tę dolegliwość. Jednak brak plemników w materiale biologicznym pobranym od kobiety, ofiary gwałtu, nie oznacza, iż nie ma tam materiału biologicznego pochodzącego od mężczyzny. Leukocyty sprawcy oraz komórki nabłonkowe z jego przewodu ejakulacyjnego są obecne w wymazie zabezpieczonym do dalszych badań, pod warunkiem że sprawca nie używał prezerwatywy

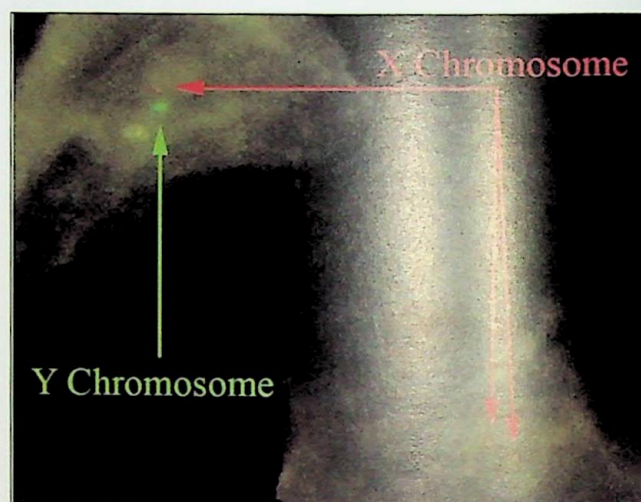
podczas dokonania czynu zabronionego. W takiej sytuacji biegły ma do czynienia z mieszaniną DNA, w której dominować będzie komponent pochodzący od kobiety, przy znikomo małej ilości męskiego kwasu deokserybonukleinowego. Przy takiej dysproporcji, często sięgającej stosunku 70:1 i więcej, szanse na uzyskanie wyniku badań genetycznych, który będzie można poddać analizie statystycznej, są małe. Zazwyczaj uzyskuje się wyraźny profil kobiety oraz nieliczne allele pochodzące od mężczyzny. Konieczne jest więc dokonanie separacji komórek męskich od żeńskich jeszcze przed badaniami genetycznymi. Na rynku dostępne są sondy ze znacznikami fluorescencyjnymi komplementarnymi do specyficznej sekwencji satelity alfa centromeru chromosomu X oraz satelity III DNA w regionie Yq12 chromosomu Y (na przykład zestaw CEP X Spectrum Orange i Y Spectrum Green firmy Abbott Molecular). Komórki żeńskie, zawierające dwa chromosomy X, będą oznaczone kolorem pomarańczowym, natomiast w przypadku komórek męskich do chromosomu X przyłączy się sonda z pomarańczowym znacznikiem, a do chromosomu Y oligonukleotyd oznaczony kolorem zielonym. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiono na rycinie 4. Metoda FISH pozwala zatem na identyfikację komórek męskich i żeńskich. Po określeniu współrzędnych położenia komórek męskich na szkiełku możliwe staje się ich pobranie z preparatu za pomocą metody laserowej mikrodesekcji. Po ich wyodrębnieniu z mieszaniny wysoce prawdopodobne jest uzyskanie profilu DNA, na podstawie którego można dokonać identyfikacji kryminalistycznej [6, 7, 8].

Podobny schemat postępowania obowiązuje w przypadku, gdy zabezpieczono wymaz z penisa osoby podejrzanej o popełnienie przestępstwa zgwałcenia. Oprócz pochodzącego od mężczyzny materiału, którego ilość jest dominująca, w pobranym materiale obecne są komórki nabłonkowe pochodzące od ofiary gwałtu. W takim przypadku uwaga biegłego jest skoncentrowana na oznaczeniu komórek żeńskich i męskich, a następnie na wyodrębnieniu komponentu męskiego z mieszaniny i jego późniejszej analizie genetycznej [4, 5].

Połączenie obu opisanych powyżej metod z badaniami genetycznymi daje dobre rezultaty, gdy w toku oględzin miejsca popełnienia przestępstwa zgwałcenia ujawniono i zabezpieczono do dalszych badań prezerwatywę. Pobierając, w warunkach laboratoryjnych, wymazy substancji biologicznej naniesionej na obie powierzchnie prezerwatywy, można sprawdzić, na której z nich znajdują się komórki męskie, a gdzie dominują komórki żeńskie. Oznaczenie płci metodami cytogenetyki molekularnej i wyodrębnienie komórek z preparatu oraz zastosowanie odpowiednich metod analizy gene-

tycznej pozwolą na powiązanie zabezpieczonego śladu z ofiarą przestępstwa oraz ze sprawcą [8].

Nie tylko dowodzenie przestępstw z rozdziału XXV kodeksu karnego (przeciwko wolności seksualnej i obyczajności) może być wspomagane połączeniem metod FISH i LCM. Spektrum zastosowania w badaniach kryminalistycznych tych technologii jest znacznie szersze. Wszędzie tam, gdzie istnieje konieczność od-



Ryc. 4. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) interfazowych komórek ludzkich. Zielony sygnał wskazuje sondę specyficzną dla ludzkiego chromosomu Y (satellite III DNA), a czerwony to sonda specyficzną dla ludzkiego chromosomu X (alpha satellite DNA) [13]

Fig. 4. Fluorescence in situ hybridization (FISH) of a interphase human cells. The green colour indicates a probe specific for human chromosome Y (satellite III DNA) and red is a probe specific for human chromosome X (alpha satellite DNA) [13]

źródło: P. Wojtkiewicz [13]

dzielenia od siebie materiału biologicznego w formie komórek, można te procedury analityczne z powodzeniem wykorzystać. W literaturze opisane są przypadki, w których zastosowanie przez biegłych fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ i laserowego pozyskiwania mikroskrawków oraz badań genetycznych pozwoliło na ustalenie biologicznego ojca płodu po nielegalnie wykonanej aborcji. Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ pozwoliła na rozróżnienie fragmentów tkankowych pochodzących od matki i płodu, a metoda laserowej mikrodesekcji na precyzyjne wyselekcjonowanie materiału do badań genetycznych [2, 14].

Zalety zastosowania fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) i laserowego pozyskiwania mikroskrawków (LCM) w badaniach kryminalistycznych

Proces wdrażania do praktyki kryminalistycznej metod badawczych, które są wykorzystywane w innych dziedzinach nauki, jest czasochłonny i wymaga ponie-

sienia dużych kosztów. Jednak ich zastosowanie pozwoli na uzyskanie wiarygodnych wyników, których do niedawna nie można było interpretować. Dla kryminalistyki wprowadzenie nowej metodyki badawczej to duża korzyść. Poszerza się spektrum stosowanych technologii, co ma wpływ na wykrywanie sprawców przestępstw. Dzięki nowatorskim rozwiązaniom badawczym rola prewencyjna kryminalistyki stale się zwiększa. Równie ważnym aspektem jest wzmacnianie wśród społeczeństwa poczucia posiadania przez organy wymiaru sprawiedliwości narzędzi, które spowodują nieuchronność kary za popełnione przestępstwo. Rozwój metod badawczych umożliwia udowodnienie popełnienia czynu zabronionego przez oskarżonego, a to wpływa na rozstrzygnięcie procesowe składu orzekającego.

Aktualnie wyniki badań genetycznych są gromadzone w formie elektronicznych baz danych. Ich konstrukcja pozwala między innymi na porównywanie profili DNA osób z układami alleli uzyskanymi po badaniu zabezpieczonych śladów kryminalistycznych. Największe znaczenie mają bazy danych, w których zgromadzone są informacje o loci autosomalnych typu STR. Wynika to z ich dużej wartości diagnostycznej oraz przydatności do analizy statystycznej. Stąd też istnieje tendencja, aby wprowadzać metody badawcze ukierunkowane na analizę tych niekodujących fragmentów DNA. Polimorfizm chromosomów X i Y oraz analiza mitochondrialnego DNA mają aktualnie znaczenie wspomagające. Zastosowanie metod fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz laserowego pozyskiwania mikroskawków pozwala na oznakowanie i selekcję komórek z opisanego powyżej materiału biologicznego, a poprzez zastosowanie metod analizy genetycznej możliwe jest oznaczenie profilu DNA, który można będzie wprowadzić do baz danych i porównać go z jej zasobami.

Dzięki wprowadzeniu do praktyki kryminalistycznej obu tych metod możliwe stało się otrzymanie wyników badań z materiału, który do tej pory nie mógł być analizowany. W sytuacjach mieszanin DNA, w przypadku których jeden z komponentów znacznie przeważa nad drugim, np. stosunek mieszaniny 70:1, brak selekcji komórek męskich od żeńskich spowodowałby, iż mało realne byłoby oznaczenie pełnego profilu komponentów mieszaniny DNA. Oddzielenie komórek męskich od żeńskich ten problem całkowicie eliminuje [3, 9].

Przedstawiony przegląd niektórych korzyści płynących bezpośrednio z łącznego zastosowania obu metod pokazuje, iż poniesione koszty związane z wyposażeniem i szkoleniem pracowników są szybko kompensowane, w chwili gdy na podstawie badań składy orzekające sądów karnych otrzymają wiarygodne narzędzie, które umożliwia podjęcie decyzji procesowej.

Podsumowanie

Cechą charakterystyczną kryminalistycznych badań genetycznych jest wykorzystywanie technologii badawczych, które są z powodzeniem stosowane w innych dziedzinach biologii molekularnej. Wprowadzenie do praktyki kryminalistycznej metody fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz laserowego pozyskiwania mikroskawków, standardowo od wielu lat wykorzystywanych w cytogenetyce molekularnej i w onkologii, pozwoliło na oznaczenie profili DNA z materiału biologicznego, który do tej pory nie mógł być analizowany. Zaprezentowany kierunek rozwoju badań kryminalistycznych jest związany z regułami uznania danych metod badawczych za spełniające wymogi przydatności podczas dowodzenia popełnienia przestępstw.

Przydatność opisanych powyżej dwóch metod analitycznych jest szczególnie duża do wykrywania sprawców przestępstw przeciwko wolności seksualnej i obyczajności. Dzięki zastosowaniu FISH i LCM uzyskuje się materiał biologiczny, który daje duże prawdopodobieństwo otrzymania wiarygodnego i potwierdzonego statystycznie wyniku badań genetycznych.

BIBLIOGRAFIA

1. **Brown T.:** Genomy, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
2. **Budimilija Z., Lechpammer M., Popiolek D., Fogt F., Prinz M., Bieber F.:** Forensic applications of Laser Capture Microdissection: use in DNA-based parentage testing and platform validation, *Croat. Medicine Journal* 2005, 46 (4), 549.
3. **Burgemeister R.:** New Aspects of Laser Microdissection in research and routine, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2005, vol. 53 (3), 409.
4. **Cina S., Collins K., Pettenati M., Fitts M.:** Isolation and Identification of Female DNA on Postcoital Penile Swabs, *American Journal of Forensic Medicine & Pathology* 2000, 21 (2): 97.
5. **Di Martino D., Giuffrè G., Staiti N., Simone A., Le Donne M., Saravo L.:** Single sperm cell isolation by laser microdissection. *Congress Mediterranean Academy of Forensic Sciences, Workshop No 1, Reggio Calabria, ITALIE* 2004, vol. 146, SUP (226 p.) (6 ref.), 151.
6. **Elliott K., Hill D., Lambert C., Burroughes T., Gill P.:** Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides, 2003, 137 (1): 28.
7. **Espina V., Wulffkuhle J., Calvert V., VanMeter A., Zhou W., Coukos G., Geho D., Petricoin E., Liotta L.:** Laser-capture microdissection, *Nature Protocols* 2006, 1, 586.
8. **Maj S., Cina S., Collins K., Fitts M., Pettenati M.:** Isolation and Identification of Male and Female DNA on a Postcoital Condom, *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2000, vol. 124, No. 7, pp. 1083.

9. Murray C., McAlister C., Elliott K.: Identification and isolation of male cells using fluorescent in situ hybridization and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault, *Forensic Science International: Genetics* 2007, 1, 247.

10. Primrose S.: Zasady analizy genomu, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 1999.

11. Skuza L., Słomińska-Walkowiak R., Filip E., Achrem M., Kalinka A.: Wybrane metody biologii i cytogenetyki molekularnej, Wydawnictwo Uniwersytetu Szczecińskiego, Szczecin 2008.

12. Słomski R. [red.]: Przykłady analiz DNA, Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań 2004.

13. Wojtkiewicz P.: Advanced LMD Forensic Applications. North Louisiana Crime Lab, prezentacja z konferencji Technology Transfer Workshop, National Institute of Justice 2007.

14. Vecchiotti C., Spaltro G., Bloise D., Brunetti E., Sciacchitano S.: Demonstration of a Gastric Biopsy Specimen Mix-up by Laser Capture Microdissection (LCM) and DNA Fingerprinting, *American Journal of Forensic Medicine & Pathology* 2004, 25 (2): 113.

Streszczenie

Celem artykułu jest przedstawienie dwóch metod badań cytogenetycznych: fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ oraz laserowego pozyskiwania mikroskratków, które są standardowo wykorzystywane w cytogenetyce molekularnej i w onkologii. Ich łączne zastosowanie w genetycznych badaniach kryminalistycznych po-

zwoli na uzyskanie rezultatów – profili autosomalnego DNA w układach polimorficznych typu STR. Przedstawiono zasadę działania tych metod, ich zalety oraz wady z punktu widzenia identyfikacji kryminalistycznej. Przedstawiono także obszary działań przestępczych, przy dowodzeniu których możliwe jest wykorzystanie opisanych technologii.

Słowa kluczowe: kryminalistyczne badania genetyczne, układy typu STR, przestępstwa przeciwko wolności seksualnej, mieszaniny DNA, laserowe pozyskiwanie mikroskratków (LCM), fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH), bazy danych DNA.

Summary

The main aim of this article is to describe two biological technologies: fluorescence in situ hybridization (FISH) and laser capture microdissection (LCM). These methods are used in molecular cytogenetic and oncology. Their application to forensic science enables identification of male and female cells and isolation of spermatozoa from microscope slides containing sperms and vaginal cells. Fluorescence in situ hybridization (FISH) and laser capture microdissection (LCM) are both useful tools to prove sexual assaults. The authors describe forensic usefulness and emphasise advantages and disadvantages of these technologies.

Keywords: forensic science, short tandem repeat (STR) profiles, sexual assault, DNA mixtures, laser capture microdissection (LCM), fluorescence in situ hybridization (FISH), DNA database.

Czytelniku,

informujemy, że jest do nabycia monografia

autorstwa Tomasza Bednarka

pt. „Dowód osmologiczny.

Aspekty kryminalistyczne i procesowe”.

Książkę można zamawiać w Biurze Logistyki Policji KGP

ul. Domaniewska 36/38, 02-672 Warszawa

tel. (022) 601-29-45, faks (022) 601-15-71

cena egz. 95 zł

