

STRESZCZENIE

Wykrywanie i identyfikacja ludzkich płynów biologicznych takich jak np. krew, nasienie, ślina, wydzielina z dróg rodnych, krew miesiączkowa, mocz i pot są bardzo ważnymi analizami z zakresu biologii sądowej. W przypadku wielu przestępstw, istotne jest ustalenie tkankowego źródła DNA, a nie tylko profilu DNA osoby, od której pochodzi ślad biologiczny. Zupełnie inną wartość dowodową będzie miał profil DNA ofiary na odzieży sprawcy, gdy pochodzi on z naskórka (substancja potowo-tłuszczowa), a inny, gdy uda się wykazać, że źródłem DNA jest wydzielina z dróg rodnych ofiary. Obecność naskórka ofiary może nie mieć żadnego związku z przestępstwem, a obecność wydzieliny z dróg rodnych bezwzględnie tak. Podobnie obecność krwi obwodowej danej osoby może mieć zupełnie inne znaczenie niż obecność krwi menstruacyjnej, a obecność śliny inne niż nasienia. Właściwe i pewne rozpoznanie źródła badanego DNA w postępowaniu sądowym jest konieczne, a błąd identyfikacji może nieść za sobą poważne konsekwencje prawne i społeczne.

Przy użyciu metod klasycznych, jedynie krew i nasienie można identyfikować metodami swoistymi (w 100% stwierdzającymi obecność danego płynu biologicznego pochodzącego od człowieka), dla pozostałych płynów biologicznych dysponujemy jedynie testami wstępnymi, które są niewystarczające, nie tylko ze względu na brak specyficzności, ale także w aspekcie wysokiej czułości metod powielania DNA. Nie ma, wśród metod klasycznych, uniwersalnej metody identyfikacji różnych płynów biologicznych. Problemem jest też destrukcyjny charakter wielu testów wstępnych, szczególnie, gdy ilość materiału dowodowego jest niewielka.

Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat przyniosły znaczny postęp w dziedzinie identyfikacji płynów biologicznych. Opracowuje się m.in. metody oparte o spektrometrię ramanowską i markery DNA płynów biologicznych. Na szczególną uwagę zasługuje technika detekcji oparta na obecności specyficznych dla danych tkanek cząsteczek mRNA w śladzie biologicznym. Temu zagadnieniu poświęcona jest niniejsza rozprawa doktorska.

Zasadniczym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie nowych metod identyfikacji płynów biologicznych istotnych w kryminalistyce, ze szczególnym uwzględnieniem tych, dla których nie ma specyficznych metod detekcji. Opracowane

metody zostały ocenione w kontekście ich przydatności w genetyce sądowej do analizy różnego rodzaju płynów dowodowych.

Opracowałam dwa opisane w publikacjach testy: do identyfikacji wydzieliny z dróg rodnych i krwi miesięczkowej (heksapleks) oraz do rozróżniania pomiędzy krwią obwodową i miesięczkową (heptapleks). Oparte są one na detekcji tkankowo-specyficznych transkryptów (mRNA) następujących genów: ludzkiej beta-defensyny 1 (*HBD1*), mucyny 4 (*MUC4*), podjednostki alfa hemoglobiny (*HBA*), syntazy kwasu delta-aminolewulinowego 2 (*ALAS2*), metaloproteinaz 7 i 11 (*MMP7*, *MMP11*), dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej (*G6PDH*) oraz markerów bakteryjnych: regionów ISR (ang. *intergenic spacer region*) 16S–23S rRNA *Lactobacillus crispatus* i *Lactobacillus gasseri/Lactobacillus johnsonii*. Badania przeprowadziłam na próbkach różnych płynów biologicznych pobranych od kobiet i mężczyzn, tuż po pobraniu oraz przechowywanych w różnych warunkach i przez różny okres czasu, a także na materiale biologicznym stanowiącym zasoby własne Zakładu Medycyny Sądowej GUMed.

Na niniejszą rozprawę doktorską składają się trzy publikacje¹, stanowiące spójny tematycznie zbiór artykułów opublikowanych w indeksowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu:

1. Jakubowska J.*, Maciejewska A., Pawłowski R., **mRNA profiling for biological fluids identification in forensic genetics**, *Problems of Forensic Sciences* (2011) 87:204–215
2. Jakubowska J., Maciejewska A., Pawłowski R.*, Bielawski KP., **mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification**, *Forensic Science International: Genetics* (2013) 7:272-278, IF=3,202
3. Jakubowska J., Maciejewska A., Bielawski KP., Pawłowski R.*, **mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood**, *Forensic Science International: Genetics* 13 (2014) 53-60, IF=3,202

Publikacja przeglądowa pt. „**mRNA profiling for biological fluids identification in forensic genetics**” stanowi podsumowanie ówczesnej wiedzy (2011r.) na temat

¹ Wszystkie artykuły, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, a także będące rezultatem innych projektów, doniesienia konferencyjne oraz inne osiągnięcia publikowałam lub przedstawiałam pod panięńskim nazwiskiem (Joanna Jakubowska).

identyfikacji różnych płynów biologicznych poprzez profilowanie mRNA w genetyce sądowej. Wykorzystałam wszystkie dostępne wówczas źródła i publikacje na ten temat. Praca zawiera informacje o różnych metodach identyfikacji płynów biologicznych, metodyce, znanych markerach oraz genach metabolizmu podstawowego wykorzystywanych w profilowaniu mRNA, specyficzności markerów i ich stabilności w plamach. Analiza danych literaturowych dowodzi, że profilowanie mRNA jest obiecującą techniką, która może znaleźć szerokie zastosowanie w praktyce laboratoriów badających ślady biologiczne na potrzeby organów ścigania. Artykuł ukazał się w polskim czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym w językach polskim i angielskim.

Celem projektu przedstawionego w publikacji: „**mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification**” było opracowanie metody identyfikacji wydzieliny z dróg rodnych i krwi miesięczkowej opartej na profilowaniu mRNA. Ze względu na brak specyficzności poszczególnych znanych markerów wydzieliny z dróg rodnych oraz ich niestabilną ekspresję u różnych kobiet, zaproponowałam test multipleksowy (heksapleks) wykorzystujący markery ludzkie i bakteryjne: HBD1, MUC4, MMP11, 16S–23S ISR *L.crispatus* i *L.gasseri/L.johnsonii* oraz G6PDH, co miało zmaksymalizować jego wiarygodność.

Autorzy wcześniej opisywanych testów, wykorzystujących profilowanie mRNA, skupiali się na możliwości włączenia markerów jak największej liczby płynów biologicznych do jednej reakcji, podczas gdy moim zdaniem dla wiarygodności metody bardziej istotna jest analiza jak największej liczby markerów danego płynu biologicznego, szczególnie wtedy, gdy ich ekspresja nie jest stała u różnych osób lub w trakcie cyklu miesięczkowego.

W badaniach wykorzystałam 60 wymazów wydzieliny z dróg rodnych i krwi miesięczkowej pobranych w różnych stadiach cyklu menstruacyjnego od 15 kobiet w wieku 25-47 lat, próbki nasienia, śliny i potu pobrane od 6 osób, próbki krwi obwodowej pobrane od 12 osób, plamy płynów biologicznych na różnych podłożach, a także próbki materiału biologicznego należące do zasobów własnych Zakładu Medycyny Sądowej GUMed. Etapy testu to: izolacja RNA z plamy, odwrotna

transkrypcja, amplifikacja markerów w reakcji „end-point” PCR i detekcja produktów za pomocą elektroforezy kapilarnej.

Przedstawiłam osadzenie testu w kontekście dotychczas stosowanych metod, specyficzność i czułość proponowanych markerów oraz całego testu, zmiany w występowaniu i ekspresji markerów u różnych kobiet i w czasie cyklu menstruacyjnego, stabilność markerów na podstawie analizy różnych plam biologicznych, zastosowanie testu w przypadku inhibicji reakcji PCR i analizę możliwości testu w przypadku mieszanin wydzieliny z dróg rodnych z krwią i nasieniem. Zaproponowałam także zasady interpretacji wyniku testu. Dzięki analizie pięciu markerów, w tym dwóch bakteryjnych, metoda zapewnia wysoką wiarygodność identyfikacji. Jej opracowanie może znacząco poprawić jakość ekspertyz, szczególnie ze względu na brak innych, satysfakcjonujących metod identyfikacji wydzieliny z dróg rodnych.

Powyższy test opisałam także w rozdziale książki: (Jakubowska J.*, Maciejewska A., Pawłowski R., mRNA profiling for vaginal fluid and menstrual blood identification. W: Forensic DNA Typing Protocols, Editor: Goodwin W., 2nd Edition, Springer), która jest obecnie na etapie przygotowania do druku (lub w druku). Rozdział ten jest szczegółową instrukcją laboratoryjną wskazującą, jak krok po kroku zastosować opracowany przeze mnie test w praktyce laboratoryjnej.

Celem badań przedstawionych w publikacji **„mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood”** było stworzenie testu do rozróżniania pomiędzy krwią miesiączkową i obwodową, opartego na profilowaniu mRNA. Zaproponowałam test (heptapleks), wykorzystujący transkrypty następujących genów: *MMP7*, *MMP11*, *HBD1*, *MUC4*, *HBA*, *ALAS2* i *G6PDH*. Projekt ten był odpowiedzią na palący problem w genetyce sądowej, którym był brak prostej, wiarygodnej metody, która mogłaby być użyta w tych przypadkach, gdy pochodzenie tkankowe śladu zostało rozpoznane jako krew, lecz nieznane jest źródło krwawienia (krew miesiączkowa lub pochodząca z uszkodzenia ciała).

W badaniach wykorzystałam 28 próbek krwi miesiączkowej lub wydzieliny z dróg rodnych pobranych od 12 kobiet, próbki krwi obwodowej pobrane od 12 osób, próbki nasienia, śliny, potu, pobrane od 6 osób, a także 15 plam krwi miesiączkowej i

12 plam krwi obwodowej z zasobów Zakładu Medycyny Sądowej. Metodyka testu zakłada podobne etapy jak wyżej wymieniony heksapleks.

Publikacja zawiera szczegółowy opis testu i jego osadzenie w kontekście dotychczas stosowanych metod oraz wyniki badania specyficzności markerów i czułości testu, także w kontekście mieszanin krwi obwodowej lub miesięczkowej z nasieniem i krwi obwodowej z miesięczkową. Stwierdzono różnice w ekspresji markerów u różnych kobiet w czasie cyklu miesięczkowego. Zamieściłam też szczegółowe wytyczne jak interpretować wyniki analizy. Opisałam również przykład sprawy prowadzonej w Zakładzie Medycyny Sądowej GUMed, w której wykorzystałam test w praktyce do identyfikacji źródła krwi znajdującej się na bieliźnie i spodniach ofiary napaści seksualnej. Od maja 2013 roku pracuję w Pracowni Biologii i Genetyki Sądowej ZMS GUMed, badając ślady biologiczne na dowodach rzeczowych i przygotowuję ekspertyzy z zakresu genetyki sądowej, dzięki czemu mogę brać czynny udział we wdrażaniu metod opracowanych w ramach doktoratu.

Opracowany test jest wiarygodną metodą identyfikacji krwi miesięczkowej oraz obwodowej, szczególnie w kontekście braku innych swoistych metod identyfikacji krwi menstruacyjnej. Pozwala bowiem na potwierdzenie obecności krwi miesięczkowej, dzięki jednoczesnej detekcji czterech markerów waginalnych, w tym dwóch charakterystycznych dla pierwszego okresu cyklu miesięczkowego, dwóch markerów krwi oraz mRNA genu metabolizmu podstawowego. Tak kompleksowe podejście pozwala na zminimalizowanie prawdopodobieństwa wystąpienia wyniku fałszywie negatywnego w przypadku braku ekspresji jednego lub dwóch markerów u danej osoby. Ponadto wysoka specyficzność markerów (za wyjątkiem HBD1 i MUC4) i ścisłe zasady interpretacji wyniku pozwalają na zminimalizowanie możliwości wystąpienia wyniku fałszywie pozytywnego.

Przedstawione w wyżej wymienionych publikacjach wyniki wskazują, że profilowanie mRNA może być wiarygodną metodą identyfikacji płynów biologicznych, szczególnie w przypadku płynów biologicznych, dla których nie ma klasycznych swoistych metod detekcji. Opracowane przeze mnie testy wykrywają kilka markerów charakterystycznych dla jednego/dwóch płynów biologicznych w jednej reakcji, dzięki czemu zwiększa się specyficzność detekcji, szczególnie w przypadkach, gdy

poszczególne markery osobno nie spełniają w pełni oczekiwań pod względem specyficzności lub uniwersalności (występowania u wszystkich osobników).

Opracowanie nowych metod wpływa na jakość wydawanych ekspertyz oraz zwiększa możliwości badań prowadzonych na zlecenie organów ścigania, szczególnie w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Opracowane przeze mnie testy zostały wdrożone i były już wykorzystywane do analizy dowodów rzeczowych w Pracowni Biologii i Genetyki Sądowej Zakładu Medycyny Sądowej GUMed.