



Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

**Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii
i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim**

MGR AGNIESZKA SEWASTIANIK

**POLIMORFIZM GENETYCZNY 27 MARKERÓW DNA
CHROMOSOMU Y
W PRÓBIE POPULACYJNEJ POLSKI PÓŁNOCNO-
WSCHODNIEJ**

ROZPRAWA DOKTORSKA

przygotowana pod kierunkiem

PROF. DRA HAB. N. MED. WITOLDA PEPIŃSKIEGO

oraz

DR MAŁGORZATY SKAWROŃSKIEJ

ZAKŁAD MEDYCYNY SĄDOWEJ UMB

KIEROWNIK ZAKŁADU

PROF. DR HAB. N. MED. ANNA NIEMCUNOWICZ-JANICA

Białystok, 2024

Serdeczne podziękowania kieruję do:

Pana Profesora dra hab. n. med. Witolda Pepińskiego
za udzielone wsparcie merytoryczne oraz
inspirację do dalszego zgłębiania zagadnień naukowych.

Pani dr Małgorzaty Skawrońskiej
za przekazaną wiedzę praktyczną z zakresu pracy laboratoryjnej.

Pani Profesor dr hab. n. med. Anny Niemcunowicz-Janicy
za umożliwienie przeprowadzenia badań w Zakładzie Medycyny Sądowej.

Szczególne podziękowania składam Mojej Rodzinie.

Dziękuję Mojemu Mężowi Maciejowi
za nieustanną wiarę w moje możliwości,
wsparcie i obecność, kiedy tego potrzebowałam.

Dziękuję Rodzicom za ciepłe, motywujące słowa, które w najprostszym,
a zarazem najważniejszym sposobie dodawały mi siłę do dalszej pracy.

Spis treści

I Wstęp	5
1. WPROWADZENIE	5
2. CHROMOSOMY PŁCI.....	5
3. CHROMOSOM Y.....	7
4. MARKERY CHROMOSOMU Y.....	9
5. POLIMORFIZM STR W BADANIACH CHROMOSOMU Y	11
5.1 Krótka historia odkryć polimorfizmów chromosomu Y	11
5.2 Y-STR w różnych zastosowaniach.....	11
5.3 Efektywność badań nad chromosomem Y w badaniach genetyczno-sądowych.....	13
6. BADANIA POPULACYJNE W GENETYCE SĄDOWEJ	14
6.1. Analiza różnorodności polimorfizmu chromosomu Y w różnych grupach etnicznych i geograficznych Europy	16
6.2. Walidacja producenta.....	17
6.3. Walidacja wewnętrzna	18
7. BAZY DANYCH DNA	19
7.1. Geneza.....	19
7.2. Cel bazy danych	19
7.3. Wybrane bazy danych DNA	20
7.4. Rola baz danych DNA w genetyce sądowej	26
II CEL PRACY	28
III MATERIAŁ I METODY	28
1. MATERIAŁY	28
2. WYPOSAŻENIE I ODCZYNNIKI	29
3. METODY.....	30
3.1. Pobieranie materiału i izolacja DNA.....	30
3.2. Ocena ilościowa i jakościowa	30
3.3. Charakterystyka zestawu Yfiler Plus	30
3.4. Amplifikacja i genotypowanie	32
3.5. Analiza statystyczna.....	32
IV WYNIKI	34
1. WALIDACJA – WPROWADZENIE DO ZAGADNIENIA	34
1.1. Protokół walidacji wewnętrznej zestawu Yfiler Plus opracowany na potrzeby Pracowni DNA ZMS UMB.....	35
2. OBLICZENIA STATYSTYCZNE	57

V OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	62
VI WNIOSKI	68
VII STRESZCZENIE.....	69
VIII ABSTRACT	70
IX PIŚMIENNICTWO.....	72
X SPIS TABEL I RYCIN	81
1. Spis Tabel.....	81
2. Spis Rycin	82

I Wstęp

1. WPROWADZENIE

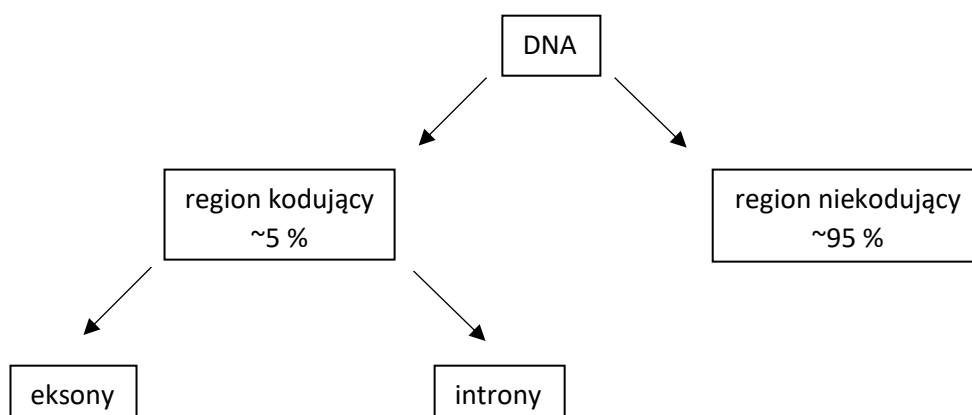
Rozważania zaprezentowane w niniejszej rozprawie pochodzą z nurtu dynamicznie rozwijającej się genetyki molekularnej, ukierunkowanej zgodnie z tematem pracy na polimorfizm chromosomu Y w populacji mężczyzn. Tematyka ta zaliczana jest do nauk interdyscyplinarnych, gdyż łączy w sobie zagadnienia związane z badaniami genetycznymi wykonywanymi przez specjalistyczne laboratoria genetyczne (głównie nakierowanymi na nauki sądowe) oraz dalsze postępowanie realizowane przez wymiar sprawiedliwości i organy ścigania. Przedmiotem prowadzonych badań jest próba populacyjna mężczyzn z północno-wschodniej Polski z uwzględnieniem specyfiki chromosomu Y. Badania te koncentrują się na analizie zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego i międzypopulacyjnego z wykorzystaniem zestawu 27 markerów DNA chromosomu Y – określanego jako haplotyp Y27. Celem pracy jest analiza, porównanie oraz podsumowanie zidentyfikowanych różnic w haplotypach DNA mężczyzn z tego regionu, co pozwala na wyciągnięcie wniosków dotyczących charakterystyki genetycznej badanej populacji.

2. CHROMOSOMY PŁCI

Prawie każda ludzka komórka, z wyjątkiem krwinek czerwonych, zawiera jądro komórkowe. DNA (kwas deoksyrybonukleinowy) w jądrze komórkowym jest ściśle upakowany w strukturach zwanych chromosomami. Dodatkowym elementem tworzącym chromosom są białka ochronne, tzw. histony. Na genom jądrowy człowieka składają się 23 pary chromosomów, w tym 22 pary chromosomów autosomalnych i 1 para chromosomów płci (allosomów). Płeć żeńską charakteryzuje genotyp XX, który wynika z obecności dwóch chromosomów X, natomiast u mężczyzn występuje genotyp XY, złożony z jednego chromosomu X i jednego chromosomu Y. W standardowych badaniach identyfikacyjnych stosowane są zestawy markerów autosomalnych, jednak określenie płci możliwe jest dzięki analizie markerów zlokalizowanych na chromosomach płciowych. Choć markery autosomalne stanowią podstawę identyfikacji osób, mitochondrialny DNA (mtDNA),

dziedziczony wyłącznie w linii matczynej, również jest używany w takich analizach. Podobnie chromosom Y, przekazywany z ojca na synów, jest cennym narzędziem w genetyce sądowej, szczególnie w badaniach dotyczących linii męskich. Ze względu na swój specyficzny sposób dziedziczenia, chromosom Y odgrywa kluczową rolę w identyfikacji mężczyzn w przypadkach, gdy analiza autosomalna jest niewystarczająca.

Chromosomy zawierają w swojej strukturze regiony DNA kodującego i DNA niekodującego. Region kodujący znany jest pod nazwą genu i zajmuje się on przekazywaniem informacji niezbędnych komórkom do produkcji białek. Geny składają się z eksonów (zawierają sekwencje kodujące białko) i intronów (sekwencje wtrącone). Geny stanowią jedynie około 5% ludzkiego genomowego DNA. Resztę materiału genetycznego budującego chromosom wypełniają regiony niekodujące.



Rycina 1. Nić DNA zawiera regiony kodujące oraz regiony niekodujące. Region kodujący tworzą eksony i introny.

Termin *locus* (w liczbie mnogiej – *loci*) oznacza lokalizację lub pozycję genu bądź markera DNA w chromosomie. W regionach niekodujących genomu ludzkiego, można znaleźć markery polimorficzne, które wykazują różnorodność pomiędzy osobami. Odmienne formy jednego genu, markera genetycznego lub *locus* określane są jako allele. Heterozygotyczne allele, to dwa różne allele w danym *locus* homologicznej pary chromosomów. W odróżnieniu od nich allele, które są identyczne w określonym *locus* homologicznej pary chromosomów określane są jako homozygotyczne. Komplet genów danej osoby, włącznie z wariantami genetycznymi, dziedziczony po obojgu rodzicach, to

genotyp. Komplet oznaczonych cech panelu markerów genetycznych nosi nazwę profilu DNA. Profilowanie DNA jest z kolei procesem określania genotypu, mieszczącego się w określonych *loci* wzdłuż łańcucha DNA. Podczas profilowania DNA, w celu potwierdzenia lub wykluczenia tożsamości genetycznej danej osoby w porównaniu z daną próbką, oznaczanych jest od kilkunastu do kilkudziesięciu *loci* / markerów. Im większa liczba zastosowanych markerów, tym mniejsza szansa przypadkowego dopasowania pomiędzy niespokrewnionymi osobami. Szacuje się, że ponad 99,7 % sekwencji bp (par zasad) jest powtarzalna w globalnej populacji ludzkiej. Jedynie pozostałe około 0,3 % (czyli około 10 milionów nukleotydów) powoduje, że jesteśmy unikatowi. Obecność różnorodnych regionów DNA w genomie ludzkim, umożliwia wykorzystanie informacji DNA w identyfikacji człowieka [1].

W komórkach somatycznych chromosomy występują w formie diploidalnej, co oznacza obecność dwóch homologicznych kopii każdego chromosomu – matczynej i ojcowskiej. Natomiast gamety, zarówno męskie (plemniki), jak i żeńskie (oocyty), charakteryzują się haploidalnością, co zapewnia przekazanie jednego zestawu chromosomów do zygoty podczas zapłodnienia, umożliwiając rekombinację i powstanie diploidalnego genomu. Ten mechanizm jest kluczowy dla zachowania stabilności genetycznej oraz różnorodności genetycznej w populacjach, co ma istotne znaczenie również w kontekście analiz genetyki sądowej, w szczególności w badaniach opartych na markerach Y-STR (ang. *Y-chromosomal Short Tandem Repeat*). Stanowią one powtarzające się krótkie (od 2 do 6 par zasad) sekwencje DNA, które znajdują się w określonych miejscach na chromosomie Y.

3. CHROMOSOM Y

Typowo dziecko dziedziczy po matce losowo po jednym z 22 chromosomów autosomalnych, chromosom X oraz jej mtDNA. Po ojcu dziedziczy natomiast losowo po jednym z 22 chromosomów autosomalnych oraz jeden z chromosomów płci X lub Y, ojciec nie przekazuje mtDNA [2]. W kariotypie człowieka chromosom Y zawiera najmniejszą liczbę 568 genów [3] będąc również czwartym z najmniejszych, po 21., 22. i 19. [2]. Wskazuje to, że jest wielokrotnie mniejszy od drugiego chromosomu płci, jakim jest chromosom X [3]. Jego długość wynosi 62.460.029 nukleotydów [2]. Według bazy

Ensembl (v86), potencjał do kodowania białek ma zaledwie 71 genów chromosomu Y, z których tylko 27 koduje różne białka, natomiast reszta genów koduje białka należące do tej samej rodziny. Długi i krótki niekodujący RNA jest kodowany przez 109 genów (ważnym ich zadaniem jest wpływ na regulację ekspresji genów). Spośród ogółu 568 genów, 388 uznano za pseudogeny. Podsumowując, należy podkreślić, że wiele przeznaczeń tych genów nie jest do końca określonych i wymaga walidacji [3]. Chromosom Y zawiera na swoich końcach regiony pseudoautosomalne, które rekombinują z regionami homologicznymi chromosomu płci X. Pozostała część około 95 % długości chromosomu jest znana, jako nierekombinująca część chromosomu Y (NRY, ang. *Nonrecombining Portion of the Y chromosome*). NRY jest przekazywany w niezmienionej postaci z ojca na syna (wyjątkiem są mutacje). Do śledzenia męskich rodowodów genetycznych można wykorzystać polimorfizmy genetyczne typu STR i SNP (polimorfizm pojedynczego nukleotydu, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) występujące wzdłuż NRY. SNP to rodzaj zmienności w DNA, który polega na różnicy w jednym nukleotydzie (A, T, C lub G) między osobnikami tego samego gatunku lub między odpowiadającymi sobie chromosomami tego samego organizmu. Tego rodzaju zmiany są najczęstszą formą różnic w naszym materiale genetycznym. Dzieje się tak, gdyż są one przekazywane z ojca na syna w stanie nienaruszonym, wyjątek stanowi możliwość wystąpienia mutacji [2].

Haplogrupa, to genetycznie zdefiniowana grupa chromosomów Y, dziedziczonych w linii męskiej, które wykazują wspólne pochodzenie filogenetyczne ustalone na podstawie specyficznych markerów genetycznych, takich jak SNP. Zaklasyfikowanie każdego chromosomu Y do konkretnej haplogrupy możliwe jest poprzez markery genetyczne, głównie SNPy [3]. Utworzono specjalne *Y Chromosome Consortium* (YCC), dotyczące chromosomu Y, podczas którego zebrano wszystkie filogenetycznie informacyjne SNPy, a następnie uporządkowano je i stworzono na podstawie metody parsymonii drzewo pokazujące rozkład wariantów SNP. Do każdej uznanej haplogrupy, przypisano unikatową nomenklaturę [3, 4]. Polimorfizm chromosomu Y jest m.in. wykorzystywany w badaniach pokrewieństwa w linii męskiej, śladów kryminalistycznych (w szczególności związanych z napaścią na tle seksualnym), szczątków historycznych i pochodzących z działań wojennych i masowych katastrof, śledzenia rodowodów i migracji ludności.

Markery Y-SNP są istotnym narzędziem w genetyce sądowej, szczególnie przy analizach wymagających określenia pokrewieństwa w linii ojcowskiej z dużą precyzją.

Dzięki swojej stabilności i niskiej częstotliwości mutacji, markery te umożliwiają dokładne śledzenie pokrewieństwa męskiego, co ma szczególne znaczenie w analizach genealogicznych i biogeograficznych [5]. Częstości mutacji dla markerów Y-STR wynosi średnio od $3,78 \times 10^{-4}$ do $7,44 \times 10^{-2}$, natomiast częstość mutacji dla Y-SNP wynosi średnio 1×10^{-9} . Odczytane wartości ukazują znacząco niski wskaźnik mutacji Y-SNP w porównaniu do Y-STR, bo aż 1 do 30.000.000 Y-SNP. Pod względem konstruowania struktury genetycznej populacji, połączenie oznaczeń markerów genetycznych Y-STR i Y-SNP oraz ich analiza są wyjątkowo cenne [2].

4. MARKERY CHROMOSOMU Y

Jeden z najpopularniejszych markerów płci – gen amelogeniny (AMEL) został włączony w skład większości komercyjnych zestawów STR DNA do oznaczania polimorfizmu markerów autosomalnych. Intron 1 homologu AMEL na chromosomie X (AMELX) wykazuje delecję sześciu nukleotydów z w stosunku do intronu 1 homologu AMELY, co skutkuje amplifikacją produktów PCR o długości odpowiednio 106 i 112 pz u mężczyzny oraz 106 pz u kobiety [6]. Obecnie dostępne wielomarkerowe zestawy markerów autosomalnych, takie jak GlobalFiler (Thermo Fisher Scientific), uwzględniają alternatywne markery płci częściowo minimalizując ryzyko diagnostyczne związane z możliwością występowania delecji obejmujących *locus* amelogeniny lub mutacji w jego regionach flankujących [7]. W kolejnych latach w praktyce genetyczno-sądowej pojawiły się multipleksowe zestawy przeznaczone do oznaczania markerów STR chromosomu Y. Analogicznie do markerów autosomalnych, analiza regionu chromosomu Y oparta jest na amplifikacji specyficznych markerów STR metodą PCR, a następnie na rozdziale fragmentów DNA metodą elektroforezy kapilarnej z detekcją fluorescencji. Po przeanalizowaniu za pomocą oprogramowania surowych danych powstaje elektroferogram, który składa się z serii pików reprezentujących produkty amplifikacji poszczególnych markerów. Na ich podstawie oprogramowanie mierzy m.in. długości fragmentów i wysokości ich pików. Otrzymane wartości są następnie przetwarzane i przeliczane na liczbę powtórzeń zawartych w każdym amplikonie. Na podstawie drabiny allelicznej amplifikowanym produktom PCR przypisywane są numery alleli [8].

Pośród licznie dostępnych komercyjnie zestawów do oznaczania markerów Y-STR można wymienić: Yfiler, Yfiler Plus, YFiler Platinum (prod. Thermo Fisher Scientific), PowerPlex Y, PowerPlex Y23 (prod. Promega), STRtyper-27, Investigator Argus Y-28 QS Kit (prod. Qiagen), Peoplespot GoldenEye Y-Plus (prod. Peoplespot), SureID PathFinder Plus (prod. SureID), AGCU Y37 (prod. AGCU ScienTech Incorporation). Zasadniczo różnią się one między sobą składem i liczbą markerów. Odpowiednio, 37 markerów zawiera AGCU Y37; 28 markerów - Investigator Argus Y-28 QS Kit; 27 markerów - Yfiler Plus, YFiler Platinum, STRtyper-27, Peoplespot GoldenEye Y-Plus, SureID PathFinder Plus; 23 markery - PowerPlex Y23; 17 markerów - Yfiler oraz 12 markerów - PowerPlex Y. Dodatkowo w pięciu zestawach (PowerPlex Y23, Yfiler Plus, STRtyper-27, Investigator Argus Y-28 QS Kit oraz YFiler Platinum) występują RM Y-STR (ang. *rapidly mutating Y-STR*), czyli markery szybkokomutujące. Z tych interesujących dla pracy zestawów, zestaw PowerPlex Y23 zawiera trzy markery RM Y-STR: DYS570, DYS576 i DYS643. Natomiast zestaw Yfiler Plus zawiera aż siedem markerów RM Y-STR, dwa te same, co poprzedni zestaw, czyli DYS570 i DYS576, a także pięć dodatkowych: DYS449, DYS460, DYS518, DYS627 oraz DYF387S1a/b [9, 10, 11]. Wśród tych zestawów występują markery wielokopijne, do których należą marker DYS385 i DYF387S1. Marker DYS385 występuje w każdym z wymienionych wyżej zestawów Y-STR, natomiast marker DYF387S1 został dołączony w zestawie Yfiler Plus [9, 10, 11]. W praktyce laboratoryjnej medycyny sądowej korzystne jest stosowanie zestawów o jak największej liczbie markerów, gdyż większa liczba zbadanych markerów Y-STR stanowi o większej sile dyskryminacji [10].

5. POLIMORFIZM STR W BADANIACH CHROMOSOMU Y

5.1 Krótka historia odkryć polimorfizmów chromosomu Y

Polimorfizm chromosomu Y został odkryty w 1985 roku [12]. Ciekawostką jest, jak opisuje w swoim artykule de Knijff, że początkowo naukowa społeczność nie doceniła wartości chromosomu Y, co wyrażało się w żartobliwych sugestiach dotyczących jego związku z nietypowymi cechami jak „Zdolność do identyfikacji samolotów (DC10) „, czy „Preadolescencyjna fascynacja Arachnida i Reptilia (MOM-4U) w 1993 roku”. W 1995 roku Roewer i wsp. [13] zmapowali pierwsze krótkie powtórzenia tandemowe (STR) na chromosomie Y, a cztery lata później pojawił się pierwszy „minimalny” zestaw Y-STR obejmujący 8 markerów. W latach dziewięćdziesiątych genotypowanie chromosomu Y odbywało się głównie przy pomocy autorskich protokołów PCR dla markerów Y-STR. Jednocześnie do 2002 roku ponad 150 laboratoriów na całym świecie otrzymało protokoły multipleksowej reakcji PCR oraz inne niezbędne informacje referencyjne. Dało to początek komercyjnym zestawom Y-STR, które pojawiły się w sprzedaży w 2003 roku umożliwiając jednoczesne powielanie 12 *loci* Y-STR. W 1996 roku w Berlinie odbyła się pierwsza międzynarodowa konferencja naukowa „1st Y-Chromosome User Workshop”. Konferencja stała się cyklicznym wydarzeniem obejmującym zakresem oprócz chromosomu Y także mitochondrialny DNA, służąc jako platforma do wymiany wiedzy, danych i opinii między badaczami z dziedziny genetyki sądowej [12].

5.2 Y-STR w różnych zastosowaniach

Polimorfizm chromosomu Y, zwłaszcza w medycynie sądowej, związany jest analizą markerów DNA chromosomu Y na potrzeby badania pokrewieństwa, śladów biologicznych, identyfikacji człowieka oraz genetyki populacyjnej. Chromosom Y jest dziedziczony z ojca na syna, a jego unikalne cechy sprawiają, że jest przydatny w wielu zastosowaniach genetyki sądowej. Polimorfizmy chromosomu Y, głównie odnoszą się do zmian w sekwencji DNA, a precyzyjniej pisząc, w określonych regionach chromosomu Y.

Te zmiany dotyczą np. krótkich powtórzeń tandemowych – STR oraz polimorfizmu pojedynczych nukleotydów – SNP.

Warto zwrócić uwagę na to, że polimorfizmy chromosomu Y to jedynie część analizy DNA w genetyce sądowej. Stanowiąc uzupełnienie badań innych markerów genetycznych, np. autosomalnych, przyczyniają się do poszerzenia możliwości identyfikacyjnych lub wykrywczych [1, 4, 7, 8, 10, 14, 15]. Tandemowe sekwencje powtarzalne w DNA charakteryzujące się znacznym polimorfizmem są szeroko rozpowszechnione w ludzkim genomie. Zastosowanie odpowiednio dobranych markerów genetycznych umożliwia analizę sekwencji DNA w celu mapowania badań, diagnozowania chorób oraz określania tożsamości osób [16]. Krótkie powtórzenia tandemowe (STR, ang. *Short Tandem Repeats*) składają się z fragmentów o długości od dwóch do sześciu par zasad. Amplifikacja tych fragmentów wyizolowanego DNA jest możliwa dzięki powszechnie stosowanej metodzie PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Popularność markerów STR w genetyce sądowej wynika z ich zdolności do identyfikacji nawet przy niewielkiej ilości zdegradowanego DNA, co czyni je nieocenionym narzędziem w badaniach kryminalistycznych [17]. W badaniach śladów biologicznych, takich jak te pozyskane w przypadku napaści seksualnych, wykorzystuje się polimorfizm krótkich powtórzeń tandemowych specyficznych dla chromosomu Y (Y-STR) w celu analizy haplotypów męskich. Y-STR odgrywają kluczową rolę w sytuacjach, gdzie DNA męski jest obecny w mieszaninie z DNA żeńskim, co często występuje w takich przypadkach. Wysoka czułość i selektywność tej metody pozwala na skuteczne oznaczenie męskiego profilu genetycznego nawet w obecności przeważającej ilości DNA żeńskiego. Analiza haplotypów Y-STR umożliwia weryfikację udziału podejrzanych mężczyzn, a także identyfikację sprawców poprzez linię ojcowską, co stanowi istotne narzędzie w genetyce sądowej w kontekście śledztw kryminalnych. Metoda ta umożliwia również oszacowanie liczby mężczyzn uczestniczących w danym zdarzeniu. Ponadto dostarcza istotnych danych i wskazówek, które mogą wspomóc identyfikację nieznanymi sprawców. Dzięki wysokiej specyficzności analizy markerów Y-STR możliwe jest ujawnienie i oznaczenie profilu genetycznego mężczyzny. Stanowi to cenne narzędzie w badaniach kryminalistycznych i rekonstrukcji przebiegu zdarzeń. Jednym z istotnych zastosowań markerów RM Y-STR w analizie genetyki sądowej jest możliwość rozróżnienia mężczyzn spokrewnionych w tej samej linii, na podstawie wykrytych mutacji. Haplotypy markerów Y-STR są również wykorzystywane w sprawach spornego ojcostwa,

stanowiąc narzędzie do identyfikacji pokrewieństwa w linii męskiej. Badania genetyczne przeprowadzane są między innymi w celu identyfikacji osób z tzw. „przeszłości”, na przykład w kontekście analiz szczątków historycznych, archeologicznych, czy szczątków osób pochodzących z katastrof masowych lub działań wojennych. W tego rodzaju analizach oznaczenia haplotypów chromosomu Y są szczególnie przydatne, ponieważ umożliwiają rekonstrukcję linii ojcowskiej, co może być kluczowe przy ustalaniu tożsamości zmarłych, szczególnie jako uzupełnienie lub zastąpienie metod identyfikacji opartych na markerach autosomalnych. Metody te znajdują również zastosowanie przy identyfikacji ofiar masowych katastrof oraz osób zaginionych, kiedy dostęp do materiału genetycznego jest ograniczony, a analiza Y-STR może dostarczyć istotnych informacji o pochodzeniu biogeograficznym i genealogicznym [7]. W zakresie zainteresowania genetyki populacyjnej badania polimorfizmów chromosomu Y mogą dostarczyć dokładniejszych informacji odnośnie różnorodności genetycznej oraz struktury populacji. Jest to przydatne w zrozumieniu wzorców migracyjnych w antropologii i genetyce populacyjnej. Obecnie coraz częściej analiza DNA chromosomu Y używana jest jako narzędzie genealogii sądowej w celu identyfikacji osób lub szczątków historycznych o nieznanym pochodzeniu lub do rozwiązania zagadek z historii, które nie znalazły rozstrzygnięcia. Poprzez porównanie profili STR chromosomu Y genealodzy sądowi mogą śledzić linie ojcowskie oraz identyfikować postacie historyczne poprzez próbki pobrane od obecnie żyjących potencjalnych męskich potomków. W genetyce sądowej dla poprawnej interpretacji wyników badań pokrewieństwa, ze względu na szerokie zastosowanie *loci* STR, kluczowe jest poznanie ich częstości mutacji. W sytuacjach, gdy występują niezgodności między porównywanymi haplotypami, różnice te są brane pod uwagę przy określaniu stopnia prawdopodobieństwa pokrewieństwa analizowanych osób [6].

5.3 Efektywność badań nad chromosomem Y w badaniach genetyczno-sądowych

Badania nad chromosomem Y w genetyce sądowej charakteryzują się wysoką efektywnością, szczególnie w kontekście identyfikacji męskich linii genetycznych oraz analizy materiału dowodowego zawierającego mieszaniny DNA żeńskiego i męskiego. Wykorzystanie zaawansowanych zestawów markerów, takich jak Yfiler Plus, oraz

przestrzeganie międzynarodowych standardów i procedur walidacyjnych, znacząco przyczyniają się do skuteczności tych badań [18]. Dodatkowo, standardy i procedury stosowane w badaniach genetyczno-sądowych wymagają akredytacji laboratoriów zgodnie z normą ISO/IEC 17025, co gwarantuje ich wiarygodność, niezawodność i odtwarzalność. Jest to niezbędne do zapewnienia prawidłowości oznaczania profili DNA, co ma bezpośrednie przełożenie na jakość i efektywność analiz genetyczno-sądowych [19]. Polskojęzyczna Grupa Robocza Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej (ISFG-PL) zaleca wykorzystanie metody *kappa* do szacowania prawdopodobieństwa obserwacji profilu Y-STR w populacji, a przez to oceny wartości dowodowej analizy porównawczej uzyskanych oznaczeń. Metoda ta pozwala na oszacowanie częstości występowania określonych haplotypów Y-STR, co jest istotne dla oceny wartości dowodowej przy ustalaniu pokrewieństwa oraz w analizach kryminalistycznych. Wartość współczynnika przypadkowej zgodności (LR, ang. *Likelihood Ratio*), czyli stosunku prawdopodobieństwa obserwacji identycznych profili genetycznych, jest z zasady odwrotnością oczekiwanej częstości haplotypu [10].

6. BADANIA POPULACYJNE W GENETYCE SĄDOWEJ

Oznaczanie markerów STR na chromosomie Y stanowi jedno z kluczowych narzędzi stosowanych w genetyce sądowej, ze względu na jego wysoką skuteczność i szybkość w rozwiązywaniu kwestii związanych z ustaleniem spornego ojcostwa, analizą próbek biologicznych, identyfikacją osób o nieznannej tożsamości oraz badaniami pokrewieństwa. Technika ta, ze względu na dziedziczenie chromosomu Y w linii męskiej bez rekombinacji, odgrywa szczególną rolę w analizach genealogicznych oraz w przypadkach weryfikacji pokrewieństwa w linii ojcowskiej.

Baza YHRD (Referencyjna Baza Danych Haplotypów Chromosomu Y, ang. *Y-chromosome Haplotype Reference Database*) jest globalnym, dostępną w internecie bazą służącą do przechowywania i analizowania haplotypów Y-STR, stanowiąc szczególnie przydatne narzędzie w genetyce sądowej. Zawiera zbiory haplotypów Y-STR mężczyzn przyporządkowane do różnych populacji i subpopulacji, co umożliwia porównanie profili genetycznych na chromosomie Y w kontekście geograficznym i etnicznym. YHRD jest wykorzystywana głównie w celu oceny częstotliwości występowania danego haplotypu

w populacji referencyjnej, co pozwala na precyzyjne oszacowanie wartości dowodowej wyników analizy Y-STR. Dzięki poszerzającym się zasobom bazy możliwe jest wsparcie i ukierunkowanie procesów identyfikacyjnych, ustalania tożsamości i pokrewieństwa w przypadkach sądowych oraz zawężenie listy osób podejrzanych w sprawie [9, 11, 15].

Obecny podział w bazie YHRD obejmuje siedem następujących metapopulacji: afrykańska, euroazjatycka, wschodnioazjatycka, afroeuroazjatycka, Indian amerykańskich, Eskimosów Aleutów oraz mieszane (oznacza to różne populacje przodków, ich równy wysoki udział) [9]. Aby wykorzystać w badaniach wrażliwość markerów Y-STR na zróżnicowanie międzypopulacyjne, należy odpowiednio pogrupować haplotypy w oparciu o pochodzenie populacji dawcy. Otrzymaną próbkę można przypisać do metapopulacji celem jej segregacji poprzez podział zgodny z pochodzeniem geograficznym, lub zgodny łącznie z pochodzeniem demograficznym, językowym i genetycznym. Podział kontynentalny (inaczej geograficzny) jest prostszy i nie potrzebuje dodatkowych testów, natomiast przy podziale złożonym z trzech uwarunkowań (demografia, język i pochodzenie genetyczne), w celu otrzymania dokładnych informacji ich dotyczących przydatne jest zastosowanie zaawansowanych analiz statystycznych i metod filogenetycznych. W tym kontekście szczególnie użyteczne są metody takie jak analiza klastrow (np. metoda hierarchiczna lub K-średnich) oraz analiza głównych składowych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*), które pozwalają na identyfikację grup na podstawie wieloczynnikowych danych demograficznych, językowych i genetycznych [9, 20, 21].

Badania populacyjne w genetyce sądowej koncentrujące się na chromosomie Y odgrywają kluczową rolę w rozumieniu historii demograficznej, migracji ludności oraz w identyfikacji osobowej. Chromosom Y ze względu na sposób dziedziczenia w linii ojcowskiej i szczególnie niską częstość rekombinacji stanowi wyjątkowe narzędzie do śledzenia historii męskiej linii genetycznej w populacjach ludzkich. Badania te wykorzystują dwa główne typy markerów: krótkie tandemowe powtórzenia (STR) i polimorfizmy pojedynczych nukleotydów (SNP), które umożliwiają precyzyjne konstruowanie haplotypów i haplogrup rzucając światło na ewolucyjne ścieżki i demograficzne historie populacji. Współczesne badania, takie jak projekt 1000 Genomów (ang. *1000 Genomes*), ujawniły dużą zmienność w obrębie chromosomu Y dostarczając nie tylko wiedzy na temat przeszłych migracji i zmian populacyjnych, ale również otwierając nowe perspektywy w rozwiązywaniu przypadków kryminalnych i w identyfikacji

szczątków. Przykładem jest badanie przeprowadzone w Bośni i Hercegowinie, które skupiało się na przewidywaniu haplogrup na podstawie Y-STR, co ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia struktury populacji i jej historii migracyjnej. Z kolei innowacyjne podejścia, takie jak analiza wysokorozdzielcza *loci* STR na chromosomie Y, umożliwiają szczegółowe typowanie genetyczne, które znajduje zastosowanie w genetyce sądowej. Badania, jak te przeprowadzone w Turcji i w Barcelonie, ukazują różnorodność haplotypów chromosomu Y i ich częstości, co może być wykorzystane do precyzyjnej identyfikacji osób oraz do analizy genealogicznej [7, 22, 23, 24, 25, 26].

6.1. Analiza różnorodności polimorfizmu chromosomu Y w różnych grupach etnicznych i geograficznych Europy

Chromosom Y wykazuje zmienność w odniesieniu do grup etnicznych i rozmieszczeniu geograficznemu w Europie. Ciekawie zostało to pokazane w pracy Grochowalskiego i wsp. [27], gdzie zaprezentowana została pełna analiza zmienności chromosomu Y współczesnej męskiej populacji Polski. Było to pierwsze tego typu badanie populacji polskiej, przeprowadzone na tak dużym zestawie danych (2705 osób), które obejmowało informacje genetyczne dotyczące mieszkańców wszystkich województw, czyli pierwszego poziomu administracyjnego kraju, oraz znacznej większości jego powiatów, czyli drugiego poziomu. Ponadto dostępne dane zostały podzielone na klastry odpowiadające bardziej naturalnym regionom geograficznym. Dwustanowe haplogrupy chromosomu Y zostały sklasyfikowane i zwizualizowane za pomocą map interpolacji. Potwierdzono, że polska populacja charakteryzuje się wysokim stopniem jednorodności, przy czym tylko niewielkie różnice genetyczne obserwowano na poziomie regionalnym. Użycie klasteryzacji regionalnej jako alternatywy dla powiatów i województw zapewniło bardziej szczegółowy obraz struktury genetycznej populacji. Zidentyfikowane w niniejszym badaniu różnice regionalne podkreślają ważność dodatkowego podziału populacji według kryteriów kulturowych i etnicznych w takich badaniach, a nie tylko według regionalizacji geograficznej lub administracyjnej. To badanie stanowiło ważny krok w kierunku zrozumienia skomplikowanej mozaiki genetycznej Polski, podkreślając jednocześnie jednorodność genetyczną narodu przy jednoczesnym uznaniu drobnych różnic regionalnych. Znaczenie tych odkryć wykracza poza czysto naukowe aspekty,

oferując cenne wskazówki dla badań antropologicznych, historycznych, a także medycyny sądowej oraz stopniowo wdrażanej w Polsce medycyny personalizowanej [27].

W celu ustalenia przodków najczęściej wykonywanym badaniem jest określenie haplogrupy chromosomu Y. Dziedziczenie chromosomu Y tylko w linii ojcowskiej (przekazywanie z ojca na syna) pozwala odczytać linię genetyczną sięgającą wielu lat wstecz aż do odległej czasowo prehistorii. Mężczyzna, który zapoczątkował historię powstania chromosomu Y prawdopodobnie żył w Afryce Centralnej, 60 tysięcy do nawet 80 tysięcy lat temu. Dotychczas wyróżniono 25 podstawowych wersji chromosomu Y. W Europie wyodrębniono występowanie 12 typów. Możliwa jest identyfikacja populacji, poprzez badanie DNA zlokalizowanego na chromosomie Y spośród występujących na całym świecie 636 grup ludności populacji męskiej.

Nomenklatura haplogrup chromosomu Y zaczyna się od znaku literowego w przedziale od A do R. Następnie podgrupy oznakowane są małymi literami i cyframi. Specyficzne zmiany w kodzie genetycznym, inaczej polimorfizm, definiują przynależność do danej haplogrupy [28]. Najczęściej występującymi haplogrupami w Polsce są R1a i R1b [28, 29]. Jednakże haplogrupa R1a wykazuje występowanie na terenie Polski powyżej 60 %. Natomiast R1b jest znacząco mniejsza i obejmuje obszar zachodniej części regionu Polski. Dzieląc haplogrupę R1b na podgrupy występujące w Europie, a szczególnie dla naszych potrzeb, w Polsce, uzyskano: R1b – S21, R1b – S28, R1b – L21, R1b – DF27, R1b – ht35 [28, 29, 30].

Należy skonstatować, że genetyka sądowa wykorzystując polimorfizmy chromosomu Y stanowi fascynujące połączenie historii populacji, genetyki sądowej i biologii ewolucyjnej, dostarczając narzędzi do głębszego zrozumienia naszej przeszłości oraz umożliwiając postępy w naukach sądowych i kryminalistycznych.

6.2. Walidacja producenta

Walidacja wyrobu jest udokumentowanym procesem polegającym na sprawdzeniu poprawności produktu poprzez dostarczenie dowodu, który potwierdza spełnienie określonych i pożądaných wymagań. Walidacja zestawu Yfiler Plus, którą przeprowadził jego producent (Thermo Fisher Scientific), obejmuje szereg testów w celu określenia

czułości, specyficzności, powtarzalności oraz odporności zestawu na czynniki zewnętrzne, jak np. zanieczyszczenia i degradacja DNA. Badania przeprowadzone przez producenta wskazały, że zestaw Yfiler Plus jest w stanie wykryć DNA męski w ilościach tak niskich, jak 60 pg. Jest to wynik porównywalny lub lepszy od poprzednich wersji zestawów Y-STR [31, 32]. Zestaw ten jest również odporny na interferencje związane z obecnością DNA żeńskiego pozwalając na skuteczną analizę próbek o niskiej proporcji ilościowej DNA męskiego do żeńskiego. Producent przeprowadził także badania nad specyficznością zestawu, analizując możliwość amplifikacji innych *loci* chromosomów autosomalnych lub mitochondrialnych. Wyniki potwierdziły wysoką specyficzność zestawu dla chromosomu Y, minimalizując ryzyko amplifikacji niespecyficzných produktów. Testy powtarzalności i odtwarzalności wykazały zgodność wyników między różnymi laboratoriami oraz w różnych warunkach analitycznych, co potwierdza wiarygodność zestawu w rutynowej analizie sądowej [31, 32, 33, 34].

6.3. Walidacja wewnętrzna

Walidacja wewnętrzna każdego zestawu do analizy DNA jest niezbędna, aby potwierdzić jego przydatność w specyficznych warunkach lokalowych i technicznych danego laboratorium z wykorzystaniem różnej aparatury. Istotnym elementem walidacji wewnętrznej jest także analiza populacyjna wykonywana w celu oceny skuteczności w badaniach identyfikacyjnych oraz uzyskania bazy oznaczonych haplotypów umożliwiającej wiarygodne obliczenia wartości dowodowej w badaniach genetyczno-sądowych [35, 36, 37].

7. BAZY DANYCH DNA

7.1. Geneza

Wprowadzenie analizy DNA do medycyny sądowej znacząco przyczyniło się do rozwoju tej dziedziny oferując nowe perspektywy. Intensywne zainteresowanie nową technologią spowodowało jej szybkie wdrożenie w laboratoriach kryminalistycznych w Europie. Jednakże, brak standaryzacji wykorzystywanych systemów oraz ich rutynowe stosowanie utrudniały porównywanie wyników między laboratoriami. W związku z tym pojawiła się konieczność ujednoczenia metod, co zapoczątkowano poprzez współpracę czołowych europejskich laboratoriów kryminalistycznych. Podjęto także decyzję o stworzeniu baz danych DNA, które miały na celu usprawnienie działania systemów organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości poprzez skuteczniejsze rozwiązywanie przestępstw. Proces ten rozpoczęto od tworzenia lokalnych baz DNA, a następnie w wyniku wprowadzenia technologii amplifikacji krótkich powtórzeń tandemowych (markery STR) pojawiły się nowe możliwości opracowania solidnych, krajowych baz danych DNA. Wielka Brytania w 1995 roku uchwaliła przepisy zezwalające na utworzenie pierwszej oficjalnej krajowej bazy danych DNA obejmującej zarówno profile DNA zebrane z miejsc przestępstwa, jak i profile DNA skazanych osób. Pozostałe kraje wzięły przykład z Wielkiej Brytanii, jednak w części z nich ustawodawstwo ograniczyło dostęp do ilości i rodzajów danych, a co za tym idzie, zmniejszyło skuteczność baz danych. Obecnie, powszechne stosowanie komercyjnych zestawów markerów STR przyczyniło się do ujednoczenia systemów stosowanych do badań DNA w Europie. Zaowocowało to perspektywami na utworzenie wspólnej i skutecznej ogólnoeuropejskiej bazy danych. Niestety istniejące przepisy prawa utrudniają swobodną wymianę profili DNA pomiędzy bazami krajowymi [38].

7.2. Cel bazy danych

Jak podają liczne definicje, baza danych jest zbiorem usystematyzowanych informacji (danych), zorganizowanych w określoną strukturę, zwykle przechowywanych w formie elektronicznej w systemie komputerowym, bądź w formie tradycyjnej np. na

papierze [39, 40, 41]. Bazy danych STR są nieocenionym narzędziem w egzekwowaniu prawa dzięki wykorzystaniu do identyfikacji osób [38]. Głównym celem tworzenia baz danych DNA jest porównanie profili DNA osób z profilami zebranymi w trakcie badań materiału dowodowego. Powodzeniem tworzenia tego typu baz danych jest ciągle ich uzupełnianie o nowo oznaczone profile genetyczne. W Polsce baza danych DNA jest tworzona na podstawie profili DNA podejrzanych i skazanych za przestępstwo, natomiast ich usunięcie następuje po uniewinnieniu lub po 35 latach od skazania [42]. Aby zawartość każdej bazy danych mogła zostać przygotowana, zweryfikowana lub zaprezentowana należy poczynić znaczne nakłady, zarówno jakościowe, jak i ilościowe. Bardziej złożona baza danych może mieć dziesiątki lub nawet setki tabel, z których każda ma dużą liczbę rekordów, w przeciwieństwie do jednej lub dwóch tabel w prostej bazie danych. Chociaż większość współczesnych baz danych obsługuje również przechowywanie danych binarnych, w tym obrazów, dźwięku i wideo, bazy danych pracują przede wszystkim z danymi tekstowymi i numerycznymi. Do cech określających poprawną bazę danych zaliczymy: niepodzielność danych pierwotnych, brak nadmiarowości, integralność, spójność, przemyślany układ tabel, itp. [43].

7.3. Wybrane bazy danych DNA

7.3.1. YHRD (Y-Chromosome STR Haplotype Reference Database)

YHRD, czyli Referencyjna Baza Danych Haplotypów Y-STR, została zainicjowana przez naukowców z Uniwersytetu Charité w Berlinie i uruchomiona w 2000 roku. Przedsięwzięcie to jest wynikiem wspólnej pracy 31 instytucji sądowych i antropologicznych z całej Europy [44]. Baza YHRD rozdziela populacje na 33 metapopulacje na podstawie kryteriów geograficznych i językowych, wg dwóch zakładek: “GeoSearch” – podział według pochodzenia geograficznego i “PopSearch” – podział według pochodzenia językowego, genetycznego i demograficznego populacji badanej [9, 44]. To wszechstronne narzędzie wspiera badania sądowe i antropologiczne dostarczając informacji na temat haplotypów chromosomu Y z całego świata. Naukowcy i genetycy sądowi używają YHRD do śledzenia linii ojcowskich, badania migracji populacji i jako pomocy w identyfikacji szczątków poprzez porównywanie profili chromosomu Y [9].

Aktualna wersja YHRD (wydanie 69) zawiera 349.750 profili w minimalnym zestawie markerów (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385). Dla zestawu YFiler Plus z 27 markerami (DYS576 DYS389I DYS635 DYS389II DYS627 DYS460 DYS458 DYS19 YGATAH4 DYS448 DYS391 DYS456 DYS390 DYS438 DYS392 DYS518 DYS570 DYS437 DYS385 DYS449 DYS393 DYS439 DYS481 DYF387S1 DYS533) liczba profili wynosi 106.444 (yhrd.org/pages/resources/stats, dostęp 30.09.2024) [11].

7.3.2. NDNAD (The United Kingdom National DNA Database) w Wielkiej Brytanii

Występująca pod oficjalną nazwą *the UK National Criminal Intelligence DNA Database* utworzona w 1995 roku jest jedną z najdłużej funkcjonujących i największych baz danych profili DNA na świecie, będąc kluczowym narzędziem w działaniach organów ścigania umożliwiającym identyfikację podejrzanych oraz wspierające proces skazywania sprawców przestępstw. Zawiera profile osób skazanych za przestępstwa, a także próbki zebrane z miejsc przestępstw. Baza ta odgrywa znaczącą rolę w rozwikłaniu przestępstw w tym spraw, które pozostawały nierozwiązane przez lata. Całkowita aktualna liczba profili próbek zanotowanych w NDNAD wynosi 7.269.527 (www.gov.uk/government/statistics/national-dna-database-statistics, dostęp 30.06.2024) [45].

7.3.3. The Sorenson Molecular Genealogy Foundation (SMGF) Database

Zanim została wchłonięta przez platformę Ancestry.com w 2012 roku, SMGF udostępniała publicznie dostępną bazę danych, która obejmowała dane Y-DNA i mitochondrialnego DNA. Chociaż przestała być już aktywnie utrzymywana jako oddzielna jednostka i nie jest dostępna w swojej pierwotnej formie (www.smgf.org), zebrane dane znacząco przyczyniły się do badań genealogii genetycznej. *Sorenson Molecular Genealogy Foundation* (SMGF) utrzymywała wcześniej obszerną bazę danych, zawierającą ponad 100.000 próbek DNA oraz rodowody rodzinne. Ta baza danych była połączona z informacjami genealogicznymi i genetycznymi, umożliwiając osobom śledzenie ich przodków poprzez analizy DNA chromosomu Y i mtDNA.

7.3.4. The International Society of Genetic Genealogy (ISOGG) Y-DNA Haplogroup Tree

ISOGG utrzymuje aktualizowane drzewo haplogrup Y-DNA, które, chociaż nie jest bazą danych haplotypów, służy jako odniesienie do zrozumienia klasyfikacji i relacji między haplogrupami Y-DNA. Jest to istotne narzędzie dla genealogów genetycznych i badaczy (<https://isogg.org/tree>). Strona ISOGG koncentruje się na klasyfikacji haplogrup Y-DNA i jest regularnie aktualizowana przez grupę wolontariuszy i ekspertów w celu odzwierciedlenia najnowszych odkryć w dziedzinie genetyki. Każda linia drzewa haplogrup Y-DNA zawiera haplogrupę lub subkladę, a także odpowiednie markery SNP, które są używane do określenia przynależności próbki do konkretnej subklady.

7.3.5. GenBank

GenBank zarządzany przez *National Institutes of Health* (NIH, tłum. Narodowe Instytuty Zdrowia) jest obszerną bazą danych zawierającą sekwencje genetyczne zgłaszane przez badaczy z całego świata. Obejmuje szeroki zakres sekwencji, w tym sekwencje chromosomu Y. Pomimo, że jest to przede wszystkim baza danych sekwencji nukleotydowych, może być cennym narzędziem dla naukowców poszukujących specyficznych sekwencji chromosomu Y do celów badawczych. Aktualna liczba sekwencji w bazie danych GenBank wynosi ponad 2,45 miliarda, które zawierają ponad 17 bilionów baz nukleotydowych. Dane te pochodzą z ostatniej aktualizacji bazy (NCBI), która jest regularnie uaktualniana co dwa miesiące (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

7.3.6. The 1000 Genomes Project

Projekt 1000 Genomów, którego główne fazy zakończono do 2015 roku, obejmował sekwencjonowanie genomów 2504 osób pochodzących z 26 różnych populacji na całym świecie, w tym dane chromosomu. Uczestnicy projektu reprezentowali różne grupy geograficzne i etniczne, co miało na celu stworzenie wszechstronnej mapy zmienności genetycznej człowieka, umożliwiającej lepsze zrozumienie globalnej różnorodności genomowej. Dane z tego projektu są swobodnie dostępne do badań i stanowią cenną bazę do zrozumienia ludzkiej różnorodności genetycznej (www.internationalgenome.org/1000-genomes-summary/).

7.3.7. YFull YTree

YFull oferuje usługę interpretacji i analizy sekwencji chromosomu Y, konstruując drzewo haplogrup Y na podstawie danych z sekwencjonowania Y o wysokiej przepustowości. Zasób ten jest przydatny dla mężczyzn, których Y-DNA był sekwencjonowany na wysokim poziomie rozdzielczości i którzy chcą sprawdzić jaka jest lokalizacja ich specyficznego haplotypu w obszernym drzewie zawierającym haplogrupy. Aktualna liczba profili w bazie YFull YTree to kilkadziesiąt tysięcy próbek, które są regularnie aktualizowane co 1-1,5 miesiąca, a każda wersja drzewa ma swoją unikalną numerację i datę wydania (Nebula Genomics; nebula.org/blog/yfull-tutorial/; yfull.com/tree/).

7.3.8. The US Y-STR Database

Baza danych US Y-STR została opracowana przez połączenie zasobów *The National Center for Forensic Science* (NCFS, tłum. Narodowe Centrum Nauk Sądowych) w Stanach Zjednoczonych z bazami danych online prowadzonymi przez Uniwersytet Arizony, Applied Biosystems Inc., ReliaGene Inc. oraz Promega Corporation. Baza ta oferuje narzędzia umożliwiające uzyskanie częstości haplotypów Y-STR, które są potrzebne do oceny danych w badaniach sądowych i pokrewieństwa. *The US Y-STR Database*, wspierana finansowo przez *US National Institute of Justice* i zarządzana przez NCFS, podlega ciągłym aktualizacjom. Wersja 4.1 tej bazy zawiera 35.295 haplotypów, z których 26.683 występuje w zakresach zestawów Yfiler i Yfiler Plus. Zestaw Yfiler Plus zawiera dodatkowe 10 *loci* w stosunku do pierwotnych 17 zawartych w zestawie Yfiler, co zwiększa zdolność dyskryminacji oraz może pomóc w rozstrzygnięciu przypadków blisko spokrewnionych mężczyzn [46]. Baza danych US Y-STR od 2018 roku zawiera 35.658 haplotypów Y-STR, które zostały wygenerowane przez różne laboratoria, w tym kryminalistyczne, akademickie, a także komercyjne.

7.3.9. Ensembl

Jest to platforma umożliwiająca badania w zakresie genomiki porównawczej, ewolucji, różnorodności sekwencji i regulacji transkrypcyjnej obejmująca zarówno kręgowce, jak i wybrane organizmy modelowe. Platforma ta zajmuje się opisywaniem genów, wykonuje analizy wielokrotnych dopasowań, ocenia funkcje regulacyjne i gromadzi informacje o chorobach. Wśród dostępnych przydatnych narzędzi Ensembl znajdują się BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), BLAT (ang. *BLAST-like alignment tool*), BioMart oraz VEP (ang. *Variant Effect Predictor*) dla obsługiwanych gatunków. Zapewnia dostęp do danych genetycznych, w tym kompletnych sekwencji chromosomu Y, umożliwiając analizę jego struktury i genów. Narzędzia dostępne na stronie Ensembl umożliwiają dogłębną analizę genów znajdujących się na chromosomie Y [47]. Aktualna liczba zsekwencjonowanych gatunków w bazie danych Ensembl wynosi 271 (ensembl.org/index.html, dostęp 16.08.2024)

7.3.10. National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Jest międzynarodową bazą danych zawierającą informacje o strukturze białek, sekwencji DNA i mapach genetycznych. Na jednej z jej podstron znajdziemy *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Jest to obszerna i wiarygodna baza obejmująca katalog ludzkich genów w relacjach z fenotypami, zwłaszcza chorobowymi. Jest dostępna publicznie z informacjami i danymi aktualizowanymi na bieżąco. NCBI (tłum. Narodowe Centrum Informacji Biotechnologicznej) zarządza wieloma bazami danych biologicznych, w tym bazą *Gene Expression Omnibus* (GEO), która gromadzi dane dotyczące ekspresji genów. Dane te są anonimowo przesyłane przez naukowców i badaczy z całego świata. Umożliwia tym samym dostęp do szerokiego zakresu informacji dotyczących ekspresji genów w różnych warunkach badawczych i systemach biologicznych. Liczba konkretnych profili w tej bazie nie została określona w dostępnych źródłach, jak oficjalna strona NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

7.3.11. Y-STR POLSKA

Inicjatywa 'Y-STR Polska' to projekt z udziałem wielu ośrodków, mający na celu utworzenie bazy danych haplotypów Y w polskiej populacji, obejmującej 16 *loci* systemu AmpFISTR Yfiler. Polska baza danych Y-STR, opublikowana w 2011 roku, miała w założeniu służyć m.in. do oceny wartości dowodowej w genetyce sądowej. Baza zawierała wstępnie 1600 haplotypów Y-STR z regionów Łodzi, Warszawy i Szczecina. Miała być systematycznie rozwijana i dostępna publicznie na stronie www.genetyka-sadowa.pl, wspierając obliczenia wartości dowodowej oznaczeń Y-STR w populacji Polski. Według obecnie dostępnych informacji, projektu nie można odszukać na podanej stronie internetowej, prawdopodobnie został zawieszony lub porzucony [48, 49].

7.3.12. Krajowa Baza Danych DNA (KBD DNA) w Polsce

Krajowa Baza Danych o nazwie GENOM funkcjonuje od 2007 roku i jest wykorzystywana głównie w celach kryminalistycznych, do gromadzenia i przetwarzania profili DNA na użytek organów ścigania i wymiaru sprawiedliwości. Zgodnie z treścią Ustawy z dnia 29.08.1997 r. o ochronie danych osobowych jej administratorem jest Komendant Główny Policji. Baza ta przyczyniła się do rozwiązania wielu spraw kryminalnych i identyfikacyjnych, dzięki możliwości automatycznej wymiany danych DNA z partnerami zagranicznymi oraz prowadzonym pracą legislacyjnym i organizacyjnym. Zgodnie z ustawą o Policji baza służy przetwarzaniu informacji dotyczących m.in. osób wymienionych w art. 74 i art. 192a Kodeksu postępowania karnego (k.p.k.), osób o tożsamości nieustalonej oraz usiłujących ukryć swoją tożsamość (osoby NN), a także zwłok o tożsamości nieustalonej (zwłoki NN), śladów kryminalistycznych o pochodzeniu nieprzypisanym do sprawców (ślady NN), a także osób stwarzających zagrożenie publiczne. Według dostępnych informacji KBD DNA zawiera obecnie około 70 tysięcy profili, w tym 83% stanowią profile osób wymienionych w art. 74 k.p.k., natomiast około 12% stanowią profile śladów NN. Pozostałe 5% to profile osób i zwłok NN oraz osób zaginionych i spokrewnionych z zaginionymi [50].

7.4. Rola baz danych DNA w genetyce sądowej

Rola oraz rozwój baz danych DNA w polskiej genetyce sądowej obejmują wiele kluczowych aspektów, począwszy od ich historycznych początków, poprzez ramy regulacyjne, aż po współczesne wyzwania oraz przyszłe perspektywy związane z ich doskonaleniem i wykorzystaniem w praktyce kryminalistycznej. Genetyka sądowa w Polsce zaczęła dynamicznie rozwijać się po pierwszym zastosowaniu badań DNA do celów sądowych w 1989 roku. Kluczowym momentem dla genetyki sądowej było odkrycie regionów krótkich tandemowych powtórzeń (STR) w 1991 roku, co przyczyniło się do intensywnego rozwoju tej dziedziny. Wykorzystanie analiz DNA stało się nieodzownym narzędziem w identyfikacji sprawców przestępstw, ofiar zbrodni, analizie pokrewieństwa i ustalaniu tożsamości osób. Markery STR wykorzystywane w profilowaniu genetycznym, zlokalizowane są głównie w niekodujących regionach genomu. Ich analiza podlega ścisłym regulacjom prawnym na całym świecie, co ma na celu zapewnienie odpowiedniego standardu bezpieczeństwa i ochrony danych genetycznych [19]. Polskie regulacje prawne dotyczące genetyki sądowej opierają się na systemie specjalizacji wprowadzonym w 2013 roku, z pierwszym programem specjalizacyjnym zatwierdzonym w 2016 roku. Specjaliści w tej dziedzinie muszą posiadać nie tylko odpowiednią wiedzę i kwalifikacje, ale również spełniać wysokie standardy rzetelności naukowo-badawczej. Polskie przepisy, w tym Kodeks postępowania karnego, zobowiązują do prowadzenia analiz materiału dowodowego zgodnie z aktualnym stanem wiedzy w zakresie kryminalistyki i medycyny sądowej [19]. Oprócz badań genetycznych, ważną rolę odgrywają bazy danych DNA, w tym bazy eliminacyjne, zawierające profile osób mogących być źródłem tzw. kontaminacji krzyżowej śladów. Takie bazy mają kluczowe znaczenie dla identyfikacji sprawców i podkreślają potrzebę zrównoważonego podejścia między wykorzystaniem nowych technologii a ochroną prywatności i danych osobowych. Rekomendacja Europejskiej Sieci Instytutów Nauk Sądowych (ENFSI, ang. *The European Network of Forensic Science Institutes*) jasno wskazuje, że każda baza danych DNA powinna zawierać również bazy eliminacyjne, co ma zasadnicze znaczenie dla skuteczności i wiarygodności analiz genetycznych [51].

Markery chromosomu Y, nazywane również markerami liniowymi lub haploidalnymi, wyróżniają się brakiem rekombinacji oraz liniowym modelem dziedziczenia. Te właściwości wpływają na metodologię pobierania próbek i metodę

raportowania częstości, która, choć opiera się na uniwersalnych zasadach genetyki populacyjnej i statystyki, wymaga specyficznego podejścia z uwagi na pełne powiązania między markerami w haplocyfie Y-STR. W konsekwencji, zasada iloczynu, charakterystyczna dla analiz autosomalnych, nie znajduje zastosowania przy szacowaniu częstości cech chromosomu Y, co z kolei wymusza stosowanie obszernych baz danych referencyjnych haplotypów do przeprowadzenia niezbędnych obliczeń [51, 52, 53]. YHRD będąca największą i ściśle monitorowaną bazą danych haplotypów chromosomu Y, odgrywa kluczową rolę w procesie identyfikacji genetycznej. Jej projekt został skonstruowany tak, by umożliwić przechowywanie, aktualizowanie i udostępnianie danych o haplotypach pobranych z szerokiego spektrum populacji lokalnych, oferując tym samym analitykom dostęp do informacji niezbędnych dla celów sądowych. Baza ta nie tylko ułatwia rozpowszechnianie danych o częstości występowania konkretnych haplotypów, ale również zawiera narzędzia wspierające analizę efektów podstruktury populacji, interpretację zgodności między profilami Y-STR, a także integrację współczynników prawdopodobieństwa w analizach mieszanin DNA, co ma znaczenie przy formułowaniu opinii genetyczno-sądowych. Dodatkowo, proces tworzenia YHRD opiera się na bezpośrednim przesyłaniu danych z akredytowanych laboratoriów, gdzie każda przesłana próbka populacji podlega weryfikacji pod kątem oryginalności, otrzymuje unikalny numer akcesyjny, a następnie jest poddawana kontroli jakości. W ramach procedury publikacji, zgłoszenia do YHRD są udostępniane publicznie. Dostęp do tych danych możliwy jest poprzez funkcje wyszukiwania, które umożliwiają filtrowanie wpisów na podstawie haplotypów, populacji, autorów lub unikalnych numerów akcesyjnych. Proces ten podkreśla otwartość i dostępność naukowej współpracy, umożliwiając szerokie wykorzystanie zgromadzonych danych w celach badawczych i sądowych. YHRD przyczynia się do wzmacniania badań w dziedzinie identyfikacji genetycznej, ułatwiając wymianę wiedzy i współpracę międzynarodową [52, 53].

II CEL PRACY

1. Walidacja wewnętrzna metody amplifikacji enzymatycznej (PCR) i oznaczania profili 27 *loci* STR chromosomu Y (Y-STR) człowieka przy zastosowaniu zestawu Yfiler Plus PCR Amplification Kit.
2. Analiza polimorfizmu haplotypów i ocena parametrów biostatystycznych 27 *loci* Y-STR w próbie populacyjnej pochodzącej z Polski północno-wschodniej.
3. Porównawcza i filogenetyczna analiza międzypopulacyjna oparta na ocenie genetycznych odległości między populacją Polski pn-wsch. a wybranymi populacjami europejskimi.

III MATERIAŁ I METODY

1. MATERIAŁY

Analizie poddano próbki DNA izolowane z anonimizowanych wymazów nabłonka wewnętrznej strony policzków lub próbek krwi zasuszonej na bibule pobranych od 534 niespokrewnionych ochotników płci męskiej w wieku od 16 do 62 lat, zamieszkujących północno-wschodni region Polski. Wszystkie zakwalifikowane do badania zadeklarowały polskie pochodzenie i miejsce urodzenia w północno-wschodniej części kraju. Na wykorzystanie wymazów oraz krwi do przedmiotowych analiz laboratoryjnych od wszystkich badanych uczestników uzyskano podpisane świadome zgody. Na wykonanie badań uzyskano zgodę niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku o numerze APK.002.40.2021. Wszystkie etapy realizacji projektu zostały wykonane w Zakładzie Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

2. WYPOSAŻENIE I ODCZYNNIKI

Sprzęt laboratoryjny:

- komora laminarna (Holten)
- wstrząsarka typu vortex (Eppendorf)
- blok grzejny
- wirówka 5424 (Eppendorf)
- 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- pipety automatyczne (Eppendorf)

Odczynniki:

- GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx)
- Quantifiler Human Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Yfiler Plus PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Powerplex Y23 System (Promega)
- woda do PCR wolna od nukleaz
- formamid dejonizowany (Thermo Fisher Scientific)
- standard wielkości LIZ 600 v.2.0 (Thermo Fisher Scientific)
- standard wielkości ILS 600 (Promega)
- polimer POP-4 do 3500 (Thermo Fisher Scientific)

3. METODY

3.1. Pobieranie materiału i izolacja DNA

Wymazy nabłonka jamy ustnej pobierano na jałowe wymazówki poprzez pocieranie wewnętrznej strony jamy ustnej. Krew na bibułę pobierano przez nakłucie skóry palca nakłuwaczem, następnie materiał pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Ekstrakcję materiałów biologicznych przeprowadzono przy użyciu zestawu GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit (EURx) zgodnie z instrukcją producenta.

3.2. Ocena ilościowa i jakościowa

Ekstrakty DNA oznaczano ilościowo metodą PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu zestawu Quantifiler Human DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) i termocyklera 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) zgodnie z instrukcją producenta. Zestaw Quantifiler wykorzystuje technologię qPCR (ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy) do precyzyjnego pomiaru ilości ludzkiego DNA. Zestaw ten zawiera: mieszaninę reakcyjną zawierającą polimerazę Taq, dNTPs, jony magnezu oraz inne składniki niezbędne do amplifikacji DNA, specyficzne sondy i startery zaprojektowane w celu specyficznej amplifikacji ludzkiego DNA, co minimalizuje ryzyko amplifikacji DNA z innych źródeł, wzorce kalibracyjne umożliwiające utworzenie krzywej standardowej, co umożliwi dokładną kwantyfikację DNA w próbkach badawczych. Poprzez kwantyfikację DNA rozumiemy pośrednie obliczanie ilości DNA przez pomiar fluorescencji barwnika interkalującego do podwójnych nici kwasu nukleinowego.

3.3. Charakterystyka zestawu Yfiler Plus

Zestaw Yfiler Plus PCR Amplification Kit charakteryzuje się zdolnością do różnicowania, którą uzyskano dzięki nowym, wysoce zmiennym markerom. Został zaprojektowany tak, aby radził sobie z próbkami zdegradowanymi oraz zawierającymi inhibitory PCR. Poprawia to znacząco precyzję i skuteczność analizy DNA. Zestaw

zawiera komplet odczynników potrzebnych do oznaczeń genotypu w zakresie 27 polimorficznych *loci* Y-STR: DYS576, DYS389I, DYS635a/b, DYS389II, DYS627, DYS460, DYS458, DYS19, YGATAH4, DYS448, DYS391, DYS456, DYS390, DYS438, DYS392, DYS518, DYS570, DYS437, DYS385a/b, DYS449, DYS393, DYS439, DYS481, DYF387S1a/b i DYS533, obejmujących 17 markerów zestawu Yfiler PCR Amplification Kit oraz 10 dodatkowych, w tym siedem markerów szybko mutujących (RM) z częstością powyżej 1×10^{-2} . W Tabeli 1 przedstawiono zakresy obserwowanych alleli wzorcowych poszczególnych *loci* Yfiler Plus wchodzących w skład drabiny allelicznej oraz ich znaczniki fluorescencyjne.

Tabela 1. Drabina alleliczna Yfiler Plus zawierająca znaczniki alleli *loci* zestawu Yfiler Plus wyznakowane pięcioma różnymi fluorochromami.

Fluorochrom	<i>locus</i>	Allele
6 FAM (niebieski)	DYS389I	9 – 17
	DYS389II	24 – 35
	DYS576	10 – 25
	DYS627	11 – 27
	DYS635	15 – 30
VIC (zielony)	DYS19	10 – 19
	DYS391	5 – 16
	DYS448	14 – 24
	DYS458	11 – 24
	DYS460	7 – 14
	Y GATA H4	8 – 15
NED (żółty)	DYS390	17 – 29
	DYS392	4 – 20
	DYS438	6 – 16
	DYS456	10 – 24
	DYS518	32 – 49
TAZ (czerwony)	DYS385 a/b	32 – 49
	DYS437	10 – 18
	DYS449	22 – 40
	DYS570	10 – 26
SID (fioletowy)	DYF387S1 a/b	30 – 44
	DYS393	7 – 18
	DYS439	6 – 17
	DYS481	17 – 32
	DYS533	7 – 17

3.4. Amplifikacja i genotypowanie

Zastosowano warunki PCR zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta zestawu Yfiler Plus w aparacie GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Amplifikację przeprowadzono w 28 cyklach PCR (9600 Emulation Mode). Wszystkie reakcje przeprowadzono w obecności kontroli pozytywnej (DNA Control 007) i kontroli negatywnej (test odczynnikowy). Elektroforezę kapilarną i genotypowanie przeprowadzono w sekwenatorze Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems) przy użyciu oprogramowania GeneMapper® ID-X v.1.5 w oparciu o standard wielkości GS600-LIZ v.2 [31, 54].

Metoda elektroforezy kapilarnej polega na rozdziale DNA w kapilarach wypełnionych polimerem. Obdarzone ujemnym ładunkiem fragmenty DNA migrują w kapilarach od katody do anody. Polimer stanowi barierę dla pokonujących go produktów PCR, stawiając silniejszy opór fragmentom o większej długości. Analizator posiada wbudowany laser wzbudzający barwniki fluorescencyjne, którymi wyznakowane zostały startery PCR. Emisja fluorescencji odczytywana jest za każdym razem, kiedy w okienku detekcji pojawia się allel. Oprócz produktów PCR poprzez kapilary migruje wewnętrzny wzorec wielkości wyznakowany odrębnym barwnikiem. Względem tego standardu odbywa się pomiar długości alleli badanego profilu genetycznego.

3.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną, opartą na 534 wygenerowanych profilach, przeprowadzono przy użyciu programu STRAF 2.1.5 (*STR Analysis for Forensics*) [55]. Program STRAF jest narzędziem online, które umożliwia analizę statystyczną danych dotyczących markerów STR w genetyce sądowej, wizualizację graficzną wyników oraz ocenę struktury populacji w kontekście chromosomu Y. Jedną z ważnych funkcji STRAF jest analiza głównych składowych (ang. *Principal Content Analysis, PCA*), która może być wykorzystana do badania podstruktur populacyjnych. W przypadku Y-STR, PCA pozwala na identyfikację klastrów genotypów, co może być przydatne w przewidywaniu przynależności do haplogrup. W tym przypadku, dokładność analizy jest ograniczona do zakresu dostępnych danych referencyjnych, na których opiera swoje prognozy. Ostateczne

potwierdzenie haplogrupy wymaga poszerzenia zakresu badań, na przykład poprzez typowanie SNP.

Częstości alleli DYF387S1, DYS385 i DYS389 obliczono metodą bezpośredniego zliczania. Częstości haplotypów obliczono poprzez bezpośrednie zliczanie. Określono liczbę singletonów, czyli haplotypów zaobserwowanych tylko raz w badanej próbie. Zdolność do dyskryminacji DC (*Discrimination Capacity*) obliczono jako liczbę różnych haplotypów podzieloną przez całkowitą liczbę próbek (pomijając wielokrotność powtarzalnych haplotypów). Obliczono następujące parametry przydatności w genetyce sądowej: GD (*Gene Diversity*) – współczynnik zróżnicowania genowego/haplotypowego, PIC (*Polymorphism Information Content*) – wskaźnik informacji o polimorfizmie, MP (*Match Probability*) – prawdopodobieństwo dopasowania, HMP (*Haplotype Match Probability*) – prawdopodobieństwo dopasowania haplotypu, PD (*Power Of Discrimination*) - siła dyskryminacji.

Obliczone wskaźniki statystyczne wynikają z następujących wzorów:

$HMP = \sum p_i^2$, gdzie p_i to częstość haplotypu [56],

$GD = (\frac{N}{N-1})(1 - \sum_{i=1}^N (p_i)^2)$, gdzie N i p_i to odpowiednio liczebność próbki i częstość alleli (dla markerów dwuallelicznych DYF387S1, DYS385 i DYS389 obliczano bezpośrednio odejmując liczbę powtórzeń allela mniejszego od liczby powtórzeń allela większego) [56],

$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$, gdzie p_i i p_j to częstości alleli [57],

$MP = \sum_i (G_i)^2$, gdzie G_i jest częstością występowania genotypu i w danym *locus* [58],

$PD = 1 - MP$.

Dodatkowo dzięki narzędziom udostępnionym na stronie YHRD (<https://yhrd.org/>, dostęp 07.03.2023) przeprowadzono analizę wariancji molekularnej AMOVA (ang. *Analysis of Molecular Variance*) oraz analizę skalowania wielowymiarowego MDS (ang. *Multidimensional Scaling*), które są wykorzystywane do analizy odległości genetycznych pomiędzy populacjami na podstawie haplotypów Y-STR w oparciu o obliczenia współczynnika F_{ST} . Analizą MDS posłużono się w celu graficznego przedstawienia dystansów genetycznych między wybranymi populacjami na podstawie zróżnicowania rozkładów haplotypów Y-STR. Analiza MDS pozwala na wizualizację danych

genetycznych w postaci wykresów, ukazując relacje między populacjami w przestrzeni wielowymiarowej. Te analizy można przeprowadzać przy użyciu danych z YHRD, z dostępem do haplotypów z wybranych populacji referencyjnych, tak jak to wykonano w niniejszej pracy. Wykorzystano dane udostępnione dla populacji: Grenlandia [78], Irlandia [79], Litwa [80], Serbia [81], Chorwacja [82], Dania [83], Niemcy [84], Węgry [85], Włochy [86,87], Niderlandy [88], Federacja Rosyjska (Rosja) [89,90], Słowenia [91], Szwajcaria [92], Belgia [93,94], Austria [95,96], Hiszpania [97], Wielka Brytania [98]. Drzewo filogenetyczne zostało zrekonstruowane stosując algorytm *neighbor-joining* [99] wykorzystując program T-REX [100].

IV WYNIKI

1. WALIDACJA – WPROWADZENIE DO ZAGADNIENIA

Walidacja jest procesem oceny i potwierdzeniem, że dany zestaw lub procedura działa zgodnie z zamierzeniem i jest odpowiednia do planowanego zastosowania. W genetyce sądowej, walidacja dotyczy np. testowania zestawów do analizy DNA. Zapewnia, że zostaną spełnione wymagania takie jak: dokładność, powtarzalność, czułość oraz specyficzność. Walidacja odbywa się w dwóch głównych etapach. Jednym z nich jest walidacja producenta, podczas której zestaw testowany jest na szeroką skalę w kontrolowanych warunkach. Drugim etapem jest walidacja wewnętrzna, która jest prowadzona w laboratoriach przed wprowadzeniem nowej metody, w warunkach rutynowego użytkowania zestawu. Wprowadzenie nowego zestawu do badań DNA w laboratorium wymaga przeprowadzenia walidacji w celu potwierdzenia, że zastosowana technologia zapewnia oczekiwane wyniki oraz umożliwia ocenę warunków, w których te wyniki są uzyskiwane, a także określa ograniczenia technologiczne [59, 60, 61, 62].

1.1. Protokół walidacji wewnętrznej zestawu Yfiler Plus opracowany na potrzeby Pracowni DNA ZMS UMB

Identyfikator metody: Yfiler Plus. Miejsce wykonywania pracy: Pracownia DNA Zakładu Medycyny Sądowej UMB

1. Dane dotyczące obiektu (próbki)

Materiał biologiczny różnego pochodzenia zawierający ludzki materiał genetyczny.

2. Cel i zakres zastosowania metody wraz z opisem procedury walidacji

Określenie parametrów badawczych zestawu Yfiler Plus służącego do identyfikacji genetycznej w oparciu o oznaczenia markerów typu STR zlokalizowanych na chromosomie Y. Sprawdzenie wydajności, czułości, balansu heterozygotycznego, zgodności i jakości profili DNA oznaczonych za pomocą zestawu Yfiler Plus ma na celu uzyskiwanie wiarygodnych, powtarzalnych wyników badań genetycznych.

Walidację przeprowadzono w oparciu o wytyczne *International Society for Forensic Genetics* (ISFG), *The European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI) oraz *Scientific Working Group for DNA Analysis Methods* (SWGDM) [60, 63, 64, 65].

3. Metodyka

DNA ze śladów biologicznych izolowany był przy pomocy zestawu GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit (Eurx). Ocenę ilościową DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Quantifiler DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific).

Elektroforezę i genotypowanie prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta oraz wg. procedur badawczych: PB-01 Badanie polimorfizmu STR DNA człowieka w śladach biologicznych, wyd. 6 i PB-02 Badanie polimorfizmu STR DNA człowieka na potrzeby ustalania pokrewieństwa, wyd. 6 rutynowo stosowanych w Pracowni DNA ZMS UMB.

4. Materiał badawczy

Control DNA 9947A, DNA Control 007, drabiny alleli w składach zestawów Yfiler Plus i Powerplex Y23, typowe ślady biologiczne badane w Pracowni DNA ZMS UMB.

5. Założenia metodyczne

Szczegółowe założenia metodyczne przeprowadzonych badań realizowano zgodnie z poniższymi punktami:

1. Precyzja – stopień zgodności między wynikami uzyskanymi w oparciu o tę samą metodę i na tej samej próbce przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczeń. Badanie polega na sprawdzeniu powtarzalności oraz odtwarzalności wyników w ramach badań prowadzonych w tym samym laboratorium.
2. Ustalenie czułości, parametrów progów analizy (poziomu oznaczalności LOQ, poziomu wykrywalności LOD, progu stochastycznego ST) i balansu heterozygotycznego, które pozwolą na uzyskiwanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników genotypowania.
3. Analiza mieszanin – określenie najmniejszej proporcji mieszaniny DNA kobiety i mężczyzny, dla której może być oznaczony pełny profil składnika mniejszościowego.
4. Porównanie zgodności i jakości profili DNA śladów biologicznych oznaczonych za pomocą zestawu standardowo stosowanego w Pracowni DNA, tj. PowerPlex Y23, z profilami otrzymanymi za pomocą walidowanego zestawu Yfiler Plus.

6. Wartości cech charakterystycznych metody

Tabela 2. Wartości cech charakterystycznych metody Yfiler Plus

Cecha	TAK/NIE	Wartość cechy
Precyzja (powtarzalność, odtwarzalność)	+	zadowalająca
Czułość	+	zadowalająca
Parametry progów analizy	+	zadowalająca
Analiza mieszanin	+	zadowalająca
Porównanie wyników śladów biologicznych w obrębie walidowanych zestawów	+	zadowalająca

7. Ocena metody (porównanie cech charakterystycznych metody z wymaganiami)

1. Precyzja wyznaczona doświadczalnie odpowiada wymaganiam zawartym w założonym kryterium akceptacji. Zaobserwowano prawidłowe, współmierne proporcje alleli pomiędzy wszystkimi badanymi *loci* zestawu Yfiler Plus. Wartości trzykrotnych odchyłeń standardowych średnich długości alleli nie przekroczyły 0,5 bp.
2. Dla zestawu Yfiler Plus przy ilości DNA w zakresie 1,000 - 0,125 ng uzyskano wiarygodne wyniki i oznaczono pełne profile genetyczne. Liczba nieoznaczonych markerów wzrastała przy stężeniu 0,062 ng i poniżej tej wartości. Przy stężeniu 0,031 ng oznaczono pojedyncze markery, poniżej tej wartości zaś otrzymane wyniki nie kwalifikowały się do interpretacji.
3. Poziom wykrywalności (LOD) określono na 50 rfu, poziom oznaczalności (LOQ) określono na 150 rfu. Wartość ST, stosowana przy interpretacji profili Yfiler Plus, została określona na poziomie 550 rfu.
4. Dla zestawu Yfiler Plus utratę alleli obserwowano przy proporcji ilości DNA męskiego i żeńskiego 1:1000. Przy większej dysproporcji zjawisko to występowało z większą częstością. Przy proporcji 1:8000 nie oznaczono haplotypów Y-STR.
5. W warunkach laboratoryjnych czułość wyznaczona doświadczalnie odpowiada wymaganiam zawartym w założonym kryterium akceptacji.
6. Dla wszystkich analizowanych śladów biologicznych odnotowano zgodne oznaczenia wszystkich odpowiadających markerów Yfiler Plus oraz Powerplex Y23. Jakość profili na elektroferogramach analizowanych próbek była porównywalna.

Podsumowanie uzyskanych wyników badań walidacyjnych pozwala na stwierdzenie, iż zestaw Yfiler Plus PCR Amplification Kit może być stosowany w badaniach prowadzonych na potrzeby przedmiotowej pracy doktorskiej.

1. Badanie czułości i balansu heterozygotycznego (PHR)

Cel testu:

1. Określenie najmniejszej, możliwej do wykrycia ilości matrycy DNA w próbce, wystarczającej do uzyskania pełnego profilu DNA, powyżej wyznaczonego progu oznaczalności.
2. Badanie balansu heterozygotycznego (PHR). Parametr ten dla *loci* heterozygotycznych wyraża się % ilorazu wysokości piku niższego i piku wyższego, zgodnie ze wzorem:

$$\text{PHR} = \frac{\text{wpn}}{\text{wpw}} \times 100\%$$

gdzie: PHR – balans heterozygotyczny, wpn – wysokość piku niższego, wpw – wysokość piku wyższego

3. Określenie przedziałów pomiędzy minimalnym i maksymalnym stężeniem matrycy DNA w reakcji PCR, w obrębie których metoda zapewnia wiarygodne wyniki.

Do reakcji amplifikacji zestawem Yfiler Plus jako matrycę DNA użyto Control DNA 007 (Thermo Fisher Scientific) w ilościach: 1,000, 0,500, 0,250, 0,125, 0,062, 0,031, 0,016 i 0,008 ng.

Reakcję dla każdego rozcieńczenia wykonywano trzykrotnie.

Wyniki przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Wyniki oznaczeń rozcieńczeń Control DNA 007 po amplifikacji zestawem Yfiler Plus.

Ilość (pg)	DYS576	DYS389I	DYS635	DYS389II	DYS627	DYS460	DYS458	DYS19	YGATAH4	DYS448	DYS391	DYS456	DYS390	DYS438	DYS392	DYS518	DYS570	DYS437	DYS385	DYS449	DYS393	DYS439	DYS481	DYF_387S1	DYS533
1,000	1																	91,15							99,89
	2																	94,48							99,07
	3																	73,26							78,57
0,500	1																	92,15							65,07
	2																	89,15							65,49
	3																	76,15							73,91
0,250	1																	86,08							73,46
	2																	68,55							93,46
	3																	93,15							73,64
0,125	1																	78,16							63,89
	2																	93,09							67,39
	3																	81,36							69,16
0,062	1																	81,09							64,78
	2																	64,68							96,16
	3																	72,16							62,59
0,031	1																								78,09
	2																	62,64							
	3																								60,74
0,016	1																								
	2																								
	3																								
0,008	1																								
	2																								
	3																								

oznaczenie alleli brak oznaczenia alleli

2. Określenie parametrów progów analizy (LOQ, LOD, ST).

LOQ (poziom oznaczalności) - wartość RFU (relatywnych jednostek fluorescencji), przekroczenie której uważane jest za jednoznaczne potwierdzenie obecności fragmentu DNA wyznakowanego danym barwnikiem fluorescencyjnym w badanej próbce.

LOD (poziom wykrywalności) - najniższa wartość RFU, przekroczenie której uważane jest za potwierdzenie możliwości obecności fragmentu DNA wyznakowanego danym barwnikiem fluorescencyjnym w badanej próbce.

Wynik otrzymany przy progu wykrywalności zostaje uznany za wiarygodny przy jego potwierdzeniu w co najmniej dwóch z trzech powtórzeń amplifikacji.

ST (próg stochastyczny) - wartość RFU, powyżej której można założyć brak wypadania siostrzanego allela w dwuallelicznym *locus* (DYS385 i DYF387S1).

Wyniki przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Poziomy LOQ, LOD i ST.

LOQ	126 (B, G, R)
	148 (Y, P)
LOD	36 (B, R, P)
	48 (G, Y)
ST	560 dla LOQ
	465 dla LOD

3. Analiza mieszanin – określenie proporcji DNA żeńskiego i męskiego w mieszaninach, dla których może być oznaczony pełny profil składnika mniejszościowego.

Do reakcji amplifikacji zastosowano DNA Control 007 (frakcja męska ♂) i Control DNA 9947A (frakcja żeńska ♀) (ThermoFisher Scientific) w proporcjach przedstawionych w Tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Proporcje mieszanin DNA ♀ : ♂ do amplifikacji zestawem Yfiler Plus.

Frakcja żeńska	Frakcja męska
1	1
1	10
1	100
1	500
1	1000
1	2000
1	4000
1	8000

Tabela 6. Wyniki analizy mieszanin ♀ : ♂ po amplifikacji zestawem Yfiler Plus.

♀ : ♂	DYS576	DYS389I	DYS635	DYS389II	DYS627	DYS460	DYS458	DYS19	YGATAH4	DYS448	DYS391	DYS456	DYS390	DYS438	DYS392	DYS518	DYS570	DYS437	DYS385	DYS449	DYS393	DYS439	DYS481	DYF387S1	DYS533	
1 : 1	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 10	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 100	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 500	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 1000	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 2000	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 4000	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
1 : 8000	1	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	2	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								
	3	obecność allele/alleli frakcji męskiej																								



4. Porównanie zgodności i jakości profili DNA oznaczonych za pomocą zestawów Yfiler Plus i PowerPlex Y23.

Kryterium akceptacji:

Zgodność wyników badań genetycznych w zakresach odpowiadających *loci* walidowanego zestawu.

Badaniom poddano 10 śladów biologicznych zabezpieczonych z różnego rodzaju materiału biologicznego (krew płynna, plamy krwi, plamy śliny, plamy nasienia, włosy katagenowe, tkanka kostna). Uzyskane wyniki oceniono pod względem zgodności cech i jakości oznaczonych profili genetycznych w porównywalnych zakresach.

5. Badanie precyzji

Kryterium akceptacji:

Wartość trzykrotnego odchylenia standardowego średnich długości alleli nie powinna przekroczyć 0,5 bp.

Powtarzalność – stopień zgodności wyników kolejnych pomiarów dla tej samej próbki, w tym samym analizatorze, przy użyciu tych samych odczynników i w tych samych warunkach środowiskowych.

Do reakcji użyto drabinę alleli dołączoną do zestawu. Próbki poddano rozdzielowi elektroforetycznemu w ośmiu powtórzeniach. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wyliczając średnią arytmetyczną w bp dla każdego allela oraz odchylenie standardowe (SD) x 3. Wyniki przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Średnie długości alleli drabiny zestawu Yfiler Plus (elektroforeza powtórzona 8x).

Marker	allel	średnia	SD	Marker	allel	średnia	SD	Marker	allel	średnia	SD
DYS576	10	72,51	0,19	DYS635	17	171,25	0,16	DYS627	12	328,67	0,14
DYS576	11	76,73	0,15	DYS635	18	175,27	0,14	DYS627	13	332,57	0,17
DYS576	12	80,92	0,11	DYS635	19	179,32	0,15	DYS627	14	336,43	0,14
DYS576	13	85,01	0,09	DYS635	20	191,71	0,14	DYS627	15	340,29	0,19
DYS576	14	89,09	0,12	DYS635	21	195,76	0,13	DYS627	12	344,17	0,25
DYS576	15	93,16	0,12	DYS635	22	199,80	0,12	DYS627	13	348,08	0,18
DYS576	16	97,22	0,11	DYS635	23	203,79	0,11	DYS627	14	352,02	0,23
DYS576	17	101,33	0,03	DYS635	24	207,75	0,12	DYS627	15	356,00	0,27
DYS576	18	105,41	0,08	DYS635	25	211,72	0,15	DYS627	16	359,87	0,23
DYS576	19	109,45	0,10	DYS635	26	215,79	0,11	DYS627	17	363,62	0,25
DYS576	20	113,47	0,14	DYS635	27	219,83	0,16	DYS627	18	367,47	0,24
DYS576	21	117,35	0,13	DYS635	28	223,87	0,13	DYS627	16	371,34	0,25
DYS576	22	121,22	0,12	DYS635	29	227,72	0,14	DYS627	17	375,20	0,23
DYS576	23	125,11	0,14	DYS635	30	231,90	0,11	DYS627	18	379,04	0,23
DYS576	24	129,03	0,15	DYS389II	24	235,78	0,15	DYS460	7	79,47	0,12
DYS576	25	132,97	0,16	DYS389II	25	239,90	0,12	DYS460	8	83,66	0,09
DYS389I	9	146,86	0,11	DYS389II	26	244,01	0,11	DYS460	9	87,84	0,08
DYS389I	10	150,96	0,13	DYS389II	27	248,11	0,15	DYS460	10	92,03	0,15
DYS389I	11	154,98	0,15	DYS389II	28	252,10	0,10	DYS460	11	96,20	0,11
DYS389I	12	159,10	0,11	DYS389II	29	265,17	0,17	DYS460	12	100,33	0,14
DYS389I	13	163,32	0,10	DYS389II	30	269,25	0,08	DYS460	13	104,57	0,07
DYS389I	14	167,23	0,12	DYS389II	31	273,25	0,17	DYS460	14	108,72	0,08
DYS389I	15	72,51	0,19	DYS389II	32	277,37	0,10	DYS458	11	120,11	0,13
DYS389I	16	76,73	0,15	DYS389II	33	281,29	0,11	DYS458	12	123,95	0,16
DYS389I	17	80,92	0,11	DYS389II	34	285,18	0,12	DYS458	13	127,81	0,17
DYS635	15	85,01	0,09	DYS389II	35	289,32	0,12	DYS458	14	131,69	0,15
DYS635	16	89,09	0,12	DYS627	11	293,29	0,16	DYS458	15	135,60	0,11
DYS458	16	139,51	0,01	DYS518	34	340,45	0,14	DYS439	11	170,53	0,14
DYS458	17	143,46	0,05	DYS518	35	344,53	0,08	DYS439	12	174,54	0,09
DYS458	18	147,53	0,08	DYS518	36	348,62	0,14	DYS439	13	178,62	0,17
DYS458	19	151,61	0,11	DYS518	37	352,69	0,13	DYS439	14	182,70	0,11
DYS458	20	155,57	0,11	DYS518	38	356,77	0,17	DYS439	15	186,71	0,13
DYS458	21	159,49	0,01	DYS518	39	360,83	0,13	DYS439	16	190,75	0,12
DYS458	22	163,43	0,13	DYS518	40	364,85	0,19	DYS439	17	194,83	0,14
DYS458	23	167,38	0,11	DYS518	41	368,90	0,13	DYS481	17	206,94	0,11
DYS458	24	171,30	0,07	DYS518	42	372,89	0,14	DYS481	18	209,92	0,13
DYS19	9	183,99	0,17	DYS518	43	376,90	0,15	DYS481	19	212,88	0,13
DYS19	10	188,14	0,08	DYS518	44	380,94	0,12	DYS481	20	215,90	0,11
DYS19	11	192,21	0,08	DYS518	45	385,00	0,13	DYS481	21	218,96	0,14
DYS19	12	196,17	0,13	DYS518	46	389,07	0,13	DYS481	22	221,99	0,11
DYS19	13	200,24	0,16	DYS518	47	393,13	0,19	DYS481	23	225,01	0,13
DYS19	14	204,19	0,10	DYS518	48	397,17	0,19	DYS481	24	228,00	0,13
DYS19	15	208,17	0,11	DYS518	49	401,20	0,14	DYS481	25	231,05	0,11
DYS19	16	212,15	0,09	DYS570	10	97,96	0,10	DYS481	26	234,02	0,10
DYS19	17	216,19	0,13	DYS570	11	102,08	0,04	DYS481	27	237,03	0,10
DYS19	18	220,28	0,17	DYS570	12	106,20	0,11	DYS481	28	240,07	0,17

DYS19	19	224,29	0,13	DYS570	13	110,30	0,10	DYS481	29	243,13	0,11
YGATAH4	8	236,13	0,13	DYS570	14	114,35	0,09	DYS481	30	246,21	0,11
YGATAH4	9	240,12	0,12	DYS570	15	118,28	0,08	DYS481	31	249,27	0,14
YGATAH4	10	244,23	0,11	DYS570	16	122,16	0,16	DYS481	32	252,23	0,13
YGATAH4	11	248,32	0,15	DYS570	17	126,16	0,07	DYF387S1	30	264,72	0,17
YGATAH4	12	252,31	0,10	DYS570	18	130,13	0,12	DYF387S1	31	268,61	0,14
YGATAH4	13	256,25	0,13	DYS570	19	134,15	0,12	DYF387S1	32	272,50	0,17
YGATAH4	14	260,17	0,18	DYS570	20	138,18	0,13	DYF387S1	33	276,45	0,16
YGATAH4	15	264,19	0,17	DYS570	21	142,26	0,11	DYF387S1	34	280,34	0,20
DYS448	14	278,32	0,17	DYS570	22	146,35	0,04	DYF387S1	35	284,13	0,16
DYS448	15	284,26	0,19	DYS570	23	150,47	0,14	DYF387S1	36	287,96	0,20
DYS448	16	290,13	0,18	DYS570	24	154,56	0,13	DYF387S1	37	291,87	0,17
DYS448	17	296,04	0,19	DYS570	25	158,70	0,11	DYF387S1	38	295,63	0,14
DYS448	18	301,87	0,14	DYS570	26	162,77	0,13	DYF387S1	39	299,69	0,12
DYS448	19	307,72	0,13	DYS437	10	178,21	0,16	DYF387S1	40	303,39	0,15
DYS448	20	313,76	0,12	DYS437	11	182,22	0,15	DYF387S1	41	307,28	0,12
DYS448	21	319,96	0,19	DYS437	12	186,29	0,09	DYF387S1	42	311,16	0,11
DYS448	22	326,11	0,12	DYS437	13	190,22	0,11	DYF387S1	43	315,16	0,13
DYS448	23	332,06	0,12	DYS437	14	194,27	0,09	DYF387S1	44	319,17	0,19
DYS448	24	338,01	0,16	DYS437	15	198,43	0,11	DYS533	7	338,55	0,14
DYS391	5	353,38	0,15	DYS437	16	202,39	0,13	DYS533	8	342,60	0,21
DYS391	6	357,40	0,12	DYS437	17	206,32	0,11	DYS533	9	346,70	0,16
DYS391	7	361,35	0,17	DYS437	18	210,30	0,12	DYS533	10	350,75	0,17
DYS391	8	365,40	0,12	DYS385	6	225,10	0,14	DYS533	11	354,80	0,14
DYS391	9	369,38	0,14	DYS385	7	229,12	0,13	DYS533	12	358,88	0,18
DYS391	10	373,44	0,18	DYS385	8	233,23	0,08	DYS533	13	362,93	0,14
DYS391	11	377,43	0,14	DYS385	9	237,26	0,11	DYS533	14	366,92	0,12
DYS391	12	381,42	0,12	DYS385	10	241,31	0,03	DYS533	15	370,93	0,09
DYS391	13	385,52	0,14	DYS385	11	245,38	0,13	DYS533	16	374,98	0,18
DYS391	14	389,56	0,19	DYS385	12	249,58	0,11	DYS533	17	378,97	0,16
DYS391	15	393,60	0,12	DYS385	13	253,59	0,17				
DYS391	16	397,64	0,18	DYS385	14	257,52	0,13				
DYS456	10	76,17	0,13	DYS385	15	261,53	0,11				
DYS456	11	80,46	0,09	DYS385	16	265,54	0,12				
DYS456	12	84,66	0,09	DYS385	17	269,59	0,14				
DYS456	13	88,87	0,11	DYS385	18	273,60	0,21				
DYS456	14	93,06	0,12	DYS385	19	277,69	0,04				
DYS456	15	97,22	0,11	DYS385	20	281,71	0,13				
DYS456	16	101,32	1,14	DYS385	21	285,72	0,13				
DYS456	17	105,67	0,11	DYS385	22	289,68	0,16				
DYS456	18	109,83	0,10	DYS385	23	293,66	0,08				
DYS456	19	113,94	0,14	DYS385	24	297,63	0,15				
DYS456	20	117,91	0,08	DYS385	25	301,60	0,12				
DYS456	21	121,87	0,12	DYS385	26	305,58	0,12				
DYS390	22	125,87	0,07	DYS385	27	309,57	0,13				
DYS390	23	129,91	0,14	DYS385	28	313,61	0,18				
DYS390	24	133,95	0,13	DYS449	22	325,68	0,15				
DYS390	25	144,16	0,06	DYS449	23	329,76	0,11				
DYS390	26	148,05	0,11	DYS449	24	333,81	0,15				

DYS390	27	151,98	0,15	DYS449	25	337,83	0,08
DYS390	28	156,16	0,04	DYS449	26	341,86	0,03
DYS390	29	160,15	0,16	DYS449	27	345,93	0,10
DYS438	6	164,21	0,09	DYS449	28	349,97	0,17
DYS438	7	168,32	0,16	DYS449	29	354,06	0,16
DYS438	8	172,33	0,12	DYS449	30	358,09	0,16
DYS438	9	176,31	0,20	DYS449	31	362,14	0,16
DYS438	10	180,35	0,16	DYS449	32	366,14	0,17
DYS438	11	184,32	0,10	DYS449	33	370,19	0,13
DYS438	12	188,43	0,13	DYS449	34	374,18	0,13
DYS438	13	192,48	0,13	DYS449	35	378,18	0,17
DYS438	14	207,65	0,12	DYS449	36	382,21	0,18
DYS438	15	212,65	0,03	DYS449	37	386,25	0,15
DYS438	16	217,74	0,09	DYS449	38	390,31	0,15
DYS392	4	222,83	0,11	DYS449	39	394,35	0,13
DYS392	5	227,89	0,15	DYS449	40	398,37	0,19
DYS392	6	232,96	0,10	DYS393	7	90,25	0,13
DYS392	7	237,99	0,11	DYS393	8	94,26	0,11
DYS392	8	243,13	0,11	DYS393	9	98,43	0,10
DYS392	9	248,28	0,11	DYS393	10	102,58	0,09
DYS392	10	253,29	0,13	DYS393	11	106,84	0,08
DYS392	11	258,24	0,14	DYS393	12	110,77	0,11
DYS392	12	274,23	0,16	DYS393	13	114,80	0,12
DYS392	13	277,23	0,13	DYS393	14	118,69	0,13
DYS392	14	280,19	0,15	DYS393	15	122,51	0,08
DYS392	15	283,23	0,13	DYS393	16	126,58	0,17
DYS392	16	286,12	0,11	DYS393	17	130,54	0,10
DYS392	17	288,99	0,12	DYS393	18	134,53	0,12
DYS392	18	291,85	0,16	DYS439	6	150,21	0,11
DYS392	19	294,88	0,10	DYS439	7	154,27	0,12
DYS392	20	297,81	0,13	DYS439	8	158,38	0,02
DYS518	32	332,39	0,08	DYS439	9	162,44	0,14
DYS518	33	336,43	0,14	DYS439	10	166,58	0,10

Odtwarzalność – stopień zgodności wyników kolejnych pomiarów dla tej samej próbki, w tym samym analizatorze, przy użyciu tych samych odczynników i w różnych odstępach czasowych.

Do reakcji użyto drabinę alleli dołączoną do zestawu. Osiem próbek poddano trzy razy osobnym rozdziałom elektroforetycznym. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie wyliczając średnią arytmetyczną w bp dla każdego allela oraz odchylenie standardowe (SD) x 3. Wyniki przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Średnie długości alleli dla ośmiu próbek drabiny Yfiler Plus (elektroforeza powtórzona 3x).

Marker	Próbka 1		Próbka 2		Próbka 3		Próbka 4		Próbka 5		Próbka 6		Próbka 7		Próbka 8		
	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	średnia	SD	
DYS576	10	72,49	0,22	72,46	0,20	72,46	0,06	72,51	0,22	72,53	0,20	72,50	0,13	72,50	0,28	72,46	0,08
DYS576	11	76,71	0,05	76,70	0,05	76,69	0,03	76,71	0,20	76,73	0,19	76,73	0,23	76,73	0,19	76,73	0,05
DYS576	12	80,86	0,19	80,87	0,17	80,90	0,05	80,90	0,03	80,92	0,15	80,89	0,03	80,92	0,16	80,89	0,03
DYS576	13	84,98	0,13	84,94	0,18	85,00	0,11	85,02	0,16	85,03	0,14	84,99	0,09	84,99	0,13	84,99	0,16
DYS576	14	89,06	0,10	89,04	0,15	89,12	0,14	89,05	0,14	89,12	0,11	89,08	0,02	89,09	0,09	89,09	0,05
DYS576	15	93,14	0,22	93,14	0,09	93,20	0,23	93,14	0,27	93,15	0,08	93,11	0,06	93,15	0,11	93,15	0,15
DYS576	16	97,19	0,21	97,20	0,06	97,27	0,23	97,22	0,23	97,24	0,21	97,20	0,08	97,21	0,08	97,23	0,06
DYS576	17	101,27	0,22	101,28	0,22	101,31	0,05	101,32	0,05	101,31	0,06	101,28	0,22	101,31	0,05	101,30	0,05
DYS576	18	105,37	0,17	105,35	0,25	105,38	0,09	105,37	0,20	105,39	0,18	105,38	0,10	105,40	0,09	105,37	0,22
DYS576	19	109,40	0,15	109,40	0,24	109,38	0,17	109,41	0,09	109,42	0,22	109,43	0,12	109,45	0,09	109,43	0,15
DYS576	20	113,38	0,29	113,41	0,14	113,41	0,14	113,47	0,15	113,44	0,26	113,41	0,14	113,47	0,15	113,42	0,13
DYS576	21	117,28	0,21	117,31	0,24	117,29	0,17	117,35	0,18	117,32	0,25	117,31	0,24	117,33	0,17	117,34	0,22
DYS576	22	121,16	0,20	121,16	0,20	121,17	0,20	121,23	0,19	121,16	0,20	121,16	0,21	121,16	0,20	121,18	0,32
DYS576	23	125,01	0,14	125,06	0,20	125,09	0,18	125,09	0,21	125,06	0,18	125,07	0,22	125,05	0,21	125,07	0,35
DYS576	24	128,94	0,09	128,95	0,26	128,98	0,24	129,02	0,37	129,00	0,15	128,99	0,17	128,99	0,22	128,98	0,34
DYS576	25	132,89	0,26	132,88	0,11	132,92	0,33	132,93	0,36	132,89	0,17	132,90	0,17	132,92	0,28	132,93	0,35
DYS389I	9	146,83	0,09	146,89	0,15	146,84	0,05	146,89	0,10	146,83	0,09	146,88	0,11	146,88	0,13	146,91	0,11
DYS389I	10	150,95	0,06	150,99	0,16	150,93	0,05	150,97	0,03	150,92	0,12	150,97	0,12	150,97	0,12	151,00	0,08
DYS389I	11	155,00	0,14	155,05	0,00	154,95	0,05	154,99	0,17	154,96	0,03	154,99	0,15	154,99	0,15	155,01	0,05
DYS389I	12	159,13	0,16	159,10	0,03	159,10	0,03	159,12	0,21	159,10	0,03	159,10	0,03	159,10	0,03	159,10	0,02
DYS389I	13	163,32	0,18	163,33	0,14	163,31	0,03	163,31	0,05	163,29	0,05	163,29	0,05	163,29	0,08	163,36	0,08
DYS389I	14	167,27	0,15	167,26	0,20	167,22	0,06	167,23	0,09	167,19	0,08	167,22	0,11	167,28	0,16	167,24	0,03
DYS389I	15	171,27	0,21	171,27	0,20	171,26	0,10	171,26	0,24	171,23	0,08	171,24	0,08	171,29	0,23	171,31	0,06
DYS389I	16	175,31	0,16	175,29	0,20	175,30	0,19	175,27	0,19	175,26	0,05	175,26	0,05	175,30	0,30	175,29	0,12
DYS389I	17	179,33	0,20	179,30	0,03	179,29	0,02	179,30	0,03	179,30	0,03	179,30	0,03	179,30	0,29	179,37	0,18
DYS635	15	191,70	0,16	191,70	0,08	191,69	0,11	191,66	0,06	191,74	0,15	191,70	0,08	191,72	0,05	191,71	0,00
DYS635	16	195,76	0,00	195,74	0,05	195,74	0,05	195,72	0,03	195,78	0,16	195,74	0,05	195,75	0,03	195,77	0,17
DYS635	17	199,79	0,02	199,79	0,02	199,79	0,02	199,79	0,02	199,83	0,18	199,79	0,02	199,79	0,02	199,83	0,18

DYS635	18	203,78	0,14	203,74	0,20	203,76	0,05	203,77	0,16	203,79	0,13	203,74	0,20	203,76	0,05	203,79	0,11
DYS635	19	207,72	0,18	207,73	0,24	207,71	0,20	207,76	0,11	207,71	0,11	207,73	0,24	207,74	0,09	207,77	0,17
DYS635	20	211,68	0,20	211,68	0,28	211,70	0,08	211,73	0,20	211,72	0,10	211,71	0,11	211,71	0,09	211,74	0,11
DYS635	21	215,75	0,11	215,75	0,17	215,81	0,07	215,78	0,11	215,78	0,09	215,75	0,17	215,78	0,09	215,79	0,21
DYS635	22	219,79	0,02	219,79	0,00	219,82	0,18	219,79	0,30	219,82	0,17	219,79	0,00	219,79	0,02	219,76	0,17
DYS635	23	223,80	0,18	223,80	0,05	223,85	0,14	223,81	0,29	223,85	0,17	223,82	0,10	223,85	0,17	223,80	0,17
DYS635	24	227,64	0,03	227,70	0,08	227,71	0,10	227,70	0,11	227,75	0,18	227,69	0,15	227,72	0,11	227,66	0,18
DYS635	25	231,82	0,18	231,83	0,09	231,87	0,14	231,86	0,08	231,86	0,20	231,85	0,03	231,87	0,20	231,83	0,19
DYS635	26	235,72	0,17	235,70	0,11	235,72	0,18	235,74	0,20	235,78	0,20	235,77	0,10	235,75	0,05	235,71	0,20
DYS635	27	239,86	0,17	239,86	0,17	239,86	0,17	239,89	0,00	239,93	0,18	239,89	0,02	239,89	0,02	239,86	0,17
DYS635	28	243,98	0,14	244,00	0,16	243,97	0,05	244,01	0,20	244,00	0,16	244,00	0,16	243,99	0,12	243,96	0,15
DYS635	29	248,09	0,30	248,03	0,12	248,12	0,12	248,06	0,24	248,14	0,12	248,06	0,07	248,11	0,14	248,05	0,12
DYS635	30	252,09	0,06	252,03	0,23	252,10	0,07	252,08	0,26	252,10	0,07	252,10	0,07	252,09	0,10	252,08	0,07
DYS389II	24	265,19	0,18	265,19	0,08	265,15	0,15	265,22	0,05	265,21	0,15	265,15	0,16	265,19	0,06	265,19	0,10
DYS389II	25	269,27	0,08	269,25	0,14	269,28	0,12	269,27	0,06	269,25	0,06	269,25	0,20	269,25	0,18	269,26	0,06
DYS389II	26	273,25	0,31	273,25	0,14	273,21	0,12	273,26	0,23	273,28	0,05	273,22	0,14	273,25	0,10	273,24	0,06
DYS389II	27	277,36	0,26	277,35	0,08	277,38	0,11	277,41	0,14	277,39	0,14	277,38	0,12	277,38	0,11	277,38	0,08
DYS389II	28	281,32	0,13	281,29	0,05	281,26	0,15	281,33	0,13	281,29	0,05	281,29	0,06	281,28	0,03	281,27	0,06
DYS389II	29	285,15	0,22	285,20	0,02	285,14	0,17	285,21	0,05	285,18	0,07	285,16	0,07	285,17	0,05	285,17	0,17
DYS389II	30	289,34	0,18	289,33	0,03	289,31	0,11	289,35	0,09	289,33	0,20	289,28	0,02	289,34	0,20	289,35	0,15
DYS389II	31	293,28	0,30	293,26	0,06	293,24	0,12	293,28	0,12	293,28	0,11	293,31	0,07	293,28	0,17	293,32	0,12
DYS389II	32	297,13	0,15	297,11	0,18	297,11	0,18	297,11	0,15	297,13	0,15	297,12	0,12	297,10	0,11	297,19	0,08
DYS389II	33	301,13	0,15	301,11	0,14	301,11	0,13	301,08	0,05	301,10	0,10	301,07	0,05	301,09	0,12	301,15	0,03
DYS389II	34	304,90	0,18	304,95	0,09	304,93	0,15	304,92	0,02	304,94	0,14	304,94	0,19	304,88	0,15	304,88	0,09
DYS389II	35	308,99	0,00	309,03	0,12	309,06	0,05	309,03	0,02	309,05	0,16	309,03	0,20	308,94	0,18	309,00	0,16
DYS627	11	324,66	0,19	324,67	0,23	324,72	0,32	324,73	0,36	324,74	0,38	324,77	0,19	324,77	0,19	324,80	0,41
DYS627	12	328,59	0,27	328,56	0,21	328,62	0,29	328,65	0,37	328,66	0,17	328,66	0,17	328,66	0,17	328,67	0,51
DYS627	13	332,47	0,25	332,44	0,19	332,49	0,45	332,57	0,36	332,55	0,17	332,54	0,17	332,54	0,17	332,54	0,52
DYS627	14	336,33	0,22	336,32	0,21	336,38	0,42	336,36	0,38	336,39	0,37	336,37	0,33	336,41	0,41	336,43	0,42
DYS627	15	340,15	0,40	340,15	0,40	340,23	0,36	340,23	0,61	340,27	0,42	340,19	0,21	340,23	0,36	340,23	0,35
DYS627	16	344,02	0,16	344,08	0,33	344,12	0,37	344,14	0,35	344,19	0,59	344,11	0,42	344,15	0,20	344,13	0,27
DYS627	17	347,94	0,33	347,98	0,34	347,98	0,32	348,06	0,42	348,07	0,37	348,00	0,21	348,07	0,37	348,00	0,41
DYS627	18	351,90	0,28	351,89	0,44	351,93	0,49	351,98	0,45	352,00	0,56	351,94	0,42	352,00	0,27	351,91	0,36
DYS627	19	355,87	0,23	355,88	0,39	355,92	0,44	355,95	0,28	355,98	0,53	355,93	0,42	356,02	0,36	355,91	0,25
DYS627	20	359,73	0,19	359,76	0,35	359,81	0,38	359,80	0,40	359,85	0,52	359,81	0,38	359,81	0,38	359,81	0,39
DYS627	21	363,49	0,30	363,50	0,27	363,58	0,45	363,55	0,36	363,64	0,35	363,57	0,44	363,64	0,33	363,60	0,35
DYS627	22	367,33	0,24	367,36	0,19	367,44	0,39	367,41	0,33	367,49	0,33	367,42	0,37	367,47	0,29	367,40	0,33
DYS627	23	371,18	0,21	371,19	0,34	371,31	0,36	371,29	0,32	371,30	0,51	371,28	0,31	371,32	0,26	371,29	0,50
DYS627	24	375,04	0,17	375,06	0,31	375,06	0,31	375,13	0,50	375,16	0,50	375,11	0,43	375,13	0,40	375,14	0,32
DYS627	25	378,88	0,36	378,95	0,30	378,95	0,30	378,99	0,36	379,03	0,48	378,95	0,32	378,99	0,35	379,00	0,35
DYS627	26	382,79	0,34	382,81	0,33	382,80	0,31	382,82	0,33	382,91	0,34	382,88	0,30	382,87	0,27	382,88	0,33
DYS627	27	386,64	0,43	386,73	0,31	386,67	0,41	386,71	0,41	386,80	0,51	386,75	0,39	386,76	0,41	386,76	0,33
DYS460	7	79,55	0,02	79,48	0,17	79,48	0,17	79,48	0,17	79,51	0,17	79,52	0,17	79,48	0,17	79,49	0,18
DYS460	8	83,69	0,05	83,68	0,15	83,67	0,13	83,69	0,17	83,71	0,08	83,67	0,15	83,67	0,17	83,68	0,03
DYS460	9	87,89	0,11	87,86	0,17	87,87	0,11	87,89	0,17	87,89	0,12	87,84	0,18	87,88	0,09	87,89	0,17
DYS460	10	92,05	0,09	92,04	0,08	92,10	0,10	92,03	0,15	92,09	0,14	92,02	0,05	92,02	0,27	92,06	0,14
DYS460	11	96,21	0,05	96,22	0,16	96,26	0,12	96,20	0,14	96,23	0,15	96,16	0,10	96,23	0,14	96,24	0,03
DYS460	12	100,37	0,02	100,38	0,02	100,40	0,15	100,35	0,15	100,38	0,26	100,31	0,15	100,38	0,26	100,40	0,16
DYS460	13	104,57	0,10	104,60	0,10	104,60	0,08	104,58	0,23	104,58	0,05	104,57	0,15	104,59	0,11	104,60	0,12

DYS460	14	108,72	0,11	108,75	0,05	108,73	0,13	108,72	0,29	108,71	0,03	108,72	0,15	108,73	0,12	108,73	0,10
DYS458	11	120,06	0,16	120,06	0,16	120,06	0,16	120,12	0,17	120,06	0,16	120,09	0,00	120,06	0,16	120,09	0,27
DYS458	12	123,91	0,11	123,92	0,10	123,97	0,15	123,97	0,17	123,95	0,13	123,93	0,14	123,94	0,17	123,91	0,15
DYS458	13	127,73	0,08	127,76	0,08	127,82	0,15	127,83	0,17	127,79	0,11	127,78	0,14	127,77	0,17	127,77	0,31
DYS458	14	131,63	0,19	131,65	0,05	131,65	0,17	131,70	0,31	131,67	0,12	131,67	0,12	131,66	0,17	131,68	0,21
DYS458	15	135,54	0,15	135,54	0,23	135,58	0,14	135,57	0,16	135,52	0,17	135,57	0,29	135,55	0,29	135,56	0,18
DYS458	16	139,42	0,26	139,48	0,14	139,49	0,15	139,48	0,14	139,49	0,15	139,52	0,27	139,49	0,15	139,49	0,16
DYS458	17	143,36	0,27	143,37	0,26	143,40	0,17	143,39	0,26	143,39	0,30	143,40	0,28	143,40	0,29	143,40	0,10
DYS458	18	147,46	0,32	147,49	0,25	147,47	0,16	147,45	0,09	147,46	0,28	147,48	0,23	147,47	0,22	147,50	0,24
DYS458	19	151,55	0,30	151,59	0,23	151,53	0,29	151,58	0,05	151,51	0,20	151,61	0,28	151,57	0,20	151,59	0,26
DYS458	20	155,53	0,18	155,51	0,19	155,52	0,16	155,56	0,18	155,53	0,18	155,56	0,06	155,59	0,17	155,57	0,20
DYS458	21	159,43	0,32	159,46	0,16	159,43	0,31	159,46	0,16	159,47	0,15	159,46	0,17	159,46	0,17	159,47	0,16
DYS458	22	163,38	0,26	163,39	0,26	163,38	0,15	163,41	0,26	163,36	0,12	163,39	0,24	163,46	0,14	163,42	0,12
DYS458	23	167,30	0,22	167,33	0,28	167,32	0,24	167,33	0,21	167,32	0,30	167,36	0,12	167,38	0,16	167,38	0,14
DYS458	24	171,23	0,25	171,27	0,35	171,26	0,21	171,26	0,20	171,23	0,28	171,30	0,18	171,29	0,12	171,28	0,12
DYS19	9	184,01	0,02	183,98	0,17	184,00	0,12	184,00	0,16	183,99	0,15	183,95	0,13	183,98	0,21	184,03	0,18
DYS19	10	188,15	0,17	188,15	0,07	188,20	0,09	188,15	0,17	188,15	0,08	188,15	0,07	188,13	0,08	188,14	0,02
DYS19	11	192,24	0,02	192,21	0,07	192,24	0,09	192,17	0,07	192,22	0,06	192,21	0,07	192,20	0,17	192,22	0,02
DYS19	12	196,17	0,00	196,16	0,03	196,18	0,12	196,17	0,16	196,19	0,18	196,16	0,03	196,20	0,14	196,21	0,02
DYS19	13	200,27	0,17	200,23	0,17	200,30	0,02	200,27	0,17	200,30	0,00	200,23	0,17	200,27	0,17	200,27	0,17
DYS19	14	204,18	0,12	204,17	0,08	204,16	0,05	204,21	0,03	204,20	0,19	204,21	0,18	204,19	0,20	204,20	0,12
DYS19	15	208,15	0,09	208,17	0,10	208,15	0,11	208,17	0,12	208,15	0,06	208,17	0,10	208,15	0,08	208,21	0,09
DYS19	16	212,16	0,06	212,12	0,13	212,12	0,10	212,18	0,12	212,16	0,06	212,12	0,13	212,16	0,06	212,18	0,08
DYS19	17	216,17	0,09	216,17	0,17	216,19	0,15	216,20	0,11	216,17	0,09	216,17	0,17	216,17	0,09	216,17	0,11
DYS19	18	220,28	0,17	220,24	0,17	220,31	0,02	220,25	0,19	220,28	0,20	220,24	0,17	220,28	0,17	220,24	0,18
DYS19	19	224,28	0,02	224,25	0,19	224,30	0,03	224,26	0,18	224,30	0,06	224,27	0,15	224,30	0,05	224,25	0,06
YGATAH4	8	236,07	0,02	236,09	0,14	236,07	0,03	236,13	0,03	236,10	0,21	236,09	0,12	236,18	0,05	236,06	0,21
YGATAH4	9	240,07	0,19	240,11	0,00	240,11	0,00	240,11	0,00	240,11	0,00	240,15	0,19	240,11	0,00	240,11	0,00
YGATAH4	10	244,19	0,15	244,22	0,15	244,19	0,03	244,23	0,21	244,25	0,02	244,22	0,16	244,24	0,11	244,21	0,03
YGATAH4	11	248,35	0,12	248,24	0,11	248,33	0,14	248,27	0,26	248,35	0,12	248,28	0,06	248,28	0,05	248,26	0,12
YGATAH4	12	252,30	0,09	252,28	0,12	252,31	0,08	252,29	0,17	252,30	0,09	252,30	0,09	252,33	0,05	252,28	0,08
YGATAH4	13	256,26	0,21	256,23	0,14	256,28	0,17	256,24	0,23	256,28	0,18	256,21	0,05	256,22	0,03	256,25	0,05
YGATAH4	14	260,14	0,20	260,15	0,19	260,15	0,19	260,18	0,19	260,21	0,02	260,11	0,00	260,15	0,19	260,14	0,18
YGATAH4	15	264,16	0,16	264,18	0,20	264,14	0,16	264,21	0,17	264,21	0,06	264,15	0,17	264,18	0,19	264,20	0,14
DYS448	14	278,26	0,24	278,25	0,27	278,21	0,11	278,29	0,30	278,30	0,29	278,22	0,11	278,29	0,32	278,32	0,28
DYS448	15	284,18	0,17	284,16	0,34	284,17	0,16	284,20	0,19	284,22	0,33	284,19	0,21	284,24	0,31	284,21	0,38
DYS448	16	290,06	0,10	290,05	0,19	290,03	0,17	290,07	0,26	290,12	0,24	290,11	0,20	290,13	0,23	290,13	0,27
DYS448	17	295,98	0,33	295,96	0,36	295,91	0,19	295,95	0,32	296,01	0,18	295,97	0,30	295,99	0,06	296,02	0,33
DYS448	18	301,80	0,08	301,78	0,27	301,79	0,28	301,80	0,26	301,85	0,26	301,85	0,23	301,80	0,09	301,85	0,23
DYS448	19	307,64	0,14	307,64	0,23	307,66	0,30	307,74	0,32	307,70	0,28	307,71	0,13	307,66	0,21	307,70	0,15
DYS448	20	313,63	0,17	313,70	0,18	313,74	0,17	313,74	0,17	313,78	0,33	313,74	0,17	313,74	0,17	313,74	0,19
DYS448	21	319,84	0,19	319,88	0,35	319,88	0,35	319,92	0,21	319,92	0,21	319,96	0,21	319,96	0,21	319,92	0,40
DYS448	22	326,03	0,26	326,03	0,28	326,08	0,37	326,06	0,32	326,09	0,25	326,09	0,18	326,10	0,20	326,10	0,42
DYS448	23	332,01	0,23	331,99	0,19	332,07	0,23	332,03	0,17	332,06	0,34	332,05	0,06	332,05	0,08	332,06	0,45
DYS448	24	337,95	0,10	337,90	0,28	338,00	0,30	337,99	0,27	338,01	0,27	337,94	0,09	337,98	0,24	338,01	0,29
DYS391	5	353,32	0,14	353,32	0,30	353,40	0,13	353,38	0,18	353,35	0,23	353,33	0,26	353,35	0,24	353,32	0,24
DYS391	6	357,37	0,18	357,40	0,10	357,40	0,10	357,39	0,12	357,40	0,09	357,40	0,07	357,41	0,10	357,40	0,12
DYS391	7	361,30	0,23	361,31	0,22	361,35	0,25	361,31	0,24	361,34	0,27	361,31	0,22	361,30	0,24	361,29	0,24
DYS391	8	365,37	0,19	365,39	0,14	365,39	0,14	365,36	0,07	365,41	0,24	365,38	0,16	365,40	0,21	365,38	0,07

DYS391	9	369,37	0,13	369,37	0,08	369,37	0,08	369,39	0,15	369,41	0,08	369,35	0,11	369,36	0,17	369,38	0,23
DYS391	10	373,42	0,12	373,36	0,05	373,44	0,23	373,39	0,11	373,46	0,24	373,41	0,17	373,43	0,14	373,38	0,11
DYS391	11	377,40	0,09	377,39	0,11	377,40	0,11	377,39	0,08	377,44	0,24	377,40	0,11	377,41	0,10	377,36	0,23
DYS391	12	381,41	0,06	381,38	0,20	381,38	0,19	381,35	0,24	381,41	0,06	381,38	0,17	381,41	0,06	381,39	0,06
DYS391	13	385,46	0,08	385,50	0,08	385,48	0,00	385,48	0,23	385,51	0,29	385,48	0,12	385,46	0,05	385,48	0,27
DYS391	14	389,56	0,18	389,58	0,11	389,52	0,17	389,50	0,03	389,56	0,31	389,52	0,11	389,52	0,08	389,53	0,11
DYS391	15	393,51	0,14	393,55	0,15	393,56	0,18	393,56	0,14	393,55	0,26	393,56	0,25	393,55	0,23	393,54	0,14
DYS391	16	397,58	0,11	397,65	0,17	397,57	0,10	397,56	0,10	397,62	0,26	397,66	0,28	397,58	0,09	397,61	0,09
DYS456	10	76,17	0,03	76,15	0,03	76,17	0,16	76,17	0,14	76,19	0,19	76,16	0,06	76,12	0,14	76,16	0,12
DYS456	11	80,45	0,02	80,45	0,02	80,48	0,13	80,45	0,02	80,51	0,15	80,48	0,17	80,48	0,14	80,48	0,14
DYS456	12	84,68	0,03	84,70	0,03	84,70	0,11	84,69	0,15	84,69	0,06	84,66	0,14	84,69	0,05	84,69	0,16
DYS456	13	88,88	0,10	88,89	0,05	88,90	0,10	88,89	0,14	88,88	0,09	88,87	0,15	88,88	0,07	88,91	0,05
DYS456	14	93,08	0,08	93,07	0,11	93,14	0,09	93,08	0,23	93,09	0,11	93,08	0,11	93,09	0,08	93,12	0,08
DYS456	15	97,25	0,11	97,23	0,11	97,30	0,08	97,25	0,18	97,27	0,17	97,23	0,11	97,27	0,17	97,29	0,15
DYS456	16	101,46	0,12	101,44	0,10	101,49	0,05	101,48	0,12	101,12	1,91	101,44	0,10	101,47	0,11	101,48	0,06
DYS456	17	105,65	0,18	105,66	0,11	105,66	0,09	105,65	0,08	105,70	0,05	105,63	0,06	105,69	0,18	105,68	0,08
DYS456	18	109,80	0,03	109,84	0,16	109,79	0,03	109,82	0,11	109,82	0,10	109,81	0,13	109,85	0,11	109,83	0,06
DYS456	19	113,91	0,00	113,94	0,16	113,91	0,00	113,97	0,16	113,94	0,16	113,91	0,00	113,97	0,16	113,94	0,16
DYS456	20	117,89	0,10	117,92	0,05	117,90	0,10	117,93	0,14	117,89	0,10	117,92	0,05	117,90	0,05	117,91	0,09
DYS456	21	121,89	0,11	121,86	0,10	121,90	0,12	121,90	0,15	121,86	0,10	121,87	0,09	121,83	0,08	121,91	0,08
DYS456	22	125,88	0,08	125,86	0,12	125,89	0,15	125,89	0,08	125,83	0,05	125,87	0,08	125,82	0,09	125,87	0,09
DYS456	23	129,88	0,13	129,86	0,02	129,92	0,14	129,93	0,11	129,88	0,06	129,87	0,10	129,87	0,09	129,90	0,14
DYS456	24	133,89	0,03	133,95	0,06	133,96	0,09	133,94	0,12	133,90	0,11	133,95	0,22	133,89	0,15	133,96	0,13
DYS390	17	144,14	0,05	144,16	0,03	144,18	0,17	144,18	0,03	144,14	0,03	144,19	0,11	144,15	0,05	144,21	0,06
DYS390	18	148,05	0,20	148,08	0,17	148,06	0,18	148,08	0,07	148,05	0,22	148,07	0,09	148,07	0,11	148,08	0,09
DYS390	19	152,01	0,11	152,05	0,10	151,96	0,18	152,01	0,10	151,98	0,15	151,97	0,08	151,97	0,10	152,05	0,10
DYS390	20	156,19	0,15	156,18	0,12	156,15	0,00	156,16	0,12	156,13	0,15	156,19	0,11	156,19	0,11	156,23	0,12
DYS390	21	160,20	0,02	160,20	0,02	160,13	0,17	160,17	0,17	160,13	0,16	160,16	0,17	160,16	0,17	160,23	0,16
DYS390	22	164,27	0,06	164,25	0,16	164,20	0,02	164,24	0,18	164,21	0,18	164,25	0,16	164,21	0,21	164,27	0,22
DYS390	23	168,36	0,14	168,35	0,14	168,32	0,06	168,33	0,31	168,32	0,20	168,35	0,14	168,33	0,15	168,39	0,16
DYS390	24	172,36	0,18	172,37	0,15	172,33	0,14	172,33	0,15	172,30	0,10	172,37	0,15	172,35	0,19	172,39	0,05
DYS390	25	176,37	0,24	176,33	0,20	176,34	0,06	176,34	0,29	176,29	0,16	176,29	0,16	176,33	0,11	176,37	0,11
DYS390	26	180,34	0,16	180,34	0,16	180,41	0,02	180,34	0,16	180,34	0,16	180,34	0,16	180,37	0,17	180,40	0,29
DYS390	27	184,35	0,17	184,36	0,19	184,34	0,06	184,31	0,16	184,33	0,05	184,32	0,03	184,35	0,20	184,40	0,16
DYS390	28	188,46	0,16	188,42	0,14	188,48	0,11	188,43	0,20	188,46	0,08	188,42	0,14	188,44	0,06	188,48	0,14
DYS390	29	192,48	0,15	192,49	0,10	192,52	0,17	192,51	0,14	192,49	0,11	192,45	0,14	192,51	0,27	192,52	0,03
DYS438	6	207,62	0,18	207,62	0,24	207,61	0,20	207,66	0,11	207,61	0,10	207,66	0,32	207,64	0,09	207,67	0,17
DYS438	7	212,64	0,12	212,63	0,13	212,63	0,12	212,62	0,11	212,63	0,11	212,63	0,13	212,67	0,06	212,65	0,13
DYS438	8	217,71	0,09	217,68	0,00	217,72	0,10	217,71	0,27	217,75	0,09	217,75	0,17	217,75	0,09	217,72	0,18
DYS438	9	222,80	0,12	222,78	0,14	222,81	0,11	222,76	0,25	222,81	0,14	222,81	0,09	222,81	0,14	222,77	0,12
DYS438	10	227,85	0,03	227,84	0,10	227,86	0,14	227,84	0,26	227,85	0,20	227,83	0,03	227,89	0,09	227,86	0,20
DYS438	11	232,90	0,05	232,92	0,15	232,92	0,18	232,91	0,11	232,91	0,24	232,90	0,09	232,99	0,11	232,87	0,23
DYS438	12	237,97	0,10	237,95	0,06	237,96	0,09	237,94	0,10	237,96	0,10	237,99	0,21	237,96	0,11	237,98	0,10
DYS438	13	243,07	0,27	243,14	0,12	243,06	0,11	243,11	0,13	243,14	0,12	243,10	0,17	243,13	0,09	243,10	0,11
DYS438	14	248,27	0,26	248,24	0,11	248,30	0,17	248,23	0,11	248,24	0,11	248,24	0,11	248,28	0,05	248,26	0,12
DYS438	15	253,31	0,28	253,26	0,15	253,32	0,17	253,28	0,12	253,32	0,17	253,25	0,12	253,27	0,02	253,28	0,17
DYS438	16	258,27	0,13	258,18	0,09	258,27	0,15	258,21	0,26	258,26	0,17	258,19	0,10	258,20	0,07	258,21	0,10
DYS392	4	274,15	0,14	274,20	0,27	274,16	0,14	274,24	0,15	274,21	0,20	274,16	0,14	274,23	0,35	274,21	0,30
DYS392	5	277,18	0,22	277,17	0,23	277,13	0,08	277,19	0,26	277,18	0,18	277,17	0,20	277,20	0,26	277,21	0,18

DYS392	6	280,15	0,19	280,15	0,38	280,15	0,19	280,18	0,19	280,18	0,18	280,15	0,19	280,18	0,18	280,17	0,19
DYS392	7	283,15	0,30	283,20	0,30	283,16	0,26	283,20	0,33	283,22	0,12	283,18	0,12	283,21	0,11	283,18	0,14
DYS392	8	286,05	0,09	286,03	0,23	286,04	0,26	286,07	0,11	286,08	0,27	286,06	0,14	286,10	0,19	286,05	0,27
DYS392	9	288,95	0,21	288,94	0,34	288,95	0,12	288,99	0,21	288,94	0,21	288,92	0,14	288,95	0,21	288,96	0,23
DYS392	10	291,78	0,17	291,78	0,26	291,76	0,23	291,80	0,33	291,77	0,15	291,76	0,09	291,81	0,21	291,83	0,34
DYS392	11	294,83	0,14	294,84	0,18	294,83	0,17	294,83	0,16	294,82	0,15	294,81	0,10	294,85	0,16	294,85	0,29
DYS392	12	297,74	0,23	297,73	0,26	297,76	0,28	297,76	0,29	297,81	0,10	297,73	0,23	297,78	0,14	297,80	0,29
DYS392	13	300,67	0,21	300,68	0,19	300,68	0,19	300,68	0,20	300,67	0,20	300,67	0,20	300,63	0,03	300,70	0,20
DYS392	14	303,47	0,18	303,50	0,10	303,48	0,29	303,50	0,29	303,53	0,22	303,50	0,18	303,48	0,13	303,54	0,28
DYS392	15	306,49	0,25	306,51	0,18	306,49	0,32	306,53	0,28	306,53	0,32	306,51	0,10	306,47	0,15	306,52	0,11
DYS392	16	309,46	0,20	309,51	0,31	309,50	0,32	309,55	0,22	309,56	0,36	309,51	0,03	309,45	0,15	309,51	0,17
DYS392	17	312,40	0,14	312,43	0,26	312,47	0,30	312,50	0,12	312,47	0,32	312,47	0,33	312,40	0,13	312,42	0,13
DYS392	18	315,47	0,24	315,51	0,05	315,47	0,24	315,55	0,24	315,54	0,43	315,51	0,05	315,47	0,24	315,50	0,10
DYS392	19	318,59	0,05	318,63	0,19	318,67	0,16	318,67	0,16	318,68	0,19	318,67	0,16	318,67	0,16	318,64	0,31
DYS392	20	321,71	0,08	321,71	0,07	321,75	0,23	321,76	0,26	321,74	0,26	321,78	0,27	321,71	0,07	321,77	0,28
DYS518	32	332,43	0,17	332,41	0,19	332,41	0,11	332,42	0,10	332,36	0,06	332,39	0,08	332,35	0,11	332,39	0,13
DYS518	33	336,45	0,15	336,43	0,19	336,45	0,05	336,44	0,05	336,47	0,02	336,40	0,18	336,41	0,17	336,42	0,09
DYS518	34	340,50	0,19	340,46	0,03	340,46	0,03	340,47	0,02	340,46	0,03	340,42	0,19	340,42	0,19	340,41	0,19
DYS518	35	344,55	0,23	344,55	0,02	344,55	0,02	344,57	0,05	344,53	0,03	344,53	0,03	344,53	0,06	344,54	0,17
DYS518	36	348,63	0,24	348,63	0,05	348,64	0,05	348,63	0,14	348,61	0,08	348,62	0,05	348,61	0,08	348,60	0,22
DYS518	37	352,71	0,29	352,70	0,27	352,74	0,08	352,72	0,07	352,69	0,11	352,71	0,05	352,69	0,12	352,67	0,03
DYS518	38	356,75	0,12	356,77	0,18	356,81	0,09	356,80	0,09	356,79	0,15	356,78	0,19	356,79	0,15	356,79	0,15
DYS518	39	360,84	0,16	360,88	0,17	360,88	0,17	360,85	0,17	360,88	0,19	360,84	0,20	360,84	0,16	360,83	0,16
DYS518	40	364,87	0,32	364,85	0,14	364,89	0,09	364,86	0,24	364,87	0,05	364,84	0,19	364,86	0,02	364,85	0,19
DYS518	41	368,91	0,15	368,94	0,16	368,91	0,05	368,88	0,09	368,95	0,09	368,89	0,11	368,89	0,22	368,84	0,09
DYS518	42	372,88	0,15	372,93	0,19	372,93	0,19	372,88	0,12	372,92	0,12	372,87	0,10	372,90	0,09	372,89	0,12
DYS518	43	376,98	0,14	376,92	0,26	376,93	0,26	376,88	0,17	376,90	0,16	376,93	0,30	376,87	0,14	376,90	0,14
DYS518	44	380,98	0,16	380,99	0,17	380,98	0,17	380,91	0,19	380,95	0,05	380,94	0,30	380,94	0,03	380,93	0,03
DYS518	45	385,03	0,17	385,06	0,21	385,00	0,02	385,00	0,21	384,99	0,08	385,01	0,27	384,99	0,03	384,97	0,18
DYS518	46	389,12	0,13	389,15	0,24	389,04	0,24	389,05	0,25	389,05	0,12	389,04	0,11	389,05	0,08	389,06	0,09
DYS518	47	393,15	0,12	393,19	0,15	393,12	0,26	393,12	0,10	393,11	0,15	393,13	0,06	393,07	0,15	393,08	0,14
DYS518	48	397,18	0,15	397,21	0,29	397,13	0,12	397,12	0,11	397,19	0,18	397,22	0,05	397,15	0,14	397,14	0,08
DYS518	49	401,21	0,15	401,25	0,18	401,21	0,12	401,21	0,15	401,17	0,08	401,21	0,20	401,17	0,08	401,15	0,05
DYS570	10	97,98	0,08	97,97	0,08	98,03	0,09	97,96	0,08	97,98	0,09	97,97	0,08	97,97	0,08	97,99	0,08
DYS570	11	102,08	0,08	102,10	0,08	102,12	0,12	102,10	0,11	102,12	0,11	102,10	0,08	102,10	0,12	102,10	0,14
DYS570	12	106,21	0,10	106,26	0,10	106,22	0,18	106,22	0,03	106,19	0,10	106,19	0,08	106,22	0,22	106,23	0,18
DYS570	13	110,27	0,03	110,34	0,03	110,28	0,12	110,29	0,10	110,29	0,11	110,30	0,14	110,32	0,10	110,32	0,15
DYS570	14	114,36	0,00	114,36	0,00	114,31	0,14	114,34	0,15	114,33	0,16	114,36	0,00	114,33	0,15	114,36	0,02
DYS570	15	118,28	0,05	118,28	0,05	118,26	0,10	118,30	0,14	118,28	0,05	118,28	0,05	118,26	0,05	118,27	0,09
DYS570	16	122,16	0,12	122,17	0,12	122,21	0,09	122,21	0,08	122,14	0,09	122,14	0,07	122,13	0,07	122,18	0,08
DYS570	17	126,15	0,06	126,15	0,12	126,17	0,12	126,18	0,08	126,14	0,11	126,16	0,06	126,10	0,11	126,14	0,11
DYS570	18	130,10	0,02	130,14	0,00	130,17	0,05	130,15	0,11	130,10	0,15	130,13	0,07	130,11	0,08	130,15	0,12
DYS570	19	134,15	0,12	134,15	0,05	134,19	0,11	134,13	0,12	134,13	0,08	134,17	0,08	134,12	0,05	134,15	0,13
DYS570	20	138,14	0,09	138,20	0,12	138,20	0,12	138,17	0,06	138,17	0,08	138,16	0,10	138,13	0,11	138,16	0,10
DYS570	21	142,25	0,10	142,26	0,07	142,25	0,22	142,23	0,15	142,18	0,10	142,25	0,06	142,25	0,06	142,23	0,06
DYS570	22	146,34	0,09	146,36	0,12	146,35	0,08	146,36	0,05	146,34	0,11	146,35	0,15	146,32	0,05	146,36	0,03
DYS570	23	150,49	0,11	150,49	0,17	150,44	0,08	150,48	0,02	150,43	0,14	150,48	0,14	150,48	0,14	150,50	0,06
DYS570	24	154,60	0,14	154,61	0,17	154,55	0,07	154,59	0,17	154,56	0,06	154,59	0,16	154,59	0,17	154,61	0,05
DYS570	25	158,73	0,14	158,72	0,23	158,69	0,05	158,72	0,21	158,69	0,05	158,69	0,05	158,69	0,05	158,71	0,03

DYS570	26	162,79	0,11	162,80	0,06	162,78	0,13	162,78	0,20	162,70	0,06	162,80	0,06	162,79	0,09	162,80	0,11
DYS437	10	178,17	0,12	178,16	0,11	178,15	0,11	178,16	0,10	178,16	0,11	178,16	0,11	178,20	0,29	178,25	0,14
DYS437	11	182,17	0,07	182,21	0,14	182,25	0,06	182,22	0,14	182,25	0,10	182,21	0,14	182,21	0,17	182,25	0,07
DYS437	12	186,25	0,10	186,27	0,09	186,28	0,05	186,26	0,12	186,27	0,11	186,27	0,09	186,26	0,05	186,29	0,10
DYS437	13	190,20	0,08	190,20	0,09	190,22	0,09	190,18	0,15	190,20	0,10	190,20	0,09	190,18	0,02	190,23	0,15
DYS437	14	194,26	0,15	194,24	0,11	194,26	0,17	194,24	0,14	194,27	0,14	194,27	0,14	194,28	0,21	194,25	0,10
DYS437	15	198,39	0,17	198,42	0,11	198,42	0,13	198,41	0,11	198,42	0,11	198,42	0,11	198,42	0,11	198,44	0,10
DYS437	16	202,37	0,15	202,36	0,26	202,41	0,11	202,41	0,15	202,42	0,10	202,36	0,26	202,41	0,09	202,39	0,06
DYS437	17	206,30	0,16	206,30	0,18	206,29	0,14	206,32	0,11	206,32	0,23	206,34	0,26	206,35	0,20	206,37	0,14
DYS437	18	210,29	0,08	210,25	0,23	210,27	0,03	210,32	0,20	210,32	0,22	210,31	0,18	210,28	0,05	210,33	0,09
DYS385	6	225,15	0,13	225,12	0,35	225,17	0,15	225,07	0,03	225,10	0,25	225,07	0,21	225,10	0,11	225,07	0,08
DYS385	7	229,14	0,14	229,10	0,17	229,18	0,20	229,11	0,05	229,14	0,14	229,12	0,11	229,11	0,08	229,10	0,08
DYS385	8	233,24	0,12	233,24	0,17	233,23	0,12	233,23	0,24	233,23	0,09	233,25	0,12	233,23	0,08	233,22	0,15
DYS385	9	237,26	0,12	237,28	0,16	237,26	0,11	237,23	0,10	237,26	0,10	237,29	0,12	237,26	0,10	237,25	0,07
DYS385	10	241,34	0,13	241,34	0,14	241,35	0,14	241,34	0,13	241,34	0,14	241,34	0,14	241,33	0,16	241,32	0,14
DYS385	11	245,42	0,09	245,40	0,18	245,43	0,17	245,38	0,15	245,36	0,17	245,40	0,19	245,38	0,17	245,38	0,03
DYS385	12	249,61	0,17	249,57	0,02	249,60	0,21	249,53	0,19	249,57	0,02	249,54	0,20	249,57	0,33	249,57	0,02
DYS385	13	253,66	0,12	253,57	0,16	253,60	0,05	253,56	0,17	253,60	0,06	253,59	0,05	253,54	0,19	253,56	0,05
DYS385	14	257,58	0,20	257,55	0,08	257,57	0,25	257,57	0,10	257,57	0,25	257,50	0,09	257,50	0,15	257,56	0,17
DYS385	15	261,56	0,17	261,54	0,11	261,53	0,12	261,55	0,11	261,53	0,11	261,53	0,12	261,50	0,08	261,55	0,14
DYS385	16	265,58	0,34	265,55	0,15	265,54	0,16	265,58	0,15	265,56	0,09	265,54	0,15	265,54	0,12	265,57	0,27
DYS385	17	269,62	0,20	269,65	0,11	269,60	0,11	269,63	0,18	269,61	0,21	269,57	0,18	269,61	0,10	269,58	0,03
DYS385	18	273,65	0,23	273,62	0,21	273,57	0,28	273,66	0,11	273,60	0,05	273,58	0,28	273,61	0,15	273,60	0,13
DYS385	19	277,69	0,24	277,71	0,10	277,71	0,11	277,70	0,11	277,72	0,12	277,71	0,11	277,71	0,09	277,71	0,09
DYS385	20	281,75	0,11	281,72	0,06	281,72	0,26	281,76	0,11	281,75	0,11	281,72	0,23	281,75	0,14	281,70	0,08
DYS385	21	285,76	0,14	285,74	0,03	285,71	0,13	285,75	0,08	285,76	0,15	285,73	0,20	285,74	0,19	285,73	0,12
DYS385	22	289,77	0,18	289,69	0,20	289,67	0,27	289,71	0,17	289,66	0,20	289,68	0,20	289,70	0,09	289,70	0,09
DYS385	23	293,68	0,20	293,69	0,06	293,68	0,11	293,64	0,21	293,64	0,12	293,63	0,08	293,63	0,06	293,68	0,08
DYS385	24	297,70	0,24	297,65	0,17	297,61	0,10	297,61	0,10	297,63	0,11	297,66	0,14	297,64	0,08	297,65	0,10
DYS385	25	301,62	0,12	301,64	0,12	301,64	0,10	301,58	0,17	301,60	0,23	301,57	0,17	301,56	0,30	301,60	0,15
DYS385	26	305,58	0,29	305,60	0,06	305,58	0,12	305,58	0,05	305,55	0,05	305,60	0,18	305,53	0,14	305,52	0,09
DYS385	27	309,57	0,17	309,58	0,11	309,61	0,03	309,59	0,03	309,52	0,03	309,58	0,19	309,49	0,16	309,54	0,16
DYS385	28	313,59	0,21	313,63	0,20	313,66	0,02	313,63	0,20	313,63	0,17	313,63	0,20	313,55	0,02	313,56	0,02
DYS449	22	325,68	0,13	325,69	0,18	325,71	0,15	325,68	0,11	325,68	0,22	325,72	0,06	325,68	0,15	325,69	0,26
DYS449	23	329,79	0,11	329,77	0,14	329,76	0,08	329,75	0,11	329,76	0,17	329,79	0,12	329,75	0,18	329,79	0,23
DYS449	24	333,86	0,23	333,80	0,17	333,81	0,12	333,78	0,07	333,83	0,05	333,82	0,11	333,78	0,12	333,80	0,22
DYS449	25	337,87	0,11	337,82	0,09	337,85	0,11	337,80	0,06	337,82	0,06	337,79	0,15	337,79	0,15	337,82	0,18
DYS449	26	341,87	0,12	341,85	0,07	341,85	0,07	341,85	0,06	341,88	0,11	341,84	0,09	341,88	0,11	341,89	0,14
DYS449	27	345,94	0,16	345,93	0,06	345,94	0,05	345,96	0,05	345,91	0,08	345,92	0,10	345,92	0,09	345,91	0,10
DYS449	28	350,01	0,21	349,99	0,21	350,03	0,02	350,00	0,11	349,99	0,10	349,97	0,18	349,99	0,12	349,97	0,18
DYS449	29	354,06	0,03	354,02	0,05	354,06	0,19	354,11	0,05	354,08	0,12	354,03	0,09	354,08	0,12	354,04	0,08
DYS449	30	358,10	0,25	358,09	0,25	358,13	0,07	358,13	0,06	358,14	0,08	358,10	0,10	358,14	0,08	358,09	0,14
DYS449	31	362,18	0,26	362,15	0,15	362,16	0,14	362,12	0,11	362,19	0,10	362,15	0,17	362,14	0,18	362,16	0,11
DYS449	32	366,18	0,14	366,16	0,26	366,20	0,18	366,18	0,09	366,18	0,14	366,11	0,17	366,17	0,16	366,15	0,12
DYS449	33	370,18	0,10	370,22	0,10	370,22	0,10	370,16	0,12	370,22	0,10	370,16	0,10	370,20	0,00	370,18	0,10
DYS449	34	374,15	0,09	374,21	0,15	374,21	0,15	374,16	0,14	374,19	0,12	374,14	0,06	374,17	0,03	374,15	0,14
DYS449	35	378,18	0,29	378,21	0,23	378,21	0,23	378,17	0,17	378,18	0,17	378,14	0,06	378,14	0,07	378,16	0,08
DYS449	36	382,20	0,17	382,25	0,30	382,20	0,18	382,18	0,12	382,20	0,21	382,17	0,08	382,20	0,17	382,21	0,11
DYS449	37	386,25	0,14	386,25	0,15	386,27	0,19	386,27	0,16	386,25	0,26	386,28	0,14	386,25	0,14	386,25	0,14

DYS449	38	390,31	0,10	390,33	0,21	390,30	0,20	390,29	0,21	390,35	0,13	390,31	0,08	390,31	0,12	390,27	0,17
DYS449	39	394,38	0,07	394,42	0,23	394,31	0,24	394,32	0,03	394,34	0,22	394,36	0,12	394,34	0,20	394,33	0,08
DYS449	40	398,41	0,14	398,41	0,26	398,33	0,09	398,32	0,09	398,38	0,18	398,41	0,13	398,34	0,09	398,35	0,07
DYS393	7	90,27	0,08	90,25	0,07	90,30	0,09	90,27	0,11	90,33	0,06	90,26	0,21	90,27	0,15	90,32	0,08
DYS393	8	94,30	0,08	94,27	0,08	94,36	0,08	94,30	0,24	94,34	0,23	94,27	0,08	94,31	0,20	94,33	0,08
DYS393	9	98,44	0,06	98,43	0,06	98,49	0,11	98,45	0,17	98,50	0,20	98,43	0,06	98,49	0,19	98,51	0,20
DYS393	10	102,58	0,11	102,57	0,06	102,61	0,08	102,58	0,11	102,62	0,14	102,57	0,06	102,60	0,08	102,63	0,06
DYS393	11	106,83	0,12	106,85	0,08	106,84	0,09	106,87	0,03	106,84	0,07	106,82	0,10	106,87	0,19	106,88	0,15
DYS393	12	110,73	0,05	110,80	0,05	110,75	0,11	110,75	0,10	110,79	0,10	110,77	0,13	110,78	0,09	110,81	0,19
DYS393	13	114,76	0,17	114,82	0,02	114,76	0,12	114,79	0,14	114,79	0,15	114,79	0,15	114,78	0,14	114,81	0,05
DYS393	14	118,68	0,14	118,68	0,14	118,69	0,09	118,72	0,07	118,68	0,14	118,65	0,03	118,68	0,14	118,72	0,11
DYS393	15	122,50	0,06	122,50	0,08	122,52	0,06	122,52	0,06	122,50	0,07	122,51	0,05	122,47	0,10	122,54	0,11
DYS393	16	126,52	0,08	126,55	0,06	126,58	0,06	126,58	0,20	126,58	0,08	126,56	0,11	126,57	0,12	126,61	0,12
DYS393	17	130,47	0,02	130,52	0,02	130,56	0,03	130,56	0,08	130,53	0,07	130,53	0,10	130,52	0,12	130,53	0,13
DYS393	18	134,49	0,12	134,53	0,06	134,56	0,09	134,52	0,13	134,51	0,08	134,55	0,09	134,50	0,05	134,53	0,15
DYS439	6	150,16	0,25	150,20	0,17	150,14	0,23	150,18	0,00	150,13	0,15	150,18	0,15	150,18	0,15	150,21	0,25
DYS439	7	154,23	0,14	154,28	0,15	154,22	0,09	154,28	0,14	154,23	0,12	154,26	0,03	154,29	0,13	154,28	0,19
DYS439	8	158,36	0,11	158,36	0,12	158,36	0,10	158,41	0,15	158,36	0,11	158,36	0,13	158,39	0,05	158,41	0,06
DYS439	9	162,43	0,23	162,43	0,14	162,38	0,11	162,45	0,14	162,37	0,10	162,47	0,10	162,47	0,11	162,44	0,09
DYS439	10	166,55	0,06	166,57	0,08	166,53	0,21	166,57	0,11	166,53	0,26	166,56	0,08	166,56	0,11	166,59	0,11
DYS439	11	170,50	0,17	170,51	0,17	170,49	0,26	170,49	0,08	170,47	0,10	170,51	0,17	170,49	0,10	170,55	0,17
DYS439	12	174,51	0,15	174,53	0,14	174,50	0,15	174,53	0,06	174,52	0,14	174,53	0,12	174,54	0,14	174,56	0,10
DYS439	13	178,60	0,05	178,60	0,26	178,62	0,29	178,62	0,17	178,56	0,11	178,60	0,26	178,63	0,12	178,65	0,14
DYS439	14	182,65	0,12	182,66	0,10	182,66	0,08	182,67	0,10	182,66	0,11	182,66	0,10	182,69	0,23	182,68	0,15
DYS439	15	186,66	0,12	186,68	0,09	186,70	0,06	186,68	0,11	186,68	0,11	186,68	0,09	186,70	0,23	186,69	0,12
DYS439	16	190,74	0,15	190,74	0,18	190,77	0,10	190,73	0,08	190,75	0,18	190,74	0,18	190,76	0,19	190,77	0,12
DYS439	17	194,81	0,12	194,79	0,15	194,81	0,05	194,79	0,05	194,82	0,27	194,79	0,15	194,83	0,02	194,85	0,14
DYS481	17	206,94	0,11	206,91	0,21	206,94	0,10	206,94	0,11	206,93	0,11	206,95	0,28	206,93	0,11	206,94	0,06
DYS481	18	209,88	0,07	209,90	0,18	209,89	0,15	209,92	0,18	209,88	0,03	209,90	0,18	209,91	0,16	209,92	0,07
DYS481	19	212,87	0,05	212,84	0,15	212,86	0,05	212,90	0,14	212,87	0,05	212,87	0,27	212,87	0,05	212,89	0,05
DYS481	20	215,92	0,11	215,89	0,00	215,91	0,05	215,89	0,09	215,89	0,09	215,89	0,00	215,89	0,23	215,89	0,11
DYS481	21	218,94	0,06	218,94	0,00	219,00	0,16	218,94	0,26	218,94	0,06	218,94	0,00	218,94	0,06	218,93	0,12
DYS481	22	222,00	0,10	221,98	0,24	222,01	0,10	221,96	0,17	221,97	0,09	221,98	0,08	222,01	0,10	221,95	0,09
DYS481	23	225,01	0,05	224,98	0,17	225,03	0,05	224,96	0,02	225,03	0,08	225,00	0,12	225,04	0,06	224,97	0,08
DYS481	24	227,96	0,02	227,98	0,17	227,99	0,08	227,98	0,20	227,99	0,11	228,00	0,14	228,03	0,11	227,96	0,20
DYS481	25	231,01	0,05	230,99	0,11	231,03	0,11	231,01	0,05	231,03	0,17	231,01	0,03	231,03	0,15	231,00	0,18
DYS481	26	233,98	0,09	234,01	0,05	234,00	0,11	234,01	0,03	234,00	0,17	233,99	0,10	234,04	0,16	233,98	0,13
DYS481	27	237,02	0,05	237,00	0,03	237,01	0,06	237,02	0,11	237,02	0,07	237,04	0,15	237,05	0,10	237,00	0,17
DYS481	28	240,00	0,00	240,07	0,19	240,00	0,00	240,04	0,19	240,04	0,19	240,04	0,19	240,11	0,00	240,04	0,19
DYS481	29	243,11	0,13	243,14	0,12	243,10	0,08	243,11	0,13	243,14	0,12	243,10	0,17	243,16	0,12	243,10	0,11
DYS481	30	246,22	0,15	246,19	0,03	246,22	0,17	246,18	0,06	246,19	0,03	246,20	0,05	246,24	0,14	246,23	0,03
DYS481	31	249,32	0,15	249,25	0,03	249,31	0,16	249,21	0,15	249,25	0,03	249,25	0,03	249,25	0,03	249,25	0,02
DYS481	32	252,30	0,09	252,21	0,11	252,28	0,17	252,22	0,09	252,23	0,10	252,23	0,10	252,22	0,07	252,25	0,17
DYF387S1	30	264,62	0,33	264,62	0,20	264,65	0,30	264,72	0,38	264,71	0,21	264,65	0,32	264,68	0,40	264,69	0,31
DYF387S1	31	268,51	0,34	268,49	0,39	268,56	0,27	268,59	0,18	268,57	0,12	268,56	0,27	268,60	0,40	268,55	0,29
DYF387S1	32	272,39	0,17	272,42	0,37	272,38	0,25	272,50	0,34	272,45	0,30	272,46	0,17	272,49	0,28	272,46	0,40
DYF387S1	33	276,35	0,21	276,37	0,36	276,33	0,23	276,43	0,23	276,42	0,40	276,44	0,21	276,44	0,24	276,42	0,30
DYF387S1	34	280,22	0,33	280,25	0,37	280,22	0,32	280,29	0,20	280,32	0,33	280,29	0,20	280,36	0,38	280,25	0,38
DYF387S1	35	284,01	0,32	284,05	0,34	284,02	0,30	284,06	0,36	284,04	0,34	284,04	0,38	284,14	0,31	284,11	0,36

DYF387S1	36	287,84	0,35	287,86	0,30	287,84	0,24	287,87	0,35	287,94	0,32	287,92	0,29	287,95	0,36	287,93	0,53
DYF387S1	37	291,75	0,32	291,75	0,43	291,76	0,23	291,80	0,33	291,84	0,32	291,80	0,46	291,85	0,28	291,80	0,52
DYF387S1	38	295,55	0,32	295,53	0,36	295,55	0,38	295,55	0,37	295,58	0,36	295,54	0,27	295,64	0,23	295,60	0,56
DYF387S1	39	299,57	0,30	299,60	0,35	299,60	0,35	299,60	0,35	299,60	0,35	299,64	0,47	299,64	0,17	299,61	0,36
DYF387S1	40	303,22	0,27	303,29	0,34	303,30	0,36	303,32	0,33	303,32	0,50	303,32	0,46	303,30	0,17	303,29	0,44
DYF387S1	41	307,17	0,29	307,20	0,21	307,19	0,47	307,23	0,44	307,23	0,43	307,24	0,30	307,23	0,18	307,24	0,31
DYF387S1	42	311,04	0,26	311,06	0,38	311,09	0,45	311,12	0,28	311,11	0,44	311,13	0,27	311,07	0,36	311,07	0,26
DYF387S1	43	314,97	0,43	315,05	0,38	315,09	0,43	315,09	0,43	315,08	0,42	315,09	0,43	315,05	0,38	315,04	0,41
DYF387S1	44	319,02	0,16	319,10	0,36	319,10	0,36	319,10	0,36	319,15	0,51	319,14	0,17	319,14	0,17	319,15	0,47
DYS533	7	338,54	0,08	338,50	0,12	338,57	0,17	338,56	0,32	338,53	0,10	338,54	0,08	338,54	0,08	338,56	0,30
DYS533	8	342,57	0,09	342,54	0,10	342,66	0,10	342,63	0,30	342,65	0,12	342,57	0,07	342,57	0,08	342,57	0,14
DYS533	9	346,67	0,18	346,63	0,08	346,75	0,07	346,70	0,18	346,72	0,12	346,65	0,05	346,68	0,24	346,66	0,18
DYS533	10	350,74	0,19	350,72	0,05	350,73	0,05	350,77	0,09	350,80	0,12	350,74	0,05	350,77	0,08	350,73	0,08
DYS533	11	354,83	0,20	354,79	0,22	354,84	0,02	354,82	0,05	354,82	0,18	354,80	0,14	354,86	0,05	354,81	0,11
DYS533	12	358,84	0,05	358,87	0,19	358,91	0,16	358,87	0,18	358,92	0,15	358,87	0,18	358,88	0,17	358,85	0,05
DYS533	13	362,91	0,08	362,92	0,11	362,93	0,11	362,93	0,08	362,95	0,21	362,88	0,11	362,91	0,09	362,88	0,08
DYS533	14	366,91	0,12	366,94	0,07	366,94	0,07	366,91	0,11	366,95	0,12	366,92	0,14	366,94	0,07	366,90	0,12
DYS533	15	370,95	0,14	370,91	0,07	370,92	0,06	370,94	0,08	370,95	0,14	370,97	0,12	370,93	0,16	370,90	0,13
DYS533	16	374,97	0,07	374,95	0,11	374,99	0,14	374,94	0,05	375,01	0,16	374,96	0,06	374,98	0,00	374,95	0,17
DYS533	17	378,95	0,05	378,95	0,06	378,99	0,16	378,95	0,05	378,99	0,18	378,95	0,05	378,96	0,03	378,96	0,05

6. Obecność pików *stutter*

Obecność pików *stutter* jest rezultatem „poślizgu” polimerazy podczas amplifikacji DNA. Najczęściej występujący *stutter* jest o jedną jednostkę powtórzeniową krótszy od głównego piku. Ponadto mogą pojawiać się *stutter* niestandardowe, krótsze ($n-$ lub minus *stutter*) lub dłuższe ($n+$ lub plus *stutter*) o niepełną jednostkę powtórzeniową. Ze względu na fakt, iż piki *stutter* są artefaktami mogącymi wpływać na poprawność interpretacji uzyskanych wyników przeprowadzono analizę mającą na celu ustalenie procentowego udziału pików *stutter* w odniesieniu do pików głównych w poszczególnych układach walidowanego zestawu Yfiler Plus. Uzyskane wyniki przedstawiono w poniższej tabeli:

Tabela 9. Średni procent minus i plus *stutter* dla *loci* zestawu Yfiler Plus.

marker	średni % minus <i>stutter</i>	średnia % plus <i>stutter</i>
DYS576	11,02	1,32
DYS389I	7,57	0,93
DYS635	8,28	1,17
DYS389II	13,03	0,97
DYS627	9,18	0,91
DYS460	7,06	1,24
DYS458	10,34	1,02
DYS19	9,32	1,36
YGATAH4	7,83	0,89
DYS448	2,14	0,82
DYS391	6,67	1,11
DYS456	12,13	2,12
DYS390	8,43	1,24
DYS438	3,94	1,07
DYS392	10,68	6,75
DYS518	18,95	2,37
DYS570	11,25	1,72
DYS437	5,64	0,86
DYS385a/b	10,24	1,39
DYS449	17,21	1,78
DYS393	10,11	2,13
DYS439	6,67	1,39
DYS481	20,21	3,02
DYF387S1	9,74	nieokreślony
DYS533	8,27	2,17

Kryterium akceptacji: wartości % pików *stutter* w odniesieniu do głównych pików zbliżona do wartości uzyskanych podczas badań walidacyjnych producenta zestawu Yfiler Plus.

WNIOSKI Z WALIDACJI

- I. W warunkach laboratoryjnych czułość zestawu Yfiler Plus wyznaczona doświadczalnie odpowiada wymaganiom zawartym w założonym kryterium akceptacji.
- II. Dla zestawu Yfiler Plus przy ilości DNA w zakresie 1,000 – 0,125 ng uzyskano wiarygodne wyniki i oznaczono pełne profile genetyczne. Liczba nieoznaczonych markerów wzrastała przy stężeniu 0,062 ng i poniżej tej wartości. Przy stężeniu 0,031 ng oznaczono pojedyncze markery, poniżej tej wartości zaś otrzymane wyniki badań nie kwalifikują się do interpretacji.
- III. Wartość ST, stosowana przy interpretacji profili Yfiler Plus, została określona na poziomie 550 rfu.
- IV. Poziom detekcji (LOD) określono na 50 rfu, poziom detekcji (LOD) określono na 150 rfu. Wartość ST stosowana przy interpretacji profili Yfiler Plus została określona na poziomie 550 rfu.
- V. Dla zestawu Yfiler Plus utratę alleli składnika mniejszościowego (żeńskiego) zaobserwowano przy proporcji ilości DNA męskiego i żeńskiego 1:1000. Przy większej dysproporcji zjawisko to występowało z większą częstotliwością. Przy proporcji 1:8000 nie oznaczono markerów Y-STR.
- VI. W warunkach laboratoryjnych czułość wyznaczona doświadczalnie odpowiada wymaganiom zawartym w założonym kryterium akceptacji.
- VII. Dla wszystkich analizowanych śladów biologicznych odnotowano zgodne oznaczenia wszystkich odpowiadających markerów Yfiler Plus oraz PowerPlex Y23. Jakość profili na elektroferogramach analizowanych próbek była porównywalna.
- VIII. W warunkach Pracowni DNA ZMS UMB precyzja wyznaczona doświadczalnie odpowiada wymaganiom zawartym w założonym kryterium akceptacji.

Zaobserwowano prawidłowe, współmierne proporcje długości alleli (pb) w zakresach wszystkich markerów zestawu.

- IX. Badania udziału procentowego pików *stutter* w odniesieniu do pików głównych pozwoliły na stwierdzenie, że pokrywają się one z badaniami walidacyjnymi producenta zestawu i umożliwiają użycie ustawień fabrycznych filtrów służących do automatycznej eliminacji pików *stutter*.

2. OBLICZENIA STATYSTYCZNE

W badaniach przeprowadzonych na populacji mężczyzn z północno-wschodniej Polski z wykorzystaniem zestawu Yfiler Plus obejmującego 27 markerów zlokalizowanych na chromosomie Y stwierdzono wysoką zdolność dyskryminacyjną całego zestawu, wynoszącą 0,9925. Oznacza to, że zestaw ten pozwala na skuteczne rozróżnianie linii męskich w badanej populacji. Wartości parametrów przydatności poszczególnych markerów w badaniach genetyczno-sądowych przedstawiono w Tabeli 10. W grupie markerów o wartości zróżnicowania genowego powyżej 0,800 znalazły się DYS518, DYS627, DYS481 i DYS449 co świadczy o ich wysokiej przydatności w genetyce sądowej. W badanej próbie populacyjnej, wśród 534 przeanalizowanych haplotypów, 526 haplotypów (98,5%) zostało wykrytych tylko raz. Cztery haplotypy pojawiły się dwukrotnie. Ten wysoki odsetek unikalnych haplotypów jest korzystnym wskaźnikiem siły dyskryminacji badanych markerów Y-STR w populacji Polski północno-wschodniej. Wartość DC markerów zestawu Yfiler Plus dla populacji mężczyzn z Polski północno-wschodniej wynosi 99,25%. W *locus* DYS481 wykazano największą liczbę różnych alleli (15) przypadającą na marker, natomiast najmniejszą (4 allele) stwierdzono dla DYS391. Wartości zróżnicowania genowego (GD) przekraczają 0,5 dla wszystkich markerów oprócz DYS392, DYS393, DYS437 i DYS448 (gdzie GD zawiera się w zakresie 0,420-0,481), zaś dla 13 markerów (48,1%) nawet 0,7. Warto zauważyć, że w trzech (DYS449, DYS518 i DYS627) spośród siedmiu markerów szybko mutujących, GD przekracza 0,84, zaś w pozostałych 0,76. Najwyższą wartość GD obliczono dla DYS518 (0,86) należącym do grupy RM, zaś najniższe GD równe 0,42 wykazano dla DYS392. Należy zaznaczyć, że przy porównywaniu wartości GD z zestawu Yfiler Plus, celowo zostały pominięte trzy markery kilkualleliczne, tzw. markery wielokopijne (DYF387S1a/b, DYS385a/b oraz DYS389I i DYS389II). Wartość PIC zawiera się w zakresie od 0,389 (DYS518) do 0,841 (DYS393).

Tabela 10. Parametry biostatystyczne *loci* zestawu Yfiler Plus w próbie populacyjnej 534 mężczyzn z regionu Polski pn-wsch.

<i>locus</i>	Nall	GD	PIC	MP	PD
DYF387S1*	9	0,781	0,766	0,220	0,780
DYS19	6	0,744	0,699	0,257	0,743
DYS385	13	0,778	0,772	0,223	0,777
DYS389	8	0,633	0,568	0,368	0,632
DYS390	7	0,675	0,623	0,327	0,673
DYS391	4	0,546	0,442	0,456	0,544
DYS392	9	0,420	0,393	0,581	0,419
DYS393	6	0,425	0,389	0,576	0,424
DYS437	5	0,456	0,403	0,545	0,455
DYS438	7	0,611	0,546	0,390	0,610
DYS439	7	0,700	0,646	0,302	0,698
DYS448	8	0,481	0,435	0,520	0,480
DYS449*	12	0,841	0,820	0,161	0,839
DYS456	8	0,747	0,705	0,254	0,746
DYS458	11	0,736	0,687	0,266	0,734
DYS460	6	0,572	0,507	0,429	0,571
DYS481	15	0,843	0,823	0,158	0,842
DYS518*	13	0,859	0,841	0,143	0,857
DYS533	6	0,545	0,494	0,456	0,544
DYS570*	11	0,784	0,749	0,218	0,782
DYS576*	12	0,764	0,729	0,238	0,762
DYS627	13	0,845	0,826	0,157	0,843
DYS635	7	0,599	0,565	0,402	0,598
YGATAH4	5	0,633	0,570	0,369	0,631

Legenda: Nall – liczba obserwowanych alleli w markerze, GD (*Gene Diversity*) – współczynnik zróżnicowania genowego/haplotypowego, PIC (*Polymorphism Information Content*) – wskaźnik informacji o polimorfizmie, MP (*Match Probability*) – prawdopodobieństwo dopasowania, PD (*Power Of Discrimination*) – siła dyskryminacji, * markery RM (szybkomutujące)

Analiza molekularnej wariacji (AMOVA) pozwala zrozumieć strukturę i poziom genetycznego zróżnicowania populacji. W celu porównania populacji Polski pn-wsch. z 18 wybranymi populacjami europejskimi obliczono wartości współczynnika utrwalenia FST (ang. *fixation index*) między wszystkimi parami populacji na podstawie częstości haplotypów Y-STR udostępnionych poprzez stronę yhrd.org. Wartość FST jest miarą zróżnicowania na skutek występowania wewnętrznej struktury genetycznej (subpopulacji) lub różnic genetycznych między populacjami i stanowi odzwierciedlenie wariacji frekwencji alleli pomiędzy porównywanymi grupami. Generalnie, wyższe wartości FST wyrażają większe zróżnicowanie międzypopulacyjne. Uzyskaną macierz odległości genetycznych przedstawia Tabela 11. Wszystkie wyniki porównań były istotne statystycznie przy poziomie $p=0,05$.

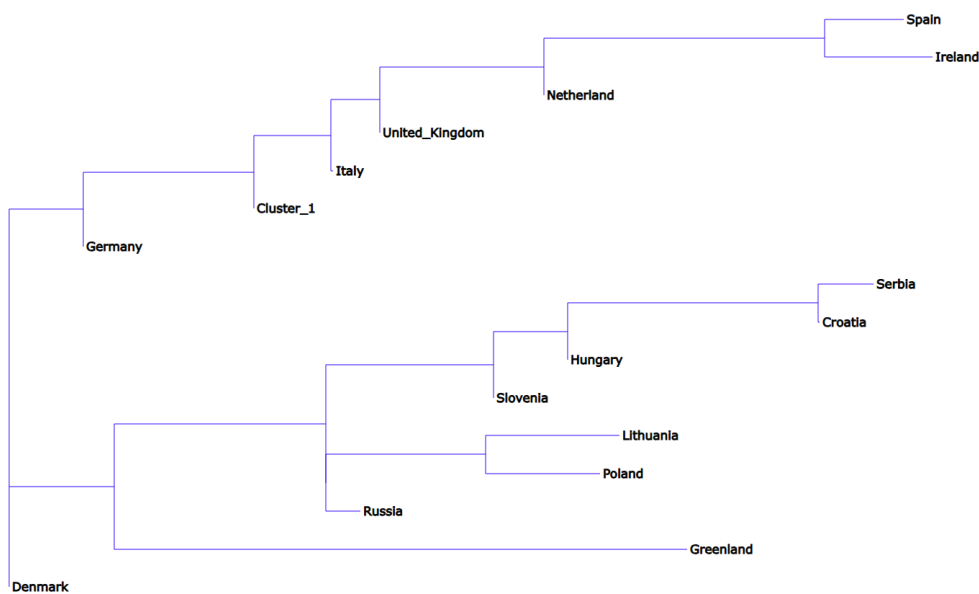
Tabela 11. Wartości FST (poniżej przekątnej) i odpowiadające im wartości p (powyżej przekątnej) w analizie AMOVA dla par populacji.

Population	Poland	Croatia	Denmark	Germany	Greenland	Hungary	Ireland	Italy	Lithuania	Netherlands	Russian Federation	Serbia	Slovenia	Spain	United Kingdom	Cluster 1
Poland	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Croatia	0,1080	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0057	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Denmark	0,0950	0,1290	-	0,0083	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Germany	0,0847	0,1366	0,0065	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Greenland	0,2309	0,1900	0,1577	0,1483	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hungary	0,0699	0,0482	0,0879	0,0842	0,1470	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Ireland	0,2702	0,3069	0,1741	0,1098	0,2711	0,2947	-	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Italy	0,1838	0,2043	0,0575	0,0407	0,1673	0,1339	0,1129	-	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Lithuania	0,0428	0,1914	0,0847	0,0738	0,2284	0,1106	0,2547	0,1454	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Netherlands	0,2119	0,2535	0,0769	0,0476	0,1918	0,2063	0,0477	0,0366	0,1641	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0184	0,1010	0,0143
Russian Federation	0,0549	0,0779	0,0648	0,0692	0,1470	0,0303	0,2331	0,1229	0,0704	0,1637	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Serbia	0,1325	0,0097	0,1415	0,1465	0,1768	0,0449	0,3402	0,2057	0,2023	0,2570	0,0743	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Slovenia	0,0367	0,0297	0,0615	0,0638	0,1584	0,0142	0,2675	0,1387	0,0932	0,1842	0,0275	0,0423	-	0,0000	0,0000	0,0000

Spain	0,27 48	0,32 83	0,169 5	0,100 0	0,2822	0,293 1	0,03 23	0,07 60	0,237 8	0,0185	0,2268	0,35 90	0,27 95	-	0,000 0	0,00 00
United Kingdom	0,17 51	0,20 26	0,042 6	0,024 7	0,1549	0,151 6	0,05 52	0,02 50	0,147 5	0,0077	0,1290	0,20 99	0,13 87	0,04 43	-	0,00 00
Cluster 1	0,14 96	0,17 96	0,021 4	0,012 1	0,1479	0,121 3	0,08 80	0,01 70	0,120 1	0,0201	0,1038	0,18 34	0,11 17	0,06 82	0,005 9	-

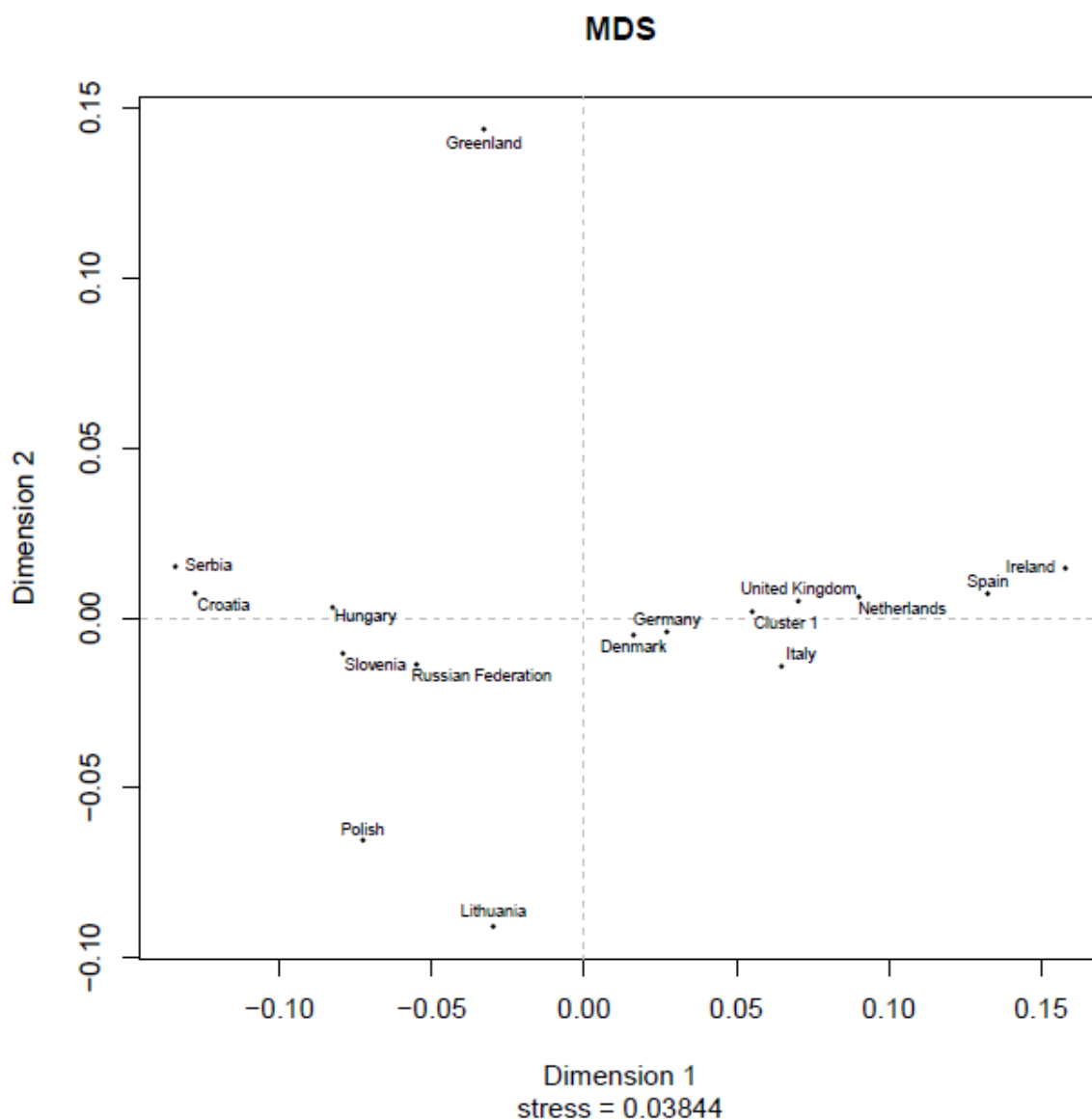
Cluster 1 Belgium; Austria; Switzerland

Drzewo filogenetyczne skonstruowane metodą łączenia sąsiadów (NJ, ang. *neighbor-joining*) odzwierciedla pokrewieństwa filogenetyczne między haplotypami Y-STR analizowanych populacji (Rycina 2).



Rycina 2. Drzewo filogenetyczne *neighbor-joining* (NJ) wykreślone na podstawie macierzy odległości FST badanej populacji i 17 populacji europejskich.

W celu dalszego zbadania zależności genetycznych między badaną populacją a wybranymi populacjami europejskimi, na podstawie wartości FST sporządzono wykres MDS (Rycina 3) ilustrujący rozmieszczenie badanej populacji oraz 17 wybranych populacji europejskich w przestrzeni wielowymiarowej.



Rycina 3. Wykres MDS wykreślony na podstawie macierzy odległości FST badanej populacji i 17 populacji europejskich.

Użyto dwóch wymiarów do reprezentacji danych: pierwszy wymiar różnic genetycznych (ang. *Dimension 1*) reprezentowany na osi X oraz drugi wymiar różnic genetycznych (ang. *Dimension 2*) reprezentowany na osi Y. Na wykresie pojawia się również informacja o wartości *stress*, która jest miarą dopasowania modelu MDS oceniającą rozbieżność między danymi rzeczywistymi a danymi obliczonymi w nowej przestrzeni. Obliczona wartość 0,03844 (poniżej 0,05) sugeruje, że model prawidłowo oddaje struktury genetyczne danych. Populacje są przedstawione jako punkty na wykresie, a w ich ułożeniu można dopatrywać się odzwierciedlenia rzeczywistego rozmieszczenia biogeograficznego.

Oba wykresy wyraźnie obrazują filogenetyczne zróżnicowanie pomiędzy ludnością Europy wschodniej i zachodniej. Wśród analizowanych populacji Polacy wykazują wysoki stopień pokrewieństwa genetycznego z Litwinami, Słoweńcami i Rosjanami. Populacje Europy zachodniej są zgrupowane w co najmniej dwie struktury filogenetyczne umiejscowione w oddaleniu od populacji Europy centralnej i wschodniej. Hiszpania i Włochy, a po przeciwnej stronie Serbia i Chorwacja, są oddalone od grupy centralnej, co może sugerować unikalne cechy genetyczne tych populacji. Szczególnie małe zróżnicowanie wykazano między populacjami Belgii, Austrii i Szwajcarii, które przy zadanym progu parametru $F_{ST}=0,01$ tworzą zgrupowanie oznaczone jako *Cluster 1*. Ludność Grenlandii wyróżnia się szczególnie wśród innych grup, będąc najbardziej oddaloną genetycznie jak i geograficznie od pozostałych porównywanych populacji.

V OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Obserwując obowiązujące zalecenia przygotowywane w jednostkach i podmiotach standaryzujących, które działają, kierując się zasadami przygotowywanymi i polecanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Sądowej (ISFG), minimalna liczba próbek Y-chromosomowych STR reprezentatywna dla danej grupy populacyjnej stanowi 400 niespokrewnionych osobników płci męskiej. Natomiast przy próbkach autosomalnych liczba wzrasta do minimum 500 próbek [67]. Odpowiednio duża baza danych Y-STR jest kluczowa w genetyce sądowej, ponieważ umożliwia dokładniejsze oszacowanie częstości występowania haplotypów. Im większa baza, tym lepsza jakość analizy na poziomie statystycznym, co jest istotne zarówno w identyfikacji jak i w porównaniach międzypopulacyjnych. Przykładem jest baza YHRD, która zawiera tysiące haplotypów, która znacząco zwiększa dokładność identyfikacji w badaniach sądowych [11, 68]. Zaprezentowana przeze mnie baza populacyjna haplotypów dla zestawu 27 markerów Y-STR (Thermo Fisher Scientific), jest pierwszą takiej wielkości bazą opracowaną dla populacji Polski północno-wschodniej, wystarczająco liczną w odniesieniu do obowiązujących standardów, określonych przez ISFG, nawet w kontekście całej populacji Polski. Jak dotąd, obecna baza przedstawiająca populację polską zamieszczoną w bazie YHRD, zawiera 653 haplotypy Y-STR, obejmując swym zasięgiem populację całej Polski. Została ona zbadana i uzupełniona stosunkowo niedawno: oprócz 496 haplotypów 27 Y-STR dodanych przez Woźniaka w dniu 27 października 2016 roku (numer akcesji YA004147), pozostałe 157 haplotypów zostały dodane przez zespół pod kierownictwem

Branickiego 22 marca 2002 roku (numer akcesji YA003124). Ze względu na to, że zestaw Yfiler Plus firmy Thermo Fisher Scientific został wprowadzony w 2015 roku, prawdopodobnie system błędnie umieścił 157 haplotypów z numeru akcesji YA003124 w zakładce 27 Y-STR [11]. Dzięki temu, baza haplotypów z obecnej pracy doktorskiej ma szansę być największą i najbardziej aktualną zbadaną liczbą haplotypów dla populacji Polski, umieszczoną w ogólnodostępnej publicznie dostępnej bazie YHRD o największej liczbie haplotypów Y-STR. Zaprezentowana w tej pracy baza populacyjna, zbiera dane dla 534 haplotypów z regionu Polski północno-wschodniej. Liczba zgromadzonych próbek przekracza minimalną zalecaną przez ISFG ilość 400 próbek. Od wprowadzenia zestawu Yfiler Plus minęło już 9 lat, a baza YHRD zawiera tylko 653 haplotypy z populacji polskiej, a praktycznie po dokładniejszej analizie – 496 haplotypów. Opracowane dane wzbogacą tę bazę o 534 haplotypy z regionu Polski północno-wschodniej. Jest to niezwykle istotne, ponieważ większa liczba haplotypów znacząco poprawi precyzję i wiarygodność analiz genetycznych. Rozszerzenie bazy YHRD o nowe haplotypy przyniesie kilka ważnych korzyści. Wśród nich warto wymienić m.in.:

- Zwiększenie różnorodności danych zwiększy genetyczną różnorodność w bazie YHRD i pomoże w lepszym zrozumieniu genetycznej struktury populacji polskiej.
- Polepszenie dokładności analiz sądowych poprzez dokładniejsze dopasowanie profili DNA, a w efekcie skuteczniejszą identyfikację sprawców przestępstw oraz wykluczenia niewinnych osób.
- Wsparcie badań genealogicznych poprzez bardziej precyzyjne i szeroko zakrojone analizy genealogiczne.
- Zwiększenie reprezentatywności i wiarygodności danych dotyczących populacji Polski [2, 6, 7, 9, 18, 27].

W poprzednich pracach opisujących populację Polski, zarówno w zakresie polimorfizmów autosomalnych, mtDNA jak i Y-STR, podkreślano wysoki stopień jej homogeniczności pod względem rozkładów. Na podstawie wyników AMOVA wykazano, że większość wariacji genetycznej w populacji polskiej wynika z różnic wewnątrz populacji, a nie między jej subpopulacjami.[6, 27, 48, 69, 70, 75, 101, 102]. W szeroko zakrojonej analizie obejmującej wyniki oznaczeń Y-SNP dla 2705 próbek zidentyfikowano regionalne różnice genetyczne między subpopulacjami Polski, szczególnie w województwie łódzkim [27]. Należy także zauważyć, że już na poziomie tzw. „haplotypu minimalnego” populacja północno-wschodniej regionu Polski wykazuje pewne wewnętrzne zróżnicowanie w obrębie struktury genetycznej

z uwagi na występowanie domieszek mniejszości etnicznych i religijnych [75]. Należy przypuszczać, że poszerzenie zakresu markerów i technik badawczych pozwoli na bardziej szczegółową analizę regionalnych różnic genetycznych. Y-STR są bardziej zmienne i mogą lepiej oddawać różnice w obrębie krótszych okresów czasu, natomiast Y-SNP mogą lepiej uchwycić długoterminowe tendencje w badaniach o większej skali oraz zasięgu. Wykorzystanie różnych zestawów markerów także prowadzi do różnic w wynikach obliczeń wartości wskaźników biostatystycznych, takich jak GD, PD i FST. Szybkomutujące markery używane w obecnej pracy mogą mają wpływ na wyższe wskaźniki zróżnicowania genetycznego, w porównaniu do bardziej konserwatywnych markerów. Średnia wartość GD dla badanego zestawu jest wysoka (0,667), co potwierdza jego skuteczność w różnicowaniu linii męskich [70]. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniej publikowane doniesienia dla innych subpopulacji Polski [71, 72, 73] w zakresie zróżnicowania genetycznego oraz potwierdzają stabilność i powtarzalność wyników przeprowadzonych analiz genetycznych.

Wyniki AMOVA zobrazowane przy pomocy filogramu oraz wykresu MSD wskazują na bliskie pokrewieństwo populacji Polski z populacjami wschodniej / centralnej Europy, z wyraźnym oddaleniem od populacji zachodnioeuropejskich. Największe odległości genetyczne zaobserwowano między populacją Polski a populacjami Irlandii i Hiszpanii, co zgodne jest z wynikami poprzednich badań populacyjnych z wykorzystaniem zestawu Yfiler Plus [70]. Spójność wyników jest potwierdzeniem wysokiej jednorodności genetycznej populacji polskiej oraz skuteczności zestawu w analizie różnorodności haplotypowej Y-STR. Wyniki obu badań wskazują na potrzebę dalszych badań genetycznych, zwłaszcza w kontekście porównania z innymi populacjami europejskimi [74]. Wyniki obu tych prac podkreślają znaczenie wykorzystania markerów Y-STR w analizach genetyczno-sądowych, zwłaszcza w kontekście identyfikacji indywidualnej oraz określania pochodzenia geograficznego. Analiza zróżnicowania genetycznego w różnych regionach Polski dostarcza cennych danych, które mogą być wykorzystane w praktyce sądowej, zwłaszcza w sprawach dotyczących identyfikacji biologicznej. Rozpatrując unikalny haplotyp dla chromosomu Y mamy na myśli taki, który jest obserwowany tylko raz w pojedynczej populacji. Przeciwnieństwem jest wspólny haplotyp, który występuje więcej niż jeden raz w obrębie populacji lub między populacjami. Rozpatrując filogenezę chromosomu Y w Europie, zauważono przewagę Eu18 i Eu19. Oba wywodzą się z jednego M173. Pomimo tego wspólnego pochodzenia, Eu18 zajmuje największą część w krainie Basków (pogranicze Hiszpanii i Francji) oraz przeważa w Europie Zachodniej. Natomiast im dalej na wschód

Europy, tym jego występowanie się zmniejsza. We Wschodniej Europie następuje odwrotność i Eu19 osiąga przewagę nad Eu18. Tym samym największe występowanie Eu19 zaprezentowano w Polsce, Ukrainie i na Węgrzech [66].

Północno-wschodnia część Polski, wchodząca obecnie w skład województwa podlaskiego i włączona do państwa polskiego dopiero w XX wieku, charakteryzuje się największym w kraju zróżnicowaniem struktury narodowościowej i wysokim odsetkiem mniejszości narodowych i etnicznych. Powtarzalność tych samych haplotypów sugeruje nieco mniejszą różnorodność, co może być wynikiem struktury populacji, a nawet efektu założyciela. Obecność tych samych haplotypów obniża siłę dyskryminacji, ale jednocześnie dostarcza ważnych informacji o lokalnej genetyce tej populacji. W pracy Pepińskiego i wsp. [75] dotyczącej zmienności linii męskich na terenie Polski północno-wschodniej stwierdzono istotne statystycznie różnice w obrębie struktury genetycznej grup etnicznych oraz zasugerowano, że powinny one być brane pod uwagę w ocenie wartości dowodowej na potrzeby ekspertyz genetyczno-sądowych [75]. Należy zauważyć, że cytowane badanie obejmowało mniejszą liczbę *loci*, w tym tzw. minimalny haplotyp europejski (DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS385a/b, DYS392, DYS393) oraz trzy dodatkowe *loci* (DYS437, DYS438 i DYS439). Mniejsza liczba markerów z pewnością nie pozwoliła na uzyskanie wysokiej skumulowanej wartości GD. Natomiast dodatkowe *loci* przyczyniły się do wzrostu różnorodności genetycznej o 1,37% w stosunku do minimalnego haplotypu europejskiego. Oprócz większej liczebności próby populacyjnej i szerszego zakresu markerów, wyniki uzyskane na potrzeby niniejszej pracy dotyczyły także *loci* o wysokiej mutacyjności (RM), jak DYF387S1 i DYS518, co oznacza, że zmiany w liczbie powtórzeń (alleli) w tych markerach mogą nastąpić stosunkowo często w krótkich przedziałach czasu ewolucyjnego (na przykład w ciągu kilku pokoleń). Różnice te mogą sugerować stosunkowo niedawne zróżnicowanie genetyczne między rodzinami lub osobami. Rozważając powtarzalność haplotypów oraz tło genetyczne opisane w tej pracy, czterokrotne powtarzanie się tych samych haplotypów w większej próbie może sugerować pewne zjawiska rodzinne lub klasteryzację w populacji. Mimo to, duża próba pozwala na osiągnięcie wysokiej zdolności dyskryminacji. W pracy Pepińskiego i wsp. [75] zidentyfikowanie pięciu powtarzających się haplotypów mimo mniejszej liczebności próby świadczy o proporcjonalnie podobnym poziomie powtarzalności do tego, który zaobserwowano w niniejszej analizie. Obie prace, mimo różnic w wielkości próby, liczbie *loci* i użytym oprogramowaniu, dostarczają komplementarnych informacji na temat haplotypów Y-STR w populacji męskiej z Polski.

Praca doktorska wyróżnia się większą liczbą próbek i markerów, co pozwala na bardziej szczegółową analizę różnorodności haplotypów. Natomiast praca Pepińskiego i wsp. udziela cennego spojrzenia na mniejszą populację o wysokiej różnorodności. W obu badaniach zaobserwowano wysoką różnorodność genetyczną, co odzwierciedla dużą złożoność genetyczną badanych populacji. Znalezione drobne różnice w powtarzalności haplotypów mogą wynikać z metodologii lub regionalnych różnic w populacji.

Porównanie uzyskanych wyników z publikacją Diaz-Lacava i wsp. [76] w kontekście porównania danych uzyskanych dla populacji Polski północno-wschodniej w odniesieniu do populacji innych krajów europejskich w oparciu o metody AMOVA i MDS, pozwala wyodrębnić różnice i podobieństwa w strukturze genetycznej. W cytowanej analizie populacja polski została wskazana jako część większego klastra genetycznego Europy wschodniej (klaster 17), który obejmuje również Litwę, Węgry, Ukrainę i inne kraje tego regionu. Wyniki badań geostatystycznych pokazują, że populacje krajów Europy wschodniej są genetycznie podobne na podstawie niskich wartości FST, a jednocześnie wyraźnie oddalone od populacji Europy zachodniej.

W ramach stosowania procedur badawczych zgodnie z wymaganiami normy ISO 17025 laboratorium badawcze utrzymujące system zarządzania jakością powinno potwierdzić odpowiedniość użytej metody badawczej do zamierzonego zastosowania poprzez wykonanie wewnętrznych testów walidacyjnych. Zakres walidacji powinien odpowiadać zakresowi wymaganemu przez dane zastosowanie lub obszar zastosowania w warunkach lokalowych i technicznych konkretnego laboratorium. Wyniki testów walidacyjnych zestawu Yfiler Plus PCR Amplification Kit przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy porównano z badaniami Gopinath i wsp. [32] oraz Watahiki i wsp. [77] przeprowadzonymi zgodnie z międzynarodowymi standardami (SWGDM, ENFSI, ISFG) zapewniając spójność podejścia do walidacji na poziomie globalnym. W tych pracach przedstawiono wspólne elementy oraz różnice w podejściu do walidacji, opisując szczegółowo kluczowe parametry, takie jak czułość, specyficzność, powtarzalność oraz tolerancja na inhibitory. Obie prace zgodnie wykazały zdolność zestawu Yfiler Plus do generowania pełnych profili genetycznych przy niskich stężeniach męskiego DNA, pełne profile uzyskano już przy minimalnej ilości 125 pg DNA, co wskazuje na wysoką czułość zestawu. W obu badaniach analizowano również czułość zestawu przy różnych stężeniach DNA, potwierdzając, że poniżej wartości 0,031 ng dochodziło do częściowej utraty (wypadania) alleli Y-STR. Potwierdzono również wysoką specyficzność zestawu dla męskiego DNA, mimo obecności wysokich proporcji

DNA żeńskiego w próbkach mieszanych. W pracy Gopinath i wsp. wykazano zdolność zestawu do amplifikacji pełnych profili męskich nawet w obecności 3 µg DNA żeńskiego, co podkreśla wysoką specyficzną zestawu dla męskiego DNA. Potwierdzono, że zestaw Yfiler Plus pozwala na uzyskanie spójnych i powtarzalnych wyników, cech kluczowych w genetyce sądowej. Istotną różnicą między porównywanymi metodami walidacji jest podejście do analizy mieszanin DNA. Praca doktorska bardziej szczegółowo badała różne proporcje mieszanin DNA żeńskiego i męskiego, dochodząc do wniosku, że zestaw Yfiler Plus napotyka trudności w detekcji haplotypów Y-STR przy dużych proporcjach DNA żeńskiego (powyżej 1:1000), a to prowadzi do częstszej utraty alleli. W pracy Watahiki i wsp. [77] pomimo tego, że analizowano mieszaniny, większy nacisk położono na porównanie wyników z różnych analizatorów genetycznych oraz wpływ inhibitorów PCR na wydajność zestawu. W obu cytowanych pracach badano wpływ takich inhibitorów jak hematyna i kwas huminowy, jednak praca Watahiki i wsp. zawiera bardziej szczegółowe dane, jak stężenia tych substancji, przy których obserwowano utratę markerów. Niniejsza praca nie zawiera szczegółowych badań nad wpływem inhibitorów, stanowi to wyraźną różnicę w metodologii. Praca Gopinath i wsp. [32] wyróżnia się bardziej zaawansowaną analizą optymalizacji protokołów, korzystając z technik *Design of Experiments* (DoE) do dostrajania parametrów takich jak stężenie magnezu czy warunki termiczne cykli PCR. Takie podejście nie zostało szczegółowo uwzględnione w niniejszej pracy doktorskiej ani też w badaniach Watahiki i wsp. [77]. Mimo wielu podobieństw, prace różnią się w zakresie szczegółowości analiz oraz badanych parametrów. W niniejszej pracy oraz w badaniach Watahiki i wsp. [77] koncentrowano się głównie na praktycznych aspektach stosowania zestawu w różnych kontekstach laboratoryjnych, podczas gdy Gopinath i wsp. [32] oferuje bardziej rozbudowaną walidację z uwzględnieniem badań nad mieszaninami i inhibitorami PCR. Wszystkie te badania dostarczają istotnych informacji na temat wszechstronności i elastyczności zestawu Yfiler Plus, podkreślając jego przydatność do szerokiego spektrum zastosowań w genetyce sądowej.

W niniejszej pracy dokonano analizy różnorodności haplotypów Y-STR w populacji północno-wschodniej Polski z zastosowaniem zaawansowanego zestawu Yfiler Plus. Wyniki potwierdziły wysoką przydatność tego narzędzia do analiz genetyczno-sądowych, szczególnie w kontekście małych ilości męskiego DNA w mieszaninach z dużą przewagą DNA żeńskiego. Jest to istotne w sprawach kryminalistycznych, zwłaszcza dotyczących śladów pochodzących z przestępstw o podłożu seksualnym. Zebrana baza danych, obejmująca 534

haplotypy, znacząco wzbogaca globalną bazę YHRD, przyczyniając się do większej reprezentatywności i dokładności analiz genetycznych w populacji polskiej. Przeprowadzone porównania z innymi populacjami europejskimi, wykazały wysoki stopień homogeniczności genetycznej populacji Polski oraz jej bliskie pokrewieństwo z populacjami Europy Wschodniej. Wyniki badań wskazują na potrzebę dalszego rozszerzania bazy danych o dodatkowe regiony i populacje, co może przyczynić się do jeszcze bardziej precyzyjnych analiz i wniosków w badaniach genetyki sądowej. W przyszłości warto rozważyć poszerzenie badań na najnowszy występujący w bazie YHRD moduł jakim jest Ymax. Moduł ten reprezentuje wszystkie dostępne markery występujące w bazie YHRD. Obecnie populacja polska nie zawiera żadnego haplotypu z modułu Ymax.

VI WNIOSKI

1. Podsumowanie uzyskanych wyników badań walidacyjnych pozwala na stwierdzenie, iż zestaw Yfiler Plus PCR Amplification Kit może być stosowany w identyfikacyjnych badaniach genetycznych wykonywanych w Pracowni DNA ZMS UMB.
 2. Wysoka zdolność do dyskryminacji zestawu Yfiler Plus, z wartością DC na poziomie 99,25%, czyni go skutecznym narzędziem w analizach śladów DNA w badaniach kryminalistycznych, szczególnie w przypadkach małych ilości męskiego DNA w obecności dużej ilości DNA żeńskiego. Rozszerzenie bazy YHRD o dodatkowy zestaw haplotypów z Polski północno-wschodniej zwiększa jej różnorodność genetyczną, co ma bezpośredni wpływ na dyskryminatywność i precyzję wyszukiwań.
 3. Wyniki AMOVA zobrazowane przy pomocy filogramu oraz wykresu MSD wskazują na bliskie pokrewieństwo populacji Polski z populacjami wschodniej / centralnej Europy, z wyraźnym oddaleniem od populacji zachodnioeuropejskich.
-

VII STRESZCZENIE

Niniejsza praca doktorska dotyczy analizy genetycznej mężczyzn zamieszkujących północno-wschodnią Polskę, z wykorzystaniem zestawu Yfiler Plus, który umożliwia badanie 27 markerów Y-STR, w tym siedem markerów szybko mutujących, na podstawie których możliwa jest analiza różnicująca mężczyzn spokrewnionych w linii ojcowskiej. W badaniu przeanalizowano próbki DNA 534 niespokrewnionych mężczyzn w wieku od 16 do 62 lat. Próbkę DNA pochodziły z wymazów nabłonka jamy ustnej oraz krwi zasuszonej na bibule. Ekstrakcję DNA przeprowadzono z użyciem zestawu GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit, a ocena jakości i ilości materiału DNA została wykonana za pomocą zestawu Quantifiler Human DNA Quantification Kit. Wyniki walidacji zestawu Yfiler Plus wykazały, że metoda spełnia wszystkie wymagania postawione w założonych kryteriach akceptacji. Czulość analizy, wyznaczona doświadczalnie, odpowiadała założonym normom, co potwierdzono w pełnych profilach genetycznych uzyskanych dla zakresu DNA od 1,000 do 0,125 ng. Poniżej stężenia 0,062 ng liczba nieoznaczonych markerów wzrastała, a przy stężeniu 0,031 ng oznaczano jedynie pojedyncze markery, co czyniło te wyniki nieodpowiednimi do interpretacji. Wartość ST dla interpretacji profili Yfiler Plus ustalono na poziomie 550 rfu, natomiast poziom wykrywalności LOD - został określony na 50 rfu, a poziom oznaczalności LOQ na 150 rfu. Analiza proporcji DNA męskiego do żeńskiego wykazała, że przy stosunku 1:1000 utrata alleli składnika mniejszościowego (żeńskiego) była zauważalna, a przy proporcji 1:8000 nie oznaczono markerów Y-STR. Wyniki badań wskazują również na wysoką zgodność wyników uzyskanych przy użyciu zestawów Yfiler Plus oraz PowerPlex Y23. Jakość profili elektroforetycznych była porównywalna, co świadczy o precyzji i czułości metody. Uzyskane wyniki badań walidacyjnych pozwalają na stwierdzenie, iż zestaw Yfiler Plus PCR Amplification Kit w zakresie przydatności w identyfikacyjnych badaniach genetycznych wykonywanych w Pracowni DNA ZMS na UMB, przeszedł walidację pozytywnie. Badania walidacyjne są zgodne z wytycznymi SWGDAM. Analizy wielowymiarowego skalowania (MDS) oraz wariancji molekularnej (AMOVA) wykazały bliskie pokrewieństwo genetyczne z populacjami Litwy, Węgier i Rosji. Dodatkowo, badania wzbogaciły globalną bazę YHRD o 534 nowe haplotypy, co zwiększa precyzję analiz genetycznych w kontekście badań genetyczno-sądowych oraz genealogicznych. Zastosowanie zestawu Yfiler Plus okazało się skutecznym narzędziem w analizach kryminalistycznych, szczególnie przy badaniu śladów zawierających małe ilości męskiego DNA. Wysoka zdolność dyskryminacyjna zestawu, z wartością DC na poziomie

99,25%, potwierdza jego użyteczność w praktyce genetyki sądowej. Wyniki badań sugerują konieczność dalszych analiz na większych próbach z innych regionów Polski, co pozwoliłoby uzyskać jeszcze bardziej szczegółowy obraz zróżnicowania genetycznego populacji. Odkrycia dotyczące chromosomu Y pomagają nie tylko w rozumieniu historii ewolucyjnej i demograficznej ludzkości, ale również wnoszą znaczący wkład w genetykę sądową, umożliwiając dokładniejszą identyfikację i analizę w kontekście prawnym i historycznym. Wraz z postępem technologicznym i metodologicznym, badania te nadal będą ewoluować, oferując nowe możliwości i perspektywy w wielu dziedzinach nauki.

GENETIC POLYMORPHISM OF 27 Y-CHROMOSOME DNA MARKERS IN A POPULATION SAMPLE FROM NORTHEASTERN POLAND

VIII ABSTRACT

This doctoral dissertation focuses on the genetic analysis of men residing in northeastern Poland using the Yfiler Plus kit, which allows for the study of 27 Y-STR markers, including seven rapidly mutating markers, enabling the differentiation of men related through the paternal line. In the study, DNA samples from 534 unrelated men aged 16 to 62 were analyzed. The DNA samples were collected from buccal epithelial swabs and dried blood on filter paper. DNA extraction was performed using the GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit, and the quality and quantity of the DNA material were assessed using the Quantifiler Human DNA Quantification Kit. The results of the Yfiler Plus kit validation demonstrated that the method met all the criteria set in the acceptance guidelines. The sensitivity of the analysis, determined experimentally, matched the established standards, as confirmed by full genetic profiles obtained for DNA quantities ranging from 1,000 ng to 0.125 ng. Below the concentration of 0.062 ng, the number of undetected markers increased, and at 0.031 ng, only single markers were detected, making these results unsuitable for interpretation. The ST value for interpreting Yfiler Plus profiles was set at 550 rfu, while the limit of detection (LOD) was established at 50 rfu, and the limit of quantification (LOQ) at 150 rfu. The analysis of male-to-female DNA ratios revealed that at a ratio of 1:1000, the loss of alleles from the minority component (female) was noticeable, and at a ratio of 1:8000, Y-STR markers were not detected. The study results also indicated high concordance between

the results obtained using the Yfiler Plus and PowerPlex Y23 kits. The quality of the electrophoretic profiles was comparable, indicating the precision and sensitivity of the method. The results of the validation studies allow for the conclusion that the Yfiler Plus PCR Amplification Kit, in terms of its suitability for genetic identification studies conducted at the UMB DNA Laboratory, passed the validation successfully. The validation studies comply with SWGDAM guidelines. Multidimensional scaling (MDS) and molecular variance (AMOVA) analyses demonstrated a close genetic relationship with the populations of Lithuania, Hungary, and Russia. Additionally, the research enriched the global YHRD database with 534 new haplotypes, increasing the precision of genetic analyses in forensic and genealogical contexts. The use of the Yfiler Plus kit proved to be an effective tool in forensic analyses, particularly in the study of traces containing small amounts of male DNA. The high discriminatory power of the kit, with a DC value of 99.25%, confirms its usefulness in forensic genetics practice. The study results suggest the need for further analyses on larger samples from other regions of Poland, which would provide an even more detailed picture of the genetic diversity of the population. Discoveries related to the Y chromosome not only aid in understanding the evolutionary and demographic history of humanity but also make a significant contribution to forensic genetics, enabling more accurate identification and analysis in legal and historical contexts. As technological and methodological advancements continue, these studies will evolve, offering new opportunities and perspectives in many fields of science.

IX PIŚMIENNICTWO

1. Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing. 2nd ed. Chapter 2. Academic Press; 2010.
2. Zhang X, Tang Z, Wang B, Zhou X, Zhou L, Zhang G, Tian J, Zhao Y, Yao Z, Tian L, Zhang S, Xia H, Jin L, Li C, Li S. Forensic Analysis and Genetic Structure Construction of Chinese Chongming Island Han Based on Y Chromosome STRs and SNPs. *Genes*. 2022; 13:1363. doi:10.3390/genes13081363.
3. Maan AA, Eales J, Akbarov A, et al. The Y chromosome: a blueprint for men's health?. *Eur J Hum Genet*. 2017;25:1181-1188. doi:10.1038/ejhg.2017.128.
4. The Y Chromosome Consortium: A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res* 2002;12:339–348. doi: 10.1101/gr.217602.
5. Zhao GB, Miao L, Wang M, et al. Developmental validation of a high-resolution panel genotyping 639 Y-chromosome SNP and InDel markers and its evolutionary features in Chinese populations. *BMC Genomics*. 2023;24:611. doi:10.1186/s12864-023-09709-3.
6. Rębała K. Analiza polimorfizmu 18 loci STR chromosomu Y metodą kompleksowej reakcji PCR. Badania populacyjne i zastosowanie w ustalaniu pokrewieństwa. Gdańsk: Arch Katedry Zakł Med Sądowej AM Gdansk; 2006. <https://pbc.gda.pl/dlibra/doccontent?id=5767>.
7. Kayser M. Forensic use of Y-chromosome DNA: a general overview. *Hum Genet* 2017;136: 621–635. doi:10.1007/s00439-017-1776-9.
8. Pinto N, Gusmão L, Amorim A. Mutation and mutation rates at Y chromosome specific short tandem repeat polymorphisms (STRs): A reappraisal. *Forensic Sci Int Genet*. 2014;9:20-24. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.10.008.
9. Willuweit S, Roewer L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Sci Int Genet*. 2007;1:83-87. doi:10.1016/j.fsigen.2007.01.017.
10. Rębała K, Branicki W, Pawłowski R, et al. Recommendations of the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics on forensic Y chromosome typing. *Arch Med Sądowej Kryminol/Arch of Forensic Med and Criminol*. 2020:1-18. doi:10.5114/amsik.2020.97833.
11. Y chromosome haplotype reference database (YHRD). <https://www.yhrd.org>.

12. de Knijff P. On the forensic use of Y-chromosome polymorphisms. *Genes*. 2022;13:898. doi:10.3390/genes13050898.
13. Roewer L, Amemann J, Spurr NK, i wsp.. Simple repeat sequences on the human Y chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet*. 1992;89:389-394. doi:10.1007/BF00194309.
14. Butler JM. Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Forensic Sci Rev*. 2003;15:91-111.
15. Roewer L. Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol*. 2009;5:77-84. doi:10.1007/s12024-009-9089-5.
16. Perryman CL. Mapping studies. *J Med Libr Assoc*. 2016;104:79-82. doi:10.3163/1536-5050.104.1.014.
17. Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM. STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:320-322. doi:10.1093/nar/29.1.320.
18. Gołaszewska A, Skawrońska M, Niemcunowicz-Janica A, Pepiński W. Y-STR data of the Yfiler Plus panel in population of north-eastern Poland. Dane populacyjne dla markerów zestawu Yfiler Plus w populacji Polski północno-wschodniej. *Arch Med Sadowej Kryminol/Arch of Forensic Med and Criminol*. 2022;72:200-210. doi:10.4467/16891716AMSIK.22.022.17622.
19. Jacewicz R. Standardization of research in the field of forensic genetics – the current state in the world and introduction to the guidelines in Poland with reference to the work of the Expert Team for Standards and Assessment in Forensic Genetics of the Polish Speaking Working Group of the International Society for Forensic Genetics (ISFG-PL). *Arch Med Sadowej Kryminol/Archives of Forensic Medicine and Criminology*. 2018:215-231. doi:10.5114/amsik.2018.84531. DOI: <https://doi.org/10.5114/amsik.2018.84531>.
20. Novembre J, Stephens M. Interpreting principal component analyses of spatial population genetic variation. *Nat Genet*. 2008;40:646-649. doi:10.1038/ng.139.
21. Zhang J, Khan A, Kennard A, Grigg ME, Parkinson J. PopNet: A Markov Clustering Approach to Study Population Genetic Structure. *Mol Biol Evol*. 2017;34:1799-1811. doi:10.1093/molbev/msx110.
22. Jobling MA, Tyler-Smith C. Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era. *Nat Rev Genet*. 2017;18:485-497. doi:10.1038/nrg.2017.36.

23. Willuweit S, Roewer L. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;15:43-48. doi:10.1016/j.fsigen.2014.11.024.
24. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526:68-74. doi:10.1038/nature15393.
25. Gettings KB, Ballard D, Bodner M, et al. STRSeq: A catalog of sequence diversity at human identification Short Tandem Repeat loci. *Forensic Sci Int Genet.* 2017;31:111-117. doi:10.1016/j.fsigen.2017.08.017.
26. Phillips C, de la Puente M, Garcia O, et al. Building a forensic ancestry panel from the ground up: the EUROFORGEN Global AIM-SNP set. *Forensic Sci Int Genet.* 2014;11:13-25. doi:10.1016/j.fsigen.2014.02.012.
27. Grochowalski Ł, Jarczak J, Urbanowicz M, et al. Y-Chromosome Genetic Analysis of Modern Polish Population. *Front Genet.* 2020;11:567309. doi:10.3389/fgene.2020.567309.
28. Instytut Genetyki Sądowej. Haplogrupy chromosomu Y - poznaj swoje pochodzenie. <https://www.genetico.pl/haplogrupy-chromosomu-y-poznaj-swoje-pochodzenie/>. Data odczytu: 11.05.2023.
29. Y-DNA haplogroups in Europe. https://eupedia.com/europe/maps_Y-DNA_haplogroups.shtml. Data odczytu: 11.05.2023.
30. Navarro-López B, Granizo-Rodríguez E, Palencia-Madrid L, Raffone C, Baeta M, de Pancorbo MM. Phylogeographic review of Y chromosome haplogroups in Europe. *Int J Legal Med.* 2021;135:1675-1684. doi:10.1007/s00414-021-02644-6.
31. Thermo Fisher Scientific. Yfiler® Plus PCR Amplification Kit User Guide. 2015. <https://www.thermofisher.com>.
32. Gopinath S, Zhong C, Nguyen V, Ge J, Lagacé RE, Short ML, Mulero JJ. Developmental validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit: An enhanced Y-STR multiplex for casework and database applications. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;24:164-175. doi:10.1016/j.fsigen.2016.07.006.
33. Mulero J, Lagace R, Chang J, et al. Developmental validation of the Yfiler Plus PCR Amplification Kit. *Promega 25th International Symposium on Human Identification; 2014. 25th ISHI Conference; 2014.*
34. Phan A. Validation of YFiler Plus Amplification Kit for the San Diego Police Department. 2017.

35. Zeng Y, Chen L, Wang M, et al. The Validation of a Single Multiplex Typing System With 45 Y-STR Markers for Familial Searching and Database Construction. *Front Genet.* 2022;13:842004. doi:10.3389/fgene.2022.842004.
36. Pickrahn I, Müller E, Zahrer W, et al. Yfiler(®) Plus amplification kit validation and calculation of forensic parameters for two Austrian populations. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;21:90-94. doi:10.1016/j.fsigen.2015.12.014.
37. Kieser JA, Solheim T, Gibbs F. Validation of Yfiler Plus in high-volume forensic casework labs. *Int J Legal Med.* 2016;130:369-375.
38. Martin PD, Schmitter H, Schneider PM. A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int.* 2001;119:225-231. doi:10.1016/s0379-0738(00)00436-9.
39. Oracle Polska. Czym jest baza danych | Oracle Polska. Oracle. <https://www.oracle.com/pl/database/what-is-database/>. Data odczytu: 13.02.2023.
40. Baza danych - Encyklopedia PWN. <https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/baza-danych>. Data odczytu: 13.02.2023.
41. Podstawowe definicje. Właściwości baz danych. <http://bazy.rzeszow.pl/klasa2/1.pdf>. Data odczytu: 13.02.2023.
42. Santos F, Machado H, Silva S. Forensic DNA databases in European countries: is size linked to performance? *Life Sci Soc Policy.* 2013;9:12. doi:10.1186/2195-7819-9-12.
43. RODZAJE BAZ DANYCH I ICH BUDOWA – Siteor. https://fs.siteor.com/ecdl/files/RODZAJE_BAZ_DANYCH_I_ICH_BUDOWA.pdf?1289369360.1. Data odczytu: 13.02.2023.
44. Syndercombe Court D. The Y chromosome and its use in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci.* 2021;5:427-441. doi:10.1042/ETLS20200339.
45. National DNA Database documents and statistics. GOV.UK. Aktualizacja 22.05.2024. <https://www.gov.uk/government/statistics/national-dna-database-statistics>.
46. SWGDAM FAQs. <https://www.swgdam.org/faq>. Data odczytu: 25.06.2023.
47. Ensembl Genome Browser. <https://www.ensembl.org/index.html>. Data odczytu: 25.06.2023.
48. Jacewicz R, Krajewski P, Ulewicz D, et al. Y-STR Polska--baza danych do oceny wartości dowodowej w genetyce sądowej [Y-STR Poland--a database for evaluation of evidence value in forensic genetics]. *Arch Med Sądowej Kryminol/Arch of Forensic Med and Criminol.* 2011;61:146-152.

49. Genetyka Sądowa - Uniwersytet Medyczny w Łodzi. <https://genetyka-sadowa.umed.pl/>. Data odczytu: 30.06.2023.
50. Jurga A, Modzelewski J, Funkcjonowanie bazy danych DNA w Polsce. *Probl Kryminalist.* 2017; 297: 14-20. doi: 10.34836/pk.2017.297.2.
51. Ćwik K. Elimination DNA database – an opportunity or a threat? A review of the functioning of elimination databases in selected countries. *Probl Kryminalist.* 2017; 295: 3-17.
52. Butler JM. Forensic DNA Advisory Groups: DAB, SWGDAM, ENFSI, and BSAG. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 2nd ed. 2012.
53. ENFSI DNA Working Group. DNA Database Management Review and Recommendations. April 2016.
54. Thermo Fisher Scientific. Product Sheet: Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit (100 and 500 reactions). Thermo Fisher Scientific; 2015.
55. Gouy A, Zieger M. STRAF-A convenient online tool for STR data evaluation in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet* 2017; 30: 148-151. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.007.
56. Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York, NY: Columbia University Press; 1987:179.
57. Botstein D, White RL, Skalnick MH, Davies RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1980;32:314-331.
58. Balding DJ, Nichols RA. DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. *Forensic Sci Int.* 1994;64(2-3):125-140. doi:10.1016/0379-0738(94)90222-4.
59. Kloosterman AD, Kersbergen P. Validation and implementation of DNA typing methods in forensic casework. *Forensic Sci Int.* 2003;133:186-195.
60. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. SWGDAM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. *Forensic Sci Commun.* 2016;18.
61. Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd ed. London: Elsevier Academic Press; 2005.
62. ENFSI DNA Working Group. Validation and Implementation of (New) DNA Technologies in Forensic Genetics. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;21:18-22.
63. Butler JM. *Quality Assurance and Validation. w: Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Elsevier, 2011.

64. DNA Advisory Board (DAB). Quality Assurance Standards for Forensic DNA Testing Laboratories and Quality Assurance Standards for Convicted Offender DNA Databasing Laboratories, *Forensic Sci Commun*. Volume 2, Number 3.
65. Guidelines for the single laboratory Validation of Instrumental and Human Based Methods in Forensic Science. <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2017/06/Guidance-QCC-VAL-002.pdf>.
66. Semino O, Passarino G, Oefner PJ, et al. The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science*. 2000;290:1155-1159. doi:10.1126/science.290.5494.1155.
67. Gusmão L, Butler JM, Linacre A, et al. Revised guidelines for the publication of genetic population data. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;30:160-163. doi:10.1016/j.fsigen.2017.06.007.
68. Alipour Tabrizi A. Forensic Human Y-Chromosome Markers: Principles and Applications. In: Dash HR, Shrivastava P, Lorente JA, eds. *Handbook of DNA Profiling*. Singapore: Springer; 2022.
69. Ploski R, Wozniak M, Pawlowski R, et al. Homogeneity and distinctiveness of Polish paternal lineages revealed by Y chromosome microsatellite haplotype analysis. *Hum Genet*. 2002;110:592-600. doi:10.1007/s00439-002-0728-0.
70. Spólnicka M, Dąbrowska J, Szabłowska-Gnap E, et al. Intra- and inter-population analysis of haplotype diversity in Yfiler[®] Plus system using a wide set of representative data from Polish population. *Forensic Sci Int Genet*. 2017;28:e22-e25. doi:10.1016/j.fsigen.2017.01.014.
71. Rapone C, D'Atanasio E, Agostino A, et al. Forensic genetic value of a 27 Y-STR loci multiplex (Yfiler1 Plus kit) in an Italian population sample. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;21. doi:10.1016/j.fsigen.2015.11.006.
72. Olofsson JK, Mogensen HS, Buchard A, et al. Forensic and population genetic analyses of Danes, Greenlanders and Somalis typed with the Yfiler Plus PCR amplification kit. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;16:232-236. doi:10.1016/j.fsigen.2015.02.006.
73. Ottaviani E, Vernarecci S, Asili P, et al. Preliminary assessment of the prototype Yfiler1 Plus kit in a population study of Northern Italian males. *Int J Legal Med*. 2015;129:729-730. doi: 10.1007/s00414-014-1078-x.
74. Abreu-Głowacka M, Zaba C, Koralewska-Kordel M, Michalak E, Przybylski Z. Badania populacji Wielkopolski w zakresie 17 markerów Y-STRs oraz 8 Y-SNPs

- [Polish population data for 17 Y-STRs and 8 Y-SNPs markers]. Arch Med Sadowej Kryminol/Arch of Forensic Med and Criminol. 2013;63:201-215.
75. Pepinski W, Niemcunowicz-Janica A, Ptaszynska-Sarosiek I, et al. Population genetics of Y-chromosome STRs in a population of Podlasie, Northeastern Poland. Forensic Sci Int. 2004;144:77-82. doi:10.1016/j.forsciint.2004.02.024.
 76. Diaz-Lacava A, Walier M, Willuweit S, et al. Geostatistical inference of main Y-STR-haplotype groups in Europe. Forensic Sci Int Genet. 2011;5:91-94. doi:10.1016/j.fsigen.2010.09.010.
 77. Watahiki H, Fujii K, Fukagawa T, et al. Validation of the Yfiler® Plus PCR Amplification Kit for forensic purposes. Jpn J Forensic Sci Technol. 2017;23. doi:10.3408/jafst.730.
 78. Hallenberg C, Tomas C, Simonsen B, Morling N. Y-chromosome STR haplotypes in males from Greenland. Forensic Sci Int Genet 2009;3:145-146. doi:10.1016/j.fsigen.2008.11.012.
 79. Aliferi A, Thomson J, McDonald A, Molin V, Ferguson S, Vanhinsbergh D, Syndercombe D, Ballard D. UK and Irish Y-STR population data — A catalogue of variant alleles. For Sci Int Genetics 2018;34:1-6. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.02.018.
 80. Jankauskiene J, Kukiene J, Ivanova V, Aleknaviciute G. Population data and forensic genetic evaluation with the Yfiler™ Plus PCR Amplification kit in the Lithuanian population. Forensic Sci Int Genet Suppl Ser 2017;6:606-607. doi:10.1016/j.fsigss.2017.10.009.
 81. Zgonjanin D, Alghafri R, Antov M, Stojiljković G, Petković S, Vuković R, Drašković D. Genetic characterization of 27 Y-STR loci with the Yfiler® Plus kit in the population of Serbia', Forensic Sci Int Genet 2017;31:48-49. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.013.
 82. Primorac D, Škaro V, Projić P, Missoni S, Zanki H, Merkaš S, Šarac J, Novokmet N, Ledić A, Makar A et al. Croatian genetic heritage: an updated Y-chromosome story. Croat Med J 2022;63:273-286. doi:10.3325/cmj.2022.63.273.
 83. Olofsson JK, Mogensen HS, Buchard A, Børsting C, Morling N. Forensic and population genetic analyses of Danes, Greenlanders and Somalis typed with the Yfiler® Plus PCR amplification kit. Forensic Sci Int Genet 2015; 16: 232-236. doi:10.1016/j.fsigen.2015.02.006.
 84. Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelmann J, Elias S, Heinrich M, Henke J, Henke L et al. Significant genetic differentiation between Poland and

- Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum Genet* 2005;117:428-43. doi:10.1007/s00439-005-1333-9.
85. Pamjav H, Fóthi Á, Fehér T, Fóthi E. A study of the Bodrogeköz population in north-eastern Hungary by Y chromosomal haplotypes and haplogroups. *Mol Genet Genomics*. 2017;292:883-894. doi:10.1007/s00438-017-1319-z.
86. Rapone C, D'Atanasio E, Agostino A, Mariano M, Papaluca MT, Cruciani F, Berti A. Forensic genetic value of a 27 Y-STR loci multiplex (Yfiler®) Plus kit) in an Italian population sample. *Forensic Sci Int Genet* 2016;21:e1-5. doi:10.1016/j.fsigen.2015.11.006.
87. Lacerenza D, Aneli S, Di C, Critelli R, Piazza A, Matullo G, Culigioni C, Robledo R, Robino C, Calò C. Investigation of extended Y chromosome STR haplotypes in Sardinia. *Forensic Sci Int Genet* 2017;27:172-174. doi:10.1016/j.fsigen.2016.12.009.
88. Westen AA, Kraaijenbrink T, Clarisse L, Grol LJ, Willemse P, Zuniga SB, De R, Schouten R, Der V, Weiler NE et al. Analysis of 36 Y-STR marker units including a concordance study among 2085 Dutch males. *Forensic Sci Int Genet* 2015;14:174-181. doi:10.1016/j.fsigen.2014.10.012.
89. Woźniak M, Derenko M, Malyarchuk B, Dambueva I, Grzybowski T, Miścicka-Sliwka D. Allelic and haplotypic frequencies at 11 Y-STR loci in Buryats from South-East Siberia. *Forensic Sci Int*. 2006;164:271-275. doi:10.1016/j.forsciint.2005.11.023.
90. Semikhodskii A, Krassotkin Y, Makarova T, Zavarin V, Ilina V, Sutyagina D. Population genetic data and forensic parameters of the 27 Y-STR panel Yfiler® Plus in Russian population [published correction appears in *Int J Legal Med*. 2021 May 6]. *Int J Legal Med* 2021;135:1785-1787. doi:10.1007/s00414-021-02599-8.
91. Sterlinko H, Pajnic IZ, Balazic J, Komel R. Human Y-specific STR haplotypes in a Slovenian population sample. *Forensic Sci Int*. 2001;120:226-228. doi:10.1016/s0379-0738(01)00390-5.
92. Zieger M, Utz S. The Y-chromosomal haplotype and haplogroup distribution of modern Switzerland still reflects the alpine divide as a geographical barrier for human migration. *For Sci Int Genet* 2020;48:102345. doi:10.1016/j.fsigen.2020.102345.
93. Purps J, Siegert S, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Salazar R, Angustia SM, Santos LH, Anslinger K, Bayer B, et al. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Sci Int Genet* 2014;12:12-23. doi:10.1016/j.fsigen.2014.04.008.

94. Claerhout S, Roelens J, Der V, Verstraete P, Larmuseau MHD, Decorte R. Ysurnames? The patrilineal Y-chromosome and surname correlation for DNA kinship research', *For Sci Int Genet* 2020;44:102204. doi:10.1016/j.fsigen.2019.102204.
95. Pickrahn I, Müller E, Zahrer W, Dunkelmann B, Cemper-Kiesslich J, Kreindl G, Neuhuber F. Yfiler(®) Plus amplification kit validation and calculation of forensic parameters for two Austrian populations. *Forensic Sci Int Genet* 2016;21:90-94. doi:10.1016/j.fsigen.2015.12.014.
96. Niederstätter H, Berger B, Kayser M, Parson W. Differences in urbanization degree and consequences on the diversity of conventional vs. rapidly mutating Y-STRs in five municipalities from a small region of the Tyrolean Alps in Austria. *Forensic Sci Int Genet* 2016;24:180-193. doi:10.1016/j.fsigen.2016.07.009.
97. García O, Yurrebaso I, Mancisidor ID, López S, Alonso S, Gusmão L. Data for 27 Y-chromosome STR loci in the Basque Country autochthonous population. *Forensic Sci Int Genet* 2016;20:e10-e12. doi:10.1016/j.fsigen.2015.09.010.
98. Huszar TI, Bodmer WF, Hutnik K, Wetton JH, Jobling MA. Sequencing of autosomal, mitochondrial and Y-chromosomal forensic markers in the People of the British Isles cohort detects population structure dominated by patrilineages. *Forensic Sci Int Genet.* 2022;59:102725. doi:10.1016/j.fsigen.2022.102725.
99. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
100. Boc A, Diallo AB, Makarenkov V. T-REX: a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Web Server issue):W573-W579. doi:10.1093/nar/gks485.
101. Soltyszewski, I, Pepinski, W, Wolanska-Nowak P, Maciejewska A, Paszkowska R, Abreu-Glowacka M, Achrem W, Jonkisz A, Lebioda A, Konarzewska M, et al. Polish population data on 15 autosomal STRs of AmpFISTR NGM PCR kit. *Forensic Sci Int Genet.* 2014,9,142–149. doi:10.1016/j.fsigen.2013.12.002.
102. Jarczak J, Grochowalski L, Marciniak B, Lach J, Słomka M, Sobalska-Kwapis M, Lorkiewicz W, Pułaski L, Strapagiel D. Mitochondrial DNA variability of the Polish population. *Eur J Hum Genet.* 2019, 27, 1304–1314. doi:10.1038/s41431-019-0381-x.

X SPIS TABEL I RYCIN

1. Spis Tabel

Tabela 1. Drabina alleliczna Yfiler Plus zawierająca znaczniki alleli <i>loci</i> zestawu Yfiler plus wyznakowane pięcioma różnymi fluorochromami.....	30
Tabela 2. Wartości cech charakterystycznych metody Yfiler Plus.....	35
Tabela 3. Wyniki oznaczeń rozcieńczeń Control DNA 007 po amplifikacji zestawem Yfiler Plus.....	38
Tabela 4. Poziomy LOQ, LOD i ST.....	39
Tabela 5. Proporcje mieszanin DNA ♀ : ♂ do amplifikacji zestawem Yfiler Plus.....	40
Tabela 6. Wyniki analizy mieszanin ♀ : ♂ po amplifikacji zestawem Yfiler Plus.....	41
Tabela 7. Średnie długości alleli drabiny zestawu Yfiler Plus (elektroforeza powtórzona 8x).....	43
Tabela 8. Średnie długości alleli dla ośmiu próbek drabiny Yfiler Plus (elektroforeza powtórzona 3x).....	46
Tabela 9. Średni procent minus i plus <i>stutter</i> dla <i>loci</i> zestawu Yfiler Plus.....	54
Tabela 10. Parametry biostatystyczne <i>loci</i> zestawu Yfiler Plus w próbie populacyjnej 534 mężczyzn z regionu Polski pn-wsch.....	57
Tabela 11. Wartości FST (poniżej przekątnej) i odpowiadające im wartości p (powyżej przekątnej) w analizie AMOVA dla par populacji.....	58

2. Spis Rycin

Rycina 1. Nić DNA zawiera regiony kodujące oraz regiony niekodujące. Region kodujący tworzą eksony i introny.....	5
Rycina 2. Drzewo filogenetyczne <i>neighbor-joining</i> (NJ) wykreślone na podstawie macierzy odległości FST badanej populacji i 17 populacji europejskich.....	59
Rycina 3. Wykres MDS wykreślony na podstawie macierzy odległości FST badanej populacji i 17 populacji europejskich.....	60