

„Nowoczesne techniki analizy materiału biologicznego w zastosowaniach toksykologiczno-sądowych”

mgr Anna Wójtowicz
Pracownia Chemii Sądowej
Wydział Chemii,
Uniwersytet Jagielloński

Próbki biologiczne są powszechnym materiałem dowodowym w postępowaniach sądowych, a zatem i częstym przedmiotem badań toksykologiczno-sądowych. Mogą one dostarczyć wielu istotnych informacji o przebiegu danego zdarzenia. Prawidłowe wnioskowanie wymaga opracowania rzetelnych, skutecznych, ale też szybkich i łatwo dostępnych metod pozyskiwania informacji z danych rejestrowanych podczas analizy matryc biologicznych.

W niniejszej pracy testowano wykorzystanie następujących technik:

- spektroskopii fluorescencyjnej i ramanowskiej w celu detekcji zmian biochemicznych w składzie plam krwi menstruacyjnej (MB) w czasie po ich pozostawieniu (TSD) i stworzenia modelu szacowania TSD,
- spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ATR-FTIR) i chromatografii ciekowej z detektorem mas (LC-MS) w celu monitorowania zmian w składzie biochemicznym matrycy oraz zawartości ksenobiotyków w próbkach biologicznych przechowywanych w różnych warunkach przed analizą,
- spektroskopii ATR-FTIR i obrazowania transmisyjnego w podczerwieni (FTIR) oraz spektroskopii ramanowskiej w celu detekcji zmian biochemicznych w tkankach *post-mortem* i opracowania modelu ustalania czasu jaki upłynął od zgonu (PMI).

W toku badań wykazano, że ekspozycja plam krwi menstruacyjnej na środowisko zewnętrzne prowadzi do zmian zawartości endogennych fluoroforów – tryptofanu, NADH i flawiny, które monitorowano z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej oraz zmian w obrębie pochodnych hemoglobiny, na detekcję których pozwoliła spektroskopia ramanowska z laserem 785 nm. Ze względu na rodzaj wskazanych markerów zmian

biochemicznych, fluorescencja wykazała potencjał do opracowania uniwersalnej metody datowania plam śladów biologicznych, z kolei spektroskopia ramanowska – metody specyficznej dla plam krwawych o dominującym udziale hemoglobiny na widmach. Ponadto spektroskopia fluorescencyjna okazała się czułą metodą szacowania wczesnego PMI, wskazując na silne zmiany w pierwszych punktach czasowych po naniesieniu plam. Jednakże stopniowe osiągnięcie *plateau* na krzywych kinetycznych, może świadczyć o braku możliwości wykorzystania tej techniki w celu detekcji zmian dla TSD powyżej 24 godzin. Dla dłuższych czasów po pozostawieniu plam sprawdziła się spektroskopia ramanowska. Technika ta, dzięki zastosowaniu obrazowania i dużej liczbie zarejestrowanych danych widmowych, pozwoliła na opracowanie skutecznych modeli klasyfikacyjnego PLS-DA i regresji PLSR w celu datowania plam krwi menstruacyjnej w czasie do dwóch tygodni po ich powstaniu. Wysokie wyniki oceny opracowanych modeli wskazały na duży potencjał ich zastosowania w praktyce sądowej.

Procesy biochemiczne zachodzące podczas przechowywania dwóch matryc biologicznych – ciała szklistego oka (VH) i homogenatu wątroby (LH), w trzech warunkach temperaturowych: -20, 4 i 20°C, zidentyfikowano przede wszystkim jako efekt rozkładu przez autolizę oraz aktywności bakterii gnilnych. Monitorowanie opisanych zmian było możliwe z wykorzystaniem spektroskopii ATR-FTIR. Jako potencjalne markery zmian biochemicznych w próbkach zaproponowano, przypisane do aminokwasów, pasma 1590 cm^{-1} dla VH i 1404 cm^{-1} dla LH. Monitorowanie zmian intensywności w obrębie tych pasm może pozwolić na ocenę stopnia degradacji próbek. Warto zaznaczyć, że żadne z zastosowanych warunków temperaturowych nie pozwoliły na całkowite zahamowanie zmian w składzie badanych matryc biologicznych, zatem w celu zapewnienia ich skutecznego przechowywania konieczne jest zastosowanie jeszcze niższych temperatur. W celu monitorowania stabilności substancji psychotropowych, istotnych z punktu widzenia badań sądowych, w dwóch badanych matrycach i trzech testowanych warunkach przechowywania, wykorzystano czułą metodę LC-MS z mikroekstrakcją do fazy stałej. Wykazano, że największą uwagę, podczas oznaczania w próbkach biologicznych przechowywanych przez pewien czas przed analizą, należy zwracać na kokainę, nordiazepam i wenlafaksynę, których stężenie znacząco zmieniało się podczas przechowywania we wszystkich badanych warunkach. Pokazano też, że matryca ciała szklistego oka zapewnia większą stabilność stężeń badanych ksenobiotyków niż matryca homogenatu wątroby.

Spektroskopia ramanowska z wykorzystaniem lasera z zakresu UV (199 i 239 nm) okazała się najlepszą metodą identyfikacji i odpowiedniej klasyfikacji zmian pośmiertnych w próbkach wątroby dla trzech badanych PMI – 0, 12 i 24 godziny. Szczególnie wykorzystanie linii lasera 199 nm pozwoliło na opracowanie modelu PLS-DA o skuteczności klasyfikacji trzech badanych PMI powyżej 80%, co wskazuje na duży potencjał jego praktycznego zastosowania. Kierunek zmian biochemicznych monitorowanych z wykorzystaniem tego lasera przypisano rozkładowi białek obecnych w próbkach. Wyniki dwóch pozostałych testowanych w aspekcie tego zastosowania metod spektroskopii w podczerwieni – ATR-FTIR i obrazowania transmisyjnego, również wskazały na pewne korzyści ich wykorzystania. Wyniki obrazowania pozwoliły na wnioskowanie o dystrybucji zmian zachodzących w próbkach i stwierdzenie o ich rozpoczęciu od krawędzi tkanki. Z kolei technika ATR-FTIR, ze względu na prostotę przygotowania próbki i samego pomiaru, umożliwiła szybkie przetestowanie różnych tkanek i płynów ustrojowych, wskazując na duży potencjał skorelowania z PMI zmian w obrębie ciała szklistego oka. W kontekście mechanizmu zachodzących zmian pośmiertnych, wszystkie trzy wykorzystane techniki spektroskopowe opierały się na monitorowaniu zmian zawartości biomolekuł w efekcie zachodzenia dwóch głównych procesów biochemicznych tj. rozkładu przez autolizę oraz syntezy nowych substancji w wyniku działalności bakterii gnilnych.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że nowoczesne, szybkie i pozwalające na znaczne skrócenie etapu przygotowania próbki techniki spektroskopowe mogą zostać z sukcesem wykorzystane w toku identyfikacji zmian biochemicznych w obrębie materiału biologicznego analizowanego na potrzeby zastosowań toksykologiczno-sądowych. Do analizy zmian zawartości ksenobiotyków w matrycy biologicznej, posłużyła natomiast metoda chromatografii cieczowej z czułym detektorem mas oraz nowoczesną i przyjazną środowisku techniką mikroekstrakcji do fazy stałej.