Centralne Laboratorium Kryminalistyczne Policji
instytut badawczy zarejestrowany w Krajowym Rejestrze Sądowym
pod nr 0000372361, NIP: 701 026 95 46, REGON: 142707011
00-583 Warszawa, Al. Ujazdowskie 7
tel.: +48 22 60 157 97, fax: +48 22 60 155 57, e-mail: clk@policja.gov.pl

**dr n. med. Magdalena Spólnicka**

**Zakład Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji**

# AUTOREFERAT

Warszawa, dn. 02 października 2018 r.

1. **Imię i nazwisko:**

Magdalena Maria Spólnicka

2. **Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**
   - **2016** – dyplom specjalisty w dziedzinie laboratoryjnej genetyki sądowej;
   - **2014** – świadectwo ukończenia kursu specjalistycznego dla kadry kierowniczej Policji średniego szczebla zarządzania, z zakresu zarządzania zasobami ludzkimi;
   - **2006** – dyplom, doktor nauk medycznych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład i Katedra Medycyny Sądowej, praca finansowana przez KBN ze środków na naukę jako projekt badawczy – grant promotorski nr 2 P05A03129, wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Jarosława Berenta,
     Tytuł rozprawy: Polimorfizm STR niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu (HumGH@) i jego wykorzystanie w identyfikacji osobniczej;
   - **2003** - świadectwo ukończenia studiów podyplomowych, Uniwersytet Jagielloński Wydział Biotechnologii, Studia Podyplomowe, Biologia Molekularna;
   - **2002** – świadectwo posiadania uprawnień do wydawania opinii w imieniu policyjnych laboratoriów kryminalistycznych ze specjalności genetyka sądowa;
   - **2001** - świadectwo ukończenia studium oficerskiego o profilu ekspertów kryminalistyki, Wyższa Szkoła Policji w Szczytnie;
   - **1998** – dyplom, mgr analityki medycznej, Akademia Medyczna im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, Wydział Farmaceutyczny, kierunek: analityka medyczna.

3. **Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**
   - **2011 – 2014** starszy specjalista badawczo – techniczny Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji Instytutu Badawczego;
   - **2014 – 2015** Zastępca Kierownika Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji Instytutu Badawczego;
   - **2015 – 2016** główny specjalista badawczo - techniczny Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji Instytutu Badawczego;
   - **2016** – obecnie Kierownik Zakładu Biologii Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji Instytutu Badawczego.

4. **Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)**

a) **Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**„Badanie użyteczności i walidacja markerów wchodzących w skład modelu do epigenetycznego przewidywania wieku"**

Osiągnięcie zostało udokumentowane cyklem 4 oryginalnych publikowanych w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR), których sumaryczny IF wynosi 18,119, a łączna liczba punktów MNiSW to 145. Wymienione prace powstały po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych.

b) **Autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa:**

- **Spólnicka M.**, Zbieć-Piekarska R., Jaskuła E., Basak G., Jacewicz R., Pięta A., Makowska Ż., Jedrzejczyk M., Wierzbowska A., Pluta A., Robak T., Berent J., Branicki W., Jędrzejczak W., Lange A., Płoski R., Donor age and C1orf132/MIR29B2C determine age-related methylation signature of blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 2016, Clin Epigenetics, 6 (8): 93
- **Spólnicka M.**, Pośpiech E., Pepłońska B., Zbieć-Piekarska R., Makowska Ż., Pięta A., Karłowska-Pik J., Ziemkiewicz B., Wężyk M., Gasperowicz P., Bednarczuk T., Barcikowska M., Żekanowski C., Płoski R., Branicki W., DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups, 2018, Int J Legal Med., 132(1): 1-11
- **Spólnicka M.**, Zbieć-Piekarska R., Karp M., Machnicki M.M., Własiuk P., Makowska Ż., Pięta A., Gambin T., Gasperowicz P., Branicki W., Giannopoulos K., Stokłosa T., Płoski R., DNA methylation signature in blood does not predict calendar age in patients with chronic lymphocytic leukemia but may alert to the presence of disease, 2018, Forensic Sci Int Genet. 34, 15 - 17
- **Spólnicka M.**, Pośpiech E., Adamczyk J. G., Freire-Aradas A., Pepłońska B., Zbieć-Piekarska R., Makowska Ż., Pięta A., Lareu M. V., Phillips Ch., Płoski R., Żekanowski C., Branicki W.,: Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers, 2018, Aging-US, https://doi.org/10.18632/aging.101385

5. **Omówienie celu naukowego w/w prac, osiągniętych wyników wraz z wnioskami naukowymi oraz omówienie ich ewentualnego wykorzystania**

**Wstęp**

Słownik języka polskiego definiuje wiek chronologiczny (zwanym również kalendarzowym lub metrykalnym), jako długość życia człowieka od urodzenia do danej chwili. Natomiast wiek jako cecha osobnicza jest oceną jednostki lub grupy w stosunku do standardu, jaki wyznaczają normy rozwojowe, będące wartością średnią cechy dla danej grupy wiekowej. Już te dwie definicje pokazują różnice pomiędzy wiekiem chronologicznym, a wiekiem jako cechą osobniczą, na którą mogą mieć wpływ nie tylko czynniki genetyczne, ale także choroby lub styl życia danej jednostki.

Od lat 80. ubiegłego wieku uznano, że wiarygodne biomarkery starzenia będą potrzebne do osiągnięcia takich celów jak zrozumienie, spowolnienie, zatrzymanie, a nawet odwrócenie tego procesu.

Zamiast stosować wiek chronologiczny, który jest niedoskonałą, zastępczą miarą procesu starzenia się, Baker i Sprott zaproponowali identyfikację biomarkerów, które mogą dokładnie i szybko przewidywać funkcjonalność osoby i ocenić, jak się ona zmienia wraz z wiekiem - czyli zidentyfikować markery wieku biologicznego [Baker G. i Sprott R., 1988]. Osoby w tym samym wieku chronologicznym mogą wykazywać bardzo różne podatności na choroby związane ze starzeniem się i śmiercią, co prawdopodobnie odzwierciedla różnice w czynnikach leżących u podstaw biologicznych procesów starzenia [Levine M. E. i wsp., 2018].

Próby znalezienia biomarkerów procesów starzenia stanowią niezwykle ważny kierunek wielu badań prowadzonych na świecie. Pomyślne ich zidentyfikowanie wymagało znacznych przełomów technicznych. Pierwsze z nich obejmowały ukończenie projektu zsekwencjonowania ludzkiego genomu, postępów w rozwoju technologii mikromacierzy i rozwoju narzędzi biostatycznych [Laird, P. W. i wsp. 2010, Horvath S, Raj K., 2018]. Bardzo ważną zmianą w kulturze naukowej było otwarcie dostępu do danych, który doprowadził do możliwości ich łączenia i analizowania dużych zbiorów w ogólnodostępnych repozytoriach, takich jak *Gene Expression Omnibus (GEO)* [Edgar R. i wsp., 2002] i *The Cancer Genome Atlas (TCGA)* [The Cancer Genome Atlas Research Netwok i wsp. 2013].

Obecnie ocena poziomu metylacji DNA (DNAmet) wybranych markerów uważana jest za najbardziej obiecujące źródło informacji na temat przewidywanego wieku.

Wykazano, że markery metylacji DNA przewyższają inne typy potencjalnych czynników predykcyjnych wieku, w tym skracanie telomerów, zależne od wieku rearanżacje receptorów limfocytów T (sjTREC) i stężenie mRNA [Zubakov D. i wsp. 2016, Jones MJ i wsp., 2015].

Metylacja DNA jest podstawowym procesem biochemicznym zachodzącym w genomie podczas rozwoju. Polega na kowalencyjnym dołączeniu grupy metylowej ($-CH_3$) do atomu węgla w pozycji piątej cytozyny [Xu i wsp., 2004]. Wraz ze starzeniem zachodzą zmiany we wzorcach metylacji DNA. Miejsce ciągów CpG, które zostały nazwane wyspami CpG, są głównie hipermetylowane wraz z wiekiem, natomiast CpG hipometylowane, zwykle znajdują się poza nimi [Bekaert i wsp., 2015]. Udowodniono także, że u ludzi w starzejących się w komórkach, lokalnie występuje obfita metylacja cytozyn w wyspach CpG, które znajdują się w promotorach ważnych genów [Lokk i wsp., 2014]. Obserwuje się u nich stopniową utratę zdolności ekspresji niektórych genów w wyniku hipermetylacji wysp CpG. Do tych genów należą między innymi te, które kodują: białka blokujące namnażanie komórek, białka p53 blokujące wzrost nowotworów, czynniki transkrypcyjne związane z mitochondriami, dysmutazy ponadtlenkowe i lipooksygenazy [Sawicki i wsp., 2015].

Duża ilość loci metylacji DNA w genomie ludzkim, które są liniowo skorelowane z wiekiem i mogą uzupełniać się wzajemnie umożliwia bardzo dokładne oszacowanie wieku określanego również jako wiek epigenetyczny lub wiek metylacyjny/DNA [Bocklandt S. i wsp., 2011, Hannum G. i wsp., 2012]. Wiek DNA jest nie tylko odzwierciedleniem wieku chronologicznego, ale także osobniczego, określanego również jako biologiczny. Mechanizmy molekularne wpływające na biomarkery DNAmet, które mogą zmieniać predykcję wieku muszą być dokładnie poznane, co przyczyni się do pełnego wykorzystania ich potencjału. Obecnie jedną z głównych kwestii do rozstrzygnięcia w epigenetyce i predykcji wieku jest to, czy obserwowane zmiany są wynikiem akumulacji ekspozycji i zdarzeń, czy też istnieje program bazowy [Horvath S. i Raj K. i wsp. 2018, Marioni RE i wsp. 2015].

Zauważono, że środowisko i indywidualny styl życia mogą wpłynąć na genom i powodować jego zmiany, które mogą ujawnić się na różnych etapach życia danej osoby, a nawet w późniejszych pokoleniach. Przeprowadzone ostatnio badania potwierdzają hipotezę, że metylowane DNA działa jako łącznik między ustalonym genomem, a dynamicznym środowiskiem. Zmiany w modelach metylacji DNA

następują w odpowiedzi na stres środowiskowy we wczesnym rozwoju lub później jako mechanizm długookresowej adaptacji genomu, co umożliwia ekspresję różnych fenotypów [Vidaki, 2015]. Kilka badań dotyczących bliźniaków jednojajowych wykazało związek pomiędzy środowiskiem, starzeniem się, a długotrwałymi epigenetycznymi zmianami w fenotypie [Fraga i wsp., 2005; Wong i wsp., 2005]. Bliźniaki jednojajowe są idealnym modelem do badania epigenetyki, ponieważ mają takie same podstawy genetyczne, a w chwili oddzielania oba zarodki mają prawie identyczne wzory metylacji. Wykazano również, że bliźniaki w młodym wieku wykazują podobne ilości metylacji DNA, podczas gdy w wieku starszym różnią się znacznie nie tylko w ilości, ale także w modelach metylacji DNA [Fraga i wsp., 2005; Bocklandt i wsp., 2011].

Dryf epigenetyczny zdefiniowano jako zbiór zmian epigenetycznych nabytych wraz z wiekiem, które mogą być związane ze środowiskiem, w którym człowiek się starzeje. Miejsca dryfu epigenetycznego są unikalne dla osobnika i dlatego przyczyniają się do zwiększenia rozbieżności między epigenami ludzkimi w czasie. Z drugiej strony zegar epigenetyczny reprezentuje odmienne zjawisko biologiczne. W 2013 r. Horvath i inni opublikowali artykuły identyfikujące miejsca metylacji DNA w genomie, które były tak niezawodnie związane z wiekiem, że można je było wykorzystać do przewidywania wieku powiązanego z procesami związanymi z cyklem życiowym [Horvath S., 2013]. Publikacja ta doprowadziła do wniosku, że zegar epigenetyczny zasadniczo odzwierciedla proces programowego starzenia się. Występuje on obok rosnącej zmienności spowodowanej dryftem epigenetycznym w miejscach w genomie, które niezawodnie "tykają" wraz z wiekiem. Chociaż niektóre miejsca z zegara mogą być powszechne w tkankach, każda z nich może w rzeczywistości mieć własny zestaw "idealnych" miejsc zegarowych. Wykazano również, że DNAmet w różnych miejscach CpG może podlegać odmiennym regulacjom [Bacalini MG i wsp. 2017]. Zatem śledzenie poszczególnych markerów epigenetycznych może zapewnić lepszy wgląd w procesy molekularne leżące u podstaw starzenia się poprzez ujawnianie aktywności komórkowej i potencjalnych interakcji, w których biorą udział kluczowe geny.

Ostatnie prace sugerują, że przyspieszone starzenie epigenetyczne, wynikające z różnicy pomiędzy wiekiem chronologicznym a biologicznym, jest związane ze zmniejszeniem ogólnego stanu zdrowia lub stanu chorobowego i zwiększoną śmiertelnością [Marioni R. E. i wsp. 2015, Levine M. E. i wsp. 2018]. Epigenetyka

starzenia się jest obiecującym krokiem w kierunku śledzenia lub poprawy zdrowia starzejącej się populacji. Dlatego też dobór właściwych biomarkerów wieku będzie kluczowy dla zrozumienia procesów starzenia organizmów poprzez zapewnienie mierzalnego wyniku, który w przeciwieństwie do przypadków śmierci lub choroby nie wymaga bardzo długich obserwacji. Warto zauważyć, że czynniki takie jak tytoń, alkohol, czynniki rakotwórcze, stres lub choroby zakaźne, a nawet dieta lub aktywność fizyczna mogą wpływać na metylację DNA [Hannum G. i wsp., 2012, Mathers J. C. i wsp., 2010]. Zbadanie, w jaki sposób szacowany wiek epigenetyczny różni się w grupie osób w tym samym wieku chronologicznym, może pomóc w określeniu wpływu poszczególnych czynników endogennych lub egzogennych na starzenie się biologiczne.

W ostatnich latach również na etapie prowadzonych postępowań karnych dostrzeżono potencjał w badaniach genetycznych nad wiekiem człowieka.
Stosowane powszechnie profilowanie DNA umożliwia jedynie identyfikację osoby poprzez bezpośrednie porównanie z profilem oznaczonym z materiału porównawczego, bądź też pośrednie przy wykorzystaniu profili genetycznych osób spokrewnionych. Brak hipotezy na temat sprawcy przestępstwa na etapie prowadzonego dochodzenia ogranicza obecnie znacząco przydatność analizy śladów biologicznych pozostawionych przez niego na miejscu zdarzenia. W przypadkach, w których nie ma wytypowanego podejrzanego, oznaczony profil DNA zostaje wprowadzony do bazy danych DNA w celu uzyskania potencjalnego dopasowania z profilami wcześniej w niej zgromadzonymi. Gdy nie dojdzie do dopasowania profilu DNA oznaczonego ze śladu ze zgromadzonymi w bazie badania genetyczne stają się bezużyteczne. Można zatem zdefiniować oczekiwania organów ścigania prowadzących postępowania – istnieje potrzeba wspomożenia procesu wykrywczego w informacje genetyczne, które pozwolą doprowadzić do przestępcy, jedynie na podstawie zostawionego przez niego na miejscu zdarzenia śladu, czyli udzielenia odpowiedzi na pytania jak ta osoba wygląda, ile ma lat, jaki styl życia prowadzi.

Dlatego też wyodrębnienie dodatkowych informacji dotyczących pochodzenia biogeograficznego lub wyglądu fizycznego sprawcy, czy wieku mogą okazać się bardzo użyteczne w śledztwach policyjnych. Informacja o wieku osoby może

uzupełniać dane umożliwiając lepszy opis nieznanej osoby, co mogłoby wspomagać wykonanie portretu pamięciowego podejrzanego, czy też zawężenia liczby potencjalnych podejrzanych [Kayser M. i wsp. 2009, Kayser M. i wsp. 2011]. Do chwili obecnej dobrze zbadanymi markami cech zewnętrznych (*Externally Visible Characteristics EVCs*) są markery polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (*SNP*) związane z pigmentacją, np. zmiany w zabarwieniu tęczówki, włosów i skóry [Sulem P. i wsp. 2007, Walsh S. i wsp. 2011, Walsh S. i wsp. 2014]. Jednak takie markery pigmentacji mogą być nieużyteczne, w niektórych populacjach z niewielką zmiennością tej cechy, takich jak Azjaci i Afroamerykanie, natomiast wiek można wykorzystać niezależnie od przynależności etnicznej do przewidywania wyglądu osoby [Lee H.Y. i wsp. 2016]. Trudno też zbagatelizować fakt, że starzenie się ma wyraźny wpływ na niektóre cechy takie jak kolor włosów, zmarszczki skóry, czy łysienie męskie.

Postęp epigenetyki doprowadził do identyfikacji wielu markerów CpG, wykazujących zależne od wieku zmiany metylacji DNA w różnych typach tkanek i komórek. W kilku badaniach zgłoszono modele predykcyjne wieku, które można zastosować w szerokim spektrum tkanek, a także w oparciu o wykorzystanie krwi lub śliny ze znaczną dokładnością przewidywania (<5 lat) [Bocklandt S. i wsp. 2011; Hannum G. i wsp. 2012; Horvath S. 2013; Weidner C. I. i wsp. 2014]. Dlatego też w swojej pracy naukowej zajęłam się badaniem metylacji DNA, która umożliwiła selekcję loci wykazujących znaczną korelację statusu metylacji z wiekiem biologicznym z krwi ludzkiej [Zbieć-Piekarska i wsp., 2015 a, b]. W badaniach w latach 2013 -2016 byłam wykonawcą projektu w ramach, którego przy zastosowaniu technologii pirosekwencjonowania przeanalizowaliśmy 41 miejsc CpG na zebranej próbie pochodzącej z krwi od 420 mężczyzn i kobiet w wieku od 2 do 75 lat. Używając danych otrzymanych z 300 próbek zbudowaliśmy model oparty na pięciu CpG wykazujących najwyższą korelację, zlokalizowanych w genach: ELOVL2, C1orf132/MIR29B2C, TRIM59, KLF14 i FHL2. Metodę opracowano po przeprowadzeniu analizy danych *in silico* oraz replikacji wyników uzyskanych przez Hannum i wsp. To ograniczenie pozwoliło na uproszczenie analizy bez obniżenia dokładności predykcji, ponieważ zbudowany model pozwala na predykcję wieku z błędem szacowania na poziomie 4,5 roku z krwi. Średni bezwzględny błąd dla puli testowej 120 próbek wynosił 3,9 roku. Liczba poprawnych ustaleń wieku, biorąc pod

uwagę błąd rzędu ± 5 lat, przekroczyła 85% w grupie ludzi młodych (w wieku od 2 do 19 lat), natomiast w grupie wiekowej 60-75 lat, liczba poprawnych ustaleń wieku stanowiła 50%. Precyzja szacunków zależała od przedziału wiekowego i u osób starszych znacząco malała. Opracowany model szacowania wieku jest dostępny online w formie kalkulatora na stronie internetowej: *http://www.agecalculator.ies.krakow.pl* [Zbieć- Piekarska i wsp., 2015b].

Nasz model opierał się na pomiarach poziomu metylacji markerów zlokalizowanych w 5 genach (wyspy CpG). Geny te są lepiej lub gorzej poznane, kodują białka biorące udział w podstawowych procesach biologicznych. I tak: *ELOVL2* koduje enzym elongaza 2 kwasów tłuszczowych biorący udział w syntezie długołańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFA). Jest to białko transbłonowe, którego ekspresja na wysokim poziomie zachodzi w wątrobie [Zbieć-Piekarska i wsp., 2015 a.]. Garagnani i wsp. (2012) wysnuli hipotezę, że regulacja ekspresji *ELOVL2* przez metylację może być związana z procesem starzenia, ponieważ wiadomo, że PUFA są zaangażowane w ważne procesy biologiczne, takie jak stan zapalny lub wytwarzania energii. Stwierdzono również, że PUFA odgrywają rolę w odpowiedzi na fotostarzenie ludzkiej skóry.

*FHL2* to gen który koduje wielofunkcyjne białko adaptacyjne biorące udział w regulacji transkrypcji genów, transdukcji sygnału oraz proliferacji i różnicowaniu komórek [Kadrmas J. L. i wsp. 2004]. Ponadto białko to wchodzi w skład kompleksu odgrywającego ważną rolę w wytwarzaniu amyloidu beta, którego kumulacja wiąże się z początkami choroby Alzheimera [McCarthy 2005, Tanahashi H i wsp. 2000]. Natomiast *KLF14* poprzez stymulację cytokin może być zaangażowany w indukcję stanów zapalnych, jak również odgrywać rolę w tworzeniu zmian miażdżycowych. Stwierdzono, że rodzina KLF uczestniczy w modulacji transkrypcyjnej genów neuronalnych, np. receptora D2 dopaminy [Seo S. i wsp. 2012]. Wykazano, że utrata *KLF14* u myszy powoduje amplifikację centrosomu i powstawanie nowotworu, i zasugerowano, że redukcja *KLF14* może zwiększać ryzyko raka sutka i raka okrężnicy [Fan G i wsp. 2015].

*TRIRM59* to gen kodujący białko ligazę ubikwityny, które jest indukowane przez interferon typu I i typu II, kluczowe dla wielu aspektów oporności na patogeny. *TRIM59* może być zaangażowany w proces neurodegeneracji na przykład przez udział w akumulacji łańcucha włókien nerwowych, podobnie jak *TRIM2* [Balastik M. i wsp.,

2008]. Ten gen jest zaangażowany w procesy nowotworzenia i został zasugerowany jako marker wielotorowy wykrywający wczesną tumorogenezę [Khatamianfar V i wsp., 2012 ]. Kilka danych sugerowało pro-apoptotyczną współpracę p53 i *TRIM59*, a aktywacja sygnalizacji p53 jest powszechnie znana, prowadząc do śmierci neuronów postmitotycznych u pacjentów z chorobą Alzheimera. Fizyczna interakcja *TRIM59* i p53 pod wpływem regulacji *TRIM59* powoduje ubikwitynację i degradację p53 [Zhou Z. i wsp., 2014].

Piąty marker w naszym modelu jest położony w genie *C1orf132/MIR29B2C* i jego rola biologiczna jest nie do końca poznana. Zaobserwowano hypometylację markera z wiekiem. Ostatnio wykazano, że koduje on długi niekodujący RNA (lncRNA), który na swoim końcu 3 'zawiera mikroRNA *MIR29B2C* [Kurinna S. i wsp., 2014]. U myszy rodzina miR29 (miR29ab1 i miR29b2c) jest zaangażowana w samoodnawiającą zdolność krwiotwórczych komórek macierzystych, jak również w określaniu wielkości narządu i ciała [Kauffman L. i wsp., 2015].

Biorąc pod uwagę rolę biologiczną jaką odgrywają geny, w obszarze których są położone markery wchodzące w skład modelu oraz potencjalny wpływ czynników środowiskowych na te pozycje CpG, ich wykorzystanie do analizy predykcyjnej DNA w badaniach kryminalistycznych zależy w dużej mierze od ich dokładnego zbadania. Dlatego też założyliśmy, że dalsze badania powinny wyjaśnić, czy poszczególne markery metylacji DNA, które weszły w skład naszego modelu, są dobrze dobrane, jako czynniki predykcyjne wieku u osób cierpiących na określone choroby lub poddane działaniu innych czynników zewnętrznym takich jak zabiegi medyczne, czy ekstremalny wysiłek fizyczny.

**Cel naukowy**

W swoim cyklu badawczym zajęłam się testowaniem stanu metylacji DNA i możliwościami predykcyjnymi pięciu markerów (ELOVL2 C7, C1orf132/MIR29B2C C1, TRIM59 C7, KLF14 C1 i FHL2 C2) w różnych grupach. Celem tego badania było określanie ograniczeń prognozowania wieku chronologicznego za pomocą zbudowanego przez nas modelu [Zbieć-Piekarska i wsp., 2015b] w rutynowych analizach kryminalistycznych. Przesłanką jaką się kierowałam było założenie, że nawet najbardziej odpowiedni zestaw kryminalistycznych markerów do przewidywania wieku powinien zostać zwalidowany w sposób umożliwiający udzielenie odpowiedzi

na pytane, jakie zależności pojawiają się pomiędzy predykcją wieku za pomocą opracowanego modelu (markerów w nim zawartych), a wpływem czynników środowiskowych.

**Omówienie poszczególnych grup badanych - motywacja do badania, wyniki i wnioski**

**Osoby po allogenicznym krwiotwórczym przeszczepie komórek macierzystych** (Spólnicka M., Zbieć-Piekarska R., Jaskuła E., Basak G., Jacewicz R., Pięta A., Makowska Ż., Jedrzejczyk M., Wierzbowska A., Pluta A., Robak T., Berent J., Branicki W., Jędrzejczak W., Lange A., Płoski R., Donor age and C1orf132/MIR29B2C determine age-related methylation signature of blood after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Clin Epigenetics, 2016, 6 (8): 93)

**Motywacja do badania**

Na modelach zwierzęcych wykazano, że osoby w podeszłym wieku narażone na działanie młodego środowiska systemowego, na przykład poprzez chirurgiczne połączenie układu krążenia u młodego i starego zwierzęcia wykazują zmniejszone oznaki starzenia biologicznego w układzie sercowo-naczyniowym, szkieletowym i żołądkowo-jelitowe, a także ośrodkowym układzie nerwowym [Conboy I. M. i wsp. 2005, Bouchard J. i wsp., 2015]. Parabioza jest systemem ściśle eksperymentalnym, ale ma pewne podobieństwa ze stanem klinicznym podczas allogenicznego przeszczepu, w tym przeszczepu krwiotwórczych komórek macierzystych krwi obwodowej (*HSCT*) [Castellano J. M. i wsp., 2015]. Bardziej zasadniczym pytaniem, jakie postawiliśmy było czy mierząc metylację DNA z krwi biorcy po przeszczepie sprawdzamy faktyczny stan metylacji markerów biorczy, czy też dawcy. Dlatego też postanowiliśmy ocenić wpływ *HSCT* na 5 markerów CpG z naszego modelu w szczególności zbadać wpływ wieku dawcy na biorcę, a także ocenić, jakie różnice występują w metylacji po przeszczepie w poszczególnych markerach.

**Materiał badawczy**

Przebadaliśmy próbki krwi obwodowej od 16 par dawców i biorców. Jedenastu pacjentów było chorych na ostrą białaczkę mieloblastyczną, dwie z powodu chorób

mieloproliferacyjnych, jedna z ostrą białaczką limfoblastyczną komórek T, jedna z przewlekłą białaczką mieloblastyczną i jedna z napadową nocną hemoglobinurią. Czternaście par było tej samej płci, dwóch mężczyzn otrzymało przeszczep od kobiet. Próbki od dawców zostały pobrane dla celów typowania HLA w ciągu 6 miesięcy przed *alloHSCT*. Próbki od biorców po *alloHSCT* pobrano po medianie wynoszącej 91 dni (zakres 27-360). Mediana wieku biorców wynosiła 45 lat (zakres 18-59), natomiast mediana wieku dawców komórek macierzystych wynosiła 28 lat (zakres 20-63).

**Wyniki**

Stwierdzono, że u biorców przewidywany wiek nie korelował z ich wiekiem chronologicznym, ale był skorelowany z wiekiem chronologicznym i przewidywanym odpowiedniego dawcy. Pomimo bardzo silnej korelacji między przewidywanym wiekiem biorcy, a przewidywanym wiekiem dawcy zauważyliśmy, że we wszystkich przypadkach z wyjątkiem jednego przewidziany wiek metylacyjny oznaczony z krwi biorców po *HSCT* był niższy niż wiek przewidziany na podstawie wieku metylacyjnego u dawców. Różnica ta była stosunkowo niewielka (średnia 3,7 roku), ale była wysoce statystycznie istotna i nie zależała od płci, wieku biorcy, długości okresu od *HSCT*, a pobieraniem krwi w grupie biorców, ani też od różnicy w wieku chronologicznym między dawcami, a biorcami. Dalsze badania prowadziliśmy aby sprawdzić, czy stała różnica między przewidywanym wiekiem biorcy, a przewidywanym wiekiem dawcy była spowodowana spójnymi efektami wszystkich predyktorów CpG, czy też kierunek zmian metylacji DNA był różny w poszczególnych markerach. Stwierdziliśmy, że pozornie niższy przewidywany wiek u biorców w porównaniu do przewidywanego wieku dawców po *HSCT* wynikał tylko z selektywnej hipermetylacji CpG w locus *C1orf132/MIR29B2C C1* (średnia różnica 8,2%, SD = 6,9%), a wielkość wzrostu metylacji tego markera u biorców vs. dawców korelowała z wiekiem chronologicznym dawców. Co ciekawe, wielkość hipermetylacji *C1orf132/MIR29B2C* u biorców była bezpośrednio pozytywnie skorelowana z wiekiem dawców (-im starszy dawca, tym wyższa metylacja). Ponieważ w *C1orf132*/MIR29B2C metylacja zmniejsza się wraz z wiekiem chronologicznym, zwiększona metylacja może sugerować, że w tym konkretnym CpG *HSCT* indukuje "odmłodzenie", które staje się silniejsze wraz z rosnącym wiekiem dawcy. Jednakże, ponieważ *HSCT* od starszych dawców jest mniej skuteczny niż od młodszych dawców

[Kroger N. i wsp., 2013], jest mało prawdopodobne, że obserwujemy prawdziwe odmłodzenie z pozytywnymi konsekwencjami klinicznymi.

**Wnioski**

Po *HSCT* wiek dawcy jest główną determinantą charakterystyczną dla oznaczenia wieku na podstawie metylacji we krwi biorcy. Nowatorskim odkryciem jest unikatowa dynamika metylacji *C1orf132* kodujący *MIR29B2C*, który może być zaangażowany w samo odnawianie się hematopoetycznych komórek macierzystych. Nasze wyniki sugerują, że locus *C1orf132/MIR29B2C* może być ważny dla funkcji przeszczepu po *HSCT*, a zatem powinien być dalej badany jako marker prognostyczny. Natomiast ta potencjalne interesująca rola z biologicznego punktu widzenia w pewnych okolicznościach w badaniach sądowych może zmniejszyć praktyczną przydatność tego locus dla przewidywania wieku.

**Osoby z wczesną (EOAD) i późną (LOAD) postacią choroby Alzheimera oraz z chorobą Gravesa Basedowa (GD)**

**Spólnicka M.**, Pośpiech E., Pepłońska B., Zbieć-Piekarska R., Makowska Ż., Pięta A., Karłowska-Pik J., Ziemkiewicz B., Wężyk M., Gasperowicz P., Bednarczuk T., Barcikowska M., Żekanowski C., Płoski R., Branicki W., DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups, Int J Legal Med., 2018, 132(1): 1-11

**Motywacja do badania:**

Choroba Alzheimera (*Alzheimer disease – AD*) to najpowszechniej występujący typ otępienia, które postępuje na przestrzeni lat, powodując poważne deficyty funkcji poznawczych. Na Alzheimera chorują najczęściej osoby starsze, który ukończyły 65 rok życia, dlatego tak często wiązana jest z mniejszą sprawnością umysłową z powodu wieku. Proces choroby powoduje uszkodzenia w korze mózgowej, co w konsekwencji prowadzi do kłopotów z mową, pamięcią czy myśleniem. Osoby cierpiące na to schorzenie charakteryzują się dużą utratą neuronów spowodowaną nadprodukcją β-amyloidu i hiperfosforylowanego białka tau związanym z mikrotubulami, zgromadzonymi odpowiednio w starczych blaszkach i splątkach neurofibrylarnych. Płytki starcze z minimalną korową patologią tau i brak towarzyszącej historii upośledzenia poznawczego są również cechami patologicznego starzenia [Moore B. D.

i wsp., 2012]. Istnieją dwa główne typy *AD*: *EOAD* (*early-onset Alzheimer disease)* I *LOAD* (*late-onset Alzheimer disease)*. *EOAD* (stanowi 1-5% wszystkich przypadków *AD*, a w 40% jest związany z mutacjami w genach *PSEN1*, *PSEN2* i *APP)*. Badana grupa pacjentów *EOAD* została dobrze scharakteryzowana genetycznie [Żekanowski C. i wsp., 2003, 2005, Bialopiotrowicz E. i wsp., 2011]. Genetyka *LOAD* jest nadal słabo poznana, ale znaczące postępy dokonały analizy GWAS, które zidentyfikowały 25 genów związanych z tym typem *AD* [Cuyvers E. i wsp., 2016].
Natomiast choroba Graves Basedova (*Graves disease* - *GD*) to schorzenie autoimmunologiczne o podłożu genetycznym, które wpływa na tarczycę prowadząc do jej nadczynności. Stężenie sjTREC u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa jest zgłaszane jako wyższe w stosunku do osób zdrowych, u których maleje ilość sjTREC z wiekiem, co ma związek z zanikiem grasicy [Strawa K. i wsp., 2014]. W 2011 roku w dziedzinie medycyny sądowej opublikowano wyniki badań nad testem DNA opartym na kwantyfikacji DNA sjTREC. Test opierał się na logarytmicznym spadku obwodowej liczby sjTREC wraz ze wzrostem wieku człowieka w procesie trwającym całe życie [Ou X. i wsp., 2011].

Dlatego też rozpatrując powyższe grupy naszą główną motywacją do ich badania było to, że wszystkie trzy choroby mogą potencjalnie wiązać się z przyspieszonym/opóźnionym starzeniem i wpływać na parametry dokładności przewidywania wieku, a zatem idealnie pasują do naszego celu oceny potencjalnego rozregulowania metylacji DNA markerów stosowanych do prognozowania wieku chronologicznego.

**Materiał badawczy**

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od 31 pacjentów *EOAD*, 68 pacjentów *LOAD* i 91 pacjentów z *GD*. Ze względu na opisane różnice w korelacji wieku DNA i dokładności przewidywania wieku między młodszymi i starszymi osobami [np. Zbieć-Piekarska R. i wsp. 2015b; Freire-Aradas A. I wsp., 2016], pacjentów podzielono na kategorie wiekowe i obliczenia przeprowadzono dla każdej grupy wiekowej osobno. Pacjenci *EOAD* podzielono na młodszą grupę EOAD (wiek 31-44 lat) i starszą grupę *EOAD* (wiek 45-68 lat). Pacjenci z *GD* zostali zakwalifikowani do młodszej grupy *GD* (wiek 12-30 lat) i starszej grupy *GD* (56-76), natomiast wszyscy pacjenci z *LOAD* stanowili tylko jedną kategorię wiekową (wiek

65-75 lat). Kontrolę stanowiło 120 osób zdrowych, dopasowanych oddzielnie dla poszczególnych grup pacjentów *EOAD*, *LOAD* i *GD*, stosując kryteria średniego wieku i rozkładu wieku między porównywanymi grupami.

**Wyniki**

W naszych badaniach stwierdziliśmy, że pacjenci z *EOAD* wykazywali przyspieszoną hipermetylację markera *TRIM59 C7*, a efekt był najbardziej znaczący w młodszej grupie *EOAD* ($P$ = 0,004). Analiza predykcyjna przy użyciu markera *TRIM59 C7* pokazała zmniejszoną dokładność przewidywania wieku u pacjentów z *EOAD*, a efekt był najbardziej znaczący w młodszej grupie *EOAD* (*MAE* = 12,2 obliczony dla pacjentów i *MAE* = 5,7 dla dobranej pod względem wieku grupy kontrolnej). Określenie wieku za pomocą markera *TRIM59 C7* u pacjentów młodszych z grupy *EOAD* wykazało, że mają znacznie zwiększony wiek, średnio o 9 lat w stosunku do grupy kontrolnej w podobnym wieku.

Natomiast zwiększona metylcja w młodszej grupie *EOAD* w markerze *KLF14 C1* wykazała zwiększony wiek o 10 lat, gdy porównaliśmy bezpośrednio przewidywany wiek pacjentów z kontrolami, chociaż nie zaobserwowano odchyleń dokładności przewidywania wyrażonych przez *MAE* dla tych pacjentów. Odchylenie marginalne w *MAE* zaobserwowaliśmy dla starszej grupy *EOAD* ($P$ = 0,035), a różnica była niewielka, gdy porównano przewidywany wiek ($P$ = 0,093).

Zmieniony wzór metylacji DNA zaobieraliśmy również w grupie pacjentów z *GD*. Podobnie jak u pacjentów z *EOAD*, hipermetylację była przyspieszona dla *TRIM59 C7* w młodszej grupie *GD*. Analiza predykcyjna przeprowadzona przy użyciu markera *TRIM59 C7* wykazała istotnie zmniejszoną dokładność przewidywania wieku u młodszych osób z *GD* (*MAE* = 8,6) w porównaniu do zdrowych osób z grupy kontrolnej (*MAE* = 4,9). Młodsi pacjenci z *GD* według przewidywań byli o 6 lat starsi niż osoby z grupy kontrolnej. Natomiast w markerze *FHL2 C2*, zaobserwowano istotnie obniżoną metylację dla młodszej grupy *GD*, ze znaczącą różnicą zaobserwowaną pomiędzy *MAE* z młodszej grupy *GD* (*MAE* = 3,8), a kontrolami (*MAE* = 8). Dla pacjentów z tej grupy wiek przewidywany wynosił mniej o 4,9 lata niż kontroli. Niejednoznaczny wynik uzyskano dla markera *KLF14 C1*. Chociaż obserwowana była istotnie zmniejszona dokładność przewidywania wieku mierzona za pomocą *MAE* w młodszej grupie *GD* w porównaniu do grupy kontrolnej, nie

zaobserwowaliśmy znaczącej różnicy w poziomie metylacji DNA i nie odnotowaliśmy znaczących różnic w średnim przewidywanym wieku. Niezmieniony poziom metylacji DNA i predykcji wieku stwierdziliśmy dla dwóch pozostałych markerów. *ELOVL2 C7* i *C1orf132/MIR29B2C C1* w trzech grupach chorób we wszystkich kategoriach wiekowych.

W kolejnym kroku opracowaliśmy wieloczynnikowy model predykcyjny obejmujący pięć związanych z wiekiem markerów CpG. Zbudowany metodą sztucznych sieci neuronowych (ANN) wieloczynnikowy model w przypadku predykcji wieku wszystkich pacjentów *EOAD*, prognozował ze znacznie zmniejszoną dokładnością (*MAE* = 7,1) w stosunku do zdrowej grupie kontrolnej (*MAE* = 3,8). Gdy analizowano oddzielnie różne kategorie wiekowe, efekt ten obserwowano tylko w młodszej grupie *EOAD*. Liczba poprawnych przewidywań również zmniejszyła się w całej grupie *EOAD* (38,7%) w porównaniu do grupy kontrolnej (70,2%) i ponownie efekt był widoczny zwłaszcza u młodszej grupy *EOAD*. Średnio pacjenci w całej grupie *EOAD* są starsi o 1,7 roku w stosunku do ich wieku kalendarzowego, ale o 6,4 roku analizując tylko grupę młodszą *EOAD*. Gdy na podstawie predykcji wieku dokonano porównania między pacjentami młodszymi z grupy *EOAD*, a osobami zdrowymi prognoza wieku była znacznie wyższa (5,8 lat) w stosunku do grupy kontrolnej. Nie stwierdziliśmy odchyleń w *MAE* i średnim przewidywanym wieku w pozostałych grupach, tj. u pacjentów z *LOAD* i *GD*, gdy zastosowano wieloczynnikowy model predykcji NN.

**Wnioski**

Uzyskane wyniki wykazały, że wybrane związane z wiekiem miejsca CpG mają niezmienioną zdolność przewidywania wieku w grupie pacjentów z późną postacią *AD*. Nieprawidłową hipermetylację i zmniejszoną dokładność predykcji stwierdzono natomiast w przypadku markerów *TRIM59 C7* i *KLF14 C1* w grupie wczesnej postaci *AD*, co sugeruje przyspieszone starzenie się tych pacjentów. U pacjentów z *GD* zaobserwowano zmieniony profil metylacji DNA i zmodyfikowaną dokładność przewidywania wieku dla *TRIM59 C7* i *FHL2C2* z obserwowaną zaburzoną hipermetylacją dla pierwszego i hipometylacją dla drugiego. Nasza praca podkreśla wysoką użyteczność markerów *ELOVL2* i *C1orf132/MIR29B2C* do przewidywania wieku chronologicznego w kryminalistyce poprzez pokazywanie niezmienionej dokładności prognozowania u osób dotkniętych trzema chorobami.

Ogólna dokładność stworzonego wielowymiarowego modelu *ANN* została istotnie zmniejszona u pacjentów z *EOAD*, co zmierzono za pomocą *MAE* i liczby pozytywnych przewidywań. Średni przewidywany wiek pacjentów był wyższy niż rzeczywisty ich wiek chronologiczny i wyższy niż średni wiek dobranych pod względem wieku zdrowych osób z grupy kontrolnej. W pozostałych grupach pacjentów z *LOAD* i *GD* wiek przewidywano z dokładnością podobną do obserwowanej w dobranych pod względem wieku zdrowych kontrolach.

**Osoby z przewlekłą białaczką limfocytową (chronic lymphocytic leukemia – CLL)**

**Spólnicka M.**, Zbieć-Piekarska R., Karp M., Machnicki M.M., Własiuk P., Makowska Ż., Pięta A., Gambin T., Gasperowicz P., Branicki W., Giannopoulos K., Stokłosa T., Płoski R., DNA methylation signature in blood does not predict calendar age in patients with chronic lymphocytic leukemia but may alert to the presence of disease, Forensic Sci Int Genet. 2018, 34, 15 - 17

**Motywacja do badania:** Przewlekła białaczka limfocytowa to choroba nowotworowa krwi, która atakuje osoby starsze (powyżej 65 r.ż.), ze zmiennym przebiegiem klinicznym, od łagodnej i często bezobjawowej choroby do agresywnej białaczki opornej na leczenie. Jej istotą jest niekontrolowane namnażanie i gromadzenie się zmienionych nowotworowo limfocytów, które wraz z postępem choroby "wypierają" zdrowe krwinki i dokonują dalszej ekspansji. *CLL* jest najczęstszym typem złośliwości hematologicznej dorosłych na półkuli zachodniej i stanowi 11% przypadków raka krwi. Szacowana zachorowalność w Europie i Ameryce Północnej wynosi 4,5 na 100 000 osób [https://seer.cancer.gov/statfacts/html/clyl.html]. To przekłada się na prawie 19.000 nowych przypadków w USA i prawie 2000 w Polsce rocznie [http://onkologia.org.pl/raporty/ accessed 04.10.2017]. Niedawno wprowadzone terapie poprawiają ogólny czas przeżycia, co sprawia, że częstość występowania *CLL* może znacznie wzrosnąć w najbliższej przyszłości. Ponieważ nie są znane wyniki predykcji wieku na podstawie analizy metylacji w obecności *CLL* dlatego też w kolejnej pracy postanowiliśmy przebadać krew tej grupy chorych wykorzystując nasz model [Zbieć-Piekarsk i wsp., 2015b].

**Materiał badawczy**

Przebadaliśmy 39 pacjentów z *CLL* w tym 19 mężczyzn i 20 kobiet. Średnia wieku pacjentów wynosiła 64,7 lat (SD = 10,8), natomiast kontroli 63,3 lata (SD = 8,6). Grupa kontrolna obejmowała 92 zdrowe osoby dopasowane do pacjentów pod względem wieku i płci. Ponadto wykorzystaliśmy poszerzoną grupę kontrolną niesparowaną z pacjentami pod względem płci lub wieku (n = 420) wybrani z wcześniej badanej kohorty [Zbiec-Piekarska R i wsp., 2015a].

**Wyniki**

Wśród kontroli średni wiek przewidywany na podstawie metylacji DNA wynosił 60,9 lat (SD = 7,8), tj. 2,4 roku mniej niż średni wiek chronologiczny (63,31 lat) i różnica ta mieściła się w granicy istotności statystycznej. Odwrotnie, wśród pacjentów średni wiek przewidywany z metylacji wynosił 75,5 lat (SD = 13,5), co stanowiło 10,7 lat więcej niż średni wiek chronologiczny w tej grupie (64,7 lat). 79,5% (31/39) przypadków *CLL* przewidywało wiek wyższy niż wiek chronologiczny, który istotnie różnił się od kontroli (29,6%, 27/91). Wśród kontroli była silna korelacja między wiekiem kalendarzowym, a wiekiem przewidywanym z metylacji, natomiast wśród pacjentów ta korelacja była słabsza i miała marginalne znaczenie statystyczne. W markerach *ELOVL2*, *TRIM59* i *FHL2* CpG u chorych wykazywały hipermetylację względem kontroli. Co ciekawe, nie było tak w przypadku *KLF14 C1* i *C1orf132/MIR29B2C C1*. W przypadku CpG w *KLF14* obserwowano wyraźny spadek metylacji (często do poziomów niewykrywalnych), podczas gdy dla *C1orf132/MIR29B2C C1* występowały podzbiory wykazujące zarówno hiper- i hypometylację, odpowiednio w porównaniu z kontrolami.

Wartości metylacji u osób z *CLL* w porównaniu z kontrolami sugerują, że dane dotyczące metylacji można wykorzystać do identyfikacji białaczki u badanych osób. Aby to przetestować, stworzyliśmy model klasyfikacji zdolny do różnicowania osób zdrowych i chorych. Jako grupę uczącą w modelu wykorzystano dane metylacji określone dla 32 miejsc CpG zlokalizowanych w genach *ELOVL2*, *FHL2*, *TRIM59*, *KLF14* i *C1orf132/MIR29B2C* dla chorych i zdrowych kontroli. Przeprowadziliśmy ocenę modelu za pomocą niezależnego, większego zestawu danych dotyczących metylacji zebranych dodatkowo od 420 zdrowych osób. Dla każdej próbki przewidywaliśmy prawdopodobieństwo choroby za pomocą modelu klasyfikacji

wyszkolonego na oryginalnym zbiorze danych pacjentów i kontroli. Dla wszystkich z wyjątkiem 6 przypadków *CLL* prawdopodobieństwo wystąpienia choroby było wyższe niż najwyższa wartość uzyskana dla badanej grupy kontrolnej (n = 420). Czułość testu zdefiniowana jako frakcja pacjentów, u których prawdopodobieństwo *CLL* było wyższe niż najwyższa wartość uzyskana w grupie kontrolnej i wynosiła 0,875. Co ważne, wiek kalendarzowy dawcy, który zwykle nie jest dostępny w badaniu niezidentyfikowanych plam krwi, nie jest potrzebny do prognozy.

Przeanalizowaliśmy również udział poszczególnych CpG w przewidywaniu obecności *CLL*. Dokonano obliczenia dla wszystkich CpG czułości prognozowania *CLL*. Najwyższe wartości uzyskano dla *ELOVL2 C2, ELOVL2 C5, TRIM59 C6* i TRIM59 C8, podczas gdy *ELOVL2 C6, FHL2 C2, FHL2 C4, KLF14 C1-C4* i *C1orf32/MIR29B2C C1-C3* miały wartości równe 0. Zauważyliśmy, że z pięciu CpG zastosowanych do przewidywania wieku w naszym testowanym modelu tylko *TRIM59 C7* miał znaczną czułość do przewidywania *CLL* ~ 0,6 podczas gdy FHL2 C2, KLF14 C1 i C1ofr32/MIR29B2C C1 były nieinformatywne.

W 26 przypadkach chorych prawdopodobieństwo wystąpienia testu *CLL* było wysokie (>0,99), co umożliwiało postawienie prawdopodobnej diagnozy (wśród kontroli najwyższe obserwowane wartości wynosiły ~ 0,5). Natomiast stwierdzono, że istnieją przypadki *CLL*, które mają niskie (blisko 0) prawdopodobieństwo choroby i są nieodróżnialne od kontroli, dlatego niskie wartości P naszej prognozy *CLL* powinny być traktowane raczej jako rezultat nierozstrzygający, niż wykluczenie choroby. Takie działanie testu jest podobne do obserwowanego dla metod zaprojektowanych do przewidywania innych cech fenotypu, na przykład kolor włosów / oczu i może być dokładne w niektórych przypadkach, podczas gdy w innych przypadkach informacje pochodzące z genetyki nie są rozstrzygające.

Opublikowaliśmy kalkulator, który wykorzystuje opisany powyżej model klasyfikacji do obliczenia prawdopodobieństwa wystąpienia białaczki dla danej próbki przy użyciu zestawu poziomów metylacji dostarczonych przez użytkownika (https://zsibio.ii.pw.edu.pl/shiny/sample -apps / methyl_leuk /). Jako dane wejściowe, kalkulator wymaga wprowadzenia poziomów metylacji DNA dla 32 miejsc CpG

w formacie i kolejności opisanej na stronie internetowej.

**Wnioski**

Nasze wyniki pozwalają wnioskować, że *CLL* ma silny i złożony wpływ na zależny od wieku profil metylacji DNA oznaczony z ludzkiej krwi, co wyklucza jej użycie do wiarygodnego prognozowania wieku chronologicznego u osób dotkniętych tą chorobą. Co ważne, w znacznej liczbie przypadków *CLL* badacz może zostać ostrzeżony o obecności choroby, pod warunkiem, że surowe dane metylacyjne będą odpowiednio przeanalizowane.

**Osoby uprawiające sport wyczynowo (zawodowi sportowcy)**

(Spólnicka M., Pośpiech E., Adamczyk J. G., Freire-Aradas A., Pepłońska B., Zbieć-Piekarska R., Makowska Ż., Pięta A., Lareu M. V., Phillips Ch., Płoski R., Żekanowski C., Branicki W.,: Modified aging of elite athletes revealed by analysis of epigenetic age markers, Aging-US, 2018, https://doi.org/10.18632/aging.101385)

**Motywacja do badania:** Powszechnie przyjmuje się, że osoby, których styl życia związany jest z umiarkowaną aktywnością fizyczną, charakteryzują się lepszym nastrojem i pamięcią, niższym poziomem chorób sercowo-naczyniowych i wolniejszym tempem starzenia [Lee I. M. i wsp. 2000; Gajewski A.K i Poznańska A., 2008]. W rzeczywistości większość badań wykazała dłuższą oczekiwaną długość życia i mniejsze ryzyko zgonu wśród zawodowych sportowców w porównaniu z ogólną populacją i te wyniki dotyczą szczególnie grupy sportowców wytrzymałościowych. [Teramoto M. i wsp. 2010; Garatachea N. i wsp. 2014; Lemez S I wsp. 2015]. W pracy śledziliśmy reakcję na intensywne ćwiczenia fizyczne poszczególnych skorelowanych z wiekiem markerów metylacji DNA oraz oceniliśmy ich potencjalny wpływ na procesy starzenia. Założyliśmy, że badanie może przyczynić się do odróżnienia markerów z miejsc bardziej podatnych na czynniki środowiskowe związane z życiem sportowców o najwyższym reżimie treningowym, od tych o regularnym wzorcu zmian metylacjnych.

**Materiał badawczy**

W pracy zbadaliśmy próbki krwi obwodowej grupy 174 sportowców wyczynowych

zdefiniowanych, jako osoby młode, zdrowe, prowadzące regularny tryb życia, narażone na ciężki trening fizyczny. Grupę kontrolną stanowiła krew 128 osób zdrowych z ogólnej populacji, dopasowanych pod względem wieku i płci. Grupa sportowców siłowych składała się z 57 mężczyzn (60,6%) i 37 kobiet (39,4%), a średnia wieku wynosiła 23 lata. Grupa sportowców wytrzymałościowych liczyła 55 mężczyzn (67,1%) i 27 kobiet (32,9%) w średnim wieku 25,2 lat.

**Wyniki**

Badania wykazały znacząco zmienione wzorce metylacji DNA w całej grupie sportowców w stosunku do grupy kontrolnej w markerach *TRIM59* C7 i *KLF14* C1, niezależnie od rodzaju treningu sportowców (wytrzymałościowy czy siłowy). Chociaż wyniki były istotne statystycznie zarówno dla grupy sportowców wytrzymałościowych, jak i siłowych, bardziej znaczące różnice odnotowano w *TRIM59* C7 dla sportowców siłowych. W *KLF14* C1 zaobserwowano hipermetylację dla sportowców siłowych i wytrzymałościowych o podobnych poziomach istotności. Analizy przeprowadzone oddzielnie dla kobiet i mężczyzn potwierdziły, że markery *TRIM59* C7 i *KLF14* C1 są znacząco hipermetylowane u sportowców obu płci.

Opracowany metodą sztucznych sieci neuronowych (ANN) model z wykorzystaniem 5 wybranych miejsc CpG przewidywał wiek dla całej grupy zawodowych sportowców z mniejszą dokładnością MAE=3,3 w porównaniu z grupą kontrolną MAE=2,4. Ten spadek dokładności przewidywania wieku był większy dla sportowców siłowych i wynosił MAE=3,7. Następnie z różnicy pomiędzy wiekiem chronologicznym i metylacyjnym obliczyliśmy przyspieszenie starzenia oraz oszacowaliśmy je pod kątem intensywnego wysiłku fizycznego. Analiza ta wykazała, że rodzaj wysiłku zawodowych sportowców istotnie wiąże się z przyśpieszeniem starzenia i jest istotny dla obu grup co wiąże się ze wzrostem poziomu metylacji w markerach *TRIM59* C7 i *KLF14*. C1 Poziom istotności zwiększył się, gdy jako predyktora wieku użyto tylko markera *TRIM59* C7, natomiast pozostał podobny dla *KLF14* C1 w obu grupach sportowców wytrzymałościowych i siłowych. Stwierdziliśmy, że rodzaj wysiłku fizycznego zawodowych sportowców jest istotnie związany z przyspieszeniem starzenia, co wskazuje na większe przyspieszenie starzenia sportowców uprawiających sporty siłowe w porównaniu do sportów uprawiających sporty wytrzymałościowe. Predykcja wieku wskazała na średnie różnice między grupami badanymi, a kontrolami:

dla CpG C1w *KLF14* wszyscy sportowcy byli starsi o 5.5 lat, wytrzymałościowi o 5.9 lat, natomiast siłowi o 5.1 lat. Dla CpG C7 w *TRIM59* sportowcy byli starsi 4.5 lat, siłowi o 5.6 lat, a wytrzymałościowi o 3.3 lata.

**Wnioski**

Nasze wyniki badań wskazują, że różne predyktory wieku mogą wykazywać wykrywalne różnice we wrażliwości na intensywny wysiłek fizyczny. W badaniu wykazano przyspieszoną hipermetylację markerów *TRIM59* i *KLF14* u zawodowych sportowców. Różnica ta wskazuje wyższy wiek epigenetyczny sportowców, co jest sprzeczne z danymi epidemiologicznymi ukazującymi dłuższy ich czas życia. Jednak oba geny, w obrębie których są położone *TRIM59* C7 i *KLF14* C1 biorą udział w działaniach przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych, co z kolei może wpływać na lepsze prognozy na życie. Uzyskane wyniki mogą ujawnić złożony wpływ intensywnego treningu fizycznego na proces starzenia. Wynikająca z tego zmniejszona ekspresja tych genów może potencjalnie uruchomić sieci sygnalizacyjne, które przyczyniają się do zaobserwowanego niższego ryzyka dla zawodowych sportowców w zakresie rozwoju chorób sercowo-naczyniowych i raka.

**Praktyczne wykorzystanie badań osiągnięcia naukowego w kryminalistyce**

W kryminalistyce ważne jest prognozowanie wieku kalendarzowego. Posiadając informację dotyczącą wieku sprawcy organy ścigania mogą dokonywać przeszukiwań baz informatycznych, typując z powodzeniem grupę docelową. Ponadto rozważając test DNA w kontekście określenia wieku biologicznego osoby, należy przypuszczać, że pozwoliłoby to na prognozowanie przybliżonego wyglądu fizycznego sprawcy przestępstwa pomagając w stworzeniu bardziej wiarygodnego, nieobarczonego czynnikiem ludzkim, jego portretu pamięciowego.

Zróżnicowanie markerów metylacji DNA na markery wieku chronologicznego i biologicznego może mieć bardzo istotne znaczenie. Ocenę markerów wieku można osiągnąć poprzez badanie ich reakcji na różne choroby i czynniki środowiskowe, które mogą zmienić metylację DNA wpływającą niekorzystnie na dokładność przewidywania wieku kalendarzowego. Z drugiej strony, dokładne poznanie zjawisk wywierających wpływ na metylację DNA, może bardziej ukierunkować badania na poznanie wewnętrznego dryfu epigenetycznego osoby, a co zatem będzie mieć wpływ

na zidentyfikowanie markerów, które będą prognozować choroby, styl życia, czy też śmiertelność.

Markerów epigenetycznie regulowanych w chorobach należy unikać w modelach predykcyjnych opracowanych do oszacowania wieku chronologicznego. Stworzony przez nas model *ANN* 5-CpG nie był w stanie przewidzieć dokładnie wieku w przypadku pacjentów z *EOAD*. Ponieważ *EOAD* jest bardzo rzadkim stanem, który dotyka jedynie 1-5% pacjentów z *AD*, odkrycie to ma niewielki wpływ na predykcję wieku dla celów sądowych. Również w przypadku zawodowych sportowców szacowanie wieku przy użyciu naszego modelu było mniej dokładne w porównaniu ze zdrowymi kontrolami. Jednak nasze badania sugerują, że każdy predyktor wieku metylacji DNA może mieć wyjątkową wrażliwość na różne czynniki zewnętrzne. Po *HSCT* wiek dawcy jest główną determinantą charakterystyczną dla oznaczenia wieku na podstawie metylacji we krwi biorcy. Używając zaproponowanego przez nas modelu predykcyjnego wykazaliśmy znacząco statystycznie niższy przewidywany wiek pacjentów po hematopoetycznym przeszczepie komórek macierzystych (*HSCT*) w stosunku do dawców. Wynik ten był niezgodny z raportem Weidner i wsp. [2015], a szczegółowa analiza naszych wyników wykazała, że zaobserwowana rozbieżność jest spowodowana różnymi zestawami predyktorów zastosowanych w obu badaniach. Efekt zaobserwowany w naszym badaniu był wynikiem hipermetylacji pojedynczego *locus C1orf132/MIR29B2C*, podczas gdy pozostałe *loci* zawarte w modelu nie wykazały tego wzorca. Oznacza to, że w niektórych przypadkach, takich jak *HSCT*, *C1orf132/MIR29B2C* może nie być dobrym prognostykiem wieku kalendarzowego. Jednak w dalszych badaniach stwierdziliśmy, że *C1orf132/MIR29B2C* i *ELOVL2* są stabilnymi markerami wieku w trzech grupach pacjentów *EOAD*, *LOAD* i *GD*. Warto zauważyć, że *HSCT* to bardzo rzadkie leczenie medyczne (~ 50 000 ogólnoświatowych *HSCT* w 2006 r.) w związku z czym raczej trzeba mieć świadomość znaczenia profili metylacyjnych DNA po tym zabiegu niż eliminować marker z modeli, co jest zgodne z praktykowanym podejściem w rutynowo wykorzystywanych badaniach za pomocą markerów identyfikacyjnych STR. Nieprawidłową hipermetylację i zmniejszoną dokładność predykcji stwierdzono w przypadku markerów *TRIM59* i *KLF14* w grupie wczesnej postaci *AD*, a u pacjentów z *GD* zaobserwowano zmieniony profil

metylacji DNA i zmodyfikowaną dokładność przewidywania wieku w markerach *TRIM59* i *FHL2*, co może ograniczać użyteczność tych markerów biorąc pod uwagę powszechność *GD* (do 2% populacji europejskiej).

Natomiast silne oddziaływanie *CLL* i *HSCT* na metylację związaną z wiekiem kontrastuje z efektami powyżej opisanych przypadków, które wpływają na przewidywania wieku kalendarzowego w bardziej subtelny i selektywny sposób. Okazało się, że w obecności *CLL* i *HSCT* (i najprawdopodobniej przeszczepu szpiku kostnego) wiek nie może być rzetelnie przewidywany na podstawie analizy metylacji CpG proponowanej zdrowym ludziom. Efekt *CLL* i *HSCT* jest bardzo silny i prognozy wieku chronologicznego są wysoce niewiarygodne.

W przypadku *CLL* zaproponowaliśmy rozwiązanie, które może być bardzo interesujące z punku widzenia genetyki sądowej. Mianowicie obserwowaną cechą profilu metylacji *CLL* jest to, że w pewnym stopniu można ją wykryć otrzymując alarmującego dane co do możliwości jej wystąpienia, a tym samym pomóc w uniknięciu fałszywych wniosków. Stwierdziliśmy, że w > 85% przypadków *CLL* informacja uzyskana z profilu metylacji za pomocą zaproponowanego przez nas podejścia może sugerować diagnozę *CLL*. Co ważne, wiek chronologiczny dawcy, który zwykle nie jest dostępny do testowania niezidentyfikowanych plam krwi, nie jest potrzebny do takiej prognozy.

Należy zauważyć, że optymalne wykorzystanie opracowanego rozwiązania wymaga określenia wszystkich 32 CpG. Podczas gdy brak danych dla niewielkiej liczby pojedynczych CpG jest ogólnie dobrze tolerowany, przewidywania są mało wiarygodne, jeśli stosowane jest tylko 5 CpG z badanego przez nas modelu. Wynika to z faktu, że CpG najcenniejsze dla prognozowania wiekowego są względnie mało przydatne do wykrywania *CLL*.

Nasze dalsze badania przeprowadzone na grupie sportowców wyczynowych potwierdziły fakt, że na profil metylacji w testowanych przez nas markerach do predykcji wieku ma również wpływ styl życia, którym był w tym przypadku regularny, intensywny wysiłek fizyczny. W badaniu wykazano przyspieszoną hipermetylację markerów *TRIM59* i *KLF14* u zawodowych sportowców, natomiast nie zaobserwowano zmian w markerach *ELOVL2*, *C1orf132/MIR29B2C* i *FHL2*.

Przeprowadzone przez nas analizy mogą pomóc w wyborze najbardziej optymalnego zestawu markerów do przewidywania wieku chronologicznego w kryminalistyce i potwierdzają wysoką użyteczność markera *ELOVL2*. Poprzez jego niezaburzoną

metylację w różnych grupach chorych staje się doskonałym predyktorem wieku chronologicznego. Również *C1orf132/MIR29B2C* powinien być rozpatrywany, jako marker predykcyjny wieku chronologicznego w badaniach kryminalistycznych, po uwzględnieniu rzadkich ograniczeń opisanych powyżej.

Literatura:


(1) Bacalini MG, Deelen J, Pirazzini C, De Cecco M, Giuliani C, Lanzarini C, Ravaioli F, Marasco E, van Heemst D, Suchiman HE, Slieker R, Giampieri E, Recchioni R. Systemic Age-Associated DNA Hypermethylation of ELOVL2 Gene: In Vivo and In Vitro Evidences of a Cell Replication Process. J Gerontol A Biol Sci Med Sci . 2017; 72

(2) Balastik M, Ferraguti F, Pires-da Silva A, et al. Deficiency in ubiquitin ligase TRIM2 causes accumulation of neurofilament light chain and neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008:105:12016–12021

(3) Baker G. & Sprott R. Biomarkers of aging. Exp. Gerontol. 23 , 223-239 (1988). Warner, HR Przyszłość starzejących się interwencji. J. Gerontol. A Biol Sci. Med. Sci. 2004, 59, B692-B696

(4) Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Van de Voorde W, Decorte R. 2015. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. *Epigenetics* 10:10, 922-930

(5) Bialopiotrowicz E, Kuzniewska B, Kachamakova-Trojanowska N, et al. Cell cycle regulation distinguishes lymphocytes from sporadic and familial Alzheimer's disease patients. Neurobiol Aging. 2011;32:2319. 13–2319. 26

(6) Bocklandt S, Lin W. Sehl ME, et al. Epigenetic predictor of age. PLoS ONE. (2011):6:e14821. doi: 10.1371/journal.pone.0014821

(7) Bouchard J, Villeda SA. Aging and brain rejuvenation as systemic events. J Neurochem. 2015; 132 (1): 5-19

(8) Castellano JM, Kirby ED, Wyss-Coray T. Blood-borne revitalization of the aged brain. JAMA Neurology. 2015;72(10):1191–1194

(9) Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. . Natura. 2005; 433 (7027): 760-4

(10) Cuyvers E, Sleegers K. Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. Lancet Neurol. 2016:15:857–868

(11) Edgar R., Domrachev, M. & Lash, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. Nucleic Acids Res. 30, 207–210 (2002)

(12) Fan G, Sun L, Shan P, et al. Loss of KLF14 triggers centrosome amplification and tumorigenesis. Nat Commun. 2015; 6:8450

(13) Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu YZ, Plass C, Esteller M. **(2005)** Epigenetic differences arise during thelifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 102(30), 10604-10609.

(14) Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, et al. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. Forensic Sci Int Genet. 2016

(15) Gajewski AK, Poznańska A. Mortality of top athletes, actors and clergy in Poland: 1924-2000 follow-up study of the long term effect of physical activity. Eur J Epidemiol. 2008; 23:335–40

(16) Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Gori D, Giuliani C, Mari D, Di Blasio AM, Gentilini D, Vitale G, Collino S, Rezzi S, Castellani G, Capri M, Salvioli S, Franceschi C. (2012) Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. Aging Cell 11 (6) 1132–1134.

(17) Garatachea N, Santos-Lozano A, Sanchis-Gomar F, Fiuza-Luces C, Pareja-Galeano H, Emanuele E, Lucia A. Elite athletes live longer than the general population: a meta-analysis. Mayo Clin Proc. 2014;89:1195–200

(18) Hannum G, Guinney J, Zhao L, et al. Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. Mol Cell. (2013);49:359–367

(19) Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. Genome Biol. (2013);14:R115

(20) Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. Nature Reviews Genetics, 2018, 19, 371 – 384

(21) Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging. Aging Cell. 2015: 14:924-32

(22) Kadrmas JL, Beckerle MC. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5:920–931

(23) Kauffman L, Balatti V, Cascione L, Fadda P, Racke F, Santhanam R, Costinean S. Gradual rarefaction of hematopoietic precursors and atrophy in a depleted microRNA 29a, b and c environment. PLoS One. 2015;10 (7)

(24) Kayser M, Schneider PM. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. Forensic Sci Int Genet. 2009; 3:154–161

(25) Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. Nat Rev Genet. 2011; 12:179–192

(26) Khatamianfar V, Valiyeva F, Rennie PS, et al. TRIM59, a novel multiple cancer biomarker for immunohistochemical detection of tumorigenesis. BMJ Open. 2012;2:e001410

(27) Kroger N, Zabelina T, de Wreede L, Berger J, Alchalby H, van Biezen A, et al. Allogeneic stem cell transplantation for older advanced MDS patients: improved survival with young unrelated donor in comparison with HLA-identical siblings. Leukemia. 2013:27(3):604–609

(28) Kurinna S, Schafer M, Ostano P, Karouzakis E, Chiorino G, Bloch W, Bachmann A, Gay S, Garrod D, Lefort K, Dotto GP, Beer HD, Werner S. A novel Nrf2-miR-29 desmocollin-2 axis regulates desmosome function in keratinocytes. Nat Commun. 2014;6:5

(29) Laird PW. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. Nat. Rev. Genet. 2010;11: 191–203

(30) Levine ME, Lu AT, Quach A, Chen BH, Assimes TL, Bandinelli S, Hou L, Baccarelli AA, Stewart JD, Li Y, Whitsel EA, Wilson JG, Reiner AP, Aviv A, Lohman K, Liu Y, Ferrucci L, Horvath S. An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. Aging (Albany NY). 2018;10(4):573-591

(31) Lee HY, Lee SD, and Shin KJ BMB Rep Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. 2016; 31, 49 (7): 359-369

(32) Lee IM, Paffenbarger RS Jr. Associations of light, moderate, and vigorous intensity physical activity with longevity. The Harvard Alumni Health Study. Am J Epidemiol. 2000; 151:293–99

(33) Lemez S, Baker J. Do Elite Athletes Live Longer A Systematic Review of Mortality and Longevity in Elite Athletes. Sports Med Open. 2015; 1:16

(34) Lokk K, Modhukur V, Rajashekar B, Märtens K, Mägi R, Kolde R i wsp. 2014, DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome Biol* 15: 54

(35) Marioni RE, Shah S, McRae AF, i in. The epigenetic clock is correlated with physical and cognitive fitness in the Lothian Birth Cohort 1936. Epidemiol. 2015; 44 : 1388-1396

(36) Mathers JC, Strathdee G, Relton CL. Induction of epigenetic alterations by dietary and other environmental factors. Adv Genet. 2010; 71:3 -39

(37) McCarthy. Involvement of presenilins in cell-survival signalling pathways. Biochem Soc Trans. 2005. 33:568-

572

(38) Moore BD, Chakrabarty P, Levites Y, et al. Overlapping profiles of Aβ peptides in the Alzheimer's disease and pathological aging brains. Alzheimers Res Ther. 2012:4:18

(39) Ou X, Zhao H, Sun H, Yang Z, Xie B, et al. Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. Int J Legal Med 2011; 125: 603–608

(40) Sawicki W, Malejczyk J, Wróblewska M. 2015, Starzenie: mechanizmy epigenetyczne i genetyczne. *Gerontol Pol* 2:68-73

(41) Seo S, Lomberk G, Mathison A, et al. Krüppel-like factor 11 differentially couples to histone acetyltransferase and histone methyltransferase chromatin remodeling pathways to transcriptionally regulate dopamine D2 receptor in neuronal cells. J Biol Chem. 2012;287:12723–12735

(42) Strawa K, Markowska A, Miśkiewicz P, et al. Increased concentration of T-cell receptor rearrangement excision circles (TREC) in peripheral blood in Graves' disease. Clin Endocrinol. 2014;81:769–774

(43) Sulem P, Gudbjartsson DF, Stacey SN, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. Nat Genet. (2007);39:1443–1452

(44) Tanahashi H, Tabira T, et al. Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. Hum Mol Genet. 2000

(45) The Cancer Genome Atlas Research Netwok et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. Nat. Genet. 20131 45, 1113–1120

(46) Teramoto M, Bungum TJ. Mortality and longevity of elite athletes. J Sci Med Sport. 2010; 13:410–16. 10.1016/j.jsams.2009.04.010

(47) Vidaki A. Novel uses of epigenetics in forensic science. 2015, King's College London.

(48) Walsh S. Lindenbergh A, Zuniga SB, et al. Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. Forensic Sci Int Genet. 2011;5:464–471.

(49) Walsh S, Chaitanya L, Clarisse L, et al. Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. Forensic Sci Int Genet. 2014;9:150–161

(50) Weidner CI, Lin Q, Koch CM, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. Genome Biol. (2014);15:R24

(51) Weidner CI, Ziegler P, Hahn M, Brümmendorf TH, Ho AD, Dreger P, Wagner W. Epigenetic aging upon allogeneic transplantation: the hematopoietic niche does not affect age-associated DNA methylation. Leukemia. 2015 Apr;29(4):985-8. doi: 10.1038/leu.2014.323. Epub 2014 Nov 12

(52) Wong AH, Gottesman I, Petronis A. 2005, Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Human Molecular Genetics* 14 R11-R18.

(53) Xu XL, Yu J, Zhang HY i wps., 2004, Methylation profile of the promoter CpG islands of 31 genes that may contribute to colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 10: 3441-54

(54) Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Kupiec T., Makowska Ż., Spas A., Parys-Proszek A., Kucharczyk K., Płoski R., Branicki W., Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science, Forensic Science International: Genetics, 2015, 14: 161-7, (a)

(55) Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. Forensic Sci Int Genet. 2015;17:173–179. (b)

(56) Zekanowski C, Styczyńska M, Peplońska B, et al. Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer's disease in Poland. Exp Neurol. 2003;184:991–996

(57) Zekanowski C, Religa D, Safranow K, et al. The -22c/t polymorphism in presenilin 1 gene is not connected with late-onset and early-onset familial Alzheimer's disease in Poland. J Neural Transm. 2005;112:839–845

(58) .Zhou Z, Ji Z, Wang Y, et al. TRIM59 is up-regulated in gastric tumors, promoting ubiquitination and

degradation of p53. Gastroenterology. 2014; 147:1043–1054
(59) Zubakov D, Liu F, Kokmeijer I, et al. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. Forensic Sci Int Genet. 2016;24:33–43

## 6. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Śledząc postępy w genetyce sądowej na przestrzeni trzydziestu lat John Butler wyróżnił jej cztery fazy rozwoju: poszukiwawczą, stabilizacji i standaryzacji, wzrostu oraz najmłodszą wyrafinowaną [Butler J, 2015, The future of forensic DNA analysis, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 5; 370(1674): 20140252].

Moja praca zawodowa jest od dwóch dekad związana z kryminalistyką w Polsce i przez ten czas starałam się zrozumieć wyzwania i oczekiwania jakim musiała sprostać genetyka w naukach sądowych.

Badania genetyczne po raz pierwszy zostały wykorzystane w praktyce śledczej w Wielkiej Brytanii w 1986 roku, natomiast w Polsce pierwsza opinia z genetyki sądowej została wydana w maju 1989 r. Na przestrzeni lat w polskiej genetyce sądowej pojawiło się w stosunku do krajów zachodnioeuropejskich około 8 letnie opóźnienie technologiczne. Wejście Polski do UE spowodowało, że w 2004 r. kryminalistyczne laboratoria policyjne uzyskały dotację unijną na zakup aparatury badawczej, w tym automatycznych analizatorów DNA opartych o technologię elektroforezy kapilarnej (CE). Technologia ta umożliwiła czułe, zautomatyzowane i wysokoprzepustowe badania. Poprzez takie przygotowanie laboratoriów badania genetyczne w naszym kraju stały się powszechne w prowadzonych postępowaniach policyjnych. Jednak opóźnienie w podążaniu za nowościami wynikające z uwarunkowań historycznych spowodowało, że miałam swój udział we wszystkich zdefiniowanych przez Johna Butlera fazach rozwoju genetyki sądowej. Poniżej przedstawiłam podsumowanie mojego udziału naukowego w poszczególnych fazach rozwoju genetyki sądowej w Polsce.

**Faza poszukiwawcza**

Pierwsza dekada mojej działalności naukowej w kryminalistycznej analizie DNA rozpoczęła się na początku obecnego wieku poszukiwaniem optymalnych markerów identyfikacyjnych. Informacje genetyczne z *Human Genome Project* dostarczyły informacji o markerach genetycznych STR, jako idealnych do wykorzystania w testach sądowych. Badanie DNA za pomocą dostępnych zestawów pozwalało na osiągnięcie

bardzo dużej, zazwyczaj satysfakcjonującej, siły dyskryminacji w rutynowej identyfikacji osobniczej. Jednak w niektórych przypadkach konieczne było rozszerzenie badań o dodatkowe wysokopolimorficzne markery STR.

Dlatego też w pierwszych pracach badawczych poszukiwałam i wdrażałam nowe markery STR, niesprzężone z rutynowo używanymi. Utworzyłam systemy fluorescencyjnej analizy dla nowowyłonionych markerów STR HumGH@ i HUMHUU oraz sprawdziłam ich wiarygodność i opracowałam statystyczne parametry przydatności w badaniach kryminalistycznych.

*(Spólnicka M., Konarzewska M., Soltyszewski I., Berent J., Polimorfizm STR niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu (HUMGHCSA) i jego wykorzystanie w identyfikacji osobniczej – doniesienie wstępne. Archiwum Medycyny Sądowej, 2006, 56, 95-98;*

*Spólnicka M, Jagiełło A, Soltyszewski I, Jacewicz R, Płócienniczak A, Berent J., Sequence analysis of a new short tandem repeat locus D17S2266E located In the Human Growth Hormone gene cluster HumGH@, Journal of Forensic Science, 2008, 53 (3): 683–686;*

*Spólnicka M., Polimorfizm STR niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu (HUMGH@) i jego wykorzystanie w identyfikacji osobniczej, Wyd. Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego KGP, Warszawa 2009;*

*Konarzewska M., Pepiński W., Jagiełło A., Spólnicka M., Soltyszewski I., Płócienniczak A., Berent J., Population data and sequence analysis of a new mocrosatellite locus HumHUU (D16S3433), Forensic Science International: Genetics, 2010, 4 (5): 143-144;*

*Konarzewska M., Spólnicka M., Soltyszewski I., Berent J., Polimorfizm locus HUMHUU w populacji polskiej – doniesienie wstępne, Archiwum Medycyny Sądowej, 2006, 56, 99-102;*

*Projekt badawczy – grant promotorski nr 2 P05A03129: Polimorfizm STR niekodującego regionu genu ludzkiego hormonu wzrostu (HumGH@) i jego wykorzystanie w identyfikacji osobniczej)*

**Faza stabilizacji i standaryzacji**

W tej fazie typowanie DNA za pomocą markerów STR objęło zastosowanie barwników fluorescencyjnych do znakowania produktów PCR i elektroforezę

kapilarną (CE) w celu szybkiego rozdzielenia i detekcji produktów PCR znakowanych barwnikiem. Startery do kilku markerów STR zostały połączone w jedną reakcję multipleksową, co pozwoliło na efektywniejsze genotypowanie i wykorzystanie mniejszej ilości DNA, niż w przypadku badania każdego markera oddzielnie. Interpretacja statystyczna wyników DNA oparła się na solidnych podstawach naukowych, z których znaczna część pochodziła z działań akademickich. W sytuacji, gdy badana jest odpowiednia liczba markerów genetycznych statystycznie osiągalna staje się probabilistyczna "indywidualizacja" profilu DNA. W związku z tym siła dowodu może być wyrażona w kategoriach liczbowych, które mogą być silnie dyskryminujące (1 na bilion lub rzadziej). Jednak w celu przeprowadzenia powyższych obliczeń konieczne były i są kolejne badania dostarczające danych do oceny zmienności genetycznej populacji. Dlatego też brałam udział w pracach, w ramach, których przebadałam 870 i 2000 osób z populacji Polski w zakresie autosomalnych markerów STR z komercyjnego zestawu odpowiednio *GenePrint* PowerPlex 16 firmy Promega i *SGM-plus* firmy *Applera*.

(*Sołtyszewski I, Spólnicka M, Kartasińska E, Konarzewska M, Pepiński W, Janica J., Genetic variation of STR loci D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX and FGA by GenePrint PowerPlex 16 in a Polish population, w: Forensic Science International, 2006, 159: 241-243;*

*Projekt celowym nr 148/27/CT00/99 finansowany przez Komitet Badań Naukowych i Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego: Badania kryminalistyczne z wykorzystaniem dziesięciu niekodujących układów STR obejmujących reprezentatywną część populacji polskiej).*

Również brałam udział w badaniach dotyczących wpływu alleli występujących z niską częstością (poniżej 0,01) na siłę dyskryminacji całego profilu oznaczonego multipleksowym zestawem STR.

(*Sołtyszewski I., Spólnicka M., Konarzewska M., Berent J., Effect of rare on DNA profile frequency in SGM Plus studies, Problems of Forensic Science, 2006, LXVIII, 362-367)*

Ważnym aspektem mojej pracy była standaryzacja postępowania w interpretacji wyników badań genetycznych, która powinna uwzględniać jednolite reguły obowiązujące podczas analizy profili DNA. Narzędziami służącymi do tego są

wytyczne i normy formułowane przez środowiska naukowe opisujące możliwie dokładnie istotne czynniki wpływające na wyniki badań genetycznych. Dlatego też skupiałam się na propagowaniu wykonywania badań genetycznych zgodnie z zapewnieniem odpowiedniej jakości, wykorzystaniem najnowszych rozwiązań oraz osiągnięć nauki. W branżowym czasopiśmie kryminalistyczny opisałam nowe możliwości badań DNA o znacznym stopniu zdegradowania poprzez wykorzystania markerów miniSTR, jako alternatywy do rutynowych analiz genetycznych.

*(Spólnicka M., Drabik J. Markery miniSTR jako nowa technologia badania dla celów biologicznych w kryminalistyce, Problemy kryminalistyki, 2007, 258, 56 – 62)*

Ponadto opracowałam w języku polskim jednolite zasady obowiązujące podczas analizy oraz oceny statystycznej profilu DNA. Przedstawiłam najczęściej pojawiające się zjawiska genetyczne z jakimi mają do czynienia biegli podczas kryminalistycznej analizy profili STR.

*(Dąbrowska J., Makowska Ż., Spólnicka M., Szabłowska-Gnap E., Najczęstsze zjawiska występujące podczas analizy profili DNA w multipleksowych systemach STR, Problemy kryminalistyki, 2013, 279 (1),46 – 53)*

Kolejny artykuł, który opublikowałam zostały przygotowany z myślą o biegłych z zakresu genetyki sadowej, jako narzędzie pomocne w analizowaniu wyników, ze szczególnym uwzględnieniem mieszanin DNA oraz opracowywaniu na ich podstawie wniosków, które są później wykorzystywane przez organy procesowe.

*(Dąbrowska J., Makowska Ż., Spólnicka M., Szabłowska-Gnap E. Teoretyczne podstawy analizy mieszaniny DNA w multipleksowych systemach STR, Problemy kryminalistyki, 2013, 280 (2), 16 – 27)*

Biorąc pod uwagę moc dowodową, jaką daje profilowanie DNA, niezmiernie ważnym staje się utrzymywanie wysokich standardów badań i stosowanie sprawdzonych zasad postępowania. W celu zapewnienia wysokiej jakości wyników badań laboratoria kryminalistyczne muszą przeprowadzać walidację wewnętrzną stosowanych metod i sprzętu. Proces ten przybliżyłam w kolejnej pracy poglądowej.

*(Spólnicka M., Zbieć-Piekarska R., Proces walidacji w kryminalistycznych badaniach profilowania DNA, Problemy kryminalistyki, 2008, 262 (4), 5 – 13)*

**Faza wzrostu**

Amerykańska baza danych DNA fazę wzrostu rozpoczęła od około dwóch milionów

profili DNA pod koniec 2004 r. Dziesięć lat później baza ta miała zgromadzonych około 12 milionów profili (14 milionów profili ogółem). Podobne wzorce wzrostu pojawiły się w innych krajowych bazach danych DNA na całym świecie. W Polsce baza danych DNA rozpoczęła swoją działalność w 2007 roku i obecnie ma zgromadzonych około 100 000 profili. Ponadto polska baza danych jest operacyjna z 19 krajami Unii Europejskiej, z którymi wymienia dane genetyczne. W swojej pracy współtworzyłam polską bazę DNA i budowałam wśród policjantów świadomość jej potencjału oraz możliwości wykrywczych. Prowadziłam szkolenia dotyczące funkcjonowanie i możliwości wykrywczych baz danych DNA skierowane do naczelników nadzorujących pracę dochodzeniowo-śledczą w komendach wojewódzkich/stołecznej Policji, naczelników laboratoriów kryminalistycznych komend wojewódzkich i KSP oraz funkcjonariuszy Agencji Bezpieczeństwa Wewnętrznego, Straży Granicznej i żołnierzy Żandarmerii Wojskowej. Zrealizowany przeze mnie plan marketingowy popularyzujący bazę danych DNA spowodował rejestrację ponad 90% wszystkich NN śladów oznaczanych w toku wykonywanych opinii.

Przy większych rozmiarach bazy i wymianie międzynarodowej, pojawiła się potrzeba rozszerzenia zestawów głównych loci, które zostały zaproponowane przez Unię Europejską. Doprowadziło to do wyprodukowania nowych zestawów autosomalnych STR, jak również gromadzenia w bazie markerów Y-STR. Dlatego też następną swoją aktywność naukową skierowałam na badania populacyjne dotyczące 17 markerów STR zlokalizowanych na chromosomie Y. Badania te dodatkowo stanowiły element walidacji rozwojowej zestawu AmpFISTR Yfiler PCR. W ramach tej pracy przebadanych zostało 255 niespokrewnionych mężczyzn mieszkających w Polsce Centralnej.

(*Sołtyszewski I, Pepiński W, Spólnicka M, Kartasińska E, Konarzewska M, Janica J., Y-chromosomal haplotypes for the AmpFISTR Yfiler PCR Amplification Kit in a population sample from central Poland, w: Forensic Science International, 2007, 168: 61-67);*

Kolejne badania dotyczyły 27 markerów YSTR z zestawu Yfiler® Plus firmy Applied Biosystems. Zestaw ten to nowy dodatek do zestawów dostępnych na rynku. System umożliwia amplifikację 27 loci Y-STR, obejmujących standardowy zestaw tak zwanych markerów "*minimal haplotyps*" (zdefiniowanych w bazie danych YHRD), jak

również dodatkowych markerów, w tym tych charakteryzujących się szybkim tempem mutacji.

(*Spólnicka M., Dąbrowska J., Szabłowska-Gnap E., Paleczka A., Jabłońska M., Zbieć-Piekarska R., Pięta A., Boroń M., Konarzewska M., Kostrzewa G., Płoski R., Rogalla U., Woźniak M., Grzybowski T., Intra- and inter-population analysis of haplotype diversity in Yfiler® Plus system using a wide set of representative data from Polish population, Forensic Science International: Genetics, 2017, 28: 22 – 25;*

*Projekt z badań własnych CLKP: Baza haplotypów chromosomu Y oznaczonych dla populacji polskiej w zakresie 27 loci)*

**Faza wyrafinowana**

Analizując miejsce, w którym obecnie znajduje się genetyka sądowa w Polsce zaobserwować można, że w badaniach wdrożeniowych i rozwojowych musieliśmy „gonić" kraje UE, żeby siłą rozpędu w 2013 roku stwierdzić swoją obecność w fazie wyrafinowanej. Rozpatrując tą fazę należy myśleć o przyszłość badań w kryminalistyce. Dokładne przewidywanie przyszłości zawsze stanowi wyzwanie ze względu na nieprzewidziane innowacje. Jednakże, badając przeszłość i rozumiejąc obecne wyzwania, często można rozsądnie prognozować na przyszłość. Takie planowanie pozwala działającym w niej osobom wiedzieć dokąd zmierzają i pracować nad poprawą przyszłości poprzez ukierunkowanie działań naukowych. Ta motywacja spowodowała, że w swoich badaniach zajęłam się predykcją wieku, cech fenotypowych oraz biogeograficznych.

W 2013 roku zaczęłam badania naukowe w projekcie finansowany przez NCBR na rzecz obronności i bezpieczeństwa państwa: „Kryminalistyczny test DNA do określania wieku człowieka". Szacowanie wieku w śledztwach kryminalistycznych może uzupełniać przewidywanie widocznych cech zewnętrznych, umożliwiając w ten sposób lepszy opis nieznanej osoby. W ludzkim genomie zidentyfikowano wiele miejsc CpG, które wykazują liniową korelację pomiędzy wiekiem, a stopniem metylacji DNA, co zapewnia wybór kandydatów do prognozowania wieku. W pierwszych badaniach dotyczących wieku zoptymalizowaliśmy test oparty na konwersji wodorosiarczanem sodu i pirosekwencjonowaniu 7 miejsc CpG zlokalizowanych w genie ELOVL2. Uzyskane wyniki pokazały, że locus ELOVL2 stanowi bardzo dobre źródło informacji o wieku chronologicznym człowieka

w oparciu o analizę krwi, w tym plam krwi z szacunkowym błędem standardowym +/- 7 lat.

Kolejne badania wynikały z postępów, jakie się dokonały w analizie ludzkiego metylomu i umożliwiły selekcję wielu potencjalnych loci wykazujących liniową korelację z wiekiem chronologicznym. Praktyczne zastosowanie w kryminalistyce markerów DNAmet zależy od pomyślnego sprawdzenia tych potencjalnych predyktorów wieku. W badaniu przeanalizowaliśmy osiem loci kandydujących za pomocą wygodnej i niezawodnej technologii pirosekwencjonowania. Badanie potwierdziło korelację wszystkich badanych markerów z wiekiem człowieka. Pięć najbardziej istotnie skorelowanych miejsc CpG zostało wybranych do zbudowania modelu predykcjnego. To ograniczenie pozwoliło na uproszczenie analizy technicznej bez znaczącego obniżenia dokładności prognozy (szacunkowy błąd standardowy wynosił 4,5 roku).

*(Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Kupiec T., Makowska Ż., Spas A., Parys-Proszek A., Kucharczyk K., Płoski R., Branicki W., Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science, Forensic Science International: Genetics, 2015, 14: 161-7;*

*Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Kupiec T., Parys-Proszek A., Makowska Ż., Paleczka A., Kucharczyk K., Płoski R., Branicki W., Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis, Forensic Science International: Genetics, 2015, 17: 173-179;*

*Projekt nr O ROB 0002 03 001 - finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu nr 3/2012 na wykonanie projektów w zakresie badań naukowych lub prac rozwojowych na rzecz obronności i bezpieczeństwa państwa: Kryminalistyczny test DNA do określania wieku człowieka")*

Nasze doświadczenia zyskane w trakcie badań nad metylacją DNA pozwoliły na sporządzenie listu do redakcji czasopisma Bioinformatics, w którym radziliśmy ostrożne stosowanie proponowanej metodologii, możliwości stosowania modeli binarnych do analizy DNA, zaproponowanej w artykule Cheng i Zhu (2014). Nie zgodziliśmy się z niektórymi dokonanymi w artykule uogólnieniami.

*(Prochenka A., Pokarowski P., Gasperowicz P., Kosińska J., Stawiński P., Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Branicki W., Płoski R., A cautionary note on using binary calls for analysis of DNA methylation, Bioinformatics, 2015, 31(9): 1519-20)*

Bez wątpienia predykcja wieku człowieka jest bardzo pomocna w określeniu genetycznego rysopisu przestępcy. Udział w kolejnym projekcie stał się ścisłą kontynuacją badań nad wiekiem człowieka. Od 2016 roku kieruje projektem, który ma na celu opracowanie kompletnego systemu predykcyjnego pozwalającego na jednoczesną analizę kilkudziesięciu wariantów DNA i predykcję poprzez zastosowanie modeli matematycznych wybranych cech fizycznych, tj. koloru oczu, włosów i skóry, skłonności do wczesnego łysienia, stopnia skręcenia włosów oraz pochodzenia biogeograficznego. Ponadto postanowiliśmy włączyć się do badań nad markerami pochodzenia biogeograficznego, które od kilku lat są intensywnie prowadzone w ośrodkach zachodnio-europejskich i amerykańskich. Do tej pory w badaniach tego rodzaju zmierzano niemalże wyłącznie do opracowywania globalnych zestawów markerów pozwalających na określanie pochodzenia z rozdzielczością międzykontynentalną. W projekcie szczególną uwagę poświęcamy selekcji markerów genetycznych, które mogą okazać się przydatne dla określania pochodzenia w obrębie Europy Środkowej i Wschodniej, z uwzględnieniem populacji Polski.

W 2018 roku została opublikowana praca, w której prezentujemy wyniki badań nad kształtem włosów głowy, jako cechy charakterystycznej ludzkiego wyglądu wykazującej znaczny stopień zmienności na mapie świata. Ponieważ błąd przewidywania pigmentacji w niektórych przypadkach może wynikać z ciemnienia koloru włosów związanych z wiekiem, jak również wpływu płci na kolor oczu kolejne nasze badania miały na celu zbadanie tych mniej poznanych zjawisk w grupie młodych osobników.

*(Pośpiech E., Lee HY, Kukla-Bartoszek M, Karlowska-Pik J, Woźniak A, Boroń M, Zubańska M, BronikowskaA, Hong SR, Lee JH, Lee SD, Spólnicka M, Branicki W., Variation in RPTN gene may facilitate straight hair formation in Europeans and East Asians, Journal of Dermatological Science, 2018, 20: S0923-1811(18)30246-9);*

*Kukla-Bartoszek M., Pośpiech E., Spólnicka M., Karlowska-Pik J., Strapagiel D., Sitek A., Investigating the impact of age-depended hair colour darkening during childhood on DNA-based hair colour prediction with the HIrisPlex system, Forensic Science International: Genetics, 2018, 6, 36: 26-33;*

*Projekt nr DOB-BIO7/17/01/2015 - finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w zakresie badań naukowych lub prac rozwojowych na rzecz obronności*

*i bezpieczeństwa państwa: NEXT - Genetyczny portret sprawcy oraz ofiary przestępstwa – opracowanie systemu do określania wyglądu człowieka i pochodzenia biogeograficznego poprzez analizę DNA z wykorzystaniem sekwencjonowania następnej generacji (NGS)*

W 2018 roku rozpoczęłam realizację projektu w ramach programu EU Horyzont 2020 Forensics techniques on broadened use of DNA, „Visible Attributes through Genomics: Broadened Forensic Use of DNA for Constructing Composite Sketches from Traces – VISAGE", które to badania pozwolą na pełną wymianę doświadczeń naukowych oraz wiedzy zdobytej przez 13 krajów europejskich w obszarze predykcji cech fenotypowych, biogeograficznych i wieku.

**Z praktyki kryminalistycznej**

W trakcie swojej dotychczasowej pracy starałam się dzielić wiedzą i doświadczeniem z innymi osobami zajmującymi się genetyką sądową. Organizowałam konferencje i seminaria naukowe, prowadziłam zajęcia i warsztaty w ramach wewnątrzpolicyjnego doskonalenia zawodowego biegłych i policjantów z pionu techniki kryminalistycznej i dochodzeniowo-śledczego. Omówienie istotnych z praktyki zagadnień przedstawiałam w wystąpieniach na konferencjach i w artykułach. Opublikowałam swoje doświadczenia w: badaniu różnych śladów biologicznych, ocenie ciałka szklistego jako potencjalnego materiału badawczego do kryminalistycznej identyfikacji DNA człowieka po śmierci, izolacji DNA z materiału kostnego oraz identyfikacji NN zwłok, które zdobyłam w trakcie udziału w międzynarodowej akcji identyfikacji ofiar kataklizmu tsunami w Tajlandii w 2004 r. Swoimi umiejętnościami zawodowymi miałam możliwość podzielić się w trakcie realizacji projektu międzynarodowego dotyczącego zapobieganie i zwalczanie przestępczości (ISEC): poprawa współpracy laboratoriów sądowych w zakresie medycyny sądowej i wymiany informacji w krajach V4.

Brałam również udział w innowacyjnym projekcie społecznym, którego głównym celem było wyjaśnienie archiwalnych spraw: z jednej strony doprowadzenie do identyfikacji osób długotrwale zaginionych, a z drugiej zmarłych pochowanych jako NN.

*(Janica J., Vitreous humor as a potential source for postmortem human identification. Folia Histochemica et Cytobiologia, 2007, 45, No.2, s.135- 136 ;*

*Dębska M., Spólnicka M., Zbieć-Piekarska R., Badania jądrowego DNA w materiale kostnym – opis wybranych przypadków, Problemy kryminalistyki, 2013, 279 (1), 23-29;*

*Spólnicka M, Soltyszewski I., Procedura identyfikacji ofiar Tsunami w Tajlandii, w: Postępy Współczesnej Kryminalistyki pod red. E. Gruzy, T. Tomaszewskiego i M., Goca 2006, tom 10, s.313-316;*

*Soltyszewski I., Spólnicka M., Badanie śladów biologicznych w: Medyczno-sądowa problematyka wypadków drogowych, pod red. J. Berenta, Wyd. Politechnika Krakowska i Instytut Ekspertyz Sądowych, Kraków 2005, s.43-54, s.55-63;*

*Projekt nr IS-2/29/NCBR/2015- finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach konkursu II Innowacje Społeczne, GeNN identyfikacja niezidentyfikowanych zwłok;*

*Projekt HOME/2012/ISEC/FP/C1/4000003837, Prevention of and Fight against Crime (ISEC): Improvement of DNA forensic laboratory cooperation and information exchange in V4 countries)*

**Inne badania**

Również jestem współautorką prac spoza obszaru kryminalistyki, które powstały w wyniku współpracy z innymi ośrodkami, jako *spin-off* badań prowadzonych w moich głównych kierunkach badawczych.

(*Strawa K., Markowska A., Miśkiewicz P., Kuś A., Ambroziak U., Szymański K., Zbiec R., Spólnicka M., Krajewski P., Bednarczuk T., Płoski R., Increased concentration of T-cell receptor rearrangement excision circles (TREC) in peripheral blood in Graves' disease, Clinical Endocrinology (Oxf)., 2014, 81 (5) 769-74*

*Wężyk M., Spólnicka M., Pośpiech E., Peplońska B., Zbiec-Piekarska R., Ilkowski J., Styczyńska M., Barczak A., Zboch M., Filipek-Gliszczyńska A., Skrzypczak M., Ginalski K., Kabza M., Makałowska I., Barcikowska-Kotowicz M., Branicki W. and Żekanowski C., Hypermethylation of TRIM59 and KLF14 influences cell death signaling in familial Alzheimer's disease, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, February 2018, Article Number: 6918797).*

Podsumowanie:

Dwadzieścia lat badań, 26 publikacji, jedna monografia, jedno współautorstwo

rozdziału w monografii oraz ponad 50 prezentacji na konferencjach, udział i kierowanie projektami oraz współpraca w konsorcjach naukowych stanowi mój wkład w rozwój genetyki sądowej.

Impact Factor publikacji nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **46,461**

Impact Factor jako pierwszy autor i/lub autor do korespondencji: **24,844**

Całkowita liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: **589**

Liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **145**

Liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nie wchodzących w skład osiągnięcia naukowego: **444**

Doniesienia zjazdowe zagraniczne: **33**

Doniesienia zjazdowe krajowe: **20**

Łącznie **121** cytowań, indeks Hirscha wynosi **4** (Źródło: ISI Web of Science Core Collection)

Łącznie **142** cytowań, indeks Hirscha wynosi **5** (Źródło: Scopus)

Magdalena Gulmicki