

Identyfikacja czaszki oficera polskiego zamordowanego w Katyniu przy pomocy badań polimorfizmu DNA.

Andrzej Ossowski*, Jarosław Piątek*, Andrzej Przewoźnik **, Grażyna Zielińska*, Piotr Waloszczyk*, Łukasz Szydłowski*, Mirosław Parafiniuk*

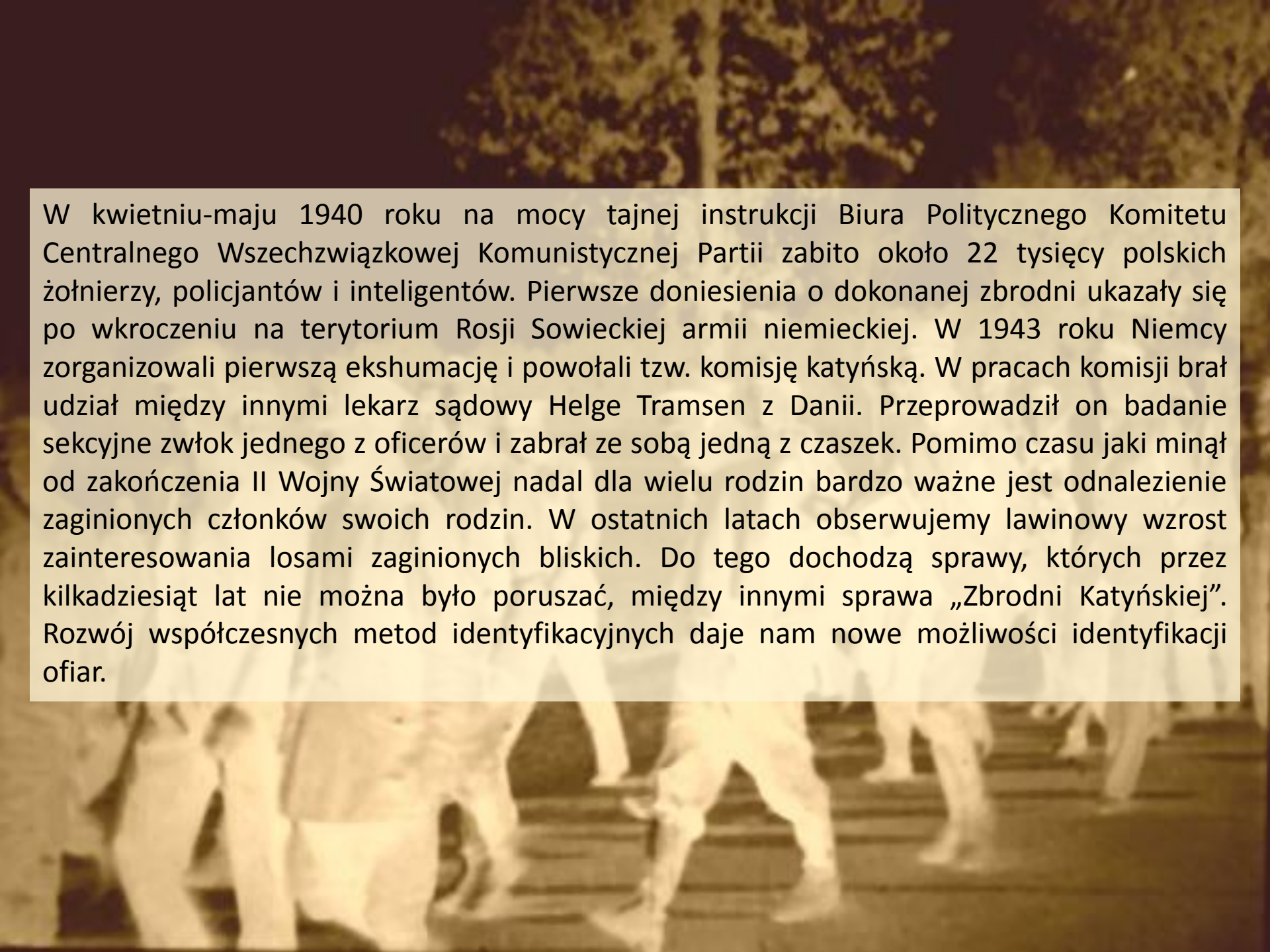
*Zakład Medycyny Sądowej Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

Kierownik: dr hab. n. med. Mirosław Parafiniuk,

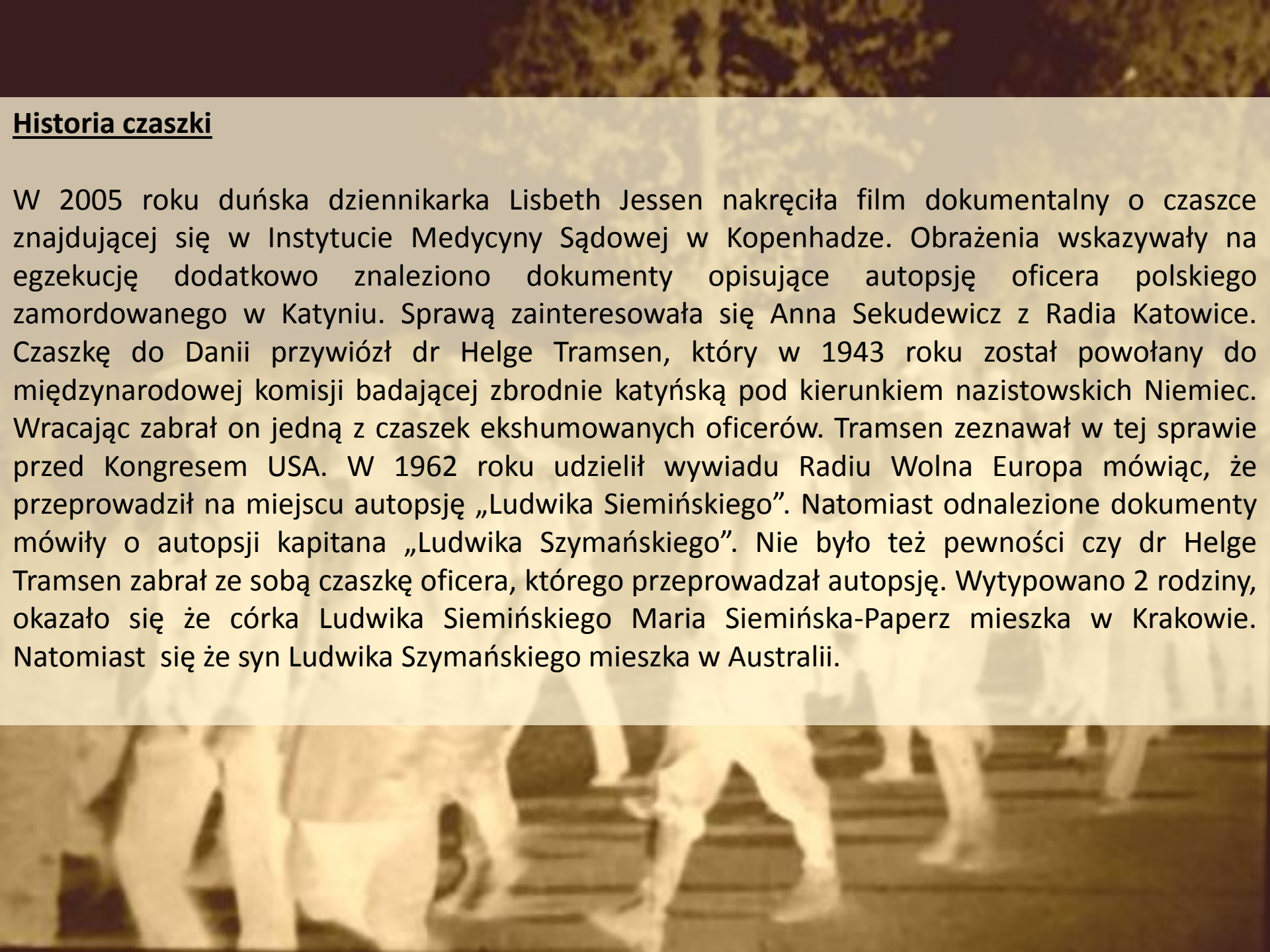
** Rada Ochrony Pamięci Walk i Męczeństwa w Warszawie

Przewodniczący ROPWiM: Władysław Bartoszewski,

Praca dedykowana
śp. Andrzejowi Przewoźnikowi



W kwietniu-maju 1940 roku na mocy tajnej instrukcji Biura Politycznego Komitetu Centralnego Wszechzwiązkowej Komunistycznej Partii zabito około 22 tysięcy polskich żołnierzy, policjantów i inteligentów. Pierwsze doniesienia o dokonanej zbrodni ukazały się po wkroczeniu na terytorium Rosji Sowieckiej armii niemieckiej. W 1943 roku Niemcy zorganizowali pierwszą ekshumację i powołali tzw. komisję katyńską. W pracach komisji brał udział między innymi lekarz sądowy Helge Tramsen z Danii. Przeprowadził on badanie sekcyjne zwłok jednego z oficerów i zabrał ze sobą jedną z czaszek. Pomimo czasu jaki minął od zakończenia II Wojny Światowej nadal dla wielu rodzin bardzo ważne jest odnalezienie zaginionych członków swoich rodzin. W ostatnich latach obserwujemy lawinowy wzrost zainteresowania losami zaginionych bliskich. Do tego dochodzą sprawy, których przez kilkadziesiąt lat nie można było poruszać, między innymi sprawa „Zbrodni Katyńskiej”. Rozwój współczesnych metod identyfikacyjnych daje nam nowe możliwości identyfikacji ofiar.



Historia czaszki

W 2005 roku duńska dziennikarka Lisbeth Jessen nakręciła film dokumentalny o czaszce znajdującej się w Instytucie Medycyny Sądowej w Kopenhadze. Obrażenia wskazywały na egzekucję dodatkowo znaleziono dokumenty opisujące autopsję oficera polskiego zamordowanego w Katyniu. Sprawą zainteresowała się Anna Sekudewicz z Radia Katowice. Czaszkę do Danii przywiózł dr Helge Tramsen, który w 1943 roku został powołany do międzynarodowej komisji badającej zbrodnię katyńską pod kierunkiem nazistowskich Niemiec. Wracając zabrał on jedną z czaszek ekshumowanych oficerów. Tramsen zeznawał w tej sprawie przed Kongresem USA. W 1962 roku udzielił wywiadu Radiu Wolna Europa mówiąc, że przeprowadził na miejscu autopsję „Ludwika Siemińskiego”. Natomiast odnalezione dokumenty mówiły o autopsji kapitana „Ludwika Szymańskiego”. Nie było też pewności czy dr Helge Tramsen zabrał ze sobą czaszkę oficera, którego przeprowadzał autopsję. Wytypowano 2 rodziny, okazało się że córka Ludwika Siemińskiego Maria Siemińska-Paperz mieszka w Krakowie. Natomiast się że syn Ludwika Szymańskiego mieszka w Australii.



CEL

Celem niniejszej pracy było pokazanie procesu identyfikacji osobniczej czaszki ludzkiej przywiezionej z Danii i potwierdzenie tezy jakoby była to czaszka należąca do oficera polskiego Ludwika SZYMAŃSKIEGO zamordowanego w Katyniu.



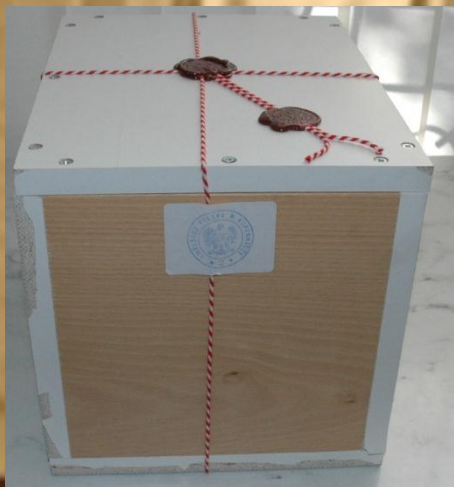
MATERIAŁ METODY

Materiałem do badań była czaszka ludzka przekazana przez Radę Ochrony Pamięci Walk i Męczeństwa. Czaszka została przywieziona z Danii z Zakładu Medycyny Sądowej w Kopenhadze. Po przywiezieniu jej z Katynia w 1943 roku przez doktora Helge Tramsena została wypreparowana i pokryta przezroczystą twardą substancją. Tak zakonserwowana przebywała do 2006 roku w Zakładzie Medycyny Sądowej w Kopenhadze. Została przywieziona przez sekretarza Rady Ochrony Pamięci Walk i Męczeństwa Andrzeja Przewoźnika i przekazana do badań.

Materiał porównawczy stanowiły próbki pobrane od członków rodzin 2 oficerów zamordowanych w Katyniu. Pobrano materiał od dzieci tych oficerów.

A - materiał porównawczy pobrany od Marii Siemińskiej - Paperz,

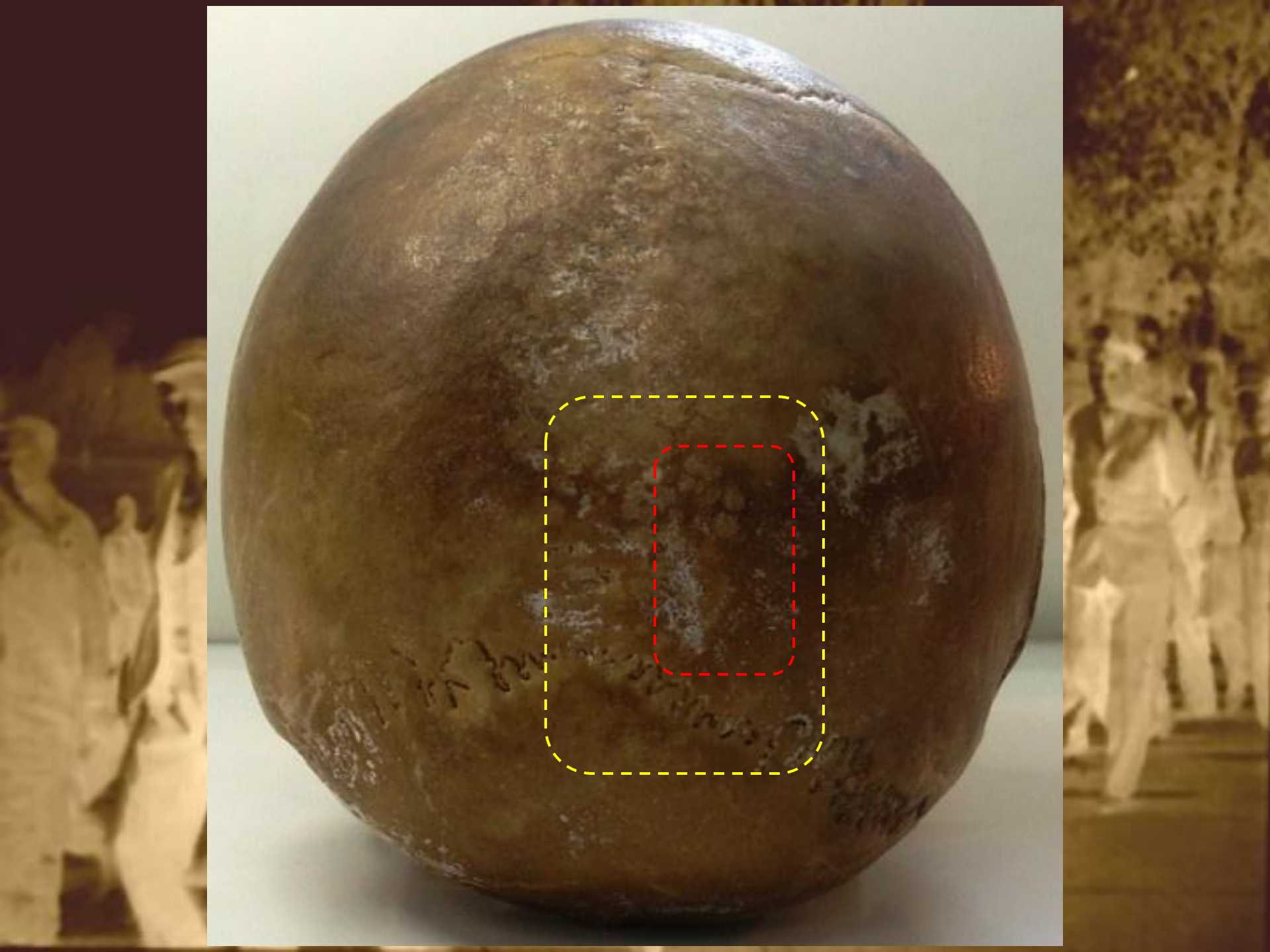
B- materiał porównawczy pobrany od Jerzego Szymańskiego.

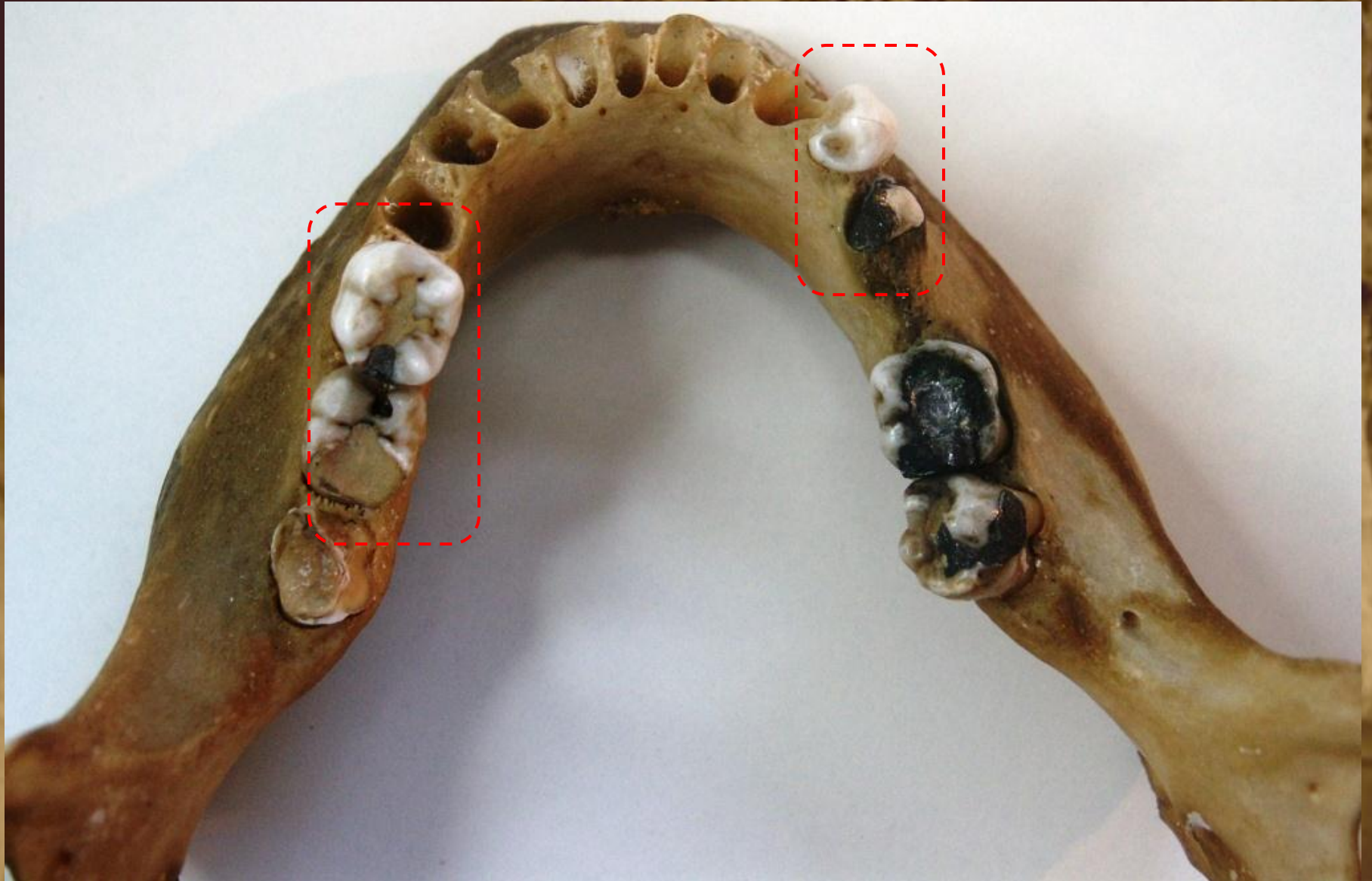




Z przekazanej do badań czaszki wraz z żuchwą pobrano próbki w postaci zębów i wycięto fragmenty tkanki kostnej. Wycięto 5 fragmentów tkanki kostnej. Przed wycięciem rejon z którego pobierano wycinki do badań przemyto roztworem podchlorynu sodu a następnie poddano działaniu światła UV przez 30 minut. Następnie zeszlifowano wierzchnią warstwę lakieru pokrywającego czaszkę, kolejnym krokiem było zeszlifowanie wierzchniej warstwy kości. Po zeszlifowaniu ponownie przemyto miejsce wytypowane do pobrania roztworem podchlorynu sodu i poddano działaniu światła UV. Wycięte fragmenty tkanki kostnej umieszczono w sterylnej tubie urządzenia FreezerMill, fragmenty mrożono przez 30 minut w środowisku ciekłego azotu a następnie skruszono. Tak przygotowany materiał w postaci pyłu kostnego zalewano buforem trawiącym o pH 8,0.

Materiał w postaci zębów oczyszczano z nalotu poprzez zeszlifowanie wierzchniej warstwy następnie kruszono w ciekłym azocie i postępowano dalej jak w przypadku kości.





Izolacja DNA tryb postępowania zaproponowany przez prof. Tadeusza Dobosza oraz Magdę Żołędziowską.

Trawienie:

Materiał inkubowano przez okres od 1 do 5 dni w temperaturze 55°C i kilkakrotnie worteksowano. Do próbki dodawano 100 µl proteinazy K (20mg/ml) na 1ml preparatu. Próbkę wirowano przez 1 minutę przy 10 000 obr/min, supernatant ściągano i przenoszono do probówek Eppendorfa.

Izolacja:

Do supernatantu dodawano odczynnika fenolowego pH 8,0 w stosunku 1:1, mieszano i odwirowano przy 10 000 obrotów przez minutę.

Następnie zbierano górną frakcję zawierającą DNA i przenoszono do nowej probówki Eppendorfa, pozostałość odrzucano. Kolejny raz dodawano odczynnika fenolowego pH 8,0 i postępowano jak poprzednio. Supernatant przenoszono do nowej probówki Eppendorfa, zalewano odczynnikiem chloroformowym pH 8,0 w stosunku 1:1 i mieszano, dalej wirowano przy 10 000 obr/min przez minutę. Odciągano supernatant do nowej probówki Eppendorfa.

Oczyszczanie produktu:

Supernatant oczyszczano zestawem QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN):

Supernatant mieszano z buforem PB według instrukcji producenta (w stosunku 1ml buforu PB, 0,4ml ekstraktu z DNA) i nakładano na kolumnę z krzemionką. Inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przy 10 000 obr/min przez 30-60s. Przesącz wylewano, a czynność powtarzano do momentu zużycia całości ekstraktu.

Kolumnę przemywano 0,75 ml buforu płuczącego PE i wirowano przy 10 000 obr/min przez minutę, następnie wylano przesącz i wirowano przy 13 000 obr/min przez minutę by osuszyć sącdek.

Na kolumnę nakładano 200µl buforu elucyjnego EB, pozostawiono w temperaturze pokojowej na 10 minut i wirowano przy 12 000 obr/min przez 1 minutę.

Oczyszczony ekstrakt mieszano z buforem PB i nanoszono na nową kolumnę. Proces oczyszczania powtarzano.

PCR:

Reakcje PCR przeprowadzono poprzez amplifikowanie uzyskanych izolatów zestawem komercyjnym **AmpFISTR® SGM Plus™**, firmy Applied Biosystems. W zestawie **AmpFISTR® SGM Plus™** amplifikowane są powtarzalne regiony następujących STR loci: D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA i marker amelogeniny.

Reakcje PCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera **Applied Biosystems GeneAmp 9700**. Analizę zamplifikowanych fragmentów przeprowadzono na urządzeniu ABI PRISM 310 Genetic Analyzer przy zastosowaniu oprogramowania Gene Scan i Genotyper Applied Biosystem. Do badań przygotowywano mieszaninę reakcyjną zgodną z zaleceniem producenta zestawu.

WYNIKI

UKŁAD ŚLAD	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	AMG	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
1/24h	-	-	-	-	XY	-	-	-	-	-	-
2/24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/48h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4/72h	15-16	-	-	-	XY	-	-	-	-	-	-
5/120h	15-16	16-18	9-13	-	XY	13-15	30.2-31.2	13-18	13-16	7-9.3	22-24
6Z/24h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

UKŁAD ŚLAD	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	AMG	D8S1179	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
A	17-18	16-18	12-14	17-19	XX	13-14	28-30	14-15	14-16	9-9.3	21-21
B	15-16	15-18	12-13	17-17	XY	13-15	28-30.2	15-18	12-16	6-9.3	22-24

Wynik obliczeń biostatystycznych wykazał dla pary NN-mężczyzna (domniemany ojciec) i Jerzy Szymański prawdopodobieństwo ojcostwa 99,99%. Obliczenia dokonano programem DNASat 1.1.

Zastosowany tryb postępowania oraz procedury postępowania z materiałem okazały się skuteczne i pozwoliły na jednoznaczną identyfikację badanego materiału. Udało się potwierdzić tezę jakoby czaszka przekazana z Zakładu Medycyny Sądowej w Kopenhadze należała do kpt **Ludwika Szymańskiego** zamordowanego w Katyniu.

