

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W ŁODZI**  
**Katedra i Zakład Medycyny Sądowej**  
**Pracownia Genetyki Sądowej**

Renata Jacewicz

**Badanie polimorfizmu DNA u osób  
po allogenicznym przeszczepie  
komórek macierzystych hematopoezy  
w aspekcie jego konsekwencji dla analiz  
z zakresu genetyki sądowej**

ROZPRAWA HABILITACYJNA



Łódź 2009

Renata Jacewicz

**Badanie polimorfizmu DNA u osób  
po allogenicznym przeszczepie  
komórek macierzystych hematopoezy  
w aspekcie jego konsekwencji dla analiz  
z zakresu genetyki sądowej**

ROZPRAWA HABILITACYJNA

Pracownia Genetyki Sądowej  
Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi



Łódź 2009

**Wydawca:** Uniwersytet Medyczny w Łodzi

© *Copyright by Renata Jacewicz, Łódź 2009*

**ISBN 978-83-61058-18-2**

**Druk i oprawa:** Biuro Promocji i Wydawnictw  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
ul. Kopcińskiego 20

***Podziękowanie***

***za okazane wsparcie i pomoc dla***

***Prof. dr. hab. n. med. Jarosława Berenta***

***oraz***

***Dr n. med. Joanny Rupy***

***Dr. n. med. Macieja Jędrzejczyka***

***Dr. n. med. Piotra Brzezińskiego***

***Prof. dr. hab. n. med. Krzysztofa Lewandowskiego***

***Prof. dr. hab. n. med. Tadeusza Dobosza***

***Prof. dr. hab. n. med. Stefana Szrama***



## Spis treści

1. Wstęp.....	7
1.1. Badania z zakresu genetyki sądowej.....	7
1.2. Polimorfizm w zakresie markerów autosomalnego DNA....	10
1.3. Polimorfizm w zakresie markerów chromosomu Y.....	15
1.4. Źródła materiałów w analizach genetyczno-sądowych.....	17
1.5. Allotransplantacja komórek macierzystych hematopoezy...	20
1.6. Chimeryzm DNA jako konsekwencja alloprzeszczepu.....	23
1.7. Metody oznaczania chimeryzmu poprzez przeszczepowego.....	26
1.8. Właściwości komórek macierzystych.....	31
2. Cel pracy.....	33
3. Materiał i metodyka badań.....	34
3.1. Materiał.....	34
3.2. Metodyka badań.....	36
3.2.1. Ocena mikroskopowa włosów biorców allo-HSCT.....	36
3.2.2. Izolacja genomowego DNA .....	36
3.2.3. Pomiar stężenia metodą fluorymetryczną.....	36
3.2.4. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym.....	37
3.2.5. Analiza multipleks STR-PCR.....	38
3.2.6. Ocena chimeryzmu donorowego.....	40
4. Wyniki.....	41
4.1. Ocena mikroskopowa włosów biorców allo-HSCT.....	41
4.2. Pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną.....	44
4.3. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym.....	44
4.4. Analiza polimorfizmu w reakcji multipleks STR-PCR.....	61
4.4.1. Analiza markerów autosomalnego DNA.....	61
4.4.2. Analiza markerów chromosomu Y.....	104
5. Omówienie wyników .....	133
5.1. Charakterystyka pacjentów.....	133
5.2. Ocena mikroskopowa włosów biorców allo-HSCT.....	133
5.3. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym.....	134
5.4. Analiza markerów autosomalnego DNA.....	137
5.5. Analiza markerów chromosomu Y.....	138
6. Dyskusja.....	141
7. Wnioski.....	157
8. Streszczenie.....	158
9. Piśmiennictwo.....	161
10. Wykaz skrótów wykorzystanych w pracy.....	175

# Wstęp

## 1.1. Badania z zakresu genetyki sądowej

Wprowadzenie analizy genetycznej to największy sukces w zakresie nauk medyczno-sądowych ubiegłego stulecia. Osiągnięcia w dziedzinie badań DNA, dokonane na przestrzeni ostatnich 20 lat, przyniosły rewolucyjny postęp i doprowadziły do wyodrębnienia się nowej dziedziny badawczej – genetyki sądowej [95]. Stanowi ona obecnie jedno z najskuteczniejszych narzędzi w egzekwowaniu prawa. Większość sprawców przestępstw, takich jak morderstwa czy gwałty, nie pozostaje bezkarna dzięki badaniu profili DNA w śladach biologicznych, pozostawionych na miejscu zbrodni, do jakich należą: włos, plama krwi, spermy czy śliny [18].

Prawidłowo zabezpieczony materiał dowodowy eliminuje możliwość dokonania zbrodni doskonałej. Śladowa ilość materiału pochodzącego od sprawcy, pozostawiona np. w wyniku dotknięcia przez niego przedmiotu, jest często wystarczająca do uzyskania niepowtarzalnego w populacji wzoru DNA [129]. Wprowadzenie tego wzoru do bazy danych, zawierających profile przestępców, prowadzi niczym nitka do kłębka do ustalenia personaliów osoby, od której zabezpieczony ślad pochodzi [17,57].

Poza aspektem kryminalistycznym genetyka sądowa obejmuje również identyfikację zwłok ludzkich na podstawie analizy ich szczątków, w tym również pochodzących z katastrof masowych, oraz analizy pokrewieństwa przeprowadzane celem ustalania personaliów osoby zaginionej [84,114]. W sprawach imigracyjnych i spadkowych prowadzi do ustalenia określonych relacji rodzinnych lub ich wykluczenia [164]. Do najczęściej przeprowadzanych analiz pokrewieństwa należy badanie ojcostwa. Ekspertyza DNA potwierdza bądź wyklucza ojcostwo również w sytuacjach pozornie trudnych, kiedy domniemany ojciec nie żyje [58].

Olbrzymie możliwości, jakimi dysponuje współczesna genetyka sądowa, wynikają z szerokiego zakresu wysoce czułych i efektywnych metod i narzędzi badawczych. Najważniejszym z nich jest technika PCR czyli łańcuchowa reakcja polimerazy opracowana przez Kary Mullisa w roku 1983. Umożliwia ona namnożenie DNA w milionowych ilościach kopii z wyjściowej pojedynczej sekwencji [131]. Technika ta pozwala na przeprowadzenie identyfikacji osobniczej na podstawie badania zaledwie

kilku, a w szczególnych przypadkach nawet jednej komórki organizmu człowieka, która zawiera 6 pg DNA [21].

Obecnie badania identyfikacyjne przeprowadzane są głównie z wykorzystaniem krótkich sekwencji tandemowych powtórzeń czyli sekwencji typu STR. Sekwencje te zwane również mikrosatelitarnymi zostały po raz pierwszy opisane w roku 1991 przez Edwardsa i wsp. [41]. Wielkość cząsteczki waha się tu w granicach 100-450 par zasad. Motyw repetytywny, zawierający od 2 do 6 nukleotydów, powtarza się w określonym miejscu genomu – *locus* od kilku do kilkudziesięciu razy dając kilka-kilkadziesiąt wariantów – alleli [26].

W walce z przestępczością wypracowane zostały jednolite standardy analizy markerów STR, jakie obowiązują na całym świecie [127]. Umożliwiają one wymianę informacji między laboratoriami bez względu na międzynarodowe granice [140]. Większość wysoko rozwiniętych krajów posiada komputerowe bazy danych, zawierające profile oskarżonych i skazanych [57,81]. Służą one wykrywaniu sprawców i kojarzeniu przestępstw, ustalaniu i weryfikacji danych osobowych oraz identyfikacji zwłok. Rdzeniem tych baz jest siedem *loci* rekomendowanych przez Interpol – Międzynarodową Organizację Policji Kryminalnych [48].

Tworzenie narodowych rejestrów profili DNA-STR zainicjowało Forensic Science Service w roku 1995 w Wielkiej Brytanii. Najwcześniej wprowadzono w tym kraju zmiany legislacyjne, które umożliwiły pozyskiwanie profili DNA poprzez analizę wymazów z jamy ustnej, cebulek włosów oraz śladów biologicznych ujawnianych na miejscu przestępstwa [46]. Trzy lata później podobna baza danych administrowana przez FBI powstała w Stanach Zjednoczonych. Decyzją Rady Unii Europejskiej z roku 1997 państwa Unii Europejskiej zostały zaproszone do utworzenia krajowych baz profili DNA. Bazy takie uruchomiono kolejno w Holandii, Austrii i w Niemczech. W Polsce funkcjonuje od niedawna policyjna baza danych „Genom”, zawierająca profile STR-DNA oskarżonych, profile ze śladów pozostawionych na miejscach przestępstw oraz profile osób i zwłok ludzkich o nieustalonej tożsamości [92].

Podstawowym narzędziem w badaniach z zakresu genetyki sądowej jest system fluorescencyjnej detekcji sprzężony z automatycznymi sekwenatorami [27]. Pozwala on na badanie DNA w oparciu o zestawy multipleksowych markerów, których analiza stanowi wysoce wydajną procedurę pozwalającą zredukować do minimum czas, koszty oraz ilość matrycy DNA [60]. W reakcji multipleks PCR powiela się równocześnie kilka lub kilkanaście *loci* genomowego DNA, przy czym jeden ze starterów dla danego *locus* jest znakowany fluorescencyjnie.



Zastosowanie kilku różnych fluorochromów umożliwia jednoczesną detekcję wielu *loci*, co pozwala na uzyskanie wysokiej informatywności i wartości dowodowej badania [40,158].

Typowym problemem w badaniach genetyczno-sądowych śladów biologicznych jest bardzo mała ilość materiału lub jego degradacja, skutkująca niską ilością matrycy DNA, tzw. LCN DNA [21]. Badanie znikomej ilości materiału genetycznego prowadzi do wystąpienia niepożądanych zjawisk towarzyszących reakcji PCR, takich jak wypadanie (*dropout*) alleli, detekcja przypadkowych alleli czy też nierównomierna amplifikacja alleli w obrębie poszczególnych *loci* [132].

Jedną z metod opracowanych do rozwiązywania problemów związanych z cechami LCN DNA jest wstępna amplifikacja całego genomu (WGA) w celu namnożenia matrycy DNA przed właściwą *locus*-specyficzną analizą PCR [12]. Metoda ta nie weszła jednak dotąd do powszechnego zastosowania z uwagi na jej pracochłonność i wysokie koszty, przy jednoczesnym braku powtarzalności uzyskiwanych rezultatów [102,124]. Inną metodą badawczą, pomocną w genetyce sądowej, jest nowoczesna technika mikroskopowa, tzw. mikrodysekcja laserowa, pozwalająca na wycięcie z preparatu pojedynczych komórek przed właściwą analizą DNA [38,100].

Obecnie trwają intensywne wysiłki badawcze, których celem jest opracowywanie i wdrażanie markerów mało podatnych na degradację oraz ekstremalnie czułych systemów detekcji tych markerów. Do badania śladów biologicznych rekomendowane są markery typu mini-STR, dające produkty w postaci krótkich amplikonów w zakresie 100-200 par zasad [35,60]. Detekcję polimorfizmu DNA w przypadku jego silnej degradacji umożliwiają markery typu SNP o zmienności w obrębie pojedynczych nukleotydów [22,23].

W sytuacjach, gdy dysponuje się znikomą ilością matrycy DNA, bardzo przydatna w genetyce sądowej jest technika ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym, tzw. QR-PCR. Metoda ta umożliwia dokładny pomiar stężenia DNA podlegającego amplifikacji w próbce przed właściwą analizą sekwencji typu STR [49,162].

Jednymi z najczęściej wykorzystywanych w genetyce sądowej zestawów do ilościowej reakcji PCR są Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit oraz Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit firmy Applied Biosystems [8]. Charakterystykę sekwencji podlegających amplifikacji z zastosowaniem wymienionych zestawów zawarto w tabeli 1.1.

Tabela 1.1. Charakterystyka badanych sekwencji z zastosowaniem zestawów do ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym [8].

Zestaw	Sekwencja badana	Lokalizacja chromosomalna	Ploidalność sekwencji
Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit	Gen odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (hTERT)	5p15.33	Diploidalna 2n
Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit	Gen determinujący płeć męską (SRY)	Yp11.3	Haploidalna 1n

## 1.2. Polimorfizm w zakresie markerów autosomalnego DNA

Analiza markerów typu STR zlokalizowanych na chromosomach autosomalnych stała się standardem w badaniach z zakresu genetyki sądowej zarówno w identyfikacji osobniczej, jak i w analizach pokrewieństwa [24]. Mimo udoskonalania i wprowadzania coraz to lepszych metod detekcji zmienności w obrębie układów typu SNP pozycja markerów typu STR jest niezagrożona [48]. Wynika to z rozbudowanego na świecie systemu baz danych skonstruowanych w oparciu o te markery, umożliwiającego powiązanie sprawcy ze śladem biologicznym pozostawionym na miejscu przestępstwa [20,23].

Zdarzają się niezwykle trudne sprawy z zakresu ustalania ojcostwa, kiedy nie żyje pozwany jak i jego rodzice, bądź gdy istnieje domniemanie, że ojcem dziecka jest brat bądź ojciec pozwanego [15]. Rozstrzygnięcie tego typu oraz innych trudnych analiz pokrewieństwa jest motorem napędowym do poszerzania zakresu badanych markerów i konstruowania jak najliczniejszych zestawów tych markerów, które okazały się być najbardziej informatywne [25,29]. Im większa jest liczba i wyższe wskaźniki polimorfizmu badanych markerów, tym większa jest szansa na prawidłową interpretację i ocenę wartości dowodowej analizy z zastosowaniem odpowiednich obliczeń biostatystycznych [70]. Zakresy i standardy badawcze formułowane są przez Międzynarodowe Instytucje, takie jak DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics [56,93] oraz Komisję Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii [75].

Wykorzystanie multipleksowych zestawów STR znacznie skraca czas analizy i czyni ją stosunkowo prostą i taną w wykonaniu. Ponadto pozwala na ograniczenie do minimum ilości amplifikowanego DNA w oparciu o jednoczesne powielenie kilkunastu markerów z tego samego matrycowego DNA, wyekstrahowanego z kilkudziesięciu, a niekiedy tylko z pojedynczych komórek [132]. Ma to zasadnicze znaczenie w badaniach identyfikacyjnych, w których dysponuje się niejednokrotnie śladową ilością materiału [12]. Istotny jest również fakt, iż markery typu STR w obrębie multipleksowych zestawów skonstruowanych dla potrzeb genetyki sądowej są specyficzne tylko dla człowieka. Ponadto podlegają one najprostszemu, kodominującemu modelowi dziedziczenia, a poszczególne allele dziedziczą się niezależnie od siebie.

Większość multipleksowych zestawów obejmuje 7 *loci* STR, tzw. *loci* ENFSI: D3S1358, vWA, D8S1179, D21S11, D18S51, TH01, FGA przyjętych jako podstawę baz danych, tworzonych przez laboratoria skupione w sieci o tej samej nazwie, której celem jest opracowywanie standardów badań genetycznych. Tego typu standardy mają na celu zapewnienie kompatybilności danych, możliwości ich wymiany i porównywania, przy czym dany zakres badań może być dowolnie poszerzany przez poszczególne laboratoria [48].

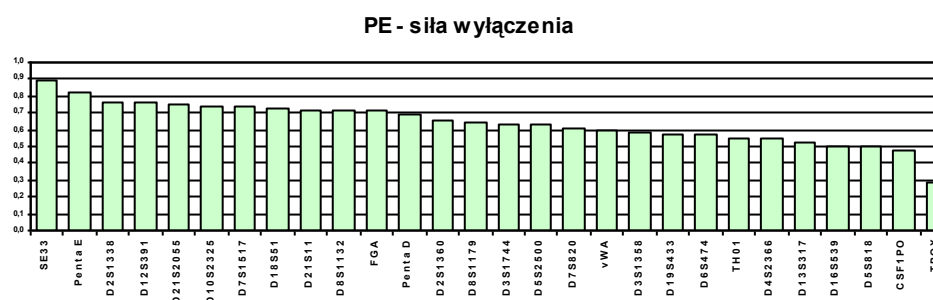
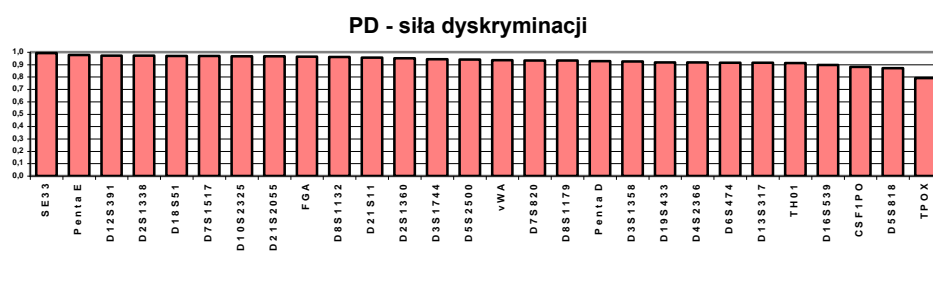
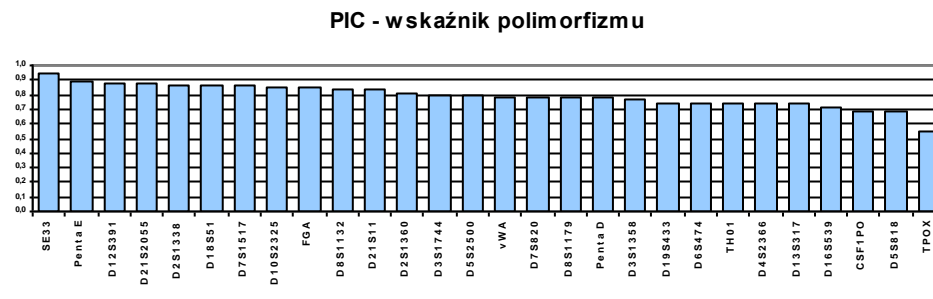
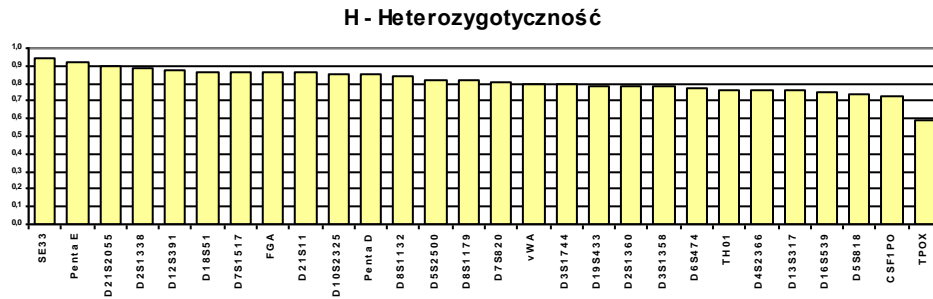
Drugą instytucją – poza ENFSI – wytyczającą standardy w zakresie badań DNA, stało się FBI, które wyznaczyło 13 *loci* systemu CODIS dla swoich baz danych w Stanach Zjednoczonych. Są wśród nich wszystkie 7 *loci* ENFSI oraz 6 dodatkowych: CSF1PO, D5S818, D7S820, D13S317, TPOX, D16S539 i *locus* amelogeniny [119].

Narodowe bazy danych skonstruowane w oparciu o zakresy ENFSI lub CODIS ulegają często poszerzeniu o dodatkowe markery. Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Komendy Głównej Policji wybrało przykładowo jako podstawę powstającej w naszym kraju bazy danych DNA zestaw SGM Plus, obejmujący 7 *loci* ENFSI oraz dodatkowo 4 inne *loci*, w tym *locus* amelogeniny [92].

W tabeli 1.2 zebrano *loci* badane przy użyciu najbardziej popularnych kompleksowych zestawów, przy czym kolorem zielonym zaznaczono zestaw *loci* ENFSI, a kolorem niebieskim dodatkowe *loci* systemu CODIS. Na rycinie 1.1 zestawiono parametry, które decydują o stopniu polimorfizmu oraz przydatności poszczególnych *loci* do badań, tj. heterozygotyczność, wskaźnik polimorfizmu, siłę dyskryminacji i siłę wyłączenia.

Tabela 1.2. Zestawienie autosomalnych *loci* typu STR przy użyciu najczęściej wykorzystywanych multipleksowych zestawów. Zielonym kolorem zaznaczono zestaw *loci* ENFSI, niebieskim kolorem dodatkowe *loci* systemu CODIS. Innymi kolorami oznaczono pozostałe *loci* tetranukleotydowe, za wyjątkiem trzech pentanukleotydowych oznaczonych na czerwono.

Zestaw multipleks PCR	SGM Plus	SEfiler Plus	Sinofiler	Identifiler	PowerPlex ES	PowerPlex 16	Humantype Chimera
Marker DNA							
D3S1358	+	+	+	+	+	+	
vWA	+	+	+	+	+	+	
D8S1179	+	+	+	+	+	+	
D21S11	+	+	+	+	+	+	
D18S51	+	+	+	+	+	+	+
TH01	+	+		+	+	+	
FGA	+	+	+	+	+	+	
CSF1PO			+	+		+	
D5S818			+	+		+	
D7S820			+	+		+	
D13S317			+	+		+	
TPOX		+		+		+	
D16S539	+	+	+	+		+	
D2S1338	+	+	+	+			
D19S433	+	+	+	+			
SE33		+			+		+
Penta E						+	
Penta D						+	
D10S2325							+
D4S2366							+
D6S474							+
D8S1132							+
D12S391			+				+
D2S1360							+
D3S1744							+
D5S2500							+
D7S1517							+
D21S2055							+
D6S1043			+				+



Rycina 1.1. Parametry stopnia polimorfizmu (H,PIC) i przydatności do badań (PD,PE) markerów typu STR w obrębie autosomalnego DNA.

Dwa najliczniejsze multipleksowe zestawy wykorzystywane w analizach genetyczno-sądowych, obejmujące swym zakresem 15 *loci* mikrosatelitarnych autosomalnego DNA oraz marker płci – amelogeninę, to AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$  Identifier $\mathbb{T}$ M PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) oraz PowerPlex $\mathbb{R}$ 16 System (Promega). Skupiają one wszystkie *loci* systemu CODIS oraz dwa dodatkowe *loci* – różne dla obu zestawów. Najczęściej stosowanym w praktyce genetyczno-sądowej jest zestaw AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$  Identifier. Analiza z wykorzystaniem tego zestawu odbywa się w oparciu o pięciokolorowy system detekcji i pozwala na uzyskanie wysokiej wartości dowodowej badania [71,110,152]. W tabeli 1.3. zestawiono oznaczenia, lokalizację chromosomalną oraz charakterystykę motywu repetytywnego markerów wchodzących w skład tego systemu według Butler'a [27].

Na uwagę zasługuje również multipleksowy system Humantype Chimera $\mathbb{R}$  PCR Amplification Kit (Biotype AG), stanowiący cenne uzupełnienie zakresu markerów w trudnych analizach pokrewieństwa, w jakich zakres 15 *loci* okazuje się być niedostateczny do sformułowania jednoznacznej opinii. Jest on zgodny z pozostałymi zestawami tylko w zakresie układu D18S51. Ponadto zawiera najbardziej polimorficzny układ SE33, będący podstawą baz danych w Niemczech, oraz 11 innych wysoce polimorficznych układów STR, jakie nie są niedostępne w żadnym innym komercyjnym zestawie [79].

Tabela 1.3. Charakterystyka i oznaczenia układów wchodzących w skład systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$  Identifier $\mathbb{T}$ M według Butler'a [27].

<i>Locus</i>	Lokalizacja	Motyw powtórzeniowy
D8S1179	8q24.13	[TCTA] [TCTG]
D21S11	21q21.1	[TCTA] [TCTG]
D7S820	7q21.11	GATA
CSF1PO	5q33.1	TAGA
D3S1358	3p21.31	[TCTG] [TCTA]
TH01	11p15.5	TCAT
D13S317	13q31.1	TATC
D16S539	16q24.1	GATA
D2S1338	2q35	[TGCC] [TTCC]
D19S433	19q12	AAGG
vWA	12p13.31	[TCTG] [TCTA]
TPOX	2p25.3	GAAT
D18S51	18q21.33	AGAA
D5S818	5q23.2	AGAT
FGA	4q31.3	CTTT
AMG	X: p22.22, Y: p11.2	-

### 1.3. Polimorfizm w zakresie markerów chromosomu Y

Analiza markerów chromosomu Y zastąpiła czasochłonną, trudną technicznie i prowadzącą zawsze do utraty części materiału metodę lizy preferencyjnej, która oddzielała frakcję plemników od frakcji epitelialnej w dwuetapowej izolacji DNA. Badanie markerów Y-STR w zestawach multipleksowych znakowanych fluorescencyjnie i przeznaczonych do automatycznej detekcji to obecnie jedna z najczulszych procedur badawczych, która służy do wykrywania męskiego DNA [98].

Umożliwia ona specyficzną detekcję męskiego materiału genetycznego w mieszaninach, w tym również takich, które zawierają zaledwie kilka męskich komórek w tle kilkuset czy nawet kilku tysięcy żeńskich. Z mieszaninami takimi spotykamy się podczas analizy wymazów z pochwy, zabezpieczonych jako dowód w sprawie o gwałt [115]. Markery chromosomu Y są ponadto przydatne w przypadkach zbiorowych gwałtów, kiedy uzyskuje się mieszaniny DNA pochodzącego od kilku mężczyzn. Analiza męskiego profilu DNA – haplotypu Y umożliwia również identyfikację sprawcy gwałtu, który poddał się wcześniej wazektomii lub cierpi na azoospermie, co skutkuje brakiem plemników w ejakulacie [133]. Poza zastosowaniem markerów chromosomu Y w badaniu materiałów pochodzących z przestępstw na tle seksualnym, genetyka sądowa wykorzystuje je również do identyfikacji męskiego DNA wszędzie tam, gdzie występuje on w mieszaninie z żeńskim [28,89].

Markery chromosomu Y są markerami haploidalnymi zlokalizowanymi na jednym chromosomie, co różni je od markerów diploidalnych autosomalnego DNA. Przekazywane są w postaci zestawu cech – haplotypu Y z ojca na syna, co oznacza, że potomkowie tej samej męskiej linii rodowej mają identyczny haplotyp Y pojawiający się w danej populacji z określoną częstością [34]. W związku z tym badanie tych markerów w analizie pokrewieństwa ogranicza się do męskich potomków. Ma także nieporównywalnie niższą wartość dowodową w odniesieniu do układów autosomalnych. Zdarza się jednak, że analiza Y-STR jest niezastąpiona w rozstrzygnięciu skomplikowanych, kilkupokoleniowych rodzinnych korelacji oraz w badaniach identyfikacyjnych osób zaginionych, gdy w grę wchodzi ustalanie pokrewieństwa w linii męskiej [13].

Analiza markerów chromosomu Y jest dobrze wystandaryzowana w aspekcie jej wykorzystania w analizach genetyczno-sądowych. Dostępnych jest wiele komercyjnych zestawów do multipleksowej reakcji PCR, z których jeden – AmpF $\Phi$ STR<sup>®</sup>Yfiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit umożliwiającą jednoczesną amplifikację 17 *loci* typu Y-STR – obejmuje

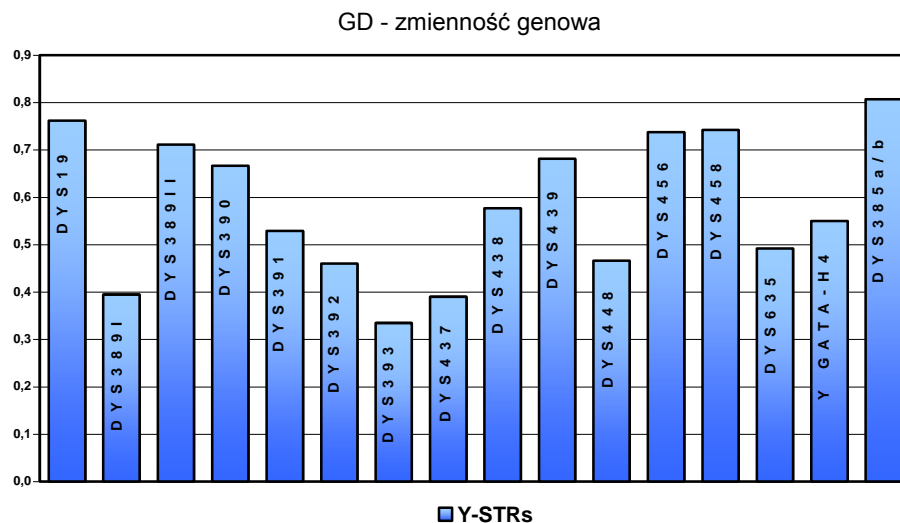
swym zakresem inne aktualnie dostępne zestawy tych markerów, takie jak Y-Plex™ 12 czy PowerPlex® Y [50]. W obrębie tego zakresu mieszczą się wprowadzone jako pierwsze do analiz układy tzw. europejskiego minimalnego haplotypu: DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, układy rekomendowane przez SWGDAM: DYS438, DYS439 oraz dodatkowe polimorficzne *loci*: DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, Y GATA H4.1 [26].

W tabeli 1.4. przedstawiono charakterystykę i oznaczenia układów, wchodzących w skład systemu AmpFℓSTR® Yfiler™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), zgodnie z wytycznymi Komisji DNA Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej [56,97]. Na rycinie 1.2 przedstawiono wartości zmienności genowej dla poszczególnych układów STR chromosomu Y, która jest wykładnikiem ich przydatności do badań [69].

Tabela 1.4. Charakterystyka i oznaczenia układów wchodzących w skład systemu AmpFℓSTR® Yfiler™ zgodnie z wytycznymi ISFG [56,97].

Locus Y	Zakres alleli	Motyw powtórzeniowy
DYS456	13-18	(AGAT) <sub>n</sub>
DYS389I	10-15	(TCTG) <sub>3</sub> (TCTA) <sub>n</sub>
DYS390	18-27	(tcta) <sub>2</sub> (TCTG) <sub>n</sub> (TCTA) <sub>n</sub> (TCTG) <sub>n</sub> (TCTA) <sub>n</sub> tca(tcta) <sub>2</sub>
DYS389II	24-34	(TCTG) <sub>n</sub> (TCTA) <sub>n</sub> N <sub>28</sub> (TCTG) <sub>3</sub> (TCTA) <sub>n</sub>
DYS458	14-20	(GAAA) <sub>n</sub>
DYS19	10-19	(TAGA) <sub>3</sub> tagg(TAGA) <sub>n</sub>
DYS385a/b	7-25	(aagg) <sub>6-7</sub> (GAAA) <sub>n</sub>
DYS393	8-16	(AGAT) <sub>n</sub>
DYS391	7-13	(tctg) <sub>3</sub> (TCTA) <sub>n</sub>
DYS439	8-15	(GATA) <sub>n</sub>
DYS635	20-26	(TCTA) <sub>4</sub> (TGTA) <sub>2</sub> (TCTA) <sub>2</sub> (TGTA) <sub>2</sub> (TCTA) <sub>2</sub> (TGTA) <sub>0,2</sub> (TCTA) <sub>n</sub>
DYS392	7-18	(TAT) <sub>n</sub>
GATA H4.1	17-22	(AGAT) <sub>4</sub> CTAT(AGAT) <sub>2</sub> (AGGT) <sub>3</sub> (AGAT) <sub>n</sub>
DYS437	13-17	(TCTA) <sub>n</sub> (TCTG) <sub>1-3</sub> (TCTA) <sub>4</sub>
DYS438	8-13	(TTTTTC) <sub>1</sub> (TTTTTA) <sub>0-1</sub> (TTTTTC) <sub>n</sub>
DYS448	17-24	(AGAGAT) <sub>n</sub> N <sub>42</sub> (AGAGAT) <sub>n</sub>





Rycina 1.2. Wartość zmienności genowej (GD) dla poszczególnych układów wchodzących w skład systemu AmpF $\Phi$ STR<sup>®</sup> Yfiler<sup>™</sup> [69].

#### 1.4. Źródła materiałów w analizach genetyczno-sądowych

W genetyce sądowej kluczowe znaczenie ma analiza profilu DNA ujawnionego w śladzie biologicznym, a następnie jego porównanie z profilem oznaczonym w materiale referencyjnym w celu wykluczenia bądź potwierdzenia pochodzenia badanego śladu od konkretnej osoby.

Mianem śladu biologicznego określane są organiczne substancje znajdujące na przedmiotach lub na ciele ludzkim podczas oględzin sądowo-lekarskich lub kryminalistycznych. Są to płyny ustrojowe, fragmenty tkanek, wydaliny lub wydzieliny. Każdy rodzaj materiału: krew, kości, zęby, tkanki miękkie, wytwory naskórka (włosy, paznokcie), większość wydzielin (ślina, pot, nasienie, wydzielina z pochwy) czy wydaliny (kał, mocz) może być wykorzystany jako źródło profilu genetycznego osoby, od której pochodzi [92].

Wszystkie komórki wchodzące w skład jednego organizmu mają teoretycznie identyczny profil DNA. Dlatego też możliwe jest porównywanie profilu DNA ujawnionego we włosie lub w plamie spermy, zabezpieczonych na odzież bądź na miejscu zdarzenia, z profilem DNA oznaczonym w materiale porównawczym, jakim jest wymaz z jamy ustnej czy krew.

Istnieją doniesienia świadczące o tym, że poszczególne tkanki mogą różnić się między sobą genetycznie i nie zawsze mają profil DNA osoby, od której pochodzą. Dzieje się tak w wyniku mutacji [112] lub tzw. chimeryzmu wrodzonego u bliźniąt [33,91] wynikającego z częściowej wymiany komórek macierzystych hematopoezy w fazie życia płodowego. Jest to również możliwe wtedy, gdy osoba, od której ślad pochodzi lub której tkanki są badane, przeżyła w przeszłości allotransplantację [32].

Plamy krwi były pierwszymi poddawanymi analizie śladami biologicznymi w historii badań sądowych. Są to najczęściej zabezpieczane ślady na miejscach zdarzeń kryminalnych związanych z najcięższymi rodzajami przestępstw przeciwko życiu i zdrowiu ludzi. Identyfikacja plam krwawych z wykorzystaniem profilowania DNA odgrywa decydujące znaczenie w procesie dowodowym [92]. Krew jest też stosunkowo często pobieranym materiałem porównawczym. W niektórych laboratoriach genetyki sądowej kod DNA, ujawniony wyłącznie w oparciu o badanie krwi, stanowi podstawę do wydania opinii w analizie ojcostwa.

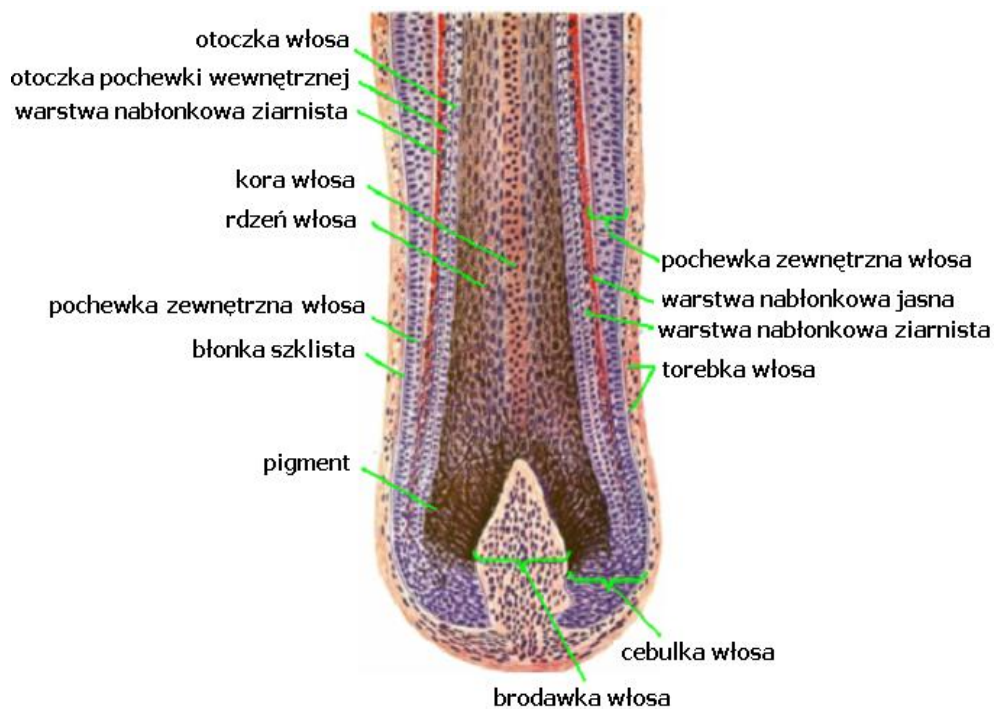
Wymaz komórek nabłonka z błony śluzowej jamy ustnej to obecnie najczęściej zabezpieczany materiał do badań genetyczno-sądowych. Wynika to m.in. ze stosunkowo prostej, nieinwazyjnej procedury jego pobrania z użyciem jałowych wymazówek, którymi kilkakrotnie pociera się wewnętrzną stronę policzka. Pobrane wymazy poddaje się wysuszeniu bądź zamrożeniu tak, aby nie podlegały one w trakcie przechowywania procesom gnilnym. Do porównawczych badań kryminalistycznych zabezpiecza się po dwa wymazy od osoby do specjalnie plombowanych pakietów, po wypełnieniu protokołu pobrania materiału. Podczas codziennych czynności, takich jak: oddychanie, mówienie, picie, jedzenie, żucie, gryzienie czy palenie, komórki nabłonka z jamy ustnej oraz składniki śliny przenoszą się na różne przedmioty i powierzchnie, stanowiąc doskonałe źródło materiału genetycznego osoby, która je pozostawiła. Dlatego też ślady te są częstym materiałem dowodowym zabezpieczonym m.in. na sztućcach, ustnikach papierosów, butelek, części twarzowej masek i czapek czy też miejscach klejenia kopert i znaczków [21,101].

Szczególnie istotną rolę w genetyce sądowej odgrywają ślady biologiczne w postaci włosów i paznokci. Obie te struktury powstają z komórek naskórka stanowiącego nabłonek wielowarstwowy płaski i mają wspólne ektodermalne pochodzenie. Są one zbudowane z podobnej proteinowej substancji – keratyny, z jakiej składa się najbardziej zewnętrzna, rogowa warstwa skóry. Charakteryzują się intensywnymi podziałami i wzrostem, a co się z tym wiąże – dużymi możliwościami regeneracyjnymi.

Wymazy bądź wyskrobiny spod paznokci lub ich ścinki stanowią często zabezpieczany materiał dowodowy, przekazywany do ekspertyzy genetycznej w nadziei na ujawnienie profilu DNA, pochodzącego od sprawcy lub ofiary. Pobierane są one również jako materiał do identyfikacji włók w stanie rozkładu [3].

Włosy należą do bardzo istotnych śladów biologicznych zabezpieczanych do badań genetyczno-sądowych. Ma to związek z ich dużą liczebnością, intensywnym wzrostem i nieustanną regeneracją. Wyróżniamy włosy długie obecne na głowie, w okolicach narządów płciowych, krótkie i grube (brwi i rzęsy), zarost u mężczyzn oraz meszek włosowy pokrywający prawie całe ciało. Identyfikacja profilu genetycznego we włosach jest szczególnie istotna wtedy, gdy ujawniane są one w ręce ofiary, gdyż mogą być wyrwane przez nią napastnikowi. Ponadto znalezienie włosów na ubraniu podejrzanego lub na narzędziach, jakimi się posługiwał, czy też włosów pochodzących z miejsca zdarzenia, pozwala na ustalenie faktycznego ich pochodzenia i wyjaśnienia okoliczności zbrodni. Włosy pobiera się przy użyciu specjalnej przylepnej folii, a następnie umieszcza pojedynczo w papierowych pakietach za pomocą pincet, które nie miażdżą trzonu włosa. Włos zabezpieczony z grzebienia czy odzieży osoby zaginionej wykorzystywany jest w procesie identyfikacji ludzkich szczątków. Włosy pobierane są również w charakterze materiału porównawczego. Zgodnie z przyjętą procedurą wyrywa się je wraz z cebulkami z pięciu okolic głowy i umieszcza w papierowych pakietach.

We włosie wyróżnia się korzeń oraz łodygę (trzon włosa). Korzeń włosa mieści się we wpukleniu naskórka zwanym mieszkem włosowym. Dolna część korzenia dochodzi do tkanki podskórnej i rozszerza się kolbkowato tworząc cebulkę włosa. Od strony tkanki podskórnej do cebulki (opuszki włosa) uwypukla się bogato unaczyniona i unerwiona tkanka łączna zwana brodawką włosa. W cebulce włosa znajdują się komórki macierzyste, które w okresie wzrostu włosa (anagenie) intensywnie dzielą się i wzrastają, powodując wydłużanie się włosa. Oddalając się od cebulki włosa komórki te ulegają keratynizacji i spłaszczeniu, a następnie tracą jądra i w znacznej części organelle komórkowe. W wyniku procesu degradacji komórek wytwarzających włos w jego części wystającej ponad powłoki – łodydze – występują zrogowaciałe komórki pozbawione jądra i przyjmujące charakter silnie zespolonych ze sobą płytek rogowych. Schemat przedstawiający strukturę korzenia włosa, według Sobotty i Hammersena [134], zamieszczono na rycinie 1.3.



Rycina 1.3. Schemat obrazujący strukturę korzenia włosa według Sobotty i Hammersena [134].

Istnieją uregulowania prawne dotyczące pobrania materiału do badań od oskarżonych, podejrzanych oraz osób, co do których zachodzi podejrzenie popełnienia przestępstwa. Zgodnie z art. 74 Kodeksu postępowania karnego, po nowelizacji z roku 2003r., jak i w myśl art. 15 Ustawy o Policji, po zmianach z roku 2004, dopuszcza się pobranie krwi, włosów, wymazów ze śluzówki policzków lub innych wydzielin od każdego, bez względu na to, czy wyraża zgodę, czy też nie [154,155,156,157]. W myśl art. 192a Kodeksu postępowania karnego włosy, ślinę i wymazy ze śluzówki policzków można również pobrać od świadków „w celu ograniczenia kręgu osób podejrzanych lub ustalenia wartości dowodowej ujawnionych śladów” [156].

### 1.5. Allotransplantacja komórek macierzystych hematopoezy

W wielu ciężkich schorzeniach, takich jak nowotwory układu krwionośnego i limfatycznego (ostre i przewlekłe białaczki, chłoniaki ziarnicze i niezziarnicze, zespoły mielodysplastyczne, szpiczak mnogi),

nienowotworowe choroby hematologiczne (anemie aplastyczne, talasemie, hemoglobinopatie, poważne defekty immunologiczne), wrodzone zespoły metaboliczne (adrenoleukodystrofia, osteopetroza, gangliozydoza), choroby o podłożu autoimmunologicznym (neurologiczne, reumatologiczne) wykonuje się przeszczep komórek macierzystych hematopoezy. Wyróżnia się dwa podstawowe typy transplantacji komórek – autotransplantacje i allotransplantacje.

Autotransplantacja to przeszczep w obrębie tej samej osoby. Polega on na wykorzystaniu komórek macierzystych pozyskanych wcześniej od pacjenta, odpowiednio oczyszczonych i odseparowanych od komórek nowotworowych. Chorego poddaje się silnemu leczeniu kondycjonującemu, niszczącemu resztkową masę nowotworu, a następnie retransplantacji z wykorzystaniem jego własnych komórek, przechowywanych do tego czasu w odpowiednich warunkach. Zaletą tej metody jest jej szeroka dostępność, niska częstość powikłań i możliwość zastosowania u ludzi starszych. Wykorzystanie własnych komórek macierzystych do odnowy układu krwiotwórczego i odpornościowego eliminuje chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) [165]. Wadą tej metody jest brak przeciwnowotworowego działania przeszczepionych komórek i co się z tym wiąże – występowanie częstszych nawrotów niż po allotransplantacji. Prawdopodobieństwo wznowy w autotransplantacji sięga aż 50% [44].

Allotransplantacja to przeszczep od innej osoby – dawcy rodzinnego lub niespokrewnionego. Dawcą rodzinnym jest w większości przypadków brat lub siostra, identyczny w zakresie antygenów transplantacyjnych. Jak największa zgodność w obrębie antygenów HLA jest wymagana po to, aby zminimalizować ryzyko odrzucenia przeszczepu lub reakcję GVHD. Optymalnym przypadkiem jest dawca syngeniczny, tj. bliźniak jednojajowy, całkowicie identyczny pod względem genetycznym z biorcą. Alternatywnym dawcą jest każdy inny dawca rodzinny, jak np. dawca haploidentyczny posiadający połowę zgodnych antygenów (matka czy ojciec) lub pochodzący z krajowych bądź międzynarodowych rejestrów dawca niespokrewniony, zgodny w zakresie antygenów HLA z biorcą [139].

Doskonalenie metod immunogenetycznego doboru dawców i biorców w oparciu o postęp w zakresie biologii molekularnej zmniejsza częstość powikłań po transplantacji i wiąże się z ciągłym rozwojem tej metody leczenia. Odsetek chorych z ostrą białaczką szpikową, u których występuje remisja hematologiczna, wzrósł niemal dwukrotnie w okresie ostatnich 15 lat i wynosi obecnie 78%. W roku 2005 w ramach Europejskiej Grupy ds. Transplantacji Komórek Krwi i Szpiku wykonano 24168 transplantacji komórek macierzystych, w tym 8880 allotransplantacji, co daje 20% przyrost w porównaniu z rokiem poprzedzającym.

5263 allotransplantacji pochodziło od dawców rodzinnych i 3617 od dawców niespokrewnionych, co stanowi odpowiednio o 15 i 27% więcej niż w roku poprzednim. Również w Polsce odnotowano wzrost liczby allotransplantacji komórek macierzystych – 335 w 2005 roku, w tym 177 przeszczepy rodzinne i 158 przeszczepów od dawców niespokrewnionych, choć liczba ta jest nadal dwu-, trzykrotnie niższa w porównaniu z liczbą odnotowaną w Czechach i krajach Europy Zachodniej [44,61,167].

Do niedawna za górną granicę wieku biorcy przeszczepu komórek krwiotwórczych uznawano 40 rok życia. Dzięki postępowi w diagnostyce i leczeniu granica ta aktualnie przesunęła się. Znaczny wzrost liczby allotransplantacji i obniżenie granicy wieku biorców wiąże się z udoskonalaniem metod przeszczepiania i wprowadzeniem niskotoksycznych sposobów przygotowywania do przeszczepu [99].

Dawniej powszechnie stosowano przed przeszczepem kondycjonowanie mieloablacyjne (MA), czyli całkowite zniszczenie hematopoezy biorcy za pomocą chemioterapii i radioterapii. Obecnie ten typ kondycjonowania wykorzystuje się przy szczególnie agresywnych rodzajach nowotworów. W innych przypadkach coraz częściej stosuje się kondycjonowanie niemieloablacyjne (NMA) określane mianem kondycjonowania o zredukowanej intensywności, w którym przed przeszczepieniem przeprowadza się leczenie mniej niszczące narządy oraz układ krwiotwórczy biorcy [37]. Kondycjonowanie NMA wiąże się ze stosunkowo nową metodą miniprzyszczepów czyli leczenia immunologicznego nowotworów [44,86].

Minitransplantacje wykonywane są nie tylko w różnych postaciach nowotworów krwi, ale również w terapii guzów litych, takich jak neuroblastoma, rak nerki, piersi, jajnika. Jest to metoda terapeutyczna, stosowania zamiast agresywnej chemio- i radioterapii, polegająca na podawaniu cytotoksycznych limfocytów dawcy (DLI). Wykorzystuje się tutaj działanie dwustopniowe. Z jednej strony zwiększa się tolerancję biorcy na komórki dawcy, minimalizując tym samym konflikt między wszczepionymi komórkami odpornościowymi, a systemem immunologicznym biorcy czyli reakcją GVHD. Z drugiej strony przeszczepiane limfocyty dawcy poddaje się zabiegom mającym na celu poprawienie ich efektywności w niszczeniu komórek nowotworowych w organizmie biorcy, tzw. działanie przeszczep przeciwko nowotworowi (GVT) [86].

Ze względu na źródło przeszczepianych komórek macierzystych hematopoezy wyróżnia się transplantację szpiku pobieranego w warunkach operacyjnych aspiracyjnie (BMT) oraz transplantację komórek krwiotwórczych izolowanych z krwi obwodowej (PBSCT) metodą

leukaferazy, tj. separacji komórek jednojądrowych z krwi obwodowej po mobilizacji z zastosowaniem czynnika wzrostowego (G-CSF). Ponadto poza szpikiem i krwią obwodową jako źródło przeszczepów wykorzystuje się komórki macierzyste pobrane z krwi pępowinowej (UCBT). Stanowią one bardzo dobry materiał transplantacyjny, ponieważ posiadają obniżoną aktywność immunologiczną. Przy ich zastosowaniu nie jest wymagana pełna zgodność w antygenach HLA, a po przeszczepie występuje znacznie niższe ryzyko powikłań oraz reakcji GVHD [37,47].

### **1.6. Chimeryzm DNA jako konsekwencja alloprzeszczepu**

Oczekiwany efekt allogenicznego przeszczepu komórek krwiotwórczych jest zastąpienie patologicznego krwiotworzenia pacjenta prawidłowym krwiotworzeniem zdrowego dawcy. Prowadzi to do zmiany fenotypu krwinek czerwonych biorcy na fenotyp dawcy oraz podobnej zmiany w obrębie markerów DNA. Występowanie w organizmie biorcy komórek dawcy nosi nazwę chimeryzmu genetycznego [90].

Monitorowanie stanu chimeryzmu DNA i dynamiki jego zmian, u pacjentów po allogenicznym przeszczepie pochodzących ze szpiku komórek macierzystych hematopoezy (allo-HSCT), jest istotnym wskaźnikiem diagnostycznym i wpływa na rokowanie. W zależności od stopnia odtworzenia hematopoezy z komórek macierzystych dawcy, w organizmie biorcy występują różne postacie chimeryzmu [11]. Możliwe zmiany chimeryzmu hematopoetycznego u osób po allotransplantacji przedstawiono w tabeli 1.5.

Termin pełny chimeryzm (CC), zwany też chimeryzmem dawcy (DC), ma przeciwne znaczenie do pierwotnej definicji słowa „chimera”. Pełny chimeryzm określa stan, w którym u pacjentów po allo-HSCT nie można wykazać obecności własnych, autologicznych komórek hematopoetycznych. Ujawnia się natomiast u nich wyłącznie profil DNA dawcy. Kompletnie zastąpienie krwiotworzenia biorcy przez komórki dawcy jest zasadniczym symptomem wskazującym na przyjęcie przeszczepu [54].

Kiedy po alloprzeszczepie komórek macierzystych szpiku obserwuje się zróżnicowane genetycznie linie komórkowe – linie pochodzące zarówno od dawcy jak i biorcy szpiku, stan taki określany jest mianem chimeryzmu mieszanego (MC) [80]. Termin ten jest odpowiednikiem pierwotnego pojęcia „chimera”, które stanowi określenie organizmu złożonego z dwóch lub więcej genetycznie zróżnicowanych populacji komórek.

W obrębie chimeryzmu mieszanego wyróżniamy: malejący chimeryzm mieszany (DMC) nazwany też przejściowym (TMC), stabilny chimeryzm mieszany (SMC) i postępujący chimeryzm mieszany (PMC) nazywany też rosnącym (IMC) [5,11,120].

Tabela 1.5. Zmiany chimeryzmu hematopoetycznego po allo-HSCT.

<b>Pełny chimeryzm CC</b>	Stan po przeszczepie, w którym ujawniamy wyłącznie komórki dawcy. Wskaźnik diagnostyczny przyjęcia przeszczepu. Szybkie osiągnięcie tego stanu związane jest z wysokim ryzykiem GVHD.
<b>Malejący chimeryzm mieszany DMC</b>	Stan przejściowy, w którym odsetek komórek biorcy zwykle nie przekracza 5%. W większości przypadków w kolejnych miesiącach dochodzi do konwersji w CC. Powiązany z niskim ryzykiem GVHD.
<b>Stabilny chimeryzm mieszany SMC</b>	Mieszany profil markerów DNA dawcy i biorcy, w którym odsetek komórek biorcy nieprzekraczający 20% pozostaje na stałym poziomie. Powiązany z dobrym rokowaniem.
<b>Postępujący chimeryzm mieszany PMC</b>	Mieszany profil markerów DNA dawcy i biorcy, w którym odsetek komórek biorcy przekraczający 5% wzrasta w czasie. Wskaźnik prognostyczny dużego ryzyka wznowy choroby.
<b>Odnowa autologiczna AR</b>	Stan po allo-HSCT, kiedy w krwi/szpiku biorcy nie stwierdza się DNA komórek dawcy. Związany z wznową choroby podstawowej

Klasyczne postępowanie mieloablacyjne z zastosowaniem radio- i chemioterapii, prowadzące do całkowitego zniszczenia krwiotworzenia pacjenta, powoduje na ogół w krótkim czasie po przeszczepie wystąpienie stanu pełnego chimeryzmu. Wystąpienie wczesnego chimeryzmu dawcy z jednej strony wiąże się z dobrym rokowaniem i remisją, z drugiej natomiast strony ze zwiększonym ryzykiem rozwoju ciężkiej GVHD [5].

U większości pacjentów z przygotowaniem niemieloablacyjnym, w początkowym okresie po przeszczepie, obserwuje się stan malejącego



(przejściowego) chimeryzmu mieszanego. Eliminacja komórek biorcy i przejście w stan chimeryzmu pełnego (chimeryzmu dawcy) przebiega u nich zwykle w późniejszym okresie ze zmienną osobniczo szybkością [120].

Stan stabilnego chimeryzmu mieszanego może istnieć nawet przez kilka lat po przeszczepie bez oznak wznowy, co w przypadku choroby nowotworowej oznacza, że odradzające się komórki biorcy są komórkami prawidłowymi. Postępujący chimeryzm mieszany jest natomiast wskaźnikiem dużego ryzyka odrzucenia przeszczepu. Może prowadzić do autologicznej odnowy, kiedy w krwioobiegu biorcy po allo-HSCT nie stwierdza się komórek dawcy [11,90].

Głównym celem oznaczeń chimeryzmu hematopoetycznego jest udokumentowanie przyjęcia przeszczepianych komórek krwiotwórczych w organizmie biorcy. Monitorowanie zmian stanu chimeryzmu w czasie umożliwia ocenę ryzyka odrzucenia przeszczepu oraz śledzenie choroby GVHD. Pozwala również na wczesne wykrycie wznowy choroby podstawowej oraz służy ocenie choroby resztkowej (MRD), która charakteryzuje się obecnością populacji komórek białaczkowych między populacją komórek o prawidłowym fenotypie, niewykrywalnych w badaniu morfologicznym [145].

Detekcja mikrochimeryzmu komórkowego po allo-HSCT występuje wtedy, gdy mniejszy komponent mieszaniny nie przekracza 1%, np. kiedy nie więcej niż 1 komórka biorcy przypada na 100 komórek dawcy. Mikrochimeryzm jest wykrywany wyłącznie przy użyciu wysoce czułych technik analizy genetycznej, jak np. PCR w czasie rzeczywistym [43,73].

Dla podjęcia właściwej terapii po przeszczepie istotna jest też analiza tzw. chimeryzmu liniowego w obrębie różnych frakcji komórkowych. Pozwala ona na detekcję rozszczepienia chimeryzmu, kiedy np. w obrębie limfocytów T frakcji limfoidalnej występuje 100% chimeryzm donorowy, a w obrębie granulocytów frakcji mieloidalnej 100% chimeryzm biorcy [5,120].

W zależności od uzyskanego obrazu chimeryzmu i jego zmian w określonych odstępach czasu możliwe jest zastosowanie najskuteczniejszej terapii [117] oraz optymalnego postępowania. Może być nim podjęcie leczenia immunosupresyjnego, które prowadzi do uzyskania stanu tolerancji przeszczepionych komórek krwiotwórczych dawcy w organizmie biorcy [86]. Również doszczepianie komórek krwiotwórczych dawcy czy też infuzja limfocytów dawcy (DLI) może zapobiec odrzuceniu przeszczepu lub wznowie choroby podstawowej.

Zabiegi te pozwalają na zastąpienie hematopoezy biorcy przez komórki krwiotwórcze dawcy przy zachowanym efekcie GVT [37,73,149].

### **1.7. Metody oznaczania chimeryzmu poprzyszczepowego**

Ocena chimeryzmu hematopoetycznego przebiega w oparciu o różnicę pomiędzy dawcą i biorcą w zakresie polimorficznych markerów genetycznych lub ich produktów. Podobnie jak w genetyce sądowej istotnym aspektem jest optymalizacja i standaryzacja stosowanych metod i zakresów badawczych. Warunkuje ona porównywanie badań między laboratoriami i wypracowanie jednolitej strategii diagnostycznej [148,161].

Jednym z pierwszych testów stosowanych w ocenie przyjęcia przeszczepu była analiza antygenów erytrocytów. Czulość tej metody oceniana jest na 0,04-3%. Ograniczenia w jej wykorzystaniu wiążą się z detekcją tylko jednego typu komórek, a także możliwością błędnej interpretacji związanej z substytucyjnym leczeniem pacjentów preparatami krwi. Przeszczepiane komórki hematopoezy pochodzą najczęściej od dawcy rodzinnego, identycznego pod względem antygenów ABO z biorcą. W takich przypadkach informatywność tej metody jest zerowa [73,120].

Analiza zmienności poprzyszczepowej jest możliwa także z zastosowaniem konwencjonalnej cytogenetyki analizującej strukturę chromosomów metafazowych. Metoda ta może być stosowana w sytuacji, gdy płeć biorcy jest odmienna od płci dawcy, za wyjątkiem występowania specyficznych anomalii cytogenetycznych, jakie różnicują dawcę i biorcę niezależnie od płci. Z uwagi na niską czulość ocenianą na 5-10% oraz dużą pracochłonność metoda ta nie należy do często wykorzystywanych [120].

W porównaniu do klasycznej cytogenetyki znacznie wyższą czulością charakteryzuje się analiza kariotypu z zastosowaniem fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Ocena ilościowa chimeryzmu dotyczy zarówno chromosomów metafazowych, jak i interfazowych. W metodzie tej wykorzystuje się specyficzne sondy molekularne hybrydujące z sekwencjami centromerów chromosomów płci – sondy DXZ1, DXZ3 specyficzne dla chromosomu X oraz sondy DYZ1, DYZ3 specyficznie dla chromosomu Y. Zastosowanie FISH jest możliwe w około 50% przypadków pacjentów po allo-HSCT, których dawca ma odmienną od nich płeć [73].

Wykrycie w 1985 r. przez A. Jeffreys'a [72] wysoce zmiennych regionów minisatelitarnego DNA odegrało istotną rolę w analizie

chimeryzmu. Metoda ta opiera się na ocenie różnic w długości fragmentów restrykcyjnych rozpoznawanych przez endonukleazy restrykcyjne i dlatego określono ją mianem RFLP. W analizie tej wykorzystuje się transfer Southern'a oraz hybrydację z oligonukleotydowymi sondami molekularnymi wyznakowanymi kolorymetrycznie, izotopowo lub chemiluminescencyjnie. Metodę tę charakteryzuje bardzo wysoka informatywność, gdyż minisatelitarny DNA obejmuje najbardziej polimorficzne sekwencje genomu. Do jej wad należy niska czułość oraz duży nakład czasu i środków potrzebnych do jej zastosowania.

Opracowanie przez Mullisa i wsp. metody łańcuchowej reakcji polimerazy, która po raz pierwszy została opisana w 1985 roku [122], a następnie wykrycie czteronukleotydowych mikrosatelit genomowego DNA przez Edwardsa i wsp. [41], zapoczątkowało rozwój nowych, niezwykle czułych i informatywnych metod oceny chimeryzmu hematopoetycznego.

Wprowadzenie automatycznych analizatorów pozwoliło na ocenę chimeryzmu po allo-HSCT w oparciu o detekcję fluorescencyjną na żelu poliakrylamidowym. Dzięki tej technice możliwa jest jednoczesna analiza wielu *loci* genomowego DNA [83]. Skonstruowane i wystandaryzowane do celów identyfikacji osobniczej komercyjnie dostępne zestawy multipleksowe, które zestawiono w tabeli 1.2, zawierają markery STR o wysokich wskaźnikach polimorfizmu (rycina 1.1). Ze względu na prostą i szybką procedurę badawczą, niezależność od różnicy płci dawca-biorca, małą ilość wymaganego materiału i wysoką czułość są one szeroko wykorzystywane również w analizie chimeryzmu przeszczepowego [19,136]. Do najbardziej informatywnych, pozwalających na blisko 100% rozróżnienie komórek dawcy i biorcy, należą zestawy o największej liczbie polimorficznych markerów, takie jak AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$  Identifier $\mathbb{T}$ <sup>™</sup>, PowerPlex $\mathbb{R}$ 16 oraz Humantype Chimera $\mathbb{R}$ .

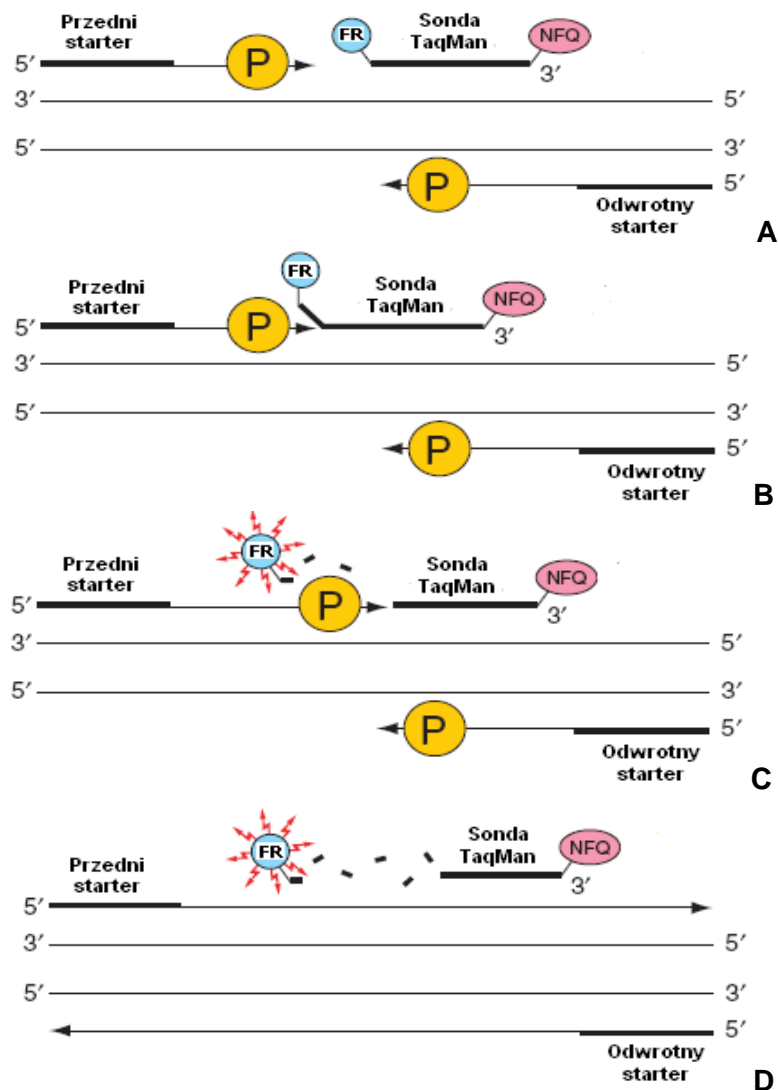
W oparciu o powyższe zestawy można przeprowadzić ocenę ilościową chimeryzmu u osób po allotransplantacji [105]. Do oceny tej wykorzystuje się odczyt wysokości bądź pola powierzchni sygnałów – pików dla poszczególnych alleli dawcy i biorcy. W zależności od uzyskanych układów alleli warunkujących określone genotypy stosuje się różne wzory do obliczeń procentowej zawartości komórek dawcy i biorcy po allo-HSCT [126,146].

Analizę chimeryzmu u pacjentów po alloprzeszczepie, których płeć jest różna od płci dawcy, przeprowadza się również z wykorzystaniem markerów specyficznych dla chromosomów płci, jak np. tych zawartych w zestawie AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$ Yfiler $\mathbb{T}$ <sup>™</sup> (tabela 1.4) oraz w oparciu o analizę genu amelogeniny (AMG) kodującego białko szkliwa zębów. Sekwencja tego

genu jest homologiczna dla obu chromosomów w około 90%. Różnice dotyczą delecji 6 nukleotydów w obrębie pierwszego intronu genu AMG chromosomu X. Na skutek tej delecji amplifikacja AMG z zastosowaniem tej samej pary starterów daje fragment o 6 par zasad dłuższy dla chromosomu Y niż analogiczny dla chromosomu X [21].

Chimeryzm poprzeczepowy można także ocenić poprzez analizę genu SRY, który jest zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu Y. Produkt transkrypcji tego genu warunkuje proces różnicowania jąder. Analiza obecności genu SRY determinującego płęć męską jest możliwa z zastosowaniem ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (QR-PCR). Jest to niezwykle szybka i czuła metoda, która umożliwia wykrycie 1 komórki męskiej wśród 100000 komórek żeńskich [116,130]. Technika ta pozwala na najwcześniejsze wykrycie odrzucenia przeszczepu i wznowy choroby podstawowej w oparciu o analizę zmienności pomiędzy dawcą a biorcą w obrębie markerów typu SNP [2,74].

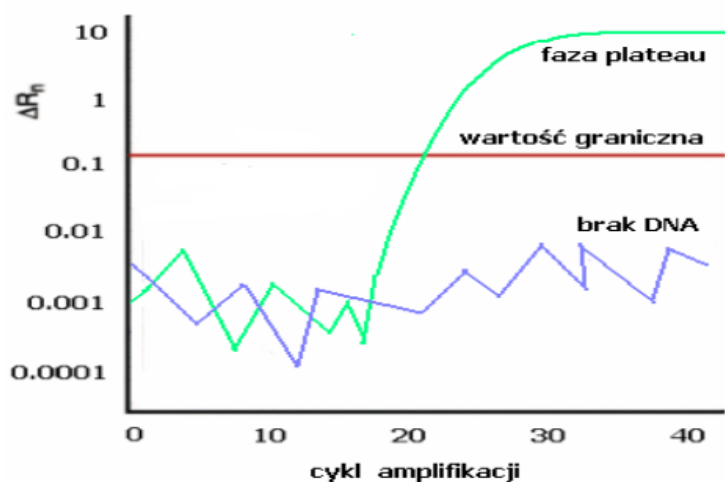
Monitorowanie chimeryzmu za pomocą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym w najczulszym wariantcie tej metody przebiega z wykorzystaniem specyficznych dla amplifikowanego fragmentu DNA sond TaqMan, które są znakowane cząsteczkami fluorochromów. W reakcji tej jest wykorzystany rezonansowy transfer energii fluorescencji zachodzący pomiędzy wyznakowaną fluorescencyjnie cząstką reporterową sondy – FR a nieznakowaną cząstką wygaszacza – NFQ. Fluorescencja emitowana przez reporter w stanie spoczynku jest wychwytywana przez znajdujący się w bliskim położeniu wygaszcz i zamieniana w energię cieplną. Obecność badanego genu lub wariantu genowego skutkuje związaniem sondy, a to z kolei zajęciem replikacji badanego rejonu DNA. W czasie reakcji PCR polimeraza Taq pełniąc jednocześnie funkcję 5' endonukleazy hydrolizuje sondę, co powoduje oddalenie reportera od wygaszacza i prowadzi do swobodnej emisji sygnału fluorescencyjnego. Wielkość tego sygnału jest wprost proporcjonalna do ilości zhydrolizowanej sondy, a tym samym powstałego produktu PCR. Ilość powstałego produktu PCR jest zależna od ilości wyjściowej matrycy DNA. Monitorowanie ilości powstającego amplikonu w trakcie trwania reakcji zachodzi w mikroprocesorowo sterowanym termocyklerze z wbudowanym systemem optycznym, dzięki któremu możliwy jest pomiar uwolnionej fluorescencji [49]. Poszczególne etapy reakcji QR-PCR z zastosowaniem sondy TaqMan, według [8], przedstawiono na rycinie 1.4.



Rycina 1.4. Etapy reakcji QR-PCR z zastosowaniem sondy TaqMan [8].

- A** – Znakowany fluorescencyjnie reporter (FR) oraz nieznakowany wygaszacz (NFQ) związane odpowiednio z końcem 5' oraz 3' sondy TaqMan hybrydującej do określonej sekwencji,  
**B** – Sonda w stanie nienaruszonym, emisja fluorescencji reportera wychwytywana przez wygaszacz,  
**C** – Polimeryzacja nici DNA, odcięcie cząstki reporterowej przez polimerazę DNA (P) w każdym kolejnym cyklu reakcji PCR,  
**D** – Kompletna polimeryzacja nici DNA, emisja sygnału fluorescencji reportera w wyniku jego oddzielenia od wygaszacza.

Na rycinie 1.5. przedstawiono typowy wykres reakcji QR-PCR. Wykres ten obrazuje wzrost sygnału fluorescencji w kolejnych cyklach amplifikacji. Powyżej wartości granicznej – jaka standardowo wynosi 0,2 – następuje detekcja fluorescencji, a tym samym odczyt stężenia DNA. Nieprzekroczenie wartości granicznej wskazuje na brak DNA w badanej próbce.



Rycina 1.5. Wykres reakcji PCR w czasie rzeczywistym.  
 $\Delta R_n$  – sygnał fluorescencji w skali logarymicznej.

Podstawowym założeniem metody QR-PCR jest to, iż we wczesnych etapach reakcji, w fazie geometrycznego wzrostu, amplifikacja DNA zachodzi z wysoką i stałą wydajnością sięgającą 100%, tzn. w trakcie każdego cyklu następuje podwojenie produktu amplifikacji. W fazie tej występuje liniowa zależność między stężeniem DNA a wartością progową  $C_T$ , jaka określa, ile cykli musi zajść, by intensywność sygnału fluorescencji  $R_n$  przekroczyła wartość tła, a więc była wykrywalna. Wartość  $C_T$  jest proporcjonalna do ilości kopii badanej sekwencji obecnej w próbce. Im wyższa koncentracja produktów PCR, a co się z tym wiąże wyjściowa ilość matrycy DNA, tym niższa wartość  $C_T$ , przy którym jest wykrywana fluorescencja. Wysoka wartość  $C_T$  jest związana z niską liczbą kopii matrycy. Różnica wartości  $C_T$  o 1 skutkuje dwukrotną różnicą w początkowej ilości matrycy DNA. Limit detekcji DNA w tej metodzie wynosi 46 pg, co odpowiada około 8 kopiom haploidalnej sekwencji oraz 15 kopiom diploidalnej sekwencji DNA [8].

## 1.8. Właściwości komórek macierzystych

Szpik kostny jest miejscem produkcji komórek macierzystych hematopoezy (krwiotworzenia), które mnożąc się przez całe życie dają początek prekursorom komórek krwi i układu odpornościowego – mieloidalnym oraz limfoidalnym komórkom progenitorowym. Różnicują się one we wszystkie upostaciowane elementy krwi obwodowej, tj. krwinki czerwone – eryocyty, płytki krwi – trombocyty oraz krwinki białe – leukocyty [59].

W obrębie komórek szpiku wyróżnia się też komórki niebiorące udziału w hematopoezie, takie jak komórki tkanki łącznej siateczkowej i tłuszczowej stanowiące utkanie zrębowe narządu. Znajdują się tam również komórki nisko zróżnicowane, które mogą dawać początek wszystkim tkankom i narządom [31, 52, 107, 113]. Wiele naukowych eksperymentów świadczy ponadto o tym, że w obrębie dojrzałych hematopoetycznych komórek szpiku istnieją takie, które mogą przekształcać się w inne niehematopoetyczne komórki układu nerwowego, nabłonka, wątroby, nerek, płuc, skóry, przewodu żołądkowo-jelitowego, miocytów serca, mięśni szkieletowych [1,76,77,151]. Natomiast komórki macierzyste układu nerwowego mają zdolność różnicowania się w komórki krwi [16].

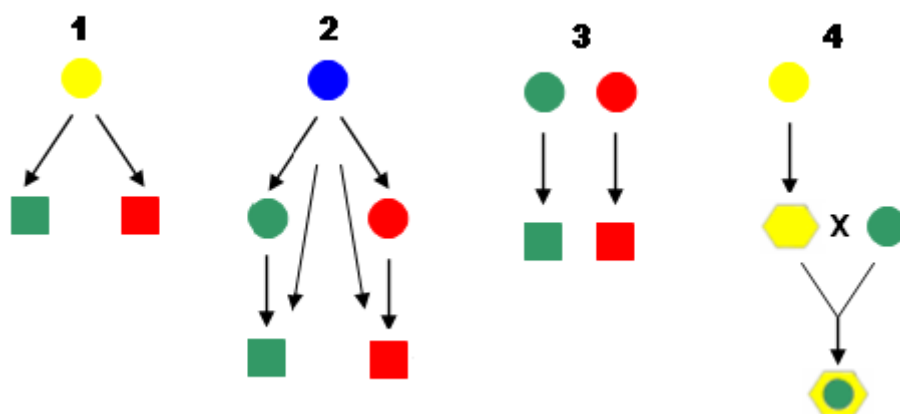
Zjawisko plastyczności komórek macierzystych polegające na tym, że komórka macierzysta jednej tkanki może różnicować się w dojrzałą komórkę innej tkanki, wyjaśniają cztery różne teorie. Zostały one przedstawione w postaci schematu na Rycinie 1.6.

Jedna z tych teorii zakłada istnienie procesu transdyferencjacji. W wyniku tego procesu ta sama komórka macierzysta szpiku stanowi źródło różnych linii komórkowych. Może się ona przekształcać nie tylko w komórki krwi, ale również w komórki innych, niehematopoetycznych tkanek, takich jak tkanka nerwowa, mięśniowa, łączna, nabłonkowa [59].

Kolejna teoria wiąże plastyczność komórek macierzystych z ich pluripotencją, w wyniku której ulegają one przekształceniu w różne typy tkanek. Przekształcenie pluripotentnej komórki szpiku może przebiegać z etapem pośrednim, podczas którego najpierw różnicuje się ona do komórek progenitorowych dających początek określonej, tkankowo-specyficznej linii komórkowej [160].

Inna z teorii zakłada, że szpik jest źródłem wielu różnych, tkankowo-specyficznych rodzajów komórek macierzystych i populacji komórek progenitorowych. Poszczególne typy komórek szpiku są zaprogramowane w różny sposób i mają odmienny od siebie potencjał rozwojowy, który wyznacza, w jaki typ tkanek będą się one różnicować [160].

Czwartym rozpatrywanym mechanizmem wyjaśniającym zjawisko plastyczności komórek macierzystych szpiku jest fuzja tych komórek z innymi komórkami, w wyniku czego następuje zmiana profilu ich ekspresji genowej i nabywają one cechy innych tkanek [143].



Rycina 1.6. Schemat przedstawiający hipotezy wyjaśniające zjawisko plastyczności dojrzałych komórek macierzystych szpiku.

- 1- teoria transdyferencji komórki macierzystej szpiku
- 2- teoria pluripotentnej komórki macierzystej szpiku
- 3- teoria tkankowo-specyficznej komórki macierzystej szpiku
- 4- teoria fuzji komórkowej

Właściwości samoodnawiania i wszechstronnej dyferencji komórek macierzystych wiążą się z ich zastosowaniem terapeutycznym i regeneracyjnym. Stanowią one nadzieję medycyny XXI wieku na uporanie się z wieloma nieuleczalnymi chorobami [30,108,113,150,159].



## 2. Cel pracy

Istnieją doniesienia mówiące o tym, że komórki macierzyste szpiku mają zdolność transformacji w inne komórki niż komórki krwiotwórcze oraz zdolność przemieszczania się w obrębie różnych tkanek i narządów. Efektem tego może być niejednorodny lub odmienny od biorcy materiał genetyczny izolowany z różnych tkanek biorcy, jak np. z krwi. Mimo to niektóre laboratoria genetyki sądowej wykorzystują krew jako jedyne źródło DNA do analiz pokrewieństwa, nie uwzględniając tego typu zagrożenia. Zdarza się również, że krew jest pobierana jako materiał porównawczy w badaniach identyfikacyjnych. Należy ona ponadto do najczęściej zabezpieczanych śladów biologicznych z miejsc przestępstw.

Łatwo dostępnym materiałem, który nie wymaga przechowywania w zamrożeniu, jest wymaz komórek nabłonka z jamy ustnej. Podobnie jest w przypadku innego często badanego materiału dowodowego, a czasami porównawczego – włosa. Przy analizie wymazu i włosa również nie uwzględnia się zagrożenia, jakie niesłoby przebycie allogenicznego przeszczepu komórek macierzystych hematopoezy przez osobę, od której materiały te pochodzą. Protokoły pobrania materiału porównawczego do badań kryminalistycznych nie zawierają oświadczenia dotyczącego ewentualnego przebycia alloprzeszczepu przez dawcę materiału. Nie jest przeprowadzany wywiad medyczny w tej kwestii nawet wtedy, gdy profil DNA osoby oskarżonej czy podejrzanej wprowadzany jest do krajowej bazy danych. W kontrolnych badaniach wykonywanych na wniosek matki dziecka, kwestionującej wynik wykluczający ojcostwo, nie weryfikuje się możliwości przebycia allo-HSCT przez pozwanego.

Dlatego celem niniejszej pracy stała się analiza polimorfizmu genetycznego we krwi, komórkach korzenia włosa i komórkach nabłonka z jamy ustnej – pochodzących od osoby po allo-HSCT – i ustalenie konsekwencji wynikających z wykorzystania tych materiałów do badań ojcostwa bądź badań identyfikacyjnych. Do realizacji tego celu wykorzystano metodę ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym i najbardziej przydatne we współczesnej genetyce sądowej systemy multipleksowe, zarówno w zakresie markerów autosomalnego DNA, jak i markerów chromosomu Y. Uzyskane wyniki mają dać odpowiedź na pytanie: Czy zatajenie faktu przebycia allotransplantacji komórek krwiotwórczych przez osobę oddającą materiał do badań niesie ze sobą zagrożenie skutkujące zafałszowaniem tożsamości tej osoby i co się z tym wiąże wydaniem błędnej ekspertyzy genetyczno-sądowej, a jeśli tak, to jaka jest skala tego zagrożenia w zależności od rodzaju wykorzystywanego do badań materiału – krwi, wymazu czy też włosa?

## **3. Materiał i metodyka badań**

### **3.1. Materiał**

Materiał badawczy został pobrany od 21 osób po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy, pacjentów Kliniki Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu Krwiotwórczego Akademii Medycznej w Poznaniu. Jako materiał referencyjny wykorzystano izolaty DNA z krwi obwodowej, pobranej od biorców przed przeszczepem oraz od ich dawców.

Przedmiotem badania były trzy różne materiały, pochodzące od każdego z biorców po alloprzeszczepie: 2 ml krwi obwodowej, wymaz komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej pobrany kolejno dwoma jałowymi wymazówkami oraz wyrwane włosy w ilości 3-16 sztuk. W tabeli 3.1. przedstawiono charakterystykę pacjentów po allo-HSCT, których materiały badano, oraz ich dawców.

Na pobranie wyżej wymienionych materiałów i przeprowadzenie opisanych badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi oraz zgodę Komisji Bioetyki przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu.

Tabela 3.1. Charakterystyka pacjentów po allo-HSCT, których materiały badano oraz ich dawców.

Pacjent	Wiek	Płeć	Dawca płęć- pokrewień- stwo	Rozpoznanie	Źródło komórek macierzystych	Typ kondycjo- nowania	GVHD ostra/prze- wlekła	Wznowa	Dni po przesz- czepie
1	22	M	K-S	ALL	PBSCT	MA	tak/tak	tak	508
2	34	M	M-B	HD	PBSCT	NMA	nie/nie	nie	574
3	25	K	M-B	ALL/AML	BMT	MA	nie/nie	nie	329
4	26	K	K-S	AML	PBSCT	MA	tak/nie	nie	679
5	29	K	K-S	AML	PBSCT/BMT	MA	nie/tak	nie	450
6	30	K	M-O	AML	PBSCT	MA/NMA	nie/nie	tak	218
7	54	K	K-S	AML	PBSCT	NMA	nie/tak	nie	345
8	34	M	M-B	HD	PBSCT	NMA	nie/nie	nie	104
9	37	M	M-NS	AML	PBSCT	MA	tak/nie	nie	126
10	31	M	K-NS	AML	PBSCT	MA	nie/tak	nie	209
11	26	K	M-B	CML	BMT	MA	nie/tak	nie	516
12	47	M	K-NS	AML	PBSCT	NMA	nie/nie	nie	1145
13	53	K	M-B	AML	PBSCT	NMA	nie/nie	nie	103
14	29	K	K-NS	AA	PBSCT	NMA	nie/nie	nie	809
15	24	K	K-S	AA	PBSCT	NMA	nie/nie	nie	816
16	35	M	K-S	AML	PBSCT/BMT	MA	nie/nie	nie	71
17	54	K	K-S	AML	PBSCT	NMA	nie/tak	nie	496
18	31	M	K-NS	CMML	PBSCT	MA	tak/tak	nie	82
19	41	M	M-NS	AML	PBSCT	MA	tak/tak	nie	32
20	50	K	M-B	AML	PBSCT	NMA	nie/tak	nie	607
21	50	K	M-B	ALL	BMT	MA	tak/tak	nie	603
22	49	K	M-B	CML	PBSCT	NMA	tak/nie	nie	246
23	53	K	M-B	AML	PBSCT	NMA	tak/tak	nie	781
24	58	K	M-B	NHL	PBSCT	NMA	tak/nie	nie	2381
25	26	K	M-B	AML	BMT	MA	tak/tak	tak	822
26	59	K	M-B	CML	PBSCT	NMA	tak/nie	tak	2009
27	59	K	M-B	AML	PBSCT	NMA	tak/tak	nie	2764
28	47	K	M-B	CML	PBSCT	NMA	nie/tak	tak	2233
29	28	K	M-B	Burkitt	PBSCT	MA	nie/nie	nie	2291
30	47	K	M-NS	CML	PBSCT	MA	tak/tak	nie	2421
31	35	K	M-B	CML	BMT	MA	nie/nie	nie	2738
32	55	K	K-S	CLL	PBSCT	NMA	tak/nie	nie	2726

M- mężczyzna, K- kobieta, NS- niespokrewniony, B- brat, S- siostra, O- ojciec, GVHD- choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi, PBSCT- przeszczep komórek macierzystych z krwi obwodowej, BMT- przeszczep szpiku kostnego, MA- przygotowanie mieloablacyjne, NMA- przygotowanie niemieloablacyjne, AML- ostra białaczka szpikowa, ALL- ostra białaczka limfoblastyczna, ALL/AML- ostra białaczka bifenotypowa, CML- przewlekła białaczka szpikowa, CMML- przewlekła białaczka mielomonocytoza, HD- choroba Hodgkina, AA- niedokrwistość aplastyczna.

## 3.2. Metodyka badań

### 3.2.1. Ocena mikroskopowa włosów biorców allo-HSCT

Przed przystąpieniem do izolacji DNA poddano analizie mikroskopowej preparaty, które wykonano z włosów biorców allo-HSCT. W tym celu włosy pochodzące od badanych biorców opłukiwano w roztworze soli fizjologicznej. Opłukane włosy wyjmowano, a następnie po jednym z włosów od każdego z biorców umieszczano na szkiełku podstawowym. Pozostałe włosy poddawano izolacji DNA. Płyn z opłukiwania włosów odwirowywano z prędkością 6000 obrotów na minutę w przeciągu 5 minut. Po odciągnięciu górnej części płynu z pozostałego osadu wykonywano rozmaz na szkiełku podstawowym. Preparaty wykonane z pojedynczych włosów, jak również z rozmazów z osadów odwirowanych po płukaniu włosów utrwalano w 96% etanolu, barwiono metodą przeglądową hematoksyliną i eozyną, a następnie zamykano pod szkiełkiem nakrywkowym. Oceniano je w telemikroskopie Jenamed przy użyciu oprogramowania do cyfrowej analizy obrazu MultiScan.

### 3.2.2. Izolacja genomowego DNA

Izolację genomowego DNA z materiałów pobranych od osób po alloprzeszczepie wykonywano w oparciu o metodę kolumnkową, z wykorzystaniem membran jonowymiennych z zestawu Sherlock AX (A&A Biotechnology). W zależności od rodzaju materiału wykorzystano w jego izolacji odpowiednio: krew – 50 µl, wymaz – 1 sztukę, wyrwane włosy w ilości 2-15 sztuk. W przypadku włosów długich izolację DNA przeprowadzano z około 2 cm fragmentu włosa zawierającego korzeń włosa i część łodygi. Pozostałą część łodygi włosa odcinano i usuwano. Wyizolowany materiał zawieszano następnie w jałowej wodzie o objętości odpowiednio: krew – 30 µl, wymaz – 30 µl, włosy – 10-20 µl.

### 3.2.3. Pomiar stężenia metodą fluorymetryczną

Stężenie DNA oznaczono z użyciem fluorymetru Qubit® i zestawu Quant-iT™ dsDNA HS kit (Invitrogen) w oparciu o metodę fluorymetryczną. Do pomiaru wykorzystano po jednym mikrolitrze badanych prób DNA, które mieszano z roztworem buforowym zawierającym fluoroforowy reagent, ściśle według instrukcji producenta [68]. Pomiary stężenia DNA przeprowadzano w temperaturze pokojowej, dwukrotnie dla każdej próby w odniesieniu do dwóch wzorców wchodzących w skład zestawu. Obliczenia stężenia badanego DNA wykonywano według wzoru:

$$\text{Stężenie DNA [ng/}\mu\text{l]} = \text{odczyt pomiaru [ng/}\mu\text{l]} \times \frac{200 [\mu\text{l}]}{\text{objętość badanej próby [\mu\text{l}]}}$$

### 3.2.4. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym (QR-PCR) przeprowadzono przy użyciu termocyklera 7900HT Real-Time PCR Fast firmy Applied Biosystems wyposażonego w argonowy laser do wzbudzenia fluorescencji, kamerę CCD do równoczesnej detekcji różnych długości emitowanych fal w przedziale 500-660 nanometrów oraz oprogramowanie SDS do analizy uzyskanych wyników. W reakcji QR-PCR wykorzystano dwa niezależne zestawy do amplifikacji firmy Applied Biosystems – Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit oraz Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit. Specyfikację badanych zestawów zawarto w tabeli 1.1. W skład wyżej wymienionych zestawów wchodziły po 2 startery służące do amplifikacji badanych sekwencji DNA – genu odwrotnej transkryptazy ludzkiej telomerazy (hTERT) oraz genu determinującego płęć męską (SRY) – sprzężone z sondą TaqMan znakowaną barwnikiem fluorescencyjnym FAM™.

Ocenę całkowitego stężenia DNA w badanych materiałach pochodzących od biorców po alloprzeszczepie – w próbach krwi, w wymazach komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej oraz w komórkach włosa przeprowadzono z zastosowaniem zestawu Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit zgodnie z zaleceniami producenta [8]. Ocenę stężenia męskiego DNA poprzez ilościową analizę sekwencji SRY chromosomu Y w badanych materiałach, pochodzących od niezgodnych pod względem płci z dawcą biorców allo-HSCT, przeprowadzono z zastosowaniem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit zgodnie z zaleceniami producenta [8]. Automatyczny odczyt granicznej wartości cyklu amplifikacji –  $C_T$ , przy którym ilość produktu amplifikacji generowała sygnał fluorescencji przekraczający wartość progową (*threshold*) – wynoszącą 0,2 – stanowił podstawę do obliczenia stężenia badanego DNA. Uzyskana wartość  $C_T$  była odnoszona do krzywej standardowej, generowanej w oparciu o próby DNA o wzorcowym stężeniu, kolejno: 0,023 ng/ $\mu$ l, 0,068 ng/ $\mu$ l, 0,21 ng/ $\mu$ l, 0,62 ng/ $\mu$ l, 1,85 ng/ $\mu$ l, 5,56 ng/ $\mu$ l, 16,17 ng/ $\mu$ l, 50,0 ng/ $\mu$ l – analogicznie dla obu zestawów do reakcji QR-PCR.

Eksperymentalne sprawdzenie zakresu czułości oraz selektywnej amplifikacji systemu Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit wykonano z wykorzystaniem rozcieńczeń kontrolnego genomowego DNA, wchodzącego w skład systemu AmpF $\lambda$ STR® Yfiler™ PCR Amplification Kit – kontroli DNA 007 zawierającej męskie DNA o stężeniu wyjściowym 0,10 ng/ $\mu$ l oraz kontroli DNA 9947A zawierającej żeńskie DNA o stężeniu wyjściowym 10 ng/ $\mu$ l.

### 3.2.5. Analiza multipleks STR-PCR

Amplifikację DNA przeprowadzano w systemie multipleksowym z wykorzystaniem starterów specyficznych dla określonego *locus*, znakowanych jednym z czterech fluorescencyjnych barwników. Niezależne amplifikacje wykonano z zastosowaniem dwóch zestawów multipleksowych firmy Applied Biosystems – systemu AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Identifiler $^{\text{TM}}$  PCR Amplification Kit, zawierającego 15 *loci* autosomalnego DNA i *locus* płci (amelogeninę) oraz systemu AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Yfiler $^{\text{TM}}$  PCR Amplification Kit, zawierającego 17 *loci* chromosomu Y specyficznych dla płci męskiej. Zakresy alleli i rodzaj znakowania fluorescencyjnego amplifikowanych *loci*, wchodzących w skład obu zestawów, przedstawiono odpowiednio w tabelach 3.2 i 3.3. Zawarte w nich przedziały nie odzwierciedlają pełnej puli populacyjnej alleli, a jedynie zakres alleli w obrębie zastosowanego wzorca.

Tabela 3.2. Charakterystyka systemu AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Identifiler $^{\text{TM}}$  PCR Kit.

<i>Locus</i>	Zakres alleli	Zakres wielkości	Fluorochrom
D8S1179	8-19	123-170 pz	6-FAM
D21S11	24-38	185-239 pz	6-FAM
D7S820	6-15	255-291 pz	6-FAM
CSF1PO	6-15	305-342 pz	6-FAM
D3S1358	12-19	112-140 pz	VIC
TH01	4-13.3	163-202 pz	VIC
D13S317	8-15	217-245 pz	VIC
D16S539	5-15	252-292 pz	VIC
D2S1338	15-28	307-359 pz	VIC
D19S433	9-17.2	102-135 pz	NED
VWA	11-24	155-207 pz	NED
TPOX	6-13	222-250 pz	NED
D18S51	7-27	262-345 pz	NED
D5S818	7-16	134-172 pz	PET
FGA	17-51.2	215-355 pz	PET
AMG	X, Y	X = 107 pz, Y = 113 pz	PET

Tabela 3.3. Charakterystyka systemu AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Yfiler $^{\text{TM}}$  PCR Kit.

<i>Locus Y</i>	Zakres alleli	Zakres wielkości	Fluorochrom
DYS456	13-18	104-123 pz	6-FAM
DYS389I	10-15	145-166 pz	6-FAM
DYS390	18-27	193-229 pz	6-FAM
DYS389II	24-34	254-294 pz	6-FAM
DYS458	14-20	133-158 pz	VIC
DYS19	10-19	177-212 pz	VIC
DYS385a/b	7-25	244-317 pz	VIC
DYS393	8-16	102-134 pz	NED
DYS391	7-13	153-177 pz	NED
DYS439	8-15	199-227 pz	NED
DYS635	20-26	248-272 pz	NED
DYS392	7-18	293-326 pz	NED
GATA H4*	8-13*	122-143 pz	PET
DYS437	13-17	183-199 pz	PET
DYS438	8-13	222-248 pz	PET
DYS448	17-24	281-323 pz	PET

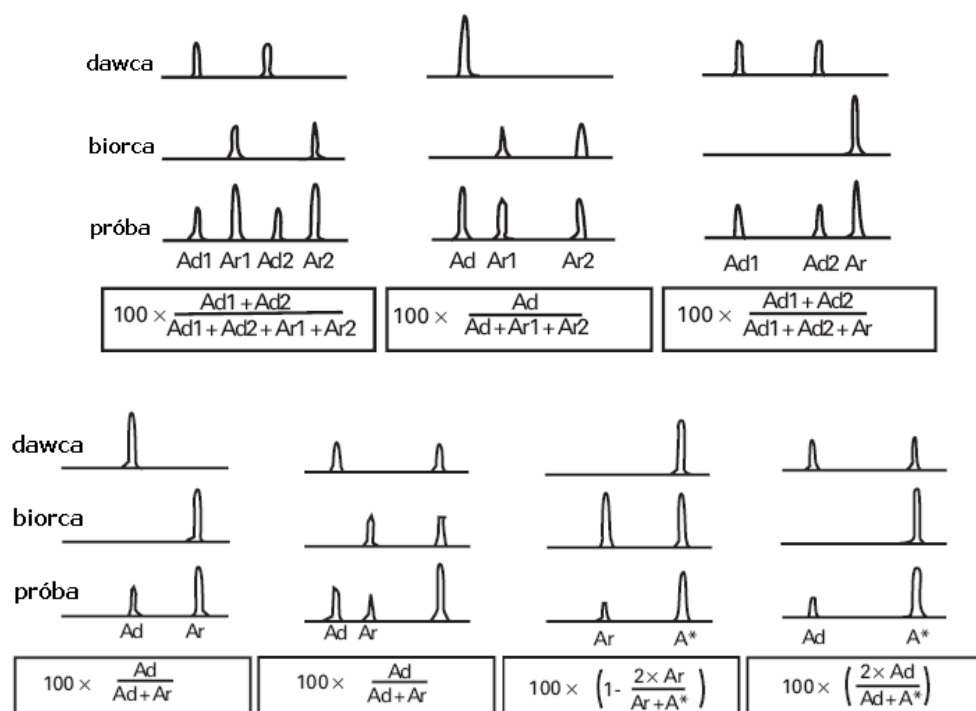
\*zakres alleli przedstawiony na wykresach odpowiada nomenklaturze przed aktualizacją [97].

Po pomiarze ilościowym badanych prób, dla reakcji STR-PCR rozcieńczano je w jałowej wodzie do stężenia 0,5 ng/ $\mu$ l (system AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Yfiler $^{\text{TM}}$ ) i 1 ng/ $\mu$ l (system AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Identifiler $^{\text{TM}}$ ). Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta [6,7]. Jediną modyfikacją było proporcjonalne zmniejszenie poszczególnych składowych mieszaniny reakcyjnej tak, że końcowa jej objętość była dwukrotnie mniejsza od podanej w przepisie. Kontrolne DNA 007 dodawano do reakcji PCR (system AmpF $\ell$ STR $^{\circledR}$  Yfiler $^{\text{TM}}$ ) w ilości odpowiednio: 300, 100, 10, 5 pg.

Produkty PCR poddano rozdzielaniu na 5% żelu poliakrylamidowym w automatycznym sekwenatorze płytowym ABI PISM 377 w odniesieniu do standardu wielkości LIZ 500, znakowanego pomarańczowym fluorochromem. Do oceny wielkości produktów amplifikacji wykorzystano oprogramowanie komputerowe GeneScan v3.7. Ilość tandemowych powtórzeń w badanych *loci* oceniano w odniesieniu do wzorca producenta (*Allelic ladder*) z zastosowaniem oprogramowania Genotyper v3.7NT (Applied Biosystems). Dla przejrzystości obrazu znacznik żółty na wykresach został zastąpiony kolorem czarnym.

### 3.2.6. Ocena chimeryzmu donorowego

W badanym materiale pochodzącym z komórek krwi, wymazu z jamy ustnej i włosów biorców po allo-HSCT oceniano stopień chimeryzmu donorowego, tj. odsetek komórek dawcy. Do tego celu wykorzystano pole powierzchni zaobserwowanego sygnału – pikę, uzyskanego dla poszczególnych alleli, odzwierciedlające ilość produktu PCR. Procentowy udział DNA dawcy w ujawnionym profilu obliczano z wykorzystaniem wzorów opracowanych przez Nollet i wsp. [105]. Wzory te, odpowiadające poszczególnym układom cech w mieszaninie, przedstawiono na rycinie 3.1. Do oszacowania stopnia chimeryzmu donorowego w obrębie całego zestawu multipleksowego wyliczano medianę wartości uzyskiwanych w obrębie poszczególnych układów, wchodzących w skład systemu. Wyłączny profil biorcy i wyłączny profil dawcy w badanym materiale odpowiadał wartości chimeryzmu donorowego, wynoszącego odpowiednio 0% i 100%.



Rycina 3.1. Wzory zastosowane do oceny chimeryzmu donorowego [105].

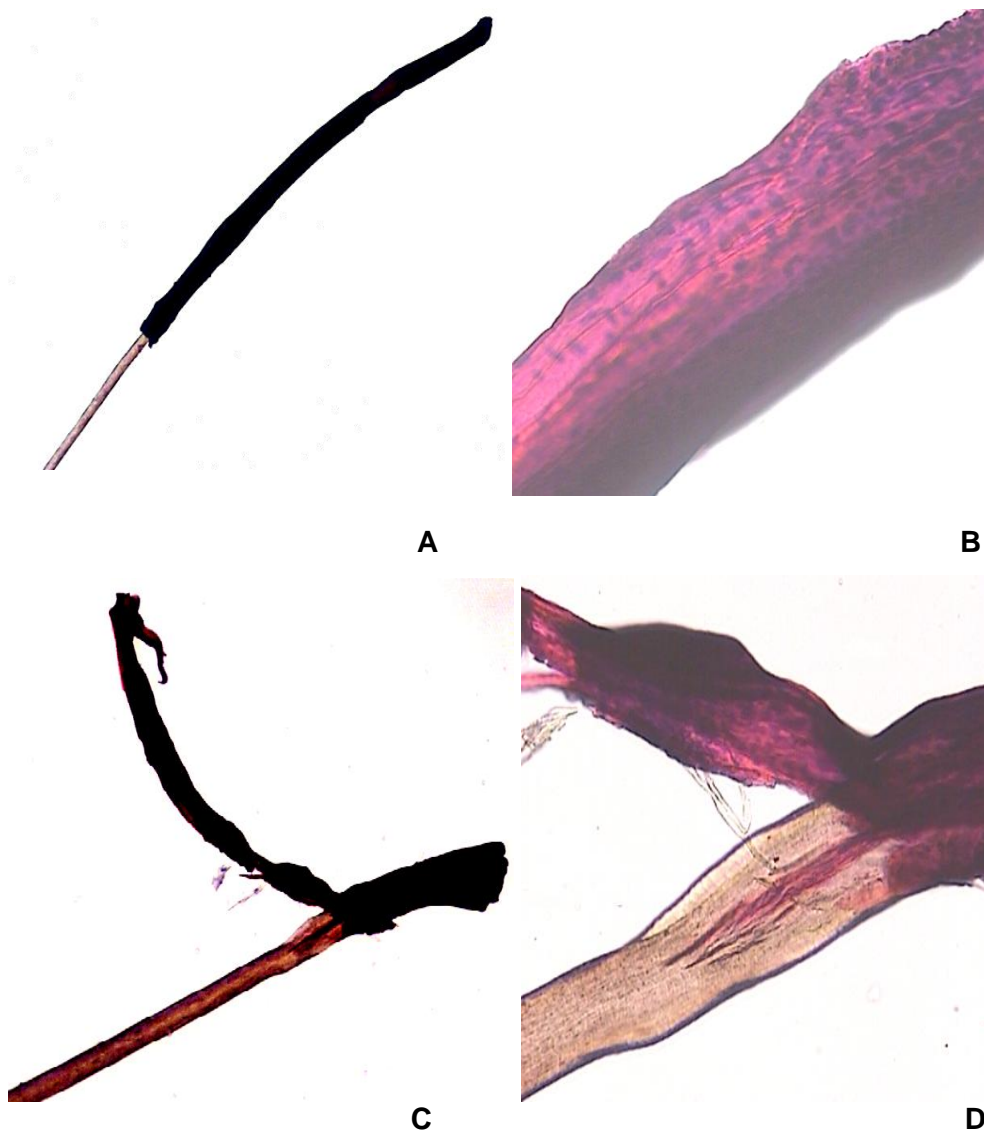


## 4. Wyniki

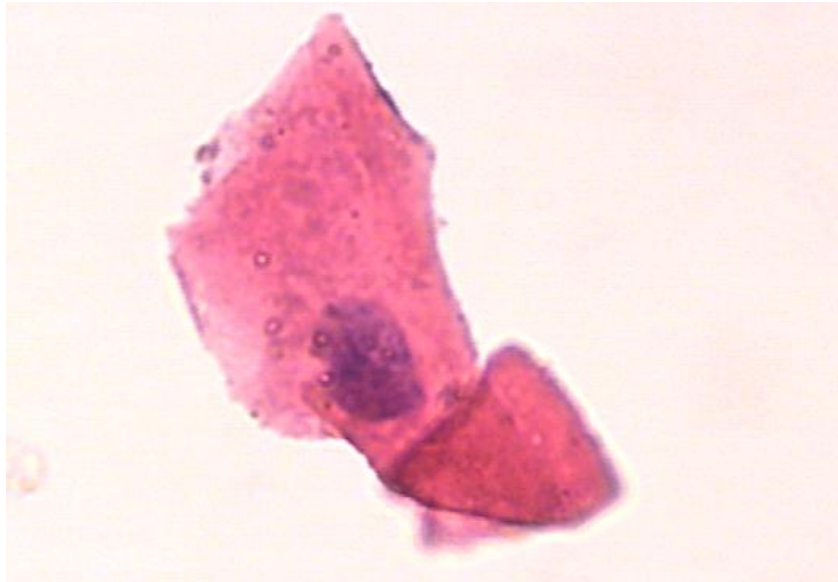
### 4.1. Ocena mikroskopowa włosów biorców allo-HSCT

Analiza mikroskopowa preparatów wykonanych z pojedynczych włosów biorców allo-HSCT, po barwieniu przeglądowym hematoksyliną i eozyną, uwidoczniała strukturę cebulki włosa w ośmiu włosach na 21 badanych. We włosach pozostałych biorców nie obserwowano cebulki włosa, lecz skupisko nabłonkowych komórek tworzących pochwę włosa. W żadnym z badanych preparatów nie uwidoczniło się komórek krwi. Na rycinie 4.1 przedstawiono zdjęcie mikroskopowe korzenia włosa pacjentki numer 3 i 11 z widoczną nabłonkową pochwą zewnętrzną włosa, zawierającą komórki z zachowanymi jądrami.

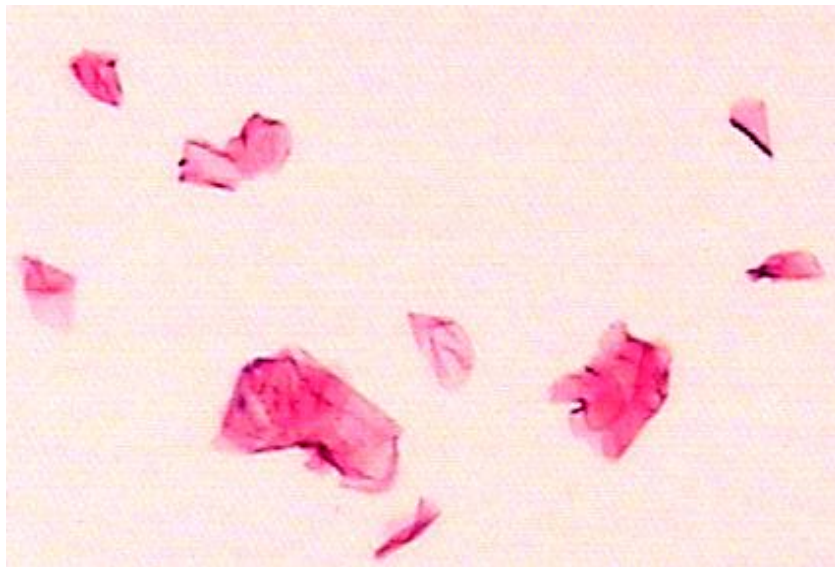
Analiza mikroskopowa rozmazów pochodzących z osadów, uzyskanych po płukaniu badanych włosów w roztworze soli fizjologicznej, w barwieniu hematoksyliną i eozyną, nie ujawniła komórek krwi. Ujawniła natomiast pojedyncze komórki nabłonkowe włosa z widocznym jądrem komórkowym oraz skupiska rozfragmentowanych płytek rogowych pozbawionych jądra komórkowego, powstałych ze zdegradowanych komórek nabłonka pochewek włosa. Na rycinie 4.2 przedstawiono zdjęcie mikroskopowe rozmazu wykonanego z osadu, który uzyskano po płukaniu włosa biorcy numer 6 w roztworze soli fizjologicznej.



Rycina 4.1. Pojedyncze włosy biorców allo-HSCT barwione hematoksyliną i eozyną. A. Korzeń włosa otoczony pochwą zewnętrzną, obiektyw 2,5x; B. Pochwa zewnętrzna włosa z widocznymi fioletowo wybarwionymi jądrami komórek nabłonka, obiektyw 40x. C,D. Roztarty włos w obrębie korzenia z odwarstwioną od rdzenia włosa pochwą zewnętrzną, obiektyw 10x i 20x.



A



B

Rycina 4.2. Rozmaz wykonany z osadu uzyskanego po płukaniu włosa biorcy allo-HSCT w roztworze soli fizjologicznej barwiony hematoksyliną i eozyną. A. Komórka nabłonkowa pochewki włosa z widocznym jądrem komórkowym, obiektyw 100x, immersja; B. Częściowo rozfragmentowane płytki rogowe pozbawione jądra komórkowego, powstałe ze zdegradowanych komórek nabłonka pochewek włosa, obiektyw 40x.

## 4.2. Pomiar stężenia DNA metodą fluorymetryczną

W wyniku przeprowadzonych pomiarów z wykorzystaniem zestawu Quant-iT™ dsDNA HS kit i fluorymetru Qubit® (Invitrogen) oznaczono następujące zakresy wyjściowego stężenia dwuniciowego DNA:

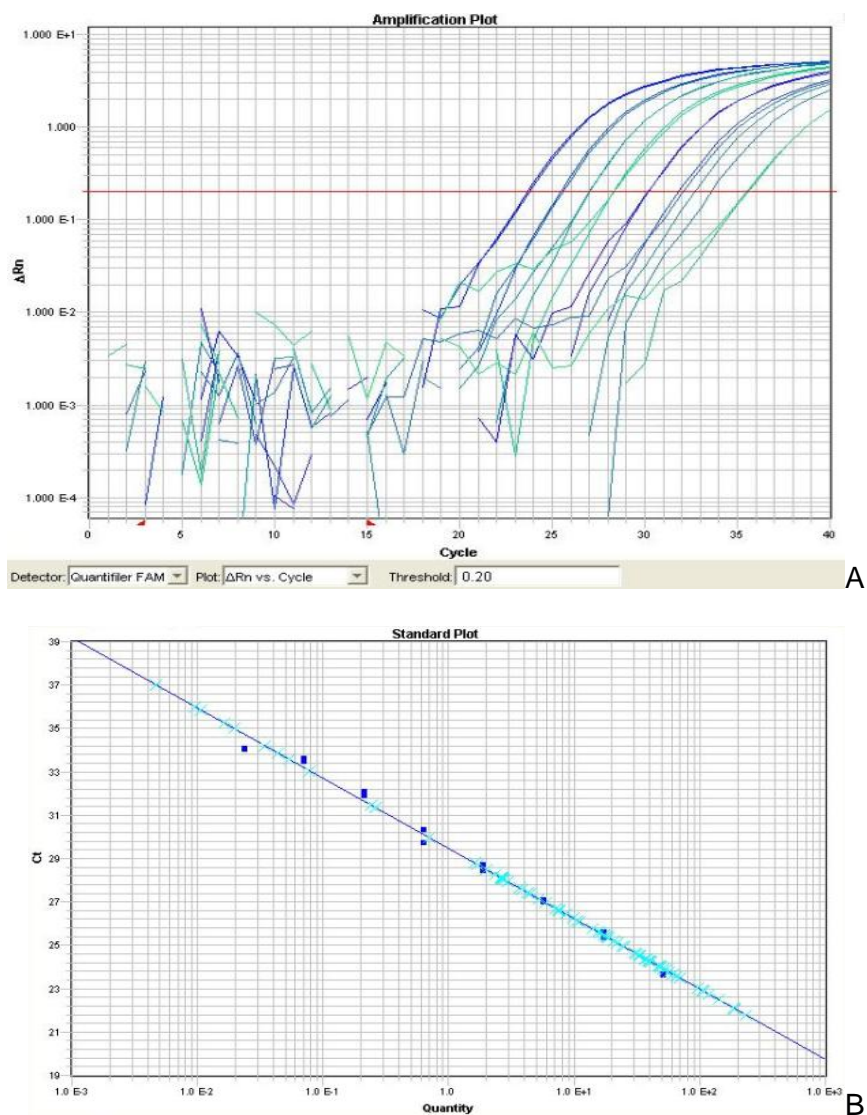
- potransplantacyjne DNA wyizolowane z 50 ml krwi biorców po allo-HSCT: 180 pg/μl - >120 ng/μl,
- potransplantacyjne DNA wyizolowane z wymazów komórek nabłonka i śliny, pobranych z jamy ustnej biorców po allo-HSCT: 8 ng/μl - >120 ng/μl,
- potransplantacyjne DNA biorców po allo-HSCT wyizolowane z fragmentów ich włosów o długości około 2 cm, zawierających korzeń włosa i część łodygi włosa: 812 pg/μl - 50 ng/μl,
- pretransplantacyjne, referencyjne DNA wyizolowane z krwi biorców przed allo-HSCT: <100 pg/μl - >120 ng/μl,
- pretransplantacyjne, referencyjne DNA wyizolowane z krwi dawców: 500 pg/μl - 104 ng/μl.

## 4.3. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Podstawę do obliczenia stężenia DNA w badanych materiałach pochodzących od osób po allo-HSCT: krwi, wymazie z jamy ustnej, komórkach włosów, stanowił odczyt granicznej wartości cyklu amplifikacji –  $C_T$ , przy którym ilość produktu amplifikacji generowała sygnał fluorescencji przekraczający wartość progową (0,2). Uzyskaną wartość  $C_T$  odnoszono do krzywej standardowej generowanej w oparciu o uśrednione pomiary 8 wzorcowych stężeń DNA w przedziale 0,023-50,0 ng/μl, analogicznie dla obu zastosowanych zestawów do ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Wykres reakcji QR-PCR oraz krzywą standardową uzyskane w oparciu o amplifikację prób z wzorcowym DNA, przy użyciu zestawu Quantifiler™ Human, przedstawiono na rycinie 4.3.

Przed przystąpieniem do analizy właściwych prób przeprowadzono eksperymentalne sprawdzenie zakresu czułości obu systemów do ilościowej reakcji QR-PCR. Ocenie poddano kontrolne DNA 007, zawierające męskie genomowe DNA o stężeniu wyjściowym 0,10 ng/μl, które dodawano do reakcji amplifikacji w stężeniu odpowiednio: 100, 50, 10, 5 pg/μl, z zastosowaniem zarówno zestawu Quantifiler™ Human oraz Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit. Odczyt wartości  $C_T$  wraz z odpowiadającymi im wartościami stężenia w kontrolnych próbach przedstawiono w tabeli 4.1.

W następnym etapie badań wykonano eksperymentalne sprawdzenie selektywnej amplifikacji męskiego DNA w oparciu o zestaw Quantifiler™ Y Human Male DNA. Do tego celu wykorzystano kontrolne DNA o stężeniu 10 ng/μl pochodzące z żeńskiej linii komórkowej 9947A. Wykres reakcji QR-PCR przedstawiono na rycinie 4.4.

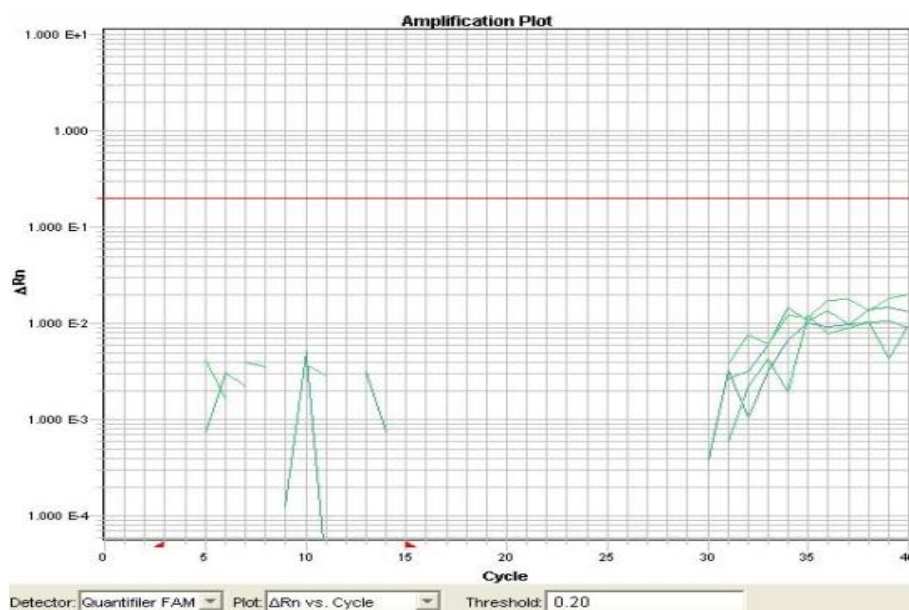


Rycina 4.3. Wykres reakcji QR-PCR (A) i krzywa standardowa zależności stężenia DNA od wartości  $C_T$  (B), generowane w oparciu o amplifikację prób DNA o wzorcowym stężeniu w przedziale 0,023-50,0 ng/μl (Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit, 7900HT SDS).

Tabela 4.1. Wyniki badań męskiego kontrolnego DNA 007 zawierające uzyskane wartości  $C_T$  wraz z odpowiadającymi im wartościami stężenia. Kolorem żółtym oznaczono wartości uzyskane z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA, a kolorem niebieskim wartości uzyskane z użyciem systemu Quantifiler™ Y Human Male DNA.

próby kontrolne	stężenie kontrolnego DNA 007	średnia wartość $C_T$ *	średnia wartość stężenia pg/ $\mu$ l*
1	100 pg/ $\mu$ l	33,12/32,68 (32,90)	89/119 (104)
1	100 pg/ $\mu$ l	35,50/35,28/34,58 (35,12)	88/100/151(113)
2	50 pg/ $\mu$ l	34,41/33,73 (34,07)	37/59 (48)
2	50 pg/ $\mu$ l	37,97/36,75 (37,36)	22/43 (32)
3	10 pg/ $\mu$ l	34,34/33,98 (34,16)	39/50 (45)
3	10 pg/ $\mu$ l	38,42/NW/NW	16/0/0
4	5 pg/ $\mu$ l	34,89/NW	27/0
4	5 pg/ $\mu$ l	37,10/NW/NW	14/0/0

\*podano wyniki dwóch bądź trzech oznaczeń tej samej próby, w nawiasach średnią wartość pomiaru. W przypadku znacznych różnic w pomiarach tej samej próby nie uśredniano wartości pomiaru.



Rycina 4.4. Wykres reakcji QR-PCR żeńskiej kontroli DNA 9947A amplifikowanej z użyciem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA.

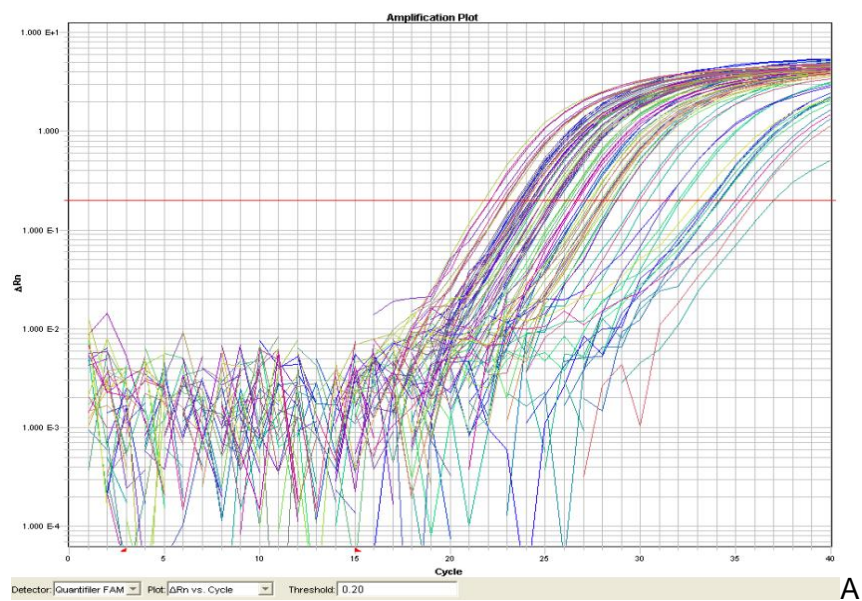
Z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™Y Human Male DNA przeprowadzono również szereg reakcji amplifikacji w odniesieniu do referencyjnego DNA pochodzącego zarówno od dawców, jak i od biorców przed przeszczepem. Wykres reakcji QR-PCR dla przykładowej pary, gdzie mężczyzna był dawcą, a kobieta biorcą, przedstawiono na Rycinie 4.5.



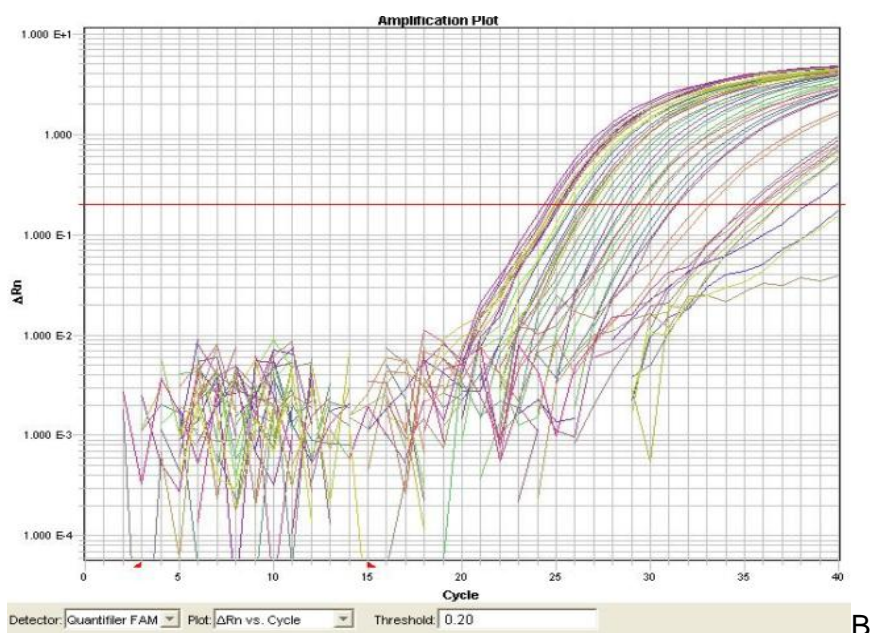
Rycina 4.5. Wykres reakcji QR-PCR z wykorzystaniem żeńskiego DNA pochodzącego od biorcy przed przeszczepem (20R) oraz męskiego DNA pochodzącego od dawcy (20D) – system Quantifiler™ Y Human Male DNA.

Na poniższych rycinach 4.6-4.17 zestawiono wykresy ilościowej reakcji PCR z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA oraz zestawu Quantifiler™Y Human Male DNA, uzyskane dla wszystkich analizowanych prób DNA, jak również dla prób DNA z poszczególnych materiałów pochodzących od wybranych biorców allo-HSCT.

W tabeli 4.2. pod wykresami reakcji QR-PCR zestawiono wartości  $C_T$  wraz z odpowiadającymi im wartościami stężenia, uzyskane dla poszczególnych materiałów, pobranych od biorców po przebytych allo-HSCT.



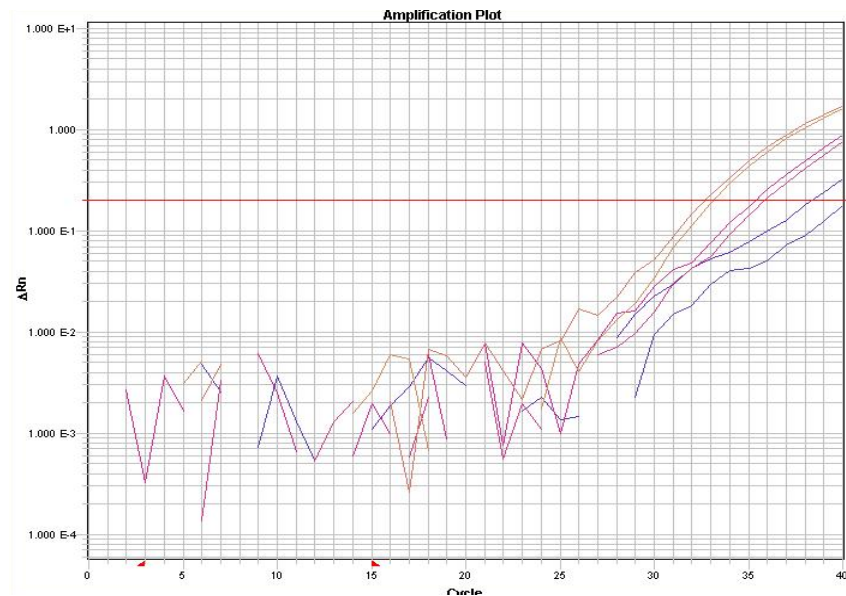
A



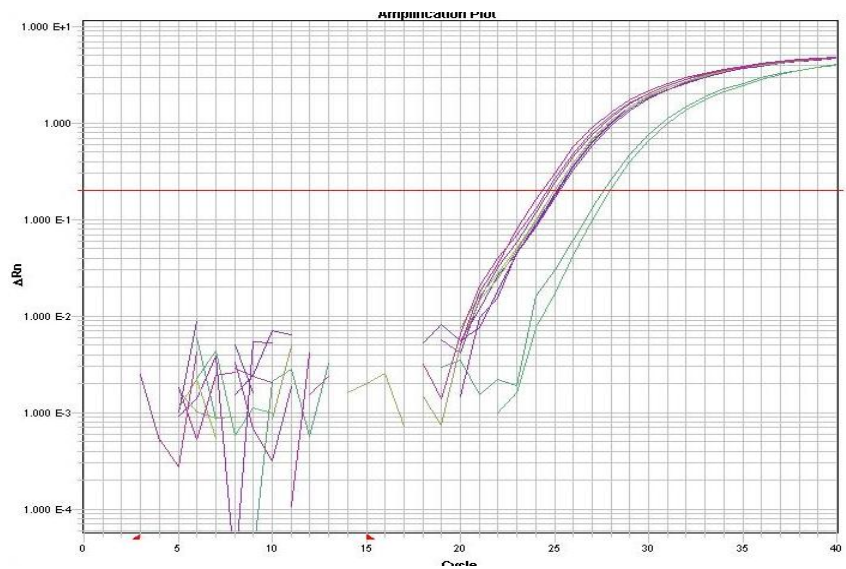
B

Rycina 4.6. Wykresy zbiorcze reakcji QR-PCR uzyskane dla wszystkich analizowanych prób DNA, amplifikowanych z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).

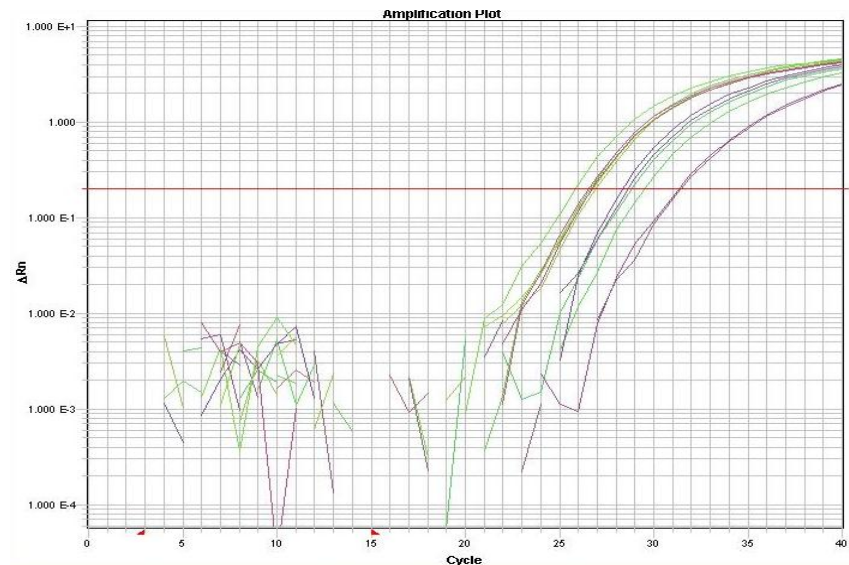




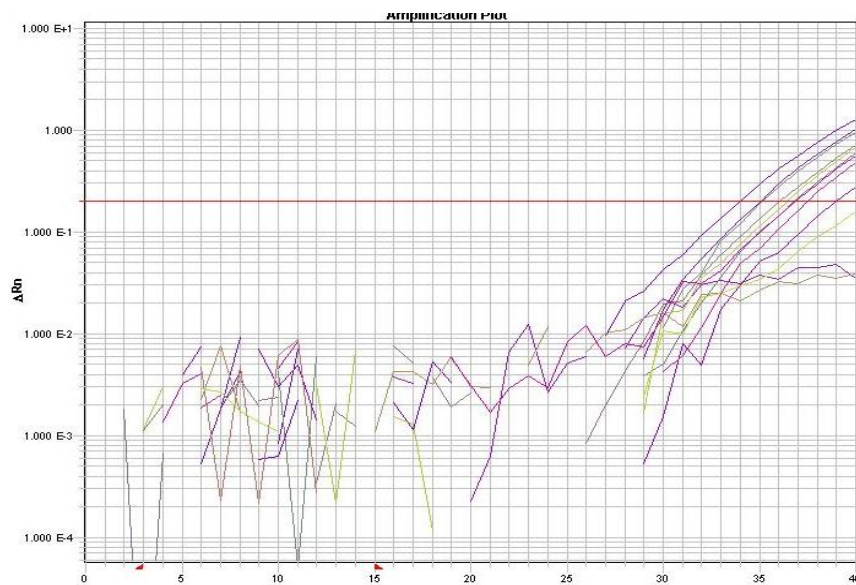
Rycina 4.7. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi pobranej po allo-HSCT od biorców oznaczonych nr 1, 10, 16, z użyciem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA.



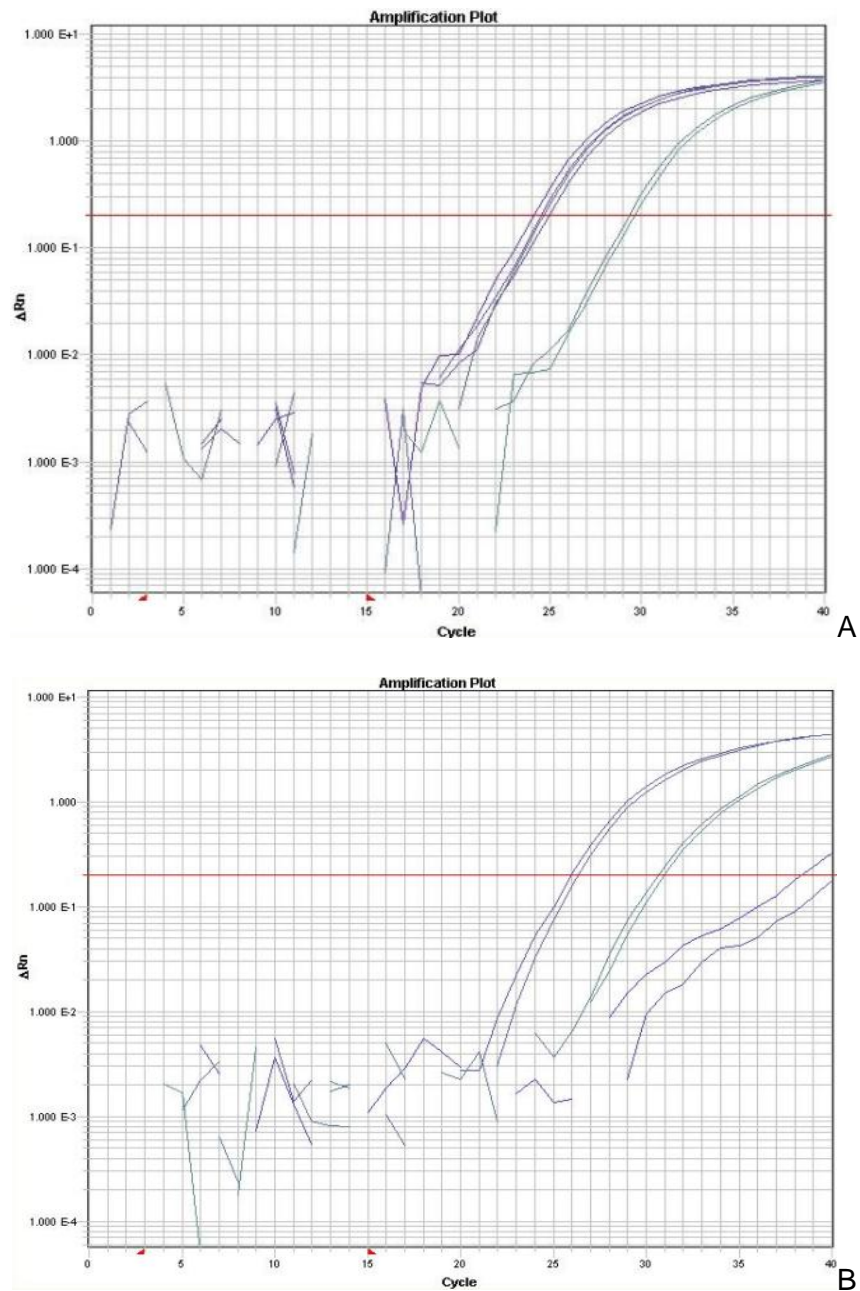
Rycina 4.8. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi pobranej po allo-HSCT od biorców oznaczonych nr 3,6,11,13,20,21, z użyciem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA.



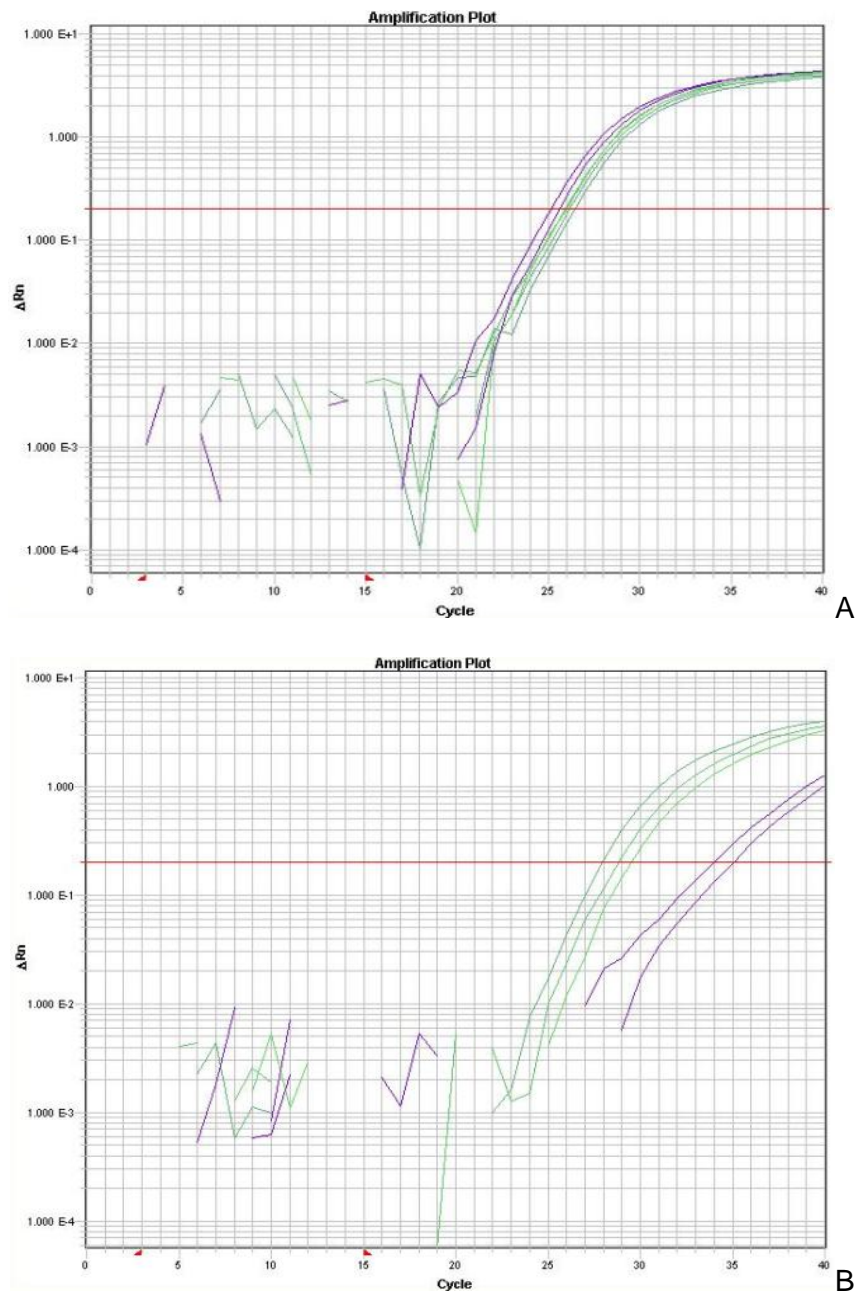
Rycina 4.9. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z wymazu pobranego po allo-HSCT od biorców oznaczonych nr 3,6,11,13,20,21, z użyciem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA.



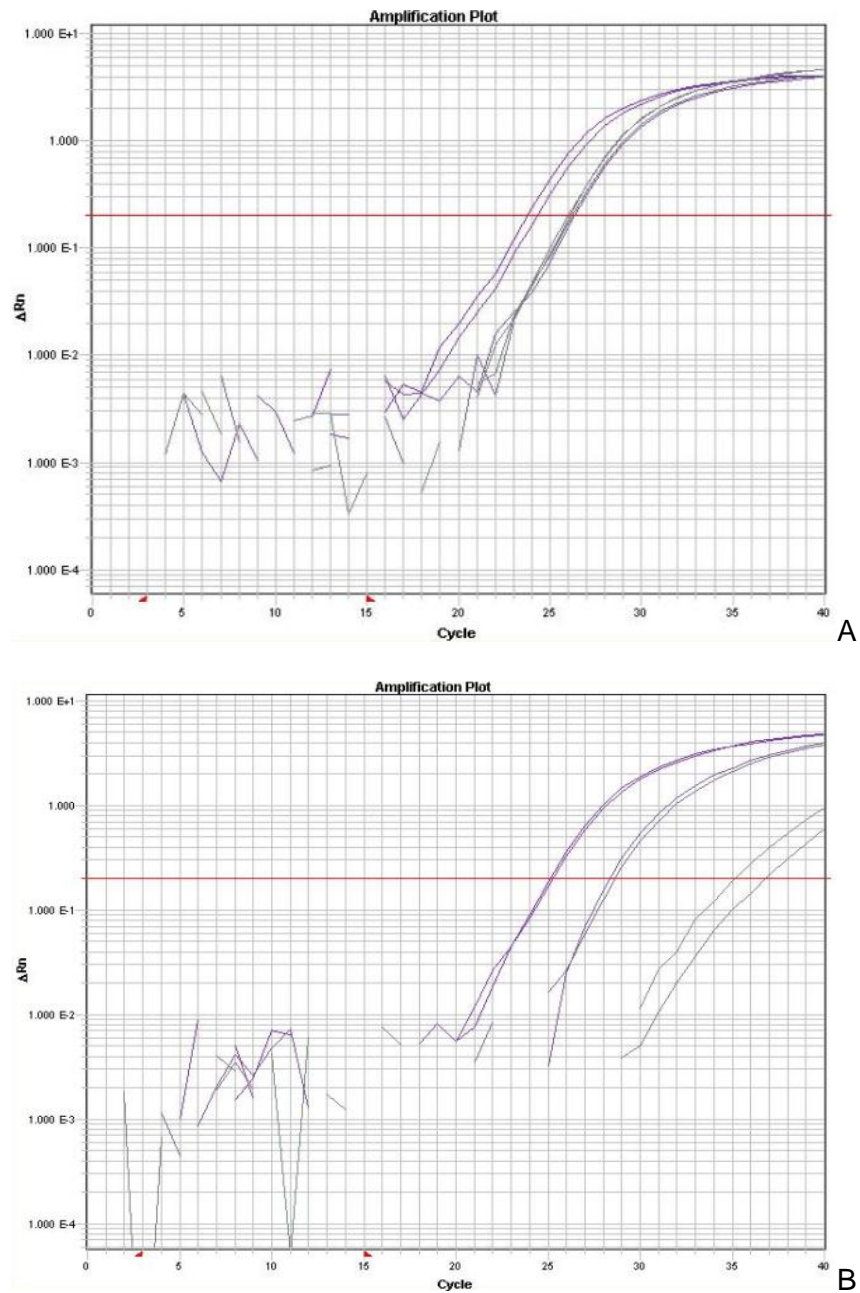
Rycina 4.10. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z włosa pobranego po allo-HSCT od biorców oznaczonych nr 3,6,11,13,20,21, z użyciem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA.



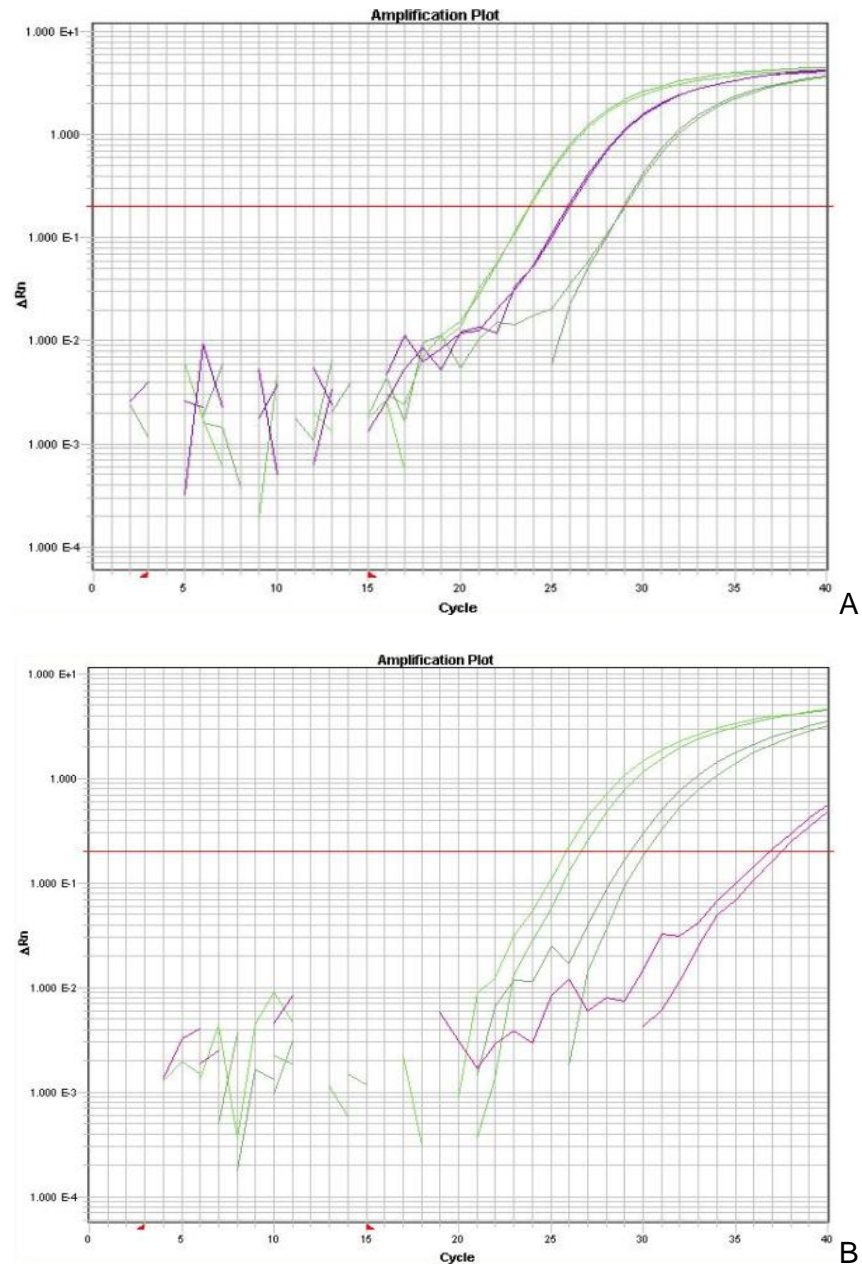
Rycina 4.11. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z wymazu, włosów i krwi, pobranych po allo-HSCT od biorcy oznaczonego nr 1, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).



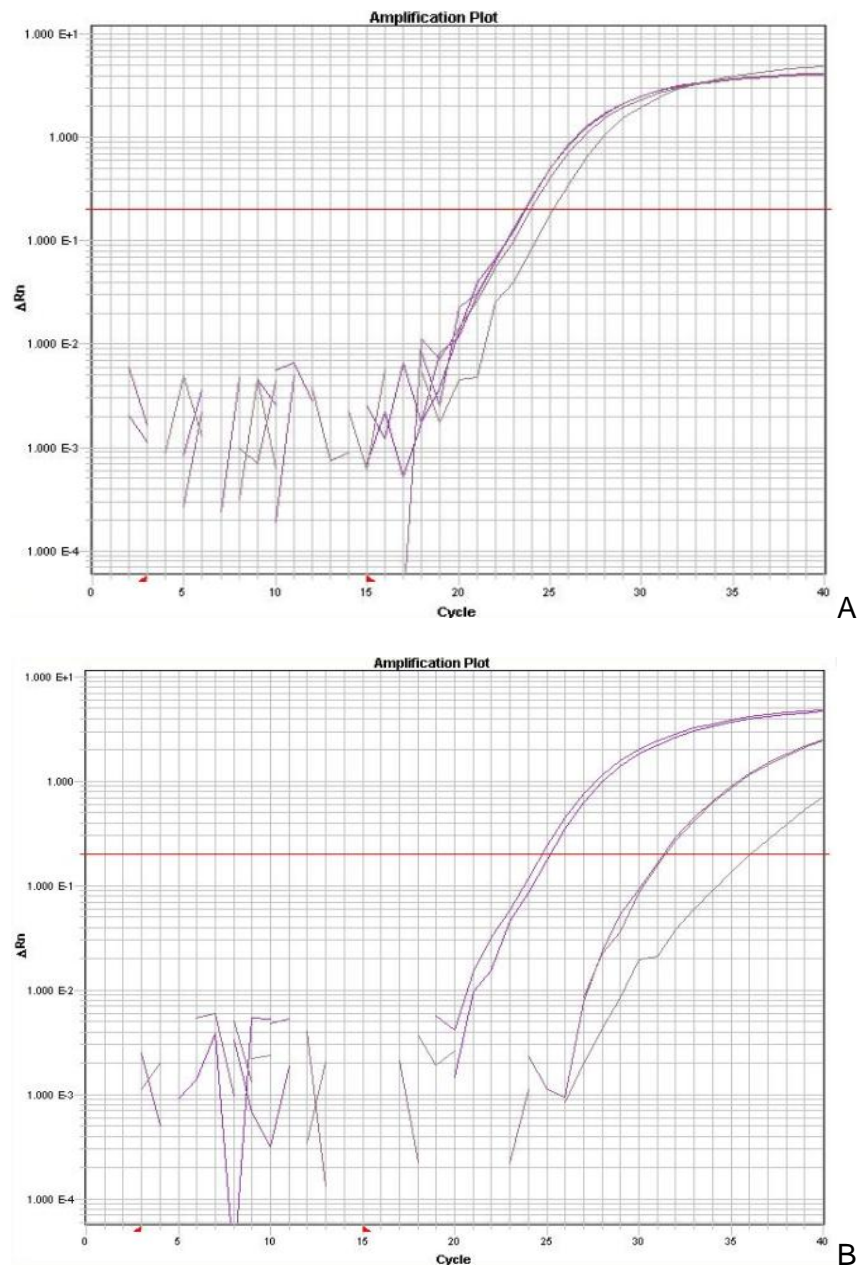
Rycina 4.12. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi, wymazu i włosów, pobranych po allo-HSCT od biorcy oznaczonego nr 3, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).



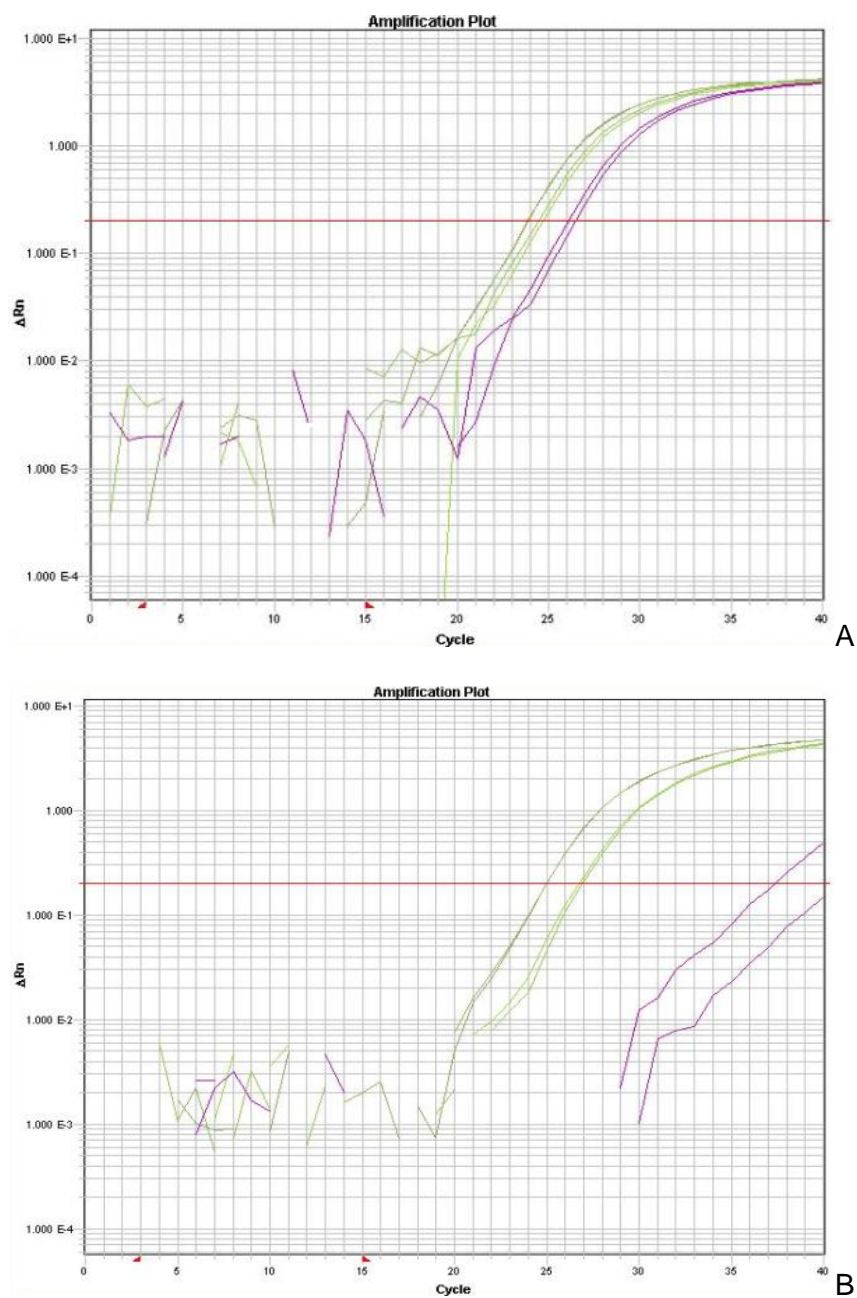
Rycina 4.13. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi, wymazu i włosów, pobranych po allo-HSCT od biorcy oznaczonego nr 6, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).



Rycina 4.14. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi, wymazu i włosów, pobranych po allo-HSCT od biorcy oznaczonego nr 11, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).

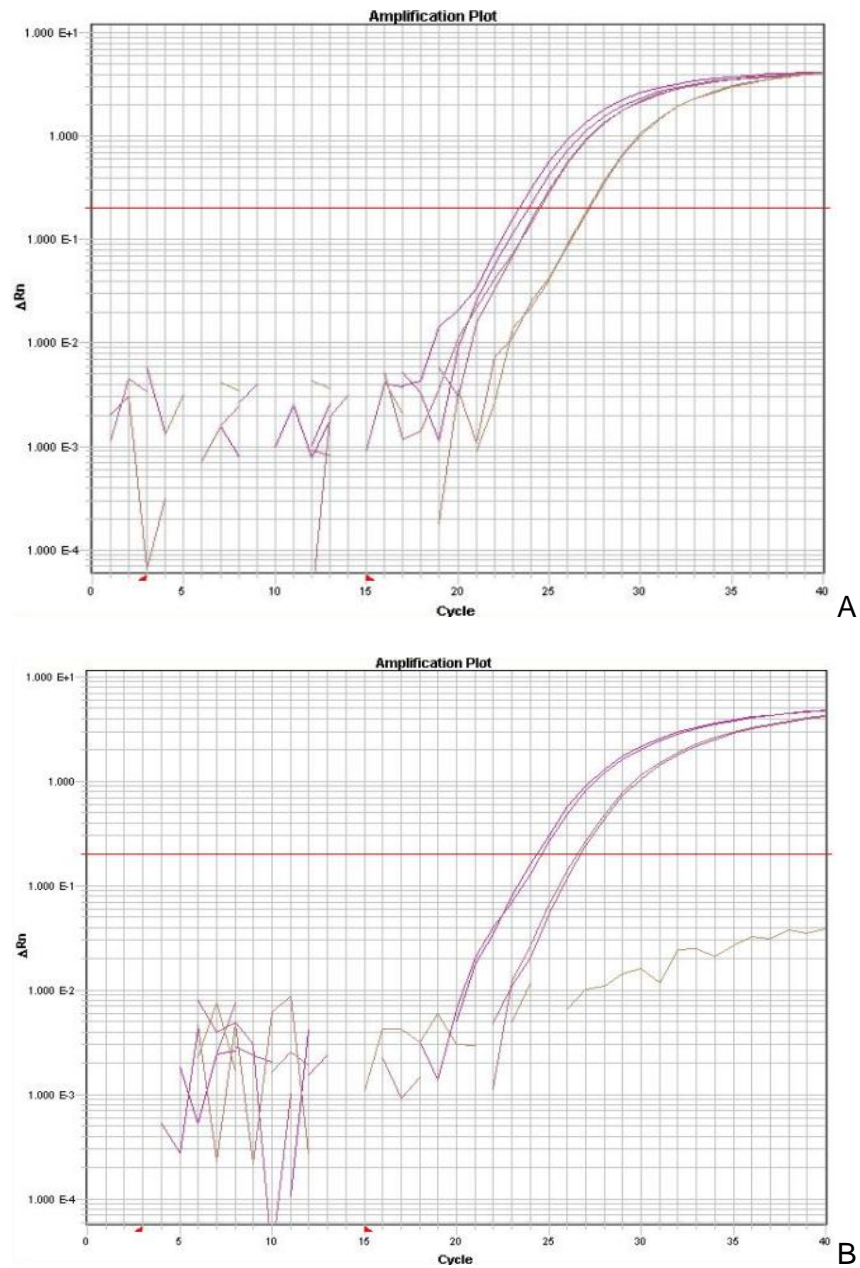


Rycina 4.15. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi, wymazu i włosów, pobranych po allo-HSCT od biorcy oznaczonego nr 13, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).



Rycina 4.16. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi, wymazu i włosów, pobranych po allo-HSCT od biocy oznaczonego nr 20, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).





Rycina 4.17. Wykres reakcji QR-PCR uzyskany w oparciu o DNA pochodzący z krwi, wymazu i włosa, pobranych po allo-HSCT od biorcy oznaczonego nr 21, z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA (A) oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA (B).

Tabela. 4.2. Wyniki analizy QR-PCR z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA w materiałach pobranych od biorców po allo-HSCT.

Nr pacjenta	Płeć Biorca/Dawca	Średnia wartość $C_T^*$	Średnia wartość stężenia ng/ $\mu$ l*
1A	M/K	24,47	30,44
1AY		38,34/NW	0,017/0
1B		24,54	27,91
1BY		26,12	19,50
1C		29,46	1,04
1CY		30,78	1,35
2A	M/M	23,54	66,53
2AY		25,32	33,71
2B		25,30	19,04
2BY		27,26	10,82
2C		25,70	14,32
2CY		27,24	11,00
3A	K/M	26,26	8,87
3AY		27,75	7,68
3B		25,90	11,22
3BY		29,12	3,53
3C		25,33	16,66
3CY		34,47	0,17
4A	K/K	25,33	18,58
4B		25,08	22,26
4C		27,38	4,33
5A	K/K	24,25	40,11
5B		24,48	34,05
5C		28,75	1,64
6A	K/M	24,00	40,58
6AY		25,15	34,04
6B		26,26	8,83
6BY		28,44	5,15
6C		26,01	10,41
6CY		35,95	0,08
7A	K/K	22,45	143,88
7B		25,51	16,45
7C		23,82	54,44

A- krew, B- wymaz, C- włos, M- mężczyzna, K- kobieta,  
 \*w przypadku znacznych różnic podano dwa pomiary  
 Kolorem żółtym oznaczono pomiary DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Human  
 Kolorem błękitnym oznaczono pomiary DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Y  
 NW- nie wykryto DNA

Tabela. 4.2. cd. Wyniki analizy QR-PCR z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA w materiałach pobranych od biorców po allo-HSCT.

Nr pacjenta	Płeć Biorca/Dawca	Średnia wartość $C_T^*$	Średnia wartość stężenia ng/ $\mu$ l*
8A	M/M	23,82	54,62
8AY		25,25	35,06
8B		24,57	32,02
8BY		25,96	23,13
8C		28,68	1,72
8CY		29,51	2,92
9A	M/M	24,20	41,68
9AY		25,92	23,77
9B		24,88	25,61
9BY		25,96	23,17
9C		25,95	10,83
9CY		27,22	10,35
10A	M/K	31,36	0,26
10AY		37,95	0,03
10B		24,29	39,02
10BY		25,87	24,39
10C		27,02	5,62
10CY		28,37	5,68
11A	K/M	28,92	1,48
11AY		29,69	2,57
11B		23,76	46,99
11BY		26,19	19,16
11C		27,35	4,31
11CY		37,89	0,03
12A	M/K	24,16	42,92
12AY		37,88	0,03
12B		24,77	27,97
12BY		26,31	18,90
12C		26,12	10,62
12CY		28,01	7,03
13A	K/M	23,58	52,95
13AY		24,91	39,24
13B		23,74	47,92
13BY		31,37	0,96
13C		25,16	18,46
13CY		36,06	0,06

A- krew, B- wymaz, C- włos, M- mężczyzna, K- kobieta,  
\*w przypadku znacznych różnic podano dwa pomiary

Kolorem żółtym oznaczono pomiary DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Human

Kolorem błękitnym oznaczono pomiary DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Y

NW- nie wykryto DNA

Tabela. 4.2. cd. Wyniki analizy QR-PCR z użyciem zestawu Quantifiler™ Human DNA oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA w materiałach pobranych od biorców po allo-HSCT.

Nr pacjenta	Płeć Biorca/Dawca	Średnia wartość C <sub>T</sub> *	Średnia wartość stężenia ng/μl*
14A	K/K	25,57	15,70
14B		22,06	190,35
14C		24,31	38,48
15A	K/K	23,45	70,79
15B		25,43	17,37
15C		27,59	3,74
16A	M/K	24,66	25,68
16AY		37,19	0,04
16B		23,75	47,40
16BY		25,14	34,12
16C		23,60	52,46
16CY		25,22	33,09
17A	K/K	22,86	107,98
17B		26,10	10,76
17C		27,91	2,99
18A	M/K	24,07	45,84
18AY		26,84	13,30
18B		24,06	48,13
18BY		25,42	31,93
18C		28,00	2,80
18CY		29,88	2,37
19A	M/M	23,74	57,54
19AY		25,15	37,22
19B		22,88	106,45
19BY		23,90	76,95
19C		26,39	8,78
19CY		28,33	5,83
20A	K/M	23,86	43,91
20AY		24,97	37,73
20B		24,56	27,60
20BY		26,91	12,91
20C		26,24	9,02
20CY		37,35/NW	0,03/0
21A	K/M	23,56	54,31
21AY		24,44	51,18
21B		24,39	30,85
21BY		26,62	14,66
21C		27,12	4,97
21CY		NW	0

A- krew, B- wymaz, C- włos, M- mężczyzna, K- kobieta,

\*w przypadku znacznych różnic podano dwa pomiary

Kolorem żółtym oznaczono pomiary DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Human

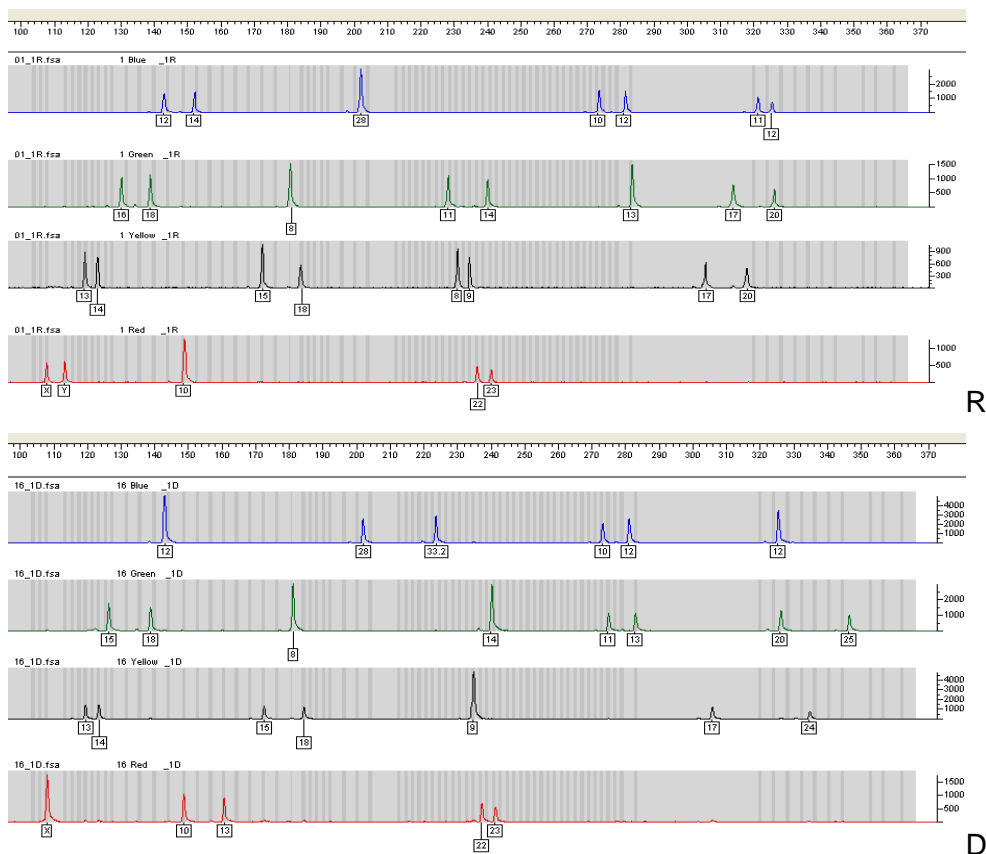
Kolorem błękitnym oznaczono pomiary DNA z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Y

NW- nie wykryto DNA

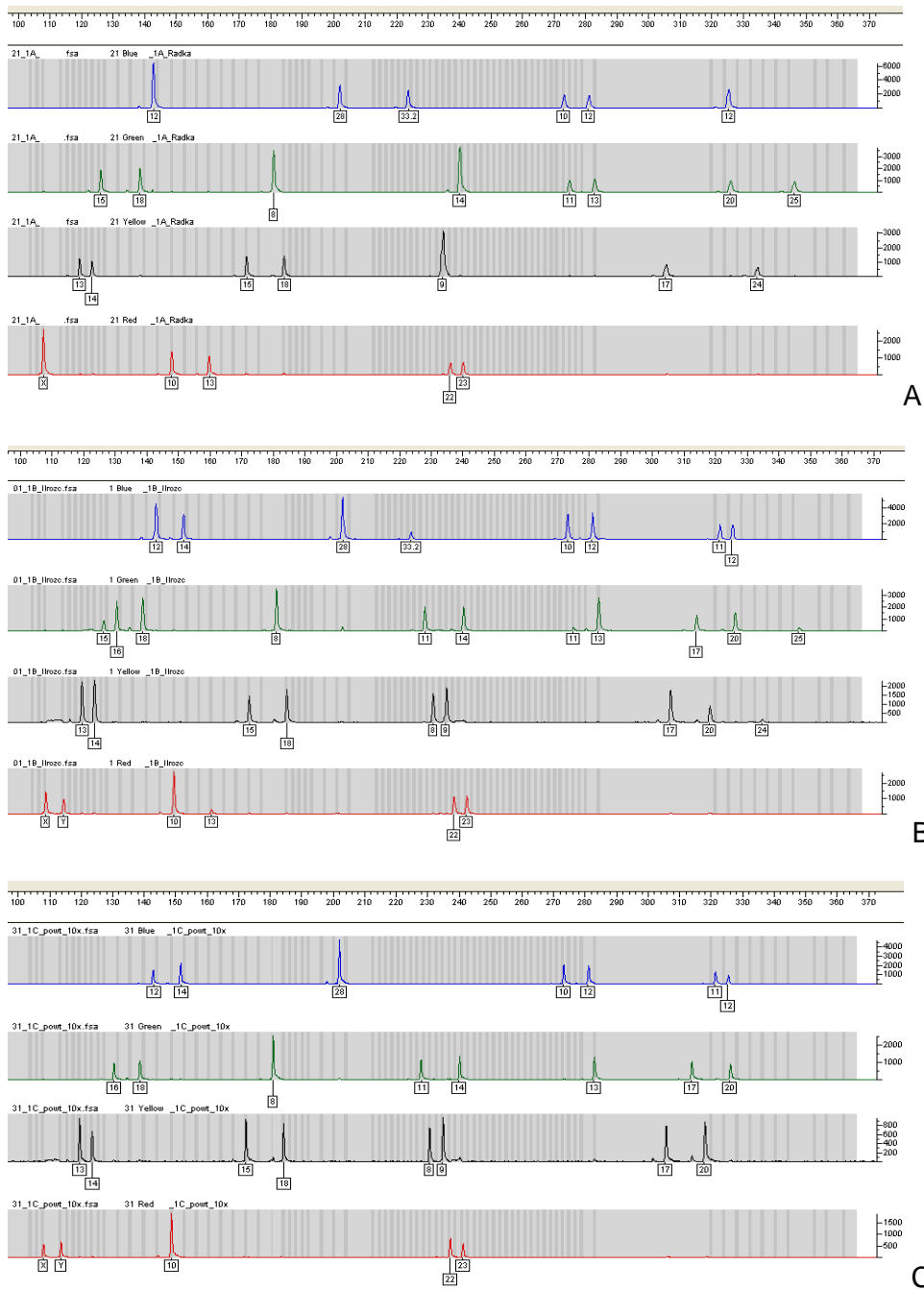
## 4.4. Analiza polimorfizmu w reakcji multipleks STR-PCR

### 4.4.1. Analiza markerów autosomalnego DNA

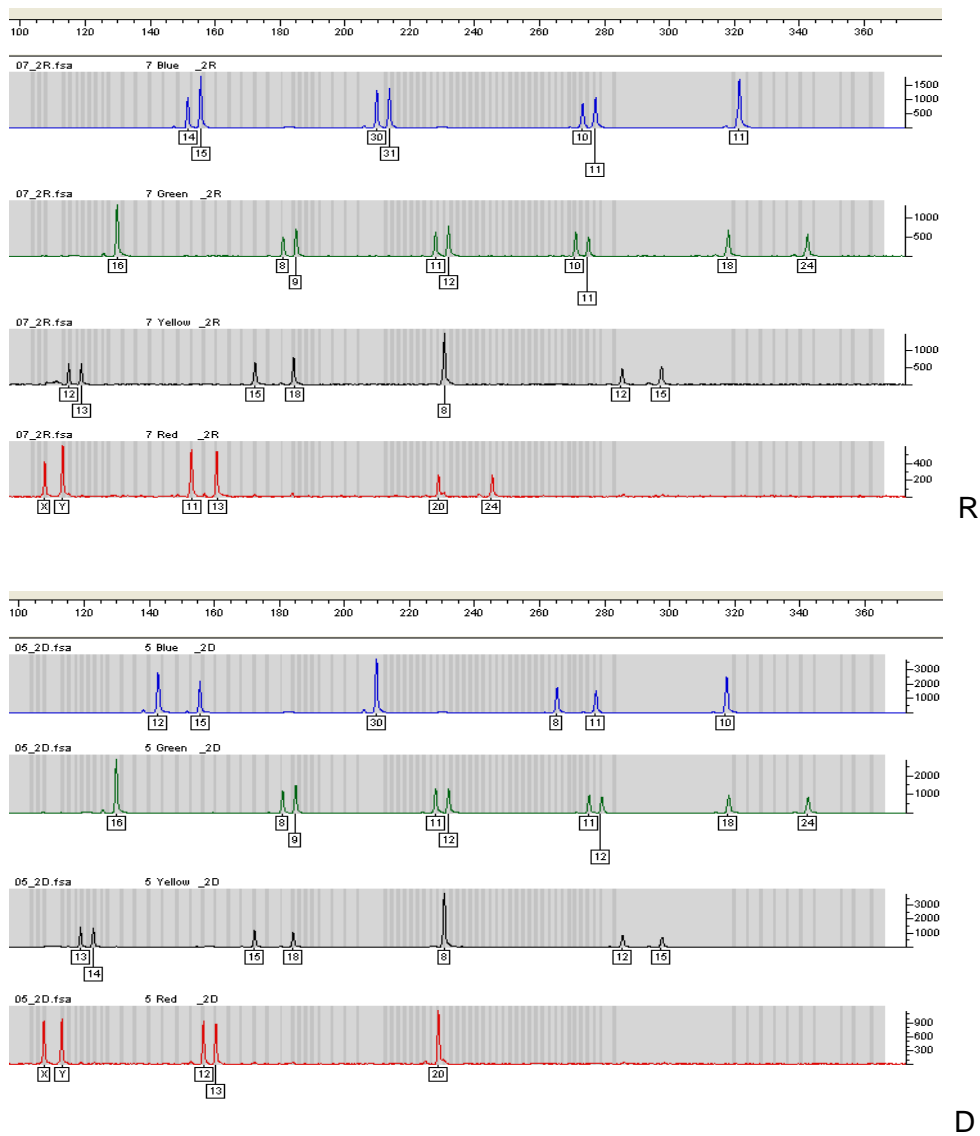
Na kolejnych rycinach 4.18.1-4.38.2 przedstawiono wyniki analizy polimorfizmu genetycznego w materiałach biorców po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy, przeprowadzone w oparciu o amplifikację markerów autosomalnego DNA. Analizie poddano DNA wyizolowane z krwi, z wymazu komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej oraz z około 2 cm fragmentów włosów zawierających korzeń włosa i część łodygi. Kontrolne DNA pochodziło z krwi dawców i biorców zabezpieczonej przed przeszczepem. Ocenę stopnia chimeryzmu donorowego w badanych materiałach pochodzących od biorców allo-HSCT zestawiono w tabeli 4.3, umieszczonej pod rycinami.



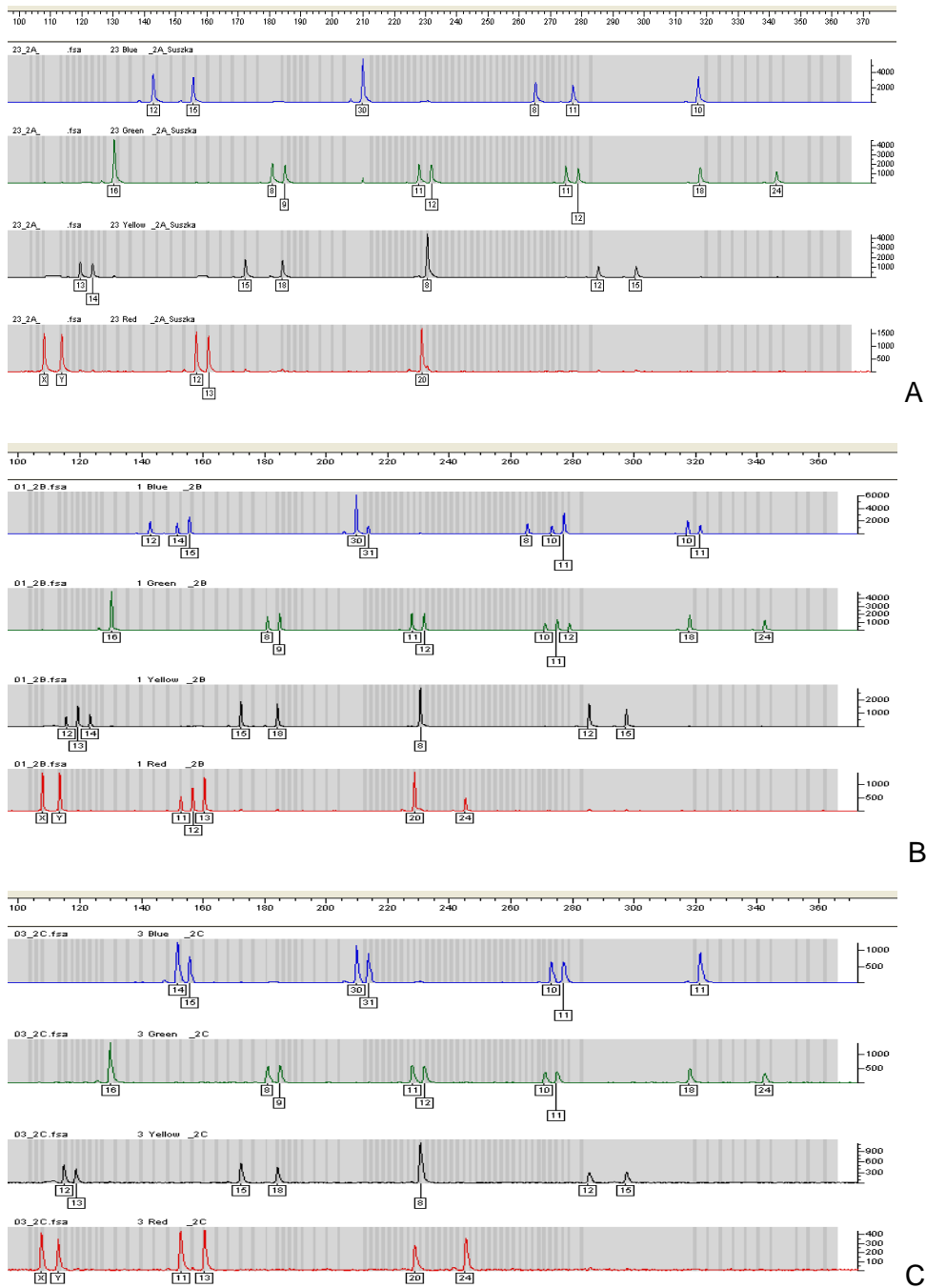
Rycina 4.18.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 1, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.18.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 1, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

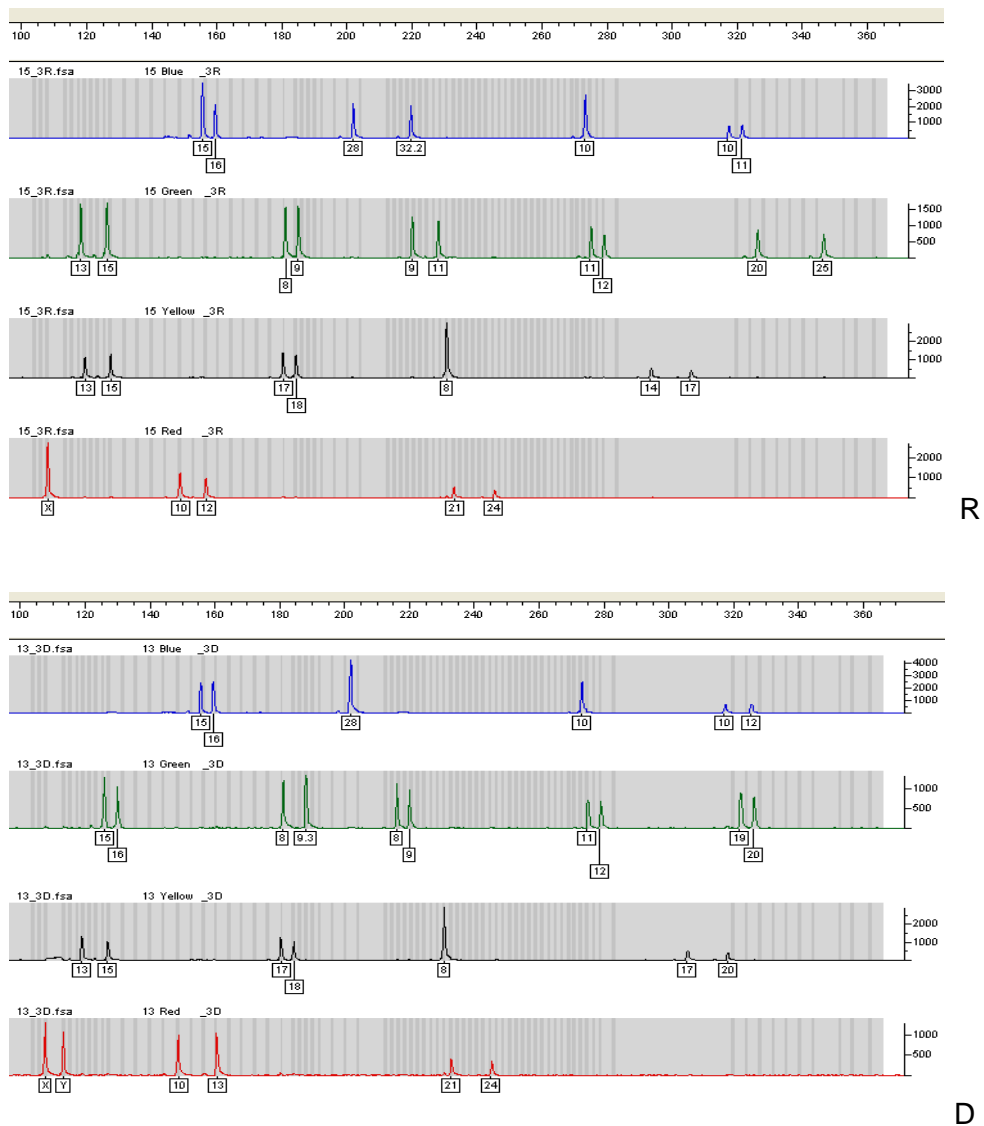


Rycina 4.19.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 2, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

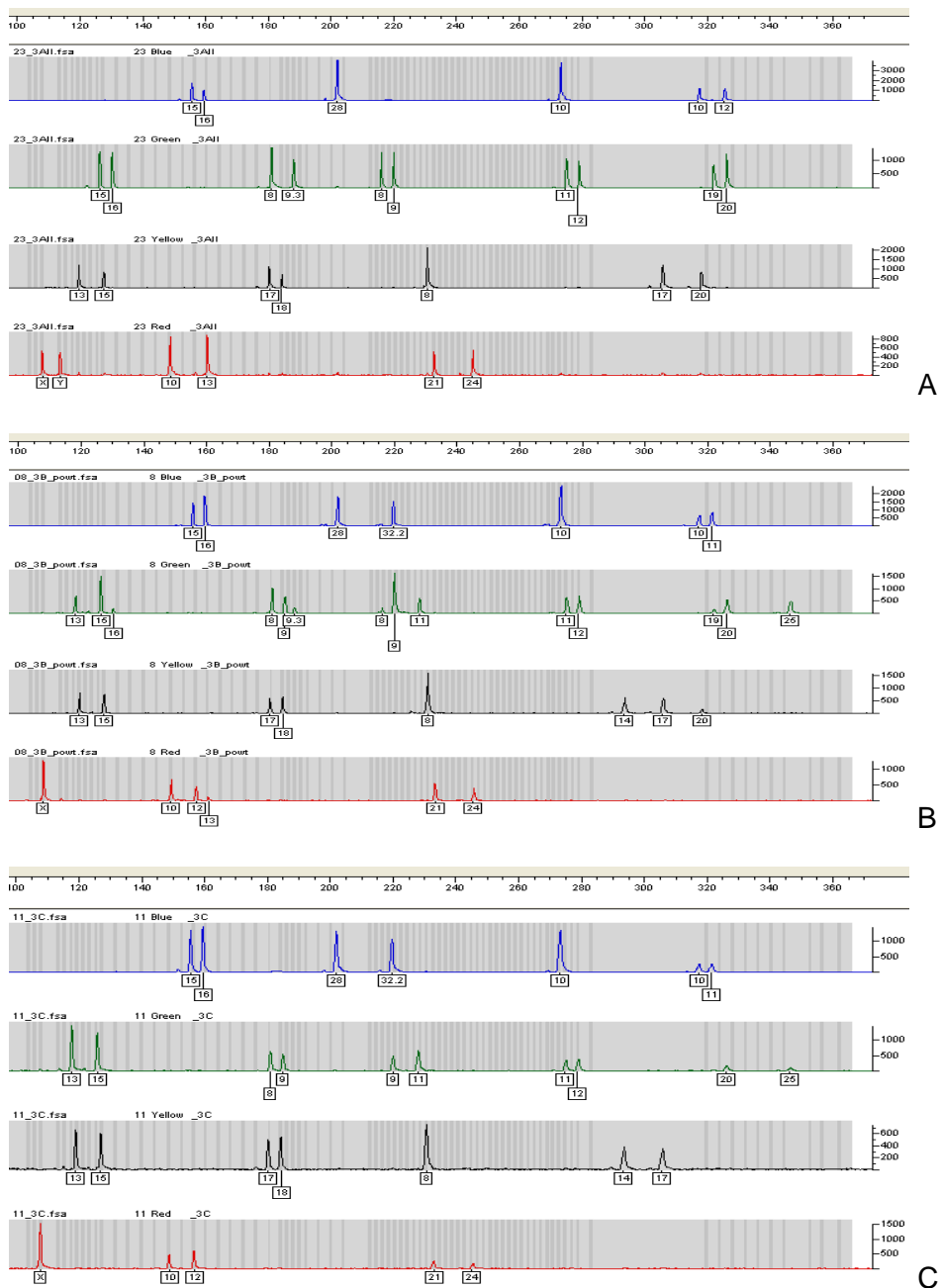


Rycina 4.19.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocyj nr 2, pobranych po przeszczepie. A-krew biocyj, B-wymaz biocyj, C-włos biocyj.

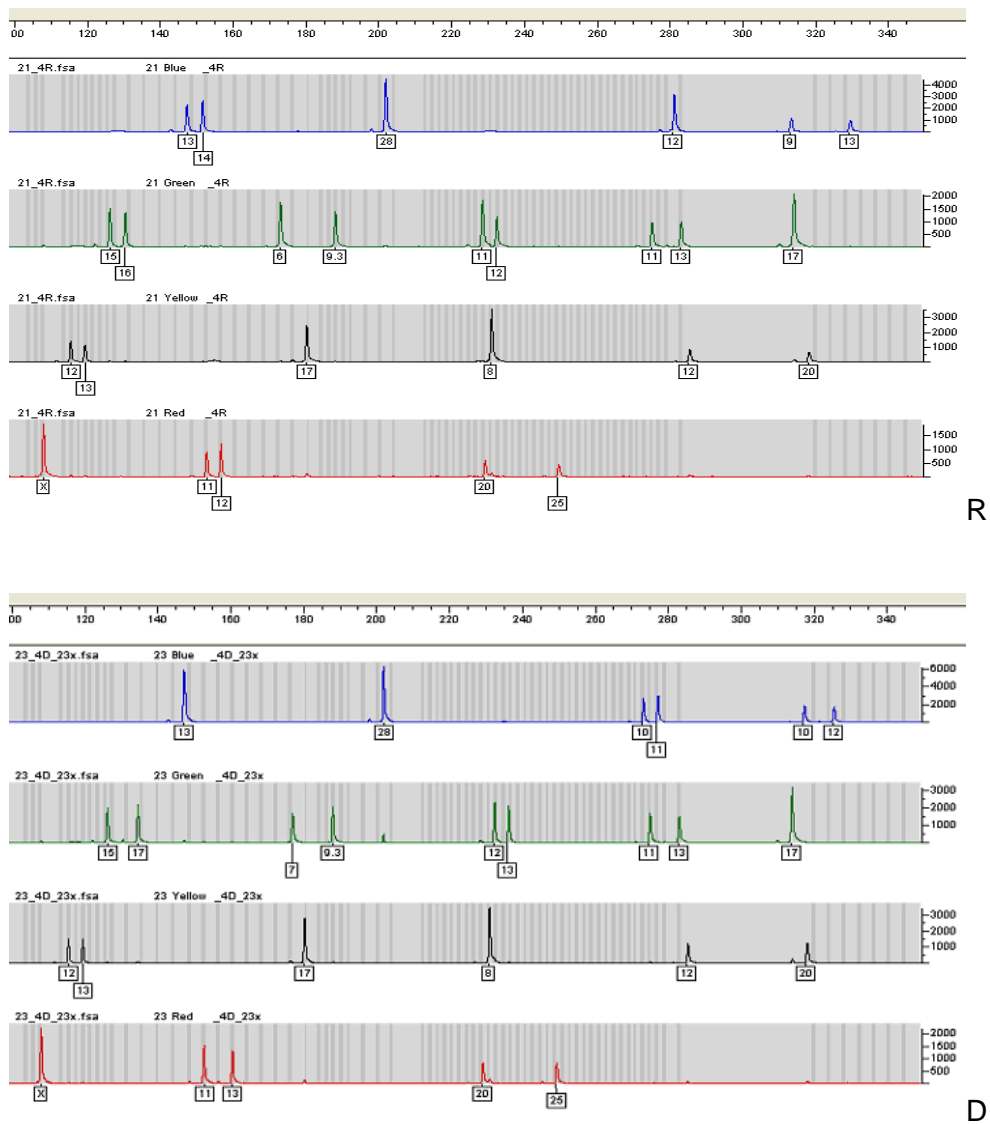




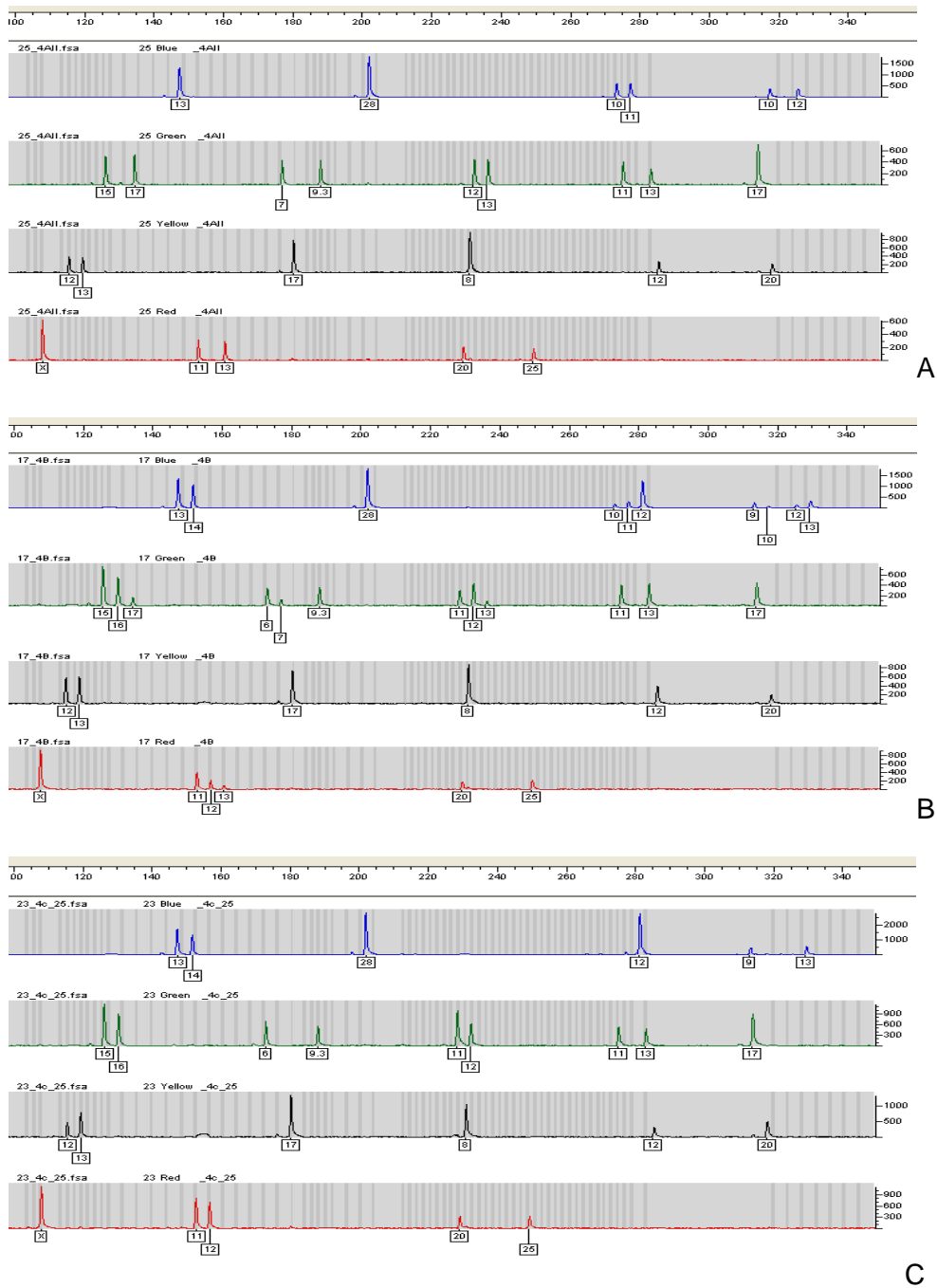
Rycina 4.20.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 3, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



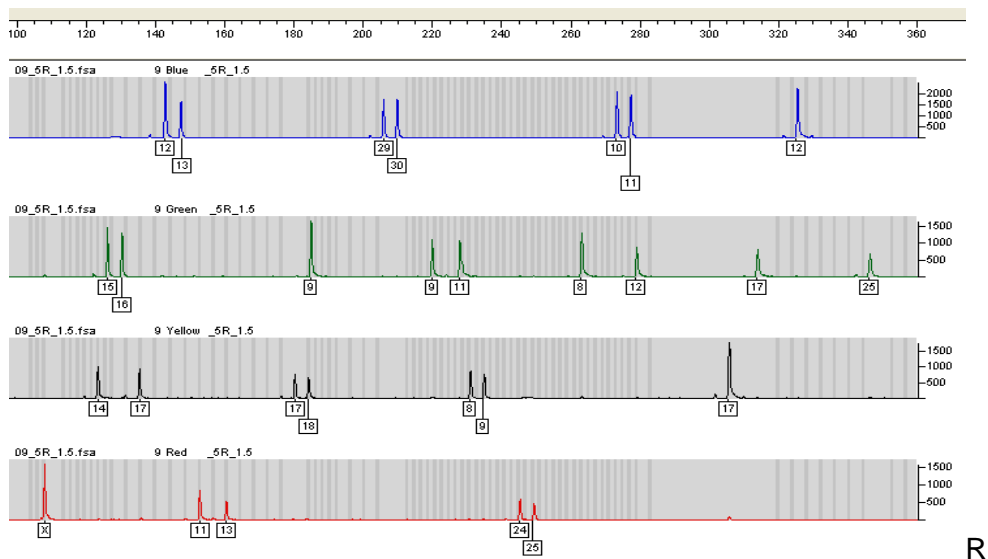
Rycina 4.20.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 3, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



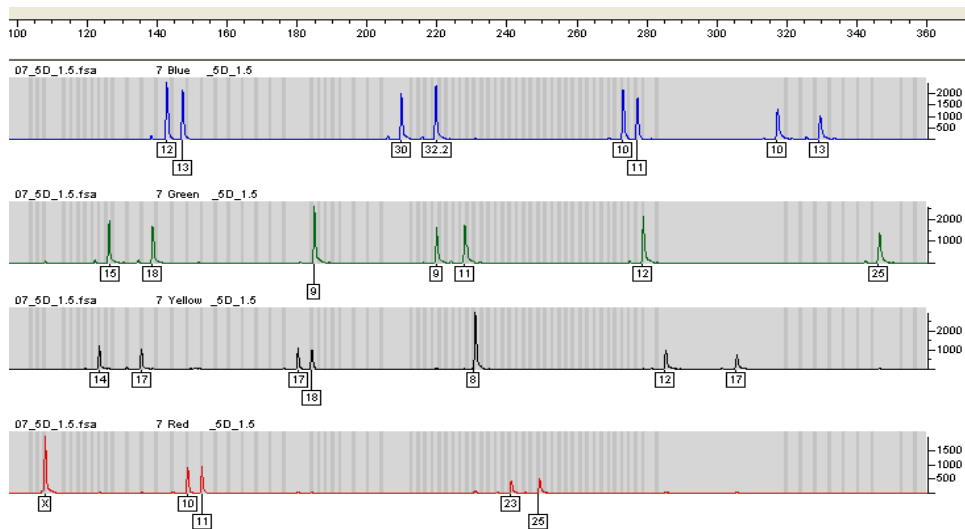
Rycina 4.21.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 4, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.21.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biorcy nr 4, pobranych po przeszczepie. A-krew biorcy, B-wymaz biorcy, C-włos biorcy.

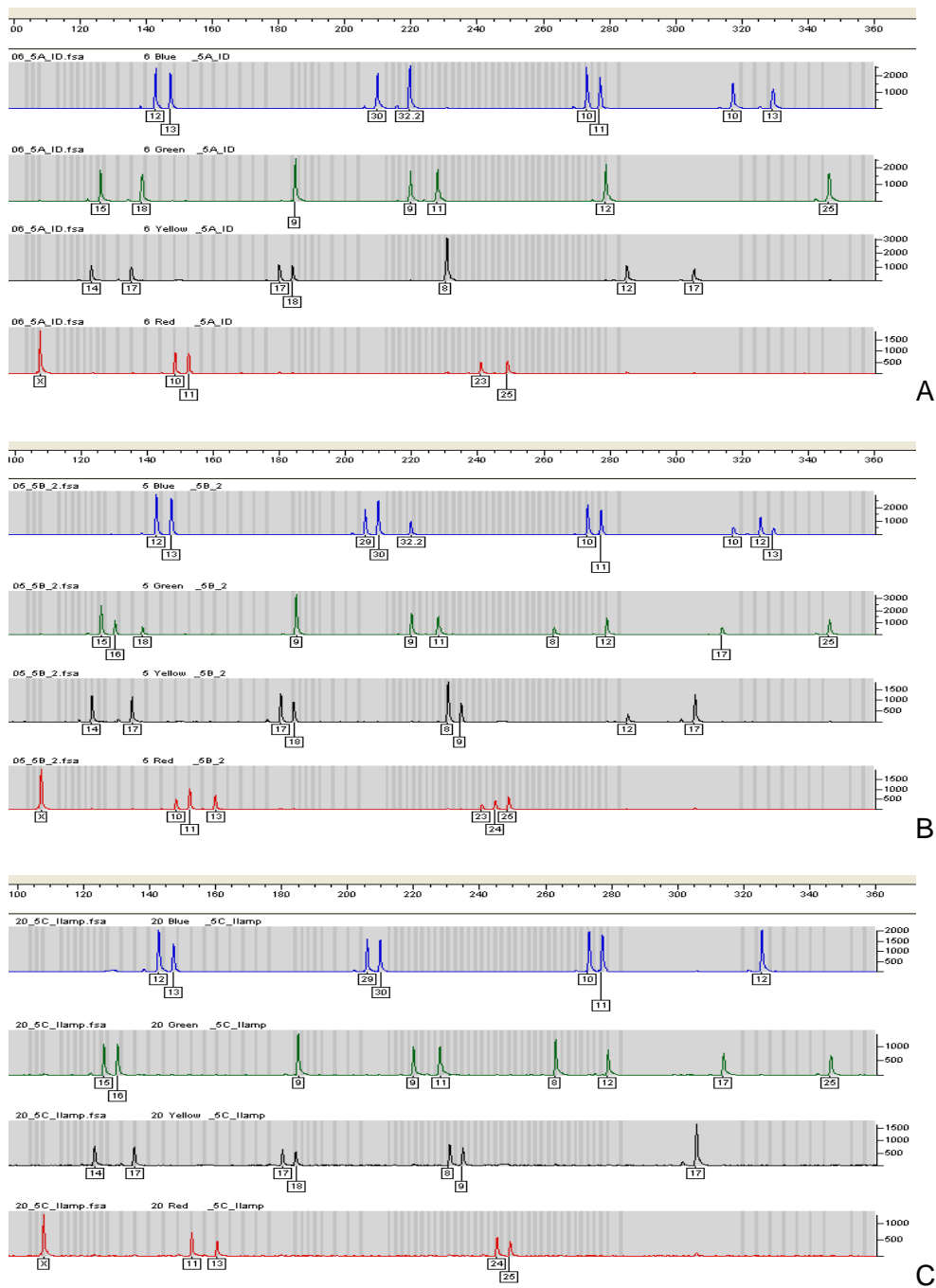


R

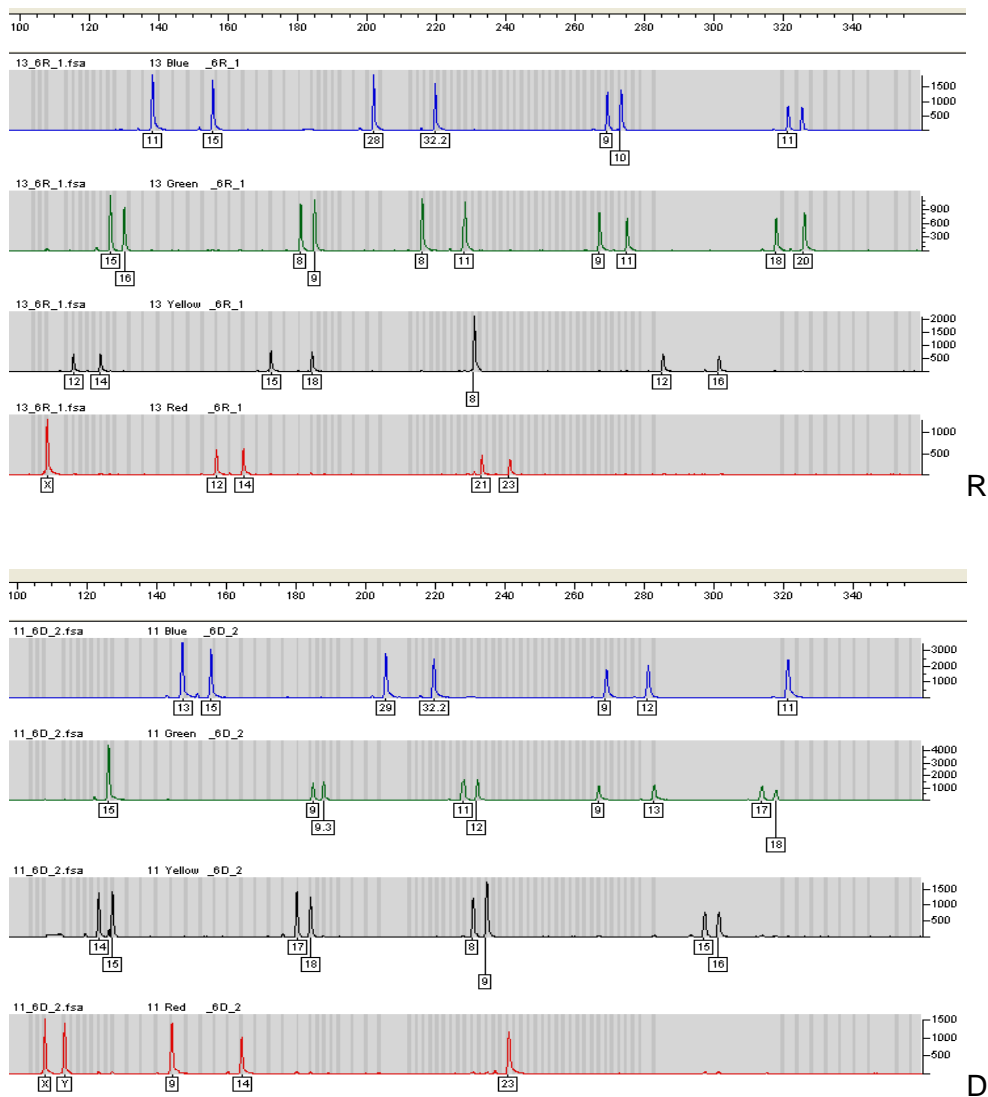


D

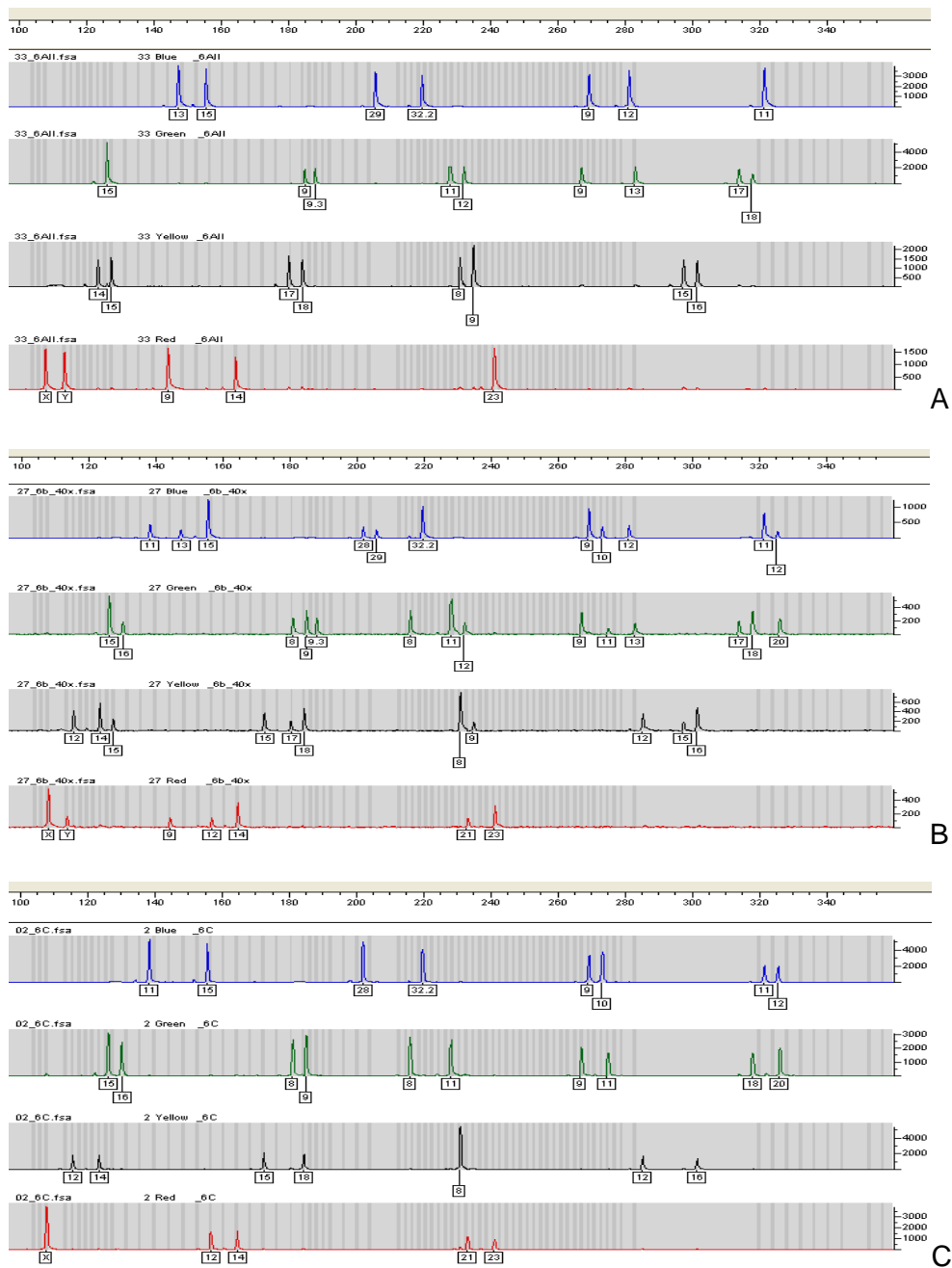
Rycina 4.22.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 5, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.22.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biorcy nr 5, pobranych po przeszczepie. A-krew biorcy, B-wymaz biorcy, C-włos biorcy.

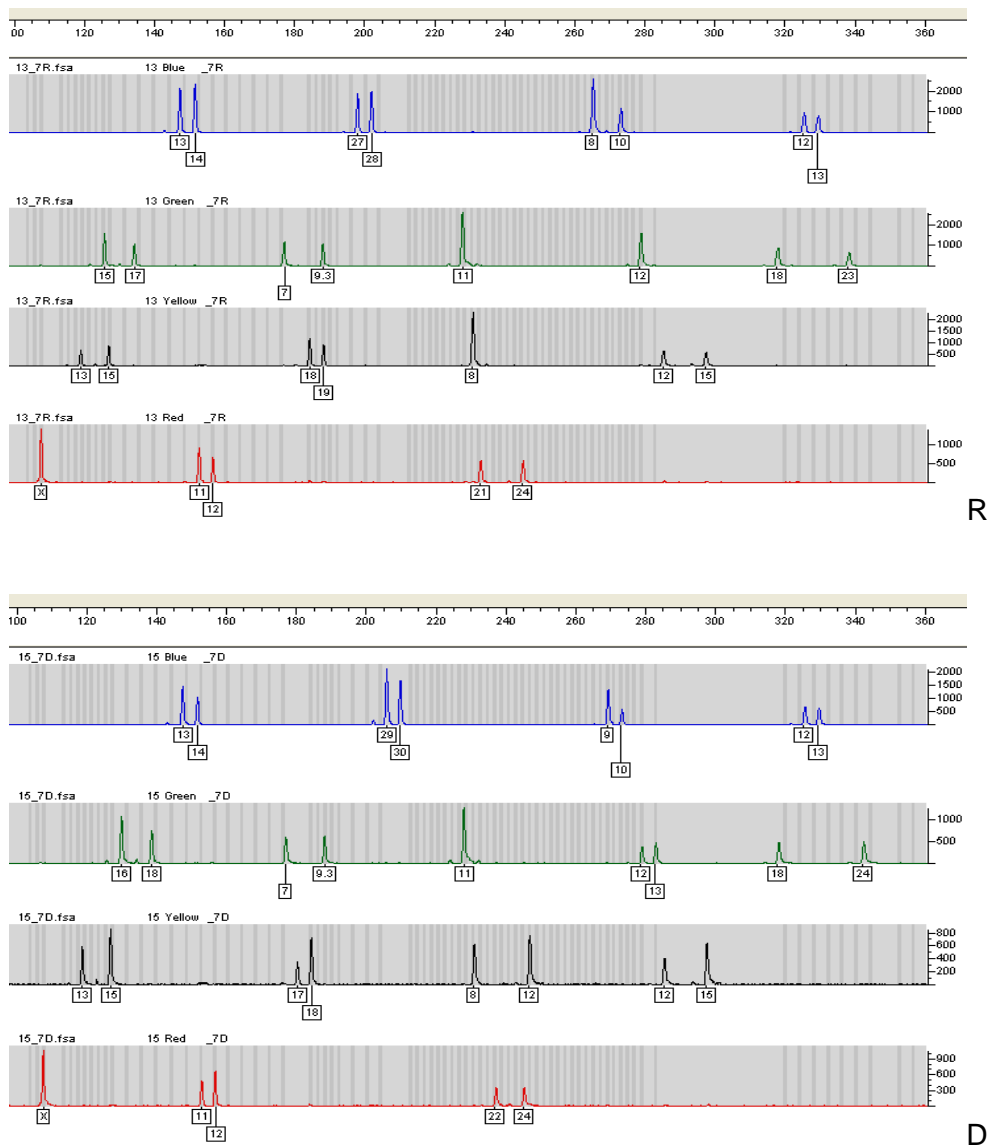


Rycina 4.23.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 6, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

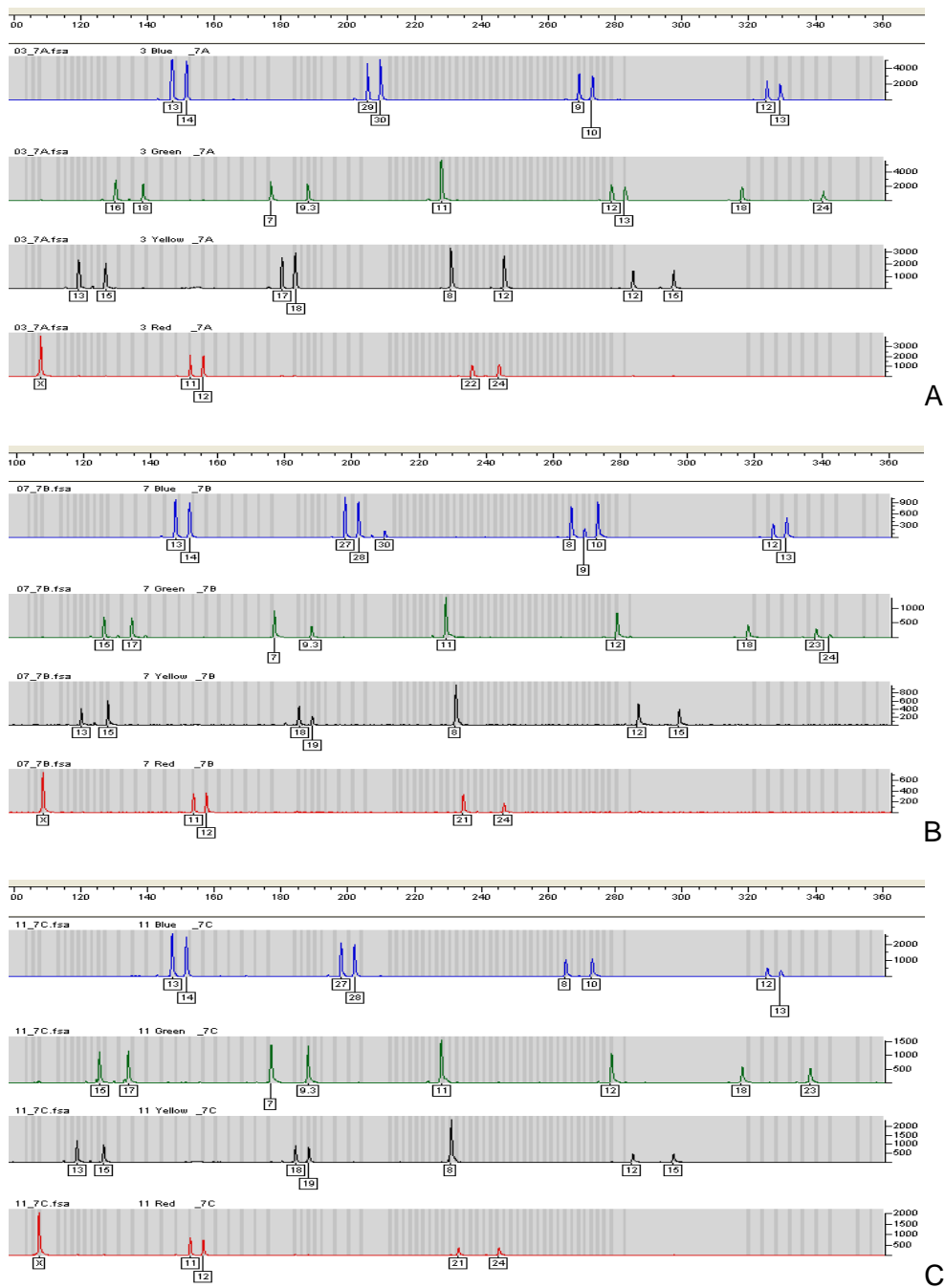


Rycina 4.23.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 6, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

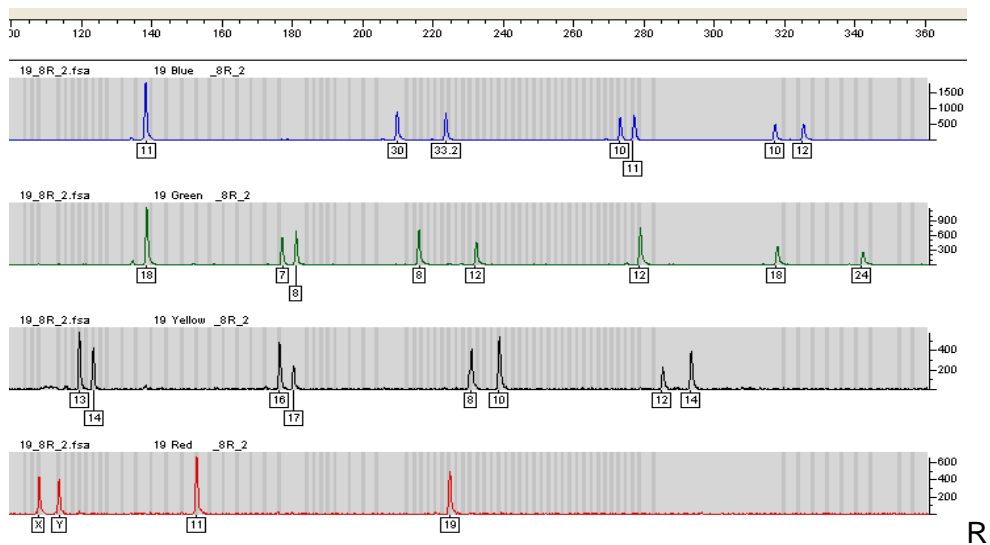




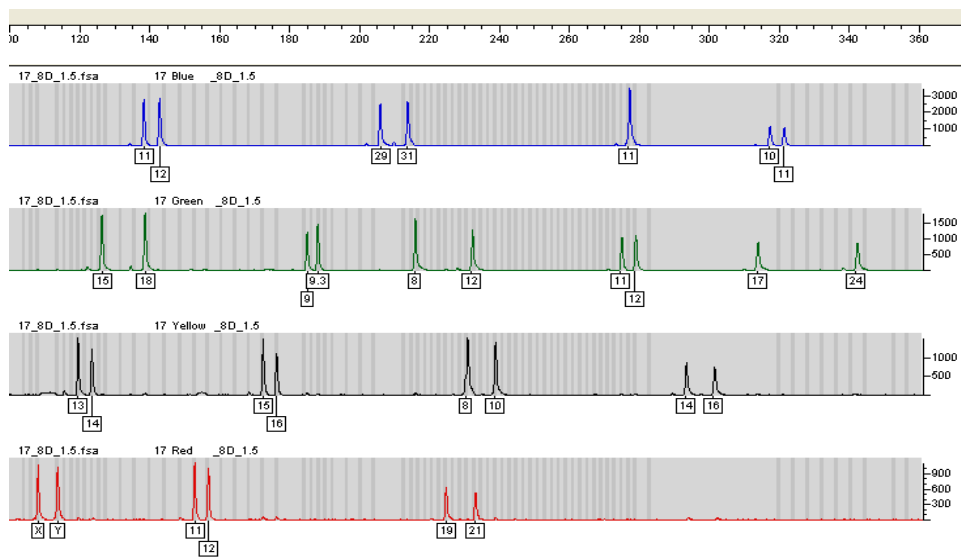
Rycina 4.24.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 7, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.24.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 7, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

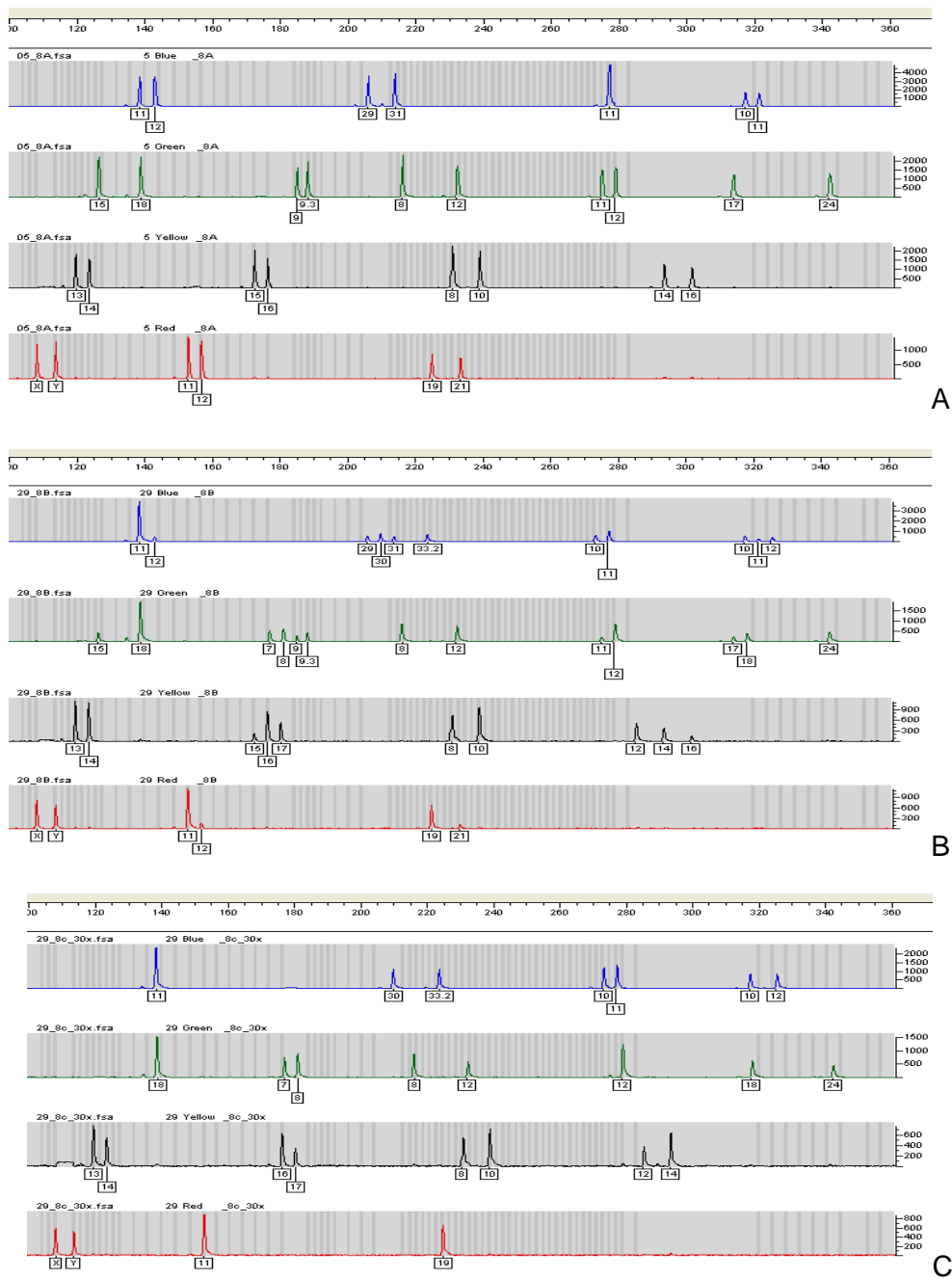


R

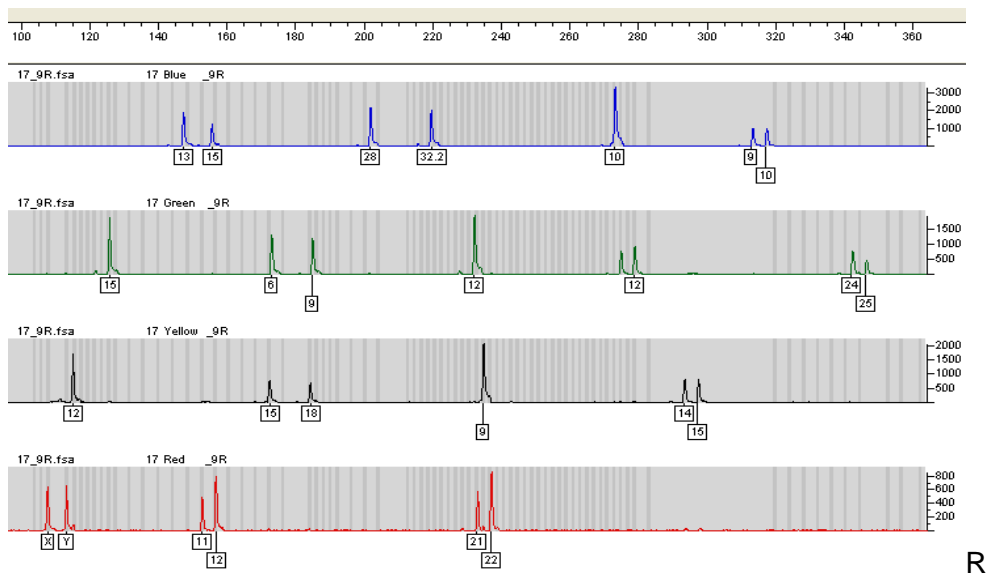


D

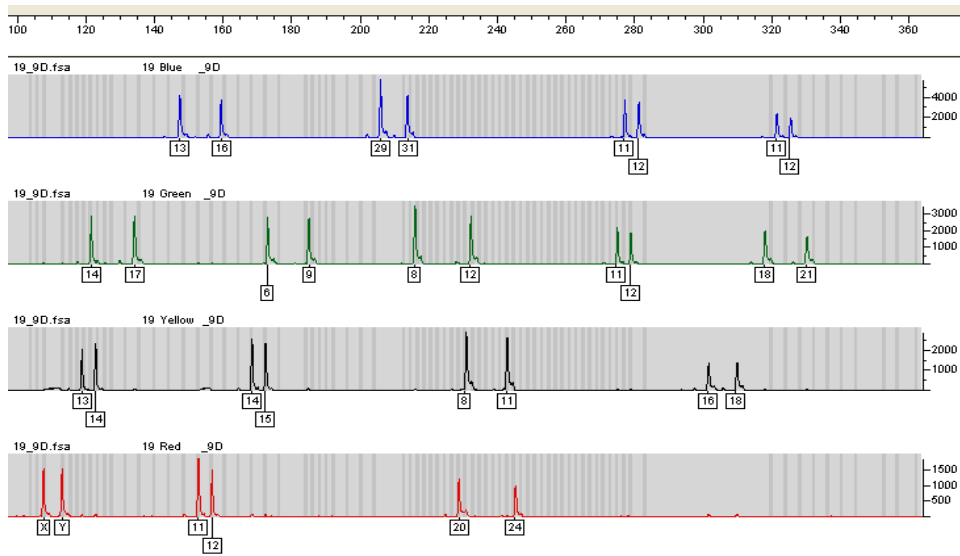
Rycina 4.25.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 8, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.25.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biorcy nr 8, pobranych po przeszczepie. A-krew biorcy, B-wymaz biorcy, C-włos biorcy.

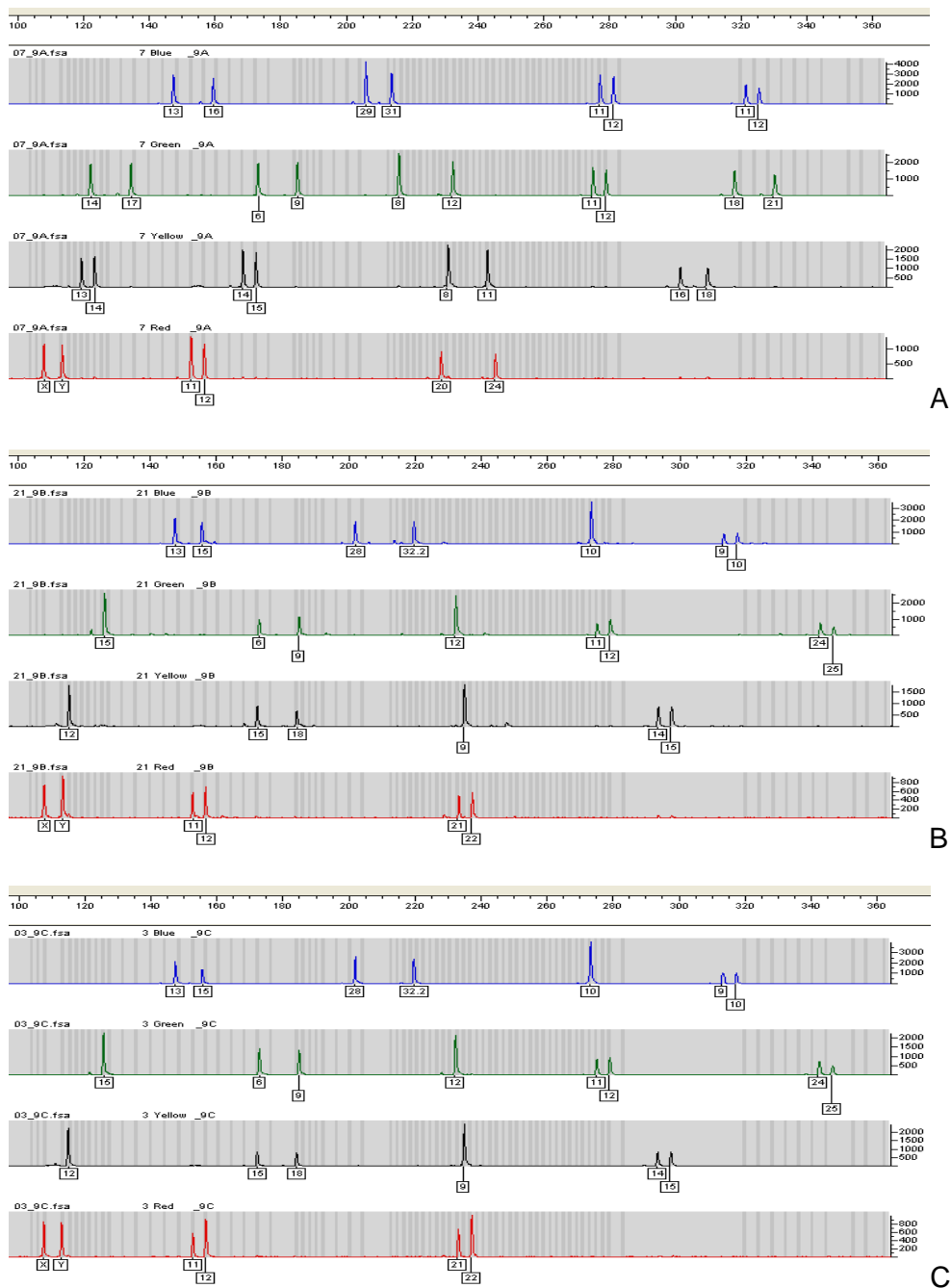


R

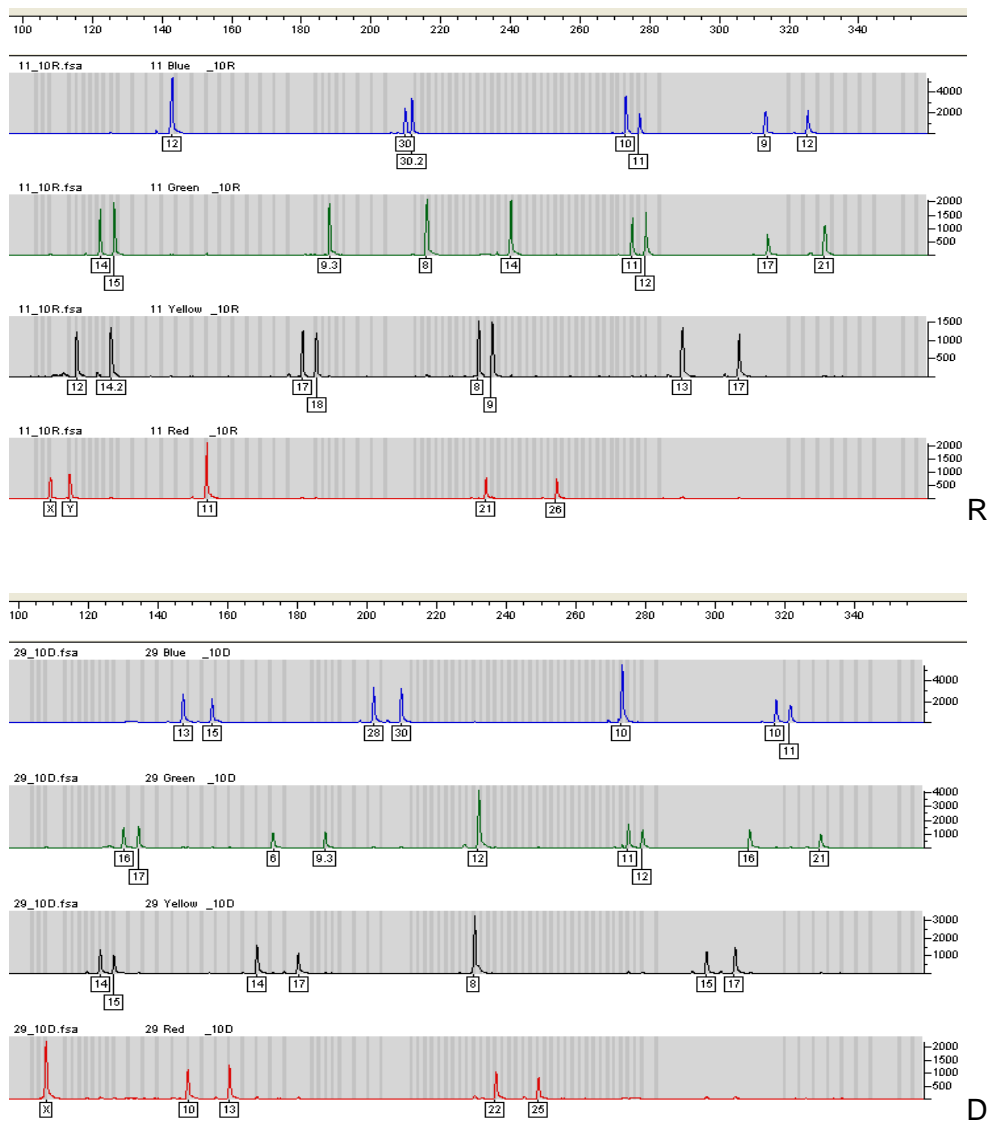


D

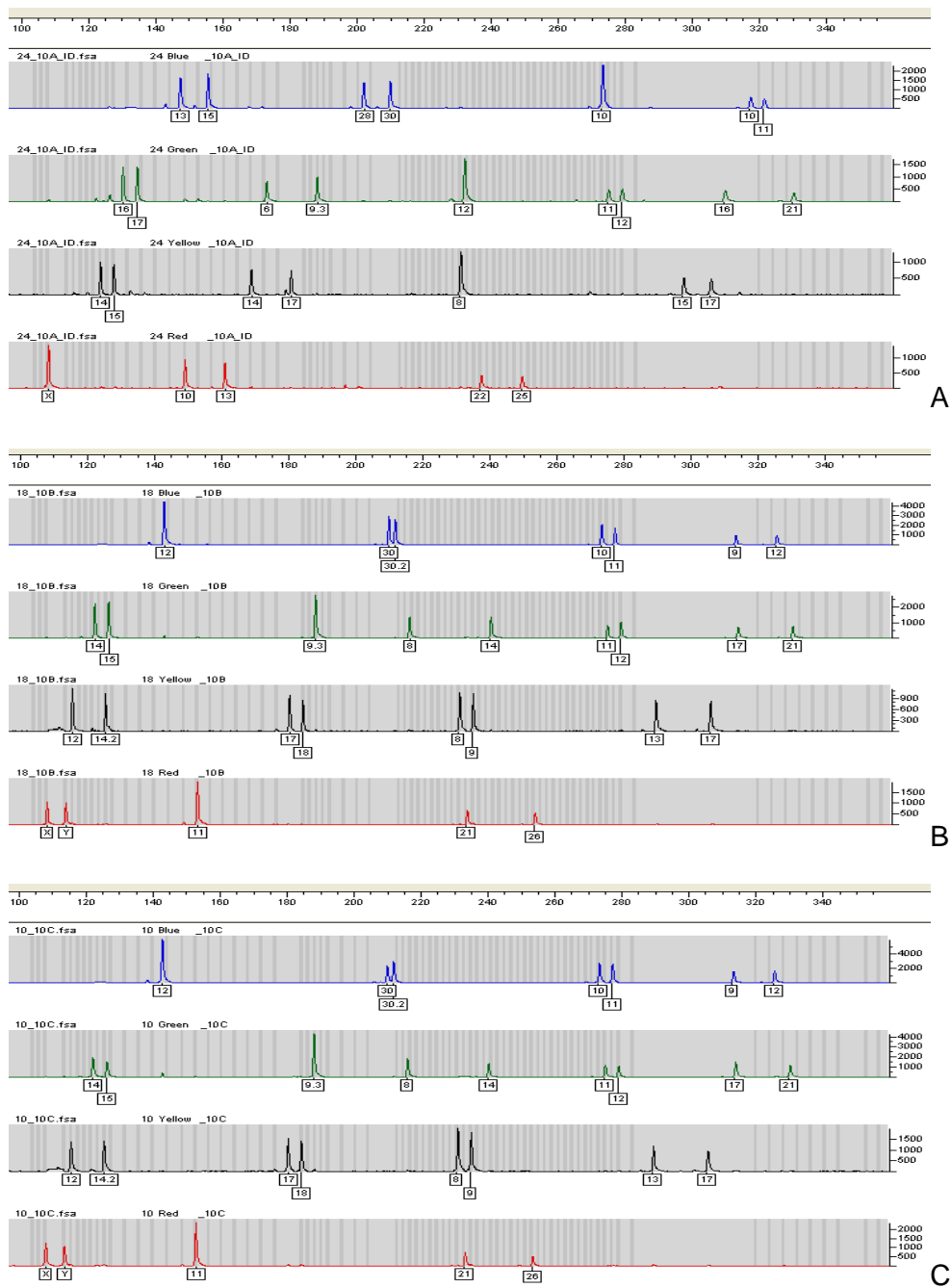
Rycina 4.26.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 9, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.26.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biorcy nr 9, pobranych po przeszczepie. A-krew biorcy, B-wymaz biorcy, C-włos biorcy.

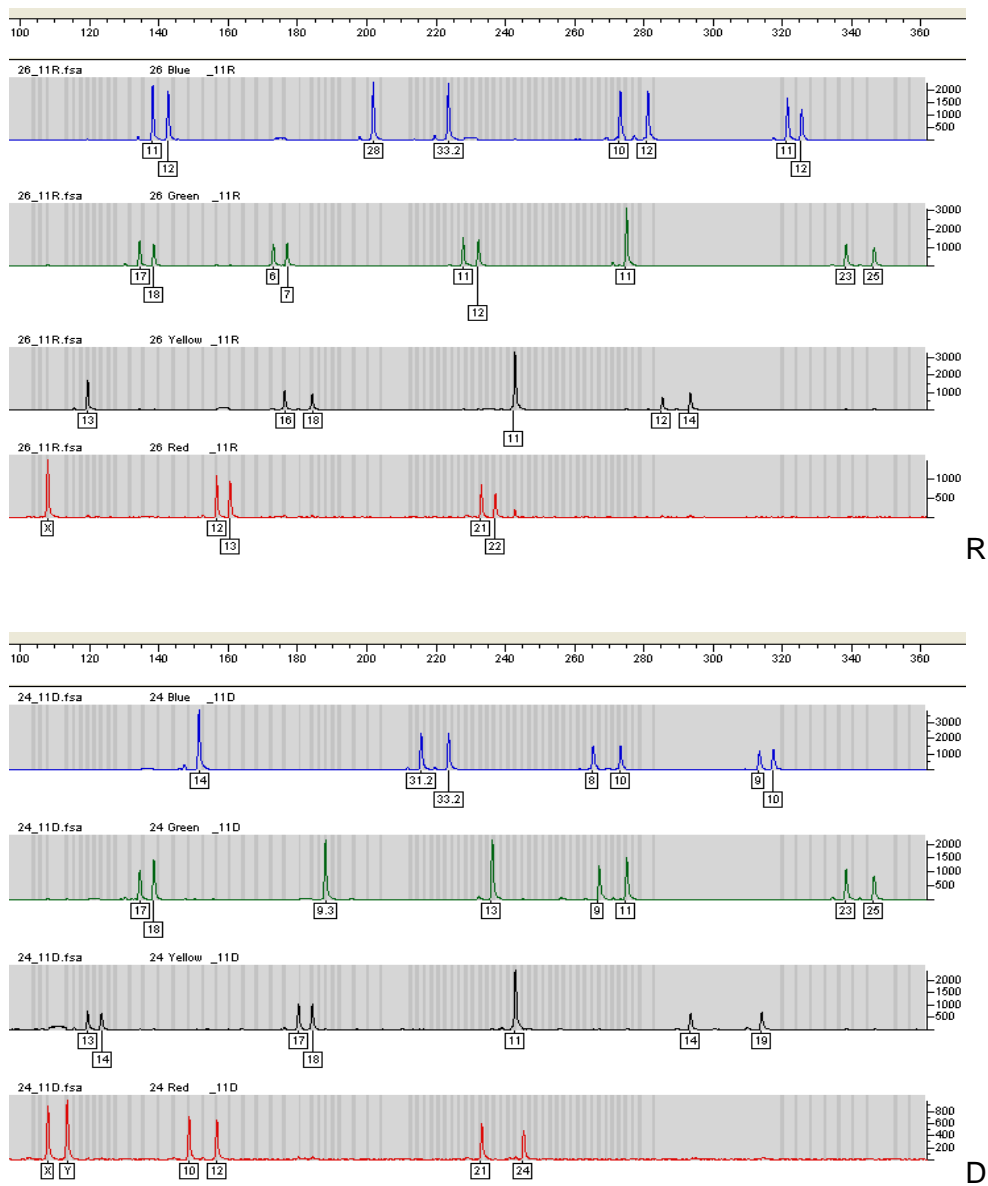


Rycina 4.27.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 10, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

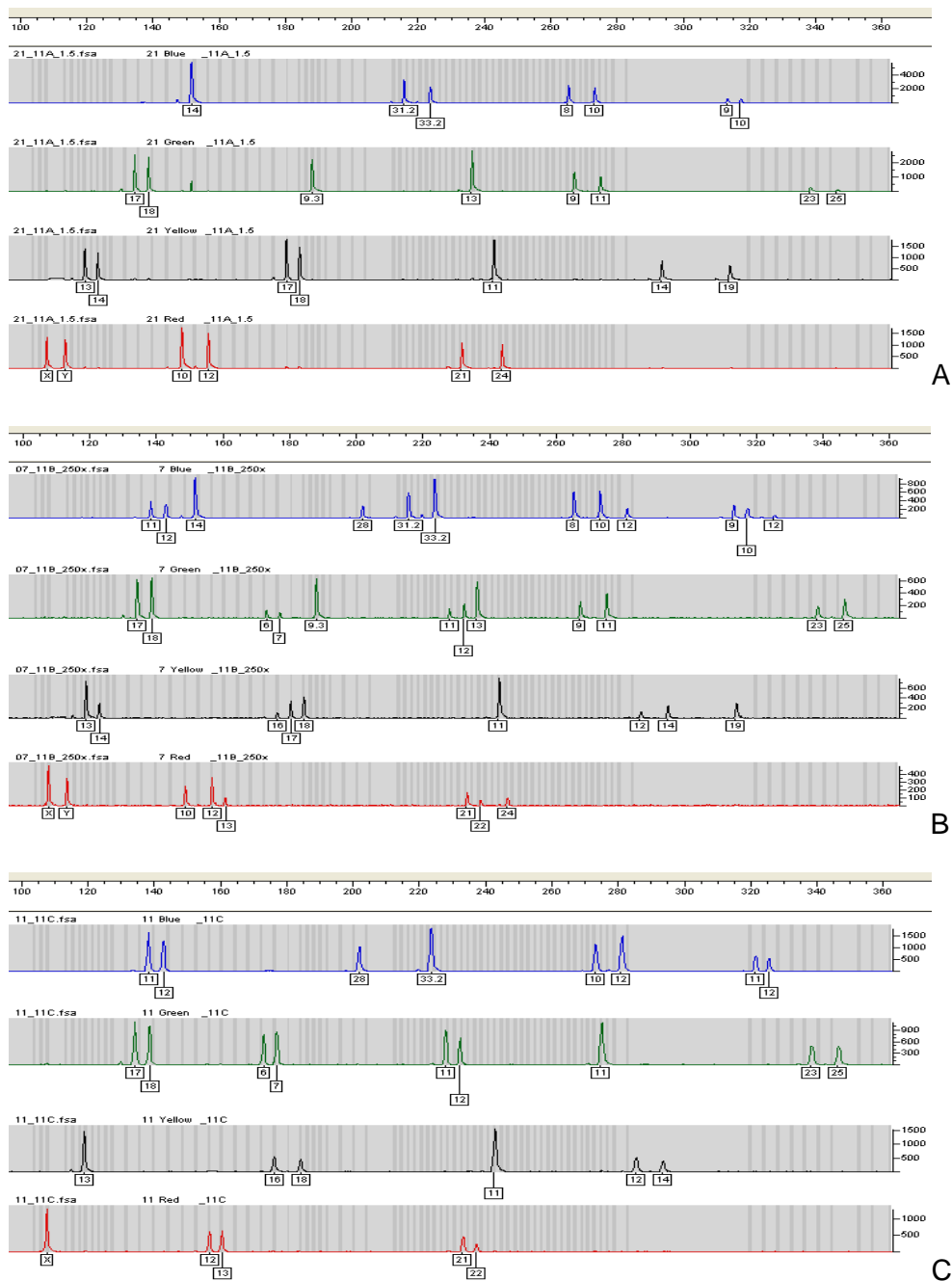


Rycina 4.27.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 10, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

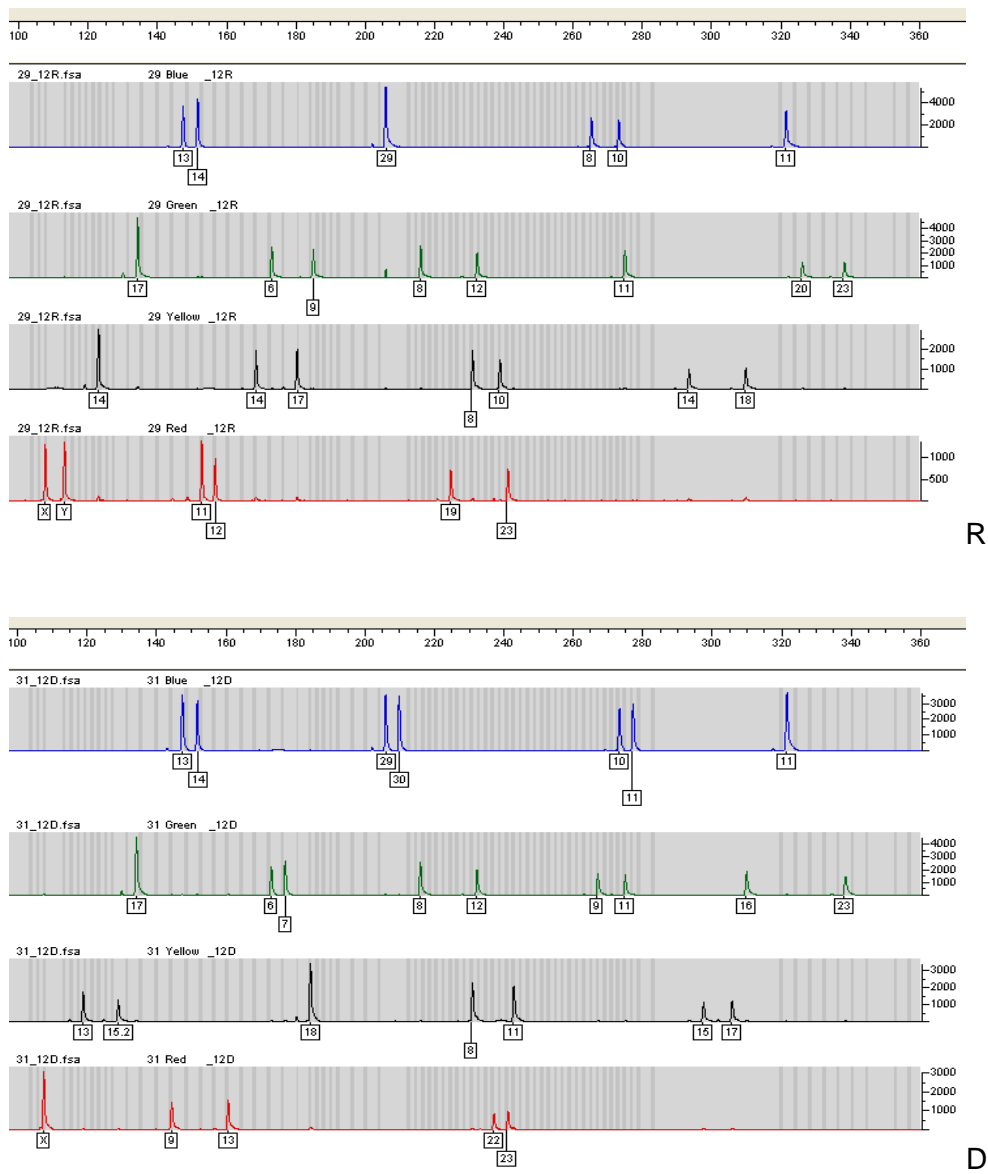




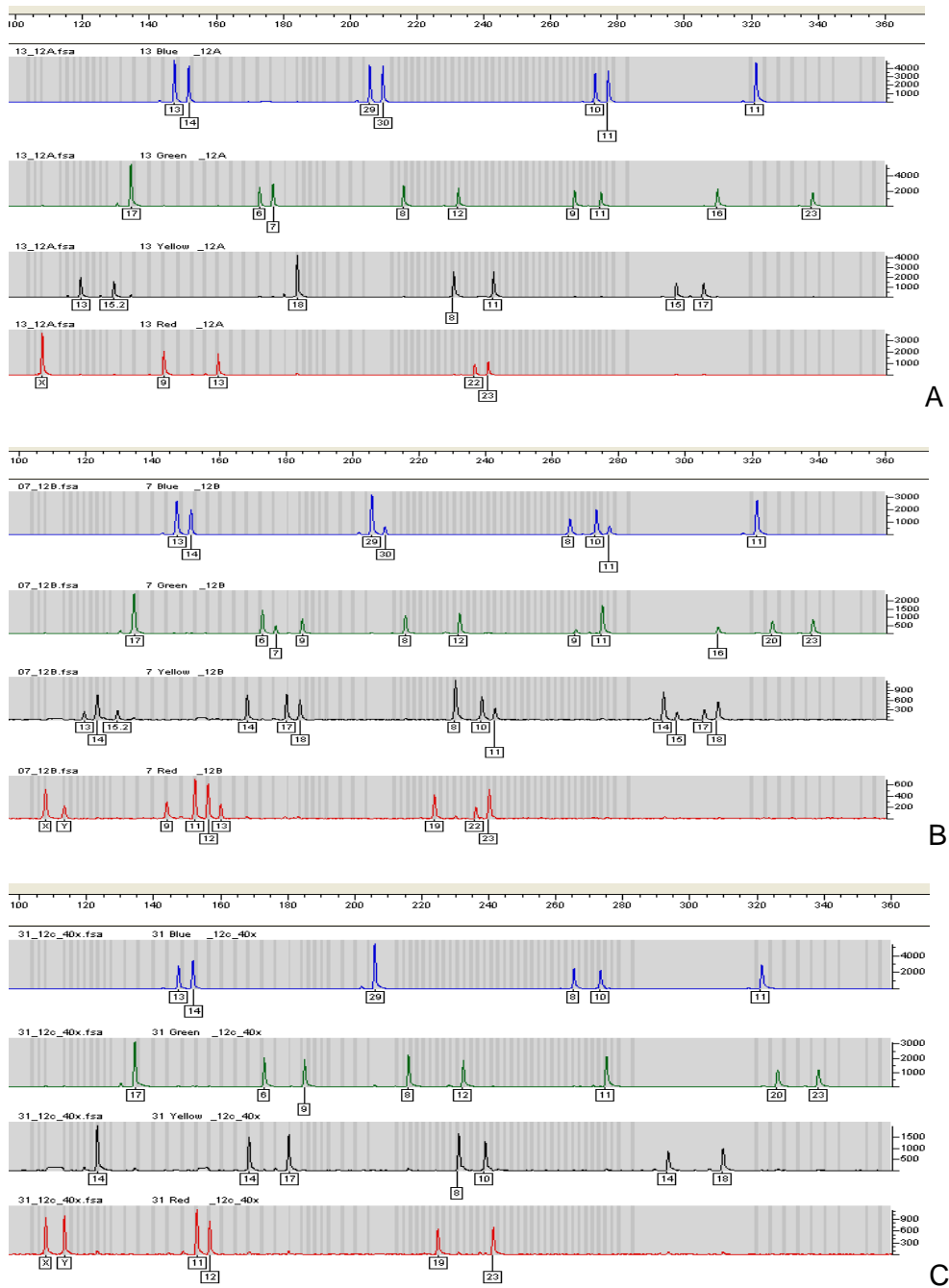
Rycina 4.28.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 11, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



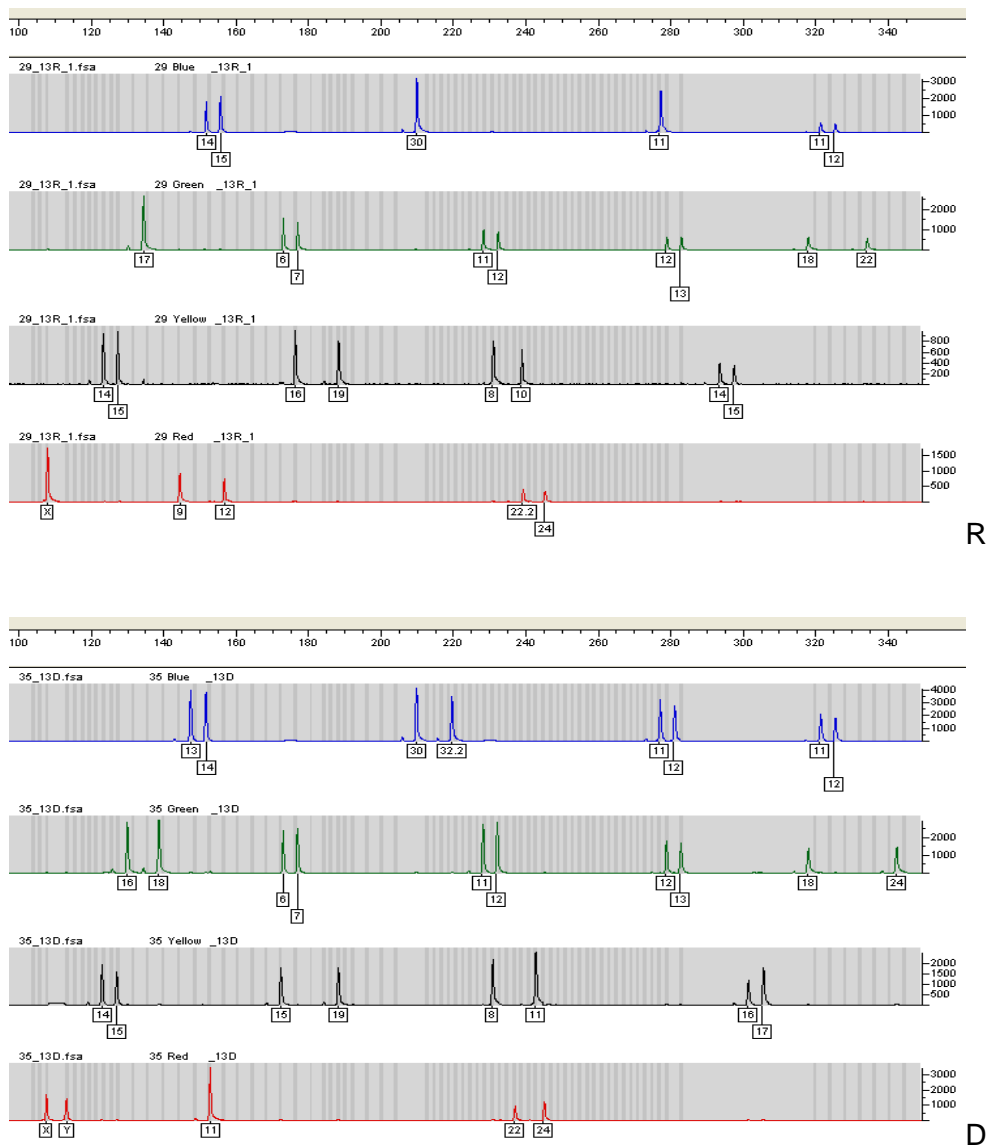
Rycina 4.28.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 11, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



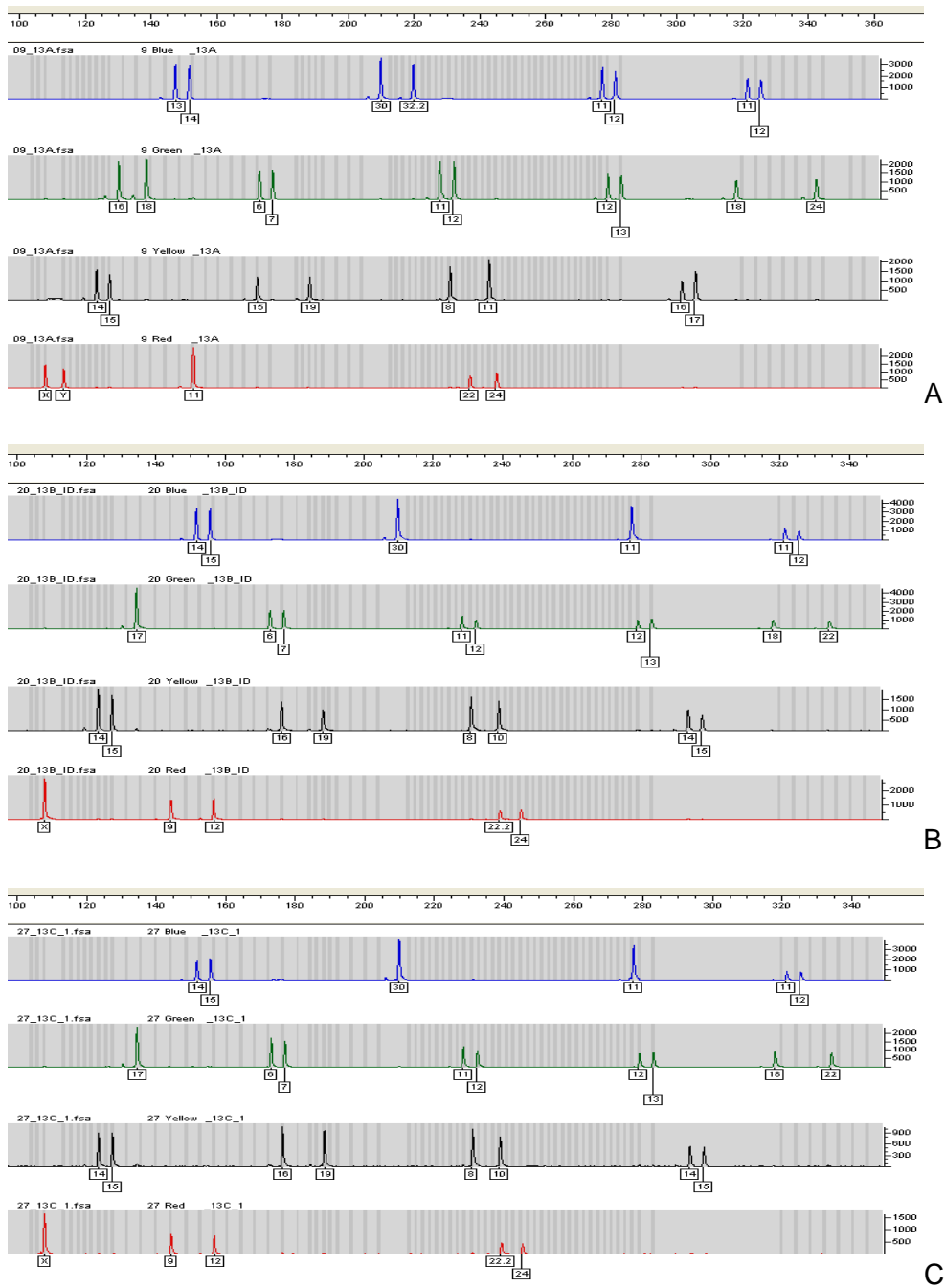
Rycina 4.29.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 12, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



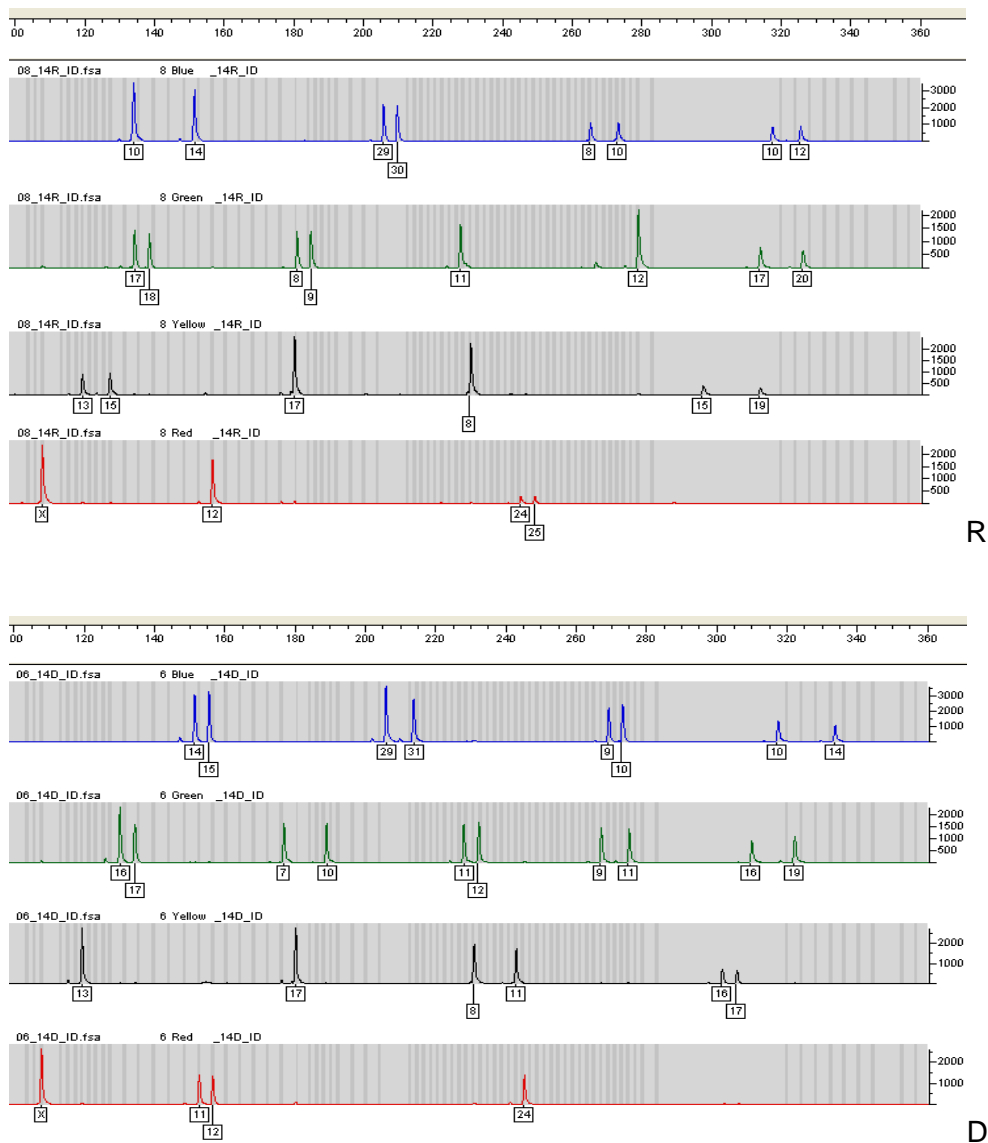
Rycina 4.29.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 12, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



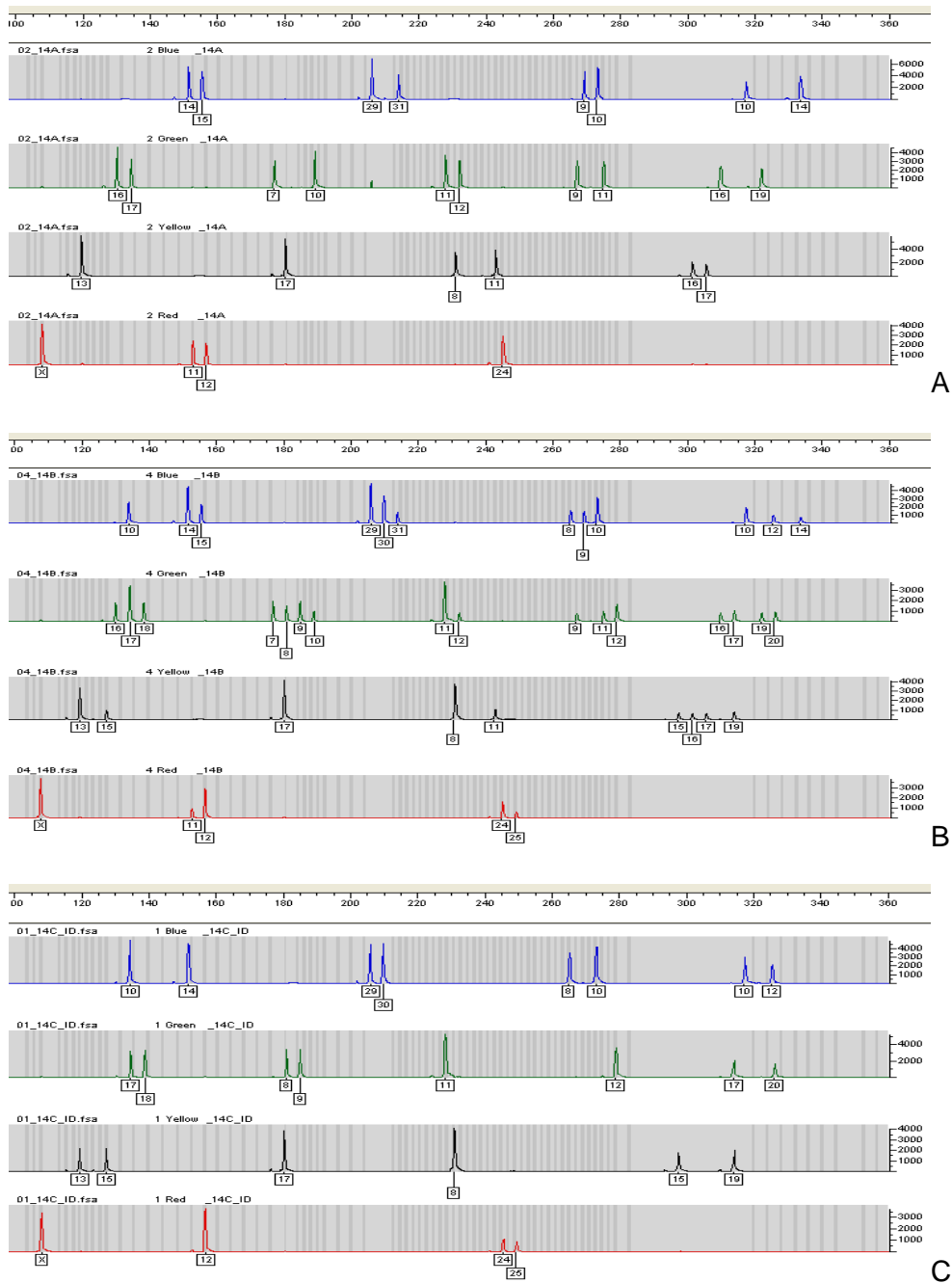
Rycina 4.30.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 13, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.30.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 13, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

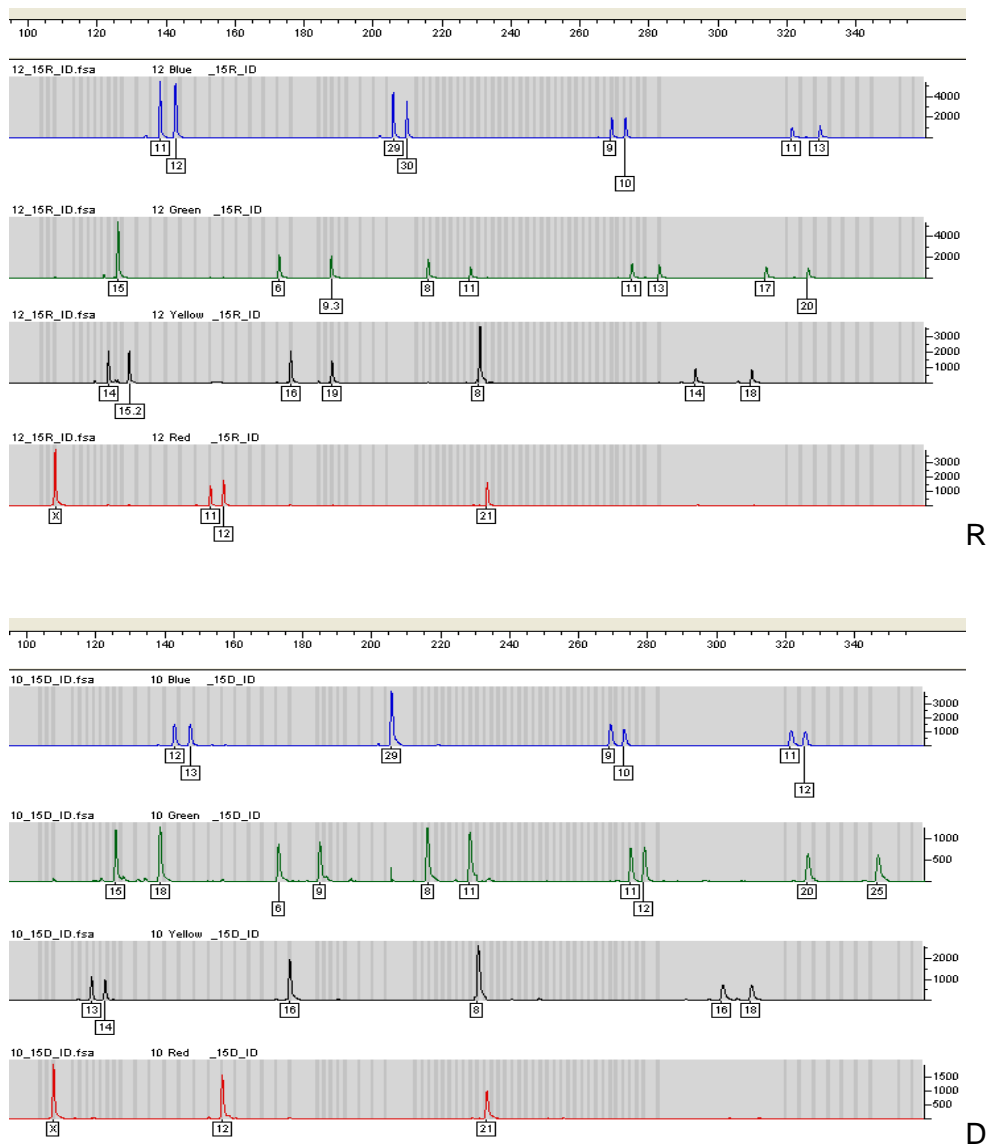


Rycina 4.31.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 14, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

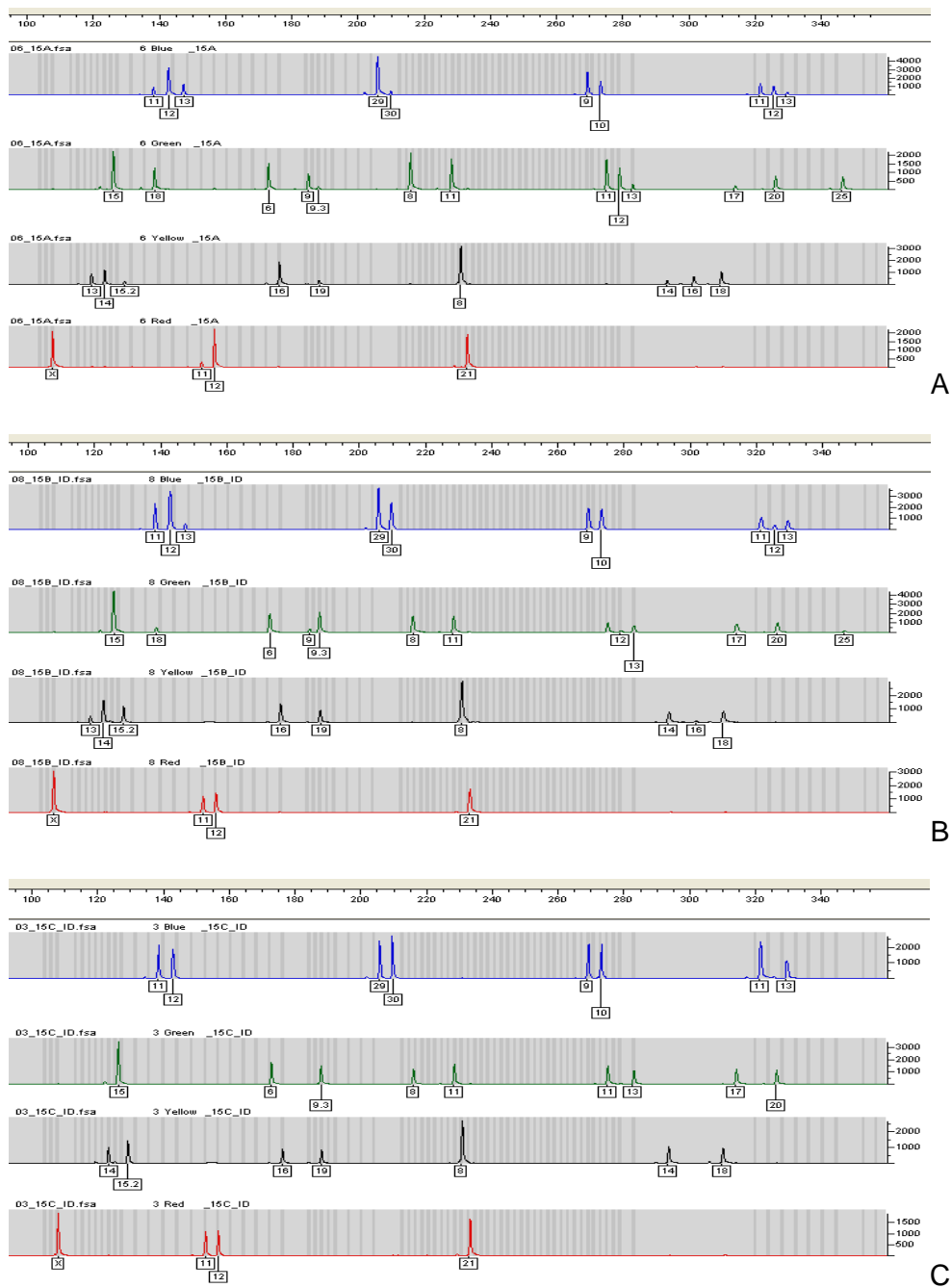


Rycina 4.31.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 14, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

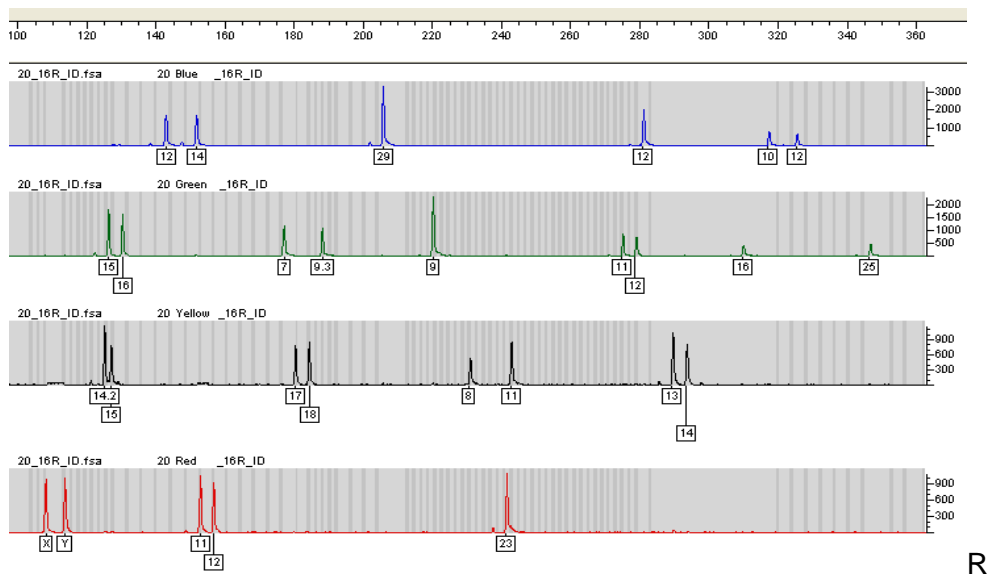




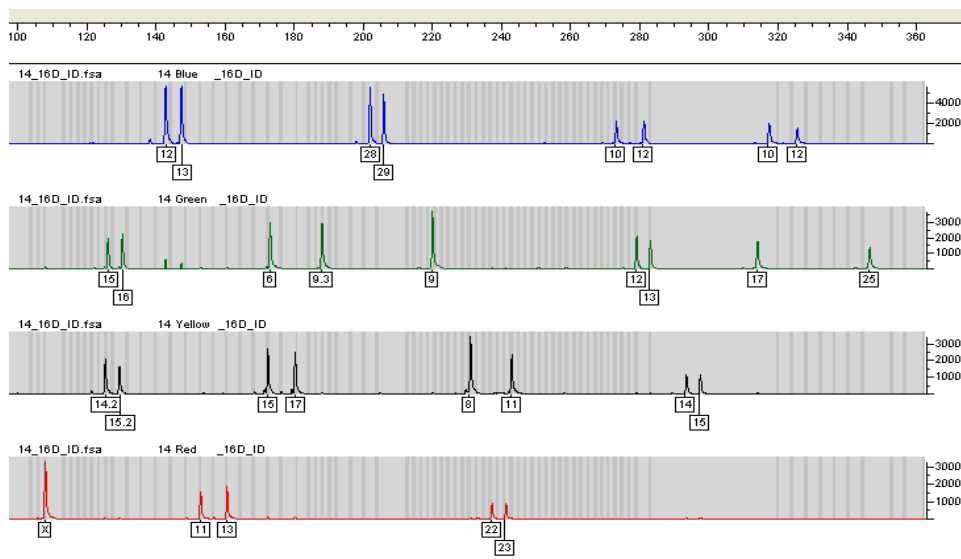
Rycina 4.32.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 15, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.32.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 15, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

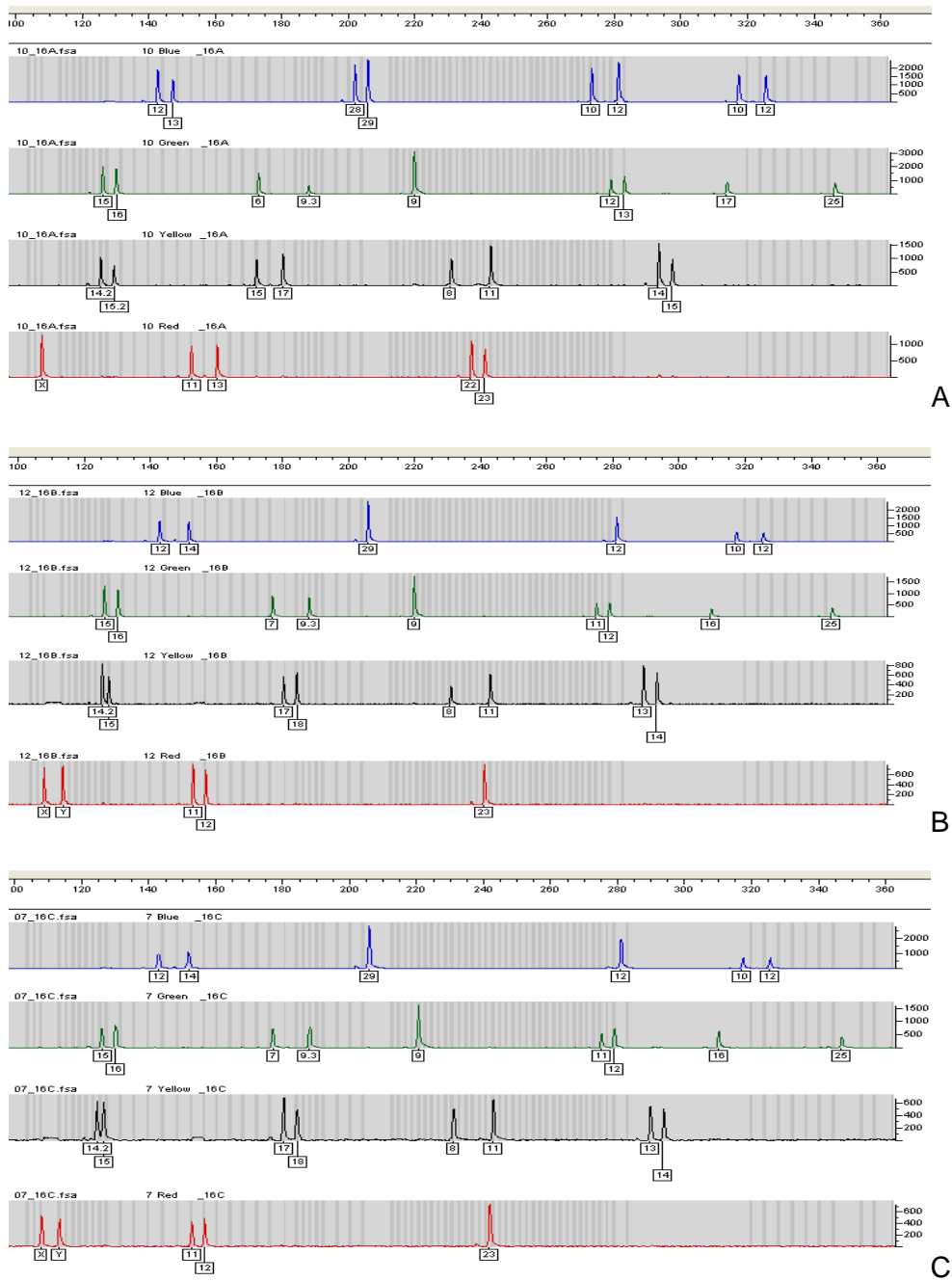


R

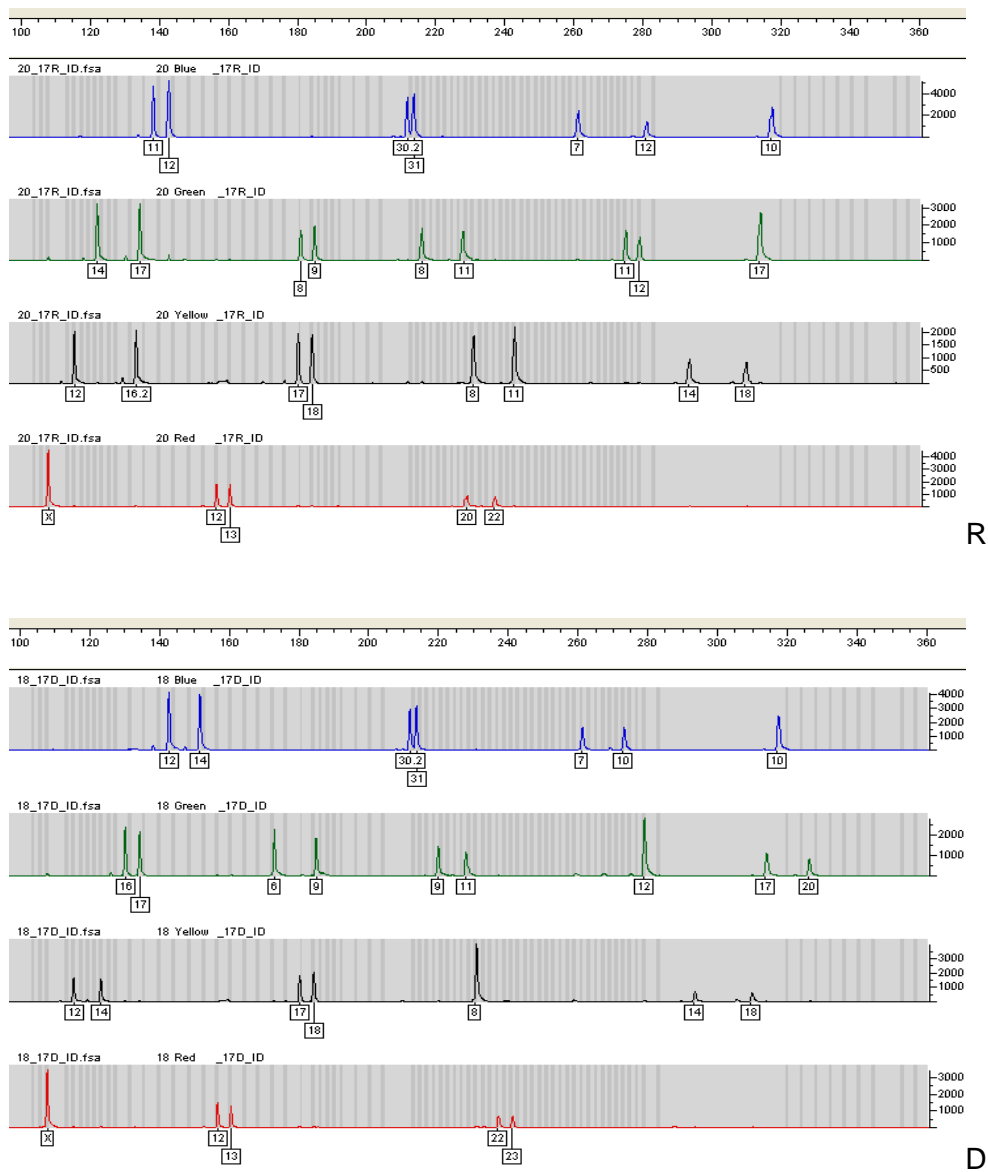


D

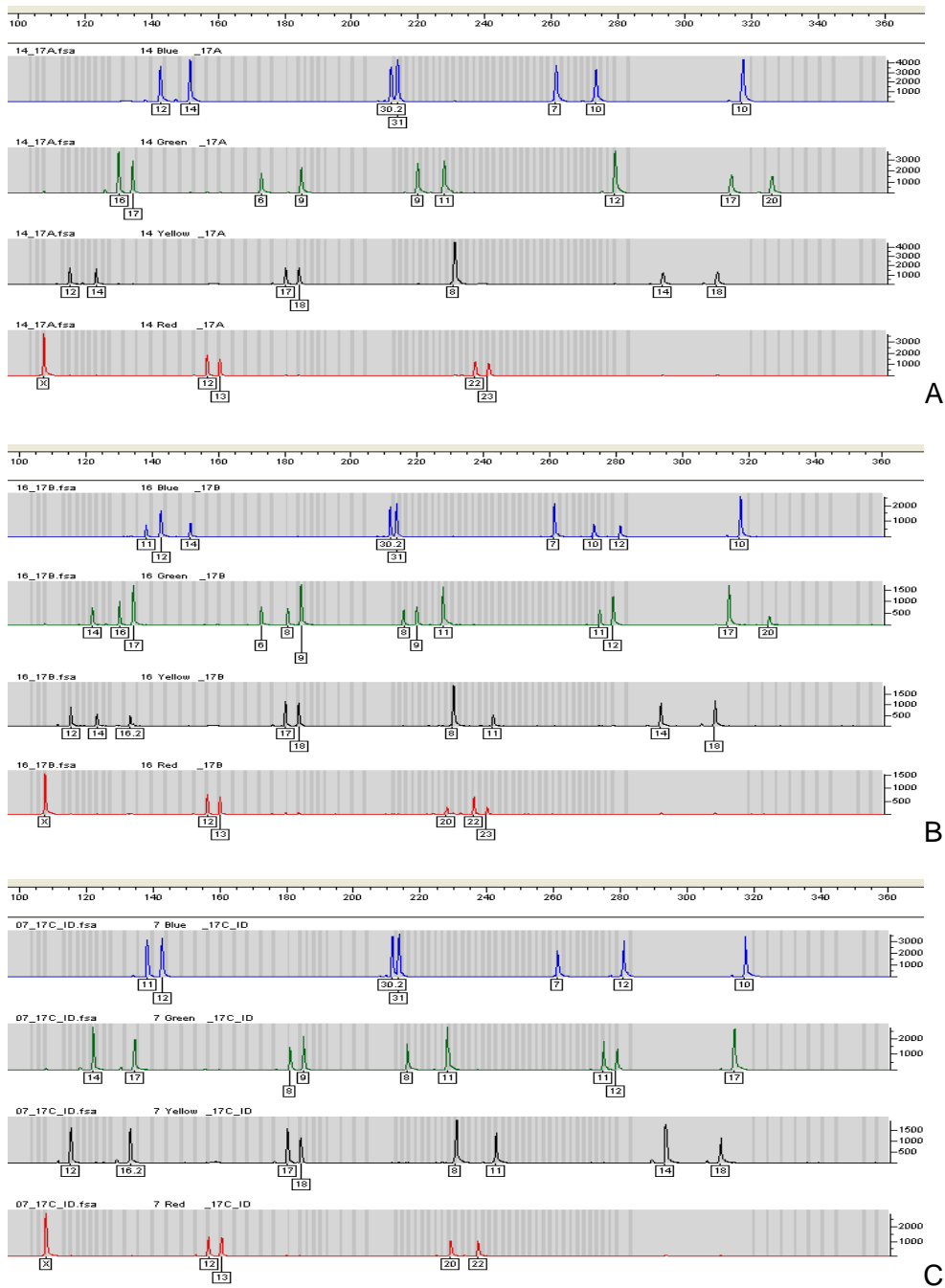
Rycina 4.33.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 16, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



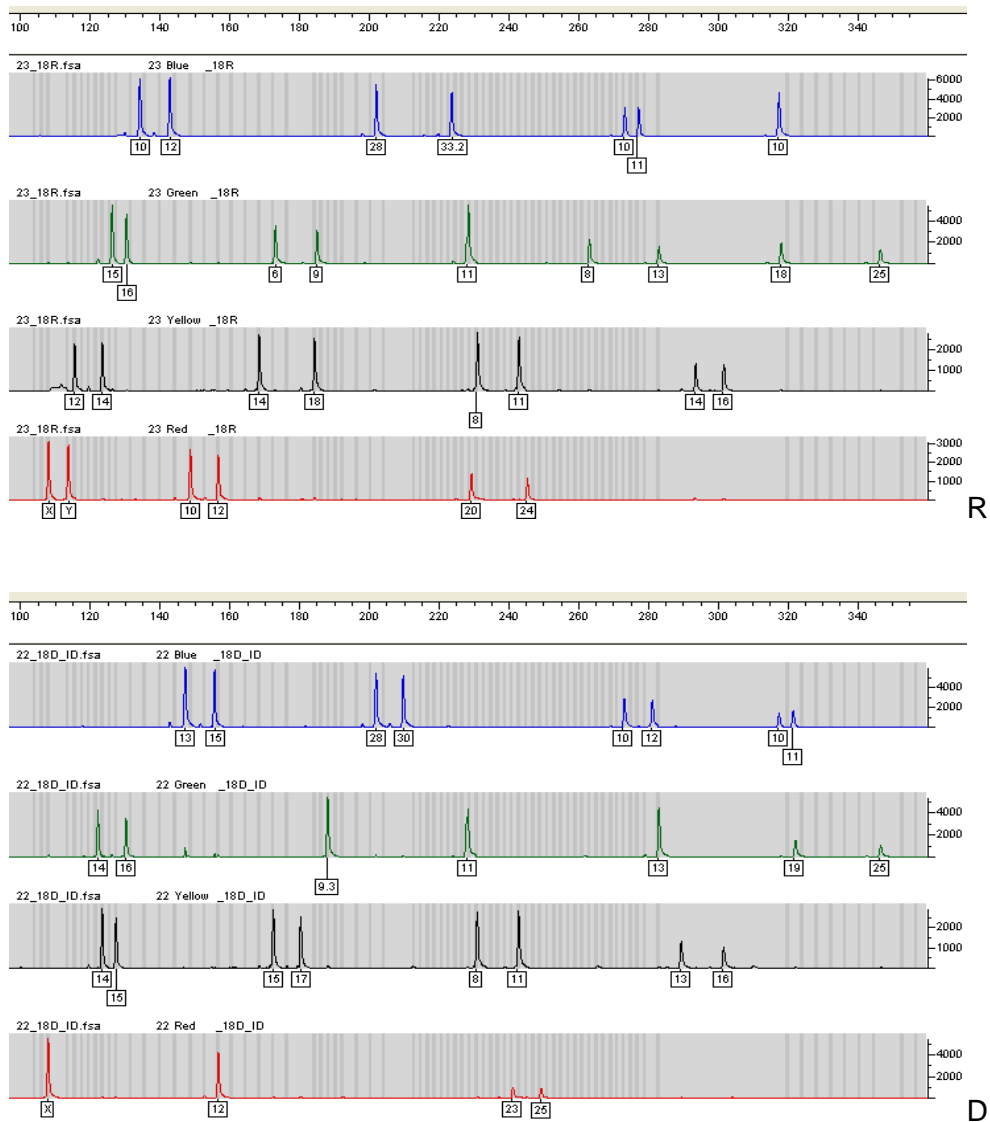
Rycina 4.33.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 16, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



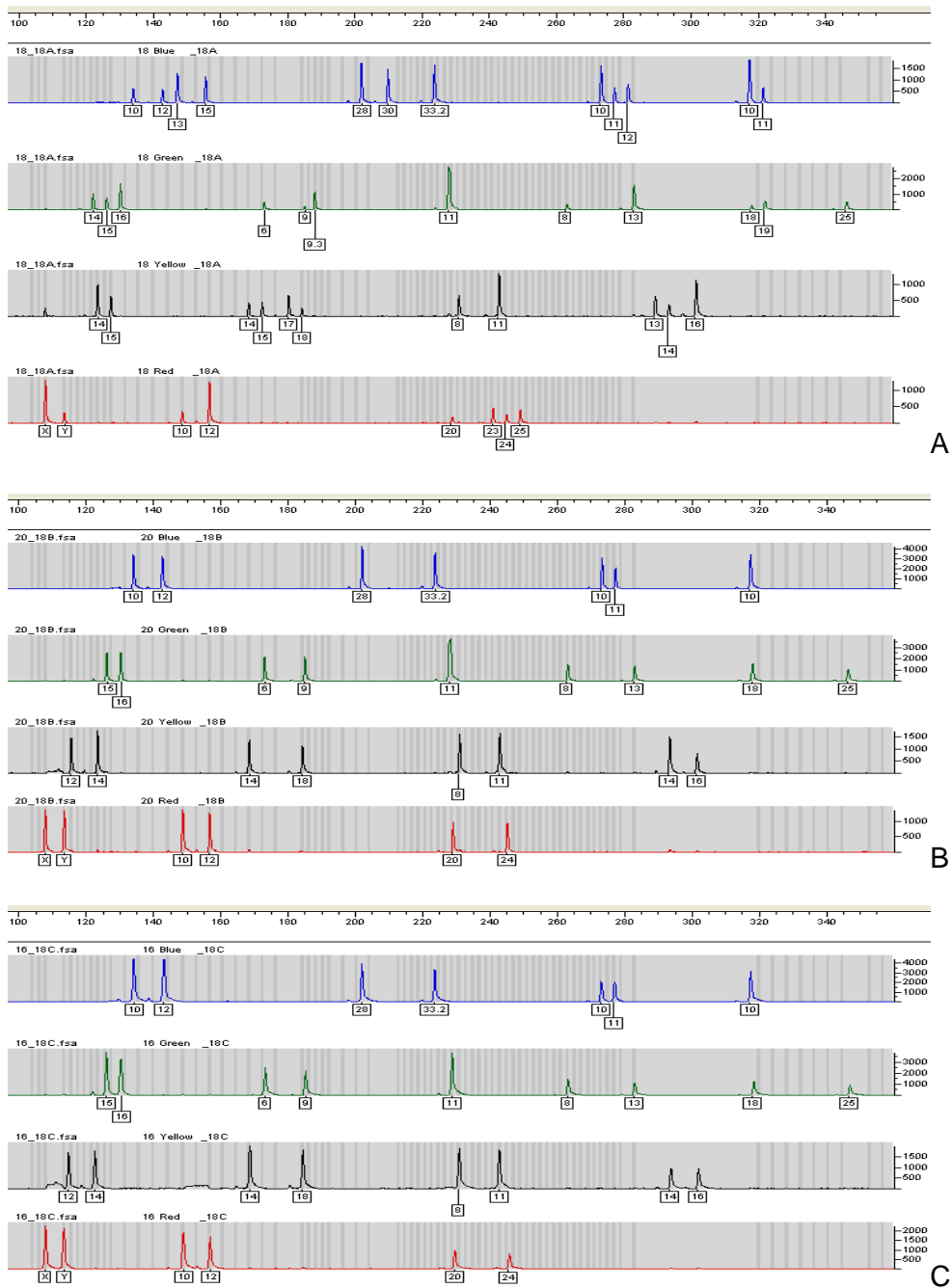
Rycina 4.34.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 17, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.34.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 17, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

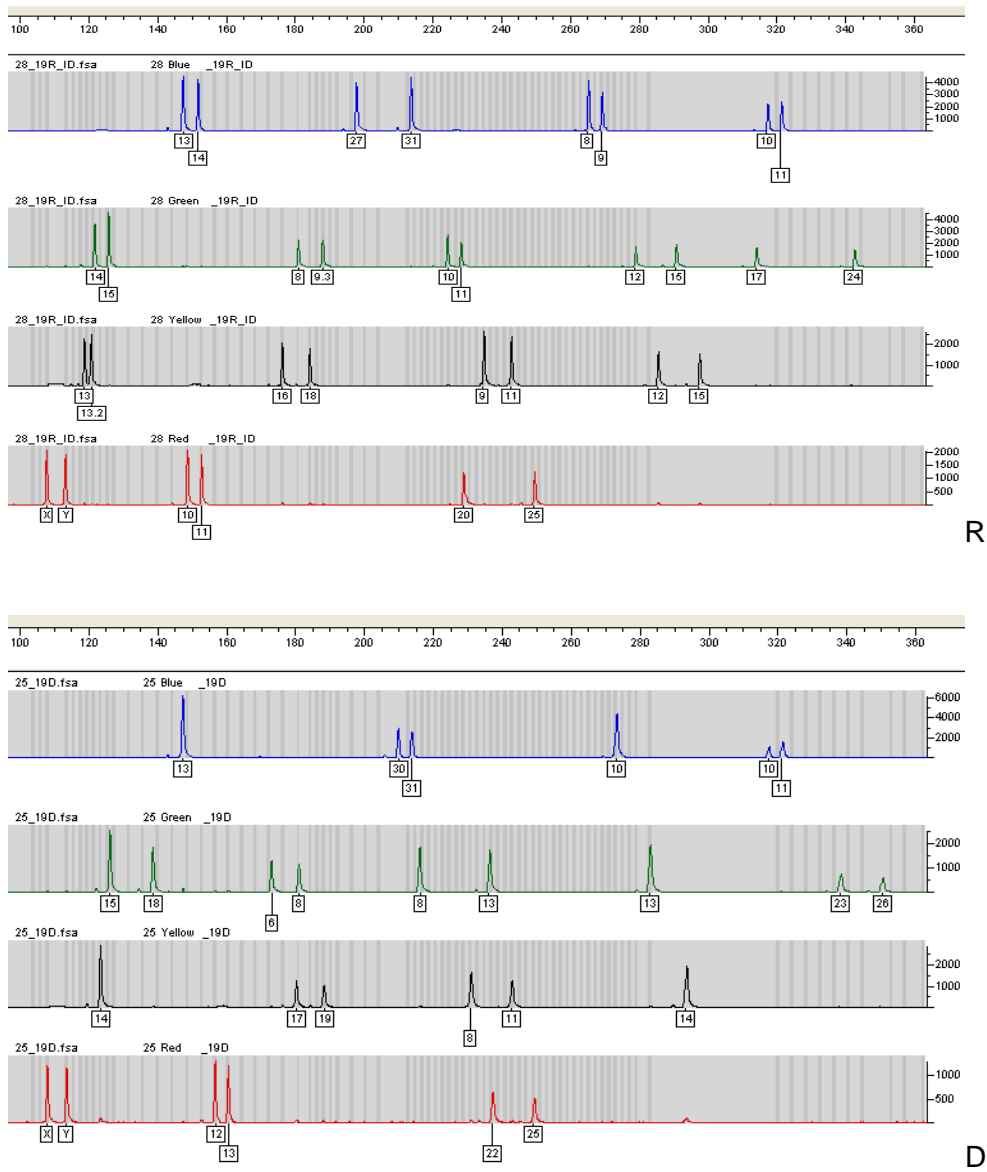


Rycina 4.35.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 18, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

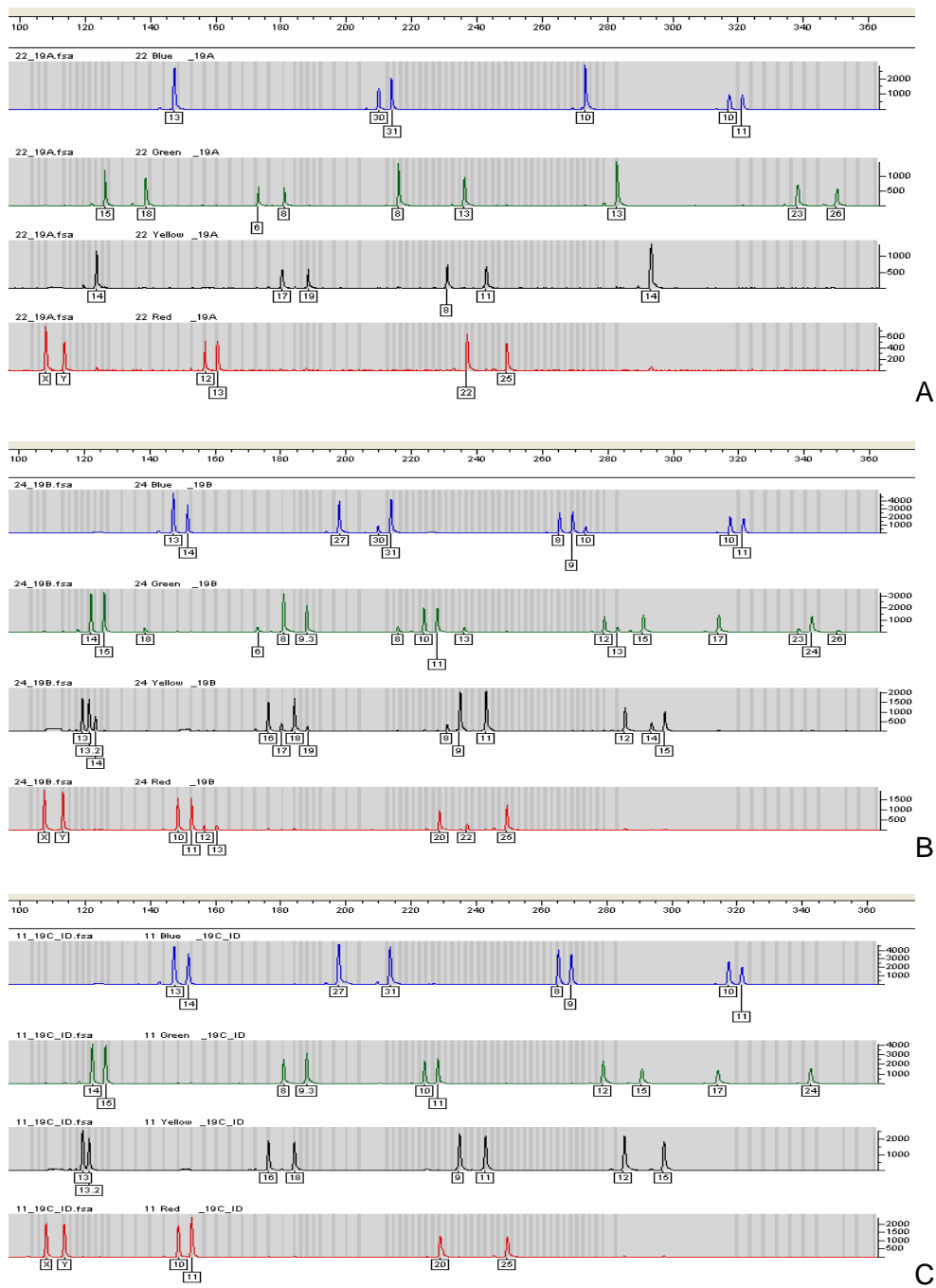


Rycina 4.35.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 18, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

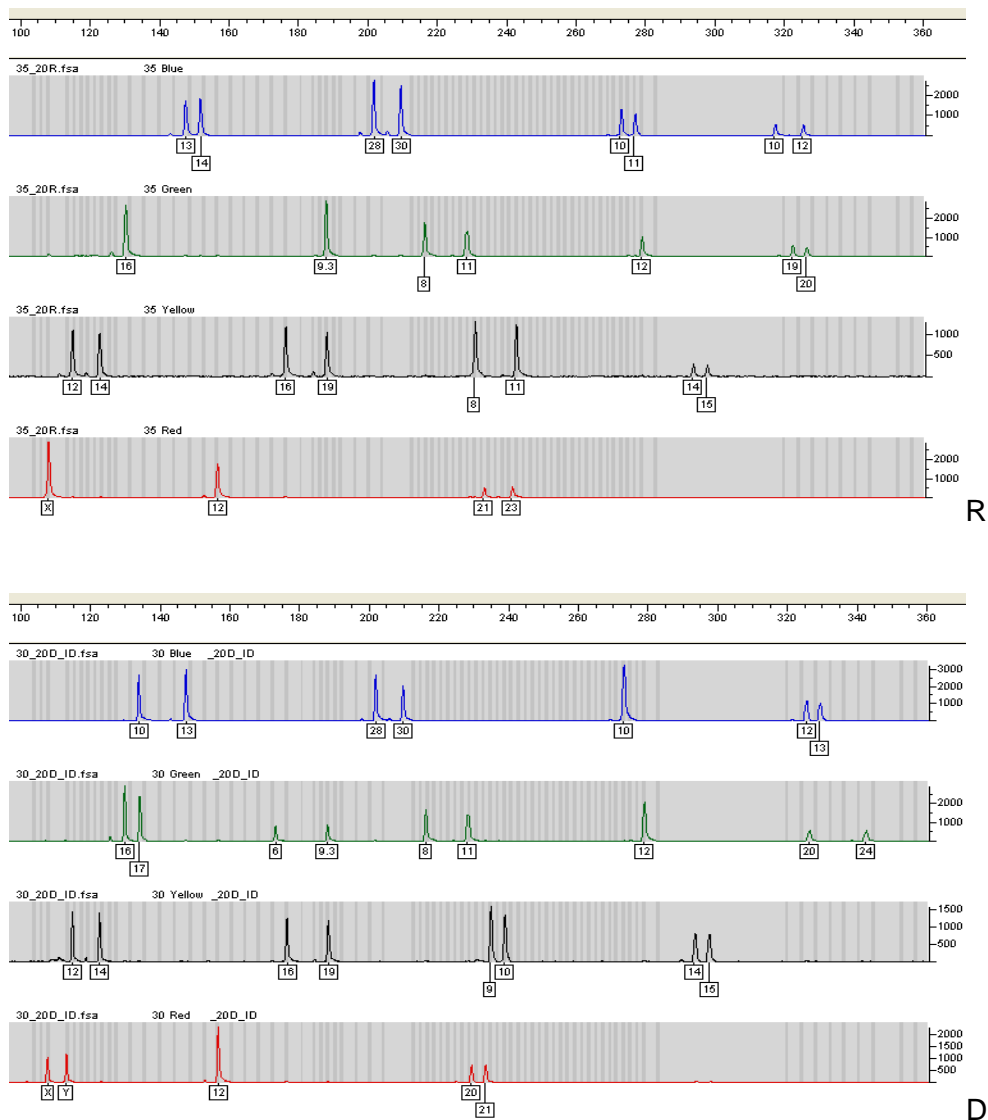




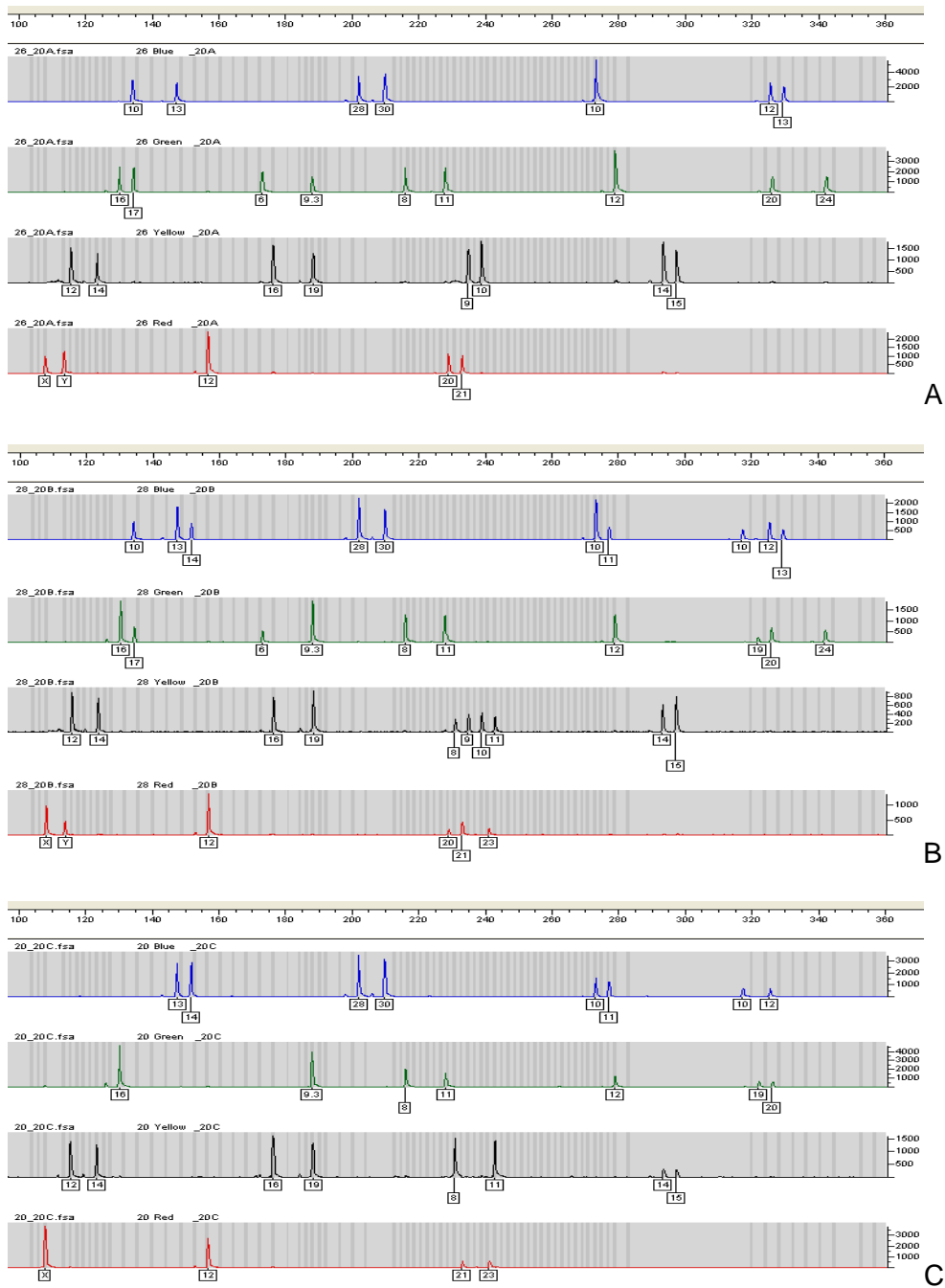
Rycina 4.36.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 19, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



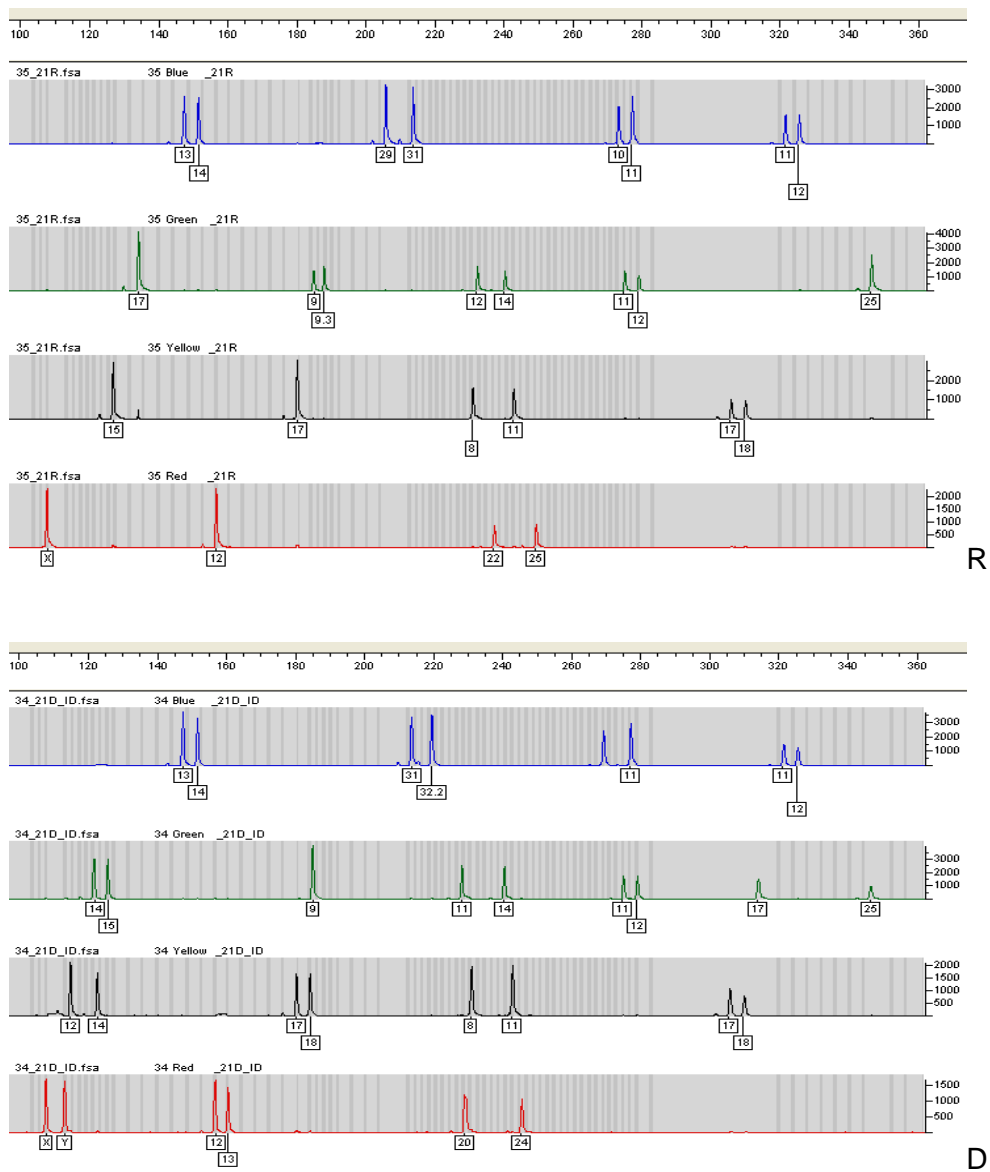
Rycina 4.36.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 19, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



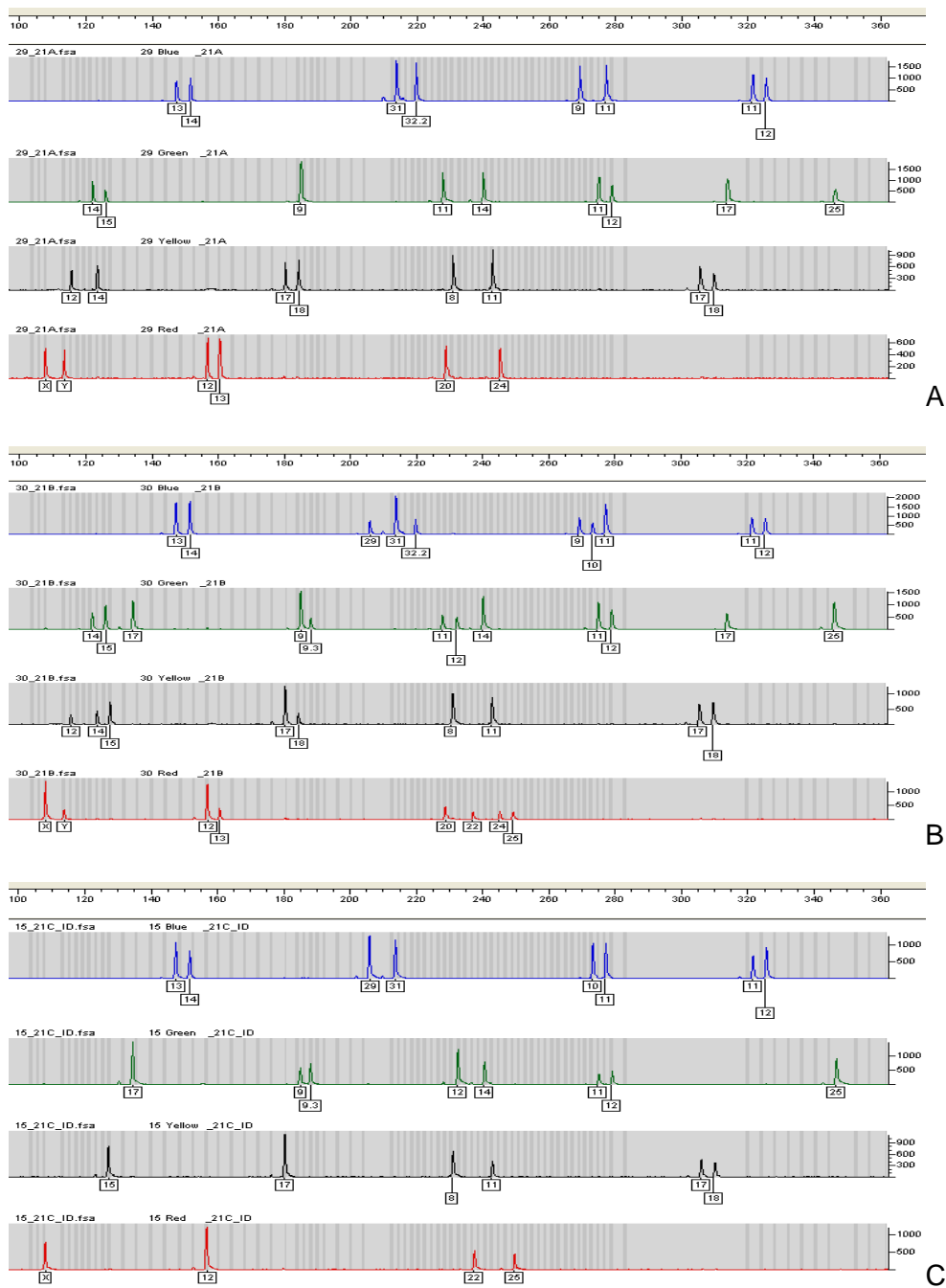
Rycina 4.37.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 20, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.37.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 20, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



Rycina 4.38.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi biorcy i dawcy nr 21, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.38.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów autosomalnego DNA w materiałach biocy nr 21, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

Tabela 4.3. Wyniki analizy polimorfizmu w zakresie markerów STR autosomalnego DNA wraz z oceną stopnia chimeryzmu donorowego w materiałach biorców po allo-HSCT.

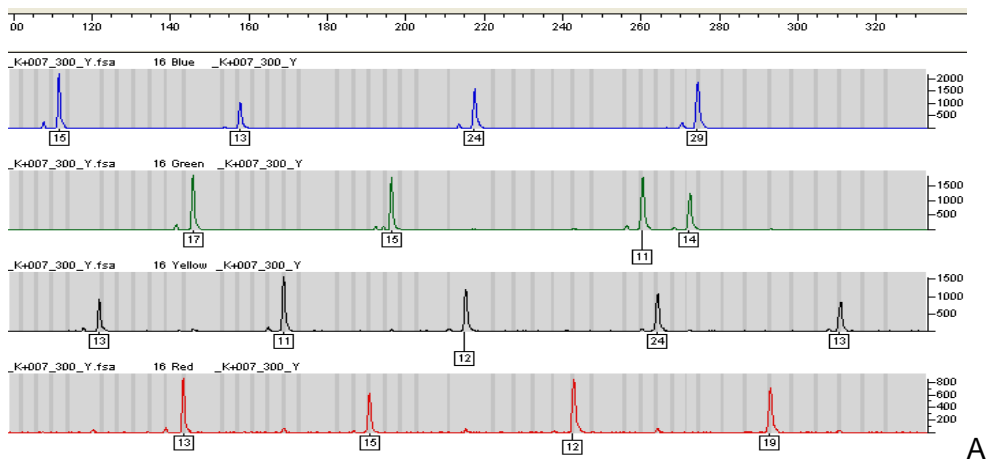
<i>Pacjent</i>	<i>Płeć</i>	<i>Dawca</i>	<i>Dni po przeszczepie</i>	<i>Chimeryzm dawcy % (KREW BIORCY)</i>	<i>Chimeryzm dawcy % (WYMAZ BIORCY)</i>	<i>Chimeryzm dawcy % (WŁOS BIORCY)</i>
1	M	K	508	100	18	0
2	M	M	574	100	57	0
3	K	M	329	100	22	0
4	K	K	679	100	24	0
5	K	K	450	100	38	0
6	K	M	218	100	45	0
7	K	K	345	100	11	0
8	M	M	104	100	29	0
9	M	M-NS	126	100	0	0
10	M	K-NS	209	100	0	0
11	K	M	516	100	67	0
12	M	K-NS	1145	100	32	0
13	K	M	103	100	0	0
14	K	K-NS	809	100	45	0
15	K	K	816	75	18	0
16	M	K	71	100	0	0
17	K	K	496	100	52	0
18	M	K-NS	82	63	0	0
19	M	M-NS	32	100	15	0
20	K	M	607	100	53	0
21	K	M	603	100	54	0

**M** – mężczyzna, **K** – kobieta, **NS** – niespokrewniony

#### 4.4.2. Analiza markerów chromosomu Y

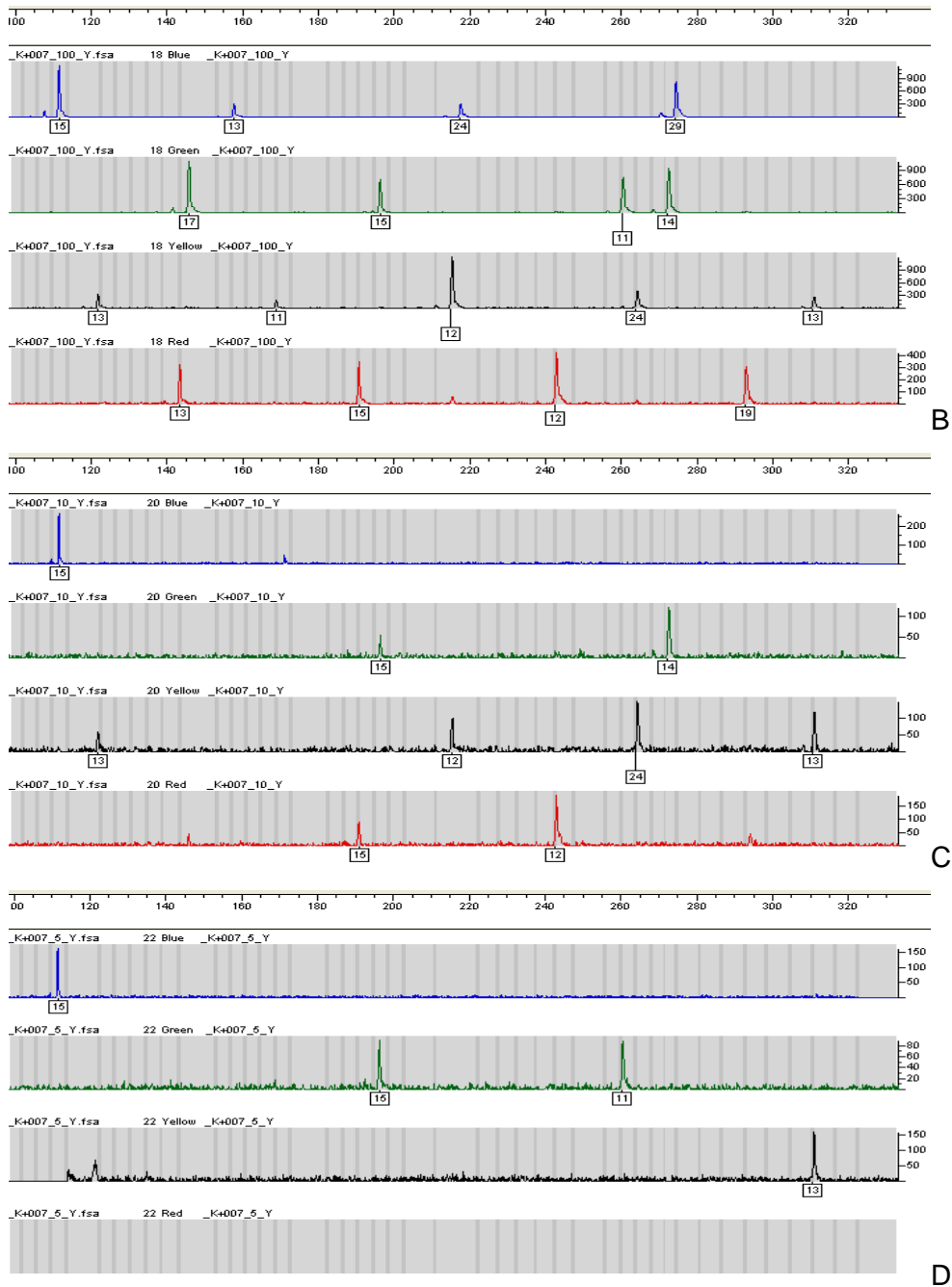
Na rycinach 4.39.1 i 4.39.2 przedstawiono wyniki analizy kontrolnego DNA, pochodzącego z męskiej linii komórkowej, który amplifikowano z wykorzystaniem systemu AmpFłSTR® Yfiler™. Kontrolne DNA dodawano do reakcji PCR w ilości kolejno: 300, 100, 10, 5 pg.

Na rycinach 4.40.1-4.52.2 przedstawiono wyniki analizy polimorfizmu genetycznego w materiałach biorców po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy, przeprowadzone w oparciu o amplifikację markerów chromosomu Y. Badaniem objęto 11 biorców, którzy otrzymali allo-HSCT od niezgodnych płciowo dawców, tj. 6 kobiet, dla których dawcą był mężczyzna (nr 3, 6, 11, 13, 20 i 21) oraz 5 mężczyzn, dla których dawcą była kobieta (nr 1, 10, 12, 16, 18). Dodatkowo analizie poddano dwóch mężczyzn-biorców, którzy otrzymali przeszczep od innych niespokrewnionych mężczyzn (nr 9 i 19). Badano DNA wyizolowany z krwi, z wymazu komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej oraz z około 2 cm fragmentów włosów zawierających korzeń włosa i część łodygi włosa. Kontrolne DNA pochodziło z krwi dawców i biorców zabezpieczonej przed przeszczepem. Wyniki analizy polimorfizmu DNA w obrębie markerów Y-STR wraz z oceną stopnia chimeryzmu w badanych materiałach biorców po allo-HSCT zestawiono w tabeli 4.4, umieszczonej pod rycinami.

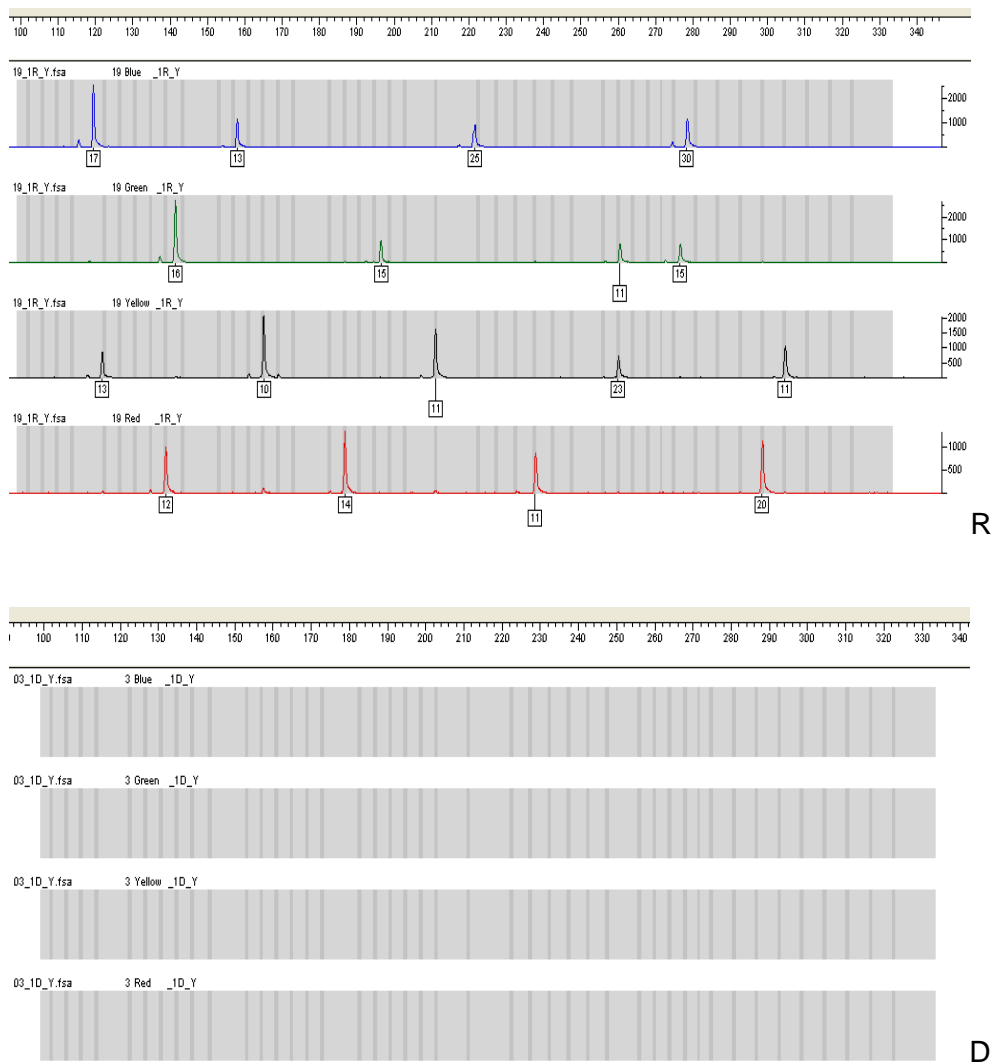


Rycina 4.39.1 Amplifikacja męskiej kontroli DNA 007 z wykorzystaniem systemu AmpFłSTR® Yfiler™. Widoczny profil uzyskany z wsadowej ilości matrycy DNA – 300 pg (A).

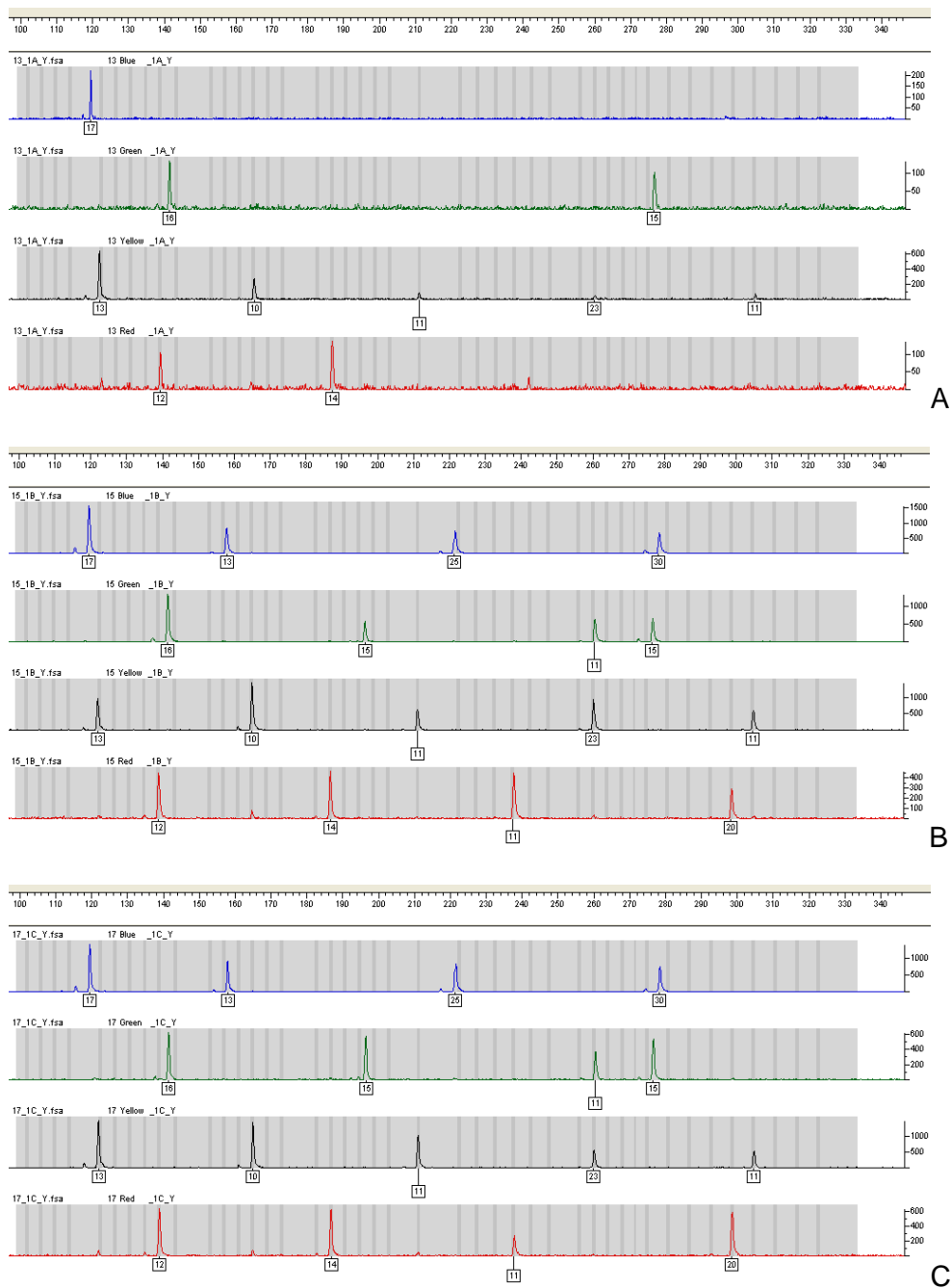




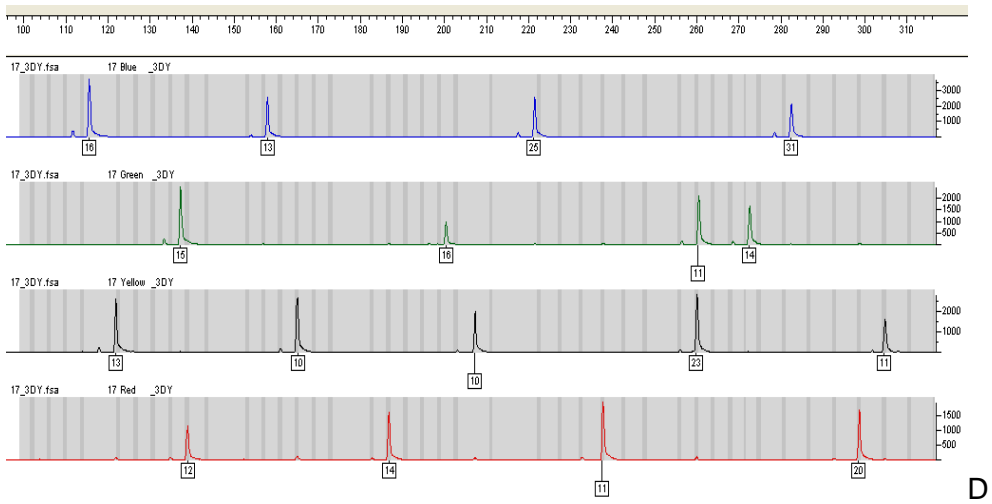
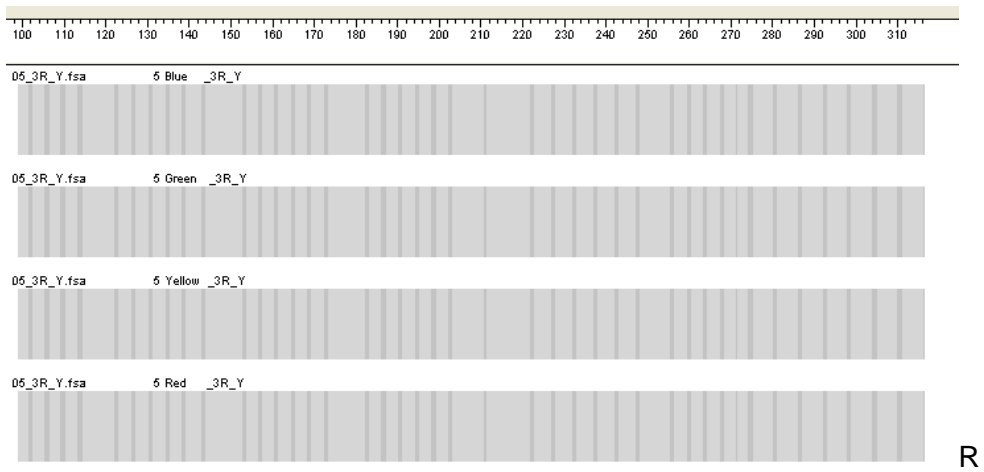
Rycina 4.39.2 Amplifikacja męskiej kontroli DNA 007 z wykorzystaniem systemu AmpF $\text{\u00f5}$ STR $\text{\u00ae}$ Yfiler $\text{\u2122}$ . Począwszy od g\u00f3ry widoczne profile uzyskane z wsadowej ilo\u015bci matrycy DNA: 100 pg (B), 10 pg (C), 5 pg (D).



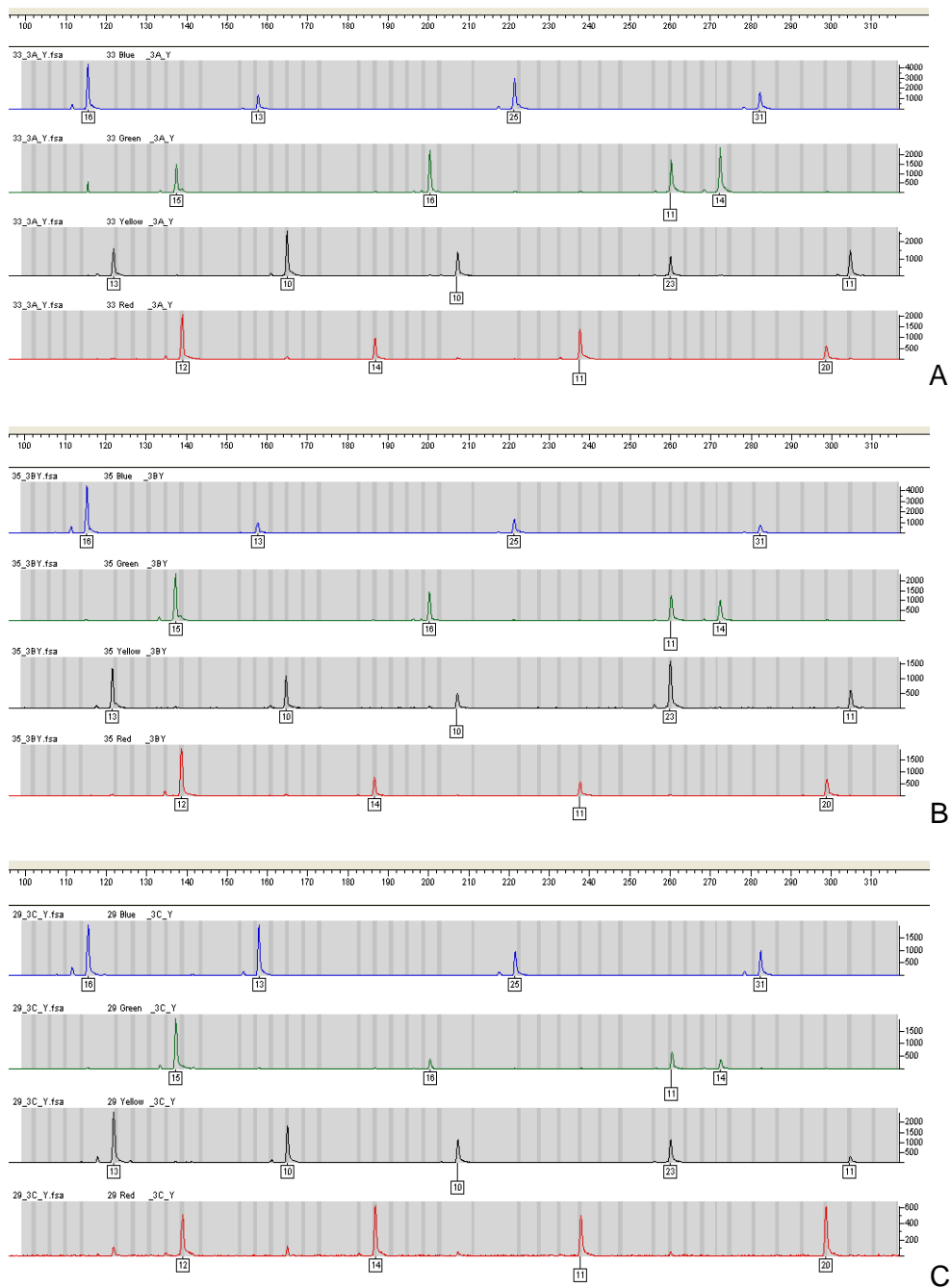
Rycina 4.40.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 1, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



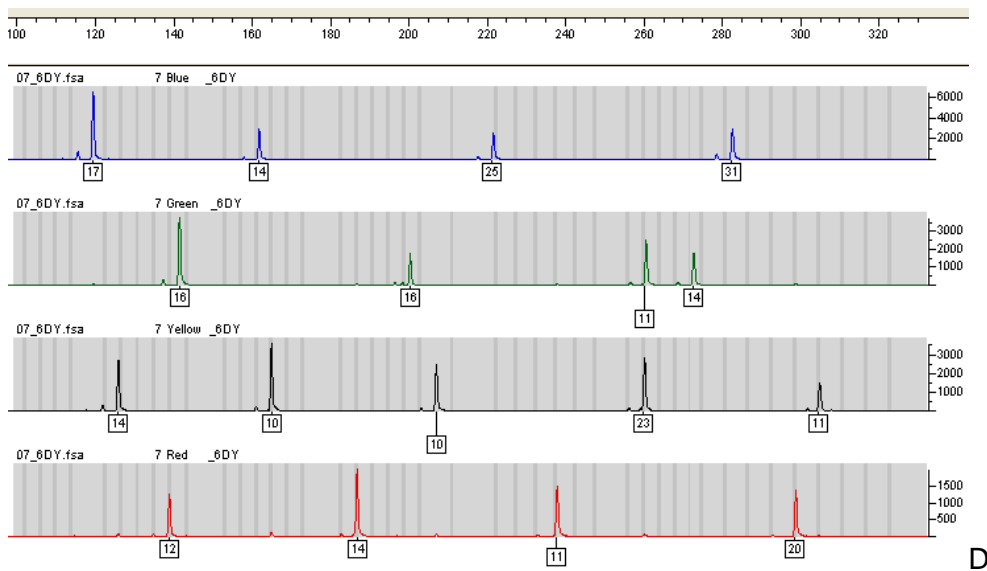
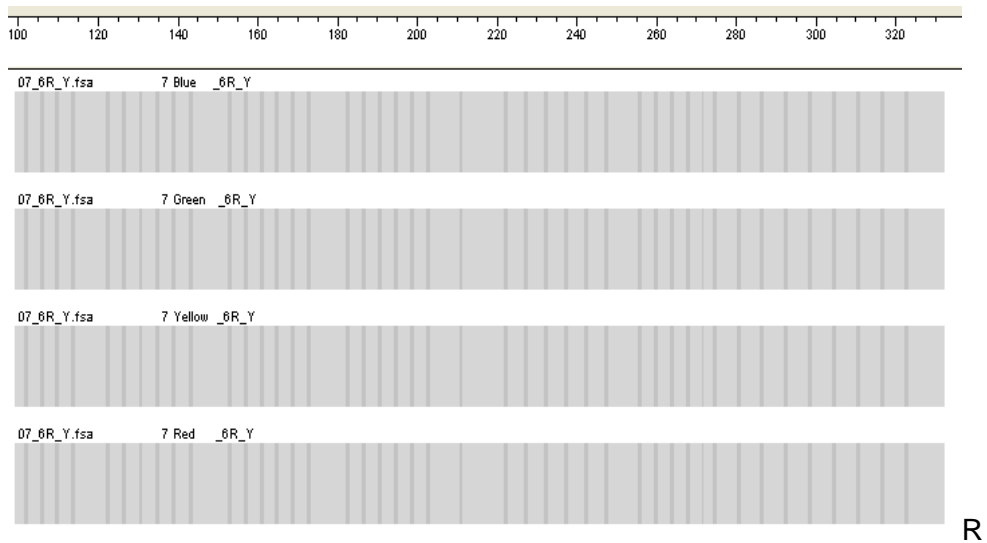
Rycina 4.40.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 1, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



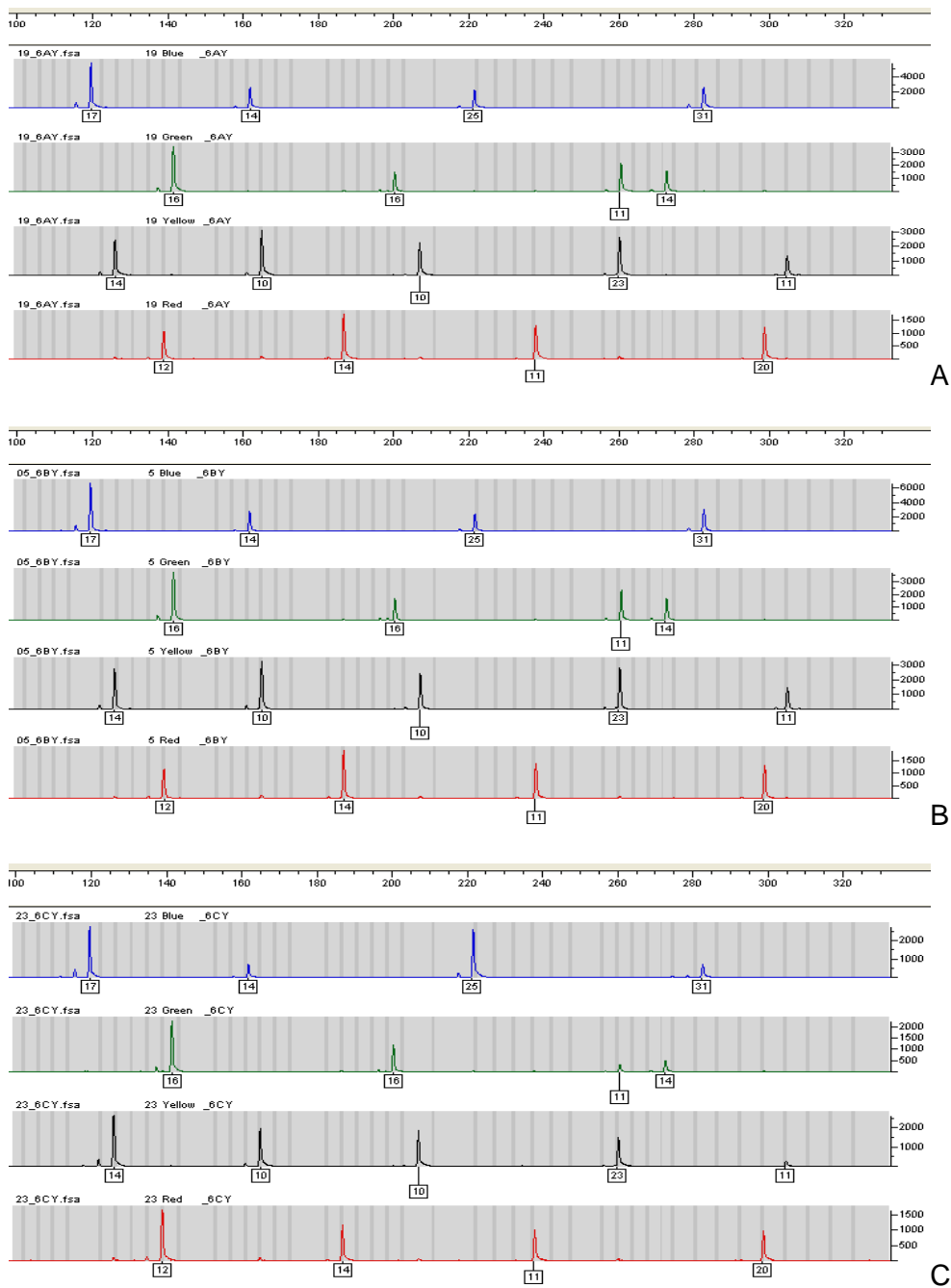
Rycina 4.41.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 3, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



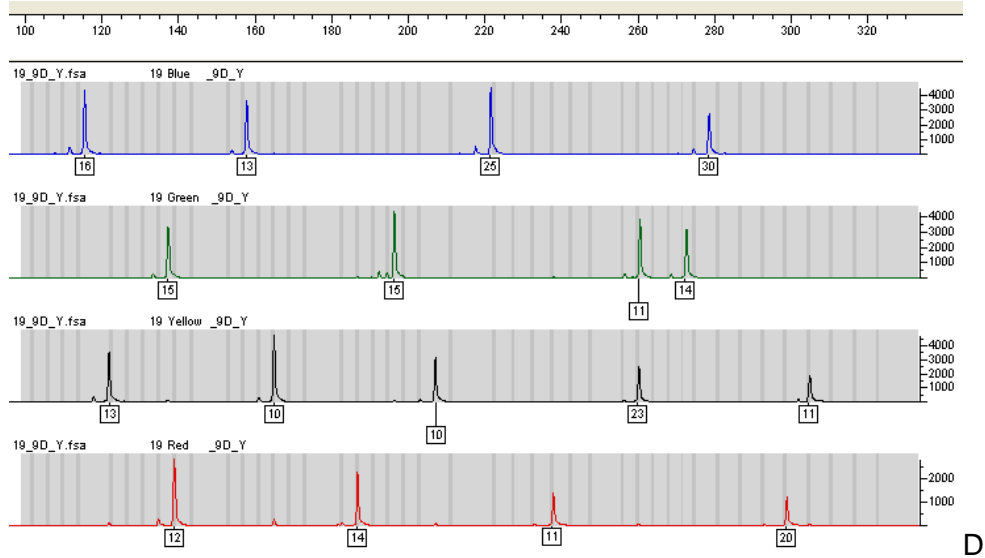
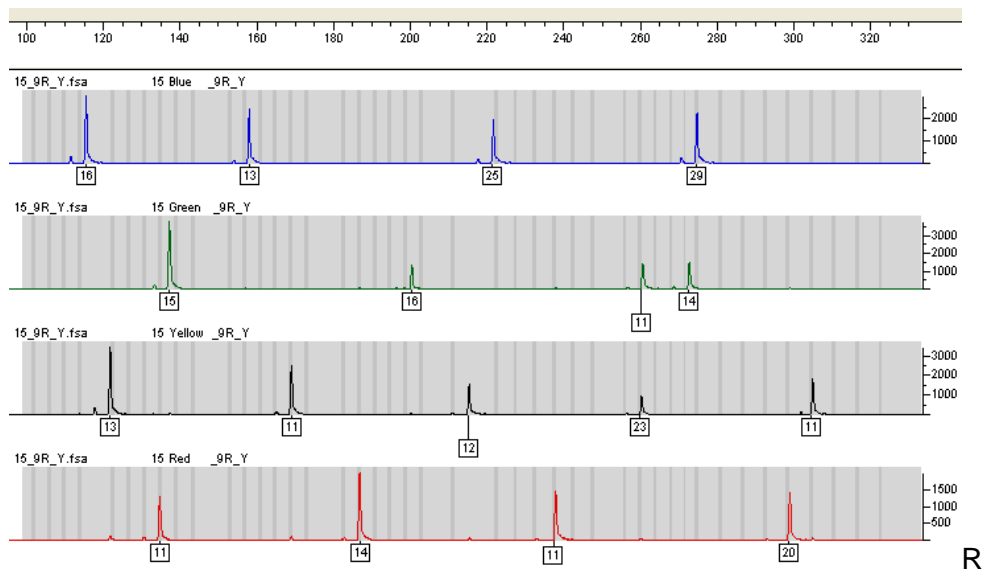
Rycina 4.41.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 3, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



Rycina 4.42.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 6, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

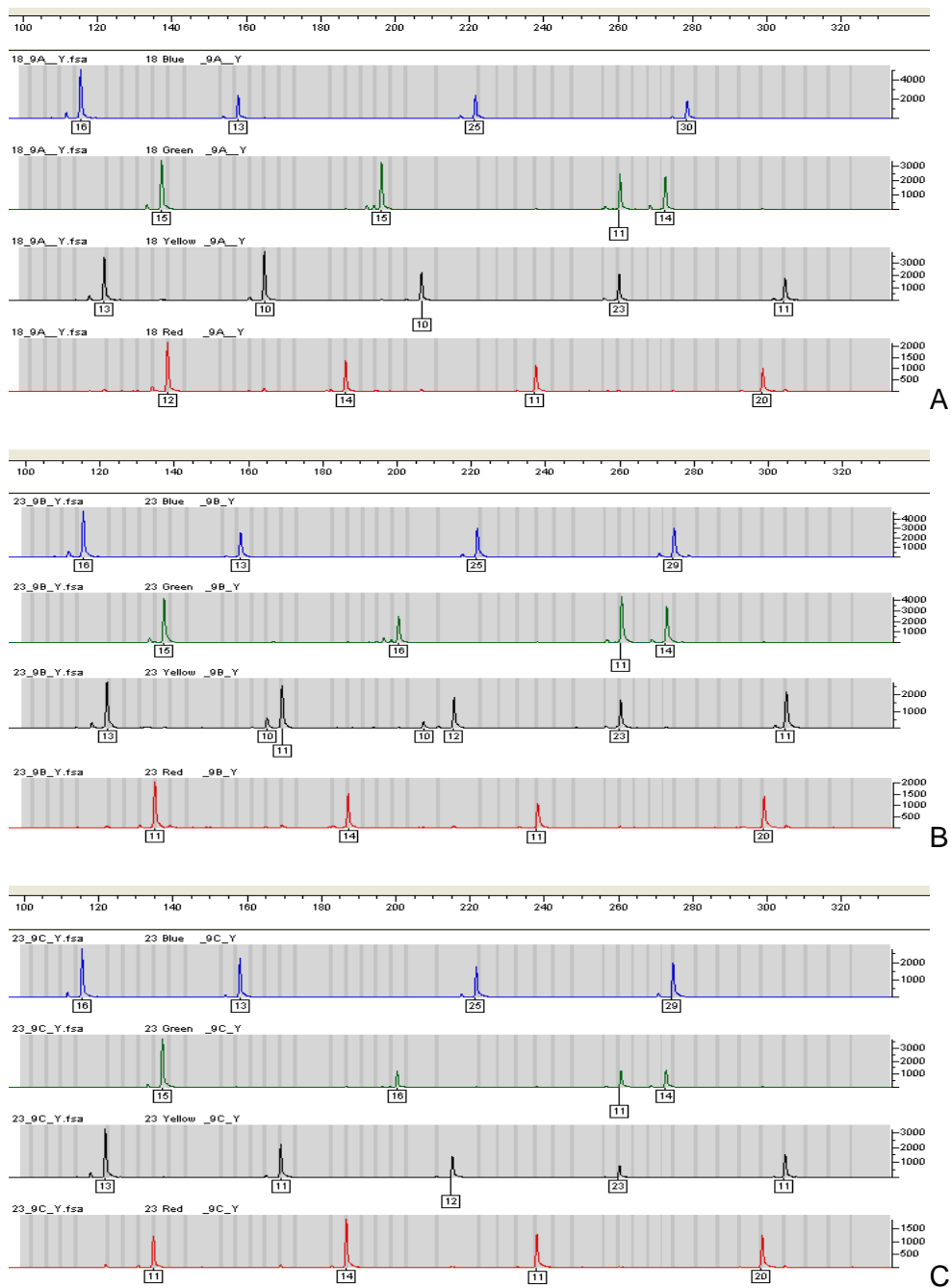


Rycina 4.42.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 6, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

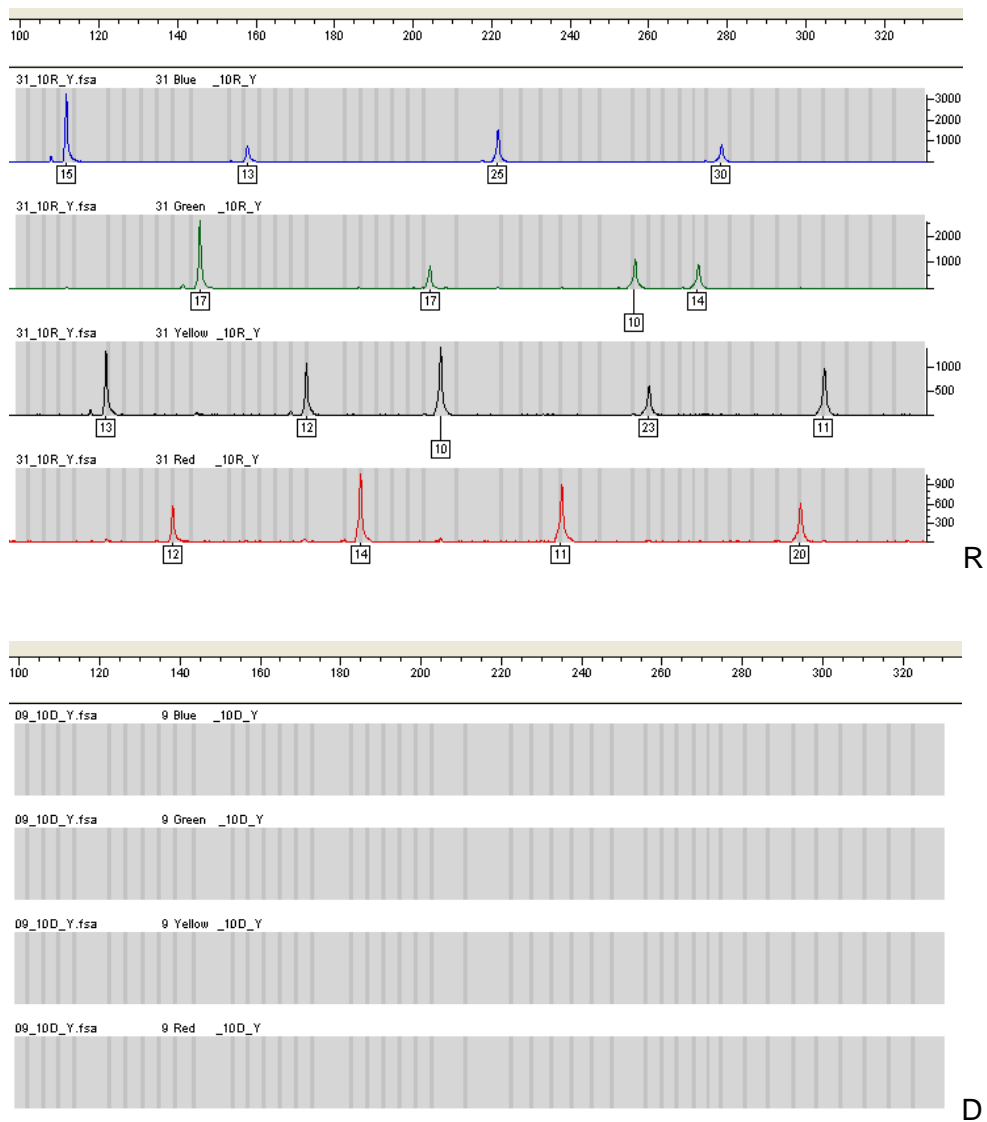


Rycina 4.43.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 9, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

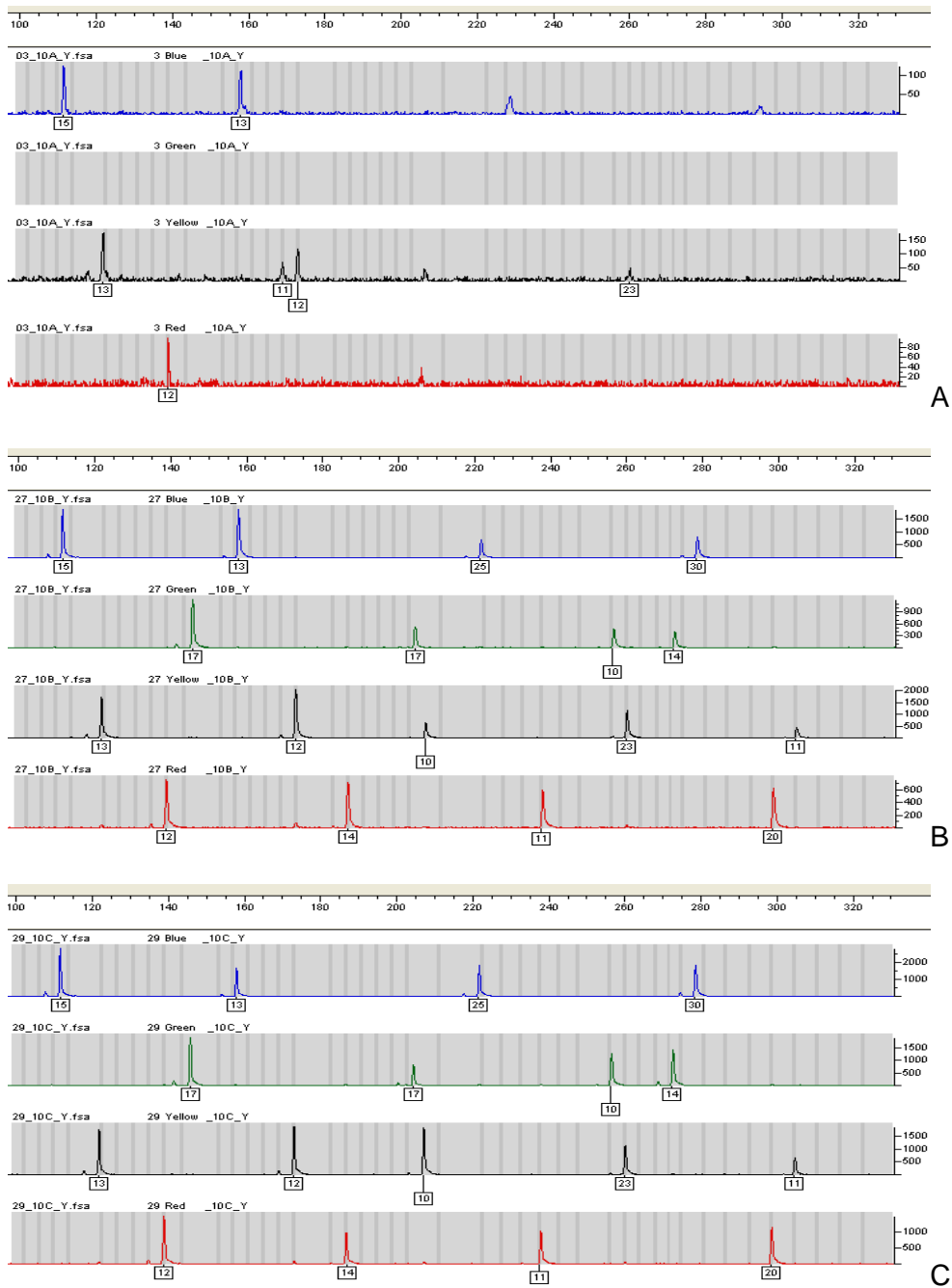




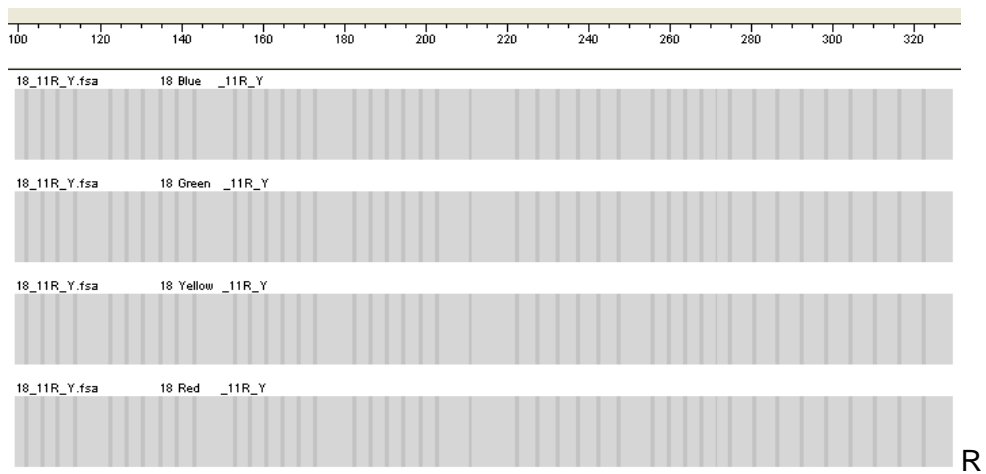
Rycina 4.43.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocyj nr 9, pobranych po przeszczepie. A-krew biocyj, B-wymaz biocyj, C-włos biocyj.



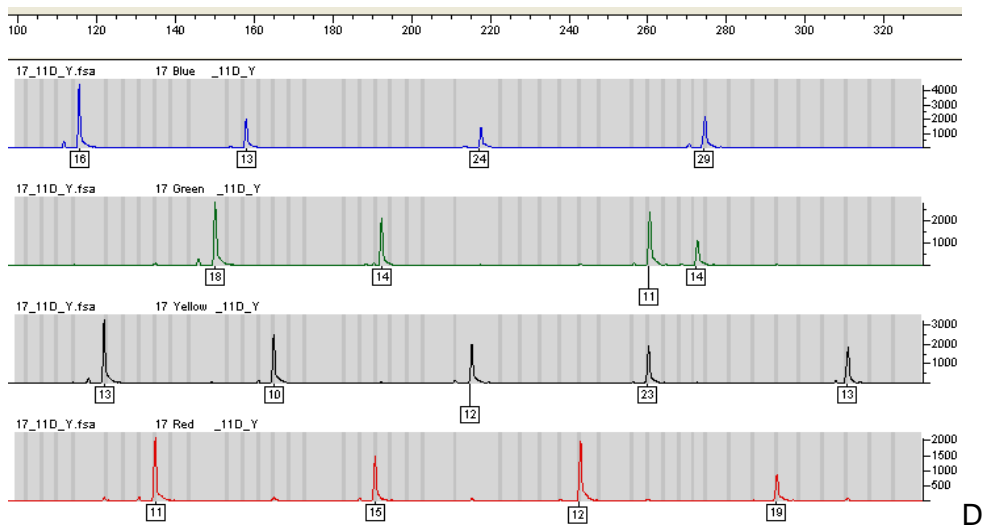
Rycina 4.44.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 10, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.44.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 10, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

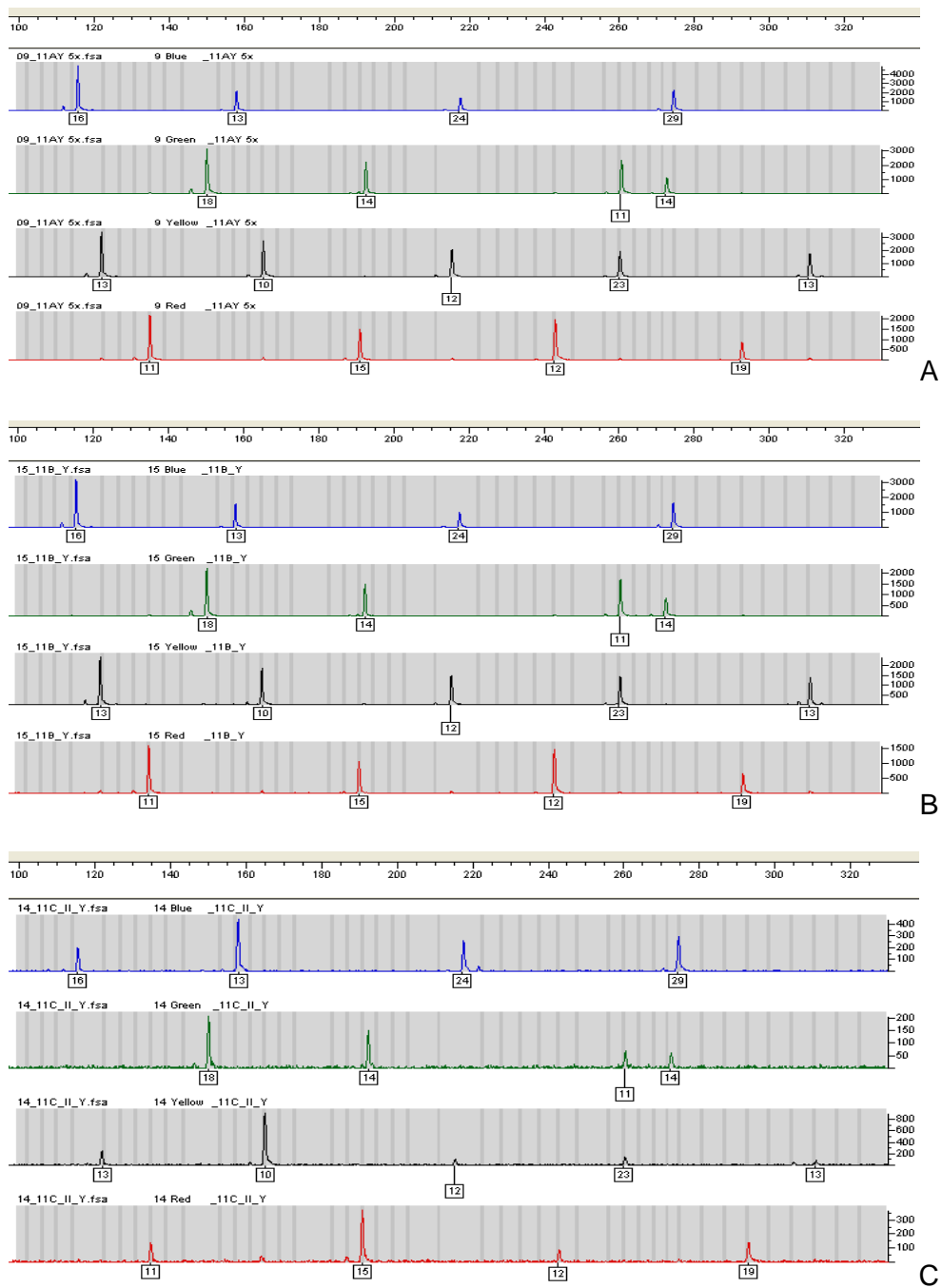


R

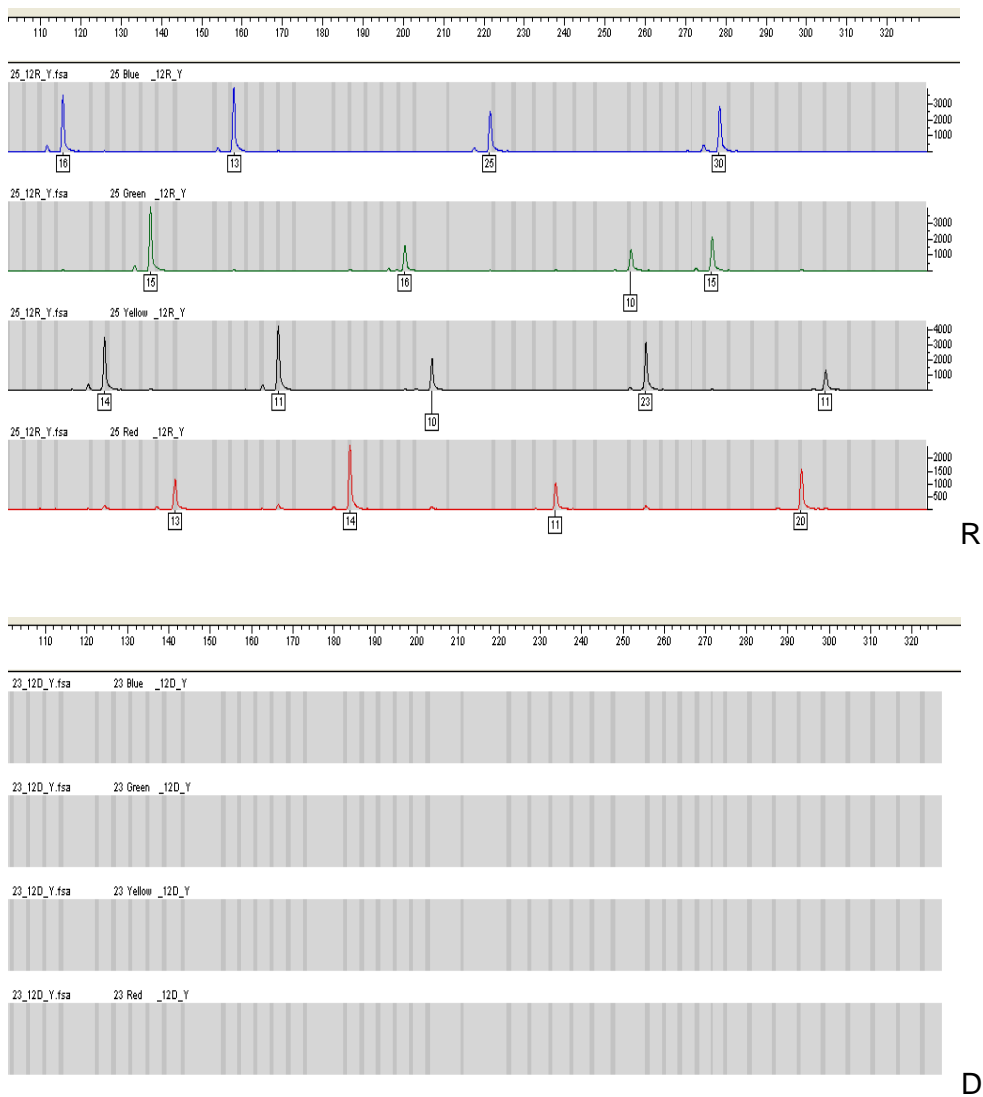


D

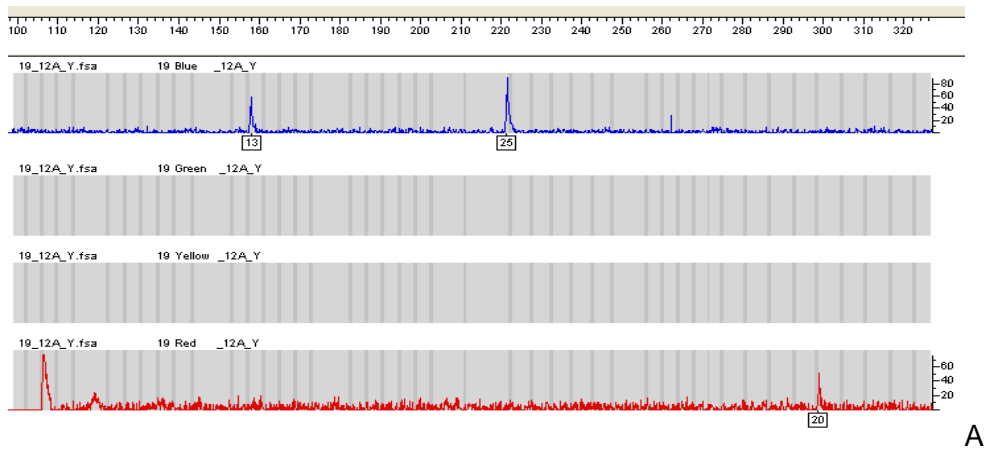
Rycina 4.45.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 11, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



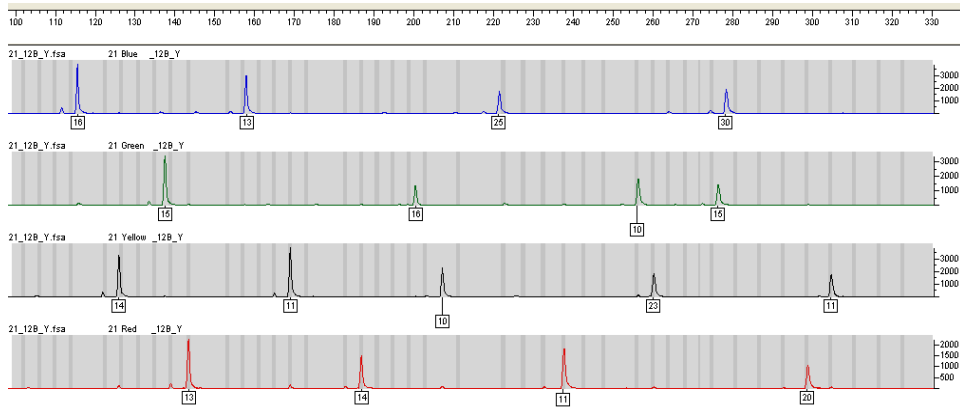
Rycina 4.45.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 11, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



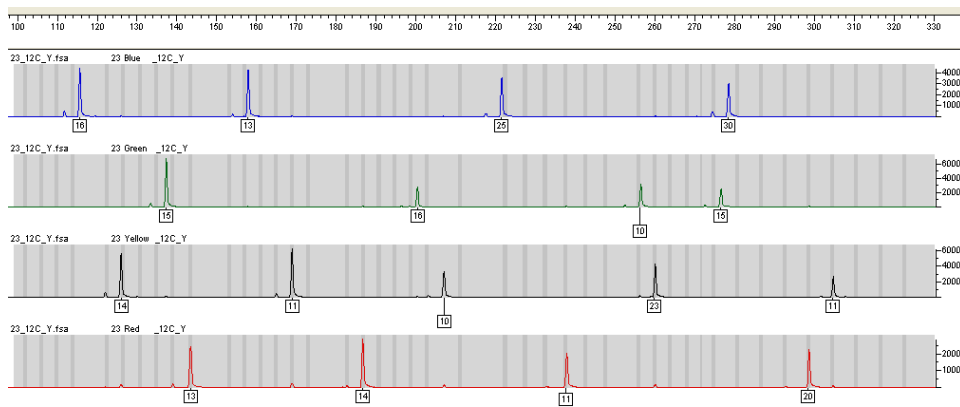
Rycina 4.46.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 12, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



A

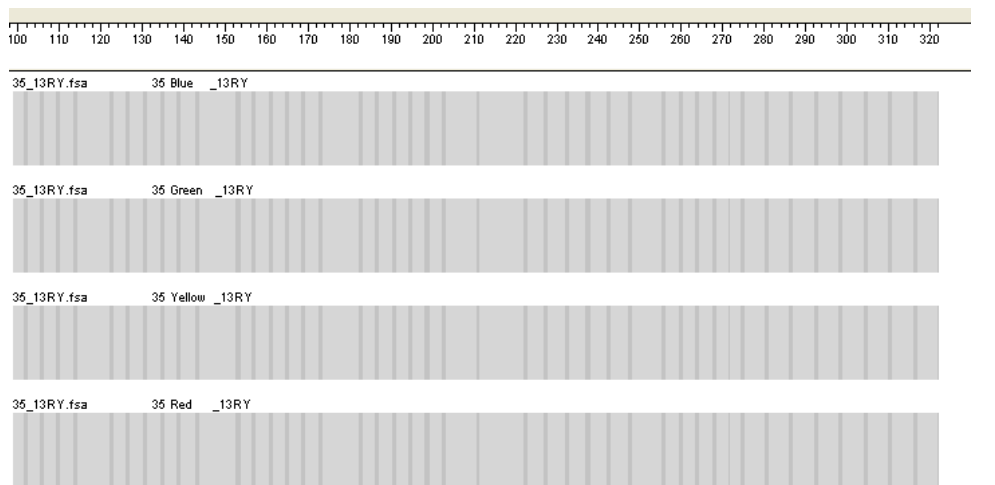


B

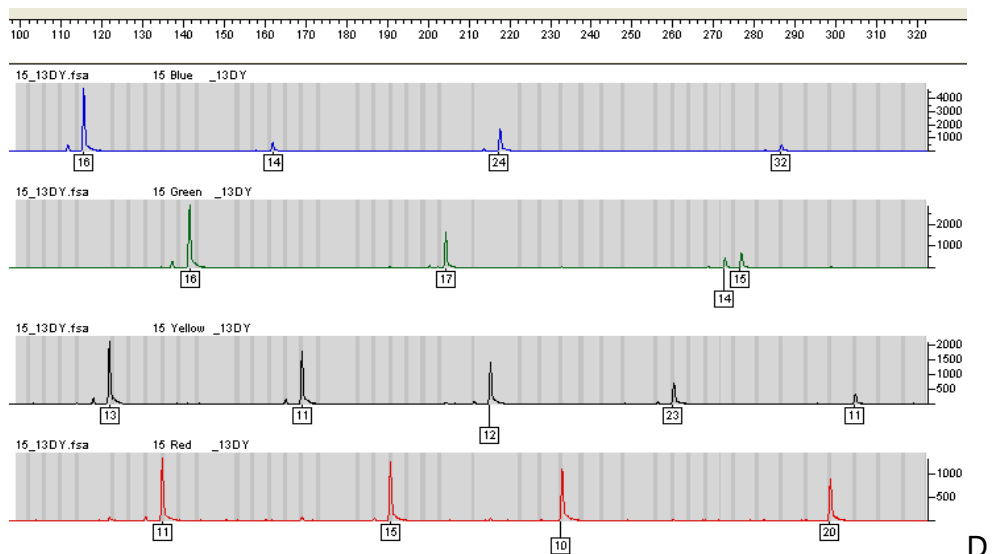


C

Rycina 4.46.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 12, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



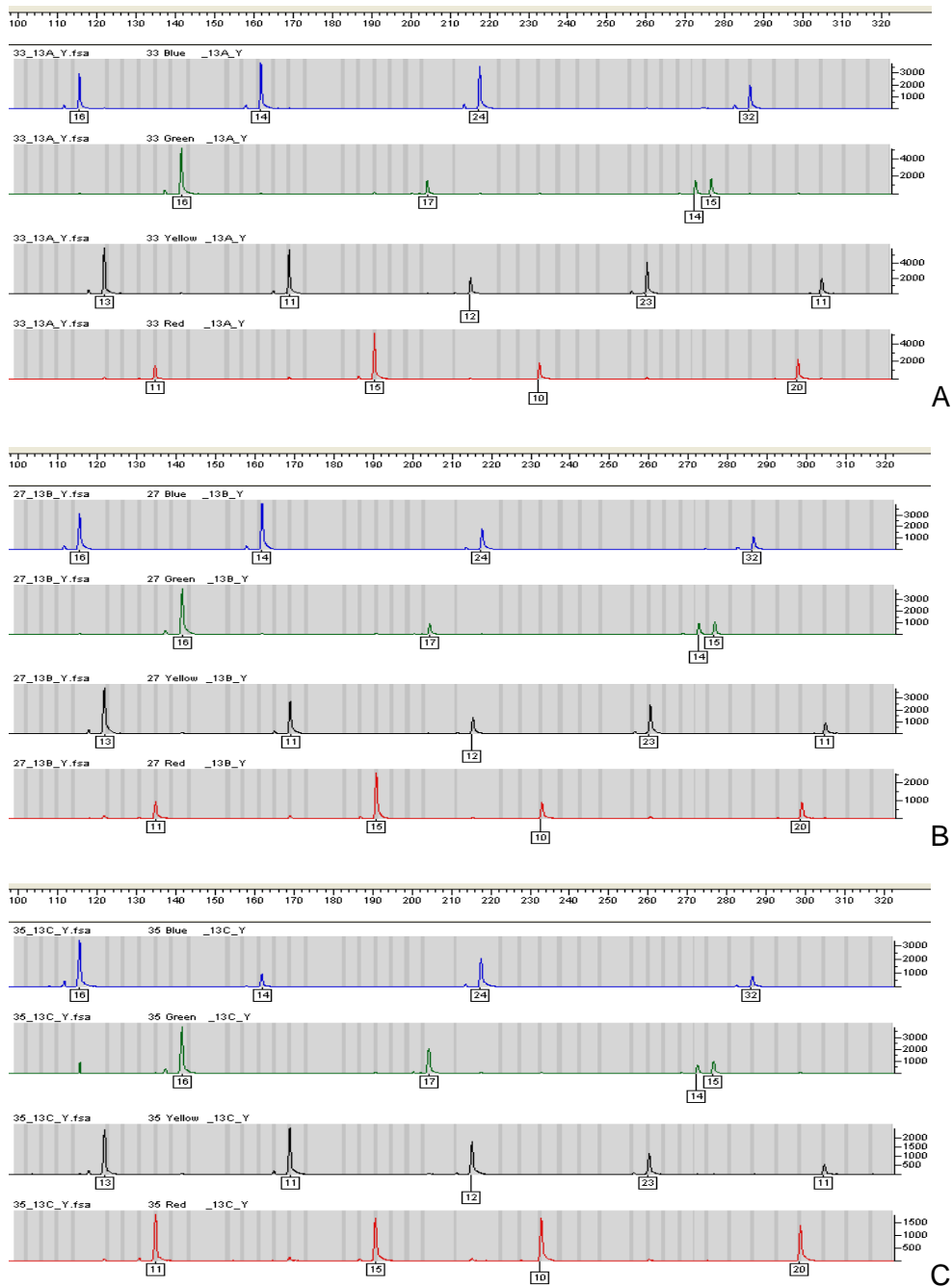
R



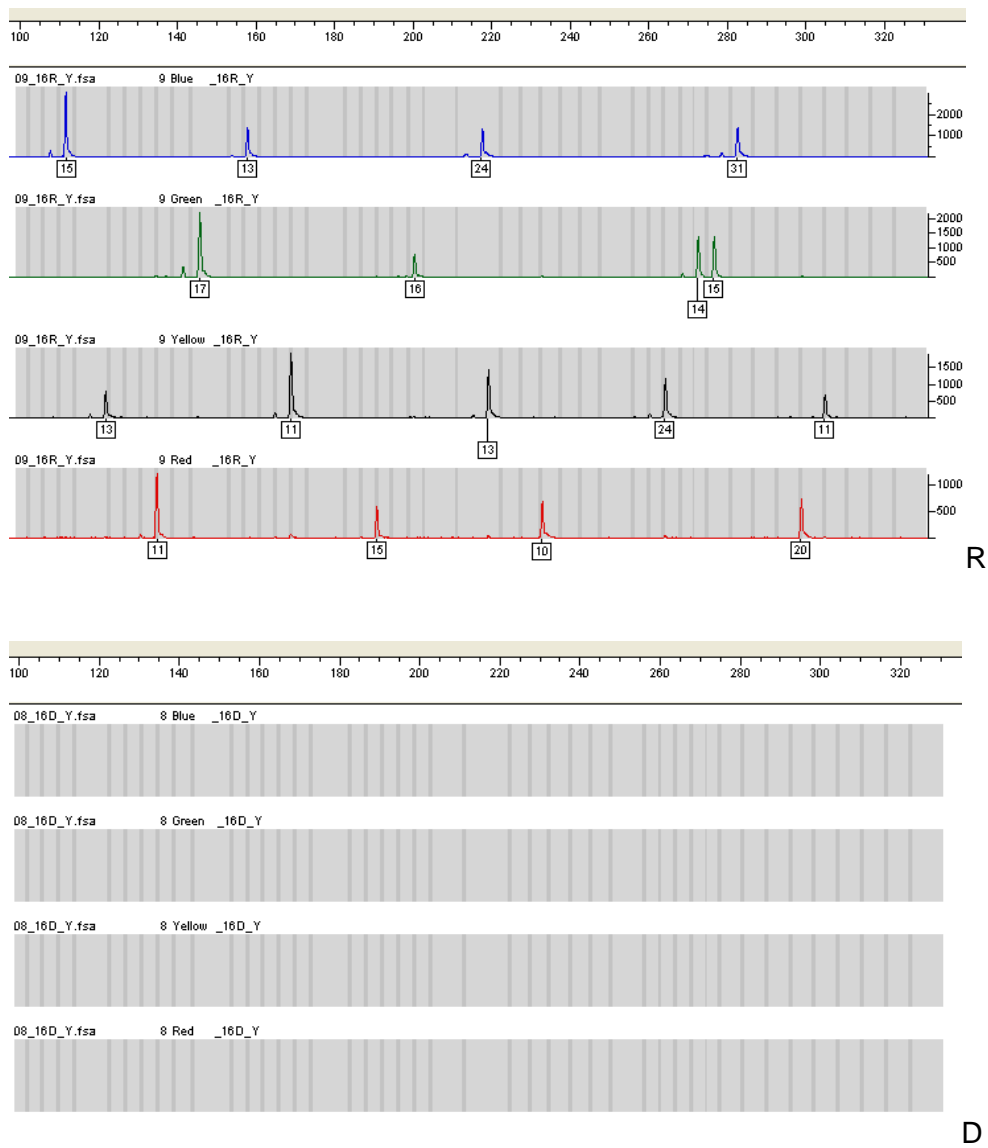
D

Rycina 4.47.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 13, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

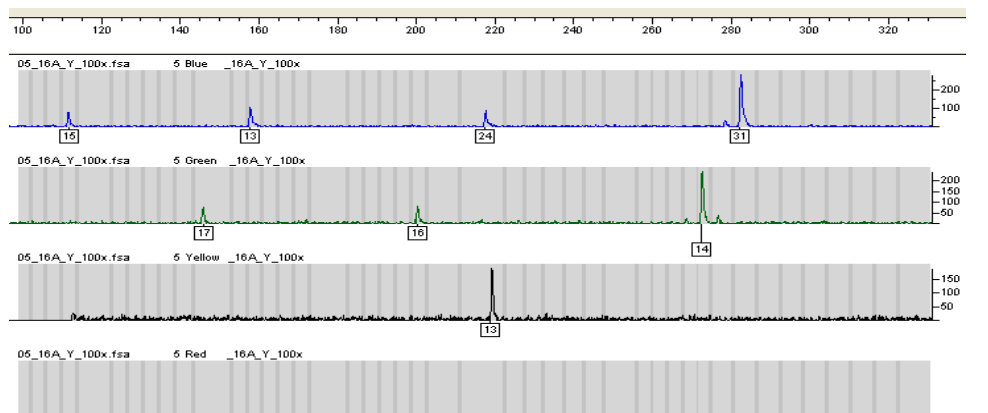




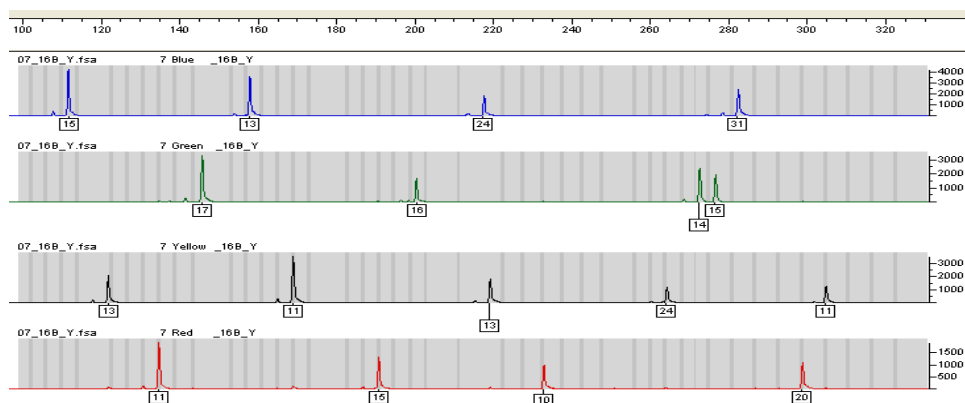
Rycina 4.47.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 13, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



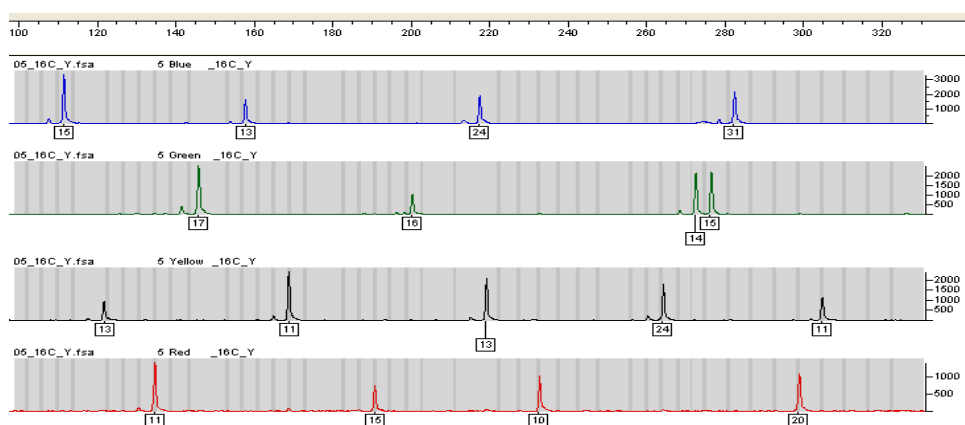
Rycina 4.48.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 16, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



A

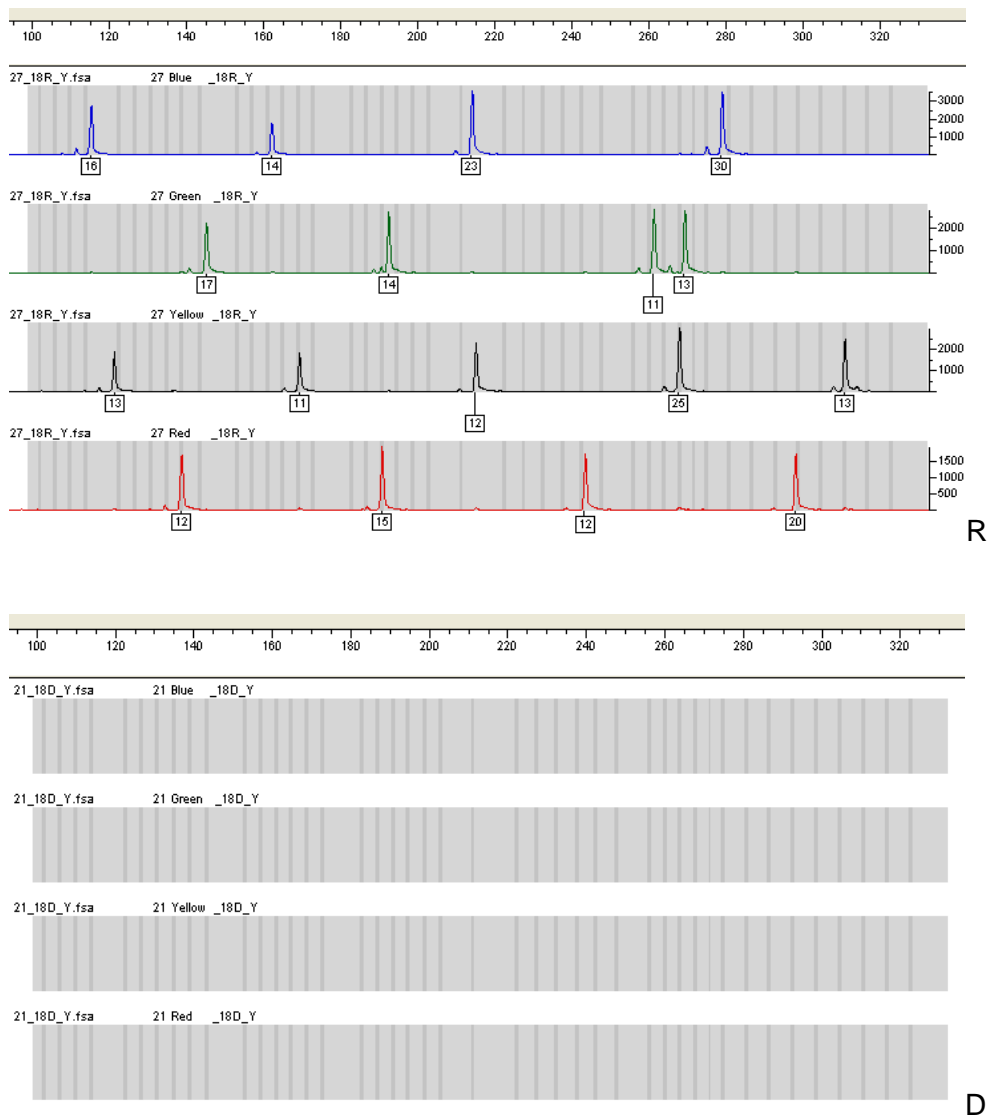


B

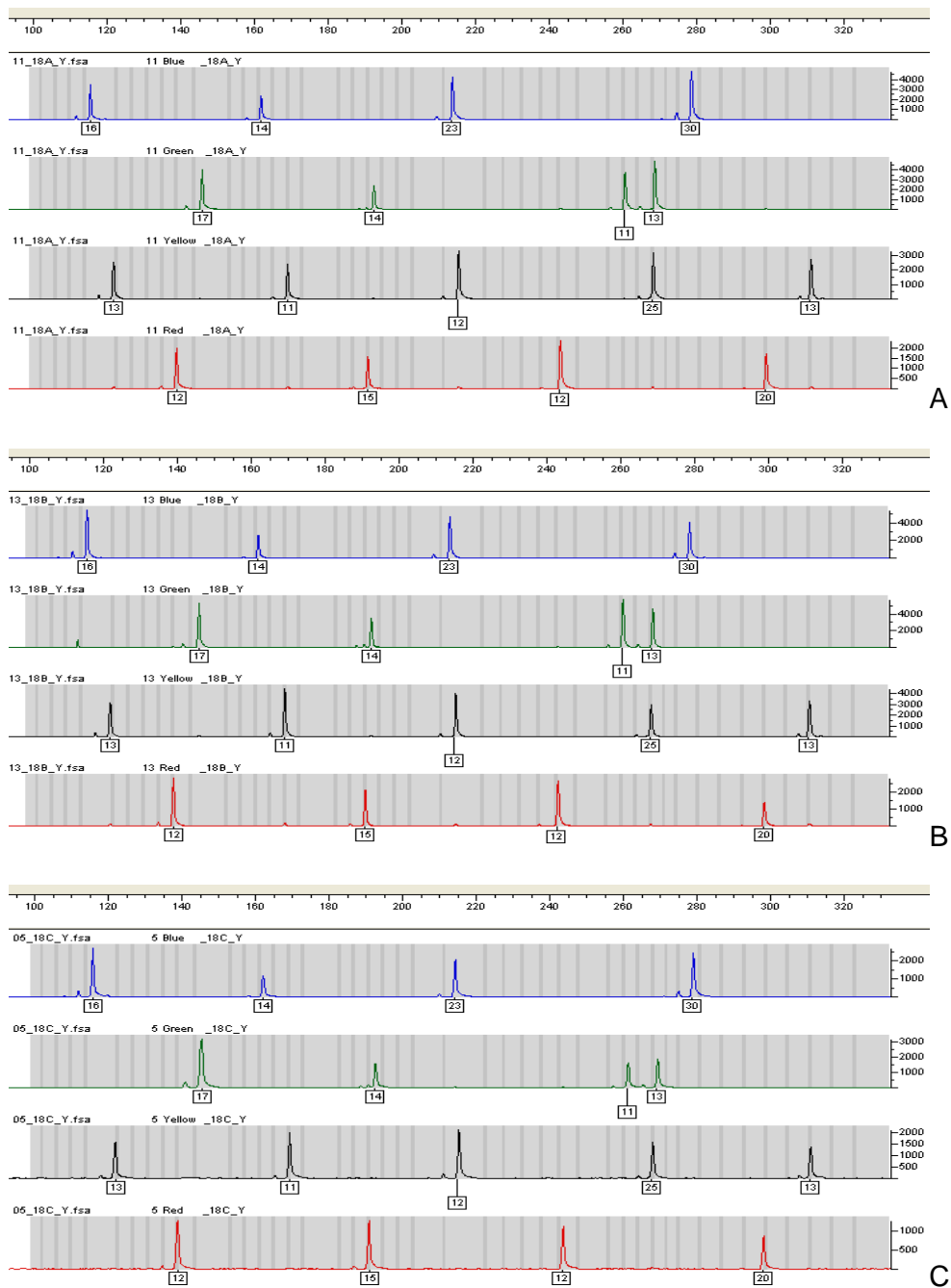


C

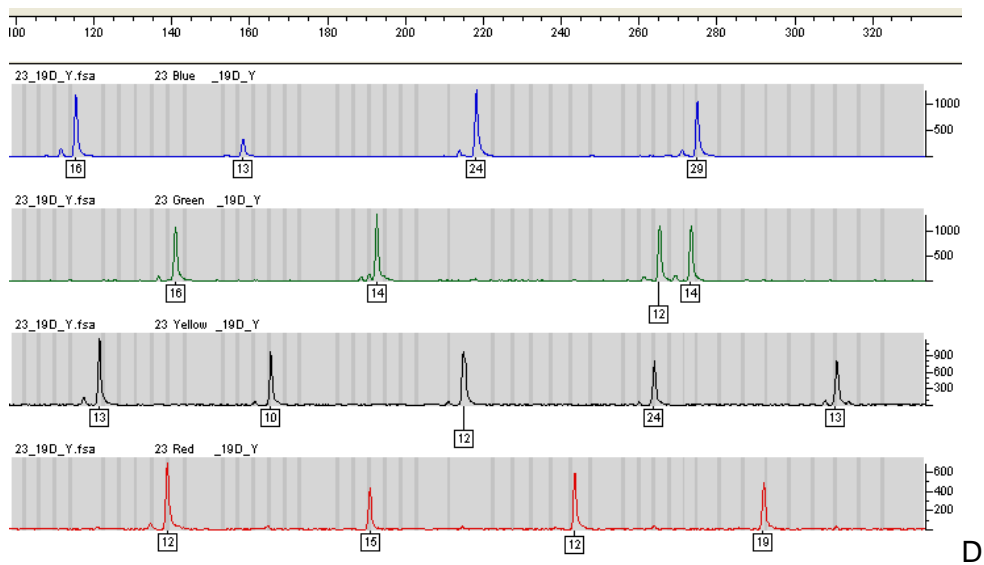
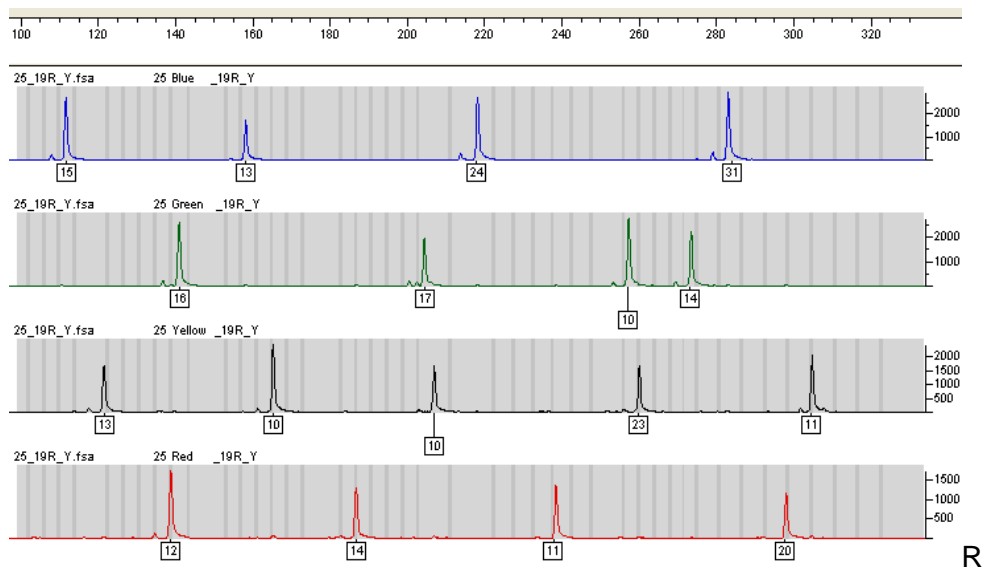
Rycina 4.48.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 16, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



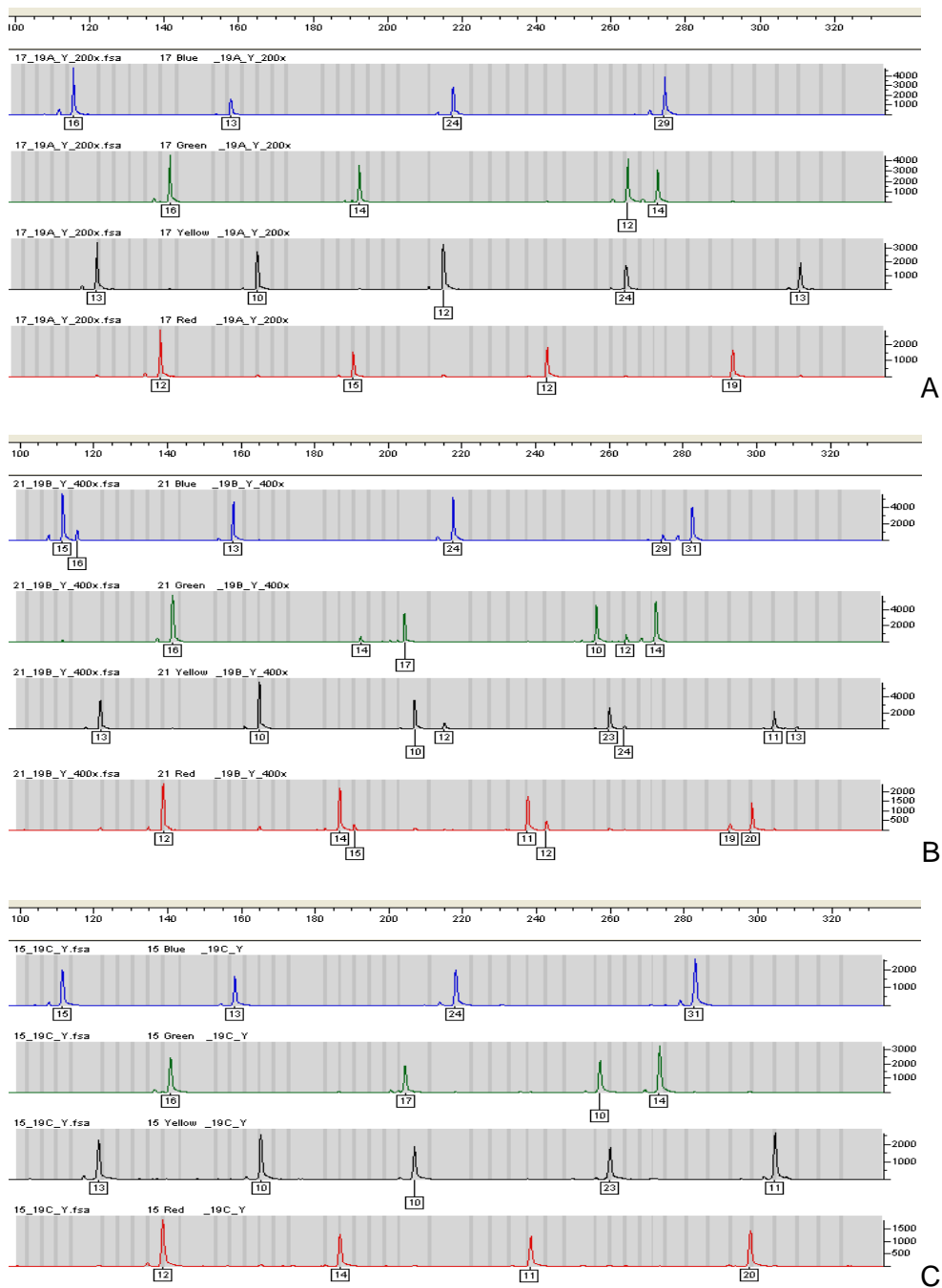
Rycina 4.49.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 18, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



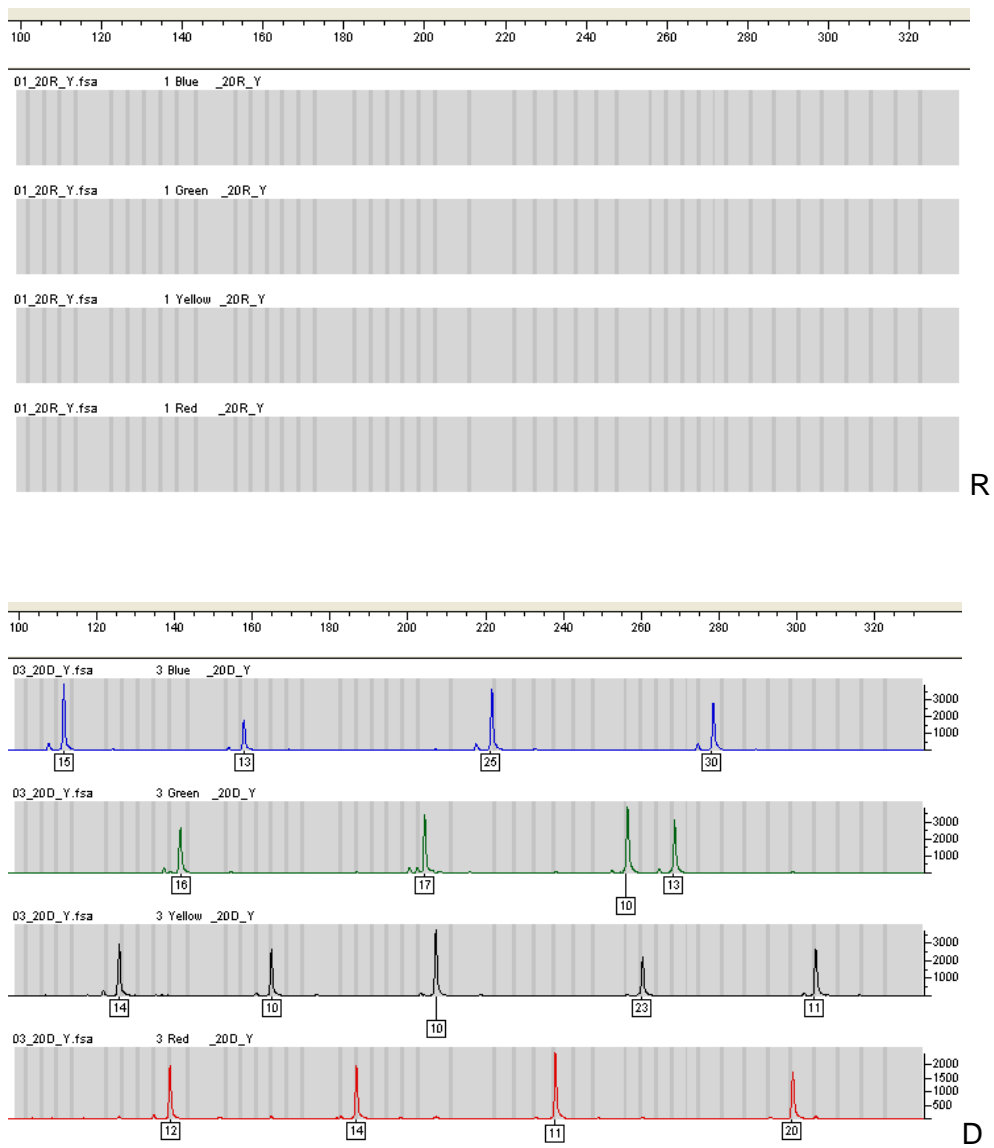
Rycina 4.49.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 18, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



Rycina 4.50.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 19, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

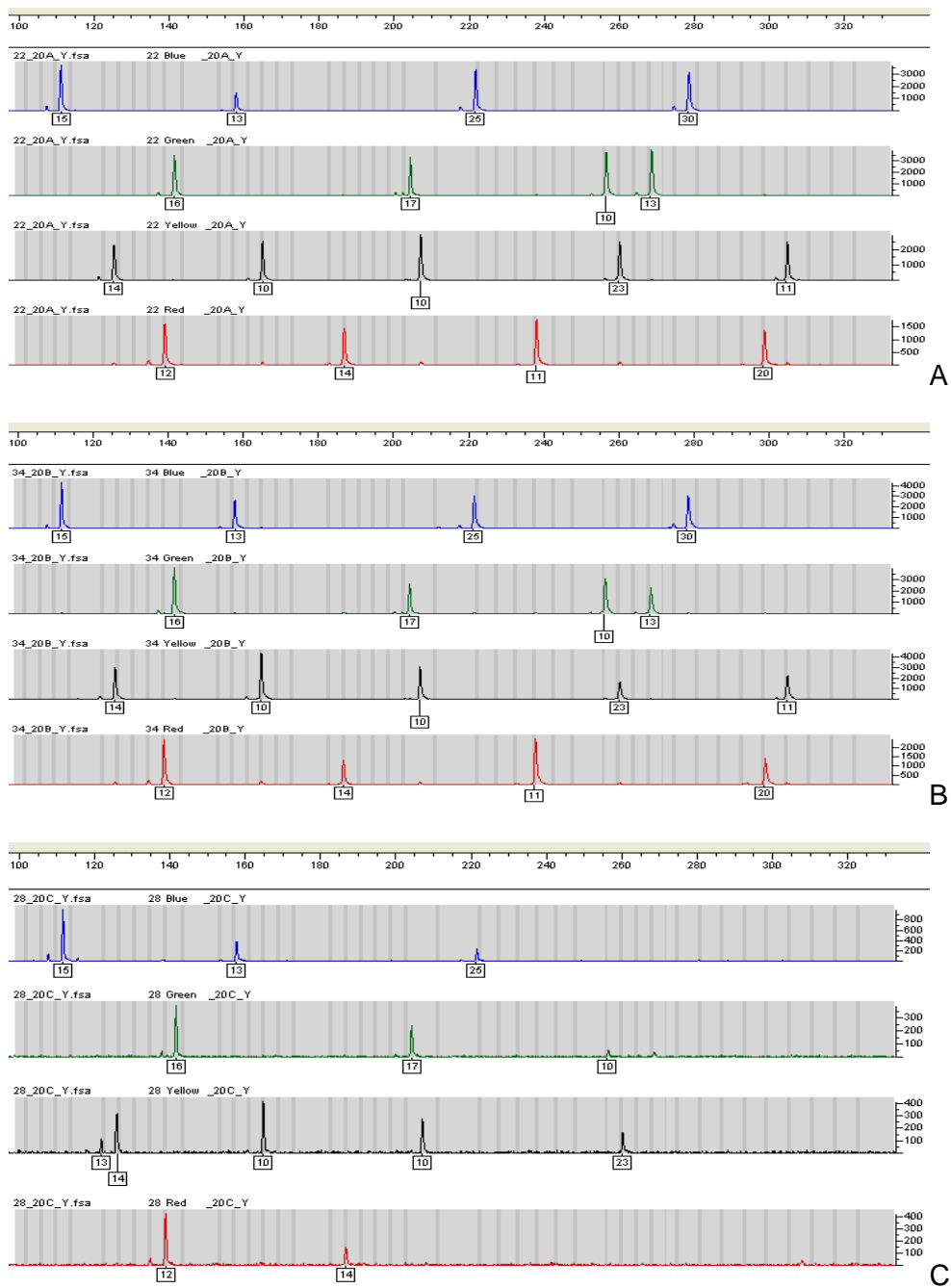


Rycina 4.50.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 19, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

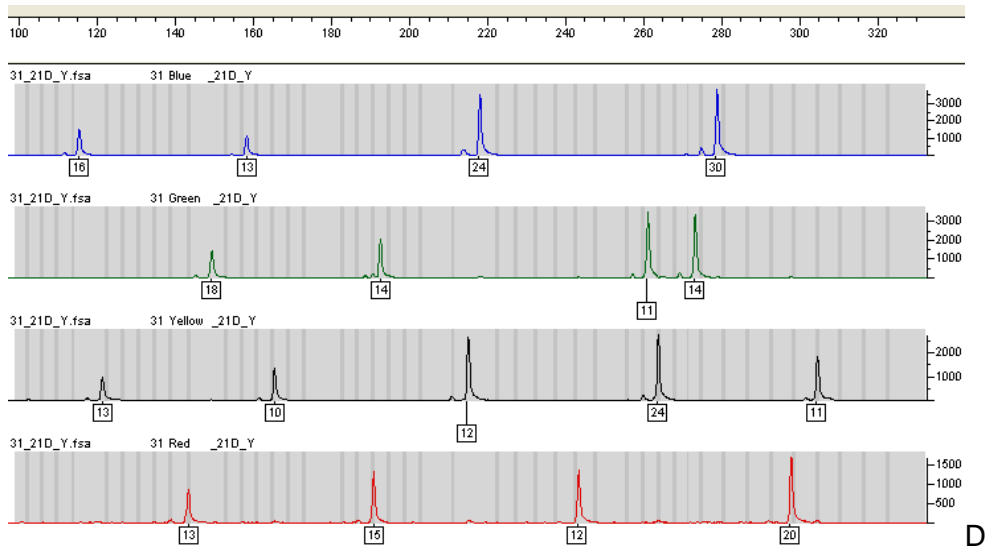
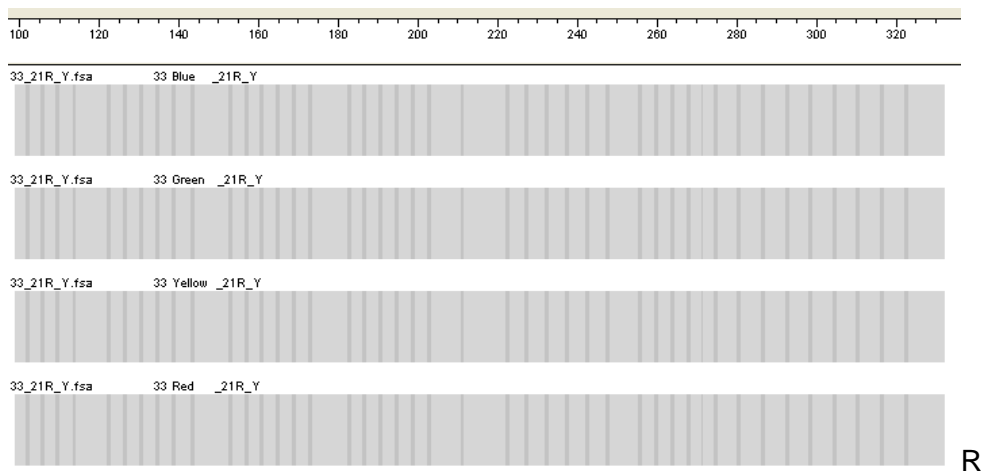


Rycina 4.51.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 20, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.

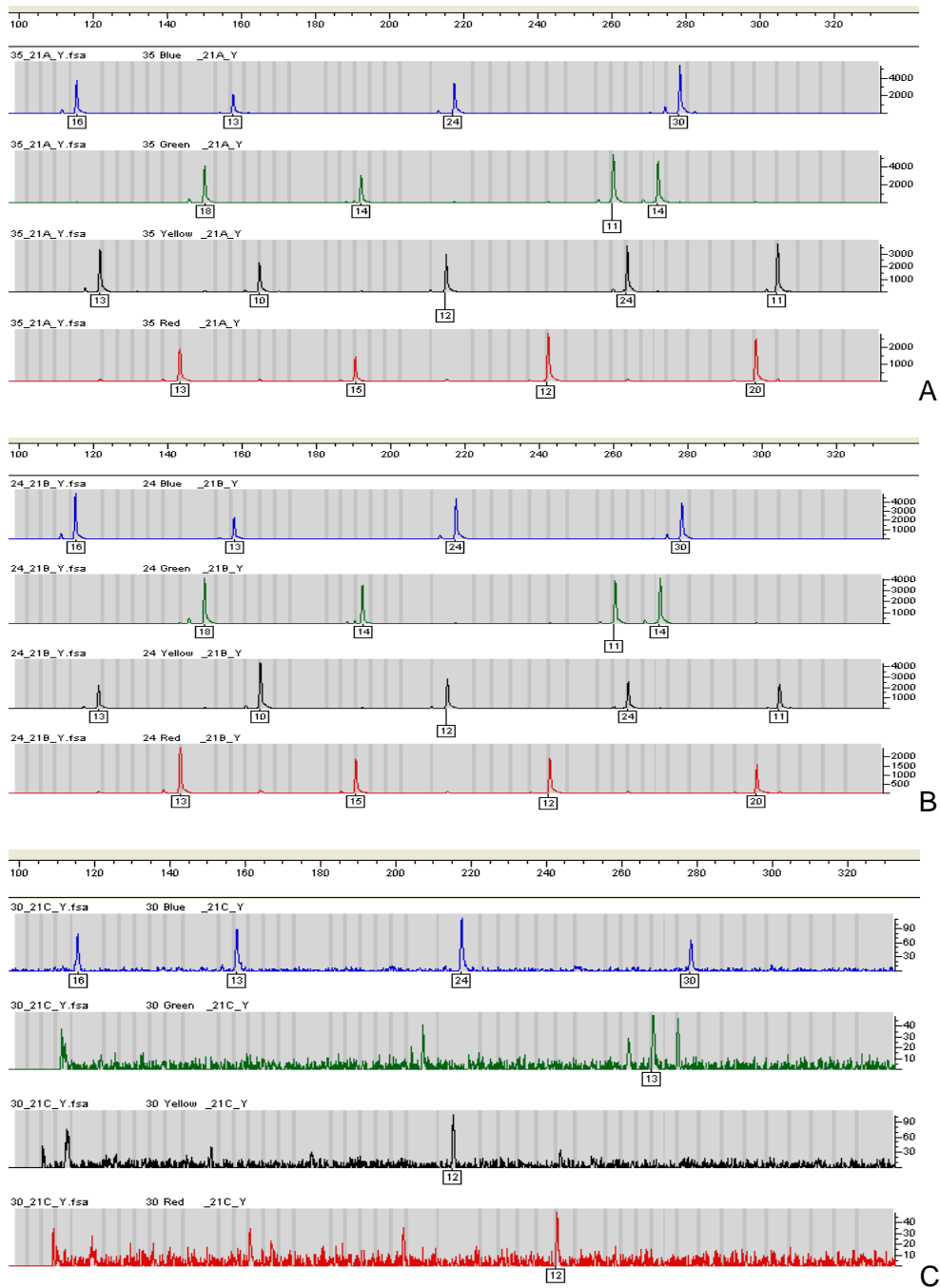




Rycina 4.51.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 20, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.



Rycina 4.52.1. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y we krwi biorcy i dawcy nr 21, pobranej przed przeszczepem. R-biorca, D-dawca.



Rycina 4.52.2. Wyniki badań polimorfizmu w zakresie markerów chromosomu Y w materiałach biocy nr 21, pobranych po przeszczepie. A-krew biocy, B-wymaz biocy, C-włos biocy.

Tabela 4.4. Wyniki analizy polimorfizmu DNA w zakresie markerów STR chromosomu Y wraz z oceną stopnia chimeryzmu w materiałach biorców po allo-HSCT.

<i>Pacjent</i>	<i>Płeć</i>	<i>Dawca</i>	<i>Dni po przeszczepie</i>	<i>Markery Y-STR (KREW BIORCY)</i>	<i>Markery Y-STR (WYMAZ BIORCY)</i>	<i>Markery Y-STR (WŁOS BIORCY)</i>
1	M	K	508	LCN biorca	100% biorca	100% biorca
2	M	M	574	nb	nb	nb
3	K	M	329	100% dawca	100% dawca	100% dawca
4	K	K	679	nb	nb	nb
5	K	K	450	nb	nb	nb
6	K	M	218	100% dawca	100% dawca	100% dawca
7	K	K	345	nb	nb	nb
8	M	M	104	nb	nb	nb
9	M	M-NS	126	100% dawca	12% dawca	100% biorca
10	M	K-NS	209	LCN biorca	100% biorca	100% biorca
11	K	M	516	100% dawca	100% dawca	100% dawca
12	M	K-NS	1145	LCN biorca	100% biorca	100% biorca
13	K	M	103	100% dawca	100% dawca	100% dawca
14	K	K-NS	809	nb	nb	nb
15	K	K	816	nb	nb	nb
16	M	K	71	LCN biorca	100% biorca	100% biorca
17	K	K	496	nb	nb	nb
18	M	K-NS	82	100% biorca	100% biorca	100% biorca
19	M	M-NS	32	100% dawca	15% dawca	100% biorca
20	K	M	607	100% dawca	100% dawca	100% dawca
21	K	M	603	100% dawca	100% dawca	100% dawca

**M** – mężczyzna, **K** – kobieta, **NS** – niespokrewniony, **LCN** – niska ilość kopii/matrycy, **nb** – nie badano

## 5. Omówienie wyników

### 5.1. Charakterystyka pacjentów

Analizie polimorfizmu DNA poddano 21 pacjentów, którzy przebyli allotransplantację komórek macierzystych szpiku. Wskazaniem do allo-HSCT w badanej grupie były: ostra białaczka szpikowa, ostra białaczka limfoblastyczna, przewlekła białaczka szpikowa, ostra białaczka bifenotypowa, choroba Hodgkina, przewlekła białaczka mielomonocytoza oraz niedokrwistość aplastyczna. Najczęstszym wskazaniem do transplantacji była ostra białaczka szpikowa, którą zdiagnozowano u 12 spośród 21 badanych pacjentów (57,1%). Źródłem komórek macierzystych hematopoezy w większości przypadków była krew obwodowa (16 pacjentów). Trzech pacjentów otrzymało komórki macierzyste bezpośrednio ze szpiku kostnego, a dwóch pozostałych zarówno ze szpiku, jak i z krwi obwodowej. Pacjenci przed przeszczepem byli poddawani leczeniu kondycjonującemu z przygotowaniem mieloablacyjnym (11 pacjentów), niemieloablacyjnym (9 pacjentów), a w jednym przypadku zastosowano oba typy kondycjonowania. Badano pacjentów w przedziale wiekowym 22-54 lata, przy czym średni ich wiek to 34 lata (mediana 36,3 lata). Sześciu z nich otrzymało komórki macierzyste hematopoezy od dawców niespokrewnionych, pozostałych piętnastu od dawców rodzinnych, w tym czternastu od rodzeństwa, a jeden od rodzica. Dziewięciu spośród 21 badanych biorców stanowili mężczyźni. W jedenastu przypadkach występowała różnica płci między dawcą a biorcą, przy czym w sześciu przypadkach dawcą byli mężczyźni, a w pozostałych pięciu kobiety. U dwunastu pacjentów obserwowano objawy GVHD, przy czym ostra jej postać wystąpiła u dwóch, przewlekła u sześciu, a obie postacie tej choroby u czterech pacjentów. Materiały od biorców – próby krwi obwodowej, wymazy komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej oraz włosy zostały pobrane średnio 420 dni po przeszczepie (zakres 32-1145 dni, mediana 450 dni). Szczegółową charakterystykę badanych pacjentów po allo-HSCT zebrano w tabeli 3.1.

### 5.2. Ocena mikroskopowa włosów biorców allo-HSCT

Analiza mikroskopowa włosów, pochodzących od biorców allo-HSCT, wykazała obecność cebulki tylko w ośmiu spośród 21 badanych włosów. Świadczy to o tym, że w większości przypadków izolowano DNA z nabłonkowych komórek, wchodzących w skład części rdzennej i korowej włosa oraz z pochewek włosa, które uwidoczniono na rycinie 4.1.

W preparatach, wykonanych z rozmazów z osadów uzyskanych po płukaniu włosów, ujawniono pojedyncze komórki nabłonkowe z jądrem oraz rozfragmentowane płytki rogowe pozbawione jądra, powstałe ze zdegradowanych komórek nabłonka pochewek włosa, które uwidoczniono na rycinie 4.2.

W żadnym z badanych preparatów mikroskopowych, sporządzonych zarówno z rozmazów z osadów, jak i z pojedynczych włosów nie ujawniono komórek krwi. Dlatego też można przyjąć, z dużym prawdopodobieństwem, że źródłem donorowego DNA izolowanego z włosów biorców allo-HSCT były komórki nabłonkowe.

### **5.3. Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym**

Ilościową reakcją PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono w urządzeniu 7900HT Fast Real-Time PCR System, sprzężonym z oprogramowaniem SDS, z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ Human DNA oraz zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA.

Odczyt wartości będącej wyznacznikiem zerowej fluorescencji, w odniesieniu do której oceniany był poziom fluorescencji w próbach następował między 3-15 cyklem amplifikacji. Za pomocą algorytmu oprogramowania SDS definiowano cykl amplifikacji –  $C_T$ , w którym poziom fluorescencji przekraczał wartość progową wynoszącą standardowo 0,2, wyznaczoną na wykresach jako czerwona linia. Im wyższa była wartość  $C_T$  przy określonym sygnale fluorescencji, tym mniejsze było stężenie wyjściowego DNA w próbce. Im więcej kopii wyjściowej sekwencji DNA było w badanej próbce, tym niższa była wartość  $C_T$ .

Z uwagi na fakt, że w diploidalnej komórce człowieka są dwie kopie autosomalnej sekwencji, a u mężczyzny tylko jedna kopia sekwencji chromosomu Y, wartości  $C_T$  przy zastosowaniu zestawu Quantifiler™ Human DNA były niższe niż wartości  $C_T$  przy zastosowaniu zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA. Wartość  $C_T$  przekraczająca 37 w systemie Quantifiler™ Human oraz wartość  $C_T$  przekraczająca 39 w systemie Quantifiler™ Y Human Male skutkowałą nieprzekroczeniem wartości progowej sygnału fluorescencji (0,2), a tym samym nieprzecięciem wykresu amplifikacji z czerwoną linią, co świadczyło o braku badanej sekwencji DNA.

Analiza wszystkich badanych prób z zastosowaniem zestawu Quantifiler™ Human DNA wykazała obecność sekwencji hTERT,

a tym samym ujawniła ludzkie genomowe DNA o stężeniu w przedziale 0,26 ng/μl-190,35 ng/μl (tabela 4.2).

Analiza z zastosowaniem zestawu Quantifiler™Y Human Male nie wykazała obecności sekwencji genu SRY we wzorcowym DNA o stężeniu 10 ng/ul, pochodzącym z żeńskiej linii komórkowej, co obrazuje rycina 4.4. Nie ujawniono również produktów amplifikacji genu SRY w materiale genetycznym, pobranym przed przeszczepem od przykładowego biorcy-kobiety oznaczonej jako 20R, przy jednoczesnej amplifikacji DNA dawcy-mężczyzny oznaczonego jako 20D, dla którego odczyt stężenia wyniósł 20,69 ng/μl ( $C_T=26,15$ ), co przedstawiono na rycinie 4.5. Brak detekcji męskiego DNA w materiale referencyjnym, pobranym przed przeszczepem od pacjentek, dla których dawcą był mężczyzna, dokumentuje bardzo istotny fakt. Świadczy on o tym, że męskie komórki nie przedostały się do krwioobiegu i następnie innych tkanek biorcy-kobiety drogą płodową, a tylko w wyniku przebytego przeszczepu komórek macierzystych hematopoezy. Brak detekcji produktów amplifikacji w przypadku DNA pochodzącego od kobiety potwierdza ponadto prawidłowe działanie systemu Quantifiler™Y Human Male, polegające na selektywnej amplifikacji męskiego DNA.

Analiza kontrolnego DNA o znanych stężeniach, odpowiednio: 100 pg/μl, 50 pg/μl, 10 pg/μl oraz 5 pg/μl, ujawniła właściwy i przybliżony w kolejnych oznaczeniach odczyt jedynie dla dwóch wyższych stężeń. Przy wartościach stężeń 10 pg/μl i 5 pg/μl rozrzut wielkości kolejnych oznaczeń tej samej kontroli był bardzo duży, wskazania pomiaru świadczyły bądź o całkowitym braku badanej sekwencji DNA, bądź też dawały ponad pięciokrotne zawyżenie ilości testowanego DNA (tabela 4.1).

Zbiorcze oraz szczegółowe wykresy ilościowej reakcji PCR dla wybranych materiałów, pobranych od biorców po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy, z użyciem zarówno zestawu Quantifiler™ Human DNA oraz zestawu Quantifiler™Y Human Male DNA, przedstawiono na rycinach 4.6-4.17. W tabeli 4.2. zestawiono uzyskane wartości  $C_T$  wraz z odpowiadającymi im wartościami stężenia dla badanych potransplantacyjnych materiałów, tj. krwi, wymazu i włosa, pochodzących od wszystkich biorców, oznaczonych kolejnymi numerami od 1 do 21. W oparciu o amplifikację sekwencji hTERT oraz niezależnie specyficzną amplifikację sekwencji SRY ujawniano zarówno odczyt stężenia całkowitego DNA, jak i stężenia męskiego DNA w badanych próbach. Ilościowy pomiar podatnego na amplifikację DNA, przeprowadzony za pomocą reakcji QR-PCR, pozwolił na wykonanie optymalnych rozcieńczeń badanych prób do reakcji multipleksowej STR-PCR.

Analiza QR-PCR, przeprowadzona w wariacie selektywnej amplifikacji męskiego DNA z użyciem zestawu Quantifiler™ Y Human Male DNA, okazała się cennym źródłem informacji przy badaniu materiałów pochodzących od biorców niezgodnych pod względem płci z dawcami. We krwi potransplantacyjnej pochodzącej od biorców-mężczyzn, dla których dawcą była kobieta, oznaczonych kolejnymi numerami 1, 10, 12, 16 i 18, u wszystkich poza biorcą nr 18 reakcja QR-PCR nie ujawniła w ogóle lub ujawniła śladowe ilości męskiego DNA w przedziale 17-40 pg/μl. Odpowiada to zaledwie około 3-7 komórek przypadającym na jeden mikrolitr krwi (rycina 4.7, tabela 4.2). Pojedyncze komórki biorcy, obecne w tle kilkudziesięciu-kilku tysięcy komórek dawcy, świadczą o prawie kompletnym zastąpieniu patologicznego krwiotworzenia pacjenta prawidłowym krwiotworzeniem zdrowego dawcy. Podobnego efektu jak dla krwi nie obserwuje się dla wymazu oraz włosa, w których ilość męskiego autologicznego DNA badanych biorców jest zbliżona do ilości całkowitego DNA (rycina 4.11, tabela 4.2).

Druga grupa biorców z przeciwnymi płciowo dawcami to kobiety, oznaczone kolejnymi numerami 3, 6, 11, 13, 20 i 21. We krwi i w wymazie tych pacjentek ujawniono męskie DNA, na co wskazuje wykres reakcji QR-PCR na rycinach 4.8 i 4.9. Na podstawie analizy z wykorzystaniem systemu Quantifiler™ Y Human Male DNA wykazano, że stężenie donorowego DNA we krwi badanych pacjentek zawiera się w przedziale 2,57-51,18 ng/μl, a stężenie donorowego DNA w wymazach tych samych kobiet zawiera się w przedziale 0,96-19,16 ng/μl, co dokumentuje tabela 4.2.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt ujawnienia męskiego DNA we włosach pięciu na sześć badanych pacjentek, co obrazuje wykres reakcji QR-PCR na rycinie 4.10. Uzyskane wartości  $C_T$  i odpowiadające im stężenia DNA w przedziale 30-170 pg/μl, zawarte w tabeli 4.2, świadczą o tym, że domieszka męskiego DNA we włosach biorców-kobiet wynika z obecności 5-28 męskich komórek, stanowiących zaledwie od 0,05% do 1% całego genomowego DNA ujawnionego w próbie. Szczegółowa analiza QR-PCR dla wszystkich materiałów pochodzących od analizowanych pacjentek, z wykorzystaniem zestawów Quantifiler™ Human DNA oraz Quantifiler™ Y Human Male DNA, została zawarta na rycinach 4.12-4.17. Wyniki przeprowadzonej analizy wskazują, że komórki macierzyste szpiku dawcy są obecne we wszystkich trzech badanych materiałach potransplantacyjnych biorcy, nie tylko we krwi i w wymazie, ale również we włosie.



#### 5.4. Analiza markerów autosomalnego DNA

Analizę chimeryzmu donorowego z obliczeniem procentowej zawartości komórek dawcy w materiałach pochodzących od biorcy alloprzeszczepu, tj. we krwi, w wymazie z jamy ustnej i w komórkach włosa, w pierwszym etapie badań przeprowadzono z zastosowaniem markerów autosomalnego DNA, wchodzącego w skład systemu AmpF $\lambda$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit.

Podczas analizy badanych materiałów potransplantacyjnych, pochodzących od 21 biorców po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy oraz materiałów referencyjnych pobranych od tych biorców i ich dawców przed przeszczepem, ujawniono produkty reakcji PCR o sygnale fluorescencji przekraczającym 200 RFU. Uzyskane profile DNA dla poszczególnych materiałów przedstawiono na rycinach 4.18.1-4.38.2. Na podstawie analizy pola powierzchni pików będących wykładnikiem siły sygnału fluorescencji, a tym samym ilości produktu PCR w próbie obliczano tzw. chimeryzm donorowy czyli odsetek, jaki stanowią komórki pochodzące od dawcy w materiałach biorcy po przeszczepie. Tabela 4.3 stanowi podsumowanie przeprowadzonej oceny polimorfizmu DNA i stopnia chimeryzmu donorowego we wszystkich badanych materiałach pochodzących od biorców allo-HSCT – krwi, wymazie i włosach.

Na podstawie analizy ilościowej rozkładu poszczególnych cech w zakresie autosomalnego DNA u 19 spośród 21 badanych pacjentów (90,5%) wykazano we krwi obwodowej pełny chimeryzm dawcy. Stan taki wskazuje na fakt, że przeszczepione komórki dawcy zastąpiły chory szpik biorcy, przejmując w pełni funkcję krwiotworzenia. Jedynie w przypadku dwóch pacjentów (numer 15 i 18) we krwi ujawniono mieszaninę DNA z przeważającą zawartością frakcji donorowej, stanowiącej odpowiednio 75% i 63% (rycina 4.32.2A i rycina 4.35.2A). U pozostałych pacjentów nastąpiła pełna konwersja profilu genetycznego krwi biorcy w profil genetyczny dawcy.

Analiza polimorfizmu w genie amelogeniny, który wchodzi w skład systemu AmpF $\lambda$ STR<sup>®</sup> Identifiler<sup>™</sup> PCR Amplification Kit, ujawniła we krwi mężczyzn po przeszczepie oznaczonych numerami 1, 10, 12 i 16 profil żeński (ryciny: 4.18.2A, 4.27.2A, 4.29.2A, 4.33.2A), a we krwi kobiet po przeszczepie oznaczonych numerami 3, 6, 11, 13, 20 i 21 profil męski (ryciny: 4.20.2A, 4.23.2A, 4.28.2A, 4.30.2A, 4.37.2A, 4.38.2A).

Autosomalne DNA pochodzące z wymazów komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej, pobranych od pacjentów po allo-HSCT, w przeważającej ich liczbie, dało obraz mieszanego profilu świadczącego o współlistnieniu dwóch frakcji komórkowych – dawcy i biorcy. W wymazach pochodzących od 16 pacjentów (76% wszystkich badanych) ujawniono od 11% do 67% DNA dawcy. W wymazach pięciu spośród 21 badanych pacjentów oznaczonych numerami 9, 10, 13, 16 i 18 ujawniono wyłącznie ich własne DNA bez domieszki donorowego (ryciny 4.26.2B i 4.27.2B, 4.30.2B, 4.33.2B, 4.35.2B) mimo tego, że czterej spośród tych pacjentów było poddanych kondycjonowaniu mieloablacyjnemu przed przeszczepem. Średnia wartość chimeryzmu donorowego wyniosła 27,6% (mediana 24%), co świadczy o tym, iż w wymazach u większości biorców dominowała frakcja ich własnych komórek. U pięciu pacjentów oznaczonych numerami 2, 11, 17, 20 i 21 komórki dawcy stanowiły przeważający komponent mieszaniny, przy czym największy odsetek komórek dawcy stanowiący 67% odnotowano u pacjenta numer 11 (rycina 4.28.2B).

Analiza markerów autosomalnego DNA i *locus* AMG w materiale genetycznym wyizolowanym z komórek włosów badanych biorców allo-HSCT nie wykazała w żadnym przypadku frakcji donorowego DNA. We wszystkich badanych włosach w zakresie systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Identifier $\text{\textsuperscript{TM}}$  PCR oznaczono wyłącznie autologiczne profile genetyczne biorców, co dokumentują ryciny 4.18.2C-4.38.2C oraz tabela 4.3.

## 5.5. Analiza markerów chromosomu Y

Badaniu specyficznych dla płci męskiej markerów chromosomu Y poddano materiały potransplantacyjne, pochodzące od biorców przeszczepu oraz materiały referencyjne, pobrane od biorców i ich dawców przed przeszczepem. Nie wykonywano powyższych analiz w przypadku, kiedy dawcą i biorcą była kobieta, oraz w przypadku, gdy dawcą i biorcą byli bracia. W sytuacji, gdy mężczyźni wywodzą się z tej samej linii rodowej, posiadają oni identyczny zestaw cech chromosomu Y – haplotyp Y. Nie pozwala to na zróżnicowanie dawcy i biorcy w obrębie markerów Y-STR, co z kolei skutkuje brakiem możliwości oceny chimeryzmu genetycznego w zakresie markerów systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Yfiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  PCR.

Analizę badanych prób pochodzących od biorców allo-HSCT poprzedziła amplifikacja kontrolnego DNA 007 o znanej ilości wsadowej matrycy, tj. kolejno: 300 pg, 100 pg, 10 pg, 5 pg, co obrazuje rycina 4.39. Jak z niej wynika, pełne profile DNA uzyskano począwszy od 100 pg matrycy DNA odpowiadającej 16-17 komórkom lub kopiom haploidalnej sekwencji chromosomu Y. Amplifikacja 10 pg i 5 pg matrycy DNA,

stanowiącej w przybliżeniu 1-2 komórki, ujawniła typowe cechy LCN-DNA, tj. wypadanie alleli oraz obecność niespecyficznych produktów amplifikacji.

Na rycinach: 4.40, 4.44, 4.46, 4.48, 4.49 przedstawiono wyniki analizy markerów chromosomu Y w materiałach pięciu mężczyzn, którzy otrzymali przeszczep komórek macierzystych hematopoezy od kobiet, przy czym w 2 przypadkach dawcą była siostra (pacjenci numer 1 i 16), w trzech pozostałych dawca niespokrewniony (pacjenci numer 10, 12, 18). We krwi wszystkich badanych biorców, za wyjątkiem biorcy nr 18, ujawniono śladową ilość DNA dającą niekompletny haplotyp Y o cechach LCN, co obrazują ryciny: 4.40.2A, 4.44.2A, 4.46.2A, 4.48.2A. Stanowi to potwierdzenie wcześniej uzyskanych wyników w zakresie analizy QR-PCR, które wykazały minimalne wartości stężenia męskiego DNA we krwi biorców oznaczonych numerami 1, 10, 12 i 16. W odróżnieniu od DNA pochodzącego z krwi, DNA pochodzący z wymazów i włosów badanych pacjentów ujawnił pełny haplotyp chromosomu Y bez cech LCN, cechujący biorcę przeszczepu, co obrazują ryciny: 4.40.2B,C, 4.44.2B,C, 4.46.2B,C, 4.48.2B,C.

Bardzo interesujący materiał z punktu widzenia analizy polimorfizmu w obrębie markerów chromosomu Y stanowiły: krew, wymazy z jamy ustnej oraz włosy, pobrane od pacjentów – mężczyzn oznaczonych numerami 9 i 19, dla których dawcą był inny niespokrewniony mężczyzna. Niespokrewnieni mężczyźni z reguły charakteryzują się zróżnicowaniem w obrębie zestawu cech chromosomu Y – haplotypu Y, który jest charakterystyczny dla określonej męskiej linii rodowej. Zróżnicowanie to obserwowano również w odniesieniu do badanych par dawca-biorca, co obrazują ryciny 4.43.1R,D i 4.50.1R,D przedstawiające porównanie referencyjnych haplotypów Y niespokrewnionego ze sobą dawcy i biorcy, oznaczonych w materiałach zabezpieczonych przed przeszczepem. W materiałach pobranych od biorców po przeszczepie wykazano zróżnicowanie haplotypowe w zależności od tego, czy analizowano DNA pochodzące z krwi, wymazu czy też z włosa biorcy. W krwi badanych biorców oznaczono wyłącznie haplotyp Y dawcy, co obrazują ryciny 4.43.2A i 4.50.2A. Odwrotnie we włosach badanych pacjentów ujawniono wyłącznie ich własny haplotyp Y, co jest widoczne na rycinach 4.43.2C i 4.50.2C. W wymazach z jamy ustnej pacjentów numer 9 i 19 ujawniono natomiast mieszaninę męskiego materiału genetycznego z przewagą frakcji pochodzącej od biorcy, stanowiącej odpowiednio 88% i 85%, której odsetek obliczono w oparciu o rozkład cech uwidoczniony na rycinach 4.43.2B i 4.50.2B.

Zaskakująca z punktu widzenia analizy polimorfizmu genetycznego okazała się analiza materiałów pochodzących od sześciu kobiet, którym przeszczepiono komórki macierzyste hematopoezy męskiego dawcy. Dawcami byli bracia pacjentek oznaczonych kolejnymi numerami 3, 11, 13, 20 i 21 oraz ojciec pacjentki oznaczonej numerem 6. We wszystkich materiałach pobranych po przeszczepie od badanych kobiet ujawniono męski materiał genetyczny o haplocybie Y dawcy. We krwi oraz w wymazie komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej odnotowano wysoki sygnał w przedziale 1500-6000 RFU, co obrazują ryciny: 4.41.2A,B, 4.42.2A,B, 4.45.2A,B, 4.47.2A,B, 4.51.2A,B, 4.52.2A,B. Uzyskane wyniki badań w zakresie markerów chromosomu Y sugerują mylnie, że zarówno krew jak i wymaz pochodzą nie od kobiety, a od mężczyzny. Stanowi to potwierdzenie wyników analizy metodą QR-PCR z zastosowaniem systemu Quantifiler™ Y Human Male, która też wykazała obecność męskiego DNA w materiałach potransplantacyjnych biorców-kobiet. Podobnie jak we krwi i w wymazie, męskie DNA pochodzenia donorowego ujawniono również we włosach sześciu badanych pacjentek. Pełny haplocybie dawcy oznaczono w komórkach włosów pacjentek numer 3, 6, 11 i 13, co obrazują ryciny: 4.41.2C, 4.42.2C, 4.45.2C, 4.47.2C. We włosach pozostałych pacjentek, oznaczonych numerami 20 i 21, ujawniono niepełny haplocybie męskiego dawcy. Na skutek śladowej ilości DNA o cechach LCN obserwowano zjawisko wypadania niektórych alleli oraz przypadkową amplifikację innych, co dokumentują ryciny 4.51.2C i 4.52.2C.

Istotnym elementem badań była analiza materiału referencyjnego, która nie ujawniła haplocybie Y we krwi pobranej od pacjentek przed przeszczepem (ryciny: 4.41.1R, 4.42.1R, 4.45.1R, 4.47.1R, 4.51.1R, 4.52.1R). Materiał ten stanowił kontrolę ujemną reakcji PCR w przypadku analizy żeńskiego DNA. Brak produktów amplifikacji w zakresie markerów Y-STR w materiale pretransplantacyjnym świadczy ponadto o tym, że ujawnienie męskiego donorowego DNA we krwi, wymazach z jamy ustnej i włosach biorców-kobiet jest wyłącznie następstwem przebytego przez nie przeszczepu komórek macierzystych hematopoezy.

## 6. Dyskusja

W wielu ciężkich schorzeniach, jakimi są nowotwory układu krwionośnego i limfatycznego, nienowotworowe zaniki szpiku, poważne defekty immunologiczne czy wrodzone zespoły metaboliczne, jedynym ratunkiem dla pacjenta jest przeszczep komórek macierzystych hematopoezy [62]. Transplantacja produkowanych w szpiku kostnym komórek macierzystych krwiotworzenia stała się uznaną metodą leczenia również wrażliwych na chemio- i radioterapię nowotworów litych [36]. Z każdym rokiem wzrasta liczba allotransplantacji, co ma związek z wprowadzeniem niskotoksycznego przygotowania do przeszczepu oraz postęпом w zakresie przełamania bariery HLA [99,139]. W efekcie udanej allotransplantacji szpik dawcy produkuje zdrowe komórki krwiotwórcze w organizmie biorcy, zapewniające prawidłowy skład krwi obwodowej. Uzupełniają one funkcje niewydolnego szpiku chorego bądź całkowicie go zastępują, na skutek czego w krwioobiegu biorcy znajdują się komórki zawierające inny materiał genetyczny niż reszta jego organizmu [90]. Stan ten zwany chimeryzmem genetycznym, jak i metody jego monitorowania są przedmiotem wielu opracowań z dziedziny transplantologii i hematoonkologii. Mają one istotne znaczenie w ocenie przyjęcia lub odrzucenia przeszczepu, umożliwiają wczesne wykrycie wznowy choroby podstawowej, monitorowanie choroby resztkowej czy choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi [10,14,53,78,88,96,128,142].

Jak wskazują powyższe doniesienia, zjawisko chimeryzmu genetycznego prowadzi z reguły do konwersji profilu genetycznego krwi biorcy w profil dawcy, co może mieć istotne znaczenie w analizach z zakresu genetyki sądowej. Na wynik dowodu z badań DNA może mieć również wpływ ujawnienie mieszanego chimeryzmu genetycznego w różnych materiałach pochodzących od biorców allo-HSCT [42,65,111,153]. Pomimo tego ewentualność alloprzeszczepu zwykle nie jest brana pod uwagę przy wydawaniu opinii na podstawie analizy DNA przeprowadzanej na użytek Sądu, Prokuratury czy Policji.

Wobec powyższego podjęto się przeprowadzenia analizy polimorfizmu DNA u osób po allotransplantacji komórek macierzystych hematopoezy i oceny zagrożenia, jakie niesie ze sobą taka analiza w badaniach z zakresu genetyki sądowej. Materiał badawczy został pobrany od 21 osób, które przeżyły allo-HSCT w następstwie chorób rozrostowych układu krwiotwórczego i chłonnego, mielodysplazji szpiku oraz niedokrwistości aplastycznej. Pobrane od tych osób do analizy – krew,

wymaz i włos – stanowią trzy najczęściej badane materiały w praktyce genetyczno-sądowej [4,18].

Badania zostały przeprowadzone w oparciu o metody badawcze, najbardziej przydatne i aktualnie najczęściej stosowane zarówno w identyfikacji osobniczej, jak i w badaniach pokrewieństwa. W pierwszym etapie wykonano ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym. W badaniach wykorzystano jedną z możliwych aplikacji tej analizy, służącą pomiarowi stężenia matrycowego DNA z wykorzystaniem sondy TaqMan. Zastosowana metoda polega na amplifikacji wybranych fragmentów DNA połączonej z precyzyjnym pomiarem przyrostu produktu PCR. Wyniki odnoszone są do przyrostu produktu PCR w referencyjnych próbach o znanym stężeniu [64]. Technika QR-PCR umożliwia dokładne oszacowanie stężenia DNA, które podlega amplifikacji. Jest to etap o bardzo istotnym znaczeniu dla prawidłowego przebiegu całej analizy. Ma to związek z wąskim zakresem optymalnego stężenia matrycowego DNA, które zapewnia prawidłowy przebieg reakcji PCR typu multipleks. Zarówno zbyt niskie, jak i zbyt wysokie stężenie matrycowego DNA może prowadzić do uzyskania artefaktów, a w następstwie tego do błędnych wniosków [104,138]. Obok zestawu Quantifiler™ Human DNA służącego do pomiaru stężenia całkowitego DNA w badaniach zastosowano również zestaw Quantifiler™ Y Human Male DNA, zawierający startery umożliwiające selektywną amplifikację sekwencji chromosomu Y oraz pomiar męskiego DNA [49]. Zestaw ten został opracowany z myślą o analizie mieszanin, w których żeńskie DNA istnieje w znacznej przewadze nad męskim, jak to ma miejsce zazwyczaj w przypadku wymazów z pochwy pobranych jako materiał dowodowy w sprawach o gwałt [51].

Metoda detekcji sekwencji SRY z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym znalazła również zastosowanie w analizie chimeryzmu przeszczepowego w sytuacji, gdy istnieje różnica płci pomiędzy dawcą a biorcą [85,116,130]. Zastąpiła ona wcześniej stosowaną fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* [74]. W oparciu o metodę FISH Körbling i wsp. [77] wykazali, że przeszczepione komórki macierzyste hematopoezy mogą różnicować się w hepatocyty, komórki nabłonkowe skóry i przewodu żołądkowo-jelitowego. Stosując tę metodę Suratt wsp. [137] udokumentowali występowanie, pochodzących od dawcy, komórek z chromosomem Y w płucach kobiet, które przebyły allo-HSCT. Tran i wsp. [151] jako pierwsi wykazali natomiast – również w oparciu o metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* – obecność donorowego DNA w wymazach nabłonka pobranych z wewnętrznej strony policzków kobiet, które otrzymały alloprzeszczep komórek macierzystych hematopoezy od niezgodnego w zakresie płci dawcy.

Stosując ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym ujawniono sekwencję genu SRY zarówno we krwi, jak i w wymazach z jamy ustnej pobranych od sześciu badanych kobiet, które uzyskały allo-HSCT od męskiego dawcy, oznaczonych kolejnymi numerami 3, 6, 11, 13, 20, 21. Ilość męskiego DNA we krwi badanych kobiet była zbliżona do ilości całkowitego DNA, co wskazuje na zastąpienie krwiotworzenia pacjentek krwiotworzeniem męskiego dawcy. Jest to dobrze znany w transplantologii fakt będący konsekwencją allogenicznego przeszczepu komórek macierzystych hematopoezy [73,90]. W wymazach komórek nabłonka i śliny pochodzących od badanych kobiet ujawniono męskie DNA w znacznie mniejszej ilości w porównaniu do całkowitego DNA, niż to miało miejsce we krwi. Jak się okazało w trakcie dalszych badań, było to wynikiem występowania mieszanego chimeryzmu genetycznego w badanym materiale. Stan mieszanego chimeryzmu jest dobrze udokumentowanym zjawiskiem następującym po allo-HSCT [9,80]. Ocena jego zmian w czasie pozwala na podjęcie odpowiedniej terapii [54,83]. W aspekcie genetyki sądowej detekcja męskiego DNA w reakcji QR-PCR we krwi i wymazach pobranych od kobiet, które uzyskały przeszczep od niezgodnego płciowo dawcy, może błędnie wskazywać na pochodzenie analizowanego materiału od mężczyzny.

W oparciu o ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym sekwencję SRY ujawniono również we włosach pięciu spośród sześciu badanych pacjentek, które uzyskały przeszczep od męskiego dawcy, tj. u pacjentek oznaczonych numerami 3, 6, 11, 13, 20. Oznaczone wartości stężenia świadczą o obecności 5-28 komórek męskich w tle kilkuset-kilku tysięcy komórek biorcy. Bardzo wysoką czułość techniki QR-PCR w detekcji genu SRY wykazali wcześniej inni autorzy. Badania przeprowadzone przez Sieverkropp i wsp. [130] ujawniły istnienie mniej niż czterech sekwencji SRY w obecności 100000 komórek żeńskich. Pujal i Gallardo [116] wykazali, że w oparciu o badanie genu SRY możliwe jest wykrycie męskiego DNA w mieszaninie z żeńskim DNA nawet wtedy, gdy stanowi ono zaledwie 1/1000000 część tej mieszaniny. Ekstremalnie wysoka czułość analizy w reakcji QR-PCR z zastosowaniem sond TaqMan, specyficznych dla sekwencji genu SRY rzędu 0,001-0,0001%, pozwala na detekcję nanochimeryzmu u osób po allo-HSCT.

Paradoksalnie, wysoka czułość techniki QR-PCR stanowi jej ograniczenie. Mankamentem tej metody jest to, że w przypadku śladowej ilości męskiego donorowego DNA obecnego we włosach pacjentek uzyskuje się duże różnice w kolejnych pomiarach tych samych prób. Efektem tego stanu rzeczy było niewykrycie obecności kilku komórek zawierających określone sekwencje w badanym materiale, którego analiza z zastosowaniem metody STR-PCR ujawniła niepowtarzalny profil lub

haplotyp Y w populacji. Brak prawidłowego szacowania stężeń z wykorzystaniem zestawu Quantifiler™ dokumentowali wcześniej Nielsen i wsp. [104]. Walidacja tego systemu, przeprowadzona przez Green i wsp. [49] wykazała, że dolna granica detekcji ludzkiego DNA wynosi 32 pg/ $\mu$ l DNA. Potwierdziła to wykonana na wstępie badań analiza QR-PCR z wykorzystaniem znanych stężeń kontrolnego DNA. Przy kolejnych pomiarach tych samych prób, w których ilość DNA w przeliczeniu na jeden mikrolitr odpowiadała obecności pojedynczych diploidalnych komórek, tj. 5 i 10 pg, nie ujawniono w ogóle DNA bądź uzyskano wskazania kilkakrotnie przekraczające te wartości, co przedstawiono w tabeli 4.1.

W analizie krwi pochodzącej od biorców-mężczyzn, dla których dawcą była kobieta, oznaczonych numerami 1, 10, 12, 16, nie wykazano w ogóle lub wykazano obecność zaledwie 3-7 męskich komórek biorcy w jednym mikrolitrze badanej krwi. Spowodowane to było następującą zwykle po allo-HSCT konwersją profilu biorcy w profil dawcy. Konwersja ta została potwierdzona w następnym etapie badań, w oparciu o analizę markerów mikrosatelitarnego DNA.

Technika multipleks PCR z wykorzystaniem systemu fluorescencyjnej detekcji i automatycznego sekwenatora stanowi obecnie podstawową metodę badawczą, stosowaną w analizach genetyczno-sądowych [27,35,158]. Jest ona również wykorzystywana w detekcji chimeryzmu potransplantacyjnego [19,83,136]. Do oceny ewentualnych konsekwencji przebytego przeszczepu komórek macierzystych hematopoezy dla analiz z zakresu genetyki sądowej wytypowano dwa zestawy markerów STR, stosowanych obecnie najczęściej w tej dziedzinie [110]. Pierwszym z nich był system AmpF $\uparrow$ STR<sup>®</sup> Identifiler™, umożliwiający uzyskanie wysokich wartości siły dyskryminacji w oparciu o jednoczesną amplifikację piętnastu markerów autosomalnego DNA i *locus* płci – AMG [71]. Drugim zastosowanym systemem był AmpF $\uparrow$ STR<sup>®</sup> Yfiler™, obejmujący swym zakresem 17 markerów chromosomu Y [69]. System ten umożliwia selektywną amplifikację męskiego DNA i ujawnienie specyficznego dla określonej męskiej linii rodowej haplotypu Y, nawet przy znacznej przewadze żeńskiego komponentu mieszaniny [39,87,98].

Elektroforetyczny rozdział wyznakowanych fluorescencyjnie fragmentów DNA pozwala na ustalenie ilościowej proporcji sygnałów w obrębie poszczególnych alleli w oznaczonym profilu DNA [78]. Analizie podlegają markery informatywne, co w ujęciu z zakresu analizy chimeryzmu poprzyszczepowego oznacza takie, które zawierają allele różnicujące dawcę od biorcy [144]. Uważa się, że lepszym wskaźnikiem ilościowego udziału jednego rodzaju materiału względem pozostałych jest pole powierzchni piku niż jego wysokość [126]. Udokumentowano,



że istnieje liniowa zależność między polem powierzchni pików a ilością produktu PCR, korelującego z określoną liczbą komórek [123]. Zależność tę opisali stosownymi wzorami zarówno Nollet i wsp. [105], Thiede i wsp. [146], jak też Shneider i wsp. [126]. Obliczanie procentowego udziału DNA dawcy w badanych materiałach pochodzących od biorcy allo-HSCT, na podstawie wartości pola powierzchni zaobserwowanego sygnału – pików pod określonym allelem, było istotnym elementem analizy.

W wyniku przeprowadzonej oceny chimeryzmu donorowego w zakresie markerów autosomalnego DNA we krwi większości pacjentów (90.5%) ujawniono wyłącznie profil dawcy. Pozostaje to w zgodzie z badaniami innych autorów. Thiede i wsp. [147] oznaczyli we krwi 13 badanych pacjentów, którzy przebyli allogeniczny przeszczep komórek macierzystych hematopoezy, chimeryzm donorowy w przedziale 99-100%. Podobnie Dauber i wsp. [32] ujawnili we krwi pacjentów po allotransplantacji zamianę profilu genetycznego biorcy na profil dawcy.

Mieszany profil genetyczny z przewagą frakcji donorowej, stanowiącej odpowiednio 63% oraz 75%, wykazano we krwi tylko dwóch biorców allo-HSCT, z których jeden był poddany niemielo-, a drugi mieloablacyjnemu kondycjonowaniu. W literaturze stan taki jest opisywany częściej po zastosowaniu kondycjonowania niemieloablacyjnego zwanego kondycjonowaniem o zredukowanej intensywności, które nie niszczy komórek szpiku biorcy, jest natomiast silnie immunosupresyjne i powoduje stopniową eliminację komórek biorcy i zastępowanie ich komórkami hematopoezy dawcy [36,120,166].

W przypadku niezgodnych w zakresie płci par dawca-biorca, wykrycie w *locus* amelogeniny sekwencji chromosomu Y błędnie wskazywało na obecność męskiego DNA na podstawie badania krwi żeńskiego biorcy. Natomiast nieoznaczenie sekwencji genu AMG-Y we krwi mężczyzny-biorcy błędnie wskazywało na płć żeńską. Co więcej, możliwość zafalszowania tożsamości osoby oraz wydania błędnej ekspertyzy genetyczno-sądowej wchodzi w grę nie tylko w przypadku badania krwi kobiety, dla której dawcą był mężczyzna bądź krwi mężczyzny, dla którego dawcą była kobieta, ale również w przypadku badania krwi mężczyzny, który uzyskał przeszczep od innego niespokrewnionego z nim mężczyzny.

Krew należy do najczęściej badanych materiałów w analizach kryminalistycznych. W Kodeksie postępowania karnego w art. 74 § 2-3, jak również w art. 308 § 1 jest mowa o tym, że organy procesowe mogą zlecać pobranie krwi i wydzielin od każdego, niezależnie od jego zgody [156]. W myśl obecnie obowiązujących przepisów prawnych dopuszcza się

pobranie krwi lub innych wydzielin organizmu nie tylko od oskarżonych, ale również od podejrzanych [156]. Uzyskany profil genetyczny zostaje wprowadzony do policyjnej bazy danych i porównywany ze zgromadzonymi w tej bazie profilami. Do bazy wprowadzane są również profile DNA oznaczone w śladach biologicznych, zabezpieczanych na miejscach przestępstw, czy też profile DNA pochodzące od osób i zwłok ludzkich o nieustalonej tożsamości [156,157].

Pomimo zagrożenia wynikającego ze zmiany profilu genetycznego biorcy alloprzeszczepu na profil dawcy nie uwzględnia się możliwości przebycia tego zabiegu przez osobę oddającą krew jako materiał do analizy kryminalistycznej. Żaden z dostępnych autorce pracy protokołów pobrania materiału do celów identyfikacyjno-porównawczych nie zawierał oświadczenia osoby oddającej materiał, w którym stwierdzałyby ona, że nie przeżyła allotransplantacji komórek macierzystych szpiku. W świetle uzyskanych wyników istotne jest uzupełnienie wyżej wymienionych protokołów o takie oświadczenie. Ponadto przy wprowadzaniu ujawnionego w oparciu o badanie krwi profilu DNA osoby oskarżonej czy podejrzanej do systemu informatycznego policyjnej bazy danych, uzasadnione jest zastosowanie procedury weryfikującej możliwość przebycia zabiegu allotransplantacji komórek macierzystych przez tę osobę.

Biorąc pod uwagę wyniki uzyskanych badań i aktualnie obowiązujące przepisy prawne, które zalecają, aby „gromadzenie, utrwalanie i analiza materiału dowodowego były dokonywane zgodnie z aktualną wiedzą w zakresie kryminalistyki i medycyny sądowej” [157], zasadnym jest również podjęcie bardziej radykalnego kroku – odstępianie od pobierania krwi jako wyłącznego materiału do badań identyfikacyjno-porównawczych.

Zważywszy, że ślady krwi są najczęściej zabezpieczanym materiałem dowodowym w najcięższych przestępstwach przeciwko życiu i zdrowiu ludzkiemu oraz że genetyka sądowa pozwala obecnie na badanie śladów biologicznych, jakie zabezpieczono kilkanaście lat temu, kiedy nie nadawały się one do badań ówczesnymi metodami serologii klasycznej, może się zdarzyć, że osoba po udanym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy pozostanie bezkarna. Wynikać to będzie z faktu, iż profil DNA w plamie krwi pozostawionej przez tę osobę na miejscu zdarzenia kryminalnego przed allotransplantacją nie będzie zgodny z jej profilem, oznaczonym po przebyciu allo-HSCT i figurującym w bazie danych. Może zaistnieć również sytuacja, w której profil DNA osoby, oznaczony przed allotransplantacją, będzie niezgodny z profilem ujawnionym w świeżym śladzie krwi pozostawionym przez tę osobę po przebyciu allo-HSCT.

Poza aspektem kryminalistycznym krew jest ciągle jeszcze stosunkowo często pobieranym materiałem w analizie pokrewieństwa, której znaczny odsetek stanowi dochodzenie spornego ojcostwa. W kilku ośrodkach badań z zakresu genetyki sądowej, posiadających stosowne uprawnienia i certyfikaty do opiniowania na użytek Sądów i Prokuratur, jedynym materiałem pobieranym w analizach ojcostwa jest krew. O ile opinia potwierdzająca ojcostwo, z uwagi na ekstremalny polimorfizm 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 wcześniej zabiegowi transplantacji komórek macierzystych hematopoezy, pochodzących od niespokrewnionego z nim męskiego dawcy, i zataił ten fakt w trakcie oddania krwi do badania. Wśród 21 analizowanych pacjentów w dwóch przypadkach taka sytuacja hipotetycznie mogłaby się zdarzyć. Pacjenci-mężczyźni, oznaczeni numerami 9 i 19, otrzymali allo-HSCT od niespokrewnionych z nimi mężczyzn i w wyniku tego profil DNA oznaczony w ich krwi odpowiadał profilowi dawcy, co przedstawiają ryciny 4.26.2A i 4.36.2A. Fałszywe wyłączenie ojcostwa jest możliwe również wtedy, gdy we krwi biologicznego ojca po allo-HSCT zamiast jego profilu zostanie ujawniony profil spokrewnionego z nim dawcy, którym jest np. jego brat [15]. Hipotetycznie mogłoby to mieć miejsce w odniesieniu do pacjentów nr 2 i 8 (rycina 4.19.2A, 4.25.2A).

Gdyby taka sytuacja zaistniała, to ekspertyza genetyczno-sądowa mogłaby niesłusznie wyłączyć ojcostwo badanego mężczyzny na podstawie badania profilu nie tego mężczyzny, a na podstawie badania profilu DNA dawcy przeszczepu. Wykluczenie to spowodowałoby dalsze skutki prawne ze 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, choć zwykle taka decyzja wiązałaby się z koniecznością pokrycia kosztów ekspertyzy przez stronę kwestionującą wynik, co mogłoby okazać się przeszkodą w kontynuacji badań. W praktyce opiniodawczej autorki pracy nie odnotowano przypadku, w którym przed wydaniem ostatecznego wyroku Sądu w tego typu sprawie istotny element procesowy stanowiłaby dokumentacja medyczna, która wykluczałaby ewentualność wcześniejszego przebycia przez pozwanego o ojcostwo alloprzeszczepu komórek macierzystych hematopoezy.

W świetle uzyskanych wyników należy stwierdzić, że wykluczenie ojcostwa niesie ze sobą bezwzględną konieczność przeprowadzenia powtórnego badania kontrolnego w oparciu o inny materiał niż krew.

Skala zagrożenia, jaką niesie udokumentowana w pracy zmiana profilu genetycznego we krwi biorcy alloprzeszczepu komórek macierzystych hematopoezy na profil dawcy, uprawnia ponadto do wnioskowania o odstąpienie od pobierania krwi w analizach pokrewieństwa, w tym w dochodzeniu spornego ojcostwa.

Obowiązujące przepisy prawne zawarte w art. 74 § 2-3 Kodeksu postępowania karnego [156], po nowelizacji z roku 2003 [154], jak i w art. 15 Ustawy o Policji [157], po nowelizacji z roku 2004 [155], 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 podejrzanej, nawet mimo braku jej zgody. W myśl art. 192a Kodeksu postępowania karnego włosy, ślinę i wymazy ze śluzówki policzków można również pobrać od świadków „w celu ograniczenia kręgu osób podejrzanych lub ustalenia wartości dowodowej ujawnionych śladów” [154,155,156,157].

Z uwagi na wynikającą z przytoczonych przepisów prawnych istotną dowodową wartość, przedmiotem badań poza krwią stały się wymazy komórek nabłonka ze śluzówki policzków oraz włosy, pochodzące od osób, które przebyły zabieg allogeniczej transplantacji komórek macierzystych hematopoezy. Oba te rodzaje śladów biologicznych są bardzo często zabezpieczanymi materiałami w analizach genetyczno-sądowych [4,18,38].

Komórki nabłonka błony śluzowej jamy ustnej, których fizjologiczne złuszczenie jest wspomagane ciągłym przepływem śliny, stanowią istotny materiał dowodowy w analizach identyfikacyjno-porównawczych. Zabezpieczany jest on w wyniku rozpuszczenia się śliny ludzkiej w płynach lub jej kontaktu z przedmiotem, takim jak np. szklanka, ustnik papierosa, maska, koperta w miejscu klejenia, bądź w wyniku kontaktu z inną osobą, jak np. w śladach będących wynikiem pogryzienia [17,21,103,109]. Materiał ten jest z reguły doskonałym źródłem genomowego DNA, dlatego określany jest mianem „niewidocznego sprzymierzeńca wymiaru sprawiedliwości”.

Wymaz komórek nabłonka z jamy ustnej jest również aktualnie najczęściej zabezpieczanym materiałem do badań porównawczych oraz do analiz pokrewieństwa ze względu na nieinwazyjną i nieskomplikowaną procedurę pobrania.

Podczas badania przeprowadzonego w zakresie markerów autosomalnego DNA ujawniono w wymazach z jamy ustnej 16 spośród 21 badanych pacjentów mieszaninę DNA, która odpowiada w terminologii hematologicznej chimeryzmowi mieszanemu. Ocena stopnia chimeryzmu mieszanego i jego zmian w czasie pozwala na przewidzenie niekorzystnych następstw związanych z allotransplantacją, tj. zbliżającego się odrzucenia przeszczepu, reakcji GVHD czy wznowy choroby podstawowej. Umożliwia wczesne podjęcie odpowiednich strategii terapeutycznych, takich jak infuzja limfocytów dawcy czy modyfikacja leczenia immunosupresyjnego, które mogą zapobiec niekorzystnym następstwom przeszczepu [73,74]. Stwierdzone wyniki analizy wymazów pochodzących od badanych biorców allo-HSCT, w których oznaczono wyłącznie własny DNA (5 pacjentów) bądź chimeryzm donorowy mieszczący się w przedziale 11-67% (mediana 24%), są zbliżone do wyników badań Thiede i wsp. [147]. Wykazali oni istnienie chimeryzmu donorowego w przedziale 5-63% (mediana 21%) na podstawie analizy wymazów pochodzących od trzynastu biorców alloprzeszczepu.

Co interesujące, Endler i wsp. [42] ujawnili, że DNA wyizolowane z popłuczyn jamy ustnej biorców allo-HSCT bardzo często wykazuje wyłącznie donorowy profil. 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 GVHD w obrębie jamy ustnej [66].

Uzyskane wyniki pozostają w sprzeczności z powszechnie obowiązującym dogmatem, na którym opiera się analiza z zakresu genetyki sądowej. Dogmat ten mówi, że w każdej tkance ludzkiej obecny jest identyczny DNA, który nie zmienia się w czasie życia osobniczego. Z wyjątkiem bliźniąt jednojajowych wszyscy ludzie posiadają unikalny profil DNA [72]. Każdy rodzaj śladu biologicznego – krew, nasienie, ślina, włos czy też ślad kontaktowy, pozostawiony na miejscu przestępstwa przez określoną osobę, stanowi źródło profilu DNA tej osoby [4,18,129]. Dzięki temu profil DNA, zidentyfikowany np. w dowodowej plamie krwi, może być porównywany z profilem oznaczonym w wymazie komórek nabłonka i śliny, pochodzącym od sprawcy przestępstwa. W szczególnych przypadkach dogmat ten może zostać obalony. Pierwszy z nich dotyczy chimerycznych bliźniąt, u których obserwuje się odmienne profile genetyczne na skutek częściowej wymiany komórek w czasie życia płodowego [33,91]. Drugi przypadek dotyczy podejmowanego w pracy zagadnienia, jakim jest zróżnicowanie genetyczne w obrębie różnych tkanek pochodzących od osób po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopojezy.

Zróznicowanie to wiąże się ściśle ze zjawiskiem plastyczności przeszczepianych komórek macierzystych szpiku. Zjawisko plastyczności oznacza, że komórka macierzysta jednej tkanki może różnicować się w komórkę innej tkanki. Wykazano, że podobnie jak komórki macierzyste pochodzące z wczesnego stadium zarodka, dojrzałe komórki macierzyste szpiku – poza właściwościami unipotencjalnymi – mogą mieć również właściwości pluriotencjalne, tj. mogą dawać początek każdemu typowi tkanek o pochodzeniu nie tylko mezodermalnym, ale również ekto- i endodermalnym [52,108]. Przeszczepiane komórki macierzyste hematopoezy różnicują się w wyspecjalizowane typy tkanek i narządów dorosłego organizmu, tworzących poza komórkami krwi i układu odpornościowego również m.in. komórki tkanki nerwowej, mięśnia sercowego, kości, chrząstki, wątroby, trzustki, płuc, zastawek serca [45,52,59,163]. Komórki macierzyste hematopoezy mogą zasiedlać również naskórek i wytwarzać białka charakterystyczne dla keranocytów oraz przekształcać się w komórki nabłonka [1,77].

Jednym z dowodów świadczących o plastyczności somatycznych komórek macierzystych jest zjawisko mieszanego chimeryzmu genetycznego, występującego w obrębie różnych tkanek osoby, która przeżyła allogeniczny przeszczep komórek macierzystych szpiku. Körbling i wsp. [77] badając sześć kobiet, które uzyskały allo-HSCT od niezgodnego w zakresie płci dawcy, ujawnili obecność chromosomu Y w dojrzałych hepatocytach oraz komórkach nabłonka skóry i przewodu żołądkowo-jelitowego. Surrat i wsp. [137] ujawnili męskie komórki donorowe w obrębie komórek nabłonka i śródbłonka płuc czterech kobiet po allo-HSCT w oparciu o metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. Tę samą metodę i strategię badawczą polegającą na analizie materiałów pochodzących od kobiet, które uzyskały komórki macierzyste szpiku w wyniku ich transplantacji od mężczyzn, zastosowali również Tran i wsp. [151]. Przeprowadzili oni analizę chimeryzmu donorowego w komórkach nabłonka, pochodzących z zeszkobin policzkowych pięciu pacjentek, po około 4-5 latach od allogenicznego przeszczepu komórek macierzystych hematopoezy. Domieszka męskiej frakcji donorowej w badanym materiale wynosiła 1,4-11%.

Przedstawione w pracy wyniki w zakresie markerów autosomalnego DNA świadczą o tym, że wymaz komórek nabłonka i śliny, pobrany z jamy ustnej biorców allo-HSCT, nie jest idealnym materiałem referencyjnym w badaniach genetyczno-sądowych. Ma to związek ze stwierdzonym w tym materiale, u większości badanych, mieszanym chimeryzmem genetycznym, charakteryzującym się obecnością dwóch frakcji genomowego DNA – frakcji pochodzącej od biorcy, jak i frakcji pochodzącej od dawcy alloprzeszczepu.

Analiza mieszanego materiału genetycznego to częsta praktyka w badaniach z zakresu genetyki sądowej [94]. Ujawniany jest on w wyniku zmieszania wydzielin i płynów ustrojowych różnych osób. Mieszaninę DNA może stanowić wymaz z pochwy zgwałconej kobiety, niedopałek papierosa palonego przez kilka osób czy też fragmenty tkanek pozostałych po zabiegu aborcji. Jeśli ślad biologiczny zawiera komórki pochodzące od więcej niż jednej osoby, to wyodrębnienie profilu DNA każdej z nich może sprawiać istotny problem [125].

W świetle uzyskanych wyników należy spodziewać się, że ślad śliny, który biorca alloprzeszczepu pozostawiłby na miejscu zdarzenia kryminalnego, z dużym prawdopodobieństwem wykazałby mieszany, trudny do interpretacji profil genetyczny. Profil ten mógłby uniemożliwić identyfikację osobniczą.

Brak możliwości identyfikacji osobniczej oraz fałszywe oznaczenie płci niesie ze sobą również analiza markerów chromosomu Y w wymazach kobiet, które uzyskały allo-HSCT od męskich dawców. Zastosowany w analizie markerów chromosomu Y system AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$  Yfiler $\mathbb{T}$  skupiający najszerszą ich paletę, jest niezwykle użyteczny w badaniach z zakresu genetyki sądowej [98]. Pozwala na ustalenie, od kogo pochodzi męska frakcja DNA wtedy, gdy analiza markerów autosomalnych nie jest w stanie tego uczynić. Z taką sytuacją spotykamy się badając mieszaniny genetyczne, w których żeńskie DNA występuje w bardzo wysokiej przewadze nad męskim [87,89].

Pełny siedemnastolocusowy haplotyp Y ujawniono w wymazach z jamy ustnej wszystkich sześciu pacjentek, niezgodnych w zakresie płci z biorcą, dzięki selektywnej amplifikacji męskiego DNA o stężeniu 0,96-19,16 ng/ $\mu$ l. Badanie śladów śliny o analogicznym pochodzeniu błędnie sugerowałoby, że pochodzą one od mężczyzny, a nie – jak było w istocie – od kobiety.

Analiza wymazów komórek nabłonka i śliny, pobranych od dwóch mężczyzn-biorców, którzy uzyskali alloprzeszczep 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 od jednego mężczyzny.

Zatem realne jest zagrożenie, że profil genetyczny ujawniony w plamie śliny pochodzącej od biorcy alloprzeszczepu, który wszedł w konflikt z prawem, będzie stanowił swoiste alibi zapewniające mu bezkarność.

O ile badanie plamy śliny jako materiału dowodowego w zakresie markerów autosomalnego DNA niesie ze sobą możliwość błędnej identyfikacji osoby, o tyle analogiczne badanie komórek nabłonka pobranych w charakterze materiału referencyjnego jest obarczone mniejszym ryzykiem. W wymazach pochodzących od pięciu spośród 21 badanych pacjentów (23,8%) ujawniono wyłącznie ich własny, autologiczny DNA w oparciu o system AmpF $\Phi$ STR<sup>®</sup> Identifier<sup>™</sup>. Reszta pacjentów wykazywała w wymazach domieszkę donorowego DNA o średniej zawartości 36,2% (mediana 35%). Zatem w trakcie przeprowadzonej zarówno do celów identyfikacyjno-porównawczych, jak i do celów ustalania ojcostwa analizy wymazu pochodzącego od biorcy alloprzeszczepu, z dużym prawdopodobieństwem oznaczymy mieszany profil DNA. Przy odrzuceniu możliwości kontaminacji materiału sytuacja taka stanowiłaby informację dla biegłego o zaistniałym fakcie chimeryzmu genetycznego u badanej osoby i skutkowałaby koniecznością powtórzenia analizy w oparciu o inny materiał, pobrany od tej samej osoby. Nie stwarzałaby natomiast ryzyka popełnienia pomyłki, jaką niesie badanie krwi biorcy allogenicznego przeszczepu komórek macierzystych hematopojezy.

W świetle uzyskanych wyników wymaz z jamy ustnej jest lepszym źródłem materiału referencyjnego do celów analizy genetyczno-sądowej niż krew, ale nie idealnym.

Ostatnim poddawany analizie DNA materiałem, pochodzącym od biorców allo-HSCT, były włosy, które zostały pobrane przez wyrwanie. Tylko w kilku korzeniach badanych włosów stwierdzono cebulkę. Większość włosów poza częścią korową i rdzenną miała zachowane pochewki włosa – wewnętrzną i zewnętrzną. W obrazach mikroskopowych stwierdzono komórki nabłonkowe zawierające jądra komórkowe. W ocenianych preparatach nie ujawniono elementów morfotycznych krwi.

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 kilkaset. Z powyższych przyczyn stanowią one bardzo istotny rodzaj śladu biologicznego, zabezpieczanego często na miejscu zdarzenia kryminalnego. Włosy ujawniane w ręku ofiary, na odzieży, na narzędziach zbrodni czy też pozostawione przez sprawcę na miejscu przestępstwa są niejednokrotnie kluczowym materiałem dowodowym w procesie karnym. Stanowią cenne źródło wiedzy, które dzięki zastosowaniu wysoce czułych technik genetycznych może wskazać winnego lub uwolnić od podejrzeń osobę niesłusznie oskarżoną. Włosy posiadające korzeń można poddać analizie z wykorzystaniem markerów genomowego DNA, identycznych z tymi, jakich używa się podczas analizy krwi czy śliny. Do uzyskania



niepowtarzalnego w populacji osobniczego profilu genetycznego wystarcza jedna cebulka, a nawet pojedyncze komórki jądrzaste włosa [38,106].

Włosy pobrane po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy wykorzystywane są w transplantologii jako materiał referencyjny, odpowiadający autologicznemu profilowi biorcy, czyli jego profilowi przed alloprzeszczepem [121]. Uważa się powszechnie, że jest to jedyna tkanka biorców allo-HSCT całkowicie pozbawiona chimeryzmu donorowego, a tym samym nie podlegająca zjawisku plastyczności przeszczepianych komórek szpiku. Rovó i wsp. [118] przeprowadzili analizę chimeryzmu we włosach 115 pacjentów po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy. Wszyscy badani pacjenci posiadali we krwi pełny profil dawcy. Analiza genomowego DNA, wyekstrahowanego z 50 włosów wraz z cebulkami wrywanych kolejno z głowy każdego ze 115 badanych biorców, nie wykazała w żadnym przypadku domieszki donorowego DNA. We włosach wszystkich pacjentów ujawniono wyłącznie profil biorcy, który w terminologii hematologicznej określa się mianem 100% chimeryzmu biorcy. Wyłączny chimeryzm biorcy we włosach pacjentów ujawnili też Hong i wsp. [63]. Również Dauber i wsp. [32,33] wykazali, że włosy pochodzące zarówno od chimerycznych bliźniąt, jak i biorców allo-HSCT, jako jedyna spośród analizowanych tkanek, zawierają czysty profil DNA biorcy.

Wyniki powyższych badań są zaskakujące, zwłaszcza jeśli weźmie się pod uwagę, że włosy są najszybciej wzrastającą tkanką, podlegającą procesowi ciągłej regeneracji. Proces ten zachodzi w warstwie podstawnej naskórka w wyniku intensywnych przemian metabolicznych i podziałów komórkowych. W wyniku tych dynamicznych procesów stare włosy zostają wypchnięte ku górze i obumierają, a ich miejsce zastępują nowe. Mieloablacyjne, wysokotoksyczne przygotowanie do przeszczepu, związane z chemioterapią oraz napromienieniem ciała pacjenta, poza innymi niepożądanymi objawami [55] powoduje często przejściowe opóźnienie lub zahamowanie wzrostu paznokci czy włosów. W wyniku przyjęcia przeszczepu i trwałej remisji choroby następuje odnowienie prawidłowej funkcji komórek macierzystych szpiku, a tym samym wzmożony proces odnowy uszkodzonych tkanek [67]. Badania fragmentów paznokci pochodzących od osób po allogenicznym przeszczepie wykazują znaczny odsetek chimeryzmu donorowego [32,111]. Ponieważ jest to tkanka o wspólnym ektodermalnym pochodzeniu z włosem oraz podobnych biologicznych cechach, związanych z ciągłym wzrostem i odnową, nieujawnienie jak dotąd chimeryzmu donorowego we włosach biorców było trudne do wyjaśnienia.

Analiza polimorfizmu DNA we włosach badanych pacjentów, wykonana w zakresie piętnastu *loci* genomowego DNA i *locus* AMG wchodzących w skład systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Identifier $\text{\textsuperscript{TM}}$ , ujawniła wyłącznie profil genetyczny biorcy, bez domieszki donorowego DNA. Uzyskane wyniki potwierdzają, że włos może być traktowany jako dobry materiał referencyjny, a tym samym może być wykorzystany w analizie genetyczno-sądowej jako źródło własnego autosomalnego profilu DNA pacjenta po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych szpiku.

W świetle powyższych badań wprowadzenie profilu autosomalnego DNA do policyjnej bazy danych powinno być poprzedzone analizą genetyczną przeprowadzoną w oparciu o dwa niezależne materiały, z których jednym byłby wyrwany z korzeniem włos.

Niespodziewane rezultaty badań uzyskano w drugim ich etapie, kiedy DNA pochodzące z włosów kobiet, dla których dawcą był mężczyzna, poddano amplifikacji z wykorzystaniem markerów chromosomu Y wchodzących w skład systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Yfiler $\text{\textsuperscript{TM}}$ . W praktyce badawczej z zakresu genetyki sądowej zestaw ten okazał się być niezwykle czułym, pozwalającym na detekcję pełnego siedemnastolocusowego haplotypu Y, począwszy już od 100 pg męskiego DNA oraz częściowego haplotypu Y przy mniejszej ilości matrycowego DNA dodawanego do reakcji PCR. Świadczy o tym amplifikacja kontrolnego DNA pochodzącego z męskiej linii komórkowej, przedstawiona na rycinie 4.39. Bardzo zbliżone rezultaty do zaprezentowanych w pracy uzyskał wcześniej Gross i wsp. [51], którzy pełny haplotyp Y w zakresie systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Yfiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  ujawnili w oparciu o amplifikację 125 pg matrycy, a dziewięciolocusowy haplotyp Y począwszy od ilości 60 pg męskiego DNA.

Szczególnie istotna jest wysoka specyficzność systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Yfiler $\text{\textsuperscript{TM}}$ , umożliwiająca detekcję śladowej ilości męskiego DNA w sytuacji bardzo wysokiej przewagi żeńskiego materiału genetycznego. Analiza mieszanin przeprowadzona przez Mayntz-Press i Ballantyne [89] wykazała, że detekcja męskiego komponentu mieszaniny jest możliwa nawet wtedy, gdy występuje on w proporcji do żeńskiego jak 1 : 4000, a według Mulero i wsp. [98] nawet jak 1 : 8000.

Podobny poziom czułości i specyficzności systemu AmpF $\mathbb{L}$ STR $\text{\textcircled{R}}$  Yfiler $\text{\textsuperscript{TM}}$  ujawniła analiza DNA we włosach sześciu badanych kobiet, które przeszły allotransplantację komórek macierzystych szpiku pochodzących od męskiego dawcy. Skutkowała ona oznaczeniem haplotypu Y-STR w komórkach włosa wszystkich sześciu badanych kobiet, przy czym pełny siedemnastolocusowy haplotyp Y ujawniono we włosach czterech z nich, co dokumentują ryciny: 4.41.2C, 4.42.2C, 4.45.2C, 4.47.2C. Jak wynika

z wcześniej przeprowadzonej analizy sekwencji SRY z użyciem reakcji PCR czasie rzeczywistym, oznaczenie kompletnego haplotypu Y męskiego dawcy we włosach pacjentek nastąpiło w wyniku amplifikacji zaledwie 30-170 pg męskiego DNA w obecności 4,31-18,46 ng całkowitego DNA, co dokumentuje tabela 4.2. Oznaczona ilość DNA przekłada się na obecność zaledwie 5-28 kopii sekwencji chromosomu Y zawartych w takiej samej liczbie męskich komórek, przypadających na kilkaset-kilka tysięcy żeńskich komórek biorcy.

Udokumentowany w toku przeprowadzonych badań fakt ujawnienia obecności donorowego DNA we włosach pacjentek po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych szpiku jest pierwszym do tej pory opublikowanym. Mimo wysiłków kilku zespołów badawczych z całego świata, w oparciu o badania ogółem 149 pacjentów po allo-HSCT, jak dotąd nikomu wcześniej nie udało się wykazać frakcji donorowego DNA we włosach biorców. [32,63,118]. Dlatego sądzono, że przeszczepiane komórki macierzyste hematopoezy nie są w stanie różnicować się w komórki zdolne do odnowy i regeneracji uszkodzonych włosów.

W świetle wiedzy z zakresu genetyki sądowej przyczyna tego stanu rzeczy jest stosunkowo prosta do wyjaśnienia. Zastosowanie metody badawczej, opartej na analizie autosomalnego DNA w połączeniu ze śladową ilością donorowego DNA, występującego w proporcji do DNA biorcy jak jeden do kilkuset czy jak jeden do kilku tysięcy, skutkowało nieoznaczeniem tego pierwszego we włosach biorców. Jak wynika z praktyki badawczej autorki pracy, a także z opracowań podejmujących to zagadnienie, prawdopodobieństwo ujawnienia profilu dwóch osób w mieszaninie, gdzie DNA jednej z nich występuje w znacznej przewadze nad DNA drugiej, jest znikome podczas analizy markerów autosomalnego DNA [51,87]. Przy dużej ilości materiału jednej z osób następuje inhibicja amplifikacji śladowego składnika mieszaniny. Jego detekcja jest możliwa tylko w szczególnej sytuacji. Śladowe DNA występujące w tle przeważającej ilości żeńskiego DNA musi pochodzić od mężczyzny. Z sytuacją taką mamy zwykle do czynienia w przypadku wymazu z pochwy kobiety, który jest materiałem dowodowym w sprawie o gwałt [89,115].

Istnieją dwa rodzaje analizy genetycznej, które umożliwiają wysoce czułą i specyficzną detekcję męskiego DNA w oparciu o znakowanie fluorescencyjne. Jedną z nich to metoda QR-PCR z wykorzystaniem nowoczesnej technologii TaqMan do ilościowego oznaczenia sekwencji genu SRY, determinującego płęć męską [49]. Drugą to metoda STR-PCR typu multipleks w wariacie specyficznej amplifikacji sekwencji chromosomu Y. Obie wymienione metody zostały zastosowane w badaniach. Pozwoliło to na wykazanie po raz pierwszy, że włosy

pacjentek po allo-HSCT nie są pozbawione donorowego DNA, którego źródłem są przeszczepiane komórki szpiku dawcy.

Kontrolna analiza DNA pochodzącego z materiału pobranego przed przeszczepem wykluczyła ewentualność, że źródłem męskiej frakcji we włosach badanych kobiet były komórki, które przedostały się do ich krwioobiegu i innych tkanek przed allotransplantacją wskutek wrodzonego chimeryzmu bliźniaczego lub płodowo-matczynego [82,135,141].

Nie stwierdzono też zależności między rodzajem zastosowanego kondycjonowania oraz między źródłem przeszczepianych komórek macierzystych hematopoezy a obecnością donorowego DNA we włosach badanych pacjentek. U trzech z nich zastosowano bowiem przygotowanie mieloablacyjne, u dwóch niemieloablacyjne, a u jednej zarówno mielo-, jak i niemieloablacyjne. Źródłem komórek macierzystych u połowy z nich był szpik kostny, a u drugiej połowy krew obwodowa, co dokumentuje tabela 3.1.

Ujawniona obecność DNA donorowego w komórkach włosów biorców po alloprzeszczepie 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. W szczególnej sytuacji badanie włosa, podobnie jak badanie krwi i wymazu, niesie ze sobą ryzyko błędnej interpretacji płci oraz zafałszowania wyników analizy genetycznej przeprowadzanej dla celów sądowych. Wysoka czułość i specyficzność stosowanych w tej analizie zestawów do amplifikacji markerów chromosomu Y umożliwia detekcję sekwencji SRY oraz haplotypu Y-STR w komórkach włosa kobiet, które uzyskały przeszczep komórek macierzystych hematopoezy od mężczyzn, podobnie jak w komórkach ich krwi czy też nabłonka z jamy ustnej.

W świetle uzyskanych wyników ślady biologiczne, zabezpieczone z miejsc kryminalnych zdarzeń, nie powinny być poddawane wyłącznej analizie z wykorzystaniem specyficznych sekwencji chromosomu Y, z odstępniem od analizy autosomalnego DNA.

Brak komórek krwi w preparatach mikroskopowych badanych włosów może świadczyć o plastyczności przeszczepianych komórek macierzystych dawcy, które uległy przekształceniu w komórki nabłonkowe włosów biorców allo-HSCT powodując regenerację ich struktury, uszkodzonej w wyniku zabiegów przygotowujących do przeszczepu.

## 7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań, których celem było udokumentowanie skali zagrożenia, jakie w zakresie genetyki sądowej niesie ze sobą badanie krwi, wymazu z jamy ustnej i włosa, pochodzących od osoby po allogenicznym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy oraz przeprowadzonej na podstawie tych badań oceny uzyskanych wyników, można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Allogeniczny przeszczep komórek macierzystych hematopoezy niesie ze sobą ryzyko zafałszowana tożsamości osoby i wydania błędnej ekspertyzy genetyczno-sądowej.
2. Z uwagi na zachodzącą w większości przypadków pełną konwersję profilu genetycznego we krwi biorcy na profil dawcy, zasadnym jest odstępianie od wyłącznego pobierania krwi zarówno w badaniach pokrewieństwa, jak i w badaniach identyfikacyjnych.
3. Obecność mieszaniny DNA dawcy i biorcy w wymazach komórek nabłonka z jamy ustnej biorców może w praktyce genetyczno-sądowej utrudnić identyfikację osobniczą biorcy alloprzeszczepu na podstawie analizy śladu biologicznego o podobnym pochodzeniu.
4. W aspekcie badań porównawczych i analiz pokrewieństwa stwierdzenie mieszaniny DNA w wymazie nie wiąże się z niebezpieczeństwem pomyłki, niesie natomiast ze sobą konieczność powtórzenia analizy w oparciu o inny materiał, jak np. włos.
5. Ujawnienie śladowej ilości donorowego DNA we włosach biorców allo-HSCT nie dyskryminuje włosa jako dobrego materiału referencyjnego. Stanowi on źródło własnego profilu DNA biorcy, jeśli jest badany w zakresie markerów autosomalnego DNA.
6. 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.
7. Istotną kwestią jest uzupełnienie protokołów pobrania materiału do celów identyfikacyjno-porównawczych o oświadczenie osoby oddającej materiał do badań, dotyczące kwestii ewentualnego przebycia przez nią allo-HSCT.
8. Wprowadzenie profilu DNA do policyjnej bazy danych powinno być poprzedzone analizą genetyczną, przeprowadzoną w oparciu o dwa niezależne materiały: pierwszy – wymaz z jamy ustnej lub krew oraz drugi – włos.

## 8. Streszczenie

W chwili obecnej komórki macierzyste wykorzystywane są do autologicznych i allogenicznych przeszczepów w leczeniu ponad 70 schorzeń. Transplantacje przeprowadza się przede wszystkim w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego, w tym ostrych i przewlekłych białaczkach szpikowych, w chorobach rozrostowych układu chłonnego – chłoniaku, ziarnicy złośliwej, w szpiczaku plazmocytowym oraz w ciężkich postaciach anemii aplastycznej [62]. Kolejną grupą wskazań do przeszczepów są też inne choroby komórki macierzystej – genetycznie uwarunkowane defekty prowadzące do ciężkich niedoborów odporności. Transplantacja komórek macierzystych hematopoezy jest również coraz częściej stosowana do leczenia nowotworów litych, takich jak rak nerki, sutka czy jajnika, z wykorzystaniem reakcji przeszczep przeciwko guzowi [36].

Pacjenci po przeszczepieniu allogenicznych komórek macierzystych, zwłaszcza ci poddani coraz częściej stosowanej obecnie, mniej toksycznej metodzie niemieloablacyjnego przygotowania do przeszczepu, w początkowym okresie po allo-HSCT wykazują zazwyczaj mieszany chimeryzm. W późniejszym okresie, kiedy krwiotworzenie biorcy zostaje całkowicie zastąpione przez krwiotworzenie dawcy, występuje u nich pełny chimeryzm [166].

Powyższy fakt istnieje w sprzeczności z powszechnie uznawanym dogmatem, który mówi, iż wszystkie tkanki pochodzące od tej samej osoby zawierają identyczny wzór DNA, i że wzór ten nie zmienia się w ciągu życia osobniczego. Dogmat ten leży u podstaw analizy z zakresu genetyki sądowej. Warunkuje on porównywanie profilu DNA, ujawnionego np. w plamie krwi zabezpieczonej na miejscu zdarzenia kryminalnego, z profilem podejrzanego oznaczonym w wymazie komórek nabłonka z jamy ustnej.

Kwestia występowania chimeryzmu poprzyszczepowego w materiałach pochodzących od biorców allo-HSCT, skutkującego ujawnieniem profilu DNA dawcy we krwi biorcy czy też ujawnieniem różnych frakcji DNA w obrębie różnych tkanek biorcy, była już sygnalizowana w piśmiennictwie, głównie z dziedziny transplantologii i hematoonkologii [32,67,77,137,151]. Jak dotąd nie została ona jednak doceniona i w dużej mierze nie jest brana pod uwagę w aspekcie konsekwencji, jakie może nieść ze sobą w analizach z zakresu genetyki sądowej.

Choć fałszywe wykluczenie ojcostwa na podstawie analizy krwi pobranej od biologicznego ojca dziecka, który przeszedł w przeszłości zabieg allotransplantacji i zataił ten fakt, stanowi realne zagrożenie, to w niektórych ośrodkach wykonujących ekspertyzy genetyczno-sądowe krew jest ciągle jedynym materiałem badawczym. Podczas pobrania materiału porównawczego do badań identyfikacyjnych nie jest prowadzony jakikolwiek wywiad w kierunku ewentualnego przebycia allo-HSCT przez osobę podawaną badaniu. Wprowadzenie profilu osoby podejrzanej lub oskarżonej do policyjnej bazy danych również nie wiąże się z wymogiem wykluczenia ewentualności przebycia przez tę osobę allotransplantacji.

W związku z powyższym podjęto się przeprowadzenia kompleksowych badań dokumentujących ryzyko, jakie niesie ze sobą genetyczno-sądowa analiza materiałów pochodzących od osób, które przeszły allotransplantację komórek macierzystych hematopoezy. Do badań została wykorzystana metoda ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym oraz systemy multipleksowe najbardziej przydatne w genetycznej indywidualizacji osób i śladów biologicznych.

Uzyskane wyniki badań świadczą o tym, że krew u większości biorców po udanym przeszczepie komórek macierzystych hematopoezy jest genotypowo identyczna z dawcą przeszczepu. Dlatego jej wykorzystanie do badań obarczone jest największym ryzykiem wydania błędnej opinii tak z zakresu identyfikacji osobniczej, jak i badań pokrewieństwa. W wymazie komórek nabłonka i śliny z jamy ustnej u większości biorców allo-HSCT występuje mieszanina DNA, co może uniemożliwić identyfikację osobniczą na podstawie analizy analogicznego materiału pochodzącego np. z miejsca zdarzenia kryminalnego. Najbezpieczniejszym w toku przeprowadzonych badań, aczkolwiek nie idealnym materiałem do genetycznych badań sądowych okazały się komórki włosa. Poddane analizie w oparciu o markery autosomalnego DNA ujawniły w 100% profil biorcy. Natomiast specyficzna analiza markerów chromosomu Y przeprowadzona we włosach, podobnie jak w wymazach i we krwi kobiet, dla których dawcą był mężczyzna, skutkowała oznaczeniem haplotypu Y dawcy. W świetle uzyskanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

Allogeniczny przeszczep komórek macierzystych hematopoezy niesie za sobą ryzyko wydania fałszywej opinii z zakresu badań genetyczno-sądowych. Z uwagi na zachodzącą w większości przypadków pełną konwersję profilu genetycznego we krwi biorcy na profil dawcy, zasadnym jest odstępianie 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 uniemożliwić identyfikację osobniczą biorcy alloprzeszczepu na podstawie analizy śladu biologicznego o podobnym pochodzeniu. W aspekcie badań porównawczych i analiz pokrewieństwa stwierdzenie mieszaniny DNA w wymazie nie stwarza ryzyka pomyłki, niesie natomiast ze sobą konieczność powtórzenia analizy w oparciu o inny materiał, jak np. włos.

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

W świetle uzyskanych wyników istotną kwestią jest uzupełnienie protokołów pobrania materiału do celów identyfikacyjno-porównawczych o oświadczenie osoby oddającej materiał, dotyczące kwestii ewentualnego przebycia przez nią allo-HSCT. Ponadto wprowadzenie profilu DNA do policyjnej bazy danych powinno być poprzedzone analizą genetyczną, przeprowadzoną w oparciu o dwa niezależne materiały: pierwszy – wymaz z jamy ustnej lub krew oraz drugi – włos.



## 9. Piśmiennictwo

1. Abkowitz J.L.: Can human hematopoietic stem cells become skin, gut, or liver cells? *N. Engl. J. Med.* 2002, 346, 770-772
2. Alizadeh M., Bernard M., Danic B., Dauriac C., Birebent B., Lapart C., Lamy T., Le Prisé P.Y., Beauplet A., Bories D., Semana G., Quelvennec E.: Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002, 99, 4618-4625
3. Allouche M., Hamdoum M., Mangin P., Castella V.: Genetic identification of decomposed cadavers using nails as DNA source. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 3, 46-49
4. Andréasson H., Nilsson M., Budowle B., Lundberg H., Allen M.: Nuclear and mitochondrial DNA quantification of various forensic materials. *Forensic Sci. Int.* 2006, 164, 56-64
5. Antin J.H., Childs R., Filipovich A.H., Giralt S., Mackinnon S., Spitzer T., Weisdorf D.: Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2001, 7, 473-485
6. Applied Biosystems. AmpF!STR® Identifier PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City, USA 2006, P/N 4323291D
7. Applied Biosystems. AmpF!STR® Yfiler™ PCR Amplification Kit User's Manual. Foster City, USA 2006, P/N 4358101C
8. Applied Biosystems. Quantifiler™ Kits. Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit and Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit User's Manual. Foster City, USA 2006, P/N 4344790D
9. Ariffin H., Daud S.S., Mohamed Z., Ibrahim K., Lee T.F., Chong L.A.: Evaluation of two short tandem repeat multiplex systems for posthaematopoietic stem cell transplantation chimerism analysis. *Singapore Med. J.* 2007, 48, 333-337
10. Bacher U., Zander A.R., Haferlach T., Schnittger S., Fehse B., Kröger N.: Minimal residual disease diagnostics in myeloid malignancies in the post transplant period. *Bone Marrow Transplant.* 2008, 42, 145-157
11. Bader P., Niethammer D., Willasch A., Kreyenberg H., Klingebiel T.: How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.* 2005, 35, 107-119

12. Ballantyne K.N., van Oorschot R.A., Mitchell R.J.: Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. *Forensic Sci. Int.* 2007, 166, 35-41
13. Barbaro A., Cormaci P., Barbaro A.: Complex family relationship reconstruction by Y-STRs test. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 494-495
14. Beck O., Seidl C., Lehrnbecher T., Kreyenberg H., Schwabe D., Klingebiel T., Seifried E., Bader P., Koehl U.: Quantification of chimerism within peripheral blood, bone marrow and purified leukocyte subsets: comparison of singleplex and multiplex PCR amplification of short tandem repeat (STR) loci. *Eur. J. Haematol.* 2006, 76, 237-244
15. 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
16. Bjornson C.R., Rietze R.L., Reynolds B.A., Magli M.C., Vescovi A.L.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999, 283, 534-537
17. Bond J.W., Hammond C.: The value of DNA material recovered from crime scenes. *J. Forensic Sci.* 2008, 53, 797-801
18. Bond J.W.: Value of DNA evidence in detecting crime. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 128-136
19. Borrill V., Schlaphoff T., du Toit E., Marx M., Wood L., Jacobs P.: The use of short tandem repeat polymorphisms for monitoring chimerism following bone marrow transplantation: a short report. *Hematology* 2008, 13, 210-214
20. Brettell T.A., Butler J.M., Almirall J.R.: Forensic science. *Anal. Chem.* 2007, 79, 4365-4384
21. Butler J.: *Forensic DNA Typing, Second Edition: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers.* Elsevier Academic Press, UK 2005, pp. 33-121
22. Butler J.M., Coble M.D., Decker A.E., Duewer D.L., Hill C.R., Kline M.C., Redman J.W., Vallone P.M.: Setting standards and developing technology to aid the human identity testing community. *Int. Congr. Series* 2006, 1288, 628-635
23. Butler J.M., Coble M.D., Vallone P.M.: STRs vs SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci. Med. Pathol.* 2007, 3, 200-205
24. Butler J.M., Hill C.R., Decker A.E., Kline M.C., Reid T.M., Vallone P.M.: New autosomal and Y-chromosome STR loci: characterization and potential uses. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> International Symposium on Human Identification* 2007, pp. 1-44

25. Butler J.M., Hill C.R., Decker A.E., Kline M.C., Vallone P.M.: New autosomal STR loci. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 95-96
26. Butler J.M.: Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *J. Forensic Sci.* 2006, 51, 253-265
27. Butler J.M.: Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques* 2007, 43, ii-v
28. 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
29. Cerri N., Verzeletti A., Gasparini F., De Ferrari F.: Limits of autosomal and sexual chromosome STRs in defining parental relationship: A case report. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 503-504
30. Cho K.J., Trzaska K.A., Greco S.J., McArdle J., Wang F.S., Ye J.H., Rameshwar P.: Neurons derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interleukin-1 $\alpha$ . *Stem Cells* 2005, 23, 383-391
31. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B.: Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 2006, 119, 2204-2213
32. Dauber E.M., Dorner G., Mitterbauer M., Wenda S., Faé I., Glock B., Mayr W. R.: Discrepant results of samples taken from different tissues of a single individual. *Int. Congr. Series* 2004, 1261, 48-49
33. Dauber E.M., Faé I., Stadlbacher S., Glock B., Schwartz D.W.M., Mayr W.R.: STR typing in a pair of chimeric twins. *Int. Congr. Series* 2003, 1239, 569-571
34. Decker A.E., Kline M.C., Vallone P.M., Butler J.M.: The impact of additional Y-STR loci on resolving common haplotypes and closely related individuals. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007, 1, 215-217
35. Decorte R., Liu C.F., Vanderheyden N., Cassiman J.J.: Development of a novel miniSTR multiplex assay for typing degraded DNA samples. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 112-114
36. Deptała A., Asendrych A.: Rola allotransplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych w leczeniu guzów litych. *Współcz. Onkol.* 2006, 10, 13-17

37. Dey B.R., Shaffer J., Yee A.J., McAfee S., Caron M., Power K., Ting D.T., Colby C., Preffer F., Ballen K., Attar E., Saidman S., Tarbell N., Sachs D., Sykes M., Spitzer T.R.: Comparison of outcomes after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow following an identical nonmyeloablative conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant.* 2007, 40, 19-27
38. 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
39. Djelloul S., Sarafian V.: Validation of a 17-locus Y-STR multiplex system. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 198-199
40. Duewer D.L., Butler J.M.: Multiplex\_QA: an exploratory quality assessment tool for multiplexed electrophoretic assays. *Electrophoresis* 2006, 27, 3735-3746
41. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T.: DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 1991, 49, 746-756
42. Endler G., Greinix H., Winkler K., Mitterbauer G., Mannhalter C.: Genetic fingerprinting in mouthwashes of patient after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1999, 24, 95-98
43. Eshel R., Vainas O., Shpringer M., Naparstek E.: Highly sensitive patient-specific real-time PCR SNP assay for chimerism monitoring after allogeneic stem cell transplantation. *Lab. Hematol.* 2006, 12, 39-46
44. Fabiańska-Mitek J., Nowak J. (red.): Immunogenetyczne podstawy doboru dawców oraz przeszczepiania komórek krwiotwórczych i narządów. Ośrodek Informacji Naukowej OINPHARMA, Warszawa 2007, pp. 15-17, pp. 101-109
45. Fausto N.: Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004, 39, 1477-1487
46. Forensic Science Service – history, The National DNA Database annual report - <http://www.forensic.gov.uk/html/company>
47. Gallardo D., Pérez-García A., de la Cámara R., Iriondo A., Jiménez-Velasco A., Torres A., Brunet S., Urbano-Ispizúa A., Vallejo C., Encuentra M., Caballero D., Espigado I., Serrano D., Barrenetxea C., Ribera J.M., de la Rubia J.: Clinical outcome after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation from human lymphocyte antigen-identical sibling donors: influence of stem cell source. *Leukemia* 2006, 20, 1461-1464
48. Gill P., Fereday L., Morling N., Schneider P.M.: The evolution of DNA databases-recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* 2006, 156, 242-244

49. Green R.L., Roinestad I.C., Boland C., Hennessy L.K.: Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *J. Forensic Sci.* 2005, 50, 809-825
50. Gross A.M., Berdos P., Ballantyne J.: Y-STR concordance study between Y-Plex5, Y-Plex6, Y-Plex12, PowerplexY, Y-Filer, MPI, and MPII. *J. Forensic Sci.* 2006, 51, 1423-1428
51. Gross A.M., Liberty A.A., Ulland M.M., Kuriger J.K.: Internal validation of the AmpFISTR Yfiler amplification kit for use in forensic casework. *J. Forensic Sci.* 2008, 53, 125-134
52. Grove J.E., Bruscia E., Krause D.S.: Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004, 22, 487-500
53. Grubic Z., Stingl K., Cecuk-Jelicic E., Zunec R., Kastelan A., Serventi Seiwert R., Bogdanic V., Labar B., Kerhin-Brkljacic V.: Repetitive DNA polymorphisms in following chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Transplant.* 2005, 19, 586-590
54. Grubic Z., Stingl K., Cecuk-Jelicic E., Zunec R., Serventi Seiwert R., Labar B., Rajic Lj., Brkljacic-Kerhin V.: Evaluation of mixed chimerism in bone marrow transplantation program in Croatia. *Transplant. Proc.* 2005, 37, 1388-1391
55. Grzegorzczak-Jaźwińska A., Dwilewicz-Trojaczek J., Kozak I., Karakulska-Prystupiak E., Górka R.: Ocena działania miejscowo stosowanego G-CSF u pacjentów po autologicznym i allogenicznym przeszczepieniu krwiotwórczych komórek macierzystych - obserwacje wstępne. *Dent. Med. Prob.* 2004, 41, 695-701
56. Gusmão L., Butler J.M., Carracedo A., Gill P., Kayser M., Mayr W.R., Morling N., Prinz M., Roewer L., Tyler-Smith C., Schneider P.M.: DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 2006, 157, 187-197
57. Hedman J., Albinsson L., Ansell C., Tapper H., Hansson O., Holgersson S., Ansell R.: A fast analysis system for forensic DNA reference samples. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 2, 184-189
58. Henke J., Henke L.: Which short tandem repeat polymorphisms are required for identification? Lessons from complicated kinship cases. *Croat. Med. J.* 2005, 46, 593-597
59. Herzog E.L., Chai L., Krause D.S.: Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003, 102, 3483-3493
60. Hill C.R., Kline M.C., Mulero J.J., Lagacé R.E., Chang C.W., Hennessy L.K., Butler J.M.: Concordance study between the AmpFISTR MiniFiler PCR amplification kit and conventional STR typing kits. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 870-873

61. Hołowiecki J.: Transplantacja szpiku i komórek krwiotwórczych. *Współcz. Onkol.* 2000, 4, 195–202
62. Hołowiecki J.: Wskazania do przeszczepiania komórek krwiotwórczych. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 2008, 118, 658-663
63. Hong Y.C., Liu H.M., Chen P.S., Chen Y.J., Lyou J.Y., Hu H.Y., Yi M.F., Lin J.S., Tzeng C.H.: Hair follicle: a reliable source of recipient origin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007, 40, 871-874
64. Hudlow W.R., Chong M.D., Swango K.L., Timken M.D., Buoncristiani M.R.: A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 2, 108-125
65. Hung E.C., Shing T.K., Chim S.S., Yeung P.C., Chan R.W., Chik K.W., Lee V., Tsui N.B., Li C.K., Wong C.S., Chiu R.W., Lo Y.M.: Presence of donor-derived DNA and cells in the urine of sex-mismatched hematopoietic stem cell transplant recipients: Implication for the transrenal hypothesis. *Clin. Chem.* 2009, 55, 715-722
66. Imanguli M.M., Alevizos I., Brown R., Pavletic S.Z., Atkinson J.C.: Oral graft-versus-host disease. *Oral Dis.* 2008, 14, 396-412
67. Imanishi D., Miyazaki Y., Yamasaki R., Sawayama Y., Taguchi J., Tsushima H., Fukushima T., Yoshida S., Sasaki H., Hata T., Tomonaga M.: Donor-derived DNA in fingernails among recipients of allogeneic hematopoietic stem-cell transplants. *Blood* 2007, 110, 2231-2234
68. Invitrogen. Qubit<sup>®</sup> Fluorometer. Instruction Manual, 2007, Q32851
69. Jacewicz R., Jędrzejczyk M., Berent J.: Applying the 16 Y-chromosome STRs in the population of central Poland. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 214-216
70. Jacewicz R., Jędrzejczyk M., Berent J.: The most efficient STR loci in forensic genetics in population of central Poland. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 340-342
71. Jacewicz R., Jędrzejczyk M., Ludwikowska M., Berent J.: Population database on 15 autosomal STR loci in 1000 unrelated individuals from the Lodz region of Poland. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 2, e1-e2
72. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.: Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 1985, 316, 76-79
73. Khan F., Agarwal A., Agrawal S.: Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.* 2004, 34, 1-12

74. Koldehoff M., Steckel N.K., Hlinka M., Beelen D.W., Elmaagacii A.H.: 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
75. Komisja Genetyki Sądowej Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii. Zasady atestacji laboratoriów genetycznych przy Polskim Towarzystwie Medycyny Sądowej i Kryminologii na lata 2008-2009. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 2007, 57, 368-379
76. Körbling M., Estrov Z., Champlin R.: Adult stem cells and tissue repair. *Bone Marrow Transplant.* 2003, 32, S23-S24
77. Körbling M., Katz R.L., Khanna A., Ruifrok A.C., Rondon G., Albitar M., Champlin R.E., Estrov Z.: Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2002, 346, 738-746
78. Kristt D., Stein J., Yaniv I., Klein T.: Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant.* 2007, 39, 255-268
79. Kuźniar P., Jastrzębska E., Płoski R.: Validation of nine non-CODIS STR loci for forensic use in a population from Central Poland. *Forensic Sci. Int.* 2006, 159, 258-260
80. Liesveld J.L., Rothberg P.G.: Mixed chimerism in SCT: conflict or peaceful coexistence? *Bone Marrow Transplant.* 2008, 42, 297-310
81. Linacre A.: The UK National DNA Database. *Lancet* 2003, 361, 1841-1842
82. Lo Y.M., Tein M.S., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M., Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M., Hjelm N.M.: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* 1998, 62, 768-775
83. Lobashevsky A.L., Senkbeil R.W., Townsend J.E., Mink C.A., Thomas J.M.: Quantitative analysis of chimerism using a short tandem repeat method on a fluorescent automated DNA sequencer. *Clin. Lab. Haematol.* 2006, 28, 40-49
84. Lorente J.A., Entrala C., Alvarez J.C., Lorente M., Arce B., Heinrich B., Carrasco F., Budowle B., Villanueva E.: Social benefits of non-criminal genetic databases: missing persons and human remains identification *Int. J. Legal Med.* 2002, 116, 187-190

85. Lui Y.Y., Woo K.S., Wang A.Y., Yeung C.K., Li P.K., Chau E., Ruygrok P., Lo Y.M.: Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin. Chem.* 2003, 49, 495-496
86. Mackiewicz A., Iżycki D., Nawrocki S.: Zastosowanie przeszczepów allogenicznych komórek macierzystych szpiku w kombinowanej immunoterapii nowotworów. *Współcz. Onkol.*, 2002, 6, 474-478
87. Malsom S., Flanagan N., McAlister C., Dixon L.: The prevalence of mixed DNA profiles in fingernail samples taken from couples who co-habit using autosomal and Y-STRs. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009, 3, 57-62
88. Masmus T.N., Madsen H.O., Petersen S.L., Ryder L.P., Svejgaard A., Alizadeh M., Vindeløv L.L.: Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2005, 11, 558-566
89. Mayntz-Press K.A., Ballantyne J.: Performance characteristics of commercial Y-STR multiplex systems. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 1025-1034
90. McCann S.R., Crampe M., Molloy K., Lawler M.: Hemopoietic chimerism following stem cell transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* 2005, 32, 55-61
91. Milde A., Kühl-Burmeister R., Ritz-Timme S., Kaatsch H.J.: DNA typing in cases of blood chimerism. *Int. J. Legal Med.* 1999, 112, 333-335
92. Młodziejowski B., Sołtyśzewski I.: Ślady biologiczne. W: Ślady kryminalistyczne. Ujawnianie, zabezpieczanie, wykorzystanie. Goc M., Moszczyński J. (red.) Centrum Doradztwa i Informacji Difin, Warszawa 2007, pp.125-186
93. Morling N., Allen R.W., Carracedo A., Geda H., Guidet F., Hallenberg C., Martin W., Mayr W.R., Olaisen B., Pascali V., Schneider P.M.: Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. *Forensic Sci. Int.* 2002, 129, 148-157
94. Morling N., Bastisch I., Gill P., Schneider P.M.: Interpretation of DNA mixtures - European consensus on principles. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007, 1, 291-292
95. Morling N.: Forensic genetics. *Lancet* 2004, 364, 10-11
96. Mossallam G.I., Smith A.G., McFarland C.: Comparison of variable number tandem repeat and short tandem repeat genetic markers for qualitative and quantitative chimerism analysis post allogeneic stem cell transplantation. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* 2005, 17, 103-113



97. Mulero J.J., Budowle B., Butler J.M., Gusmão L.: Nomenclature and allele repeat structure update for the Y-STR locus GATA H4. *J. Forensic Sci.* 2006, 51, 694
98. Mulero J.J., Hang C.W., Calandro L.M., Green R.L., Li Y., Cassie J.L., Hennessy L.K.: Development and validation of the AmpF $\mathbb{L}$ STR $\mathbb{R}$  Yfiler $\mathbb{T}$  PCR Amplification Kit: a male specific, single amplification 17 Y-STR Multiplex System. *J. Forensic Sci.* 2006, 51, 64–75
99. Muller-Bérat N., Lion T.: Chimerism and transplant-related diagnostics. *Leukemia* 2006, 20, 1358-1360
100. Murray C., McAlister C., Elliott K.: Identification and isolation of male cells using fluorescence in situ hybridisation and laser microdissection, for use in the investigation of sexual assault. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007, 1, 247-252
101. Myers J.R., Adkins W.K.: Comparison of modern techniques for saliva screening. *J. Forensic Sci.* 2008, 53, 862-867
102. Nagy M., Rascon J., Massenkeil G., Ebell W., Roewer L.: Evaluation of whole-genome amplification of low-copy-number DNA in chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation using STR marker typing. *Electrophoresis* 2006, 27, 3028-3037
103. Ng L.K., 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
104. Nielsen K., Mogensen H.S., Hedman J., Niederstätter H., Parson W., Morling N.: Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 2, 226-30
105. 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
106. Nozawa H., Yamamoto T., Uchihi R., Yoshimoto T., Tamaki K., Hayashi S., Ozawa T., Katsumata Y.: Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences. *Leg. Med (Tokyo)* 1999, 1, 61-67
107. Oliver J.A., Maarouf O., Cheema F.H., Martens T.P., Al-Awqati Q.: The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J. Clin. Invest.* 2004, 114, 795-804
108. Olszewska-Słonina D.M., Styczyński J., Drewa T.A.: Stem cells-sources and plasticity. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2006, 15, 3, 497-503
109. Pang B.C., Cheung B.K.: Applicability of two commercially available kits for forensic identification of saliva stains. *J. Forensic Sci.* 2008, 53, 1117-1122

110. Paternity Testing Workshop of the English Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics 2008 (raport roboczy niepublikowany)
111. Pearce L., Lim Z.Y., Usai M., Ho A.Y., Mufti G.J., Pagliuca A.: Mixed donor chimaerism in recipient fingernails following reduced-intensity conditioning haematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008, 42, 361-362
112. Pearson H.: Dual identities. *Nature* 2002, 417, 10-11
113. Pittenger M.F., Martin B.J.: Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 2004, 95, 9-20
114. Prinz M., Carracedo A., Mayr W.R., Morling N., Parsons T.J., Sajantila A., Scheithauer R., Schmitter H., Schneider P.M.: DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007, 1, 3-12
115. Prinz M., Sansone M.: Y Chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. *Croat. Med. J.* 2001, 42, 288-291
116. Pujal J.M., Gallardo D.: PCR-based methodology for molecular microchimerism detection and quantification. *Exp. Biol. Med.* 2008, 233, 1161-1170
117. Robak T., Wrzesień-Kuś A.: The search for optimal treatment in relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* 2002, 43, 281-291
118. Rovó A., Meyer-Monard S., Heim D., Arber C., Passweg J.R., 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
119. Ruitberg C.M., Reeder D.J., Butler J.M.: STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 2001, 320-322
120. Rupa J., Lewandowski K.: Praktyczne aspekty oznaczania chimeryzmu hematopoetycznego. *Acta Haematol. Pol.* 2006, 4, 443-474
121. Sage D., Stanworth S., Turner D., Navarrete C.: Diagnosis of transfusion-associated graft-vs.-host disease: the importance of short tandem repeat analysis. *Transfus. Med.* 2005, 15, 481-485
122. Saiki R.K., Scharfs S.J., Faloona E., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230, 1350-1354

123. Scharf S.J., Smith A.G., Hansen J.A., McFarland C., Erlich H.A.: Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers. *Blood* 1995, 1954-1963
124. Schneider P.M., Balogh K., Naveran N., Bogus M., Bender K., Lareu M., Carracedo A.: Whole genome amplification - the solution for a common problem in forensic casework? *Int. Congr. Series* 2004, 1261, 24-26
125. Schneider P.M., Fimmers R., Keil W., Molsberger G., Patzelt D., Pflug W., Rothämel T., Schmitter H., Schneider H., Brinkmann B.: The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. *Int. J. Legal Med.* 2009, 123, 1-5
126. Schneider P.M., Kreiter S., Derigs G., Kolbe K., Winkelmann N., Lummer J., Stradmann-Bellinghausen B., Rittner C.: Quantification of fluorescent STR genotyping results for chimerism control after bone marrow transplantation. *Int. Congr. Series* 2003, 1239, 653-656
127. Schneider P.M.: Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic. Sci. Int.* 2007, 238-243
128. Sellathamby S., Balasubramanian P., Sivalingam S., Shaji R.V., Mathews V., George B., Viswabandya A., Srivastava A., Chandy M.: Developing an algorithm of informative markers for evaluation of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006, 37, 751-755
129. Sewell J., Quinones I., Ames C., Multaney B., Curtis S., Seeboruth H., Moore S., Daniel B.: Recovery of DNA and fingerprints from touched documents. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 2, 281-285
130. Sieverkropp A.J., Andrews R.G., Gaur L., Shields L.E.: Chimerism analysis by sex determining region Y (SRY) and major histocompatibility complex markers in non-human primates using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Tissue Antigens* 2005, 66, 19-25
131. Słomski R., Szalata M., Wielgus K.: Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). W: *Analiza DNA. Teoria praktyka.* Słomski R. (red.) Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008, pp. 131-143
132. Smith P.J., Ballantyne J.: Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 820-829
133. Soares-Vieira J.A., Billerbeck A.E., Iwamura E.S., Zampieri R.A., Gattás G.J., Munoz D.R., Hallak J., Mendonca B.B., Lucon A.M.: Y-STRs in forensic medicine: DNA analysis in semen samples of azoospermic individuals. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 664-670

134. Sobotta J., Hammersen F.: *Histologia. Atlas cytologii i histologii* Urban & Partner, Wrocław 1993, p. 210
135. Stevens A.M., McDonnell W.M., Nelson J.L.: Male cells in female recipients of hematopoietic-cell transplants. *N. Engl. J. Med.* 2002, 347, 218-220
136. Sufliarska S., Minarik G., Horakova J., Bodova I., Bojtarova E., Czako B., Mistrik M., Drgona L., Demitrovicova M., Lakota J., Krivosikova M., Kovacs L.: Establishing the method of chimerism monitoring after allogeneic stem cell transplantation using multiplex polymerase chain reaction amplification of short tandem repeat markers and Amelogenin. *Neoplasma* 2007, 54, 424-430
137. Suratt B.T., Cool C.D., Serls A.E., Chen L., Varella-Garcia M., Shpall E.J., Brown K.K., Worthen G.S.: Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003, 168, 318-322
138. Swango K.L., Hudlow W.R., Timken M.D., Buoncristiani M.R.: Developmental validation of a multiplex qPCR assay for assessing the quantity and quality of nuclear DNA in forensic samples. *Forensic Sci. Int.* 2007, 170, 35-45
139. Symons H.J., Fuchs E.J.: Hematopoietic SCT from partially HLA-mismatched (HLA-haploidentical) related donors. *Bone Marrow Transplant.* 2008, 42, 365-377
140. Syndercombe Court D. and the European DNA Profiling group (EDNAP): Between country comparison of a large Caucasian STR database collected as part of the Standardisation in DNA Profiling project. *Int. Congr. Series* 2004, 1261, 62-64
141. Szaryńska M.: Mikrochimeryzm płodowo-matczyzny i jego znaczenie kliniczne. *Post. Biol. Kom.* 2007, 34, 85-102
142. Talwar S., Khan F., Nityanand S., Agrawal S.: Chimerism monitoring following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007, 39, 529-535
143. Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002, 416, 542-545
144. Thiede C., Bornhäuser M., Ehninger G.: Evaluation of STR informativity for chimerism testing-comparative analysis of 27 STR systems in 203 matched related donor recipient pairs. *Leukemia* 2004, 18, 248-254

145. Thiede C., Bornhäuser M., Oelschlägel U., Brendel C., Leo R., Daxberger H., Mohr B., Florek M., Kroschinsky F., Geissler G., Naumann R., Ritter M., Prange-Krex G., Lion T., Neubauer A., Ehninger G.: Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001, 15, 293-302
146. Thiede C., Florek M., Bornhäuser M., Ritter M., Mohr B., Brendel C., Ehninger G., Neubauer A.: Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.* 1999, 23, 1055-1060
147. Thiede C., Prange-Krex G., Freiberg-Richter J., Bornhäuser M., Ehninger G.: Buccal swabs but not mouthwash samples can be used to obtain pretransplant DNA fingerprints from recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant.* 2000, 25, 575-577
148. Tilanus M.G.: Short tandem repeat markers in diagnostics: what's in a repeat? *Leukemia* 2006, 20, 1353-1355
149. Ting D.T., Spitzer T.R., Chaudhary A., Muzikansky A., Colby C., Power K., McAfee S., Ballen K., Attar E., Saidman S.L., Preffer F., Sykes M., Dey B.R.: Clinical outcomes of late rather than early full-donor chimerism in patients with advanced lymphomas receiving nonmyeloablative allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008, 42, 329-335
150. Tögel F., Westenfelder C.: Adult bone marrow-derived stem cells for organ regeneration and repair. *Dev. Dyn.* 2007, 236, 3321-3331
151. Tran S.D., Pillemer S.R., Dutra A., Barrett A.J., Brownstein M.J., Key S., Pak E., Leakan R.A., Kingman A., Yamada K.M., Baum B.J., Mezey E.: Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet* 2003, 361, 1084-1088
152. Tsukada K., Nojiri M., Kurasawa Y., Kasahara K.: Fast PCR amplification of AmpFISTR Identifiler. *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Series* 2008, 1, 130-131
153. Umansky S.R.: From transrenal DNA to stem cell differentiation: an unexpected twist. *Clin. Chem.* 2009, 55, 602-604
154. Ustawa z dnia 10 stycznia 2003r. o zmianie ustawy - Kodeks postępowania karnego, ustawy – Przepisy wprowadzające Kodeks postępowania karnego, ustawy o świadku koronnym oraz ustawy o ochronie informacji niejawnych. Dz.U.2003.17.555
155. Ustawa z dnia 17 grudnia 2004r. o zmianie ustawy o Policji oraz ustawy - Kodeks postępowania karnego. Dz.U.2005.10.70

156. Ustawa z dnia 6 czerwca 1997r. Kodeks postępowania karnego. Dz.U.97.89.555 z późniejszymi zmianami
157. Ustawa z dnia 6 kwietnia 1990r. o Policji. Dz.U.2007.43.277 (tekst jednolity) z późniejszymi zmianami
158. Vallone P.M., Hill C.R., Butler J.M.: Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008, 3, 42-45
159. van Laake L.W., Hassink R., Doevendans P.A., Mummery C.: Heart repair and stem cells. *J. Physiol.* 2006, 577, 467-678
160. Wagers A.J., Weissman I.L.: Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004, 116, 639-648
161. Watzinger F., Lion T., Steward C.: Eurochimerism consortium. The RSD code: proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2006, 20, 1448-1452
162. Westring C.G., Kristinsson R., Gilbert D.M., Danielson P.B.: Validation of reduced-scale reactions for the Quantifiler Human DNA kit. *J. Forensic Sci.* 2007, 52, 1035-1043
163. Wieczorek P., Tendera M.: Zastosowanie komórek szpiku kostnego w zawale mięśnia sercowego. *Kardiol. Pol.* 2008, 66, 328-334
164. Wilkening S., Chen B., Hemminki K., Försti A.: STR markers for kinship analysis. *Hum. Biol.* 2006, 78, 1-8
165. Willak-Janc E., Wójcik I.: Powikłania płucne po przeszczepieniu komórek hematopoetycznych. *Alergia Astma Immunologia* 2006, 11, 87-92
166. Wu B.Y., Guo K.Y., Song C.Y., Yang Li D.: Mixed chimera converted into full donor chimera with powerful graft-versus-leukemia effects but no graft-versus-host disease after non T cell-depleted HLA-mismatched peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000, 26, 691-693
167. Zaucha J.M., Taszner M., Baran W., Knopińska-Posłuszny W., Hellmann A.: Znaczenie transplantacji szpiku w leczeniu chorych z ostrą białaczką szpikową. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 2006, 36, 211-223

## 10. Wykaz skrótów wykorzystanych w pracy

W poniższej tabeli zestawiono skróty wykorzystane w pracy z podaniem pierwowzoru pełnej nazwy:

<b>AA</b>	– aplastic anemia
<b>ALL</b>	– acute lymphoblastic leukemia
<b>allo-HSCT</b>	– allogeneic hematopoietic stem cell transplantation
<b>AMG</b>	– amelogenin
<b>AML</b>	– acute myeloid leukemia
<b>AR</b>	– autologous recovery
<b>BMT</b>	– bone marrow transplantation
<b>CC(DC)</b>	– complete chimerism (donor chimerism)
<b>CML</b>	– chronic myeloid leukemia
<b>CMML</b>	– chronic myelomonocytic leukemia
<b>CODIS</b>	– Combined DNA Index System
<b>C<sub>T</sub></b>	– threshold cycle
<b>D</b>	– donor
<b>DLI</b>	– donor lymphocyte infusion
<b>DMC(TMC)</b>	– decreasing mixed chimerism (transient mixed chimerism)
<b>DNA</b>	– deoxyribonucleic acid
<b>ENFSI</b>	– European Network of Forensic Science Institutes
<b>FBI</b>	– Federal Bureau of Investigation
<b>FISH</b>	– fluorescent <i>in situ</i> hybridization
<b>FR</b>	– fluorescent reporter
<b>G-CSF</b>	– granulocyte colony stimulating factor
<b>GD</b>	– gene diversity
<b>GVHD</b>	– graft versus host disease
<b>GVT</b>	– graft versus tumor
<b>H</b>	– heterozygosity
<b>HD</b>	– Hodgkin's disease
<b>HLA</b>	– human leukocyte antigen
<b>hTERT</b>	– human telomerase reverse transcriptase
<b>ISFG</b>	– International Society for Forensic Genetics
<b>LCN</b>	– low-copy number
<b>MA</b>	– myeloablative conditioning
<b>MC</b>	– mixed chimerism
<b>MRD</b>	– minimal residual disease
<b>NFQ</b>	– nonfluorescent quencher
<b>NMA</b>	– non-myeloablative conditioning

<b>NTC</b>	– no template control
<b>P</b>	– polymerase
<b>PBSCT</b>	– peripheral blood stem cell transplantation
<b>PCR</b>	– polymerase chain reaction
<b>PD</b>	– power of discrimination
<b>PE</b>	– power of exclusion
<b>PIC</b>	– polymorphism information content
<b>PMC (IMC)</b>	– progressive mixed chimerism (increasing mixed chimerism)
<b>QR-PCR</b>	– quantitative real-time PCR
<b>R</b>	– recipient
<b>RFLP</b>	– restriction fragment length polymorphism
<b>RFU</b>	– relative fluorescence unit
<b>R<sub>n</sub></b>	– normalized reporter signal
<b>SMC</b>	– stable mixed chimerism
<b>SNP</b>	– single nucleotide polymorphism
<b>SRY</b>	– sex-determining region Y
<b>STR</b>	– short tandem repeat
<b>SWGDM</b>	– Scientific Working Group on DNA Analysis Methods
<b>UCBT</b>	– umbilical cord blood transplantation
<b>WGA</b>	– whole genome amplification