



Praca oryginalna
Original paper

Renata Jacewicz¹, Krzysztof Lewandowski², Joanna Rupa-Matysek², Maciej Jędrzejczyk¹, Jarosław Berent¹

Niebezpieczeństwa wynikające z profilowania DNA materiałów biologicznych pochodzących od osób po alogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT) w odniesieniu do analiz z zakresu genetyki sądowej

Dangers resulting from DNA profiling of biological materials derived from patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) with regard to forensic genetic analysis

¹Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej Zakładu Medycyny Sądowej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Polska

²Klinika Hematologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

¹Medical and Forensic Genetics Laboratory, Department of Forensic Medicine, Medical University of Lodz, Poland

²Department of Haematology and Bone Marrow Transplantation, Poznan University of Medical Sciences, Poznan, Poland

Streszczenie

Praca dokumentuje ryzyko wynikające z analizy DNA materiałów od pacjentów po alotransplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (allo-HSCT) w aspekcie genetyki sądowej. Badania chimeryzmu DNA u 30 osób po allo-HSCT przeprowadzono przy użyciu technik badawczych stosowanych we współczesnej genetyce sądowej, tj. reakcji real-time PCR oraz multiplex PCR-STR z wykorzystaniem autosomalnego DNA oraz markerów Y-DNA. Wyniki wskazują na to, że w większości przypadków profil DNA krwi biorców jest identyczny z profilem dawcy. Dlatego też badanie krwi może prowadzić do błędnego wnioskowania w identyfikacji osób, a także w analizie pokrewieństwa. Badanie wymazów z jamy ustnej wykazuje mieszaninę DNA u większości biorców. Mieszanina taka może uniemożliwić identyfikację osoby na podstawie śladu biologicznego o analogicznym pochodzeniu. Najbezpieczniejszym (ale nie idealnym) materiałem okazał się korzeń włosa. Jego analiza w oparciu o autosomalny DNA wykazała 100% profil biorcy. Jednak analiza przeprowadzona na podstawie markerów chromosomu Y u kobiet – biorców allo-HSCT od mężczyzn ujawniła DNA dawców w komórkach włosów, podobnie jak we krwi oraz wymazach z jamy ustnej. W świetle możliwych zagrożeń, wynikających z profilowania DNA w materiałach biologicznych pochodzących od osób po alotransplantacji w aspekcie sądowym zaproponowano wdrożenie działań, które te zagrożenia eliminują. Podstawowe z nich to odstąpienie od wyłącznego pobierania krwi zarówno do celów analizy pokrewieństwa, jak i identyfikacji osób, przeprowadzanie wywiadu w kierunku przebiecia allo-HSCT przed pobraniem materiału i wprowadzeniem profilu do bazy danych DNA oraz kontrolne profilowanie DNA w wątpliwych przypadkach z wykorzystaniem pobranych z cebulką włosów.

Słowa kluczowe: allo-HSCT, genetyka sądowa, chimeryzm dawcy, profilowanie DNA, krew, wymaz nabłonka, włosy, autosomalne DNA, Y-DNA.

Abstract

The study documents the risk that comes with DNA analysis of materials derived from patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) in forensic genetics. DNA chimerism was studied in 30 patients after allo-HSCT, based on techniques applied in contemporary forensic genetics, i.e. real-time PCR and multiplex PCR-STR with the use of autosomal DNA as well as Y-DNA markers. The results revealed that the DNA profile of the recipient's blood was identical with the donor's in the majority of cases. Therefore, blood analysis can lead to false conclusions in personal identification as well as kinship analysis. An investigation of buccal swabs revealed a mixture of DNA in the majority of recipients. Consequently, personal identification on the basis of stain analysis of the same origin may be impossible. The safest (but not ideal) material turned out to be the hair root. Its analysis based on autosomal DNA revealed 100% of the recipient's profile. However, an analysis based on Y-chromosome markers performed in female allo-HSCT recipients with male donors demonstrated the presence of donor DNA in hair cells – similarly to the blood and buccal swabs. In the light of potential risks arising from DNA profiling of biological materials derived from persons after allotransplantation in judicial aspects, certain procedures were proposed to eliminate such dangers. The basic procedures include abandoning the approach based exclusively on blood collection, both for kinship analysis and personal identification; asking persons who are to be tested about their history of allo-HSCT before sample collection and profile entry in the DNA database, and verification of DNA profiling based on hair follicles in uncertain cases.

Key words: allo-HSCT, forensic genetics, donor chimerism, DNA profiling, blood, buccal swab, hair, autosomal DNA, Y-DNA.

Wstęp

W związku ze starzeniem się społeczeństw i wydłużeniem czasu życia oraz nadmierną ekspozycją na działanie czynników ryzyka z roku na rok wzrasta zachorowalność na nowotwory, będące jednymi z najczęstszych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. W Polsce złośliwe nowotwory są główną przyczyną zgonów przed 65. rokiem życia (ok. 25%). Jak wynika z danych Zakładu Epidemiologii i Prewencji Nowotworów Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, zachorowalność na te choroby w Polsce wynosi ok. 140 000 rocznie, umieralność – ok. 95 000 rocznie, chorobowość – ok. 500 000 rocznie. Przewiduje się, że w 2020 r. liczba zachorowań wzrośnie do 160 000 przypadków. W obliczu tych schorzeń coraz częściej stosowaną metodą leczenia są transplantacje krwiotwórczych komórek macierzystych. Wykonuje się je w nowotworach myelo- i limfoproliferacyjnych, w nienowotworowych schorzeniach hematologicznych, metabolicznych i autoimmunizacyjnych, jak również w leczeniu guzów litych, takich jak rak nerki, sutka czy jajnika [1, 2]. Przeszczep alogenicznych komórek nie tylko zastępuje wadliwie funkcjonujący szpik biorcy, lecz ma także działanie antynowowo-

Introduction

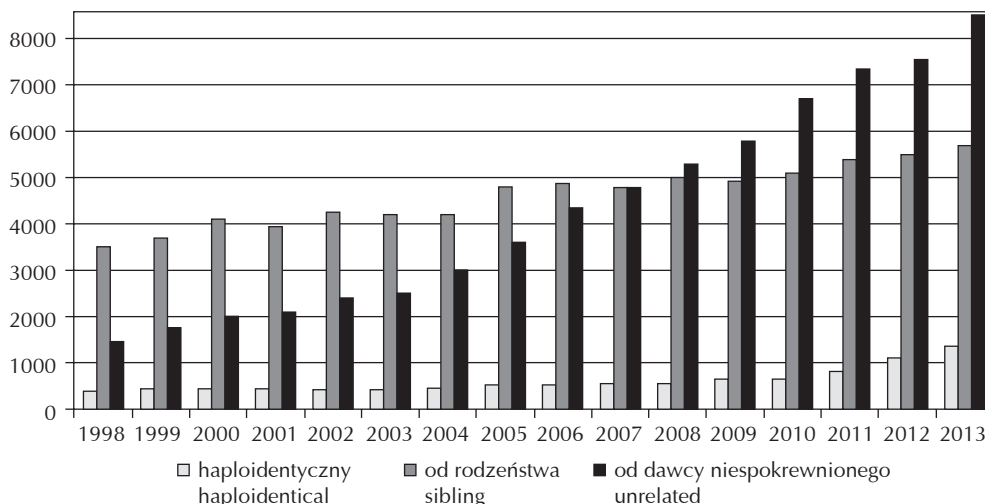
The incidence of cancers, which rank among some of the most common lifestyle diseases of the 21st century, is rising steadily year by year. The trend is attributable to the ageing of societies, increase in life expectancy and excessive exposure to risk factors. In Poland, malignant tumors are the main cause of death under 65 years of age (ca. 25%). Based on data collected by the Department of Epidemiology and Cancer Prevention, Maria Skłodowska-Curie Institute of Oncology in Warsaw, the annual incidence of the diseases in Poland is ca. 140 000, annual mortality – ca. 95 000 and annual prevalence – ca. 500 000. The number of new cases is expected to rise to 160 000 in 2020. In view of the current situation, hematopoietic stem cell transplantations are an increasingly used therapeutic option. They are performed in the treatment of proliferative diseases of the blood and lymphatic systems, non-cancerous hematologic conditions, metabolic and autoimmune disorders as well as solid tumors including kidney, breast or ovarian cancers [1, 2]. In addition to replacing the recipient's malfunctioning bone marrow, allogeneic cell transplantation also exhibits anticancer activity. High

tworowe. Duże nadzieje wiąże się również z jego oddziaływaniem regeneracyjnym na uszkodzone tkanki i narządy [3].

W ciągu ostatnich dwóch dekad nastąpił gwałtowny postęp w technikach przeszczepiania komórek macierzystych hematopoezy (HSCT) zarówno w Europie, jak i na całym świecie. Wprowadzenie kondycjonowania o zredukowanej intensywności otworzyło możliwości przeprowadzania HSCT u pacjentów w starszym wieku oraz ze schorzeniami towarzyszącymi chorobie nowotworowej [4]. Wzrost liczby dawców niespokrewnionych, częściowe pokonanie bariery HLA i możliwość wykorzystania krwiotwórczych komórek macierzystych z banków krwi pępowinowej poszerzył dostęp do HSCT pacjentów niemających zgodnego dawcy rodzinnego [5]. Według danych Europejskiej Grupy ds. Przeszczepiania Komórek Krwi i Szpiku (EBMT) w 2013 r. w Europie wykonano 14 950 allo-HSCT, a w ciągu ostatnich 15 lat nastąpił prawie 3-krotny wzrost ich liczby [6]. Co ważne, istotny wzrost nastąpił w liczbie przeszczepów od dawców w połowie zgodnych z biorcą w zakresie antygenów HLA, tj. haploidentycznych, a ponad 6-krotny w liczbie allo-HSCT od dawców niespokrewnionych, tj. 8587 w 2013 r. w porównaniu z 1417 w 1998 r. [6]. Na ryc. 1. przedstawiono wskaźniki dokumentujące wyżej opisaną tendencję wzrostową w liczbie allo-HSCT w Europie.

hopes are also being placed on the transplantation as a method of achieving regeneration of damaged tissues and organs [3].

Over the past two decades, there has been a rapid progress in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) techniques both in Europe and worldwide. The introduction of reduced intensity conditioning has opened up possibilities for performing HSCT in elderly patients and cancer patients with comorbidities [4]. The increase in the number of unrelated donors, partial crossing of the HLA barrier and the possibility of using hematopoietic stem cells from umbilical cord blood banks has increased the availability of HSCT to patients who do not have a compatible related donor [5]. According to data gathered by the European Group for Blood and Marrow Transplantation, a total of 14 950 allo-HSCT procedures were carried out in Europe in 2013, and their number has risen nearly threefold over the past 15 years [6]. Importantly, there has been a significant increase in the number of transplantations from donors half-matched to the recipients in terms of HLA antigens, i.e. haploidentical, and an over six-fold increase in the number of allo-HSCT from unrelated donors, i.e. 8,587 in 2013 compared to just 1,417 in 1998 [6]. Figure 1 illustrates the above-mentioned growth trends in the number of allo-HSCT procedures in Europe.



Rycina 1. Wskaźniki częstości wykonywania allo-HSCT w Europie na przestrzeni 15 lat wg Europejskiej Grupy ds. Przeszczepiania Komórek Krwi i Szpiku (EBMT) [6]

Figure 1. Allo-HSCT rates in Europe showing 15-year trends according to the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) [6]

W obliczu rosnącej z roku na rok liczby przeszczepów alogenicznych, jak również liczby dawców niespokrewnionych, podjęto się oceny konsekwencji mogących wynikać z analizy polimorfizmu genetycznego w najczęściej badanych materiałach w praktyce genetyczno-sądowej, tj. we krwi, komórkach nabłonka z jamy ustnej i komórkach korzenia włosa, pochodzących od osób po allo-HSCT. Uzyskane wyniki miały dać odpowiedź na pytania: czy zatajenie faktu przebycia alograftacji niesie zagrożenie skutkujące zafałszowaniem tożsamości osoby w badaniach z zakresu identyfikacji czy też analizy pokrewieństwa i co się z tym wiąże – wydaniem błędnej ekspertyzy genetyczno-sądowej. W przypadku uzyskania pozytywnej odpowiedzi istotne było też ustalenie, jaka jest skala tego zagrożenia w zależności od rodzaju badanego materiału, jak również zaproponowanie działań eliminujących to zagrożenie.

Materiał i metody

Materiał badawczy pobrano od 30 pacjentów Kliniki Hematologii i Transplantacji Szpiku Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu po alogenicznym przeszczepieniu komórek macierzystych hematopoezy (allo-HSCT). Najczęstszym wskazaniem do transplantacji była ostra białaczka szpikowa (53,3%), a w następnej kolejności: przewlekła białaczka szpikowa (23,3%), ostra białaczka limfoblastyczna (10%), anemia aplastyczna i chłoniak Hodgkina (po 6,7%). Biorcy otrzymali krwiotwórcze komórki macierzyste pobrane z krwi obwodowej (76,7%), bezpośrednio ze szpiku kostnego (16,7%) bądź z obu tych źródeł (6,7%). Pacjenci przed przeszczepieniem byli poddawani leczeniu kondycjonującemu z przygotowaniem niemieloablacyjnym (53,3%) lub mieloablacyjnym (46,7%). Większość biorców (76,7%) otrzymała krwiotwórcze komórki macierzyste od dawców rodzinnych, a pozostali (23,3%) od dawców niespokrewnionych. W 10 parach dawca i biorca byli tej samej płci, w tym w 6 przypadkach dawcami były kobiety. W 20 parach występowała różnica płci między dawcą a biorcą, w tym w 14 przypadkach dawcami byli mężczyźni. Charakterystykę pacjentów po allo-HSCT zawarto w tabeli I.

Przedmiotem badania były trzy różne materiały pochodzące od każdego z biorców, po upływie min. miesiąca i przed upływem 8 lat po allo-HSCT, tj.:

In view of year-by-year increases in the number of allogeneic transplantations and unrelated donors, an attempt was undertaken to assess consequences potentially arising from the analysis of genetic polymorphism in materials which are most commonly examined in forensic genetic practice, i.e. in the blood, epithelial cells from the oral cavity and hair root cells, sampled from post-allo-HSCT patients. The study was aimed to determine whether the concealment of the fact of undergoing allotransplantation carries a risk of falsification of identity in personal identification or kinship analysis and, hence result in the issue of erroneous forensic genetic opinions. If the above risk proved to be well-founded, further aims of the study were to assess its scale depending on the type of material under investigation, and to propose measures to eliminate the risk.

Material and methods

The study material was harvested from 30 people who have undergone allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT), patients treated at the Department of Hematology and Bone Marrow Transplantation, Poznań University of Medical Sciences. The most common indication for the transplantation was acute myeloid leukemia (53.3%) followed by chronic myeloid leukemia (23.3%), acute lymphoblastic leukemia (10%), aplastic anemia and Hodgkin's lymphoma (each 6.7%). The recipients received hematopoietic stem cells harvested from peripheral blood (76.7%), directly from the bone marrow (16.7%) or from both sources (6.7%). Prior to the transplantation the patients underwent non-myeloablative conditioning therapy (53.3%) or myeloablative conditioning therapy (46.7%). The majority of recipients (76.7%) received hematopoietic stem cells from related donors, and the remaining group (23.3%) from unrelated donors. In ten pairs, the donor and recipient were of the same sex, including six female donors. In twenty pairs, the donors and recipients were of different sex, including fourteen male donors. The characteristics of post-allo-HSCT patients are shown in Table I.

The study was performed with three different materials harvested from each of the recipients at least one month and not later than 8 years after

Tabela I. Charakterystyka pacjentów i wyników badań chimeryzmu we krwi, wymazach policzkowych i włosach pobranych po allo-HSCT na podstawie układu STR autosomalnego (Y-chromosomowego) DNA
Table I. Characteristics of patients and results of chimerism studies in blood, buccal swabs and hair follicles taken after allo-HSCT based on STR markers of autosomal (Y-chromosomal) DNA

Nr No.	Allo-HSCT				% donorowego DNA autosomalny (Y-chromosomowy) DNA % donor DNA autosomal (Y-chromosomal) DNA		
	dawca – biorca donor – recipient		dni po zabiegu days after	leczenie pretreatment	krew blood	wymaz policzkowy buccal swab	cebülki włosów hair follicles
1	F-M	S	508	MA	100	18	0
2	M-M	S	574	NMA	100	57	0
3	M-F	S	329	MA	100(+)	22(+)	0(+)
4	F-F	S	679	MA	100	24	0
5	F-F	S	450	MA	100	38	0
6	F-F	S	345	NMA	100	11	0
7	M-M	S	104	NMA	100	29	0
8	M-M	UR	126	MA	100(+)	0(12)	0(-)
9	F-M	UR	209	MA	100	0	0
10	M-F	S	516	MA	100(+)	67(+)	0(+)
11	F-M	UR	1145	NMA	100	32	0
12	M-F	S	103	NMA	100(+)	0(+)	0(+)
13	F-F	UR	809	NMA	100	45	0
14	F-F	S	816	NMA	75	18	0
15	F-M	S	71	MA	100	0	0
16	F-F	S	496	NMA	100	52	0
17	F-M	UR	82	MA	63	0	0
18	M-F	S	603	MA	100(+)	54(+)	0(+)
19	M-M	UR	32	MA	100(+)	15(15)	0(-)
20	M-F	S	607	NMA	100(+)	53(+)	0(+)
21	M-F	S	246	NMA	100(+)	65(+)	0(+)
22	M-F	S	781	NMA	100(+)	33(+)	0(-)
23	M-F	S	2381	NMA	93(+)	0(+)	0(+)
24	M-F	S	822	MA	100(+)	58(+)	0(+)
25	M-F	S	2009	NMA	78(+)	45(+)	0(+)
26	M-F	S	2764	NMA	100(+)	28(+)	0(-)
27	M-F	S	2233	NMA	100(+)	61(+)	0(+)
28	M-F	UR	2421	MA	96(+)	0(+)	0(+)
29	M-F	S	2738	MA	100(+)	20(+)	0(-)
30	F-M	S	2726	NMA	100	0	0

M – mężczyzna; F – kobieta; S – rodzeństwo; UR – niespokrewniony; (+) wykryto; (-) nie wykryto; MA – mieloablacyjne; NMA – niemieloablacyjne

M – male; F – female; S – sibling; UR – unrelated; (+) detected; (-) undetected; MA – myeloablative; NMA – nonmyeloablative

krw obwodowa, wymaz komórek nabłonka z jamy ustnej oraz włosy z cebulkami. Na pobranie wyżej wymienionych materiałów i przeprowadzenie opisanych badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz Komisji Bioetyki przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu. Jako materiał referencyjny wykorzystano izolaty DNA z krwi obwodowej, pobranej od biorców przed przeszczepem oraz od ich dawców. Każdorazowo uzyskano oświadczenie zawierające świadomą zgodę osoby biorącej udział w badaniu.

Izolację genomowego DNA z materiałów pobranych od osób po aloprzeszczepieniu wykonywano z zastosowaniem metody kolumnkowej, z wykorzystaniem membran jonowymiennych z zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology). DNA izolowano kolejno z pobranej na EDTA krwi obwodowej w ilości 50 µl, pobranego na jałową wymazówkę wymazu z jamy ustnej oraz z 4–12 sztuk ok. jednocentymetrowych fragmentów włosów zawierających korzeń włosa i część trzonu włosa. Wyizolowane DNA zawieszano następnie w jałowej wodzie w objętości odpowiednio: krew i wymaz – 30 µl, włosy – 10–20 µl.

Ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono przy użyciu termocyklera 7500 Real-Time PCR oraz oprogramowania HID Real-Time PCR Analysis v.1.1 (Applied Biosystems) z zastosowaniem zestawu PowerQuant System (Promega) wg zaleceń producenta [7]. Reakcję multiplex PCR w zakresie 15 markerów autosomalnego DNA i *locus* płci (AMG) w materiałach pobranych od wszystkich biorców przed i po allo-HSCT przeprowadzono z użyciem zestawu AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) wg zaleceń producenta [8]. Następnie przeprowadzono amplifikację w zakresie 17 markerów chromosomu Y, specyficznych dla płci męskiej, z użyciem systemu AmpFℓSTR Yfiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) [8] w materiałach referencyjnych oraz w materiałach po przeszczepieniu w sytuacji, kiedy dawcą był mężczyzna, a biorcą kobieta lub kiedy parę dawca–biorca stanowili niespokrewnieni ze sobą mężczyźni. Produkty PCR rozdzielano na automatycznym sekwenatorze w odniesieniu do standardu wielkości LIZ 500 (Applied Biosystems).

Do obliczenia procentowego udziału DNA dawcy, tzw. chimeryzmu dawcy, w badanych materiałach pochodzących od biorców po alogenicznym prze-

allo-HSCT, i.e. peripheral blood, epithelial cells obtained from buccal swabs and hair with follicles. The sampling of the materials enumerated above and the conduct of the studies were approved by the Bioethics Committee at the Medical University of Łódź and the Bioethics Committee at the Poznań University of Medical Sciences. The reference material used in the study comprised DNA isolates from peripheral blood collected from the recipients before the transplantation and from their donors. Each of the participants of the study provided a statement containing their informed consent to participation.

The isolation of genomic DNA from materials sampled from allotransplantation patients was performed by the column method using ion-exchange membranes from the Sherlock AX kit (A&A Biotechnology). DNA was isolated consecutively from peripheral blood (50 µl) collected on EDTA, oral cavity samples taken using sterile swabs, and 4–12 hair fragments, one centimeter in length, containing the hair root and a part of the hair shaft. Isolated DNA was then suspended in sterile water in the following volumes: blood and oral swabs – 30 µl, hair – 10–20 µl.

The quantitative real-time PCR reaction was conducted using a 7500 Real-Time PCR thermal cycler and HID Real-Time PCR Analysis v.1.1 software (Applied Biosystems) based on the PowerQuant System kit (Promega) in accordance with the manufacturer's recommendations [7]. The multiplex PCR reaction for 15 markers of autosomal DNA and sex *locus* (AMG) in materials collected from all recipients before and after allo-HSCT was carried out with AmpFℓSTR Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), following the manufacturer's recommendations [8]. Next, the amplification was performed for 17 markers of the male-specific Y chromosome, using AmpFℓSTR Yfiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) [8] in the reference materials and in post-transplantation material when the donor was a man and the recipient – a woman, or when the donor-recipient pair consisted of unrelated men. The PCR products were separated in an automatic sequencer in reference to the 500 LIZ Size Standard (Applied Biosystems).

The percentage of donor DNA, i.e. the so-called donor chimerism, in the study materials derived from recipients after allogeneic hematopoietic stem

szczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych wykorzystano wzory opracowane przez Nollet i wsp. [9]. Analiza pola powierzchni pików pod allelami, będącego wykładnikiem siły sygnału fluorescencji i odzwierciedlającego ilość produktu PCR, pozwoliła na ustalenie zawartości DNA oraz ilości komórek dawcy w materiałach biorcy po przeszczepie. Wyłączny profil biorcy i wyłączny profil dawcy w badanym materiale odpowiadał wartościom chimeryzmu wynoszącym odpowiednio 0% i 100%.

Wyniki

Wyniki analizy chimeryzmu donorowego z obliczeniem procentowej zawartości komórek dawcy w materiałach pochodzących od biorcy aloprzeszczepu, tj. we krwi, wymazie z jamy ustnej i w komórkach włosów, zestawiono w tabeli I.

W reakcji real-time PCR we krwi potransplantacyjnej pochodzącej od biorców mężczyzn, dla których dawcą była kobieta, za wyjątkiem pacjenta nr 17, nie ujawniono w ogóle lub ujawniono śladową ilość Y-DNA w przedziale 18–46 pg/μl w tle 2,06–315,38 ng/μl autosomalnego DNA. Odpowiadało to zaledwie kilku komórkom biorcy przypadającym na jeden mikrolitr jego krwi, obecnym w tle kilkuset – kilkudziesięciu tysięcy komórek dawcy i świadczyło o prawie kompletnym zastąpieniu patologicznego krwiotworzenia pacjenta prawidłowym krwiotworzeniem zdrowego dawcy. Analiza ilościowa rozkładu cech w zakresie oznaczanych układów STR autosomalnego DNA potwierdziła wcześniejsze wyniki, wykazując na 100% chimeryzm dawcy we krwi obwodowej większości biorców, tj. u 25 spośród 30 (83,3% badanych). Jedynie w przypadku pięciu biorców (16,7%) we krwi ujawniono mieszaninę DNA z przeważającą zawartością frakcji dawcy w przedziale 63–96%. Pełną konwersję profilu DNA krwi biorcy w profil DNA dawcy we krwi po allo-HSCT obrazuje rycina 2.

Autosomalny DNA pochodzący z wymazów komórek nabłonka z jamy ustnej, pobranych od pacjentów po allo-HSCT, w przeważającej ich liczbie dał obraz mieszanego profilu świadczącego o współistnieniu dwóch frakcji komórkowych – dawcy i biorcy. W wymazach pochodzących od 22 pacjentów (73,3% wszystkich badanych) ujawniono 11–67% DNA dawcy. W wymazach 8 pozostałych

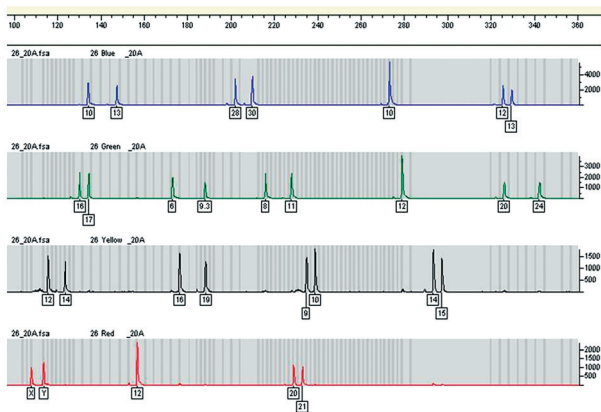
cell transplantation was calculated using formulas developed by Nollet *et al.* [9]. An analysis of the peak area under alleles, which indicates the fluorescence signal strength and reflects the amount of the PCR product, made it possible to determine the content of donor DNA and cell count in the recipient's materials after the transplantation. The exclusive recipient profile and exclusive donor profile in the study material corresponded to the chimerism values of 0% and 100%, respectively.

Results

The results of donor chimerism analysis along with calculations of donor cell percentages in materials collected from allotransplant recipients, i.e. in the blood, oral swabs and hair cells, are listed in Table I.

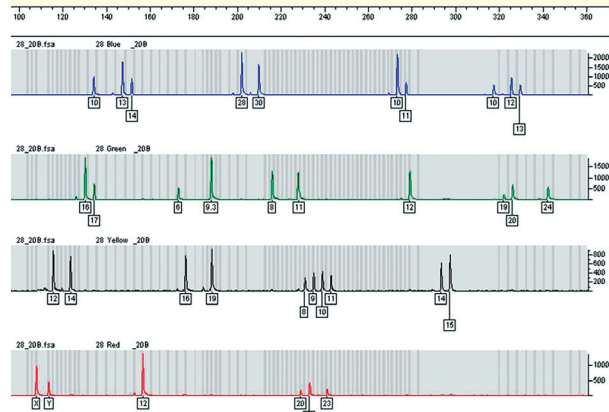
Based on the real-time PCR reaction, post-transplantation blood sampled from male recipients whose donors were female (with the exception of patient no. 17), failed to reveal or only revealed a trace amount of Y-DNA in the range of 18–46 pg/μl against 2.06–315.38 ng/μl of autosomal DNA. This value is equivalent to just a few of the recipient's cells being present in one microliter of the recipient's blood – in contrast to several hundred up to a few dozen thousands of the donor's cells. The ratio thus shows that the patient's pathological hematopoiesis was nearly completely replaced by normal hematopoiesis of the healthy donor. A quantitative analysis of the distribution of traits within the range of assayed STR systems of autosomal DNA corroborated previous results, revealing complete donor chimerism (100%) in the peripheral blood of the majority of recipients, i.e. in 25 out of 30 (83.3% of the study subjects). Only in the case of five recipients (16.7%), blood analysis demonstrated a DNA mixture with a prevailing content of the donor fraction in the range of 63–96%. A full conversion of the recipient's blood DNA profile into the donor's blood DNA profile after allo-HSCT is shown in Figure 2.

Autosomal DNA isolated from buccal swab epithelial cells derived from patients after allo-HSCT revealed mixed profiles in a predominant number of cases, which points to the coexistence of two cell fractions: those of the donor and those of the recipient. Swabs harvested from 22 patients (73.3% of



Ryc. 2. Wyniki analizy autosomalnego DNA we krwi jednej z kobiet – biorcy allo-HSCT od mężczyzny – obrazują 100-procentowy chimeryzm dawcy

Fig. 2. Results of autosomal DNA analysis in the blood of one of the female – allo-HSCT recipient from a male donor – revealing 100% donor chimerism



Ryc. 3. Wyniki analizy autosomalnego DNA w wymazie z jamy ustnej jednej z kobiet – biorcy allo-HSCT od mężczyzny – obrazują 53-procentowy chimeryzm dawcy

Fig. 3. Results of autosomal DNA analysis in the buccal swab of one female – allo-HSCT recipient from a male donor – revealing 53% donor chimerism

(26,7%) pacjentów ujawniono wyłącznie ich własne, autosomalne DNA bez domieszki DNA dawcy pomimo tego, że 5 spośród tych pacjentów było poddanych kondycjonowaniu mieloablacyjnym przed przeszczepem. Zebrane w tabeli I wyniki nie wskazują na istnienie zależności między obecnością donorowego DNA w materiałach badanych biorców a rodzajem zastosowanego przygotowania do przeszczepu czy też okresem, jaki upłynął od przeszczepu. Średnia wartość chimeryzmu dawcy w zakresie autosomalnego DNA w wymazach z jamy ustnej wyniosła 28,2%, co świadczy o tym, że w wymazach u większości biorców dominowała frakcja ich własnych komórek. Przykładowy wynik ujawniający mieszaninę DNA w zakresie markerów autosomalnego DNA w wymazie z jamy ustnej pobranym po allo-HSCT przedstawiono na rycinie 3.

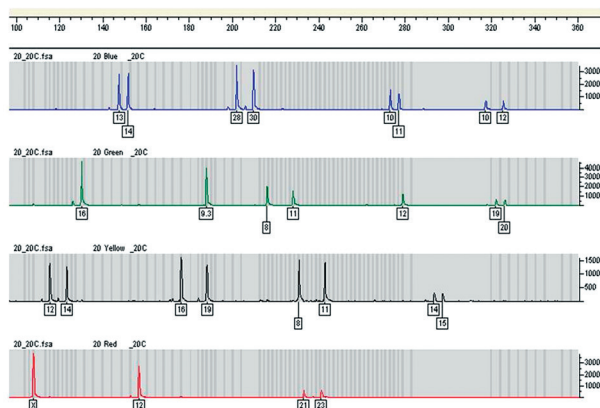
Analiza markerów autosomalnego DNA w materiale genetycznym wyizolowanym z komórek włosów wszystkich badanych biorców po allo-HSCT nie wykazała w żadnym przypadku frakcji DNA dawcy. W ich włosach w zakresie systemu AmpF ℓ STR^{Identifiler} oznaczono wyłącznie autologiczne profile DNA, analogicznie jak w przypadku analizy przedstawionej na rycinie 4.

Niezależnie od analizy autosomalnej, w sytuacji kiedy dawcą był mężczyzna, a biorcą kobieta bądź kiedy parę dawca–biorca stanowili niespokrewnieni

all study subjects) revealed between 11% and 67% of donor DNA. Swabs from eight remaining patients (26.7%) revealed only their own autosomal DNA, without any donor DNA, even though five of them had undergone myeloablative conditioning therapy before the transplantation. The results presented in Table 1 fail to display any correlation between the presence of donor DNA in the material collected from the studied recipients and the type of pre-transplantation preparation used or the period that passed from the transplantation. The mean percentage of donor chimerism with respect to autosomal DNA present in buccal swabs was 28.2%, which shows that swabs collected from the majority of recipients were dominated by their own cell fractions. A sample result revealing a DNA mixture in autosomal DNA markers for a buccal swab collected after allo-HSCT is shown in Figure 3.

An analysis of autosomal DNA markers in genetic material isolated from hair cells of all allo-HSCT recipients included in the study failed to detect donor DNA fractions in any of the cases. Hair tests conducted in the AmpF ℓ STR^{Identifiler} range only yielded autologous DNA profiles, similarly to the analysis shown in Figure 4.

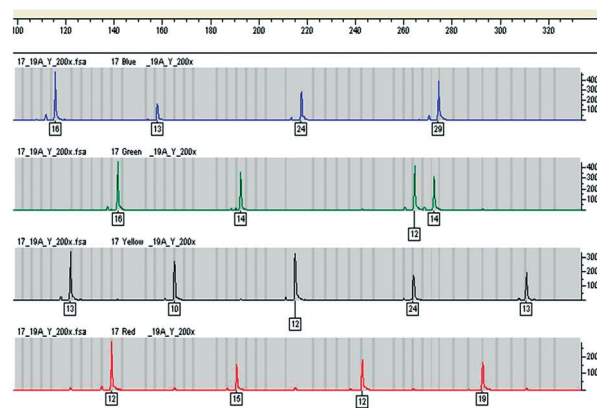
Independently of autosomal analysis, in cases with male donors and female recipients or donor-recipient pairs involving two unrelated men,



Ryc. 4. Wyniki analizy autosomalnego DNA w komórkach włosów jednej z kobiet – biorcy allo-HSCT od mężczyzny – nie ujawnił donorowego DNA
Fig. 4. Results of autosomal DNA analysis in the hair cells of one female – allo-HSCT recipient from a male donor – does not reveal donor DNA

ze sobą mężczyźni, DNA pochodzące z materiałów przed- i potransplantacyjnych poddano amplifikacji z użyciem systemu AmpFℓSTR® Yfiler. Bardzo interesującymi materiałami z punktu widzenia analizy polimorfizmu w obrębie markerów chromosomu Y były materiały pobrane od dwu biorców mężczyzn, dla których dawcami byli niespokrewnieni z nimi mężczyźni. Niespokrewnieni mężczyźni z reguły charakteryzują się zróżnicowaniem w obrębie haplotypu Y, który jest charakterystyczny dla określonej męskiej linii rodowej. Zróżnicowanie to obserwowano również przy analizie referencyjnych haplotypów Y dawcy i biorcy. W materiałach pobranych po przeszczepie wykazano natomiast zróżnicowanie Y-DNA w zależności od tego, czy analizowano DNA pochodzące z krwi, wymazu czy też z włosów biorcy. We krwi obu badanych biorców ujawniono haplotyp Y ich niespokrewnionych dawców, a we włosach wyłącznie ich własny haplotyp Y. W wymazach pobranych z jamy ustnej oznaczono mieszaninę męskiego materiału genetycznego, przy czym w wymazie jednego biorcy ujawniono 12%, a w wymazie drugiego 15% DNA dawcy. Wyniki badań uzyskane dla jednego z badanych biorców zaprezentowano na rycinach 5–7.

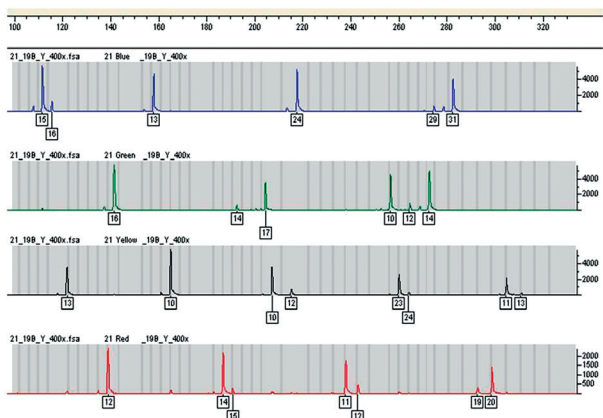
Druga grupa biorców z przeciwnymi płciowo dawcami to kobiety, którym przeszczepiono krwiotwórcze komórki macierzyste od męskiego dawcy. We wszystkich potransplantacyjnych próbach krwi, wymazach z jamy ustnej, jak również we



Ryc. 5. Wyniki analizy Y-DNA we krwi mężczyzny po allo-HSCT od niespokrewnionego z nim mężczyzny obrazują haplotyp Y dawcy
Fig. 5. Results of Y-DNA analysis in the blood of a recipient – male after allo-HSCT from an unrelated male – revealing donor Y-haplotype

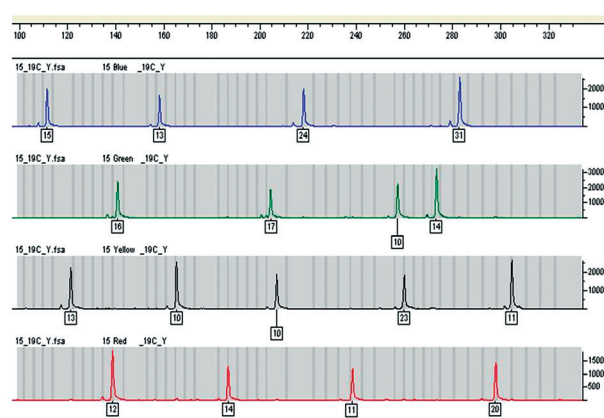
DNA isolated from pre- and post-transplantation materials was amplified using an AmpFℓSTR® Yfiler. From the viewpoint of analyzing polymorphism within markers of the Y chromosome, very interesting findings were obtained in material collected from two male recipients whose donors were unrelated men. Unrelated men as a rule display variation within the Y haplotype which is characteristic for a specific ancestral male lineage. The variation was also observed in analyses of reference Y haplotypes of the donor and recipient. Materials harvested after the transplantation, in contrast, demonstrated Y-DNA variation depending on whether the DNA under analysis was derived from the recipient's blood, buccal swab or hair. The blood of both recipients under study revealed the Y haplotype of their unrelated donors, while their hair only contained their own Y haplotype. Buccal swabs, on the other hand, yielded a mixture of male genetic material. The swab taken from one recipient revealed 12% and the other 15% of donor DNA. The results obtained for one of the studied recipients are shown in Figures 5, 6 and 7.

The other group of recipients with donors of the opposite sex are women who were transplanted hematopoietic stem cells from male donors. All post-transplantation blood samples and buccal swabs, as well hair samples collected from 11 out of



Ryc. 6. Wyniki analizy Y-DNA w wymazie z jamy ustnej mężczyzny po allo-HSCT od niespokrewnionego z nim mężczyzny obrazują domieszkę 15% Y-DNA dawcy

Fig. 6. Results of Y-DNA analysis in the buccal swab of recipient – male after allo-HSCT from an unrelated male – revealing an admixture of 15% Y-donor DNA



Ryc. 7. Wyniki analizy badań Y-DNA w komórkach włosów mężczyzny po allo-HSCT od niespokrewnionego z nim mężczyzny obrazują haplotyp Y biorcy
Fig. 7. Results of Y-DNA analysis in the hair cells of a recipient – male after allo-HSCT from an unrelated male – revealing recipient Y-haplotype

włosach 11 z 14 badanych biorców – kobiet (78,6%) ujawniono haplotyp Y-STR (tab. I).

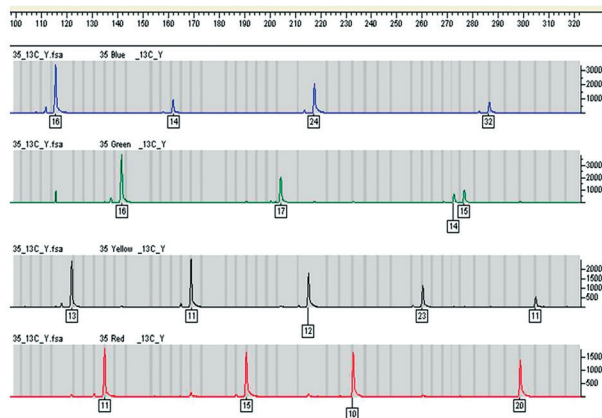
Haplotyp Y męskiego dawcy oznaczony w komórkach włosów jednej z kobiet biorcy allo-HSCT, analogiczny do haplotypu Y oznaczonego wcześniej w jej krwi i wymazie po przeszczepie, obrazuje rycina 8. Uzyskane wyniki badań w zakresie markerów STR-Y mylnie sugerują, że nie tylko krew czy wymaz, lecz także włosy po allo-HSCT pochodzą od mężczyzny, a nie, jak jest w istocie, od kobiety.

Stanowi to potwierdzenie wyników analizy metodą real-time PCR, która też wykazała obecność sekwencji chromosomu Y we wszystkich materiałach biorców – kobiet po allo-HSCT, tj. nie tylko we krwi i wymazach, lecz także w ich włosach. Co istotne, analiza materiałów referencyjnych nie ujawniła markerów chromosomu Y u żadnej z pacjentek przed przeszczepem. Wyniki selektywnej amplifikacji Y-DNA we krwi, wymazie oraz włosach jednej z biorców kobiet po allo-HSCT od dawcy mężczyzny, jak również w materiałach biorcy i dawcy pobranych przed allo-HSCT obrazuje rycina 9. Brak produktów PCR w materiałach pobranych przed przeszczepem świadczy o tym, że ujawnienie Y-DNA dawcy we krwi, wymazach z jamy ustnej i włosach pacjentek było wyłącznie następstwem przebytego przez nie przeszczepu komórek macierzystych hematopojezy.

14 studied female recipients (78.6%) demonstrated the presence of the Y-STR haplotype (Table I).

The Y haplotype of a male donor detected in the hair cells of one of the female allo-HSCT recipients, analogous to the Y haplotype previously determined in the woman's blood and buccal swab after the transplantation, is presented in Figure 8. The study results for Y-STR markers suggest erroneously that not only the blood and the swab but also the hair after allo-HSCT comes from a man, which is not the case.

The finding thus corroborates the results obtained by real-time PCR which also demonstrated the presence of Y chromosome sequences in all materials derived from female donors after allo-HSCT, i.e. not only in the blood and buccal swabs but also in their hair. Importantly, an analysis of reference materials failed to detect markers of the Y chromosome in any of the patients before the transplantation. The results of selective Y-DNA amplification in the blood, buccal swab and hair of one of the female recipients after allo-HSCT from a male donor and in the material collected from the recipient and donor prior to allo-HSCT are shown in Figure 9. The absence of PCR products in materials harvested before the transplantation shows that the detection of donor Y-DNA in the blood, buccal swabs and hair of female patients was exclusively a consequence of the fact that they underwent hematopoietic stem cell transplantations.



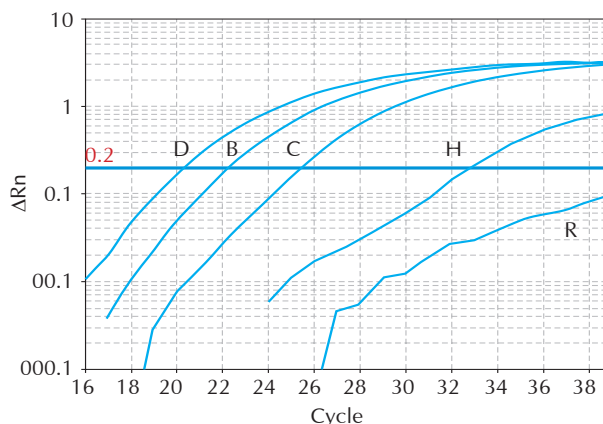
Ryc. 8. Wyniki analizy badań Y-DNA we włosach jednej z kobiet – biorcy allo-HSCT – obrazują haplotyp Y męskiego dawcy, analogiczne do haplotypu Y dawcy ujawnionego w jej krwi i wymazie z jamy ustnej (dane nieprezentowane)

Fig. 8. Results of Y-DNA analysis in the hair of one female – recipient after allo-HSCT – reveal Y-haplotype of male donor, analogous to that revealed in her blood and buccal swab (data not shown)

Dyskusja

Centralny dogmat genetyki sądowej mówi, że wszystkie komórki wchodzące w skład jednego organizmu mają identyczny, unikalny profil DNA, który nie zmienia się w czasie życia osobniczego [10]. Dlatego też możliwe jest porównywanie profilu DNA ujawnionego np. we włosie zabezpieczonym na odzieży lub miejscu zdarzenia z profilem DNA oznaczonym w materiale porównawczym (ślina lub krew) [11]. W szczególnych przypadkach dogmat ten może zostać obalony. Istnieją doniesienia świadczące o tym, że poszczególne tkanki mogą się różnić między sobą genetycznie i być źródłem dwu lub więcej różnych profili DNA lub generować mieszany profil DNA. Zdarza się tak w wyniku podziałów zmutowanych komórek dających początek zróżnicowanym genetycznie tkankom [12, 13]. Również podwójne zapłodnienie komórki jajowej, transfer między dwiema zygotami, ich połączenie bądź częściowa wymiana komórek macierzystych hematopoezy w fazie życia płodowego skutkują obecnością różnych linii komórkowych w obrębie jednego organizmu [14]. Może to skutkować oznaczeniem

Y-DNA: DONOR; BLOOD; BUCCAL; HAIR; RECIPIENT



Ryc. 9. Wykres ujawniający selektywną amplifikację Y-DNA we krwi (B), w wymazie z jamy ustnej (C) oraz we włosach (H) jednej z kobiet biorcy allo-HSCT od dawcy płci męskiej (D), jak również brak Y-DNA w materiale pobranym przed przeszczepem od tej kobiety (R)

Fig. 9. Plot revealing selective Y-DNA amplification in blood (B), in buccal swab (C) and in the hair (H) of one female – recipient allo-HSCT from a male donor (D) as well as the absence of Y-DNA in the pretransplant female-recipient material (R)

Discussion

The central dogma of genetics states that all cells within a single organism have the same unique DNA profile which does not change over the individual organism's lifetime [10]. Consequently, it is possible to compare the DNA profile identified, for example, in hair found on the clothing or at the crime scene with the DNA profile determined in the reference material (saliva or blood) [11]. In very specific cases, however, the dogma can be abolished. There are reports suggesting that tissues can differ genetically from one another and be a source of two or even more different DNA profiles, or generate a mixed DNA profile. The phenomenon happens as a result of divisions of mutated cells giving rise to genetically diverse tissues [12, 13]. The presence of different cell lines within one organism can also happen due to double fertilization of an egg cell, transfer between two zygotes, their fusion or partial exchange of hematopoietic stem cells during the fetal phase [14]. The above can result in the determination of microchimerism in different tissues of the mother because of the presence of her child's cells or free

mikrochimeryzmu w różnych tkankach matki związanego z obecnością komórek dziecka czy też wolnego, pozakomórkowego DNA płodu, szczególnie gdy jest on płci męskiej [15].

Z chimeryzmem genetycznym mamy również do czynienia w sytuacji, gdy osoba, od której ślad pochodzi lub której tkanki badamy, przeżyła allo-HSCT [16]. Wzrastająca z roku na rok liczba alogenicznych przeszczepień krwiotwórczych komórek macierzystych na świecie [17], w Europie [6], w tym również w Polsce [18], w coraz większym odsetku bazujących na przeszczepach od dawców niespokrewnionych, wiąże się z rosnącym ryzykiem przeprowadzenia badań genetyczno-sądowych z wykorzystaniem materiałów pochodzących od tych osób. Wobec powyższego podjęto się przeprowadzenia analizy polimorfizmu DNA u osób po alotransplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych i oceny zagrożenia, jakie niesie ze sobą taka analiza w badaniach z zakresu genetyki sądowej. Od biorców, którzy przeżyli allo-HSCT w następstwie chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i limfoidalnego, pobrano do analizy krew, wymaz i włos, stanowiące trzy najczęściej badane materiały w praktyce genetyczno-sądowej [19].

W wyniku przeprowadzonej oceny chimeryzmu donorowego w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi większości biorców ujawniono wyłącznie profil dawcy. Pozostaje to w zgodzie z badaniami innych autorów. Thiede i wsp. [20] oznaczyli we krwi badanych pacjentów, którzy przeżyli allo-HSCT, chimeryzm dawcy w przedziale 96–100%. Podobnie Dauber i wsp. [21], Rovo i wsp. [22], Hong i wsp. [23], Zhou i wsp. [24] oraz Berger i wsp. [25] ujawnili we krwi pacjentów po alotransplantacji w większości przypadków zamianę profilu genetycznego biorcy na profil dawcy. W przeprowadzonych przez autorów badaniach wykrycie sekwencji chromosomu Y błędnie wskazywało na obecność męskiego DNA dawcy na podstawie badania krwi żeńskiego biorcy. Nieoznaczenie sekwencji Y-DNA we krwi mężczyzny biorcy błędnie wskazywało zaś na płęć żeńską. Co więcej, uzyskane wyniki wskazują na możliwość zafalszowania tożsamości osoby oraz wydania błędnej ekspertyzy genetyczno-sądowej nie tylko w przypadku badania krwi kobiety, dla której dawcą był mężczyzna, bądź krwi mężczyzny, dla którego dawcą była kobieta, ale też w przypadku badania krwi mężczyzny, który uzyskał przeszczep od innego niespokrewnionego z nim mężczyzny.

extracellular DNA of the fetus, particularly when it is male [15].

Genetic chimerism also occurs when the person who has left a biological trace or whose tissues are investigated has a history of allo-HSCT [16]. The number of allogeneic hematopoietic stem cell transplantations has been rising worldwide [17] and in Europe [6], Poland included [18], year by year. This observation, coupled with the fact that the procedures in a growing proportion of cases involve unrelated donors, is associated with an increasing risk of forensic genetic tests being performed with material derived from such individuals. In view of the above, an attempt was made to analyze DNA polymorphism in persons who had undergone an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, and to assess the risk involved in such an analysis performed for forensic genetic purposes. Blood, oral swabs and hair samples, i.e. three most commonly examined materials in forensic genetic practice, were collected for analysis from recipients who have had allo-HSCT due to proliferative diseases of the blood and lymphatic systems [19].

An analysis of donor chimerism focused on autosomal DNA markers revealed exclusively the donor's profile in the blood of the majority of recipients. The findings are consistent with studies undertaken by other authors. Thiede *et al.* [20] found the level of donor chimerism in the blood of patients post allo-HSCT to be in the range of 96–100%. Similarly, Dauber *et al.* [21], Rovo *et al.* [22], Hong *et al.* [23], Zhou *et al.* [24] and Berger *et al.* [25] demonstrated a substitution of the recipient's genetic profile with the donor's profile in the blood of the majority of patients who had undergone alotransplantation. In our study, the detection of Y chromosome sequences mistakenly pointed to the presence of male donor DNA based on the examination of blood of a female recipient. Also, failure to detect the Y-DNA sequences in the blood of the male recipient erroneously pointed to the female sex. What is more, the results of the study give rise to the possibility of falsification of a person's identity and the issue of erroneous forensic genetic opinion not only in cases involving the examination of the blood of female recipients who have had male donors or vice versa, but also in blood tests performed for men who have undergone a transplantation from unrelated men.

Krew należy do najczęściej badanych materiałów w analizach kryminalistycznych. Obowiązujące w Polsce przepisy prawne zawarte w art. 74 § 2 i 3, art. 192a § 1 oraz art. 308 § 1 Kodeksu postępowania karnego [26], jak również w art. 15 ust. 1 ustawy o Policji [27] stanowią o tym, że organy procesowe mogą zlecać pobranie krwi, włosów, wymazu ze śluzówki policzków lub innych wydzielin organizmu od oskarżonych oraz podejrzanych niezależnie od ich zgody. Uzyskany profil genetyczny zostaje wprowadzony do policyjnej bazy danych DNA i porównywany ze zgromadzonymi w tej bazie profilami [28]. Zgodnie z art. 21a ust. 1 ustawy o Policji do bazy danych DNA wprowadzane są również profile DNA oznaczone w śladach biologicznych, w tym śladach krwi, zabezpieczanych na miejscach przestępstw, czy też profile DNA oznaczone we krwi pobranej od osób i włók ludzkich o nieustalonej tożsamości, osób usiłujących ukryć swą tożsamość, osób stwarzających zagrożenie oraz osób zaginionych [27].

Pomimo zagrożenia wynikającego ze zmiany profilu genetycznego biorcy allo-HSCT na profil dawcy nie uwzględnia się możliwości przebycia tego zabiegu przez osobę oddającą krew jako materiał do analizy kryminalistycznej. Coraz wyższa świadomość konsekwencji mogących wynikać z sądowej analizy DNA w materiałach po przeszczepie nie znalazła dotąd odbicia w uregulowaniach prawnych, wytycznych czy choćby zaleceniach dotyczących stosowania określonych procedur uwzględniających możliwość allo-HSCT [28, 29]. Policyjne protokoły pobrania materiału do celów identyfikacyjno-porównawczych nie zawierają oświadczenia osoby oddającej materiał, dotyczącego ewentualności przebycia przez nią wcześniej alogenicznego przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych. W świetle uzyskanych wyników istotne jest uzupełnienie wyżej wymienionych protokołów o takie oświadczenie. Ponadto przy rejestrowaniu próby biologicznej oraz wprowadzaniu profilu DNA osoby oskarżonej czy podejrzanej do systemu informatycznego policyjnej bazy danych DNA uzasadnione jest zastosowanie procedury weryfikującej możliwość przebycia allo-HSCT przez tę osobę. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskanych badań i aktualnie obowiązujące w Polsce przepisy prawne zawarte w art. 74 § 4 k.p.k., które zalecają, aby „gromadzenie, utrwalanie i analiza materiału dowodowego były dokonywane zgodnie z aktualną wiedzą w zakresie

Blood is one of the most frequently examined materials in forensic analyses. Under the current laws in Poland laid down in Article 74 § 2 and 3, Article 192a §1 and Article 308 § 1 of the Code of Criminal Procedure [26], as well as in Article 15 section 1 of the Act on the Police [27], judicial bodies have the power to order the collection of blood, hair, buccal mucosal swab or other body secretions from suspects and accused persons regardless of whether they consent to the procedure or not. Their genetic profile is entered in the police DNA database and compared with the DNA profiles stored in the database [28]. In accordance with Article 21a section 1 of the Act on the Police, the DNA database is also used for storing DNA profiles determined in biological traces (including blood traces) secured on crime scenes or DNA profiles identified in blood collected from persons and dead human bodies of unknown identity, individuals seeking to conceal their identity, persons posing a risk and missing people [27].

Despite the risk associated with the fact that the genetic profile of allo-HSCT recipients changes into that of their donors, persons providing blood samples for forensic analysis are not assessed for the possibility of having undergone the procedure. The growing awareness of consequences which may potentially arise from the forensic analysis of DNA in post-transplantation materials has not, as yet, been reflected in legal regulations, guidelines or even recommendations suggesting the application of specific procedures that take into account the possibility of past allo-HSCT [28, 29]. Police protocols for the collection of material for the purpose of identification/comparison do not include the statement of the person providing the sample concerning their possible history of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). In the light of the study outcomes, however, such protocols should be provided with such a statement. Moreover, when registering a biological sample and entering the DNA profile of a suspect or accused person in the IT system of the police DNA database, it is justified to apply a procedure verifying the possibility that the person concerned might have undergone allo-HSCT. Taking into consideration the study results and current legal regulations in Poland laid down in Article 74 § 4 of the Code of Criminal Procedure which prescribe that “the collection, fixation and analysis of evidence must be performed in accordance with

kryminalistyki i medycyny sądowej” [26], zasadne jest również podjęcie bardziej radykalnego kroku – odstąpienie od pobierania krwi jako jedyne materiału do badań identyfikacyjno-porównawczych.

Zważywszy, że ślady krwi są najczęściej zabezpieczonym materiałem dowodowym w najcięższych przestępstwach przeciwko życiu i zdrowiu ludzkiemu oraz że z roku na rok rośnie liczba przeszczepów od dawców niespokrewnionych, może się zdarzyć, że osoba, która dopuściła się przestępstwa i przeszła allo-HSCT, pozostanie bezkarna. Wynikać to będzie z faktu, że profil DNA ujawniony w plamie krwi pozostawionej przez tę osobę na miejscu zdarzenia kryminalnego bądź figurujący w bazie danych będzie niezgodny z profilem DNA tej osoby po allo-HSCT. Alogeniczny przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych może zatem dać alibi przestępcy czy też obciążyć niewinnego dawcę przeszczepu, jak to miało miejsce w 2005 r. w Stanach Zjednoczonych [30]. Niemniej w praktyce kryminalistycznej w Polsce odnotowano również przypadek, kiedy chimeryzm we krwi zabójcy po allo-HSCT ułatwił jego identyfikację [31].

Poza aspektem kryminalistycznym krew jest ciągle jeszcze w niektórych ośrodkach wykorzystywana jako materiał badawczy w genetycznej analizie pokrewieństwa, której znaczny odsetek stanowi analiza spornego ojcostwa. Na podstawie badania DNA wydawana jest każdorazowo opinia w przedmiotowej sprawie na zlecenie Sądu, Prokuratury, Policji czy też osób prywatnych. O ile opinia potwierdzająca ojcostwo, z uwagi na ekstremalny stopień polimorfizmu badanych markerów DNA, nie niesie ze sobą ryzyka pomyłki, o tyle opinia wykluczająca ojcostwo może być zakwestionowana w przypadku, gdy została sformułowana wyłącznie na podstawie analizy próby krwi pochodzącej od domniemanego ojca. W protokole pobrania materiału do badań pokrewieństwa zarówno domniemany ojciec, jak i matka dziecka podpisują zwykle oświadczenie stwierdzające, że nie przebyli w przeszłości przeszczepu szpiku kostnego. Nie wyklucza to jednak możliwości, że pozwany o ojcostwo został poddany zabiegowi transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych pochodzących od niespokrewnionego z nim męskiego dawcy i zataił ten fakt w trakcie oddania krwi do badania. Taka sytuacja hipotetycznie mogłaby się zdarzyć w przypadku dwu analizowanych mężczyzn biorców. Profil DNA oznaczony w ich

state-of-the-art knowledge of criminalistics and forensic medicine” [26], a more radical step also seems well-founded, namely abandoning the collection of blood as the only material used for identification/comparison purposes.

Given that blood traces are the most commonly secured evidence in the most severe crimes against human life and health, and that the number of transplantations from unrelated donors increases every year, it is feasible that a person with a history of allo-HSCT who commits a crime may in effect remain unpunished. The above scenario is possible due to the fact that the DNA profile determined in blood traces left by such a person at the crime scene or stored in the database is inconsistent with the DNA profile of the person after allo-HSCT. It follows that allogeneic hematopoietic stem cell transplantations may ultimately either give a criminal an alibi or incriminate an innocent transplantation donor. A case of this type occurred in the USA in 2005 [30]. Nevertheless, there is also a known case in Polish forensic practice in which a murderer's chimerism in the blood after allo-HSCT facilitated the criminal's identification [31].

Aside from the forensic aspect, some centers continue to use blood as a test material in genetic kinship analysis, a considerable proportion of which is paternity testing. An opinion in any given case is issued upon the request of the court, prosecutor, police or private individuals on the basis of DNA tests. Insofar as opinions confirming paternity do not carry the risk of error due to an extreme degree of polymorphism in the DNA markers tested, opinions which rule out paternity can be challenged in cases when they are prepared exclusively on the basis of blood samples collected from the alleged father. In the protocol for the collection of material for kinship testing both the child's alleged father and the mother routinely sign a statement that they have not undergone bone marrow transplantation. This, however, does not rule out the possibility that the man whose paternity is being determined may – during blood sampling for tests – conceal the fact of having undergone hematopoietic stem cell transplantation from an unrelated male donor. A situation like this could hypothetically happen in the case of two male recipients analyzed in the present study, as the DNA profile identified in their blood was consistent with the profile of their unrelated

krwi odpowiadał bowiem profilowi niespokrewnionych z nimi męskich dawców. Fałszywe wyłączenie ojcostwa badanego mężczyzny mogłoby nastąpić również w sytuacji, gdy we krwi biologicznego ojca po allo-HSCT zamiast jego profilu zostałyby ujawniony profil spokrewnionego z nim dawcy przeszczepu, np. jego brata [32]. Niesłuszne wykluczenie ojcostwa spowodowałoby dalsze skutki prawne z wszelkimi ich konsekwencjami dla dziecka i jego matki. Istnieje oczywiście możliwość, że Sąd przychyliłby się do wniosku powodów o powtórzenie wyników analizy w innym ośrodku. Zwykle jednak taka decyzja wiązałaby się z koniecznością pokrycia kosztów ekspertyzy przez stronę kwestionującą wynik, co mogłoby być istotną przeszkodą w kontynuacji badań. W praktyce opiniodawczej nie odnotowano przypadku, w którym przed wydaniem ostatecznego wyroku Sądu w sprawie podważającej wyniki genetycznej analizy ojcostwa czy też pokrewieństwa istotny element procesowy stanowiłaby dokumentacja, która wykluczałaby ewentualność wcześniejszego przebiegu przez pozwanego o ojcostwo allo-HSCT. Odnotowano natomiast przypadek, kiedy analiza była utrudniona z uwagi na niemożliwość uzyskania autologicznego, niechimerycznego profilu domniemanego ojca, który przeżył w przeszłości alop przeszczep krwiotwórczych komórek macierzystych [33].

W świetle uzyskanych wyników należy stwierdzić, że wykluczenie ojcostwa pociąga za sobą bezwzględną konieczność przeprowadzenia badania kontrolnego opierającego się na innym materiale niż krew. Skala zagrożenia, jaką niesie udokumentowana w pracy zmiana profilu genetycznego we krwi biorcy allo-HSCT na profil dawcy, uprawnia ponadto do wnioskowania o odstąpieniu od pobierania krwi w analizach pokrewieństwa, w tym w dochodzeniu spornego ojcostwa.

Ślady biologiczne bogate w komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, których fizjologiczne złuszczenie jest wspomagane ciągłym przepływem śliny, stanowią z reguły doskonałe źródło genomowego DNA, dlatego określane są mianem „niewidocznego sprzymierzeńca wymiaru sprawiedliwości”. Powstają w wyniku rozpuszczania się śliny ludzkiej w płynach lub jej kontaktu z inną osobą czy też przedmiotami, takimi jak okrycie głowy, koperta w miejscu klejenia, szklanka, ustnik papierosa, i są często zabezpieczane jako materiał dowodowy [11, 19, 34]. Ze względu na nieinwazyjną i nieskompli-

male donors. The paternity of the man under study could also be mistakenly excluded in situations when the blood of the biological father who has had allo-HSCT instead of his profile reveals that of his related transplantation donor, e.g. his brother [32]. False paternity exclusions would trigger further legal effects along with all the important consequences both for the child and the mother. There is naturally a possibility that a court might accept the plaintiff's motion to have the analysis repeated at another test centre. As a rule, however, the decision would entail the necessity to pay the costs of the expert opinion by the party challenging the previous result, which could be a significant obstacle preventing further tests. The expert opinion practice fails to include any cases in which prior to delivering the final ruling in proceedings instituted to challenge results of genetic paternity or kinship analysis an important element would be documentation excluding the possibility of prior allo-HSCT in the respondent whose paternity is being established. Nevertheless, there is one case in which analysis was difficult due to problems with obtaining an autologous non-chimeric profile of the alleged father who had previously undergone allogeneic hematopoietic stem cell transplantation [33].

In the light of the study results it needs to be noted that the exclusion of paternity dictates the absolute necessity to perform a control test based on a material other than blood. Furthermore, the scale of risk associated with the substitution of the genetic profile in the blood of allo-HSCT recipients for the profile of their donors, as documented in the study, warrants the claim to depart from the practice of blood collection in kinship analyses – including cases of disputed paternity.

Biological traces rich in oral mucosal epithelial cells which undergo physiological exfoliation supported by the constant flow of saliva are, as a rule, an excellent source of genomic DNA, which has earned them the status of the “invisible ally of the judicial system”. They arise in the process of dissolution of human saliva in fluids or its contact with another person or object (e.g. headgear, envelope flap, drinking glass, cigarette filter tip, etc.) and are frequently secured as evidence [11, 19, 34]. Since swabbing is a non-invasive and uncomplicated procedure, epithelial cells from the oral cavity represent the most common material secured for forensic DNA pro-

kowaną procedurę pobrania wymaz komórek nabłonka z jamy ustnej jest obecnie najczęściej zabezpieczonym materiałem do sądowego profilowania DNA. Zabezpieczenie tego materiału, jak wynika z analizy standardowych protokołów pobrania, a następnie profilowanie DNA nie jest poprzedzone wywiadem w kierunku ewentualnego przebiecia allo-HSCT i nie zawiera w tej kwestii oświadczenia osoby, od której pobranie następuje.

Obowiązujące w Polsce przepisy dają podstawę prawną do pobierania na potrzeby bazy danych DNA – poza krwią i wydzielinami – również włosów oraz wymazów ze śluzówki policzków zarówno od osoby oskarżonej, jak i podejrzaney, nawet mimo braku jej zgody [26, 27]. W myśl art. 192a § 1 k.p.k. wymaz ze śluzówki policzków, włosy i ślinę można również pobrać od świadków oraz dowolnej osoby „w celu ograniczenia kręgu osób podejrzanych lub ustalenia wartości dowodowej ujawnionych śladów” [26]. Artykuł 21a ust. 1 ustawy o Policji daje Komendantowi Głównemu Policji szerokie uprawnienia w kwestii gromadzenia, sprawdzania i przetwarzania „zbioru danych DNA” [27]. Na podstawie stosownych zarządzeń i rozporządzeń wdrożone zostały standardowe protokoły pobrania wymazu ze śluzówki policzków oraz karty rejestracyjne pobieranych prób biologicznych i wprowadzanych do bazy danych profili DNA [28, 35]. Żaden z tych dokumentów nie uwzględnia możliwości przebiecia allo-HSCT przez osobę, której materiał poddawany jest profilowaniu DNA w aspekcie sądowym.

Uzyskane wyniki analizy wymazów pochodzących od badanych biorców allo-HSCT, w których wskaźnik chimeryzmu dawcy mieścił się w przedziale 0–67%, korelują z wynikami innych badaczy. Thiede i wsp. [20] wykazali istnienie chimeryzmu donorowego w przedziale 5–63% na podstawie analizy wymazów pochodzących od 13 biorców. Szerszy zakres chimeryzmu dawcy, tj. 2–90%, w wymazach z jamy ustnej 7 biorców allo-HSCT ujawnili Zhou i wsp. [24]. W 29-osobowej puli biorców Hong i wsp. [23] ustalili w analogicznych materiałach domieszkę DNA dawcy na poziomie 0–96%, a Berger i wsp. [25] w analizie 77 biorców pełną skalę wskaźnika chimeryzmu, tj. 0–100%. Kaur i wsp. [36] analizując ślinę 24 biorców po allo-HSCT, określili obecność donorowych komórek na poziomie 7,8–88,7%. Znaczne różnice ujawniane w skali zawartości DNA dawcy mogą być związane z różnicami w sposobie

filii. However, as shown by standard collection protocols the sampling of material and subsequent DNA profiling are not preceded by an assessment of the person's possible history of allo-HSCT. Moreover, protocols fail to include the statement of the person taking the swab test.

Polish regulations provide a legal basis to collect – for the purpose of inclusion in the DNA database – not only blood and bodily secretions but also hair and buccal mucosal swabs from accused individuals and suspects. The procedure does not require their consent [26, 27]. In the light of Article 192a § 1 of the Code of Criminal Practice, buccal mucosal swabs, hair and saliva can also be collected from witnesses and any other individuals “in order to narrow down the group of suspects or ascertain the value of disclosed traces as evidence” [26]. The provisions of Article 21a section 1 of the Act on the Police grant the Chief Commander of the Police a broad scope of powers with regard to the collection, verification and processing of the “DNA database” [27]. Based on applicable orders and ordinances, standard protocols for the collection of buccal mucosal swabs were implemented along with registration sheets for collected biological samples and DNA profiles entered in the database [28,35]. None of the documents, however, takes into account the possibility that the person whose material is subjected to DNA profiling for forensic purposes might have had allo-HSCT.

The results of analysis involving swabs collected from investigated allo-HSCT recipients in which the donor chimerism indicator was in the range of 0–67% correlate with the findings made by other researchers. Thiede *et al.* [20] demonstrated donor chimerism in the range of 5–63% based on analysis of swabs harvested from 13 donors. A wider range of donor chimerism (2–90%) in oral swabs collected from seven allo-HSCT recipients was determined by Zhou *et al.* [24]. Based on a recipient pool of 29 individuals, Hong *et al.* [23] found the addition of donor DNA in the same materials to be in the range of 0–96%, and Berger *et al.* [25], on the basis of analysis comprising 77 recipients recorded a full scale of chimerism, i.e. 0–100%. Kaur *et al.* [36], having investigated saliva collected from 24 allo-HSCT recipients, assessed the presence of donor cells to be in the range of 7.8–88.7%. Substantial differences revealed in the content of donor

pobierania materiału z jamy ustnej, ponadto ma na nie wpływ kliniczny stan pacjenta po przeszczepie. Endler i wsp. [37] oraz Thiede i wsp. [20] ujawnili bowiem, że DNA wyizolowane z popłuczyn z jamy ustnej w zestawieniu z DNA wyizolowanym z wymazów policzkowych biorców allo-HSCT charakteryzuje się znacznie wyższą zawartością materiału genetycznego dawcy bądź też wykazuje wyłącznie profil dawcy. Fakt ten jest związany z obecnością granulocytów i limfocytów dawcy, które podobnie jak w innych wydzielinach organizmu obecne są w ślinie ludzkiej, a szczególnie duża ich liczba towarzyszy nasilonej postaci choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) w obrębie jamy ustnej [38].

Przedstawione wyniki analizy chimeryzmu w zakresie markerów autosomalnego DNA świadczą o tym, że komórki nabłonka czy śliny, pochodzące z jamy ustnej biorców allo-HSCT, nie są idealnym materiałem referencyjnym w badaniach genetyczno-sądowych. Ma to związek ze stwierdzonym w tym materiale u większości badanych biorców mieszanym chimeryzmem genetycznym, charakteryzującym się obecnością dwóch frakcji genomowego DNA – pochodzącej od biorcy i pochodzącej od dawcy. W świetle uzyskanych wyników należy się spodziewać, że ślad pochodzący z jamy ustnej, który biorca allo-HSCT pozostawiłby na miejscu zdarzenia kryminalnego, z dużym prawdopodobieństwem wykazałby mieszany, trudny do interpretacji profil genetyczny. Profil ten mógłby uniemożliwić wyodrębnienie profilu DNA sprawcy przestępstwa, a tym samym jego identyfikację [39].

Brak możliwości identyfikacji osobniczej oraz fałszywe oznaczenie płci wiąże się nie tylko z analizą markerów autosomalnego DNA, lecz także analizą markerów chromosomu Y. Zastosowany system kilkunastu markerów Y-STR stanowi niezwykle użyteczne narzędzie w badaniach z zakresu genetyki sądowej [40]. Pozwala na selektywną amplifikację Y-DNA i ustalenie, od kogo pochodzi męska frakcja wtedy, gdy nie jest to możliwe z zastosowaniem analizy markerów autosomalnych. W toku przeprowadzonych badań w wymazach z jamy ustnej wszystkich kobiet, które uzyskały allo-HSCT od męskich dawców, również tam, gdzie analiza autosomalnego DNA ujawniła wyłącznie autologiczny profil, ujawniono haplotypy Y ich dawców. Stąd też można wnioskować, że analiza śladów biologicznych

DNA can be related to differences in the method of taking samples of material from the oral cavity. In addition, they are affected by the clinical condition of the patient after the transplantation. Endler *et al.* [37] and Thiede *et al.* [20] demonstrated that DNA isolated from oral washings compared with DNA isolated from buccal swabs in allo-HSCT recipients is characterized by a considerably higher content of the donor's genetic material or exhibits exclusively the donor's profile. The fact is associated with the presence of donor granulocytes and lymphocytes which, similarly to all other bodily secretions, are found in human saliva. They are particularly abundant in the oral cavity in cases of severe graft-versus-host disease (GVHD) [38].

The results of an analysis of chimerism focused on autosomal DNA markers, which are presented in this study, show that cells harvested from the oral epithelium or saliva of allo-HSCT recipients are not a perfect reference material in forensic genetic analyses. The reason is that in the majority of recipients under study the material was affected by mixed genetic chimerism, i.e. the presence of two genomic DNA fractions: one coming from the recipient and one from the donor. In the light of these findings, it is to be expected that traces of material from the oral cavity left by an allo-HSCT recipient at the crime scene would, with a high degree of probability, reveal a mixed genetic profile, creating difficulties with interpretation. The resulting profile could make it impossible to isolate the DNA profile of the perpetrator, thus precluding their identification [39].

The lack of possibility of personal identification and false sex determination are problems associated not only with the analysis of autosomal DNA markers but also with the study of Y chromosome markers. The system comprising around a dozen of Y-STR markers, which was applied in the study, is an extremely useful tool in forensic genetic analyses [40]. It allows selective Y-DNA amplification and attribution of the male fraction in situations when autosomal marker analysis fails. In the course of the study, oral swabs collected from all female allo-HSCT recipients from male donors (including cases in which autosomal DNA analysis yielded exclusively their autologous profiles) revealed Y haplotypes of their donors. It can thus be concluded that an analysis of biological traces of the same

o analogicznym pochodzeniu błędnie sugerowało by, że pochodzą one od mężczyzny, a nie – jak było w istocie – od kobiety. Analiza wymazów pobranych od dwóch mężczyzn biorców, którzy uzyskali allo-HSCT od niespokrewnionych mężczyzn dawców, wykazała u każdego z nich mieszaninę w obrębie ujawnionego haplotypu Y. Sugerowało to mylnie, że badany materiał pochodzi od więcej niż jednego mężczyzny. Zatem realne jest zagrożenie, że trudny w interpretacji profil genetyczny ujawniony w śladzie śliny pochodzącej od biorcy allo-HSCT, który wszedł w konflikt z prawem, będzie stanowił swoiste alibi zapewniające mu bezkarność lub przynajmniej znacznie obniży wartość dowodową tego śladu.

Ostatnim poddawanym analizie DNA materiałem pochodzącym od biorców allo-HSCT były włosy. Włosy są tkanką stale odnawialną podczas życia organizmu. Podlegają one nieustannej regeneracji i wzrostowi. Na głowie mamy ich około stu tysięcy, z czego na dobę tracimy przeciętnie kilkadziesiąt. Z powyższych przyczyn stanowią one bardzo istotny rodzaj śladu biologicznego, zabezpieczanego często na miejscu zdarzenia kryminalnego. Włosy ujawniane w rękę ofiary, na odzieży, na narzędziach zbrodni czy też pozostawione przez sprawcę na miejscu przestępstwa są niejednokrotnie kluczowym materiałem dowodowym w procesie karnym. Stanowią często cenne źródło DNA [41], które może wskazać winnego lub uwolnić od podejrzeń osobę niesłusznie oskarżoną. Do uzyskania niepowtarzalnego w populacji osobniczego profilu genetycznego wystarcza jedna cebulka, a nawet pojedyncze komórki jądrzaste włosa [42].

Włosy pobrane po alogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy wykorzystywane są w transplantologii jako materiał referencyjny, odpowiadający autologicznemu profilowi biorcy, tj. jego profilowi przed alop przeszczepem. Uważa się powszechnie, że jest to jedyna tkanka biorców allo-HSCT całkowicie pozbawiona chimeryzmu dawcy. Dauber i wsp. [14, 21] wykazali, że włosy pochodzące zarówno od chimericznych bliźniąt, jak i biorców allo-HSCT jako jedyna spośród analizowanych tkanek zawierają czysty autologiczny profil DNA. Rovó i wsp. [22] analizowali chimeryzm we włosach wrywanych w ilości 50 sztuk od każdego z 115 badanych pacjentów po allo-HSCT, nie ujawniając w żadnym przypadku domieszki DNA dawcy. Podobnie wyniki uzyskali Hong i wsp. [23], Zhou i wsp. [24] oraz Kaur

origin would falsely suggest that they are attributable to a man and not, as it was actually the case, to a woman. An analysis of swabs collected from two male recipients who had received allo-HSCT from unrelated male donors showed a mixture within the identified Y haplotype in each of them. The finding suggested erroneously that the material under analysis was derived from more than one man. Consequently, there is a real risk that the genetic profile identified in a trace of saliva left by an allo-HSCT recipient who has violated the law, and is difficult to interpret, could be used as an alibi helping to evade punishment or at least considerably reduce the value of the trace as evidence.

The final material collected from allo-HSCT recipients and subjected to DNA analysis was hair. Hair is a tissue that is constantly renewed during the organism's life. Hair undergoes continuous regeneration and growth. An average person has around one hundred thousand hair follicles, and loses on average several hundred hairs a day. As a result, hair is a very important type of biological trace that is often secured as evidence at crime scenes. Hair revealed in the hands of the victim, on clothing or crime weapons – or left by the perpetrator at the crime scene – frequently constitutes key evidence in criminal proceedings. Hair is often a valuable source of DNA [41] which can help to pinpoint the perpetrator or exonerate a wrongly accused suspect. A single hair follicle – or even individual nucleated cells from hair – suffice to generate a personal genetic profile that is unique in the population [42].

Hair harvested after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation are used in transplantology as a reference material corresponding to the autologous profile of the recipient, i.e. their profile prior to allotransplantation. Hair is commonly believed to be the only tissue in allo-HSCT recipients which is completely free of donor chimerism. Dauber *et al.* [14, 21] showed that hair, both derived from chimeric twins and allo-HSCT recipients, was the only tissue under study containing a pure autologous DNA profile. Rovó *et al.* [22] analyzed chimerism in samples comprising 50 hairs collected from each of 115 studied patients after allo-HSCT, revealing no presence of donor DNA in any of the cases. Similar results were reported by Hong *et al.* [23], Zhou *et al.* [24] and Kaur *et al.* [36]. The assessment of DNA

i wsp. [36]. Również przeprowadzona przez autorów ocena polimorfizmu DNA we włosach badanych biorców pacjentów w zakresie *loci* autosomalnego DNA ujawniła wyłącznie ich profil.

Niespodziewane rezultaty przyniosła natomiast analiza DNA pochodzącego z włosów kobiet, dla których dawcą był mężczyzna, kiedy poddano je selektywnej amplifikacji z wykorzystaniem markerów chromosomu Y. Amplifikacja ta pozwoliła na detekcję DNA dawcy we włosach większości badanych pacjentek. Kompletny haplotyp Y uzyskano, począwszy od 100 pg wyjściowej ilości DNA do reakcji multiplex PCR, podobnie jak u Mayntz-Press i Ballantyne [43]. Ilość ta odpowiadała zaledwie kilkunastu komórkom męskiego dawcy przypadającym na kilkaset – kilkadziesiąt tysięcy żeńskich komórek biorcy. Krenke i wsp. [44] wykazali, że detekcja męskiej komponenty mieszaniny za pomocą selektywnej analizy Y-STR jest możliwa nawet w obecności 10 000-krotnej przewagi żeńskiego DNA.

Ujawniona obecność DNA donorowego w komórkach włosów biorców po aloprzeszczepie komórek krwiotwórczych świadczy o tym, że nie tylko krew oraz wymaz komórek nabłonka i śliny, ale również włos nie jest, jak dotychczas uważano, całkowicie bezpiecznym materiałem dowodowym. Uzyskane wyniki selektywnej analizy markerów Y we włosach biorców allo-HSCT podważają tezę mówiącą o tym, że jest to tkanka pozbawiona chimeryzmu dawcy. Nie stoi to w sprzeczności z faktem, że zarówno analiza autorów, jak i wysiłki kilku zespołów badawczych z całego świata na podstawie badań ogółem kilkuset biorców allo-HSCT, nie były w stanie ujawnić frakcji DNA dawcy we włosach biorców przy zastosowaniu wyłącznej amplifikacji w zakresie markerów autosomalnego DNA [21–24, 36].

W świetle doświadczenia badawczego z zakresu genetyki sądowej przyczyna tego stanu rzeczy jest stosunkowo prosta do wyjaśnienia. Prawdopodobieństwo ujawnienia profilu osoby, której DNA występuje w znikomej domieszce, jest tym mniejsze, im wyższa jest ilość i przewaga komponenty DNA drugiej osoby w mieszaninie [45]. Podczas analizy markerów autosomalnego DNA następuje inhibicja amplifikacji śladowego składnika mieszaniny obecnego we włosach biorców allo-HSCT. Jego detekcja jest możliwa tylko w szczególnej sytuacji, kiedy to śladowe DNA występujące w tle przeważającej ilości żeńskiego DNA pochodzi od mężczyzny. Z podob-

polymorphism in the hair of studied transplantation recipients with respect to autosomal DNA loci, which was performed in the present study, also demonstrated exclusively their own profile.

However, unexpected results were obtained in the analysis of DNA derived from the hair of women whose donors were men, when hair was subjected to selective amplification using Y chromosome markers. The amplification allowed donor DNA detection in the hair of the majority of studied women. A complete Y haplotype was obtained from 100 pg of starting DNA amount for the multiplex PCR, similarly to studies conducted by Mayntz-Press and Ballantyne [43]. The amount was equivalent to barely a dozen or so male donor cells per several hundred to a few dozen thousands of female recipient cells. Krenke *et al.* [44] demonstrated that the detection of the male component of the mixture by means of selective Y-STR analysis was possible even in the presence of a 10,000-fold prevalence of female DNA.

The presence of donor DNA identified in the hair cells of recipients after allogeneic hematopoietic cell transplantation provides evidence for the thesis that hair, contrary to the belief held so far, does not represent completely safe evidence, similarly to blood, epithelial cell swab and saliva. Results of selective analysis of Y markers in the hair of allo-HSCT recipients undermine the claim that hair is a tissue free of donor chimerism. The above statement is not in contradiction with the fact that both the analysis reported above and efforts undertaken by several research teams from all over the world based on investigations involving a total of several hundred allo-HSCT recipients were not able to identify the donor's DNA fraction in the hair of recipients using exclusively amplification of autosomal DNA markers [21–24, 36].

In the light of research experience in forensic genetics this situation is relatively simple to explain. The probability of detecting the profile of a person whose DNA is present in a very small amount decreases along with an increase in the amount and prevalence of the DNA component of the other person in the mixture [45]. An analysis of autosomal DNA markers is accompanied by the inhibition of amplification of the trace component of the mixture present in the hair of allo-HSCT recipients. Its detection is possible only in a particular situation when DNA present in a trace amount in predominantly

ną sytuacją mamy do czynienia w przypadku wymazów z pochwy pobranych jako materiał dowodowy w sprawach o gwałt [46, 47].

Metoda detekcji sekwencji chromosomu Y w analizie chimeryzmu przeszczepowego została już wcześniej zastosowana w sytuacji, gdy istniała różnica płci pomiędzy dawcą a biorcą [48, 49]. Zastąpiła ona wcześniej stosowaną mikroskopową technikę cytogenetyczną – fluorescencyjną hybrydizację *in situ* (FISH). Wykorzystanie nowoczesnych metod analizy DNA znacznie przewyższających pod względem czułości technikę FISH pozwoliło na wykazanie, że włosy pacjentek po allo-HSCT nie są pozbawione DNA dawcy, którego źródłem są przeszczepiane komórki szpiku. Kontrolna analiza DNA pochodzącego z materiału pobranego przed przeszczepem wykluczyła ewentualność, aby źródłem męskiej frakcji we włosach badanych kobiet mogły być komórki, które przedostały się do ich krwiobiegu i innych tkanek przed alotransplantacją wskutek wrodzonego chimeryzmu bliźniaczego lub płodo-matczynego [15, 50].

Wnioski

W świetle uzyskanych wyników można stwierdzić, że alogeniczne przeszczepienie krwiotwórczych komórek macierzystych niesie ze sobą ryzyko zafałszowania tożsamości osoby i wydania błędnej opinii z zakresu badań genetyczno-sądowych.

Z uwagi na zachodzącą w większości przypadków pełną konwersję profilu genetycznego we krwi biorcy na profil dawcy, zasadne jest odstąpienie od wyłącznego pobierania krwi zarówno w badaniach pokrewieństwa, jak i w badaniach identyfikacyjnych.

Obecność mieszaniny DNA dawcy i biorcy w wymazach komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej biorców może w praktyce genetyczno-sądowej utrudnić lub uniemożliwić identyfikację osobniczą biorcy allo-HSCT na podstawie analizy śladu biologicznego o takim pochodzeniu. W aspekcie profilowania autosomalnego DNA u konkretnych osób stwierdzenie mieszaniny w wymazie niesie ze sobą bezwzględną konieczność powtórnego badania opartego na innym materiale, w szczególności cebulkach włosów.

Ujawnienie śladowej ilości donorowego DNA we włosach biorców allo-HSCT nie dyskryminuje włosa jako dobrego materiału referencyjnego. Stanowi on

female DNA comes from a man. A similar situation happens in the case of vaginal swabs taken as evidence in rape cases [46, 47].

The method of detecting Y chromosome sequences in the analysis of post-transplantation chimerism had been used formerly in cases where the donor and recipient were individuals of the opposite sex [48, 49]. It replaced the previously applied microscopic cytogenetic technique referred to as fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Advanced methods of DNA analysis, substantially superior to FISH in terms of sensitivity, have made it possible to demonstrate that the hair of female patients after allo-HSCT are not free of donor DNA originating from the transplanted bone marrow cells. A control analysis of DNA derived from pre-transplantation material ruled out the possibility that the source of the male fraction found in the hair of the women under study could be cells which entered their bloodstream and other tissues prior to allotransplantation because of congenital twin or fetomaternal chimerism [15, 50].

Conclusions

The study results warrant the conclusion that allogeneic hematopoietic stem cell transplantations carry the risk of false determination of a person's identity and preparation of erroneous forensic genetic opinions.

Given that in the majority of cases there is a full conversion of the genetic profile in the recipient's blood for the donor's profile, it is justified to abandon the practice of collecting blood as the sole material for kinship and identification tests.

The presence of a mixture of donor and recipient DNA in swabs of epithelial oral cells and saliva collected from allo-HSCT recipients may in forensic genetic practice impair or prevent personal identification of recipients based on analysis of a biological trace of that origin. With respect to autosomal DNA profiling, a DNA mixture identified in the swab test entails an absolute necessity to repeat the test with a different material, the preferred one being hair follicles.

Identification of trace amounts of donor DNA in the hair of allo-HSCT recipients does not disqualify hair as a good reference material. Hair is a source of the recipient's autologous DNA profile, when it

źródło autologicznego profilu DNA biorcy, jeśli jest badany w zakresie markerów autosomalnego DNA. Natomiast analiza włosa biorcy w zakresie markerów chromosomu Y, podobnie jak krwi i wymazu, może skutkować błędną interpretacją płci i błędnym oznaczeniem haplotypu Y dawcy. Dlatego też ślady biologiczne zabezpieczane z miejsc zdarzeń kryminalnych nie powinny być analizowane wyłącznie w oparciu o markery chromosomu Y.

Istotną kwestią jest uzupełnienie protokołów pobrania materiału do badań identyfikacyjnych i porównawczych o oświadczenie osoby, od której pobierany jest materiał, odnoszące się do kwestii ewentualnego przebycia przez nią allo-HSCT.

Wprowadzenie profilu DNA określonej osoby do policyjnej bazy danych powinno być poprzedzone wywiadem w kierunku weryfikacji ewentualności przebycia allo-HSCT przez tę osobę, a w przypadku jakichkolwiek wątpliwości konieczne jest kontrolne oznaczenie profilu DNA tej osoby z wykorzystaniem pobranych z cebulkami włosów.

Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

is tested for autosomal DNA markers. On the other hand, an analysis of the recipient's hair with a focus on Y chromosome markers can result in false sex interpretation and erroneous determination of the donor's Y haplotype, as in the case of blood and buccal swab. Therefore, biological traces secured on crime scenes should not be examined exclusively on the basis of Y chromosome markers.

In the context presented above, an important matter is to provide protocols for the collection of material for identification/comparison tests with a statement by the person who is about to supply such material on whether they have undergone allo-HSCT.

Before the DNA profile of a given person is entered in the police database, the person's history should be taken to verify whether they have undergone allo-HSCT. In the case of any doubt, a control analysis of the person's DNA profile should be performed using hair with follicles collected from that person.

The authors declare no conflict of interests.

Piśmiennictwo

References

1. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, Szer J, Lipton J, Schwendener A, Gratwohl M, Frauendorfer K, Niederwieser D, Horowitz M, Kodera Y. Worldwide Network of Blood and Marrow Transplantation. Hematopoietic stem cell transplantation: a global perspective. *JAMA* 2010; 303: 1617-1624.
2. Basak GW, Wiktor-Jedrzejczak W, Labopin M, Schoemans H, Ljungman P, Kobbe G, Beguin Y, Lang P, Koenecke C, Sykora KW, Te Boome L, van Biezen A, van der Werf S, Mohty M, de Witte T, Marsh J, Dreger P, Kröger N, Duarte R, Ruutu T. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in solid organ transplant recipients: a retrospective, multicenter study of the EBMT. *Am J Transplant* 2015; 15: 705-714.
3. Gratwohl A, Baldomero H. Trends of hematopoietic stem cell transplantation in the third millennium. *Curr Opin in Hematol* 2009; 16: 420-426.
4. Budziszewska BK, Pluta A, Sulek K, Wierzbowska A, Robak T, Giebel S, Holowiecka-Goral A, Sawicki W, Ejduk A, Patkowska E, Manko J, Gajkowska-Kulik J, Piszcz J, Mordak-Domagala M, Madry K, Holowiecki J, Kyrzcz-Krzemien S, Nowakowska-Domagala M, Dmoszynska A, Calbecka M, Kloczko J, Jędrzejczak WW, Lange A, Razny M, Bilinski P, Warzocha K, Lech-Maranda E. Treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia adjusted for performance status and presence of comorbidities: a Polish Adult Leukemia Group study. *Leuk Lymphoma* 2015; 56: 2331-2338.
5. Gratwohl A, Baldomero H, Frauendorfer K, Urbano-Ispizua A, Niederwieser D; Joint Accreditation Committee of the International Society for Cellular Therapy ISCT; European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT. Results of the EBMT activity survey 2005 on haematopoietic stem cell transplantation: focus on increasing use of unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 71-87.
6. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, Duarte RF, Dufour C, Falkenburg JH, Farge-Bancel D, Gennery A, Kröger N, Lanza F, Nagler A, Sureda A, Mohty M; European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Hematopoietic SCT in Europe 2013: recent trends in the use of alternative donors showing more haploidentical donors but fewer cord blood transplants. *Bone Marrow Transplant* 2015; 50: 476-482.
7. PowerQuant™ System. Instructions for Use of Products PQ5002 and PQ5008. Technical Manual. 2015 Promega Corporation, Madison, USA.
8. AmpFℓSTR Identifier PCR Amplification Kit & AmpFℓSTR Yfiler PCR Amplification Kit. User Guide. Applied Biosystems. 2012 Life Technologies Corporation. Carlsbad, USA.

9. Nollet F, Billiet J, Selleslag D, Criel A. Standardisation of multiplex fluorescent short tandem repeat analysis for chimerism testing. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28: 511-518.
10. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985; 316: 76-79.
11. Virkler K, Lednev IK. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int* 2009; 188: 1-17.
12. Castella V, Lesta Mdel M, Mangin P. One person with two DNA profiles: a (nother) case of mosaicism or chimerism. *Int J Legal Med* 2009; 123: 427-430.
13. Bruder CE, Piotrowski A, Gijbers AA, Andersson R, Erickson S, Diaz de Ståhl T, Menzel U, Sandgren J, von Tell D, Poplawski A, Crowley M, Crasto C, Partridge EC, Tiwari H, Allison DB, Komorowski J, van Ommen GJ, Boomsma DI, Pedersen NL, den Dunnen JT, Wirdefeldt K, Dumanski JP. Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 763-771.
14. Dauber EM, Faé I, Stadlbacher S, Glock B, Schwartz DWM, Mayr WR. STR typing in a pair of chimeric twins. *Int Congr Series* 2003; 1239: 569-571.
15. Stevens AM, McDonnell WM, Nelson JL. Male cells in female recipients of hematopoietic-cell transplants. *N Engl J Med* 2002; 347: 218-220.
16. Talwar S, Khan F, Nityanand S, Agrawal S. Chimerism monitoring following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 529-535.
17. Gratwohl A, Pasquini MC, Aljurf M, Atsuta Y, Baldomero H, Foeken L, Gratwohl M, Bouzas LF, Confer D, Frauendorfer K, Gluckman E, Greinix H, Horowitz M, Iida M, Lipton J, Madrigal A, Mohty M, Noel L, Novitzky N, Nunez J, Oudshoorn M, Passweg J, van Rood J, Szer J, Blume K, Appelbaum FR, Kodera Y, Niederwieser D; Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantation (WBMT). One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *Lancet Haematol* 2015; 2: e91-e100.
18. Grosicki S, Holowiecki J, Kuliczowski K, Skotnicki A, Hellmann A, Kyrz-Krzemien S, Dmoszynska A, Sułek K, Kloczko J, Jędrzejczak WW, Warzocha K, Zdziarska B, Wierzbowska A, Pluta A, Komarnicki M, Giebel S. Assessing the efficacy of allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (allo-HSCT) by analyzing survival end points in defined groups of acute myeloid leukemia patients: a retrospective, multicenter Polish Adult Leukemia Group study. *Am J Hematol* 2015; 90: 904-909.
19. Bond JW, Hammond C. The value of DNA material recovered from crime scenes. *J Forensic Sci* 2008; 53: 797-801.
20. Thiede C, Prange-krex G, Freiberg-Ritchter J, Bornhauser M, Ehninger G. Buccal swab but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplantats. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 575-577.
21. Dauber EM, Dorner G, Mitterbauer M, Wenda S, Faé I, Glock B, Mayr WR. Discrepant results of samples taken from different tissues of a single individual. *Int Congr Series* 2004; 1261: 48-49.
22. Rovó A, Meyer-Monard S, Heim D, Arber C, Passweg JR, Gratwohl A, Tichelli A. No evidence of plasticity in hair follicles of recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2005; 33: 909-911.
23. Hong YC, Liu HM, Chen PS, Chen YJ, Lyou JY, Hu HY, Yi MF, Lin JS, Tzeng CH. Hair follicle; a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 871-874.
24. Zhou Y, Li S, Zhou J, Wang L, Song X, Lu X, Wang J, Ye Y, Ying B, Jia Y. DNA profiling in blood, buccal swab and hair follicles of patients after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Leg Med (Tokyo)* 2011; 13: 47-51.
25. Berger B, Parson R, Clause J, Berger C, Nachbaur D, Parson W. Chimerism in DNA of buccal swabs from recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: implications for forensic DNA testing. *Int J Legal Med* 2013; 127: 49-54.
26. Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 r. Kodeks postępowania karnego. Dz.U.1997.89.555 z późn. zm.
27. Ustawa z dnia 6 kwietnia 1990 r. o Policji. Dz.U.2015.355 (tekst jednolity) z późn. zm.
28. Zarządzenie nr 1565 Komendanta Głównego Policji z dnia 29 grudnia 2005 r. w sprawie wykonywania przez policjantów zadań związanych z prowadzeniem bazy danych zawierającej informacje o wynikach analizy kwasu dezoksyrybonukleinowego. *Dziennik Urzędowy Komendy Głównej Policji*. Warszawa, dnia 6 stycznia 2006 r. Nr 1. Poz. 2.
29. Varga O, Soini S, Kääriäinen H, Cassiman JJ, Nippert I, Rogowski W, Nys H, Kristoffersson U, Schmidtke J, Sequeiros J. Definitions of genetic testing in European legal documents. *J Community Genet* 2012; 3: 125-141.
30. Kaye DH. Chimeric criminals. *Minn J L Sci Tech* 2013; 14: 1-9.
31. Benedycka A, Trynda A, Wysocka B: Genetyczna chimera. Problem oznaczenia profilu DNA u osób po przeszczepie szpiku kostnego. *Bezpieczeństwo – Policja – Kryminalistyka*. W poszukiwaniu wiedzy przydatnej w praktyce. Czapska J, Okrasa A (red.). Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2015; 324-330.
32. Berent J, Jacewicz R, Szram S. Effect on paternity index of substituting a brother for the true father. *Problems of Forensic Sciences* 2006; 67: 273-278.
33. Drożdżiak K, Kabiesz J, Tomsia M, Rębała K. Opinion-forming difficulties in establishing paternity resulting from the lack of data on the relationship between biological and putative father (a case report). *Problemy Kryminalistyki* 2014; 286: 70-75.
34. Ng LK, Ng A, Cholette F, Davis C. Optimization of recovery of human DNA from envelope flaps using DNA IQ System for STR genotyping. *Forensic Sci Int Genet* 2007; 1: 283-286.



35. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 29 września 2015 r. w sprawie postępowania przy wykonywaniu niektórych uprawnień policjantów. Dz. U. 2015. 1565.
36. Kaur G, Kumar N, Nandakumar R, Rappthap CC, Sharma G, Neolia S, Kumra H, Mahalwar P, Garg A, Kumar S, Kaur J, Hakim M, Kumar L, Mehra NK. Utility of saliva and hair follicles in donor selection for hematopoietic stem cell transplantation and chimerism monitoring. *Chimerism* 2012; 3: 9-17.
37. Endler G, Greinix H, Winkler K, Mitterbauer G, Mannhalter C. Genetic fingerprinting in mouthwashes of patients after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 24: 95-98.
38. Imanguli MM, Alevizos I, Brown R, Pavletic SZ, Atkinson JC. Oral graft-versus-host disease. *Oral Dis* 2008; 14: 396-412.
39. Arcabascio C. Chimeras: Double the DNA – double the fun for crime scene investigators, prosecutors and attorneys? *Akron Law Review* 2007; 40: 435-464.
40. Mulero JJ, Chang CW, Calandro LM, Green RL, Li Y, Johnson CL, Hennessy LK. Development and validation of the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR multiplex system. *J Forensic Sci* 2006; 51: 64-75.
41. Bengtsson CF, Olsen ME, Brandt LØ, Bertelsen MF, Willerslev E, Tobin DJ, Wilson AS, Gilbert MT. DNA from keratinous tissue. Part I: Hair and nail. *Ann Anat* 2012; 194: 17-25.
42. Di Martino D, Giuffrè G, Staiti N, Simone A, Todaro P, Saravo L. Laser microdissection and DNA typing of cells from single hair follicles. *Forensic Sci Int* 2004; 146 Suppl: S155-S157.
43. Mayntz-Press KA, Ballantyne J. Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems. *J Forensic Sci* 2007; 52: 1025-1034.
44. Krenke BE, Viculis L, Richard ML, Prinz M, Milne SC, Ladd C, Gross AM, Gornall T, Frappier JR, Eisenberg AJ, Barna C, Aranda XG, Adamowicz MS, Budowle B. Validation of male-specific, 12-locus fluorescent short tandem repeat (STR) multiplex. *Forensic Sci Int* 2005; 151: 111-124.
45. Gross AM, Liberty AA, Ulland MM, Kuriger JK. Internal validation of the AmpFISTR Yfiler amplification kit for use in forensic casework. *J Forensic Sci* 2008; 53: 125-134.
46. Parson W, Niederstätter H, Köchl S, Steinlechner M, Berger B. When autosomal short tandem repeats fail: optimized primer and reaction design for Y-chromosome short tandem repeat analysis in forensic casework. *Croat Med J* 2001; 42: 285-287.
47. Cerri N, Ricci U, Sani I, Verzeletti A, De Ferrari F. Mixed stains from sexual assault cases: autosomal or Y-chromosome short tandem repeats? *Croat Med J* 2003; 44: 289-292.
48. Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphisms, standard tandem repeats, and Y-chromosome-specific sequences. *Am J Hematol* 2006; 81: 735-746.
49. Jacewicz R, Lewandowski K, Rupa-Matysek J, Jedrzejczyk M, Brzezinski PM, Dobosz T, Jonkisz A, Szram S, Komarnicki M, Berent J. Donor-derived DNA in hair follicles of recipients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2010; 45: 1638-1644.
50. Rubocki RJ, McCue BJ, Duffy KJ, Shepard KL, Shepherd SJ, Wisecarver JL. Natural DNA mixtures generated in fraternal twins in utero. *J Forensic Sci* 2001; 46: 120-125.

Adres do korespondencji

Renata Jacewicz
Pracownia Genetyki Medycznej i Sądowej
Zakład Medycyny Sądowej
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Sędziowska 18 A
91-304 Łódź, Polska
e-mail: renata.jacewicz@umed.lodz.pl

Address for correspondence

Renata Jacewicz
Medical and Forensic Genetics Laboratory
Department of Forensic Medicine
Medical University of Lodz
Sędziowska 18 A
91-304 Lodz, Poland
e-mail: renata.jacewicz@umed.lodz.pl

