

Tomasz Kupiec, Wojciech Branicki

Badania genetyczne domniemanych szczątków generała Władysława Sikorskiego

Genetic analysis of the putative remains of general Władysław Sikorski

Z Instytutu Ekspertyz Sądowych im. prof. dra Jana Sehna w Krakowie
Dyrektor: dr hab. M. Kała

Praca przedstawia wyniki identyfikacyjnych badań genetycznych przeprowadzonych na materiale pobranym podczas ekshumacji domniemanych zwłok generała Władysława Sikorskiego pochowanego w sarkofagu w Krypcie św. Leonarda w Katedrze na Wawelu. Z zabezpieczonych do badań genetycznych próbek – fragmentu kości udowej oraz zęba uzyskano pełny komplet wyników w zakresie analizy autosomalnych markerów typu STR, markerów Y-STR oraz sekwencji regionów HVI i HVII mitochondrialnego DNA. Taki sam profil mtDNA oznaczono również we włosach ujawnionych na spodenkach i koszuli zabezpieczonych na zwłokach. Profil mitochondrialnego DNA oznaczony w materiale kostnym oraz we włosach okazał się zgodny z profilem charakterystycznym dla krewnej w linii matczynej generała Władysława Sikorskiego. Uzyskany dowód przemawia na korzyść hipotezy, że zwłoki będące przedmiotem badań należą do generała Sikorskiego. Przeprowadzona dodatkowo analiza pozycji SNP rs12913832 zlokalizowanej w genie *HERC2* wykazała obecność genotypu C/C, co sugeruje, że generał Władysław Sikorski posiadał jasny (najprawdopodobniej niebieski) kolor oczu.

The paper presents results of genetic identification studies carried out in material collected during exhumation of the putative body of general Władysław Sikorski, buried in a sarcophagus in Saint Leonard's crypt in the Wawel Cathedral. The analysis of STR-type autosomal markers, Y-STR markers and sequences of HVI and HVII regions of mitochondrial DNA carried out in samples collected for genetic analysis – fragments of the thigh bone and a tooth – yielded a full set of results. The same mtDNA

profile was also determined in hair revealed on the underpants and shirt secured from the studied body. The mitochondrial DNA profile determined in the bone material and also in the hair matched the profile characteristic for a female relative through the maternal line of general Władysław Sikorski. The obtained evidence supports the hypothesis that the studied body is that of general Sikorski. An additional analysis of position SNP rs12913832 located on the *HERC2* gene revealed the presence of genotype C/C, which suggests that general Władysław Sikorski had light (most probably blue) eyes.

Słowa kluczowe: generał Władysław Sikorski, szczątki ludzkie, identyfikacja genetyczna, mtDNA

Key words: general Władysław Sikorski, human remains, genetic identification, mtDNA

WSTĘP

Proces identyfikacji zwłok ofiar katastrof, zamachów terrorystycznych oraz konfliktów zbrojnych należy do najpoważniejszych zadań współczesnych nauk sądowych. Na skutek naturalnego procesu rozkładu ciała oraz wpływu niekorzystnych czynników zewnętrznych, często nie jest możliwe ustalenie charakterystycznych cech wyglądu osoby będącej przedmiotem identyfikacji i zastosowanie najprostszej metody jej identyfikacji polegającej na rozpoznaniu. Brak dostępu do danych medycznych, a zwłaszcza kart dentystycznych, jak również danych daktyloskopijnych ogranicza możliwość wykorzysta-

nia podstawowych metod kryminalistycznych, a w konsekwencji sprawia, że jedyną skuteczną metodą identyfikacji włók pozostaje porównawcza analiza DNA. Wysoka skuteczność technik genetycznych wynika przede wszystkim z ich wysokiej czułości, która umożliwia analizę szczątków o znacznym stopniu rozkładu biologicznego, a także tych, które podlegały działaniu skrajnie niekorzystnych czynników fizycznych i chemicznych. Co więcej, współczesna genetyka sądowa dysponuje różnorodnymi markerami genetycznymi, w tym polimorficznymi sekwencjami zlokalizowanymi w dziedzicznym w linii matczynej mitochondrialnym DNA oraz w linii ojcowskiej chromosomie Y. Dzięki ich zastosowaniu, nawet przy braku najbliższej rodziny możliwe jest przeprowadzenie analizy porównawczej w oparciu o materiał pochodzący od dalekich krewnych, również tych żyjących w znacznym odstępie czasowym od osoby identyfikowanej.

Stan zachowania domniemanych włók generała Sikorskiego, będących przedmiotem niniejszych badań, uniemożliwił ich identyfikację przez rodzinę i świadków. Brak zachowanych kart daktyloskopijnych, kart dentystycznych i innych danych medycznych dotyczących generała Władysława Sikorskiego uniemożliwił ich wykorzystanie w procesie identyfikacji, który w tej sytuacji mógł polegać jedynie na analizie DNA. W czasie sekcji włók do badań genetycznych zabezpieczono fragmenty tkanek kostnych, które stanowią najlepszy rodzaj materiału badawczego. W charakterze materiału porównawczego wykorzystano próbkę DNA pochodzącą od wnuczki siostry generała. Podjęto również próbę pozyskania materiału genetycznego pochodzącego bezpośrednio od generała. W tym celu zabezpieczono ślady materiału biologicznego z należącej do niego odzieży i przedmiotów osobistego użytku przekazanych przez najbliższą rodzinę oraz udostępnionych przez Muzeum Wojska Polskiego w Warszawie. Zgodnie z przedstawionym przez Instytut Pamięci Narodowej postanowieniem pobrano i poddano analizie genetycznej ślady biologiczne z elementów odzieży znalezionej przy zwłokach będących przedmiotem ekshumacji.

MATERIAŁY I METODY

Materiał dowodowy

W czasie sądowo-lekarskich oględzin i sekcji włók, do badań identyfikacyjnych pobrano fragment kości udowej (K1) oraz ząb-kiel (Z1). Badaniom biologicznym, zgodnie z treścią

postanowienia, poddano także zabezpieczone fragmenty odzieży znalezione na zwłokach w postaci: chusteczki materiałowej, podkoszulka, ocieplacza na biodra, spodenek, fragmentu obszycia podkoszulka, koszuli, fragmentu taśm materiałowych oplatających stopy, kolana i kciuk, fragmentu dwóch kocy barwy khaki, oraz poduszki. W trakcie przeprowadzonych oględzin ujawniono na koszuli oraz spodenkach obecność włosów ludzkich, z których pięć pobrano do badań genetycznych (W1-W5).

Materiał porównawczy

Jako materiał porównawczy pobrano wymaz ze śluzówki jamy ustnej krewnej w linii matczynej generała Władysława Sikorskiego, pani Ewy Wojtasik (P1). Przedmiotem badań był również materiał biologiczny obecny na przedmiotach osobistego użytku generała Władysława Sikorskiego i zabezpieczony z nich za pomocą taśm do zbierania mikrośladów oraz jałowych pałeczek wymazowych. Badaniom poddano: 8 śladów (S1-S8) pobranych z pantofli i szczotki do munduru przekazanych przez krewną Generała, a także 27 śladów biologicznych (S9-S35) pobranych z elementów umundurowania i przedmiotów udostępnionych przez Muzeum Wojska Polskiego w Warszawie.

Próbki materiału kostnego (K1, Z1) poddano procesowi oczyszczania – myto pod bieżącą wodą, w 15% podchlorynie sodu, a następnie w 70% etanolu. Dodatkowo zostały one poddane działaniu promieniowania UV. Tak przygotowany materiał, po wysuszeniu, poddano kruszeniu w ciekłym azocie z zastosowaniem aparatu FreezerMill 6750 (Spex CertiPrep, Matuchen, USA). Około 3 g proszku kostnego inkubowano w temperaturze 56°C przez noc w obecności 3 ml buforu lizującego (0,5M EDTA, 10% SDS) z dodatkiem 225 µl proteiny K (10 mg/ml) oraz 120 µl 1M DTT. Po inkubacji próbki kości poddano dwukrotnej ekstrakcji zbuforowaną mieszaniną fenolu, chloroformu i alkoholu izoamylowego (Sigma Chemical, Steinhaim, Niemcy), a następnie zagęszczano na kolumnkach typu Amicon Ultra – 15 (Millipore, Billerica, USA).

Izolacja materiału genetycznego z zabezpieczonych włosów (W1-W5) poprzedzona została ich wstępnym trawieniem w buforze lizującym z dodatkiem proteiny K (10 mg/ml), a następnie płukaniem sterylną wodą. Zabiegi te prowadzono w celu pozbycia się ewentualnych cząsteczek obcego DNA z powierzchni włosów.

Ślady biologiczne (S1-S35), materiał porównawczy (P1) oraz włosy (W1-W5) poddano

izolacji DNA z wykorzystaniem aparatu BioRobot M48 oraz zestawu MagAttract DNA Mini M48 Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Stężenie DNA określono za pomocą zestawu Pico[®]Green ds. DNA Quantitation Kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) z zastosowaniem aparatu Fluoroskan Ascent FL. DNA wyizolowany z próbek materiału kostnego (K1, Z1), materiału porównawczego (P1) oraz próbek S1-S35 poddano analizie autosomalnych markerów typu STR, wchodzących w skład zestawu AmpFISTR[®] Identifiler[®] lub/i MiniFiler[®] (Applied Biosystems, Foster City, USA). Próbkę, w której stwierdzono obecność męskiego komponentu DNA, poddano następnie analizie markerów Y-STR wchodzących w skład zestawu AmpFISTR[®] Yfiler[®] (Applied Biosystems, Foster City, USA). Reakcje amplifikacji prowadzono z zastosowaniem aparatu GenAmp 9700 thermocycler, a rozdział produktów PCR z zastosowaniem analizatora genetycznego ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems, Foster City, USA). Stosowano przy tym oryginalne protokoły producenta.

Materiał genetyczny wyizolowany z fragmentów kostnych K1 i Z1, materiału porównawczego P1, jak również uzyskany z pobranych w czasie oględzin odzieży włosów W1-W5 został poddany analizie super-zmiennych regionów mitochondrialnego DNA HVI i HVII. Reakcję amplifikacji prowadzono w całkowitej objętości 20 μ l. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodził 10 μ l Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy), 1 μ l starterów PCR [1] oraz 9 μ l matrycy DNA. Rezultaty amplifikacji sprawdzano przy użyciu elektroforezy kapilarnej na aparacie Qiaxcel (Qiagen, Hilden, Niemcy). 5 μ l produktu PCR oczyszczano za pomocą zestawu Exo-SAP IT (Amersham Pharmacia, Freiburg, Niemcy) i poddawano reakcji sekwencjonowania. Sekwencjonowanie prowadzono z użyciem starterów zastosowanych do amplifikacji i zestawu BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 1.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Produkty sekwencjonowania oczyszczono przy użyciu zestawu Centri Sep[™] Column (Applied Biosystems, Foster City, USA), a następnie rozdzielano elektroforetycznie z użyciem analizatora ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Otrzymane sekwencje analizowano i porównywano do sekwencji referencyjnej przy pomocy programu SeqScape (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Próbkę kości Z1 dodatkowo poddano analizie polimorficznej pozycji SNP rs12913832. Obecność w tej pozycji nukleotydowej *allele* C

prowadzi do zmniejszenia ekspresji genu *OCA2* i jest silnie skorelowana z niebieskim kolorem tęczówki oczu [2, 3]. Analizę wykonano z użyciem metody wydłużania startera i zestawu SNaPshot multiplex kit stosując uprzednio zastosowaną procedurę [4].

WYNIKI

Uzyskano pełne profile DNA w zakresie polimorficznych markerów DNA typu STR zlokalizowanych na chromosomach autosomalnych oraz na chromosomie Y. Te same profile oznaczono przy tym w obu analizowanych fragmentach kostnych (próbki Z1 i K1). Badania genetyczne potwierdziły, że analizowane próbki pochodzą od mężczyzny. Otrzymane wyniki analizy polimorficznych markerów DNA jądrowego zamieszczono w tabelach I i II.

Tab. I. Wyniki badania autosomalnych markerów typu STR dla pobranych fragmentów kostnych.

Tab. I. Analysis results of autosomal STR markers of secured bone samples.

Układ polimorficzny Polymorphic system	Z1	K1
D8S1179	11,16	11,16
D21S11	29,30	29,30
D7S820	8,12	8,12
CF1PO	10,12	10,12
D3S1358	15,16	15,16
TH01	6,8	6,8
D13S317	11	11
D16S539	9,11	9,11
D2S1338	18,21	18,21
D19S433	12,16.2	12,16.2
VWA	16,17	16,17
TPOX	8	8
D18S51	17,19	17,19
Amelogenina	X,Y	X,Y
D5S818	11,12	11,12
FGA	23,24	23,24

Tab. II. Wyniki badania markerów typu Y-STR dla pobranych fragmentów kostnych.

Tab. II. Analysis results of Y-STR markers of secured bone samples.

Układ polimorficzny Polymorphic system	Z1	K1
DYS456	15	15
DYS389I	13	13
DYS390	24	24
DYS389II	29	29
DYS458	16	16
DYS19	14	14
DYS385	10,14	10,14
DYS393	12	12
DYS391	11	11
DYS439	13	13
DYS635	23	23
DYS392	13	13
Y GATA H4	13	13
DYS437	15	15
DYS438	12	12
DYS448	19	19

Ze względu na dostępność materiału porównawczego pochodzącego od krewnej generała Władysława Sikorskiego w linii matczynej, w badanym przypadku celowa była analiza polimorficznych sekwencji regionów HVI i HVII mitochondrialnego DNA. Badania wykazały obecność takiego samego profilu mtDNA w obu badanych próbkach materiału kostnego oraz w próbce materiału porównawczego pochodzącej od krewnej generała. Odnotowane różnice w otrzymanych sekwencjach DNA względem sekwencji referencyjnej rCRS przedstawiono w tabeli III.

Analiza pozycji SNP rs12913832 zlokalizowanej w genie *HERC2*, przeprowadzona dla jednej z próbek kości, wykazała obecność homozygotycznego genotypu C/C, który występuje głównie u osób o niebieskim kolorze oczu.

Poszukiwania materiału porównawczego pochodzącego bezpośrednio od generała Władysła

wa Sikorskiego prowadzono analizując ślady biologiczne (S1-S35) pobrane z przekazanych do badań elementów odzieży i przedmiotów osobistego użytku generała. Do badań wykorzystano markery DNA jądrowego. Pozytywne wyniki analizy otrzymano dla 7 zabezpieczonych śladów biologicznych. Uzyskane profile genetyczne pochodziły w czterech przypadkach od kobiety, dalsze dwa stanowiły mieszaninę materiału genetycznego pochodzącego, od co najmniej dwóch osób. W przypadku jednej próbki, ujawniono profil DNA należący do mężczyzny. Wykonana analiza regionów HVI i HVII mitochondrialnego DNA w tej próbce wykazała jednak, że uzyskany haplotyp jest różny od oznaczonego w materiale porównawczym pobranym od Ewy Wojtasik.

Tab. III. Wyniki analizy mitochondrialnego DNA.

Tab. III. Results of mitochondrial DNA analysis.

Próbka Sample	Różnice odnotowane w regionach HVI i HVII względem rCRS Differences observed in HVI and HVII regions according to rCRS	Badany zakres Analysed region
P1	16183C, 16189C, 16193.1C, 16311C, 263G, 315.1C	16024-16365 73-340
Z1, K1	16183C, 16189C, 16193.1C, 16311C, 263G, 315.1C	16024-16365 73-340

Na odzieży zabezpieczonej w czasie sekcji zwłok pochowanych jako generał Władysław Sikorski zabezpieczono i poddano analizie mitochondrialnego DNA pięć włosów ludzkich. We wszystkich oznaczono taki sam haplotyp mitochondrialnego DNA zgodny z haplotypem stwierdzonym w próbkach materiału kostnego i charakterystycznym dla krewnej generała (tabela III).

WNIOSKI

Jednym z zasadniczych celów ekshumacji i kompleksowych badań domniemanych szczątków generała Władysława Sikorskiego, zleconych przez Oddziałową Komisję Ścigania Zbrodni przeciwko Narodowi Polskiemu w Katowicach, była identyfikacja zwłok. Ze względu na daleko posunięty rozkład ciała, proces jego identyfikacji oparto na porównawczej analizie materiału genetycznego.

Przeprowadzone badania genetyczne pobranych ze zwłok fragmentów kostnych (Z1, T1),

pomimo daleko posuniętego rozkładu tkanek miękkich, umożliwiły uzyskanie pełnego zestawu wyników badanych markerów autosomalnych typu STR, markerów typu STR chromosomu Y, a także analizowanych fragmentów HVI i HVII mitochondrialnego DNA.

Poszukiwania materiału porównawczego pochodzącego bezpośrednio od Władysława Sikorskiego na przedmiotach i odzieży udostępnionych przez krewną generała oraz Muzeum Wojska Polskiego w Warszawie, nie pozwoliły na odnalezienie próbek DNA, które mogłyby być użyteczne w procesie identyfikacyjnym. Uzyskane z zabezpieczonych śladów profile genetyczne markerów autosomalnych typu STR pochodzą od kobiet lub stanowią mieszaninę DNA, co wykluczało ich użyteczność w charakterze materiału porównawczego. Wiarygodność pojedynczego śladu biologicznego pochodzącego od mężczyzny podważono po uzyskaniu wyniku analizy mitochondrialnego DNA. W związku z tym, że posiadał on profil mitochondrialnego DNA różny od ujawnionego w materiale porównawczym pobranym od krewnej generała, próbka ta nie mogła pochodzić od generała. Ze względu na brak wiarygodnego materiału biologicznego pochodzącego bezpośrednio od Władysława Sikorskiego, badania identyfikacyjne szczątków prowadzono wykorzystując wyłącznie materiał porównawczy pobrany od biologicznej krewnej generała w linii matczynej. Uzyskana zgodność profili mtDNA w próbkach materiału kostnego i włosów pobranych w trakcie ekshumacji domniemanych zwłok generała Sikorskiego z profilem mtDNA Ewy Wojtasik przekonuje, że badane szczątki mogą pochodzić od generała Władysława Sikorskiego. W przypadku analizy mtDNA przyjętym sposobem oszacowania wartości dowodowej stwierdzonej zgodności profili genetycznych jest analiza częstości występowania haplotypu w bazie danych. Przeprowadzona analiza kryminalistycznej bazy EMPOP (www.empop.org) wykazała, że haplotyp mtDNA charakterystyczny dla badanych szczątków oraz krewnej generała nie pojawił się wśród 3831 osób zamieszkujących obszar euroazjatycki [5]. Na tej podstawie można dalej obliczyć maksymalną częstość haplotypu w populacji [6], która w tym przypadku wynosi 0,00077. Oznacza to, że oznaczony profil mtDNA może pojawić się u 1 na 1294 niespokrewnionych osób. Obliczone na podstawie uzyskanych badań genetycznych prawdopodobieństwo pokrewieństwa pomiędzy badanymi osobami, przy założeniu 50% prawdopodobieństwa *a priori*, jest równe 99,92% i w tym

przypadku może zostać uznane za silny dowód na to, że badane szczątki należały do generała Władysława Sikorskiego.

Wykonana dodatkowo analiza polimorfizmu genu *HERC2* odpowiedzialnego za dziedziczenie niebieskiego i brązowego koloru oczu pozwoliła oznaczyć w nim genotyp C/C. Taki wynik wskazuje, że mężczyzna, którego szczątki analizowano z 80% prawdopodobieństwem posiadał niebieski kolor oczu. Warto wspomnieć, że uzyskany wynik jest zgodny z relacjami kolegów generała z czasów szkolnych. Potwierdzili oni, że miał on „bławatny” kolor oczu dodając, że miał również jasne włosy.

Częstym problemem identyfikacyjnych badań genetycznych szczątków ludzkich jest brak optymalnego materiału porównawczego. W opisanym przypadku, mimo uzyskania kompletu danych dla wszystkich podstawowych markerów stosowanych współcześnie do identyfikacji genetycznej człowieka, użyteczne okazały się wyłącznie dane na temat mitochondrialnego DNA. Ze względu na charakter dziedziczenia analiza mtDNA posiada ograniczoną siłę różnicującą, co sprawia, że uzyskana wartość dowodowa jest nieporównywalnie mniejsza niż w przypadku zastosowania markerów autosomalnych typu STR. Wydaje się jednak, że uzyskany w toku badań stopień pewności i okoliczności sprawy nie dają żadnych podstaw do podważania twierdzenia, że badane szczątki należały do generała Władysława Sikorskiego.

PIŚMIENICTWO

1. Wilson M. R., DiZinno J. A., Polansky D., Replogle J., Budowle B.: Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. *Int J Legal Med.* 1995, vol. 108, 68-74.
2. Eiberg H., Troelsen J., Nielsen M., Mikkelsen A., Mengel-From J., Kjaer K. W., Hansen L.: Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the *HERC2* gene inhibiting *OCA2* expression. *Hum Genet.* 2008, vol. 123(2), 177-87.
3. Sturm R. A., Duffy D. L., Zhao Z. Z., Leite F. P., Stark M. S., Hayward N. K., Martin N. G., Montgomery G. W.: A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the *HERC2* gene determines human blue-brown eye color. *Am J Hum Genet.* 2008, vol. 82, 424-31.

4. Branicki W., Brudnik U., Wojas-Pelc: A Interactions between HERC2, OCA2 and MC1R may influence human pigmentation phenotype. *Ann Hum Genet*, 2009, vol. 73(2), 160-70. forensic casework. *Forensic Sci Rev*, 1999, vol. 11, 21-50.
5. Parson W., Dur A.: EMPOP – a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int: Genet*, 2007, vol. 1, 88-92. Adres do korespondencji:
dr Tomasz Kupiec
Instytut Ekspertyz Sądowych
31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9
tkupiec@ies.krakow.pl
6. Holland M. M., Parsons T. J.: Mitochondrial DNA sequence analysis – validation and use for