



Pomorski Uniwersytet Medyczny

w Szczecinie

mgr Dagmara Lisman

**Analiza genetyczna stanowiska szkieletowego ujawnionego przy pracach na terenie
byłego niemieckiego Obozu Pracy Przymusowej „Treblinka I”.**

**Genetic analysis of a skeleton site revealed during the works on the premises of the
former German Forced Labor Camp "Treblinka I".**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Andrzej Ossowski

Pracę wykonano w Zakładzie Genetyki Sądowej PUM w Szczecinie

Szczecin 2022 r.

Serdeczne podziękowania składam promotorowi mojej pracy

dr hab. n. med. Andrzejowi Ossowskiemu.

*Dziękuję również całemu zespołowi Zakładu Genetyki Sądowej za pomoc
w realizacji niniejszej pracy.*

Streszczenie

Treblinka I była niemieckim nazistowskim obozem pracy przymusowej funkcjonującym w latach 1941-1944, na terenie gminy Kosów (powiat sokołowski). Zsyłano tam głównie mężczyzn skazanych za przewinienia o charakterze kryminalnym i gospodarczym, pojmany w trakcie łapanek i obławy. Początkowo przetrzymywano tam Polaków następnie zwożono również Żydów. Łącznie przez obóz przeszło około 20 tysięcy więźniów, z czego około 10 tysięcy zmarło z wycieńczenia i głodu lub zostało zamordowanych. Trudno jest znaleźć w literaturze jakiegokolwiek dane na temat obozu Treblinka I chociażby dlatego, że Niemcy zadbali o zniszczenie wszelkich dokumentów oraz struktur obozu. Dziś nie widać żadnej fizyczności tego miejsca, która mogłoby świadczyć o jego okrucieństwie.

Niniejsza praca poddaje analizie genetycznej stanowisko szkieletowe ujawnione podczas prac terenowych na terenie byłego obozu pracy przymusowej Treblinka I, w wyniku których ujawniono grób masowy oraz 7 regularnych pochówków. Badania prowadzono etapowo. Dokonano wstępnych analiz antropologicznych i kryminalistycznych zabezpieczonego materiału. Badania genetyczne objęły izolację DNA, oznaczenia stopnia degradacji DNA i obecności inhibitorów reakcji PCR. Amplifikacji poddano również markery STR. Ostatnim etapem była analiza DNA mitochondrialnego w celu określenia pochodzenia biogeograficznego ekshumowanych osobników.

Praca miała na celu ustalenie struktury genetycznej populacji, których szczątki odnaleziono podczas ekshumacji przy pomocy najnowszych narzędzi biologii molekularnej. Uzyskane wyniki pozwolą na dalszy proces identyfikacji osobniczej ofiar i strażników obozowych. Tak opracowany model badawczy można zastosować w przypadku innych niezidentyfikowanych dotąd miejsc masowych zbrodni zarówno w Polsce jak i na świecie. Uzyskane wyniki badań wesprą hipotezy historyczne i antropologiczne.

Summary

Treblinka I was a German Nazi forced labor camp that operated from 1941 to 1944, on the grounds of the Kosów municipality (Sokołowski county). Mainly men sentenced for criminal and economic offenses, captured during roundups and manhunts, were sent there. Initially Poles were held there, then Jews were also transported. In total, about 20 thousand prisoners went through the camp, out of which about 10 thousand died of exhaustion and hunger or were murdered. It is difficult to find any data about Treblinka I in the literature, if only because the Germans took care to destroy all documents and structures of the camp. Today, there is no physical evidence of this place, which could testify to its cruelty.

This paper subjects to a genetic analysis the skeletal position revealed during fieldwork at the site of the former Treblinka I forced labor camp, which revealed a mass grave and 7 regular burials. The research was conducted in stages. Preliminary anthropological and forensic analyses of the secured material were carried out. Genetic studies included the isolation of DNA, determination of the degree of DNA degradation and the presence of inhibitors of the PCR reaction. STR markers were also amplified. The final step was the analysis of mitochondrial DNA in order to determine the biogeographical origin of the exhumed individuals.

The aim of this work was to determine the genetic structure of the populations whose remains were found during exhumation using the latest tools of molecular biology. The obtained results will allow for further process of personal identification of the victims and camp guards. The research model developed in this way can be applied to other unidentified mass crime sites both in Poland and around the world. The obtained research results will support historical and anthropological hypotheses.

Spis treści

I Wstęp.	7
1.1 Karny wychowawczy obóz pracy Treblinka I.....	7
1.2 Wybrane obozy III Rzeszy – obecny stan zachowania.....	15
1.3 Rozkład haplogrup spodziewanych w niniejszym badaniu.....	16
2. Metody genetyczne w identyfikacji osobniczej.	20
2.1 Markery STR.....	21
2.2 Autosomalne markery STR.....	22
2.2.1 Markery STR chromosomu Y (Y-STR).....	22
2.2.2 Markery STR chromosomu X (X-STR).....	24
3. Analiza DNA mitochondrialnego (mtDNA).	26
4. Analiza pochodzenia biogeograficznego.	28
5. Proces degradacji DNA.....	31
6. Proces identyfikacji.....	32
6.1 Ograniczenia w procesie identyfikacji.	34
7. Bazy populacyjne.	37
II Cele pracy.	40
III Materiał i metody badawcze.	41
3.1 Materiał.	41
3.2. Analizy antropologiczne szczątków odnalezionych w jamach grobowych i grobie masowym.	45
3.3 Zastosowane metody badawcze.	47
3.4 Opracowanie materiału kostnego do izolacji DNA.....	49
3.5 Izolacja DNA.	49
3.6 Oznaczenie stężenia DNA, stopnia degradacji DNA i obecności inhibitorów reakcji PCR.	51
3.7 Amplifikowanie fragmentów STR w systemie Global Filer.....	52
3.8 Amplifikowanie fragmentów STR w systemie Y Filer Plus.....	53
3.9 Sekwencjonowanie całego genomu mitochondrialnego.	53
3.10 Analiza mtDNA.	54
3.11 Analiza profilów genetycznych.....	56
3.12 Analiza pokrewieństwa w systemie Familias 3.....	56
IV Prezentacja wyników badań.	57
4.1 Analizy genetyczne w systemie Global Filer i Y Filer Plus osobników jam grobowych i grobu masowego.	57
4.2 Analiza DNA mitochondrialnego osobników z jam grobowych i grobu masowego.	69
4.3 Analiza NGS osobników z jam grobowych.	75

4.4 Analiza pokrewieństwa w programie biostatystycznym Familias 3 wśród osobników z grobu masowego.	78
V Omówienie wyników badań.....	79
5.1 Jamy grobowe.	79
5.2 Grób masowy.	80
VI Wnioski.....	94
VII Dyskusja.....	95
VIII Wykaz tabel i rycin.	101
7.1 Wykaz zdjęć.....	101
7.2 Wykaz tabel.....	101
Literatura:.....	102

I Wstęp.

1.1 Karny wychowawczy obóz pracy Treblinka I.

Karny obóz pracy Treblinka I funkcjonował w latach 1941-44. Powstał z inicjatywy starosty powiatowego w Sokołowie Podlaskim – Ernesta Gramssa. Komendantem obozu przez cały okres jego funkcjonowania był Theo van Eupe. Obóz pracy przymusowej w Treblince I był ostatnim z trzech obozów, jakie funkcjonowały w Generalnym Gubernatorstwie (1).

Okres jego trwania można podzielić na poszczególne etapy. Pierwszy przypada na początek jego powstania rok 1941 (w okresie od czerwca do września). Znajdowało się tu wówczas kilkudziesięciu więźniów z wyraźnym podziałem na polskich i żydowskich. Jego obszar zawierał się w gospodarczych zabudowaniach pobliskiej żwirowni. Był to początek do wybudowania obozu właściwego. Kolejny okres przypada na wrzesień 1941 do lipiec 1942. Jego obszar przesunął się już na wschodnią stronę żwirowni. Większość więźniów stanowili wówczas Polacy. Wśród Żydów werbowano głównie rzemieślników z pobliskich miejscowości obszaru Sokołowa Podlaskiego (2).

W okresie od lipca 1942 do listopada 1943 zaczyna funkcjonować obóz zagłady Treblinka II, oddalony od Treblinki I zaledwie o 2 km. Literatura podaje, że utworzenie tego obozu było ściśle związane z polityką eksterminacji Żydów przez III Rzeszę (3). Należy podkreślić, że obóz Treblinka I był obozem pracy przymusowej, w którym przez ciężką wyniszczającą pracę i głód zginęło wielu więźniów. Praca w obozie Treblinka I była ciężka i wyczerpująca. Opierała się głównie na pracy w kamieniołomie i żwirowni, która znajdowała się w pobliżu obozu. Słabych i wycieńczonych pracą więźniów rozstrzeliwano w pobliskim lesie (las Małkiński), który stanowił miejsce egzekucji dla obozu zagłady Treblinka II. Wśród ofiar byli również więźniowie którzy próbowali uciec. Zeznania świadków informują o tym, że w Treblince I oprócz Żydów, zginęło również wielu Cyganów, Romów i Sinti. Przybliżoną liczbę ofiar szacuje się na około 800 000. Wiadomo, że wśród więźniów Treblinki I byli Polacy oraz mniejszości etniczne. Do obozu miały trafiać wyłącznie osoby z przeszłością kryminalną, takie były oficjalne założenia Niemców. Przechowywano tam również więźniów politycznych (3–6).

Ciała ofiar grzebano w masowych grobach, w pobliskim lesie małkińskim. Małkiński las był także miejscem pochówku strażników obozowych, którzy umierali lub byli rozstrzeliwani z różnych przyczyn, a których jedną mogło być nie wykonanie rozkazu

(4,6). Załoga Treblinki I składała się głównie z Ukraińców ale odnotowano również obywatele Rosji, Litwy i Łotwy. Należy podkreślić, że pełnili oni swoje zadania dobrowolnie (2).

Obozy Treblinka I i Treblinka II w późniejszym okresie były sobą powiązane i miały podobny cel (3,6,7). Po około roku trwania obozu Treblinka I znacznie zwiększyła się liczba więźniów żydowskich (rzemieślników i robotników), wzrosła również ich śmiertelność. Większość zwożonych w tym okresie ludzi padało procederowi eksterminacji. Działalność obozu zagłady Treblinka II zaczęła praktycznie przysłaniać obóz pracy Treblinka I (8).

Ostatni etap funkcjonowania Treblinki I przypada na lata 1943-44. Znacznie zmniejszyła się wówczas liczba więźniów pochodzenia żydowskiego. Polepszeniu uległy również warunki bytowe więźniów (8). W listopadzie 1943 roku praktycznie całkowicie zlikwidowano obóz zagłady Treblinka II, a przed samym przybyciem Armii Czerwonej również obóz pracy Treblinka I (1).

O ile historia obozu zagłady Treblinka II jest dość dobrze znana, o tyle brak jest dokumentacji struktur i charakteru karnego obozu pracy Treblinka I. Należy podkreślić, że te dwa obozy miały pierwotnie odmienne założenia funkcjonowania (2). Impulsem do likwidacji obozu był wybuch buntu więźniów w Treblinie II w sierpniu 1943 roku. Zaatakowano wówczas esesmanów i dokonano podpalenia budynków obozowych (9). Wydarzenie to było początkiem niszczenia obu obozów, a właściwie zacieraniem śladów masowych mordów ludności. Polaków zamykano w barakach a Żydów masowo wywożono małymi grupkami do małkińskiego lasu i rozstrzeliwano (2).

Znaczna część obszaru byłego obozu pracy Treblinka I pokryta jest obecnie drzewami oraz inną roślinnością posadzoną przez Niemców celowo po wojnie. Zachował się jedynie zarys obozu Treblinka I będący w bardzo złym stanie. Nie widać cech naziemnych związanych z okrucieństwem tego miejsca. Zniszczono wszelkie dowody wskazujące na popełnione ludobójstwo. Budynki wyburzono, a grunt wyrównano. Dziś stoi tam pomnik upamiętniający ofiary okrutnego mordu (6,7). Za taki stan wiedzy na temat zbrodni Holokaustu mogły odpowiadać min. aspekty polityczne, społeczne, moralne i etyczne (4).

Chcąc uczcić pamięć ofiar Treblinki I i Treblinki II, w latach 2016-2019 dokonano dokładnej analizy topograficznej tego terenu, ze szczególnym uwzględnieniem terenu

obożu Treblinka I. Prowadząc prace archeologiczne natrafiono na ludzkie szczątki (3,10). Szczątki były w większości przemieszane [zdj.1]. Odnaleziono również kilku osobników o kompletnych szkieletach [zdj.2]. Przy badaniach obecna była Komisja Rabinicza do spraw Cmentarzy Żydowskich przy Urzędzie Naczelnego Rabina Polski. Prace realizowano na zlecenie prokuratorów IPN.



Zdjęcie 1. Grób masowy – ekshumacja – źródło Andrzej Ossowski.



Zdjęcie 2. Odnalezione miejsce pochówku pojedynczego – ekshumacja – źródło Andrzej Ossowski.

Analizy archeologiczne i antropologiczne dostarczyły danych o odnalezieniu około 50 osobników pochowanych w masowym grobie. Ujawniono również siedem regularnych pochówków. Sposób ich złożenia do grobu oraz liczne artefakty, które przy nich znaleziono jak i obrażenia, które nosiły dwa z siedmiu odnalezionych szkieletów, mogą świadczyć, że nie byli to zwykli więźniowie. Fakty te w zestawieniu ze źródłami historycznymi pozwoliły na postawienie hipotezy, że szkielety te mogły należeć do osobników przynależnych do jednostek wartowniczych obozu (4).

Źródła historyczne oraz analizy archeologiczne nasuwają pytanie kiedy mogły zginąć osoby, których szczątki odnaleziono w grobie masowym. Ofiary mogły być zamordowane zaraz po przyjeździe do obozu w wyniku przeprowadzanej selekcji transportu gdzie mordowano starszych, schorowanych, z widoczną niepełnosprawnością, niezdolnych do ciężkiej pracy. Na tym etapie oddzielano także mężczyzn od kobiet i dzieci. Dokładne oględziny ekshumowanych z grobu masowego szczątków nie ujawniły żadnych deformacji wynikających z przebiegu choroby lub wady genetycznej. Opierając się na danych historycznych możemy powiedzieć, że szczątki te mogły należeć do osób wycieńczonych ciężką pracą w obozie, głodem jak i tych którzy próbowali stawiać opór, w wyniku czego zostali rozstrzelani (1,5,11,12).

Szczałki podjęte z jam grobowych typowano jako należące do strażników obozowych również opierając się na danych historycznych (1,3,7,8,13). Wskazywał na to sam sposób pochówku. Przy szczątkach ujawniono obecność artefaktów w postaci guzików, umundurowania wskazującego na niemieckie pochodzenie, grzebieni. Znaleziono również metalowe wieńce oddające szacunek pochówku, ofiary grzebano zdecydowanie inaczej. Wszystkie odnalezione przedmioty przekazano do Muzeum w Treblince.

Uzyskane w tej pracy wyniki pozwolą wesprzeć hipotezy historyczne i antropologiczne, dając odpowiedź na wiele nurtujących pytań. Pozwolą także na lepsze poznanie miejsca dotychczas owianego tajemnicą. Taki model prowadzenia badań jest najlepszym sposobem na dostarczenie faktów dotyczących struktury populacyjnej obozu Treblinka I, przywrócenie tożsamości ofiar, godny pochówek. Jest to również niezwykle ważne dla nas Polaków abyśmy mogli czcić miejsce gdzie spoczywają ofiary III Rzeszy a nie kaci.

Treblinka I jest bezwzględnie ważnym miejscem historycznym, jednym z najokrutniejszych miejsc masowej zagłady ludności żydowskiej (4,5). Sama działalność obozu porusza wiele zagadnień, począwszy od sprawców do wszystkich pozostających obojętnym na krzywdę ludzką. Warto również wspomnieć o licznych korzyściach materialnych, jakie nazisci uzyskali z grabieży i majątku ofiar. Po likwidacji teren obu obozów był wielokrotnie przeczesywany w celu znalezienia kosztowności. Ten sam proceder dotyczył również innych obozów (14).

Odwiedzając dziś Treblinkę I nie widać śladów po obiektach obozowych ani ich lokalizacji. Sam rys historyczny obozu jest opisany, natomiast zdarzenia z tego okresu są mało udokumentowane (13,15). Zdecydowanie więcej informacji w literaturze dotyczy obozu Treblinka II. Na obecny stan zachowania obozu Treblinka I mogła mieć wpływ specyfika terenu, wpływ długiego okresu czasu. Jednak analizując materiały historyczne i badania archeologiczne możemy powiedzieć, że ślady tego miejsca zostały celowo zacierane (3,5,7,16,17). Jednym z powodów, dla którego tak mogło się stać jest fakt, że nazisci próbowali uniknąć kary za swoje zbrodnie dlatego starali się zniszczyć wszelkie ich dowody. Byli przekonani o perfekcyjności działania takich miejsc jak Treblinka oraz doskonałości swojego planu eksterminacji ludności żydowskiej (15,18). W przypadku Treblinka I ofiary głodu lub wyniszczającej pracy grzebano w masowych grobach. Zdarzało się, że wycieńczonych i chorych rozstrzeliwano. Niektóre ciała rozdrabniano i masowo rozsypywano ich pozostałości w terenie (19,20). Prowadzone na tym terenie badania archeologiczne i geofizyczne ujawniły 11 dołów, z czego największy ma 34 metry długości, a najmniejsze około 10 metrów. Obszar ten został wskazany również przez świadków masowych pochówków i kremacji (4). Badania te prowadzone były jedynie na części terenu byłego obozu. Dlatego można przewidzieć, że odnajdzie się tam więcej takich miejsc.

Materiały historyczne dotyczące obu obozów oraz rozwój genetyki sądowej, pokazują na przykładzie tej pracy, że nie da się całkowicie zatrzeć śladów tak ogromnej ilości zamordowanych w Treblince osób. Każdego dnia kierowano tu 5000-7000 osób, istniały tylko 3 komory gazowe (Treblinka II), co świadczy, że nie wszystkie ofiary do nich trafiały. Głównym sposobem pozbycia się zwłok pozostawało grzebanie w masowych grobach, które znajdowały się głównie w południowo wschodniej części obozu (1,20–22). Po wojnie teren obozu pozostawał zaniedbany i rabowany do roku

1959. To wtedy podjęto decyzje o upamiętnieniu tego miejsca (1,23). Żydowskie nagrobki przedstawiono w postaci symboliki 17000 kamieni (4,23).

W celu poznania prawdy takich miejsc potrzebna jest współpraca interdyscyplinarna archeologów, antropologów, biegłych sądowych i genetyków. Cenne są również źródła dostarczające informacji historycznych, relacje świadków. Projekty takich badań są zwykle opracowywane w oparciu o wiedzę historyczną. Obszary badań i dowody są określane poprzez źródła dokumentalne, fotograficzne.

Analiza materiałów oraz pisanie niniejszej pracy, powrót do tragicznych faktów historii, wywołały we mnie ogromne emocje, a opisy mordów dokonywanych na ofiarach łązy. Prace były trudne już od momentu ekshumacji, gdzie samo miejsce byłego obozu zagłady Treblinka I jest smutne i opuszczone. Szczątki odnaleziono na terenie obecnego parkingu leśnego, gdzie każdego dnia toczyło się współczesne życie (parkowały tam min. autokary turystyczne), zatrzymywała się tam masa ludzi. Treblinka to jedno z najokrutniejszych miejsc tamtych czasów. Miejsce, które zostało świadomie założone w celu eksterminacji ludności. Żadna zbrodnia popełniona w Treblince nie może zostać zapomniana. Jesteśmy to winni tym wszystkim ludziom oraz ich rodzinom.

1.2 Wybrane obozy III Rzeszy – obecny stan zachowania.

Badania archeologiczne i genetyczne takich miejsc jak Treblinka I jest potrzebna w ustaleniu celowości jego powstania, lepszego poznania ich struktur oraz ujawnienia ewentualnych grobów masowych, jak miało to miejsce w przypadku Treblinka I.

Dzisiejszy stan zachowania obozów koncentracyjnych, które funkcjonowały na terenie okupowanej Polski, jest bardzo zróżnicowany (24–26). Dobrze zachowany pozostał ten w Auschwitz. Przez wiele lat tereny te podlegały naturalnej degradacji. Były to miejsca, o których chcieliśmy zapomnieć, miejsca bólu, tragedii, łez, cierpienia ale i wstydu. Wszystkie działania archeologiczne i upamiętniające, miały miejsce późno po wojnie. Obozy, których fizyczne struktury ich okrucieństwa pozostają nadal tajemnicą. Do takich obozów należy min. Treblinka I (27). Celowe działania destrukcyjne świadczyły o tymczasowości tych miejsc, ich przeznaczeniu oraz zacieraniu śladów nazistowskich zbrodni. Mimo to jesteśmy w stanie odtworzyć pewne fakty, które stanowią niezbitą dowody dokonanych zbrodni nazistowskich. Pomocne pozostają również relacje świadków, choć tych jest coraz mniej. Obecnie prowadzi się badania terenowe takich miejsc, zabezpiecza ślady, odtwarza zdarzenia, pozyskuje materiał do badań genetycznych, które są ogromnym narzędziem dowodowym i identyfikacyjnym. Zespół Polskiej Bazy Genetycznej Ofiar Totalitaryzmów ma duże doświadczenie w analizie takich miejsc (12). Brak badań naukowych powoduje wyciąganie nieprawidłowych wniosków lub podejmowania nieprawdziwych rozważań, które poddają wątpliwości Holocaust oraz inne masowe zbrodnie.

W przypadku Treblinka I, obozu pracy przymusowej, zachował się jedynie zarys granic obozu (3,10,28). Charakteryzował się on położeniem na uboczu, kamuflażem, sąsiedztwem linii kolejowej ułatwiającej transport więźniów. Obozem o odmiennym celu położonym w pobliżu Treblinka I była Treblinka II, należąca do obozów zagłady podobnie jak obóz w Bełżcu, Sobiborze i Auschwitz. Wszystkie miały jeden cel – zagłada całej ludności żydowskiej oraz polskiej inteligencji. W Treblince I jako karnym przymusowym obozie pracy, eksterminacji dokonywano poprzez ciężką wyniszczającą pracę. Cechą wspólną tych miejsc była podobna lokalizacja i struktura związana z ich celem (szybka eksterminacja). W Treblince I dołączono jeszcze granice zewnętrzne, które stanowiły pola usiane minami oraz zapory przeciw czołgom. Do budowy struktur wykorzystywano głównie drewno, co miało świadczyć o tymczasowości tych obiektów

i możliwości szybkiego niszczenia. Z betonu wykonywano jedynie komory gazowe w Treblince II (15).

1.3 Rozkład haplogrup spodziewanych w niniejszym badaniu.

Historia każdego kontynentu zapisana jest w ludzkim DNA. Analizując pochodzenie biogeograficzne w obrębie jednego obszaru, obserwujemy, że choć wszyscy mieszkańcy są ze sobą blisko spokrewnieni to sekwencjonując ich genomy znajdziemy subtelne różnice w kolejności sekwencji. Badanie haplogrup w obrębie DNA mitochondrialnego (mtDNA) jest w stanie określić nie tylko skąd może pochodzić dana osoba ale również odpowiedzieć na pytanie jakie były losy populacji ludzkiej zamieszkującej dany obszar geograficzny. Odnosząc się do najnowszych wyników badań mieszkańców Europy, możemy powiedzieć, że jej mieszkańcy są ze sobą blisko spokrewnieni. Oznacza to, że dzielą między sobą pewne podobne geny (29). Jednym z markerów pochodzenia biogeograficznego jest DNA mitochondrialne, jak wcześniej wspomniano dziedziczymy je wyłącznie od matki. Możemy również sprawdzić biopochodzenie w linii ojcowskiej, dziedziczone po chromosomie Y (w linii ojcowskiej) (30).

Około 99% genomu ludzkiego stanowi wspólne DNA, a tylko 0,5% odpowiada za dzielące nas różnice. Ludzki genom składa się z 3,2 miliarda par zasad, a 0,5% tej liczby to 16 milionów liter. Każda taka litera może wystąpić w jednej z czterech odmian więc liczba ich kombinacji jest ogromna. Dlatego właśnie prawdopodobieństwo wystąpienia identycznego genomu u drugiej osoby jest praktycznie niemożliwe (29,31). Mitochondrialne DNA zawiera 37 genów, podczas gdy cały genom ma ich około 20 tysięcy (32).

Współczesna historia szczególnie w ciągu ostatnich 200 lat pełna była tragicznych wydarzeń, takich jak wojny, okupacje, migracje oraz przemieszczenie granic (10). Największy wpływ na sytuację demograficzną miała II wojna światowa. Do tego czasu ludność Polski była etnicznie wymieszana. Szacuje się, że w okresie II wojny światowej wymordowano około 6 milionów Polaków (33) co stanowiło około 17% ludności polskiej. Najwięcej ofiar było wśród młodych mężczyzn, których śmierć znacznie wpłynęła na pulę genów (34).

W przypadku niektórych stanowisk nie zachowały się architektoniczne struktury wskazujące na dokonywanie masowych zbrodni. Metody archeologiczne i antropologiczne pozwalają na wysunięcie hipotez objaśniających historię danego

miejsca. Ostateczna weryfikacja takich hipotez może zostać dokonana za pomocą narzędzi biologii molekularnej min. określeniu pochodzenia biogeograficznego odnalezionych szczątków (12). Tak było w przypadku Trebłinki I, na podstawie badań archeologicznych oraz analiz antropologicznych, założono że w grobie masowym spoczywały również szczątki obywateli polskich. Tezę tę miały pomóc potwierdzić lub odrzucić, wyniki badań genetycznych przeprowadzonych w niniejszej pracy. Uzyskane haplotypy, zarówno ofiar jak i domniemanych strażników obozowych, porównywano w bazie EMPOP (tabela nr 8,10), której narzędzia pozwoliły na określenie ich przynależności haplogrupowej. Dodatkowo, w celu potwierdzenia, szacowano je w programie HaploGrep (tabela nr 11) pod względem wszystkich dostępnych haplotypów spodziewanych u ekshumowanych szczątków. Uzyskane dane porównywano również do dotychczasowej literatury (35,36). W historii Polski miały miejsce masowe przesiedlenia ludności sięgające okresu II wojny światowej i zaraz po niej. Przyczyną były zesłania w okresie wojennym, wysiedlanie Polaków z terenów podległych ZSRR, deportacje na roboty przymusowe, zabory niemieckie w okresie II wojny światowej (37). Wszystko to spowodowało utworzenie zróżnicowanej wewnętrznie populacji, która nie jest jednak genetycznie znacząco odmienna od pozostałych populacji słowiańskich, o czym wspomniano w literaturze (38–41), także na podstawie markerów chromosomu Y.

Dzisiejsza genetyka populacji opiera się na analizie całego genomu wykorzystując polimorfizm pojedynczego nukleotydu (SNP). Metoda ta jest bardzo ważna zarówno w medycynie spersonalizowanej i sądowej (42). Analizy te mają również dużą wartość w badaniach antropologicznych i kryminalistycznych ponieważ dostarczają informacji o różnorodności genetycznej populacji. Analiza krótkich powtórzeń tandemowych Y (Y-STR), badająca region chromosomu Y sprawia, że wykazują wyższą rozdzielność typowania od biallelicznych polimorfizmów chromosomu Y (43,44).

Całkiem niedawno większość badań filogenetycznych mtDNA opierała się na zmienności sekwencji w hiperzmiennym regionie kontrolnym HV1(45,46). Jednak szybkie tempo mutacji powoduje, że takie analizy są obciążone błędami. Badania jednego regionu, mutacje oraz brak analiz w szerszym zakresie mogą prowadzić do nieprawidłowych wniosków. Dlatego w niniejszej pracy sekwencjonowaniu poddano oba hiperzmiennie regiony HV1 i HV2.

Źródła historyczne w przypadku Trebłinki I dostarczają informacji, które pozwoliły wysunąć wnioski, że w grobie masowym należy spodziewać się obywateli polskich i żydowskich. Natomiast w jamach grobowych spoczywali najprawdopodobniej obywatele Rosji i Ukrainy (2), dlatego w rozdziale tym, opisując rozprzestrzenianie się poszczególnych haplogrup skupiono się wyłącznie na tych, które mogliśmy otrzymać w toku niniejszych badań.

Zmienność genetyczną mtDNA populacji polskiej badano w odniesieniu do Rosjan (47,48) a w szerszym aspekcie do populacji Słowian (29,49,50). Inni naukowcy badając populację polską, porównują współczesne dane do próbek badanych pochodzących z pradawnych pochówków. Pokazuje to jak tworzyły się oraz mieszały określone grupy ludności europejskiej. Najczęstsze haplotypy europejskie sklasyfikowano do makro haplogrupy HV, U i JT, stanowią one 90% populacji (51). W Europie najczęściej występującą haplogrupą jest haplogrupa H (52). W celu ustalenia jej rozprzestrzeniania niektórzy badacze wskazują na trzy fale migracji: pierwsza to zasiedlenie Europy około 45 tysięcy lat temu, druga dotyczyła powrotu na tereny północne po ostatnim maximum glacialnym około 18 tysięcy lat temu, spowodowana pokryciem większości kontynentu lodowcem, co zmusiło ludność do wycofania się na południe gdzie przetrwali w określonych miejscach; trzecia miała miejsce stosunkowo niedawno i dotyczyła neolitycznych migracji spowodowanych poszerzaniem się obszarów rolniczych (około 9 tysięcy lat temu) (29,31).

Haplogrupa HV jest najczęściej występującą w Europie (około 40%), zawiera rzadsze podhaplogrupy HV1, HV2 i HV0. Większość pochodnych haplogrupy H pochodzi z Bliskiego Wschodu. Poprzednikiem haplogrupy H i V jest haplogrupa R0. Wzrost częstotliwości haplogrupy R0 obserwuje się z Zachodu w kierunku Europy Wschodniej i Południowej oraz Bliskiego Wschodu (53–55). Również w tej haplogrupie wyodrębnia się subhaplogrupy charakterystyczne dla obszarów Polski. Są to: H5a2, H5e1a, H5a1f, H6a1a9.

Haplogrupa R0 jest poprzednikiem haplogrupy H i V. Charakteryzuje ją większa zmienność na Półwyspie Arabskim co sugeruje, że wywodzi się właśnie stamtąd (56). Z dużą częstotliwością obserwuje się ją też w Azji Południowej (23%) (57). Jej korzenie sięgają makrohaplogrupy R (56). Bez mała połowa populacji zachodnio eurazjatyckiej mtDNA jest podzielona na subhaplogrupy haplogrupy R0 (55).

Kładem powstającym z haplogrupy R jest haplogrupa U. jej początki sięgają południowo zachodniej Azji i Europy. Stanowi ona ciągłość genetyczną również z dzisiejszymi populacjami Europy (58). Dokonano w jej obrębie podział na: U2, U3, U4'9, U7 i U8. Wykazują one specyficzne dla danego regionu wzorce częstotliwości odzwierciedlone we współczesnych populacjach. Badania pokazały także, że odsetek haplogrupy U w Polsce wynosi około 21%. Polacy posiadają również specyficzną odmianę tej haplogrupy U4a2, która jest typowa dla zachodnich Słowian (Czechów, Polaków i Słowaków). Częstość występowania tej haplogrupy w Polsce stanowi około 4% natomiast w innych populacja prawie w ogóle się jej nie obserwuje (48,59).

Sekwencje oznaczone u Ukraińców i Rosjan są niemal identyczne jak te występujące w Europie Zachodniej i Wschodniej. Pozwala to wyciągnąć wnioski, że migracjom z Europy Środkowej na jej wschód towarzyszyły w większości te same linie mtDNA, które są charakterystyczne dla populacji prasłowiańskich Europy Wschodniej (60). Sekwencje populacji Rosjan i Ukraińców zgrupowano w osiem haplogrup, według powszechnie akceptowanej nomenklatury: H, V, HV, U, K, J, T, X. Główna mitochondrialną haplogrupą słowiańską jest H, które jednocześnie najczęściej występuje w Europie (46). Stanowi ona około 38% opisywanych w literaturze populacji rosyjskiej i 44% - populacji ukraińskiej (61).

Aszkenazyjskie mtDNA jest bardzo charakterystyczne ale i trudne do przypisania do konkretnej populacji źródłowej (36,62,63). Dwie główne aszkenazyjskie linie haplogrupy K (K1a1b1a, K2a2a1) mają dalece europejskie pochodzenie. Obejmują głównie mtDNA europejskie z wyłączeniem tych pochodzących z Bliskiego Wschodu. Pozostałe linie aszkenazyjskie (H, J, T, HV0, U4/U5, I, W i M1) również wykazują europejskie pochodzenie (64). Około 80% aszkenazyjskiego mtDNA wynika z asymilacji rdzennego mtDNA w Europie Zachodniej. Haplogrupy takie jak N1b2, M1a1b, K1a9, a nawet K1a1b1 mają swoje źródło z obszaru Morza Śródziemnego (63,65). Wyniki te bardzo dobrze wpasowują się w analizy całego genomu z istotnym odchyleniem w kierunku europejskim, szczególnie odnoszącym się do Włoch (66–69).

Podczas analiz wyników haplogrupowania w niniejszej pracy stwierdzono, że ciężko jest przypisać uzyskane haplogrupy do konkretnej narodowości lub obszaru geograficznego. Powodem mogła być ich niejednorodność. Należy podkreślić, że liczba osobników, dla których stan zachowania materiału genetycznego pozwolił na dokonanie

estymacji haplogrupy mtDNA była mała. Haplogrupę uzyskano dla 6 na 7 badanych szkieletów ekshumowanych z jam grobowych oraz 19 na 42 szkieletów pochodzących z grobu masowego. Dlatego potrzebne są dalsze prace ekshumacyjne i analizy genetyczne uzyskanego materiału. Takie prace zostały zaplanowane przez nasz zespół w najbliższym czasie. Tym bardziej, że badania archeologiczne sugerują, że takich miejsc pochówku jest tam zdecydowanie więcej (3–5).

2. Metody genetyczne w identyfikacji osobniczej.

Intensywny rozwój biologii molekularnej oraz metod identyfikacji z wykorzystaniem najnowszych narzędzi technologii daje dziś ogromne możliwości identyfikacyjne .

Niezwykle istotnym aspektem analiz DNA na potrzeby badań sądowych jest ustalenie stopnia pokrewieństwa pomiędzy badanymi osobnikami. Sprawy takie mogą dotyczyć imigracji oraz identyfikacji szczątków ludzkich. Trudności jakie możemy napotkać podczas identyfikacji dotyczą także wystąpienia różnych mutacji na etapie życia płodowego. Szczególnie trudne do identyfikacji są szczątki ludzkie (70–72). W tego typu sprawach czasem trudno jest o materiał porównawczy, w którym istotny jest stopień pokrewieństwa, im bliższy tym wyższe powodzenie identyfikacji. Podczas badań może także okazać się, że domniemany krewny nie jest w ogóle spokrewniony z badaną osobą. Kolejnym problemem jest praca z materiałem zdegradowanym jakim mogą okazać się szczątki. Zależy to głównie od czasu jaki upłynął od śmierci i środowiska, w którym zwłoki się rozkładały (73,74).

W tego typu sprawach genetycy sięgają po różne narzędzia identyfikacyjne. W zależności od stopnia pokrewieństwa, należy dobrać odpowiednie markery STR zlokalizowane na chromosomie Y lub X, a niekiedy sięgnąć po analizę DNA mitochondrialnego (75–79).

2.1 Markery STR.

Pozwalają na analizę różnych markerów genetycznych dostępnymi metodami molekularnymi. Profilowanie STR to najbardziej powszechna analiza DNA jądrowego zlokalizowanego na chromosomach. Stała się złotym standardem w identyfikacji ofiar katastrof masowych, wojen oraz ofiar zbrodni systemów totalitarnych (71,80–83). Daje ono możliwość identyfikacji ofiar, na podstawie analizy porównawczej z krewnymi. Dostarcza również cennych wskazówek dochodzeniowych. Znaczne postępy w biologii molekularnej zwiększyły możliwości pobierania próbek, profilowania odpowiednio dobraną metodą oraz gromadzenia danych o DNA w specjalnych bazach. Nowe markery genetyczne i techniki genotypowania pozwalają wydobyć jak największą ilość informacji genetycznych z badanej próbki, niezależnie od stopnia jej degradacji. Obecne analizy DNA pozwalają skierować badacza w stronę domniemyanych ofiar czy ich pochodzenia biogeograficznego (84).

Ludzkie DNA poza sekwencją kodującą kryje wiele obszarów polimorficznych, które różnią się długością. Są to krótkie powtórzenia tandemowe STR, (ang. short tandem repeats) (85). To grupa sekwencji różniących się między sobą długością poprzez insercję, delecję lub mutację z powtarzającą się sekwencją DNA. Zmienność w populacji powoduje, że są idealnym markerem kryminalistycznym (86). Jedną osobę może cechować 25 powtórzeń (GATC) w jednym allelu, 15 – w drugim allelu, zaś inna osoba może mieć zupełnie inną konfigurację takich powtórzeń. Tych wariantów jest tak wiele, że znalezienie dwóch osób o identycznych wariantach jest praktycznie niemożliwe. Metodą badań markerów STR jest zazwyczaj zwykła reakcja PCR z rozdziałem elektroforetycznym. Rutynowo w kryminalistyce stosuje się kilka fluorescencyjnych reakcji typu multiplex-PCR, które naraz wykrywają kilkanaście różnych STR. Do rozdziału elektroforetycznego wykorzystuje się fluorescencyjną elektroforezę kapilarną, która bardzo dokładnie (co do nukleotydu) określa wielkości uzyskanych pików. Daje to możliwość oszacowania dokładnej liczby powtórzeń w określonym loci (87).

2.2 Autosomalne markery STR.

Większa część ludzkiego DNA jest prawie taka sama u dwóch różnych osób. W celu znalezienia różnic analizuje się wyłącznie krótkie wysokozmienne regiony powtarzalnego DNA- STR (ang. short tandem repeats). Jak wspomniano wcześniej różnią się one długością u dwóch różnych osób. Są to tzw. genetyczne markery określające profil DNA, będące rzadkimi u osób niespokrewnionych.

Standardowo analizie poddaje się minimum 16 markerów (loci) w genomie. Dodatkowo analizuje się marker płci. Wynik otrzymuje się w formie elektroforegramu, na którym pozycja każdego piku odpowiada długości STR przedstawionej w postaci liczby. Każde locus zawiera dwa warianty STR (po każdym wariacie od jednego z rodziców). Pozwala to przedstawić profil osoby w postaci dwóch określonych liczb a każda para liczb to konkretne miejsce na chromosomie (85).

2.2.1 Markery STR chromosomu Y (Y-STR).

Markery te wykorzystują informacje zlokalizowane na chromosomie Y, który występuje wyłącznie u płci męskiej. Genetyka sądowa, a przynajmniej większość jej badań, koncentruje się na fragmentach DNA, które dziedziczymy od obojga rodziców. Istnieją jednak pewne wyjątki. Jest to analiza min. chromosomu Y, dziedziczony tylko od jednego z rodziców (24). Z tego względu wyniki dziedziczenia podaje się w postaci haplotypów, zestawu poszczególnych alleli dziedziczonych łącznie, określanych jako markery haploidalne. W materiale genetycznym chromosomu Y istnieją pewne polimorficzne pozycje występujące w regionie niekodującym. Właśnie te regiony wykorzystuje się w procesie indywidualizacji osobniczej. Należy tu wziąć pod uwagę model dziedziczenia chromosomu Y. Jest on dziedziczony wyłącznie w linii męskiej, staje się więc charakterystyczny dla pewnej spokrewnionej grupy linii męskiej. Wynik takiego badania to pojedynczy haploidalny marker, częstość występowania cech łącznie określamy jako haplotyp.

Analiza chromosomy Y dotyczy głównie zlokalizowanych na nim markerów STR, analogicznych do tych, które znajdują się w innych częściach DNA ludzkiego. W niektórych przypadkach wykorzystuje się analizę zmian pojedynczych nukleotydów

Y-SNP. Podczas analizy otrzymujemy pojedynczy allel. Wyjątek mogą stanowić układy powtarzające się na chromosomie. Powstają w wyniku duplikacji fragmentu chromosomu. Do takich układów podwójnych należy marker: DYS385a/b czy układ poczwórny DYS464a/b/c/d, przy czym każda litera odpowiada kolejności powielenia układu. Jego unikatowość wyłącznie dla męskiego materiału genetycznego sprawiła, że znalazł on zastosowanie w sądownictwie, wszędzie tam gdzie dochodzi do wykrycia mieszaniny materiału genetycznego mężczyzny i kobiety (88).

W normalnych warunkach prawie cały chromosom Y dziedziczony jest w formie niezmienionej w jednej kopii (NRY, ang. non-recombining Y-chromosome region) (24). Wyjątek stanowią niektóre choroby genetyczne jak np. zespół Jacobsa. Haplotyp chromosomu Y jest przekazywany w linii męskiej także niezmieniony. Odstępstwem od reguły jest spontaniczna mutacja wynikająca z pewnej zmienności genetycznej (89).

Chromosom Y zwykle różni się u niespokrewnionych osób w obrębie jednej populacji. Stąd wynik jego badania jest tak istotny w profilowaniu nieznanej próbki DNA. Należy pamiętać, że wartość badań Y-STR jest nieco niższa niż w przypadku analizy fragmentów DNA pochodzących od obojga rodziców. Jest tak dlatego, że może on występować również u osób niespokrewnionych ze sobą. Stanowi to jednak bardzo mały odsetek, dlatego genetycy chętnie sięgają po badania tego rodzaju markerów (90).

Markery chromosomów autosomalnych płci, zlokalizowane na chromosomie Y identyfikuje się przy pomocy reakcji PCR multiplex. W jednej reakcji powiela się kilkanaście loci mikrosatelitarnego DNA (STR), są to krótkie tandemowe powtórzenia (ang. short tandem repeat). W przypadku materiału silnie zdegradowanego namnaża się regiony miniSTR. Regiony te mają skrócone sekwencje starterów. W przypadku identyfikacji w linii męskiej, amplifikuje się specjalne markery zlokalizowane na chromosomie Y (75). Są one przekazywane w formie pojedynczego zestawienia cech dla haplotypu Y, w wyniku czego dają identyczny profil u spokrewnionych osób w linii męskiej (91–93).

Markery haploidalne bardzo dobrze nadają się badań uzupełniających pokrewieństwo, w sytuacji kiedy brakuje materiału porównawczego od domniemanej matki lub ojca, a dysponujemy materiałem od krewnych pochodzących z linii męskiej. Istnieją markery Y-STR, które charakteryzują się szybkim tempem mutacji,

zachodzących z pokolenia na pokolenie. Reasumując, głównym celem analizy Y-STR jest rozróżnienie osób blisko spokrewnionych w linii męskiej, co może mieć znaczenie w identyfikacji (94).

Uzyskane wyniki poddaje się analizie statystycznej, w celu ich interpretacji. Analiza ta opiera się określeniu częstości występowania poszczególnych haplotypów w danej populacji w odniesieniu do aktualnych populacyjnych baz danych (95).

2.2.2 Markery STR chromosomu X (X-STR).

W niektórych przypadkach analizy standardowo stosowanych markerów STR DNA autosomalnego, nie są w stanie dać jednoznacznej odpowiedzi i wydać opinii. Sytuacje takie zmuszają do dalszych badań i poszerzenia ich o dodatkowe markery genetyczne (76,96,97). Do takich badań należy analiza chromosomu X. Badania w obrębie markerów X-STR pokazują wartość niezależnego dziedziczenia określonych cech. Bliskość niektórych markerów X-STR, determinuje tzw. grupy sprzężone (ang. linkage groups) dziedziczone jako haplotypy, przekazywane w całości kolejnym potomkom (78).

Sam sposób dziedziczenia chromosomu X jest dosyć ciekawy. W momencie dziedziczenia w linii matka – córka, dziedziczenie następuje dokładnie tak samo jak w przypadku 22 chromosomów autosomalnych. Matka przekazuje swoim dzieciom jeden z dwóch chromosomów X, jej córka odziedziczy drugi chromosom X po swoim ojcu. Ojciec natomiast przekazałby swoim córkom jedyny chromosom X jaki ma. W przypadku przekazania alleli przez ojca nie mamy wątpliwości jakie przekazał. Matka natomiast mogła przekazać allele występujące na jednym albo drugim chromosomie. Analogicznie dziedziczy chromosom X syn (87). Tym samym jest to tylko fragment DNA pochodzący wyłącznie od matki, dzięki czemu jesteśmy w stanie zidentyfikować allele pochodzące od matki. Ojciec przekazując chromosom Y nie ma udziału w przekazaniu chromosomu X (87). Podsumowując jeżeli chodzi o model dziedziczenia chromosomu X to ojciec i syn nie są ze sobą spokrewnieni.

W przypadku badań sądowych analiza X-STR daje dobre rezultaty w przypadku konieczności brania pod uwagę materiału porównawczego pochodzącego o dalszych krewnych. Markery X-STR zlokalizowane są na tym samym chromosomie,

co daje możliwość położenia w niewielkiej odległości od siebie. Warto jednak podkreślić, że loci położone na tym samym chromosomie, mocno oddalone, będą się dziedziczyły niezależnie (78). Markery zlokalizowane na chromosomie X nie są często wykorzystywane w genetyce sądowej, choć użyteczność ich w tego rodzaju sprawach została potwierdzona (98). Znajdują swoje zastosowanie w trudnych przypadkach analizy pokrewieństwa, którą jest np. kazirodztwo, w sytuacji kiedy domniemanym ojcem dziecka płci żeńskiej jest pozwany mężczyzna lub jego syn. Innym przykładem jest sporne ojcostwo kiedy dziecko jest płci żeńskiej lub gdy jest ono kwestionowane w stosunku do jednej z sióstr (76).

3. Analiza DNA mitochondrialnego (mtDNA).

DNA mitochondrialny (mtDNA) jest kolistą cząsteczką znacznie bardziej odporną na degradację niż DNA jądrowy, co w przypadku tak odległego historycznie materiału ma duże znaczenie (99). Duża liczba kopii sprawia, że nadające się do analizy fragmenty mtDNA dają się wyizolować z niewielkich ilości materiału biologicznego (stary materiał kostny, zęby) nawet wtedy, gdy uległy one znacznemu rozkładowi. Badanie sekwencji jego hiperzmiennych regionów (HV1, HV2) daje odpowiedź, które z haplogrup najliczniej występuje w danej części świata i jak są odległe w czasie. Takie badania pozwalają ustalić pochodzenie biogeograficzne odkrytych szczątków ludzkich. W przypadku tej pracy analiza pochodzenia biogeograficznego dostarczyła więcej informacji na temat struktury populacyjnej ofiar obozu Treblinka I.

Sama cząsteczka mtDNA ma około 16569 par zasad. Nici mtDNA wykazują różną gęstość z powodu odmiennego składu zasad G+C. Ciężki łańcuch H koduje więcej informacji dla dwóch rRNA, dwanaście polipeptydów i czternaście tRNA lekki L koduje osiem tRNA i jeden polipeptyd (32). Informacja o pochodzeniu biogeograficznym znajduje się w niekodującym regionie pętli D. Jest to segment o długości 1121 par zasad, usytuowany pomiędzy pozycjami 16024 i 576, według numeracji CRS (ang. Cambridge Reference Sequence) (100,101). W regionie pętli D znajdują się również dwa promotory transkrypcji, po jednym dla każdej nici. Brak mechanizmów naprawy mtDNA prowadzi do wyższego tempa mutacji w genomie mitochondrialnym w porównaniu do genomu jądrowego. Największa zmienność sekwencji między dwoma osobnikami znajduje się w dwóch konkretnych segmentach regionu kontrolnego: hiperzmiennym HV1 – pozycje 16024-16365 oraz hiperzmiennym HV2 – pozycje 73-340 (102,103). Istnieje jeszcze trzeci hiperzmienny region - HV3 pozycje 438-574. Jako dodatkowa pozycja polimorficzna może okazać się przydatny w wynikach nie dających jednoznacznej odpowiedzi przy wykorzystaniu jedynie HV1/HV2 (104,105). To właśnie mały rozmiar i wysoka zmienność interpersonalna regionów HV, powoduje, że stają się one przydatne w kryminalistyce (106). Sekwencja mtDNA definiuje osobniczy haplotyp odnoszony względem sekwencji mtDNA rCRS. Taki zdefiniowany przez kombinację polimorfizm pojedynczych nukleotydów (SNP) mtDNA, który dziedziczymy po wspólnym przodku, definiuje haplogrupę powstającą w wyniku mutacji w linii matczynej (107). W przeciwieństwie do DNA jądrowego, mtDNA dziedziczony jest wyłącznie po matce

(jak opisano wcześniej), w wyniku czego sekwencja jego jest identyczna u rodzeństwa i wszystkich krewnych w linii matczynej, za wyjątkiem mutacji (108). Haploidalny charakter mtDNA pozwala na pewną łatwość w interpretacji jego wyników w wyniku sekwencjonowania. W roku 2014 Komisja DNA Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sadowej (ISFG) wydała zaktualizowane wytyczne i zalecenia odnośnie badania mtDNA. Odnosiły się one głównie do „dobrych praktyk laboratoryjnych”, regionu docelowego, amplifikacji i sekwencjonowania, sekwencji referencyjnych, hetreolpazmii, haplogrupowania oraz bazy danych (104,105). Dane te są regularnie aktualizowane.

Do sekwencjonowania obu hiperzmiennych regionów mtDNA wykorzystuje się głównie metodę enzymatyczną Sangera (109). Metoda ta pozwala szybko uzyskać informację na temat kolejności sekwencji nukleotydów w badanej próbce. Końcowym etapem jest uzyskanie wyniku, który porównywany jest z tzw. sekwencją konsensusu (referencyjną), ustalona w wyniku badań populacyjnych. Jest ona z powodzeniem stosowana w medycynie sądowej dając bardzo dobre rezultaty (109–111). Metoda ta została zaprezentowana po raz pierwszy w 1977 roku jako technologia sekwencjonowania DNA (112). Nazywana inaczej metodą terminacji łańcucha, a obecnie sekwencjonowaniem pierwszej generacji. Wykorzystanie ddNTP (dideoksynukleotydów) do nowo zsyntetyzowanych nici DNA powoduje zakończenie procesu elongacji i uzyskaniem informacji na temat konkretnego nukleotydu w sekwencji, w każdej pozycji. Metoda ta daje możliwość odczytu od 25 - 1200 nukleotydów (112).

Rok 2005 przyniósł erę nowych metod sekwencjonowania, zwanych sekwencjonowaniem nowej generacji (NGS, ang. Next Generation Sequencing) (113). Pozwalają one na zsekwencjonowanie do 80 milionów par zasad w ciągu 2 godzin lub do 6 miliardów w 1-2 tygodnie (114,115). Są to jednak metody wciąż bardzo drogie.

Analiza mtDNA stwarza również większe możliwości uzyskania pożądanego efektu w przypadku gdy materiał biologiczny jest silnie zdegradowany, a DNA jądrowe nie nadaje się do badania (106,116,117). Ogromną zaletą analizy mtDNA jest właśnie jego duża ilość kopii w komórce, większa odporność na degradację w odniesieniu do DNA jądrowego. Mitochondrialne DNA występuje również w trzonie włosa w przeciwieństwie do DNA jądrowego.

Dziedziczenie w obrębie tych dwóch rodzajów DNA różni się fundamentalnie. W DNA jądrowym oprócz markerów płci X i Y, u osoby płci męskiej wyróżniamy

genotypy składające się z dwóch cech – jednej od ojca, drugiej od matki. Natomiast w mtDNA ujawniamy holotypy badanej sekwencji wyłącznie od matki. W medycynie sądowej porównuje się uzyskane haplotypy, a kluczowe jest porównanie uzyskanej sekwencji do sekwencji referencyjnej z Cambridge tzw. CRS (ang. Cambridge Reference Sequence) (118). Analiza mtDNA jest niezwykle przydatna w identyfikacji starych szczątków (116,117). Istnieją jednak badania, według których możliwe jest dziedziczenie mtDNA zarówno od matki jak i od ojca. Pierwszy przypadek opisano w 2002 roku, a ostatnio prawidłowość taką potwierdzono u innych 17 osób z trzech niespokrewnionych, wielopokoleniowych rodzin (107,119). Badania te wykazywały dominujący autosomalny typ dziedziczenia (107). Taki udział ojcowskiego mtDNA jest jednak zjawiskiem rzadkim, prawdopodobnie związanym z zaburzeniami procesu degradacji mtDNA plemnika.

Pełne analizy genomu ludzkiego przyniosły nową erę badań DNA mitochondrialnego (mtDNA) (120). Proces ten jest pracochłonny i kosztowny. DNA mitochondrialne stanowi zaledwie ułamek całkowitego genomu ludzkiego. Jego analiza to potężne narzędzie w zrozumieniu ewolucji człowieka. Większość badań ewolucyjnych opartych na sekwencjonowaniu mtDNA ogranicza się jedynie do regionu kontrolnego, stanowiącego zaledwie 7% całego genomu mitochondrialnego (121,122). W przypadku identyfikacji badania mtDNA powinny być uzupełniane analizą chromosomu Y oraz innych odmian DNA jądrowego (77).

4. Analiza pochodzenia biogeograficznego.

Mitochondrialny DNA jest markerem haploidalnym, z jednej strony pozwala zidentyfikować osoby spokrewnione w linii matczynej, a z drugiej strony daje możliwości określenia pochodzenia biogeograficznego w linii matczynej (32,107). Jest to spowodowane jego dużym zróżnicowaniem międzypopulacyjnym zarówno na większych kontynentach i mniejszych obszarach. Mężczyźni również posiadają mtDNA, który odziedziczyli po swojej matce. Jednak oni nie przekazują go swojemu potomstwu (107). DNA mitochondrialny jest jednak bardziej wrażliwy na kontaminację, dlatego w laboratorium wdraża się specjalne procedury postępowania w celu zaniechania tym procesom (123). Jego analiza przebiega w kilku etapach i opiera się na odpowiednio dobranych metodach. W niniejszej pracy wykorzystano metodę Sangera,

czyli bezpośrednio sekwencjonowanie produktów PCR. Metoda ta z powodzeniem była wykorzystywana również w innych pracach dając świetne rezultaty (113). Procedury laboratoryjne są bardzo rygorystyczne, pomieszczenia muszą być odpowiednio wyposażone. Ważne jest aby laboratorium utrzymywało stały system kontroli jakości procesu, poprzez stosowanie negatywnych i pozytywnych kontroli ekstrakcji i amplifikacji DNA, posiadało i uaktualniało bazę zbioru haplotypów personelu, jak ma to w zwyczaju laboratorium Zakładu Genetyki Sądowej PUM (71).

Właśnie sposób dziedziczenia mtDNA i chromosomu Y determinuje nasze pochodzenie. Możemy podzielić go na haplogrupy – grupy haplotypów, które wywodzą się od wspólnego przodka. Występują one z różną częstotliwością w różnych populacjach. Dokładnie ta odmienność pomiędzy grupami sprawia, że jesteśmy w stanie odróżnić z której części świata pochodzą przodkowie danej osoby w linii męskiej lub żeńskiej. Oznacza to, że zupełnie inny rozkład haplogrup mtDNA wykazuje populacja Afryki (124), rdzennych Amerykanów (125) czy zachodniej i wschodniej Eurazji (126,127). Możemy wyodrębnić również pewne podgrupy mtDNA i chromosomu Y, które znacznie zawężą obszar pochodzenia biogeograficznego, np. dla Europy wschodniej i środkowej. Ostrożnie podchodzi się do próbek pochodzących z populacji niejednorodnych. Takie analizy mogą dostarczyć odmiennych wyników, np. populacje Ameryki Łacińskiej, gdzie liniom męskim pochodzenia europejskiego towarzyszą linie żeńskie pochodzące od rdzennych mieszkańców Ameryki (128,129).

Do tej pory odkryto wiele markerów genetycznych pochodzenia ancestralnego, (ang. ancestry informative markers), których częstość występowania różni się w poszczególnych regionach świata (130–132). Markery te służą do przewidywania pochodzenia biogeograficznego identyfikowanej osoby, a ściślej do regionu geograficznego, z którego pochodzili jego biologiczni przodkowie. Zestawy, które obecnie są dostępne na rynku, zapewniają wiarygodność predykcji pochodzenia biogeograficznego badanej osoby na poziomie głównych grup kontynentalnych (Afryki, zachodniej Eurazji, wschodniej i południowej Azji, rdzennych Amerykan) (125–128). Nie są one w stanie określić państwa, z którego może pochodzić badana osoba.

Często spotykamy się, że terminy pochodzenie etniczne i rasa, są używane jako synonimy pochodzenia biogeograficznego. Należy podkreślić, że termin etniczność odnosi się do pochodzenia kulturowego i społecznego, a tego nie jesteśmy w stanie

określić poprzez analizę mtDNA. Termin rasa natomiast odnosi się do klasyfikowania ludzi w odrębnych grupach (133).

W przypadku tej pracy do analizy biogeograficznej badanych szczątków zastosowano sekwencjonowanie hiperzmiennych regionów mtDNA. Zestawy, które wykorzystano w niniejszej pracy zawierają specjalne markery silnie różnicujące populacje między sobą. Markery te są tak dobrane, aby wartość estymacji uwzględniała następujące grupy: Afrykańczyków, Europejczyków, Azjatów (Azja Wschodnia), rdzennych Amerykanów oraz Australoidów (pierwotnej ludności Oceanii). Maja one dobry stopień amplifikacji w badanym materiale (131,132).

5. Proces degradacji DNA.

Materiał badany w pracy nosił cechy materiału kopalnego. DNA kopalne, w przeciwieństwie do DNA współczesnego, ulega znacznej degradacji i przeobrażeniu postmortem (łac. pośmiertnie). Z takim materiałem należy postępować w sposób szczególny (74). Zmiany te następują na skutek działania czynników środowiskowych. Do tego dochodzi proces kontaminacji współczesnym DNA. Stanowi to znaczny problem podczas prac w laboratorium (74).

Sam proces degradacji DNA rozpoczyna się zaraz po śmierci. DNA ulega niszczeniu po wpływie endogennych nukleaz, należących do enzymów nukleolitycznych. Dodatkowo materiał biologiczny narażony jest na działanie grzybów, bakterii, mikroorganizmów oraz bezkręgowców. W glebie zachodzi również szereg procesów chemicznych (hydroliza, oksydacja) (134,135). W sytuacji, kiedy tkanki ulegną szybkiemu wysuszeniu bezpośrednio po śmierci, wówczas DNA ulega degradacji pod wpływem enzymów nukleolitycznych lub mikroorganizmów (136). Wysokie stężenie soli lub działanie niskiej temperatury, niszczy lub inaktywuje endonukleazy, tym samym zabezpiecza przed redukcją kwasów nukleinowych do mononukleotydów (137). Procesy hydrolityczne i oksydacyjne powodują wolniejszą modyfikację DNA ale w sposób ciągły. Są one w prawdzie podobne do tych za życia ale po śmierci nie podlegają one naprawie ze względu na brak naprawczych systemów komórkowych (138). Powoduje to ich kumulację aż do momentu pełnej degradacji DNA, co skutkuje ostatecznie utartą informacją o sekwencji nukleotydowej. Reakcja PCR umożliwia amplifikację tych fragmentów, które nie uległy całkowitej degradacji. Takie sekwencje są zredukowane do długości 100-200 par zasad (139). Istnieją jednak wyjątki, w których daje się namnożyć fragmenty o długości 500 par zasad (140).

Za fragmentację kopalnego DNA odpowiadają głównie procesy hydrolityczne i oksydacyjne (139). Reakcje oksydacyjne związane są z działaniem aktywnych form tlenu (wolne rodniki wodorotlenkowe, nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy). Atakują one głównie wiązania pomiędzy pirymidynami i purynami oraz w pierścieniu dezoksyrybozy. W wyniku tych procesów dochodzi do fragmentacji pierścienia zasad i cukru. Powstają również hydantoiny, które nie są rozpoznawane przez polimerazę DNA, a co za tym idzie stają się inhibitorami reakcji PCR (141). Procesy oksydacyjne mogą również powodować powstanie 8-hydroksyguaniny, która zostaje odczytana przez

polimerazę jako adenina, w wyniku czego do nowej zsyntetyzowanej nici zostaje wbudowana tymina, powoduje to transwersję G→T.

Uszkodzenia oksydacyjne uważa się za główne przyczyny modyfikacji postmortem, blokujące aktywność polimerazy (142,143). Efektem działania inhibitorów reakcji PCR jest ostatecznie brak produktu. Wśród innych wymienić należy brak dimerów starterów oraz niespecyficzne produkty reakcji PCR (141). Do najbardziej powszechnych związków będących inhibitorami reakcji PCR należą kwasy humusowe, taniny, polifenole, kwasy fulwowe. Związki te mogą występować powszechnie w glebie w wyniku rozkładu roślin. Ilość ich zależy od rodzaju i ilości flory na powierzchni gleby, pH, temperatury i nawodnienia (144). Na rynku dostępne jest kilka metod eliminujących inhibitory reakcji PCR oraz niepożądane skutki modyfikacji DNA postmortem . Nadal nie można jednak skutecznie zaprojektować w pełni skutecznych enzymatycznych systemów naprawczych in vitro. Wynika to z ciągle nie do końca poznanych procesów uszkodzenia postmortem (143).

6. Proces identyfikacji.

Proces identyfikacji to końcowe porównanie wyizolowanego DNA pochodzącego z materiału dowodowego z profilem DNA uzyskanym z materiału porównawczego. Kolejnym etapem jest obliczenie tzw. siły dowodu uzyskanego w wyniku badań DNA mającej na celu poparcie hipotezy, że badany osobnik jest tym, którego założyliśmy. Szanse wystąpienia dwóch identycznych profili genetycznych u dwóch niespokrewnionych ze sobą osób są bardzo niskie. W przypadku analizy materiału kostnego silnie zdegradowanego, możemy nie uzyskać amplifikacji we wszystkich analizowanych markerach. Wówczas uzyskujemy profil częściowo zdegradowany. Większa liczba markerów w oznaczonym profilu daje większą szansę na prawidłowe dopasowanie profili, a tym samym powodzenie identyfikacji (145,146).

W procesie pozyskania materiału porównawczego kluczowe jest dotarcie do bliskich osoby badanej. W przypadku badań osobników Treblinka I jest to utrudnione ponieważ szczątki pochodzą sprzed 70 lat, krewni tych ofiar mogą już nie żyć, wielu krewnych zginęło wraz z nimi. Byli to osobnicy młodociani, którzy często nie mieli własnego potomstwa. Innym problemem może być brak danych archiwalnych, które mogłyby

dostarczyć informacji gdzie szukać potencjalnych krewnych. Najpierw szuka się krewnych w pierwszej linii ponieważ im dalsze pokrewieństwo tym mniej wspólnych cech. W autosomalnym profilowaniu DNA, szukanie wśród krewnych opiera się w pierwszym rzędzie na dotarciu do rodziców, dzieci, rodzeństwa. Czasem zdarza się, że w celu pozyskania materiału porównawczego nasz zespół musi dokonać ekshumacji krewnych badanej osoby.

Sam proces zabezpieczenia i wpłynięcia do laboratorium materiału biologicznego rozpoczyna proces identyfikacji. Aby wykonać izolację DNA, materiał zabezpieczony do badań musi przejść szereg procedur laboratoryjnych, które powinny posiadać certyfikat jakości Polskiego Centrum Akredytacyjnego (PCA), świadczący o pracy w zgodzie z normą PN-EN ISO/IEC 17025. Procedury badawcze wykorzystywane w laboratorium kryminalistycznym powinny być zgodne z aktualną literaturą naukową, doświadczeniem wykwalifikowanego personelu, wewnętrzną walidacją metod. Muszą one być ujednolicone dla wszystkich laboratoriów kryminalistycznych (Polskie Centrum Akredytacji; 2016. Akredytacja Laboratoriów – Dostawców Usług Kryminalistycznych wykonujących badania zgodnie z normą DAB-10; https://www.pca.gov.pl/download/data/repfiles/userfiles/_public/dokumenty_pca/dokumenty_ogolne/dab-10_1.pdf, dostęp 28 września 2021). Kolejnym etapem po izolacji DNA jest amplifikacja sekwencji docelowych na drodze reakcji PCR (ang. polymerase chain reaction). Namnożone fragmenty poddaje się analizie w wyniku elektroforezy kapilarnej, uzyskując elektroforegram, który umożliwia odczytanie alleli w przypadku analizy markerów STR lub sekwencji nukleotydowej mtDNA. Kolejnym etapem jest przeprowadzenie obliczeń biostatystycznych, których elementem jest potwierdzenie lub odrzucenie tożsamości badanej osoby.

6.1 Ograniczenia w procesie identyfikacji.

W badaniach identyfikacyjnych często napotyka się na trudności już w pierwszym etapie przystąpienia do badań. Komplikacje te dotyczą głównie materiału biologicznego poddanego długotrwałemu działaniu czynników środowiskowych, materiału starego, bardzo odległego w czasie (145,146).

W chwili śmierci ustają wszystkie procesy biologiczne, w tym również ochrona degradacji DNA. Dotyczy to wpływu czynników środowiskowych na degradację DNA (147). W procesie laboratoryjnym następuje podział dwuniciowej struktury DNA na bardzo małe fragmenty, które nie namnażają się i nie nadają do analizy. Objawia się to niską wydajnością reakcji PCR lub braku jej produktów. W innym przypadku może być to wystąpienie różnych reakcji krzyżowych, mających wpływ na aktywność polimerazy.

Do czynników destrukcyjnych zaliczamy wszystkie czynniki fizyko-chemiczne (środowiskowe): kwasowość gleby, rodzaj gleby, dostępność tlenu, wilgotność, charakter terenu (podmokły, suchy, torf, bagno). Wszystkie te czynniki powodują wcześniej opisaną modyfikację struktury zasad pirymidynowych i purynowych, budulców nici DNA (138,140). Dokładne czynniki mające wpływ na degradację DNA opisano w rozdziale 5 (Degradacja DNA).

Kolejnym czynnikiem destrukcyjnym są mikroorganizmy (bakterie, grzyby). One już na wstępnym etapie badań (przygotowanie materiału, izolacja), potrafią stwarzać ogromne problemy. Rozwijają się w martwych tkankach wraz z upływem czasu. Produkowane przez nie enzymy niszczą strukturę DNA. Kwasy nukleinowe ulegają rozpadowi. Domieszka DNA bakterii i grzybów stanowi problem już na etapie izolacji próbki powodując jej kontaminację. Dyskwalifikuje to badany materiał (próbkę) do dalszych etapów identyfikacji oraz podnosi kosztu tego procesu. Obecność mikroorganizmów powoduje również zakwaszenie gleby. Innym problemem jest zanieczyszczenie próbek aktualnym egzogennym DNA, które namnoży się znacznie szybciej ponieważ jest świeże (148,149). Należy podkreślić, że wszystkie metody prowadzące do ekstrakcji DNA są metodami wysoce inwazyjnymi, niszczącymi strukturę kości oraz bezpowrotną utratę materiału. W przypadku izolacji DNA z zębów, taki ząb trzeba pobrać, a w kolejnym etapie skruszyć w obecności ciekłego azotu. W przypadku

pobierania kości, należy je najpierw dokładnie oczyścić, następnie odciąć fragment i również w kolejnym etapie poddać kruszeniu. Jeżeli DNA izolujemy z tkanek, również należy pobrać jej fragment i poddać homogenizacji. Są to procesy problematyczne, poruszające kwestie etyczne, szczególnie kiedy materiałem biologicznym jest materiał historyczny czy archeologiczny (relikt) (150). W tego typu badaniach sądowe laboratorium genetyczne dąży do uzyskania jak najwyższej jakości matrycowego DNA, wolnego od wszelkich inhibitorów. Przy doborze odpowiedniej metody izolacji, należy wziąć pod uwagę stan zachowania i rodzaj badanego materiału. Sama izolacja jest często procesem niepowtarzalnym, ze względu na ograniczony dostęp do materiału (73). Dobór odpowiedniej metody może zaważyć na tym czy uda nam się zidentyfikować określonego osobnika. Materiał analizowany w pracy był materiałem o znaczeniu szczególnym, którego pobieranie było konsultowane z prokuratorami IPN i wymagało ich zgody. Dlatego w pracy wykorzystano wyłącznie zęby.

Teren otaczający obóz Treblinka I to obecnie nieużytki, piach, nieregularna rzeźba terenu, lasy iglaste. Lasy iglaste (sosnowe), to głównie gleby bielicowe i pyłowe o kwaśnym pH, charakteryzują się niskim poziomem próchnicy. Dodatkowo lasy iglaste wydzielają liczne olejki eteryczne i żywice, które wraz z opadami spływają do gleby. Kwasy humusowe gleby należą do inhibitorów reakcji PCR. Oddziaływanie tego rodzaju czynników środowiskowych na proces degradacji DNA opisano w rozdziale nr 5 (Proces degradacji DNA). Pierwsze odnalezione elementy kostne znajdowały się zaledwie 15 cm pod ziemią, to praktycznie wierzchnia warstwa gleby, niedaleko „turystycznego wysypiska śmieci”. Były one narażone na działanie czynników środowiskowych. Wszystko to wpłynęło na stan zachowania w nich DNA, a co za tym idzie uzyskane wyniki.

Opracowanie materiału stanowiło wyzwanie ze względu na stan zachowania DNA. Nie udało się uzyskać wszystkich profili odnalezionych szkieletów (Tabela nr 3,4). Uzyskano niskie stężenia DNA (Tabela nr 1). Większość elementów kostnych oczyszczono na sucho z resztek gleby na miejscu ekshumacji, przy pomocy szczoteczek i pędzli. Materiał przewieziono do Zakładu Genetyki Sądowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Szkielety zachowane były w stanie fragmentarycznym, elementy szkieletowe wielu osobników były przemieszane ze sobą, szkielet żadnej z osób nie był ułożony w porządku anatomicznym ani w zbliżonej względem siebie lokalizacji elementów szkieletu. Na miejscu ekshumacji czaszki

pakowano osobno w celach zabezpieczenia materiału oraz w celu łatwiejszego oszacowania minimalnej liczby osobników. Dopiero w trakcie badań laboratoryjnych okazało się, że niektóre elementy czaszek były rozdzielone i przemieszane w grobie masowym, co spowodowało zawyżenie szacunku minimalnej liczby osób w warunkach polowych. Inaczej zachowały się szczątki odnalezione w jamach grobowych, w których widoczne były zarysy rozłożonej ich trumny. W jednym ze szkieletów zachował się nawet skalp z włosami. Rozkład tych szczątków zachodził w odmiennych warunkach, co przełożyło się na uzyskane wyniki badań.

7. Bazy populacyjne.

Analiza DNA mitochondrialnego wymaga odpowiednich wysokiej jakości baz populacyjnych zawierających dane, które pozwolą oszacować rzadkości uzyskanych haplotypów. Dostępne na rynku bazy mtDNA zawierają głównie informacje dotyczące regionu kontrolnego (151). Wyniki sekwencjonowania DNA oraz dane populacyjne powinny stale podlegać kontroli jakości przy pomocy narzędzi filogenetycznych. Prosty i skutecznym sposobem kontroli jest określenie przynależności haplogrupowej opierającej się na mutacjach diagnostycznych. Służą do tego specjalne bazy populacyjne.

Najpowszechniejszą bazą danych populacyjnych haplotypów mtDNA jest EDNAP (EMPOP, <http://www.empop.org>, ang. The EDNAP Mitochondrial DNA Population Database, pol. populacyjna baza DNA mitochondrialnego grupy EDNAP). Jest to baza służąca nie tylko jako referencyjna baza danych populacyjnych ale również jako narzędzie kontroli jakości dla genetyków sądowych. Jest to najbardziej wszechstronne źródło. Pokrewnym narzędziem do automatycznego określania haplogrup, oferowanego przez bazę EMPOP, jest EMMA (ang. Maximum Likelihood approach, pol. podejście maksymalnego prawdopodobieństwa). Opiera się ona na danych, które zawiera baza PhyloTree. Baza ta oferuje również dodatkową funkcję w postaci wyszukiwania ewentualnych artefaktów, jakie można spotkać w danych populacyjnych, opartych na sieci haplotypów (ang. quasi-median networks). Daje to możliwość szybkiego wychwycenia nieoczekiwanych mutacji, mogących być artefaktami procesu sekwencjonowania lub innych błędów w analizie mtDNA. W bazie EMPOP haplogrupy geograficzne przedstawiane są za pośrednictwem map. Ma to na celu lepszą wizualizację i zrozumienie ich rozmieszczenia geograficznego (151).

Inną bazą jest PhyloTree, zapewnia ciągle aktualizowaną kompleksową filogenezę zmienności ludzkiego mtDNA na świecie. Oparta jest na mutacjach w regionie kodującym i kontrolnym. Drzewo filogenetyczne analizowanego mtDNA obejmuje wcześniej opublikowane jak i nowo zidentyfikowane haplogrupy. Są one stale aktualizowane i uzupełniane o nowe (147) (<http://www.phylotree.org>).

Kolejną bazą populacyjną jest HaploGrep. Jest to również narzędzie służące do identyfikacji haplogrup DNA mitochondrialnego. Baza ta oferuje szybkie i proste narzędzie do określenia pochodzenia geograficznego. Znormalizowana procedura

przypisywania haplogrup chroni przed intuicyjnym przypisywaniem poszczególnych próbek do określonych haplogrup. Wykorzystuje najnowszą wersję PhyloTree oferując kompleksowe rozwiązanie do oceny jakości profili mtDNA w genetyce populacyjnej i kryminalistycznej (152).

Tego rodzaju narzędzia służą do eliminacji błędów w publikowanych badaniach i danych populacyjnych, medycznych i sądowych (153,154). Każde wyniki badań populacyjnych mtDNA przed publikacją podlegają ścisłej kontroli prowadzonej przez zespół EMPOP. Zaleca się aby takiej kontroli poddawać również bazy wykorzystywane przez polskie laboratoria w celu oceny wartości dowodowej badań DNA mitochondrialnego.

Interpretując wyniki badań mtDNA musimy wziąć pod uwagę, że jest to marker haploidalny. Różne pozycje sekwencji mogą się charakteryzować różną szybkością mutacji. Oznacza to, że z jednej strony traktujemy profile mtDNA jako haplotypy z drugiej bierzemy pod uwagę względną ewolucyjność i niestabilność sekwencji. Sprawia to trudności w określeniu wykluczenia dwóch haplotypów z tej samej linii żeńskiej, opartej jedynie na różnicach w sekwencjach (153).

Zgodnie z rekomendacjami ISFG (ang. Forensic Science International Genetics) aby określić częstość występowania określonych haplotypów, zaleca się korzystanie baz danych, które zapewniają maksymalnie konserwatywną wykładnię wartości dowodowej (155). Chodzi o to aby przy szacowaniu częstości występowania danego haplotypu wziąć pod uwagę silne zróżnicowanie populacyjne mtDNA na różnych obszarach geograficznych i korzystać z bazy danych danego regionu geograficznego, z którego może pochodzić badany haplotyp. W przypadku haplogrup pochodzenia europejskiego możemy korzystać z bazy EMPOP, obejmuje ona populacje zachodniej Eurazji. Gdyby w badaniach wyszło, że analizowany haplotyp regionu kontrolnego pochodzi z populacji Europy Środkowej i wschodniej, wówczas wykorzystalibyśmy odpowiednie geograficzne bazy danych. Pomocne mogłoby okazać się przeszukanie bazy regionu kontrolnego zachodniej Eurazji. Wynika to z nieznacznego rozwarstwienia populacji na tym obszarze świata (49). Baza EMPOP oferuje dodatkowo możliwość pominięcia niestabilnych fragmentów sekwencji charakteryzujących się polimorfizmem długości, czego nie powinno się omijać w przypadku wystąpienia zjawiska heteroplazmii, dlatego

każde laboratorium powinno zawsze odpowiednio przemyśleć wybór bazy danych w celu analizy uzyskanych wyników (155).

Przy tego rodzaju narzędziach, szczególnie, że są one dostępne on line, mogą się pojawić problemy etyczne i prawne. Potencjał informacyjny jaki stanowi analiza mtDNA generuje pytania dotyczące prywatności i ochrony takich danych. Dlatego analiza mtDNA powinna być przeprowadzana wyłącznie w regionie niekodującym, który nie został powiązany z żadną informacją fenotypową (156,157).

II Cele pracy.

Celem pracy było:

1. Sprofilowanie szczątków ekshumowanych z grobu masowego oraz pojedynczych jam grobowych ujawnionych na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I.
2. Określenie haplogrup DNA mitochondrialnego wszystkich osobników ekshumowanych na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I.
3. Ustalenie pochodzenia biogeograficznego szczątków ekshumowanych z grobu masowego oraz pojedynczych jam grobowych ujawnionych na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I.
4. Analiza pokrewieństwa w programie Familias 3 wśród osobników ekshumowanych z grobu masowego.

III Materiał i metody badawcze.

3.1 Materiał.

Materiał badawczy stanowiły wyłącznie zdrowe zęby zabezpieczone ze szczęki, mocno przytwierdzone, co zabezpieczyło ich korzenie przed dostępem endogennego materiału genetycznego. Rodzaj pobranego materiału oraz jego ogólne stężenie przedstawiono w tabeli nr 1 (jamy grobowe) i 2 (grób masowy). Na podstawie wstępnej oceny antropologicznej ustalono, że w grobie znajdowało się około 50 ofiar. Podczas prac ekshumacyjnych odkryto również 7 grobów, które prawdopodobnie należały do określonej grupy osób.

Zespół Polskiej Bazy Genetycznej Ofiar Totalitaryzmów przeprowadził czynności ekshumacyjne w ramach śledztwa w sprawie zbrodni nazistowskich z lat 1941-44 na więźniach obozu, na zlecenie prokuratury Instytutu Pamięci Narodowej (IPN).

Poniżej w tabelach przedstawiono zabezpieczony materiał biologiczny.

Tabela 1. Zabezpieczony materiał biologiczny do badań DNA pobrany ze szczątków podniesionych z pojedynczych jam grobowych.

Materiał ekshumacyjny	Nr próbki	Pobrany materiał
szkielet	szkielet 1	Zęby ze szczęki
szkielet	szkielet 2	Zęby ze szczęki
szkielet	szkielet 3	Zęby ze szczęki
szkielet	szkielet 4	Zęby ze szczęki
szkielet	szkielet 5	Zęby ze szczęki
szkielet	szkielet 6	Zęby ze szczęki
szkielet	szkielet 7	Zęby ze szczęki

Tabela 2. Zabezpieczony materiał biologiczny pochodzący z grobu masowego.

Materiał ekshumacyjny	Nr próbki	Pobrano materiał
Czaszka nr 1	82	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 2	83	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 3	84	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 4	86	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 5	87	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 6	89	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 7	90	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 8	126	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 9	127	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 10	128	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 11	131	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 12	133	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 13	134	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 14	136	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 15	139	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 16	152	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 17	153	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 18	156	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 19	160	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 20	162	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 21	163	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 22	170	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 23	172	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 24	81	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 25	85	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 26	88	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 27	124	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 28	125	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 29	135	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 30	138	Zęby ze szczęki

Material ekshumacyjny	Nr próbki	Pobraný material
Czaszka nr 31	154	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 32	155	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 33	157	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 34	158	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 35	159	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 36	161	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 37	164	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 38	167	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 39	169	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 40	172	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 41	174	Zęby ze szczęki
Czaszka nr 42	175	Zęby ze szczęki

Ekshumowano minimum 49 osobników z grobu masowego. Materiał biologiczny do analiz genetycznych zabezpieczono i przebadano od 42 osobników. Od 7 osobników nie pobrano materiału ponieważ w szczęce nie było zębów, nie uzyskano zgody od prokuratora IPN na pobranie innego materiału biologicznego ze względu na charakter ekshumacji.

3.2. Analizy antropologiczne szczątków odnalezionych w jamach grobowych i grobie masowym.

Analizy antropologiczne posłużyły do oszacowania wieku biologicznego w chwili śmierci, płci, pochodzenia biogeograficznego oraz wzrostu. Dokonano również oględzin kryminalistycznych w celu ustalenia obrażeń na kościach oraz zmian patologicznych celem ustalenia przyczyny śmierci odnalezionych szczątków. Wszystkie urazy zadane perimortem (pol. okołośmiertnie) konsultowano z patomorfologiem sądowym, który sugerując się wynikami analiz osteologicznych dostarczonych przez antropologa sądowego, był w stanie określić przyczynę i rodzaj śmierci. Aby dokonać wzorca analizy obrażeń danego szkieletu, należy powiązać wszystkie wolne elementy z jednym szkieletem, do którego należą. Jest to bardzo trudne w przypadku grobów masowych. Kluczowe jest oszacowanie ilości osobników w takim pochówku. Istnieje kilka metod, które można wykorzystać w takim przypadku. Wykorzystali je również inni badacze (83,158,159).

W przypadku siedmiu indywidualnych pochówków badaniu poddano standardową ocenę profilu biologicznego oraz urazów. Szkielety były pochowane pojedynczo co znacznie ułatwiło zadanie. Łatwiej było również ocenić ewentualne urazy. W przypadku zachowania czaszki i żuchwy możliwe jest w przyszłych badaniach odtworzenie twarzy i porównanie jej z posiadanymi fotografiami strażników obozu Treblinka I, co planuje się wykonać w dalszych badaniach stanowiska.

Przy analizie antropologicznej grobu masowego znacznie trudniej było oszacować liczbę osobników. Szkielety nie znajdowały się w układzie anatomicznym tylko były wymieszane. Wymusiło to segregację poszczególnych elementów kostnych i podziały na osie szkieletu (strona lewa i prawa). Każdy większy element numerowano, dokumentowano i opisywano, wykonywano pomiary. Było to bardzo czasochłonne.

Osobnicy ekshumowani w Treblince I byli w młodym wieku dlatego do oszacowania wieku biologicznego okazało się być pomocne w procesie asocjacji elementów szkieletu (159). Do określania płci biologicznej wykorzystano metody morfologiczne, wszędzie gdzie było to możliwe (160). Ocenie poddano również kości wykazujące największy dymorfizm płciowy – kość biodrowa, udowa, ramieniowa oraz czaszkę (161,162). Metody te są rekomendowane przez środowisko medyków sądowych raz antropologów. Oszacowanie wieku wykonano przy pomocy oceny stadiów zrostu

nasadowego (163), etapów wyrzynania zębów (164) oraz wyników metrycznych wymiarów kości. Pomiary kości udowych przy użyciu ogólnej formuły regresji użyto do oceny wysokości osobników (165). Jest to metoda wykorzystywana w przypadku osobników zmarłych przed 1960 rokiem.

Pochodzenie biogeograficzne metodami antropologicznymi określono na podstawie pomiarów czaszek, które analizowano przy pomocy oprogramowania Cranid (166), Ancestrees (167) i Fordisc 3.0 (168).

Minimalną liczbę osób ekshumowanych z grobu masowego w Treblince I oszacowano metodami antropologicznymi na 49. Wszystkie osoby, dla których było możliwe oszacowanie płci biologicznej były płci męskiej. Wiek biologiczny szacowany metodami antropologicznymi oceniono się na od około 10 lat do około ponad 60 lat w chwili śmierci. Przyżyciowa wysokość ciała szacuje się od około 145,42 cm do około 179,93 cm (+/- 3,27 cm). Oszacowano również pochodzenie biogeograficzne na podstawie metod antropologicznych, dla 33 czaszek. Wygląda ono następująco: 17 czaszek jest pochodzenia europejskiego, 4 północno-afrykańskiego, 3 południowo-azjatyckiego. Dla 9 czaszek wyniki badania biogeograficznego, przy użyciu dwóch programów, dały niespójne wyniki. Mogły to być czaszki o mieszanym pochodzeniu lub ich pośmiertna deformacja wpłynęła na wyniki badań.

Na 34 czaszkach i pozostałych elementach kostnych dostrzeżono obrażenia perimortem. Większość z tych obrażeń ma charakter bierny, co świadczy o tym, że były to ofiary przemocy. Złamania kości śródrezcza mogą wskazywać również na charakter czynny, gdzie zmarli zadawali ciosy pięścią. Widoczne obrażenia stanowią typ zadanych narzędziami tępokrawędzistymi, ostrokrawędzistymi, jak i tych będących skutkiem postrzałów. Obrażenia te wskazują na działanie osób trzecich. Takie obrażenia i urazy (widoczna na minimum 26 czaszkach), mogą spowodować rozległe uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego lub pnia mózgu doprowadzając do zgonu.

3.3 Zastosowane metody badawcze.

Badania genetyczne przebiegały etapowo i wymagały doboru określonych procedur i metod. Celem pierwszego etapu było uzyskanie jak najwyższej matrycy DNA. Wybrano metody rutynowo stosowane w Zakładzie Genetyki Sądowej. Szczególną uwagę zwrócono na zapobieganie kontaminacji. Każdą z czynności wykonywano w innym obszarze laboratorium. Dokonano ich podziału według przeznaczenia: przygotowanie materiału kostnego do izolacji, miejsce w którym izolowano DNA, miejsce kwantyfikacji DNA i PCR, pomieszczenie do przeprowadzania elektroforezy kapilarnej. Wszystkie pomieszczenia wyposażone są w komory laminarne, samodzielny recyklator UV. Jakość i ilość otrzymanych ekstraktów mierzono metodą Real-Time PCR, przy użyciu zestawu do amplifikacji zaprojektowanego specjalnie dla materiału o potencjalnie niskiej matrycy DNA, co pozwala oszacować stopień degradacji DNA oraz obecność inhibitorów PCR. W celu oceny czystości uzyskanych ekstraktów i określenia płci biologicznej osobników, próbki poddano profilowaniu STR za pomocą wysoko czułego zestawu do amplifikacji zaprojektowanego specjalnie dla genetyki sądowej. Wszystkie wyżej opisane czynności i analizy wykonano w Zakładzie Genetyki Sądowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie.

Zabezpieczenie materiału do badań DNA przeprowadzono zgodnie z wszelkimi zasadami aseptyki i antyseptyki. W przypadku izolacji DNA zastosowano kontrole pozytywne oraz negatywne reakcji izolacji. Kontrolę pozytywną stanowiła krew zabezpieczona na karcie FTA o znanym stężeniu DNA. W kontroli negatywnej zastosowano wodę dejonizowaną wolną od nukleotydów, dedykowaną do metod biologii molekularnej. Procedury badawcze przeprowadzono w oparciu o akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (norma PN-EN ISO/IEC 17025) od 2017 roku.

Podczas całej procedury laboratoryjnej stosowano odpowiednie środki ochrony osobistej oraz środki dezynfekcyjne dedykowane biologii molekularnej. Drobną sprzęt laboratoryjny używany do badań był sterylny, jednorazowego użytku.

W pracy wykorzystano następujące metody badawcze:

1. Oznaczenie polimorfizmów DNA w systemie identyfikacji osobniczej Global Filer wśród osobników ekshumowanych z jam grobowych (tabela nr 4) oraz z grobu masowego (tabela nr 5a-5d).
2. Oznaczenie polimorfizmów DNA w systemie identyfikacji osobniczej Y Filer Plus wśród osobników ekshumowanych z jam grobowych (tabela nr 6) oraz z grobu masowego (tabela nr 7a-7c).
3. Analizę DNA mitochondrialnego w zakresie HV1 i HV2 osobników ekshumowanych z jam grobowych (tabela nr 8).
4. Pełne sekwencjonowanie (NGS) genomu mitochondrialnego DNA osobników ekshumowanych z jam grobowych (tabela nr 12).
5. Analizę DNA mitochondrialnego w zakresie HV1 i HV2 osobników ekshumowanych z grobu masowego (tabela nr 10).
6. Określenie przynależności haplogrupowej szacowanej w bazie EMPOP osobników ekshumowanych z jam grobowych (tabela nr 8).
7. Zestawienie haplogrup mtDNA osobników ekshumowanych z jam grobowych oraz z grobu masowego szacowanych w programie HaploGrep (tabela nr 11).

3.4 Opracowanie materiału kostnego do izolacji DNA.

DNA izolowano z zębów zabezpieczonych w całości. Następnie uzyskane fragmenty materiału oczyszczano mechanicznie frezarką (Proxxon) przy użyciu frezów diamentowych przeznaczonych do wstępnej obróbki zębów aż do całkowitego usunięcia zewnętrznej warstwy materiału, która jest szczególnie narażona na skutki zachodzących procesów gnilnych, metabolity bakteryjne i grzybicze oraz DN-azy (169). Na tym etapie pozbywano się także ubytków próchnicznych oraz plomb. Następnie materiał oczyszczano chemicznie celem eliminacji DNA egzogenego, poprzez płukanie w roztworze Tween20 przez 5 minut w wytrząsarce. Kolejnym etapem było dokładne płukanie w wodzie destylowanej. W ostatnim etapie materiał suszono w komorze laminarnej z przepływem jałowego powietrza oraz poddawano promieniom zintegrowanej lampy UV przez 30 minut z każdej strony, w celu uniknięcia kontaminacji. Tak przygotowany materiał kruszono w młynku kriogenicznym w środowisku ciekłego azotu do momentu uzyskania z nich proszku kostnego. Proszek kostny umieszczano w jałowych falkonach do momentu izolacji, przechowując go w temp. – 80 st. C.

3.5 Izolacja DNA.

Szczególną uwagę zwrócono na stan zachowania materiału biologicznego. Zastosowano nieinwazyjne metody pobierania próbek, które nie naruszyły struktury materiału. Miało na to wpływ również ewentualne pochodzenie żydowskie ofiar. Zgodnie z literaturą zapobiegano kontaminacji materiału (170,171).

DNA ekstrahowano przy użyciu zestawu PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z protokołem producenta (172). Po procesie trawienia do mieszanina dodaje się magnetyczne kuleczki, które mają właściwości specyficznego wiązania, przez co inne składniki mieszaniny lizującej (także zanieczyszczenia) pozostają w buforze. Działanie pola magnetycznego powoduje, że mogą być one zatrzymywane w probówce wraz z związanym DNA, podczas usuwania mieszaniny trawiącej. Wiązanie to jest na tyle stabilne, że pozwala na kilkukrotne płukanie, w celu pozbycia się ewentualnych resztek zanieczyszczeń. Ostatni etap tej metody to uwalnianie DNA do buforu elucyjnego. Metoda ta pozwala uzyskać DNA

wysokiej jakości ale i połączyć wykorzystywaną technikę z aparaturą do automatycznej izolacji co zabezpiecza przed kontaminacją.

Kontrolę dodatniej użyto krwi zabezpieczonej na karcie FTA o znanym stężeniu DNA. Kontrolę ujemną stanowiła woda wolna od nukleaz. Postępowano zgodnie ze standardami i procedurami opisanymi w literaturze (70,71,80).

3.6 Oznaczenie stężenia DNA, stopnia degradacji DNA i obecności inhibitorów reakcji PCR.

Oszacowanie stężenia DNA jest niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu procesu dalszych etapów badań. Zbyt mała lub zbyt duża ilość DNA matrycowego prowadzi do powstania artefaktów, a w efekcie niepowodzenie procesu identyfikacji.

Ekstrakty DNA oznaczano ilościowo przy pomocy zestawu Quantifiler™ Trio DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific) na aparacie 7500 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) w celu oceny stężenia ludzkiego DNA i ludzkiego męskiego DNA w ekstraktach, wykrywania obecności inhibitorów PCR i określenia poziomu degradacji DNA. Zestaw oparty jest na trzech rodzajach sond molekularnych znakowanych fluorescencyjnie przyłączających się podczas trwania reakcji PCR na zasadzie komplementarności DNA do określonych sekwencji docelowych w genomie ludzkim: krótkich fragmentów DNA autosomalnego (T. small, o długości 80 pz, barwnik: VIC™), długich fragmentów DNA autosomalnego (T. large, 214 pz, barwnik: ABY™) oraz DNA zlokalizowanego na chromosomie Y (T. Y, 75 pz, barwnik: FAM™). Emitowana podczas amplifikacji fluorescencja jest porównywana z sygnałem pochodzącym z drabiny rozcieńczeń standardu o znanej wartości stężenia DNA. Stężenie DNA, ilość DNA pochodzącego od mężczyzny i stopień degradacji DNA (stosunek wartości fragmentów T. large do fragmentów T. small), obliczono przy pomocy programu HID Real-Time PCR Analysis Software v1.2 (Thermo Fisher Scientific). Zestaw był wykorzystany również przez innych autorów (173,174).

Uzyskane amplikony poddano elektroforezie kapilarnej w analizatorze genetycznym 3500 (Thermo Fisher Scientific), a dane przetwarzano za pomocą oprogramowania GeneMapper® ID-X (Thermo Fisher Scientific). Dla każdej amplifikacji przygotowano kontrole pozytywne i negatywne w celu oceny wydajności i czystości etapu amplifikacji. Kontrola pozytywna zawierała mieszaninę reakcyjną i kontrolę DNA 007, kontrola negatywna zawierała mieszaninę reakcyjną i wodę wolną od nukleaz.

W pracy wykorzystano ogólne stężenie DNA ludzkiego.

Do kolejnych etapów badań przystąpiono po uzyskaniu nakładających się profili STR dla badanych próbek, prawidłowego profilu pozytywnej próbki kontrolnej amplifikacji i pozytywnej próbki izolacyjnej oraz braku alleli dla negatywnej izolacji

i próbek amplifikacji. Obie te metody są rutynowo stosowane do analizy próbek w Zakładzie Genetyki Sądowej (72,175).

Ze względu na charakter materiału badawczego przewidziano, że ekstrakty DNA mogą zawierać niewielkie ilości DNA matrycowego. Jednak metody, które zastosowano w badaniu, wybrane przez naukowców i ekspertów z dziedziny genetyki sądowej, pozwoliły na uzyskanie danych nadających się do analizy. Wszystkie próbki badano w trzech powtórzeniach, w zależności od jakości danych, a do końcowej analizy użyto sekwencji konsensusowej, zgodnie ze wskazówkami literatury (130,176).

Zastosowano również dodatkowe procedury, mające zminimalizować dodatkowe ryzyko zanieczyszczenia i degradacji. Zachowano ciągłość badań, aby uniknąć częstego rozmrażania próbek. Każdy etap badań zawierał kontrole pozytywne i negatywne w celu oceny wydajności i sterylności etapów. Zespół Zakładu Genetyki Sądowej posiada duże doświadczenie w pracy zarówno z materiałem zdegradowanym (70,71,80,175), jak i technologią NGS (130,177).

3.7 Amplifikowanie fragmentów STR w systemie Global Filer.

Markery STR amplifikowano przy użyciu zestawu GlobalFiler™ PCR Amplification Kit (Thermo Fisher Scientific) (178) zgodnie z protokołami producenta, z 29-cyklowym profilem termicznym, na termocyklerze GeneAmp™ PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific). Zestaw GlobalFiler™ PCR Amplification Kit amplifikuje 21 autosomalnych loci STR, 1 loci Y-STR, 1 marker polimorficzny insercji/delecji na chromosomie Y oraz amelogeninę (marker determinujący płeć). Obecność markerów Y-STR i Y-indel pomaga uniknąć błędów w identyfikacji płci. Wykorzystuje ulepszone startery do amplifikacji, które zapewniają czyste tła elektroforetyczne ułatwiające interpretację. Do reakcji użyto maksymalnej ilości izolatu DNA, ze względu na przewidywany duży stopień degradacji materiału.

Uzyskane amplikony poddano elektroforezie kapilarnej w analizatorze genetycznym 3500 (Thermo Fisher Scientific). Dane analizowano przy pomocy oprogramowania GeneMapper® ID-X (Thermo Fisher Scientific). Są to procedury rutynowo prowadzone w Zakładzie Genetyki Sądowej (72,175).

3.8 Amplifikowanie fragmentów STR w systemie Y Filer Plus.

W celu analizy markerów Y-STR wykorzystano zestaw Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) (179). Zestaw amplifikuje 25 loci Y-STR w pojedynczej reakcji PCR przy użyciu chemii 5 barwników, w celu zapewnienia najwyższej zdolności identyfikacji. Zestaw charakteryzuje się specyficzną zdolnością różnicowania dzięki wysoce dyskryminującym markerom. Dedykowany do próbek zdegradowanych. Lepsza dokładność genotypowania dzięki rozszerzonej drabinie allelicznej.

3.9 Sekwencjonowanie całego genomu mitochondrialnego.

Do sekwencjonowania całych mitogenomów wykorzystano technologię IonTorrent. Biblioteki przygotowano przy użyciu zestawu Precision ID Library Kit i Precision ID mtDNA Whole Genome Panel. Dzięki innowacyjnemu podejściu kafelkowania w tym panelu, możliwe jest uzyskanie całych genomów mitochondrialnych z silnie zdegradowanego materiału. Precision ID mtDNA Whole Genome Panel zawiera 2 pule starterów, każda po 81 starterów, które pozwalają na sekwencjonowanie krótkich, nakładających się amplikonów. Przygotowanie biblioteki, w tym amplifikacja sekwencji docelowych, częściowe trawienie amplikonu, ligacja adaptorów i oczyszczanie biblioteki, przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Biblioteki oceniono ilościowo przy użyciu zestawu Ion Library TaqMan® Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) i systemu QuantStudio™ 5 Real-Time PCR, zgodnie z instrukcjami producenta, rozcieńczono do optymalnego stężenia i połączono.

Przygotowanie szablonu i ładowanie chipa wykonano przez przyrząd Ion Chef™ przy użyciu zestawu Ion S5™ Precision ID Chef & Sequencing Kit oraz Ion 530™ Chip. Sekwencjonowanie przeprowadzono na sekwenatorze HID Ion S5™. Dane sekwencjonowania przeanalizowano przez Torrent Suite 5.10.2, a sekwencje mtDNA porównano z poprawioną sekwencją referencyjną Cambridge (rCRS) przez oprogramowanie Torrent Variant Caller (wszystkie powyżej: Thermo Fisher Scientific). Zarówno przyrząd Ion Chef™, jak i sekwenator HID Ion S5™ są własnością Zakładu Genetyki Sądowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, a personel jest wykwalifikowany i doświadczony w analizie danych mtDNA oraz sekwencjonowaniu nowej generacji, co wskazano w (70,71,80,175).

3.10 Analiza mtDNA.

Sekwencje mitochondrialnego DNA zostały określone dla regionów hiperzmiennych HV1 i HV2. Zastosowane sekwencje starterów do amplifikacji były zgodne z literaturą (180) dla par starterów: 15971 i 16410 dla HVI i L15 oraz R429 dla HVII. Regiony hiperzmiennie amplifikowano w dwóch oddzielnych reakcjach PCR przy użyciu zestawu HotStar Taq Master Mix Kit. Mieszanka reakcyjna PCR w całkowitej objętości 20 μ l składała się z: 10 μ l HotStar Taq Master Mix (QIAGEN), 6 μ l wody wolnej od RNaz, 0,5 μ l 100mM starterów każdej pary i 3 μ l oczyszczonego DNA. Amplifikacje przeprowadzono w termocyklerze GeneAmp™ PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) w następujących warunkach termocyklingu: 95°C przez 15 min., a następnie 35 cykli: 94°C przez 30 s, 53°C przez 30 s i 72°C przez 1 min., następnie końcowy etap wydłużania w 72°C przez 10 min (181) Kontrola pozytywna zawierała mieszaninę reakcyjną i kontrolę DNA, kontrola negatywna zawierała mieszaninę reakcyjną i wodę wolną od nukleaz.

Kolejnym etapem było enzymatyczne oczyszczenie otrzymanych produktów PCR. Mieszanina reakcyjna składała się z 5 μ l produktu PCR, 0,5 μ l egzonukleazy I 20U/ μ l (Thermo Fisher Scientific) i 1,0 μ l termoczulej fosfatazy alkalicznej - FastAP I 1U/ μ l (Thermo Fisher Scientific). Mieszaniny reakcyjne zawierające próbki, kontrolę pozytywną i negatywną inkubowano w 37°C przez 15 min, a następnie reakcję zatrzymano przez ogrzewanie mieszaniny w 85°C przez 15 min (182).

Oczyszczony produkt PCR zostanie zsekwencjonowano przy użyciu zestawu BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit i określonych starterów. Reakcję przeprowadzono osobno dla każdego startera użytego w pierwszym PCR (1F, 1R, 2F lub 2R). Reakcja sekwencjonowania w całkowitej objętości 20 μ l składała się z: 4 μ l BigDye™ Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, 2 μ l BigDye™ Terminator v1.1 i v3.1 5X Bufor do sekwencjonowania, 2 μ l jednego z 4 starterów, 9 μ l wody wolnej od RNaz i 3 μ l oczyszczonego produktu reakcji enzymatycznej. Reakcja sekwencjonowanie z użyciem terminatorów reakcji została przeprowadzona na termocyklerze GeneAmp™ PCR System 9700 (Thermo Fisher Scientific) z następującym profilem termicznym: 96°C przez 1 min, następnie 33 cykle: 95°C przez 10 s, 50°C przez 5 s, 60°C przez 4 min. (183).

Produkty reakcji sekwencjonowania oczyszczono z terminatorów reakcji za pomocą ExTerminator (A&A) zgodnie z instrukcjami producenta Sekwencje poddano

elektroforezie kapilarnej w analizatorze genetycznym 3500 (Applied Biosystems). Uzyskane sekwencje badanych próbek, kontroli dodatnich i ujemnych porównano ze zmienioną sekwencją referencyjną Cambridge (rCRS) i oceniono przy użyciu oprogramowania Sequencher DNA Sequence Analysis Software.

Haplogrupy DNA mitochondrialnego poddano analizie z wykorzystania dwóch narzędzi filogenetycznych: bazy danych EMPOP (<http://empop.online>) (184) oraz programu HaploGrep (<https://haplogrep.i-med.ac.at>) (185).

3.11 Analiza profilów genetycznych.

Do analizy profilów genetycznych wykorzystano program GeneMapper® ID-X Software v2.0 (Life Technologies Corporation). Walidacje metody dla zestawów multipleksowych przeprowadzono w Zakładzie Genetyki Sądowej PUM w Szczecinie. Przyjęto wartość odcięcia 100 RFU.

3.12 Analiza pokrewieństwa w systemie Familias 3.

Dodatkowo wśród osobników z grobu masowego dokonano analizy pokrewieństwa pomiędzy ekshumowanymi szczątkami. Ponieważ w grobie masowym znajdowali się wyłącznie osobnicy płci męskiej, założono hipotezę ojciec-syn-kuzyn.

Program Familias (<https://familias.no/>) wykorzystywany jest do obliczenia prawdopodobieństwa w przypadku gdy oznaczone są profile DNA osób i wątpliwe są ich powiązania rodzinne. Uwzględnia wiele alternatywnych rodowodów biorąc pod uwagę bazę danych populacyjnych. Oprogramowanie zostało opracowane przez Pettera Mostada i Thore Egelanda we współpracy z Norweskim Centrum Obliczeniowym oraz Instytutem Medycyny Sądowej w Oslo.

IV Prezentacja wyników badań.

4.1 Analizy genetyczne w systemie Global Filer i Y Filer Plus osobników jam grobowych i grobu masowego.

Badania genetyczne szczątków ekshumowanych z jam grobowych oraz grobu masowego objęły oznaczenia profilów genetycznych w systemie Global Filer i Y Filer Plus. Wyniki uzyskanych profili DNA oraz całkowitych stężeń DNA przedstawiono w tabeli nr 3.

W systemie identyfikacji osobniczej Global Filer uzyskano 6 profili na 7 badanych osobników ekshumowanych z jam grobowych. W przypadku grobu masowego, w tym samym systemie uzyskano 23 profile na 42 przebadanych osobników. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 4,5a-5d.

Tabela 3. Uzyskane profile DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z jam grobowych i grobu masowego wraz z uzyskanym stężeniem całkowitym DNA.

Materiał ekshumacyjny	Nr próbki	Pobrano materiał	Stężenie DNA [ng/μl]	Uzyskany profil w systemie GF
szkielet	szkielet 1	Zęby ze szczęki	0,0215	uzyskano profil
szkielet	szkielet 2	Zęby ze szczęki	0,0820	uzyskano profil
szkielet	szkielet 3	Zęby ze szczęki	3,1964 x 10 ⁻⁴	nie uzyskano profil
szkielet	szkielet 4	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	uzyskano profil
szkielet	szkielet 5	Zęby ze szczęki	5,2984 x 10 ⁻⁴	uzyskano profil
szkielet	szkielet 6	Zęby ze szczęki	0,0199	uzyskano profil
szkielet	szkielet 7	Zęby ze szczęki	7,0161 x 10 ⁻⁴	uzyskano profil
Czaszka nr 1	82	Zęby ze szczęki	0,0028	uzyskano profil
Czaszka nr 2	83	Zęby ze szczęki	0,0013	uzyskano profil
Czaszka nr 3	84	Zęby ze szczęki	0,1419	uzyskano profil
Czaszka nr 4	86	Zęby ze szczęki	0,1211	uzyskano profil
Czaszka nr 5	87	Zęby ze szczęki	0,0026	uzyskano profil
Czaszka nr 6	89	Zęby ze szczęki	6,8473 x 10 ⁻⁴	uzyskano profil
Czaszka nr 7	90	Zęby ze szczęki	0,3696	uzyskano profil
Czaszka nr 8	126	Zęby ze szczęki	0,0175	uzyskano profil
Czaszka nr 9	127	Zęby ze szczęki	0,0366	uzyskano profil
Czaszka nr 10	128	Zęby ze szczęki	0,0018	uzyskano profil
Czaszka nr 11	131	Zęby ze szczęki	0,9023	uzyskano profil
Czaszka nr 12	133	Zęby ze szczęki	0,0045	uzyskano profil
Czaszka nr 13	134	Zęby ze szczęki	0,0060	uzyskano profil
Czaszka nr 14	136	Zęby ze szczęki	0,0305	uzyskano profil
Czaszka nr 15	139	Zęby ze szczęki	0,0460	uzyskano profil
Czaszka nr 16	152	Zęby ze szczęki	1,0903	uzyskano profil
Czaszka nr 17	153	Zęby ze szczęki	0,0053	uzyskano profil
Czaszka nr 18	156	Zęby ze szczęki	0,0221	uzyskano profil
Czaszka nr 19	160	Zęby ze szczęki	0,0219	uzyskano profil
Czaszka nr 20	162	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	uzyskano profil
Czaszka nr 21	163	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	uzyskano profil
Czaszka nr 22	170	Zęby ze szczęki	0,0808	uzyskano profil
Czaszka nr 23	172	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	uzyskano profil
Czaszka nr 24	81	Zęby ze szczęki	5,7970 x 10 ⁻⁴	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 25	85	Zęby ze szczęki	8,0242 x 10 ⁻⁴	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 26	88	Zęby ze szczęki	4,6401 x 10 ⁻⁴	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 27	124	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 28	125	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 29	135	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 30	138	Zęby ze szczęki	0,0018	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 31	154	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 32	155	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 33	157	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu

Czaszka nr 34	158	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 35	159	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 36	161	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 37	164	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 38	167	Zęby ze szczęki	0,0078	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 39	169	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 40	172	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 41	174	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu
Czaszka nr 42	175	Zęby ze szczęki	nie oznaczono stężenia	nie uzyskano profilu

Tabela 4. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z jam grobowych.

UKŁAD	Szkielet 1	Szkielet 2	Szkielet 3	Szkielet 4	Szkielet 5	Szkielet 6	Szkielet 7
D3S1358	14,15	15,18	-	16,17	15,16	14,17	15
vWA	15,17	14,16	-	14,17	13,15	15,17	15,18
D16S539	12,13	9,14	-	11	-	9,12	10,11
CSF1PO	12,13	9,10	-	11,12	-	12	-
TPOX	8,11	8	-	8	8	-	9
INS/DEL	2	2	-	2	2	2	2
AMELO	XY	XY	-	XY	XY	XY	XY
D8S1179	12	12,13	-	12,13	13,14	13,15	11,15
D21S11	30,30.2	29,31.2	-	28,32.2	29	28	29,30
D18S51	13,16	15,20	-	13,16	-	11,17	-
DYS391	11	11	-	10	-	10	-
D2S441	10,14	11	-	10,11	11	11,12	10,13
D19S433	14,15.2	13,14	-	12,14	13,15	12,13	14.2,15
TH01	6,7	6,9.3	-	6,8	9,9.3	9	8,9.3
FGA	21,22	19,22	-	22,24	23,25	21	25
D22S1045	11,14	11,16	-	16	14,15	15,16	11,15
D5S818	11	11,12	-	10,12	11	11,12	10,12
D13S317	8,12	9,13	-	11,14	12	10,12	11
D7S820	8,11	7,11	-	10,11	-	10	-
SE33	19,33.2	-	-	29.2,34.2	-	-	-
D10S1248	14,16	13,14	-	15,16	14	14,16	13,15
D1S1656	12,17.3	15,17	-	12,17.3	-	12,14	14
D12S391	18,24	18,23	-	18,21	-	18.3,21	21
D2S1338	16,18	-	-	17,23	19	-	17

Tabela 5a. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z grobu masowego.

UKŁAD	p.82	p.83	p.84	p.86	p.87	p.89
D3S1358	15,17	17,18	14,15	16,17	17,18	16
vWA	18,19	18	17	17,19	15	-
D16S539	10,11	-	11,12	12	-	-
CSF1PO	-	11	12,13	14,10	9	-
TPOX	8	-	11	8	-	-
INS/DEL	2	2	2	2	2	2
AMELO	XY	XY	XY	X,Y	XY	X,Y
D8S1179	12	15,16	12,13	14,15	13,15	13
D21S11	28,32.2	29,31	29	29,33.2	29,30	-
D18S51	15,17	12,14	13,16	12,17	-	-
DYS391	10	-	10	10	-	-
D2S441	11,12.3	11,14	11,14	11,14	11	14
D19S433	15,15.2	15,16	13,14	13,14	13,14	15.2
TH01	8	9,10	9.3	9,9.3	6	9
FGA	21	-	20,22	20,21	20,21	-
D22S1045	15,16	-	16,17	14,16	15,16	14,16
D5S818	11,12	12	11,14	11,12	11,13	11
D13S317	8,14	11	10,11	8,11	5,11	-
D7S820	-	12	10,12	12	8	-
SE33	-	-	-	21,29.2	29.2	-
D10S1248	14	14,15	13,16	15,16	14,16	13
D1S1656	12,15	-	13,16	11,16	17	-
D12S391	23,25	-	17,23	19,21	24	-
D2S1338	23	-	19	17,18	18	-

Tabela 5b. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z grobu masowego – c.d.

UKŁAD	p.90	p.126	p.127	p.128	p.131	p.133
D3S1358	17,18	17	15,17	14	14,16	14,15
vWA	16,17	-	17	17	17,21	16,17
D16S539	11	-	8,11	-	11	8,12
CSF1PO	10,12	-	10,11	-	11	12
TPOX	8	-	8,9	-	8,11	11
INS/DEL	2	2	2	2	2	2
AMELO	XY	XY	XY	XY	XY	XY
D8S1179	12,14	13	12,13	13	13	13,14
D21S11	30,32	-	30.2,32.2	-	28,31.2	31.2,33.2
D18S51	12,16	-	12,13	-	13,18	-
DYS391	-	-	10	-	10	-
D2S441	11	10,11	11.3,14	11,14	11,14	11.3,14
D19S433	13,16	13.2	14,15	13,14.2	14,16	14,15
TH01	7,9	-	6,9.3	-	9.3	6,8
FGA	19,22	23,24	20,24	-	21,23	20,25
D22S1045	15,16	15,16	14,15	15,16	13,15	15,16
D5S818	12,13	-	10,11	12	13	10,12
D13S317	11,13	-	11,13	-	9,11	13
D7S820	-	-	11	-	12	10
SE33	13	-	24.2,29.2	19	19,20	23.2
D10S1248	14,16	14,16	13,14	15,17	14,17	14,16
D1S1656	14,16	-	15	-	15.3,16	13,17
D12S391	18,21	-	17,19	-	21	19
D2S1338	21	-	18,19	-	20	24

Tabela 5c. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z grobu masowego – c.d.

UKŁAD	p.134	p.136	p.139	p.152	p.153
D3S1358	16	16,17	14,19	15,18	16
vWA	14	14,20	14,17	14,15	16,17
D16S539	-	8,13	12	12	11
CSF1PO	-	-	12	10	10
TPOX	-	-	-	8	8,10
INS/DEL	-	2	2	2	2
AMELO	XY	XY	XY	XY	X,Y
D8S1179	-	13,14	10,14	11,14	13,14
D21S11	32.2	29	-	29,30.2	29,32.2
D18S51	-	-	17	15,17	13
DYS391	-	-	10	10	10
D2S441	-	11,14	11,14	11,14	12,14
D19S433	14	14	15.2,17	14	13
TH01	-	6	9.3	8,9.3	9
FGA	-	-	21	21,26	20,24
D22S1045	16	16	15,16	15,16	15,16
D5S818	12	13	12	10,12	-
D13S317	11,12	8	11	9,10	11,12
D7S820	-	9	12	10	11
SE33	-	-	16	15,20	-
D10S1248	13,14	15,16	14,16	14,16	16,17
D1S1656	-	16	12,14	12	12,17.3
D12S391	-	21	17,21	17,22	19
D2S1338	-	-	16,27	17,25	17

Tabela 5d. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z grobu masowego – c.d.

UKŁAD	p.156	p.160	p.162	p.163	p.170	p.172
D3S1358	11,16	15,18	16	16,17	16,17	16
vWA	17	17,18	18	17	17	19
D16S539	-	11,13	9,12	12	12,13	-
CSF1PO	-	-	-	-	12	-
TPOX	-	-	-	-	-	-
INS/DEL	2	2	2	2	2	2
AMELO	X,Y	XY	XY	XY	XY	XY
D8S1179	11,13	13	13,14	14,15	11,12	9,14
D21S11	28,29	-	30,32	29	29	-
D18S51	-	-	15,19	-	12,17	17
DYS391	-	-	-	-	-	-
D2S441	10,11	11,14	11,14	11,14	11	-
D19S433	14	12,15	14	13	13,14	-
TH01	6,9.3	9	6,10	-	6,10	9
FGA	20,26	21,22	22	-	21,22	-
D22S1045	-	15,16	15,16	14,16	15	14,16
D5S818	10	9,13	13,14	12	11,12	-
D13S317	12	-	9,10	-	12	-
D7S820	-	8	11	-	12	-
SE33	-	-	27.2	-	22.2,23.2	-
D10S1248	14,16	13,15	14,16	15,16	14	14,16
D1S1656	12,15	-	16	16	15,18.3	12,15
D12S391	18	17	17,20	21	22,23	19
D2S1338	-	-	20,23	-	-	-

W systemie identyfikacji osobniczej Y Filer Plus uzyskano 6 profili na 7 badanych osobników ekshumowanych z jam grobowych. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 6. W przypadku grobu masowego w tym samym systemie uzyskano 15 profili na 42 przebadanych osobników. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 7a-7c.

Tabela 6. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Y- Filer™ Plus szczątków podjętych z jam grobowych.

UKŁAD	Szkielet 1	Szkielet 2	Szkielet 3	Szkielet 4	Szkielet 5	Szkielet 6	Szkielet 7
DYS576	19	19	-	20	18	17	17
DYS389I	13	13	-	13	13	13	14
DYS635	23	23	-	24	-	24	23
DYS389II	29	31	-	30	30	29	-
DYS627	-	17	-	21	-	20	18
DYS460	11	11	-	11	12	11	11
DYS458	17	15	-	16	15	17	15
DYS19	14	17	-	14	-	15	16
Y GATAH4	12	-	-	13	-	12	-
DYS448	19	20	-	19	-	19	-
DYS391	11	11	-	10	-	10	-
DYS456	16	15	-	16	15	14	15
DYS390	24	25	-	24	-	23	25
DYS438	12	11	-	12	-	10	11
DYS392	13	11	-	13	11	14	-
DYS518	38	41	-	38	39	38	38
DYS570	20	18	-	17	20	21	19
DYS437	15	14	-	15	14	14	14
DYS385	11,14	11,15	-	11,15	-	11,14	11
DYS449	29	33	-	30	-	28	-
DYS393	13	13	-	13	13	14	14
DYS439	12	10	-	11	-	11	8
DYS481	22	23	-	22	-	20	-
DYF387S1	36,37	36,38	-	35,36	-	35	37,38
DYS533	11	13	-	12	-	11	-

Tabela 7a. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Y- Filer™ Plus szczątków podjętych z grobu masowego:

UKŁAD	p.86	p.84	p.83	p.82	p.127
DYS576	18	21	18	19	15
DYS389I	13	14	13	13	14
DYS635	23	21	-	-	24
DYS389II	30	-	-	-	32
DYS627	17	17	-	-	19
DYS460	11	10	-	10	10
DYS458	14	16	17.2	18	18
DYS19	17	14	14	14	15
Y GATAH4	12	11	-	12	12
DYS448	20	21	-	-	21
DYS391	10	-	-	-	10
DYS456	14	15	15	15	16
DYS390	25	25	-	-	23
DYS438	11	10	-	-	10
DYS392	11	11	-	-	11
DYS518	39	37	-	-	36,37
DYS570	20	21	17	17	16
DYS437	14	16	14	15	16
DYS385	11	14	-	-	13,16
DYS449	30	-	-	-	28
DYS393	13	12	12	13	13
DYS439	10	11	11	11	11
DYS481	23	25	24	20,21	19
DYF387S1	36,38	37	-	39	39
DYS533	11	11	-	-	10

Tabela 7b.. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Y- Filer™ Plus szczątków podjętych z grobu masowego – c.d.

UKŁAD	p.134	p.160	p.167	p.136	p.139
DYS576	15	18	-	17	18
DYS389I	13	-	12	13	-
DYS635	-	20	-	23	22
DYS389II	-	9	-	-	-
DYS627	-	-	21	-	-
DYS460	11	10		10	-
DYS458	-	17,2	18	20	17
DYS19	-	14	-	13	-
Y GATAH4	-	-	-	-	10
DYS448	-	-	-	-	19
DYS391	-	-	-	-	-
DYS456	15	15	13	16	15
DYS390	-	23	24	-	-
DYS438	-	-	9	10	11
DYS392	-	-	-	-	15
DYS518	-	-	-	-	-
DYS570	17	17	17	17	16
DYS437	-	-	-	-	14
DYS385	-	13	15,17	17	-
DYS449	-	-	-	32	-
DYS393	13	12	-	13	13
DYS439	-	11	12	-	12
DYS481	-	25	24	25	-
DYF387S1	-	-	-	-	34,35
DYS533	-	-	-	-	-

Tabela 7c. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Y- Filer™ Plus szczątków podjętych z grobu masowego – c.d.

UKŁAD	p.152	p.90	p.89	p.80	p.170
DYS576	18	17	16	17	17
DYS389I	13	14	-	14	13
DYS635	21	23	-	-	20
DYS389II	-	-	-	30	31
DYS627	22	-	-	-	20
DYS460	11	11	-	11	10
DYS458	18.2	18	16	-	17.2
DYS19	14	14	-	-	14
Y GATAH4	-	10	-	-	11
DYS448	-	-	-	-	-
DYS391	-	10	-	-	10
DYS456	14	18	-	18	15
DYS390	23	24	-	-	23
DYS438	10	12	9	-	10
DYS392	11	14	-	-	-
DYS518	40	-	-	-	-
DYS570	18	17	-	-	17
DYS437	14	15	-	-	14
DYS385	-	11,14	-	-	17
DYS449	-	30	-	-	26
DYS393	12	12	12	-	12
DYS439	12	12	-	-	11
DYS481	27	22	-	-	25
DYF387S1	36	35	-	-	36,38
DYS533	-	12	-	-	11

4.2 Analiza DNA mitochondrialnego osobników z jam grobowych i grobu masowego.

W celu określenia pochodzenia biogeograficznego szczątków wykonano analizę DNA mitochondrialnego. Ze względu na silną degradację materiału biologicznego nie można było uzyskać profilu genetycznego i oszacować pochodzenia biogeograficznego dla wszystkich osobników.

Haplogrupę w wyniku analizy hiperzmiennych regionów DNA mitochondrialnego (HV1, HV2) uzyskano dla 6 osobników ekshumowanych z jam grobowych. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 8,9.

W przypadku osobników ekshumowanych z grobu masowego haplogrupę analizowaną tą samą metodą uzyskano dla 19 osobników. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 10.

Tabela 8. Uzyskane wyniki badania mtDNA (region HV1, HV2) szczątków podniesionych z jam grobowych, analizowane w bazie EMPOP.

Nr próbki	HV1 (16024-16365)	HV2 (73-340)	Haplogrupa mtDNA
Szkielet 1	16287T	93G 152C 263G 309.1C 315.1C	H
Szkielet 2	rCRS	263G 309.1C 315.1C	R0
Szkielet 3	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
Szkielet 4	16256T 16270T 16294T Haplotyp oznaczono w niepełnym zakresie 16024-16350	73G 152C 263G 315.1C	U5a1a1h
Szkielet 5	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
Szkielet 6	16114A 16192T 16256T 16270T 16294T	73G 146C 263G 309.1C 315.1C	U5a2a
Szkielet 7	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono

Tabela 9 Zestawienie wyników badań szczątków podjętych z jam grobowych w systemie GlobalFiler, Y-Filer™ Plus oraz mtDNA.

Numer próbki	Global Filer™	Yfiler Plus™	Płeć	Haplotyp mtDNA
Szkielet 1	uzyskano pełen profil	uzyskano pełen profil	męska	uzyskano w zakresie HVR1, HVR2 oraz WG
Szkielet 2	uzyskano pełen profil	uzyskano pełen profil	męska	uzyskano w zakresie HVR1, HVR2
Szkielet 3	nie uzyskano profilu	nie uzyskano profilu	męska	nie uzyskano
Szkielet 4	uzyskano pełen profil	uzyskano pełen profil	męska	uzyskano w zakresie HVR1 (niepełny zakres: 16024-16350), HVR2 oraz WG
Szkielet 5	profil częściowy wykazujący znamiona silnej degradacji	profil częściowy wykazujący znamiona silnej degradacji	męska	uzyskano w zakresie WG
Szkielet 6	profil częściowy wykazujący znamiona degradacji	uzyskano pełen profil	męska	uzyskano w zakresie HVR1, HVR2
Szkielet 7	profil częściowy wykazujący znamiona degradacji	profil częściowy wykazujący znamiona degradacji	męska	uzyskano w zakresie WG

Tabela 10 Uzyskane wyniki badania mtDNA (HV1, HV2) szczątków podniesionych z grobu masowego, analizowane w bazie EMPOP.

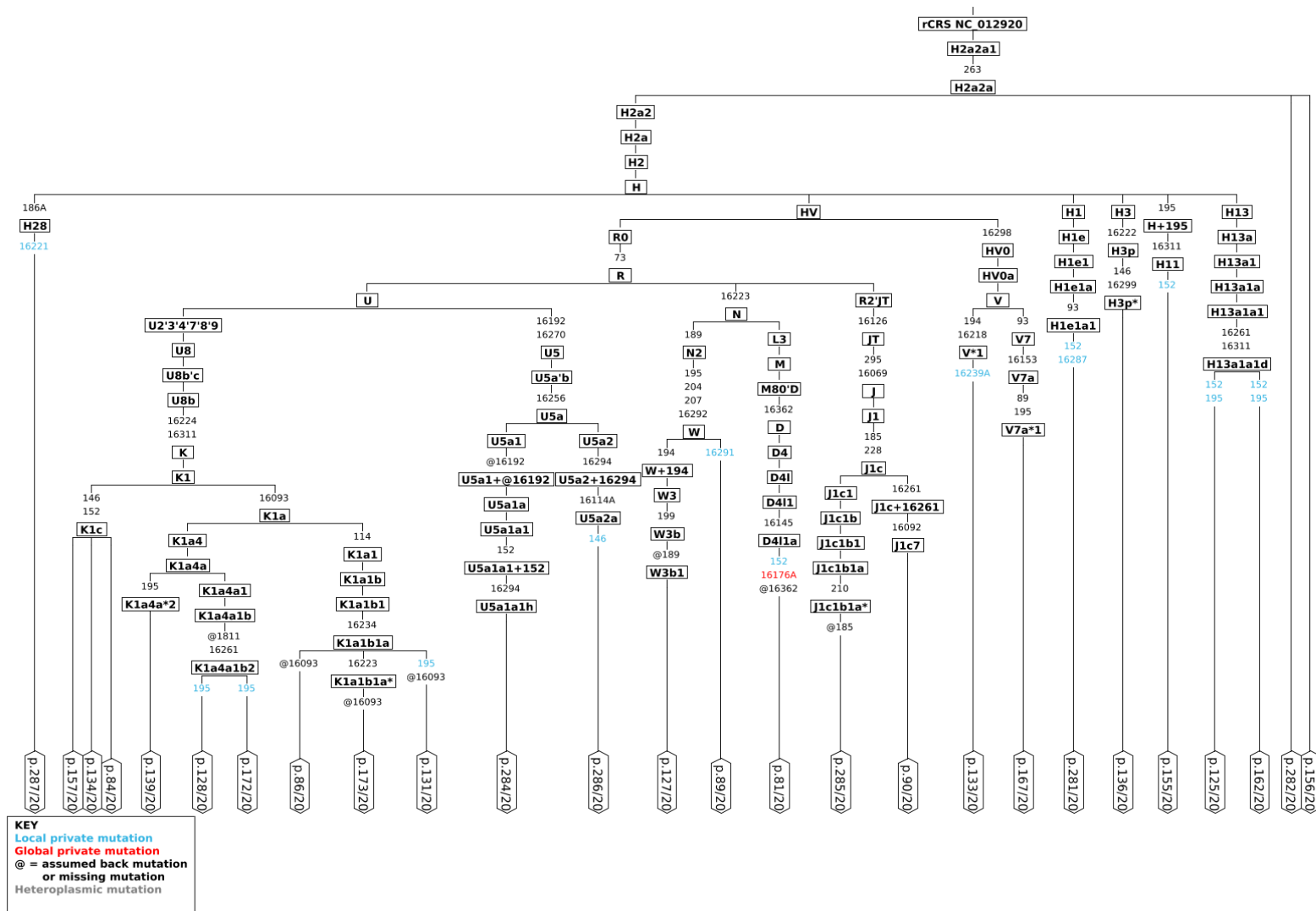
Numer próbki	HV1	HV2	haplogrupa szacowana wg EMPOP
p.81/20	16145A 16176A 16223T	73G 152C 263G 309.1C 315.1C	N1b1b
p.82/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.83/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.84/20	16224C 16311C	73G 146C 152C 263G 315.1C	K
p.87/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.88/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.89/20	16223T 16291T 16292T	73G 189G 195C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C	W
p.90/20	16069T 16092C 16126C 16261T	73G 185A 228A 263G 295T 309.1C 315.1C	J1c7
p.125/20	16261T 16311C	152C 195C 263G 315.1C	HV
p.126/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.127/20	16223T 16292T	73G 194T 195C 199C 204C 207A 263G 309.1C 315.1C	W3b1
p.128/20	16093C 16224C 16261T 16311C	73G 195C 263G 315.1C	K1a
p.131/20	16224C 16234T 16311C	73G 114T 195C 263G 309.1C 315.1C	K1a1b1a
p.133/20	16218T 16239A 16298C	194T 263G 309.1C 315.1C	HV
p.134/20	16224C 16311C	73G 146C 152C 263G 315.1C	K
p.135/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.136/20	16222T 16299G	146C 263G 309.1C 315.1C	H3p
p.139/20	16093C 16224C 16311C	73G 195C 263G 315.1C	K1
p.153/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.154/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.155/20	16311C	152C 195C 263G 315.1C	HV
p.156/20	rCRS	263G 315.1C	R0
p.157/20	16224C 16311C	73G 146C 152C 263G 315.1C	K
p.158/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono

Numer próbki	HV1	HV2	haplogrupa szacowana wg EMPOP
p.159/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.160/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.162/20	16261T 16311C	152C 195C 263G 315.1C	HV
p.163/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.164/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.167/20	16153A 16298C	89C 93G 195C 263G 309.1C 315.1C	V7a
p.168/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.169/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono
p.172/20	16093C 16224C 16261T 16311C	73G 195C 263G 315.1C	K1a
p.173/20	16223T 16224C 16234T 16311C	73G 114T 263G 315.1C	K1a1b1a
p.175/20	nie uzyskano wyniku	nie uzyskano wyniku	nie określono

Dodatkowo dokonano zestawienie poszczególnych haplogrup mtDNA szczątków podniesionych z grobu masowego i jam grobowych oszacowanych w programie HaploGrep. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 11.

Tabela 11. Zestawienie poszczególnych haplogrup mtDNA szczątków podniesionych z grobu masowego i jam grobowych oszacowanych w programie HaploGrep.

Nazwa próbki	Haplogroupa
p.81/20	D411a
p.84/20	K1c
p.86/20	K1a1b1a
p.89/20	W
p.90/20	J1c7
p.125/20	H13a1a1d
p.127/20	W3b1
p.128/20	K1a4a1b2
p.131/20	K1a1b1a
p.133/20	V*1
p.134/20	K1c
p.136/20	H3p*
p.139/20	K1a4a*2
p.155/20	H11
p.156/20	H2a2a
p.157/20	K1c
p.162/20	H13a1a1d
p.167/20	V7a*1
p.172/20	K1a4a1b2
p.173/20	K1a1b1a*
szkielet nr 1	H1e1a1
szkielet nr 2	H2a2a
szkielet nr 4	U5a1a1h
szkielet nr 5	J1c1b1a*
szkielet nr 6	U5a2a
szkielet nr 7	H28



Rysunek 1. Zestawienie poszczególnych haplogrup mtDNA szczątków podniesionych z grobu masowego i jam grobowych – drzewo filogenetyczne [źródło PhyloTree].

4.3 Analiza NGS osobników z jam grobowych.

Sekwencjonowanie nowej generacji wykonano wyłącznie dla 4 osobników ekshumowanych z jam grobowych: szkielety nr 1,4, 5 i 7. Wyniki przedstawiono w tabeli nr 12. Sekwencji poddano całe mitogenomy wykorzystując technologię IonTorrent, która pozwala na uzyskanie całych genomów z materiału silnie zdegradowanego.

Ze względów ekonomicznych na tym etapie pracy nie mogliśmy poddać sekwencjonowaniu wszystkich próbek. Planuje się je przebadać w najbliższym czasie.

Tabela 12. Uzyskane wyniki badania mtDNA (region HV1, HV2) oraz NGS szczątków podniesionych z jam grobowych, analizowane w bazie EMPOP.

Nr próbki	HV1 (16024-16365)	HV2 (73-340)	WG (1-16569)	Haplogrupa mtDNA
Szkielet 1	16287T	93G 152C 263G 309.1C 315.1C	93G 152C 263G 309.1C 315.1C 750G 1438G 4769G 8609T 8860G 9071T 10394T 10828C 13651G 15326G 16287T 16519C	H
Szkielet 2	rCRS	263G 309.1C 315.1C	nie badano	R0
Szkielet 3	nie uzyskano wyniku			nie określono
Szkielet 4	16256T 16270T 16294T Haplotyp oznaczono w niepełnym zakresie 16024- 16350	73G 152C 263G 315.1C	73G 152C 263G 315.1C 750G 1438G 1700C 2706G 3197C 4769G 5495C 7028T 8860G 9477A 11467G 11719A 11803C 12308G 12372A 13617C 14766T 14793G 15218G 15326G 15924G 16256T 16270T 16294T 16399G	U5a1a1h

Nr próbki	HV1 (16024-16365)	HV2 (73-340)	WG (1-16569)	Haplogrupa mtDNA
Szkielet 5	nie uzyskano wyniku		73G 210G 228A 263G 295T 309.1C 315.1C 462T 482C 489C 750G 1438G 2706G 3010A 3394C 4216C 4769G 5773A 7028T 7055G 7184G 8860G 10398G 10463C 11251G 11719A 11918A 12612G 13020C 13708A 14766T 14798C 15326G 15452A 16069T 16126C	J1c1b1a1
Szkielet 6	16114A 16192T 16256T 16270T 16294T	73G 146C 263G 309.1C 315.1C	nie badano	U5a2a
Szkielet 7	nie uzyskano wyniku		186A 263G 309.1C 315.1C 750G 1438G 4688C 4769G 8715C 8860G 11191T 12085T 15326G 16221T 16519C	H28a

4.4 Analiza pokrewieństwa w programie biostatystycznym Familias 3 wśród osobników z grobu masowego.

Dokonując analiz pokrewieństwa w programie Familias założono 3 modele pokrewieństwa:

1. rodzic-dziecko
2. rodzeństwo
3. kuzynostwo

W żadnej z założonych hipotez pokrewieństwo nie potwierdziło się, jednak mogło to wynikać z stanu zachowania materiału biologicznego. Do analizy biostatystycznej wykorzystano wszystkie profile DNA uzyskane w niniejszym badaniu, również częściowe wykazujące znamiona silnej degradacji. Jednocześnie nie pozwala to jednoznacznie wypowiedzieć się, że osoby, których szczątki ekshumowano z grobu masowego na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I były ze sobą blisko spokrewnione.

V Omówienie wyników badań.

5.1 Jamy grobowe.

W wyniku analizy genetycznej materiału zabezpieczonego od osobników pochodzących z pojedynczych jam grobowych (tabela nr1), uzyskano męskie profile DNA oznaczone w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ dla 6 szkieletów (Tabela nr 4). Nie uzyskano profilu genetycznego dla jednego szkieletu (tabela nr 4, szkielet nr 3). Powodem jest silna degradacja materiału biologicznego oraz ewentualna obecność inhibitorów reakcji PCR.

Dla tych samych próbek uzyskano męskie profile DNA oznaczone w systemie do identyfikacji osobniczej Y-Filer Plus™ (Tabela nr 6). Również w tym systemie nie uzyskano profilu genetycznego z materiału pobranego ze szkieletu nr 3 (tabela nr 6, szkielet nr 3). Powodem jest również silna degradacja materiału biologicznego oraz ewentualna obecność inhibitorów reakcji PCR.

Dla badanych próbek pochodzących z pojedynczych jam grobowych, pobranych ze szkieletu nr 1, nr 2, nr 6, wykonano oznaczenie haplotypów DNA mitochondrialnego w zakresie regionów HVR1 i HVR2 (tabela 8). Dla szkieletu nr 4 wykonano oznaczenie haplotypów w zakresie HVR2 oraz w niepełnym zakresie HVR1 (16024-16350) (tabela nr 8).

Wysoki stopień degradacji DNA oraz obecność ewentualnych inhibitorów reakcji PCR, uniemożliwił oznaczenie haplotypu DNA z próbki biologicznej pochodzącej ze szkieletu nr 3 (tabela nr 8).

Dla próbek zabezpieczonych ze szkieletu nr 1, nr 4, nr 5, nr 7, wykonano oznaczenie haplotypów DNA mitochondrialnego metodą NGS w zakresie pełnego genomu mitochondrialnego (Tabela nr 12). Wysoki stopień degradacji uniemożliwił wykonanie tego oznaczenie w próbce pobranej ze szkieletu nr 2 i 6.

5.2 Grób masowy.

Zdecydowanie gorsze wyniki uzyskano w przypadku materiału pochodzącego od ofiar. Przyczyny można upatrywać się w znacznie gorszym stanie zachowania szkieletów. Był to wtórny przemieszany grób masowy, którego pierwsze elementy kostne odnaleziono zaledwie 15 cm pod powierzchnią ziemi. Szczątki narażone były na destrukcyjne działanie czynników środowiskowych. Obszar, na którym prowadzono prace porośnięty był roślinnością iglastą. Dostęp wody i tlenu mógł wpłynąć na degradację DNA. Kwasy humusowe i żywice stały się inhibitorami reakcji PCR. Ograniczona ilość uzyskanych wyników nie wyklucza podjęcia prób ich interpretacji.

W przypadku grobu masowego badaniom genetycznym poddano 42 osobników na 49 ekshumowanych. Silna degradacja DNA w materiale biologicznym pozwoliła na uzyskanie profili z 23 szkieletów. Nie badano 7 osobników (pod kątem genetycznym) ponieważ nie udało się pozyskać zębów. Nie uzyskano zgody prokuratora na naruszenie struktury części skalistej czaszek, ze względu na charakter postępowania i pochodzenie szczątków.

W wyniku analizy genetycznej materiału ekshumowanego z grobu masowego uzyskano 23 profile męskie DNA oznaczone w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ (tabela 5a-5d), w tym 17 pełnych profili, które nadają się do identyfikacji oraz 8 profili niepełnych. Całkowita ilość sprofilowanych osobników stanowiła około 57% ekshumowanych z grobu masowego szczątków. Nie uzyskano profilu genetycznego z materiału pobranego od 20 osobników, co stanowi około 43%. Powodem była silna degradacja materiału biologicznego oraz ewentualna obecność inhibitorów reakcji PCR w postaci mikroorganizmów oraz grzybów.

Podczas badań genetycznych zabezpieczonego materiału próbek pobranych od osobników pochodzących z grobu masowego uzyskano 15 profili, w tym 3 pełne profile i 12 niepełnych profili męskiego DNA oznaczony w systemie do identyfikacji osobniczej Y-Filer Plus™ (tabela 7a-7c). Stanowi to około 36% sprofilowanych w tym systemie osób. Nie uzyskano profilu genetycznego z materiału pobranego z 27 szkieletów, co stanowi około 64% osobników badanych. Powodem jest silna degradacja materiału biologicznego oraz ewentualna obecność inhibitorów reakcji PCR.

Dla badanych próbek pobranych ze szkieletów pochodzących z grobu masowego wykonano oznaczenie haplotypów DNA mitochondrialnego w zakresie regionów HVR1 i HVR2 oszacowane w bazie EMPOP (Tabela nr 10) oraz programie HaploGrep (Tabela nr 11). Dla szkieletu nr 4 wykonano oznaczenie haplotypów w zakresie HVR2 oraz w niepełnym zakresie HVR1 (16024-16350).

Źródła historyczne w przypadku Treblinka I dostarczają informacji o tym, że strażnicy obozowi mieli pochodzenie w większości ukraińskie. W przypadku ofiar byli to głównie Żydzi i Polacy. Analiza haplogrup mtDNA ekshumowanych szczątków na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I, ujawnionych w grobie masowym, potwierdza hipotezę, że szczątki te należą do ofiar Holocaustu z okresu II wojny światowej (186). Wykryto obecność haplogrup mogących wskazywać na żydowskie pochodzenie ofiar podjętych z grobu masowego (62,187,188). Dlatego w celu określenia pochodzenia biogeograficznego badanych szczątków, częstości wystąpienia haplogrup mtDNA u badanych osobników odniesiono do częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach: Żydów (Tabela 13, 13a-13e), Romów (Tabela 14a-14b, 15) i Polaków (Tabela 16), ujętych w analizowanej literaturze. Wyniki przedstawiono w tabelach poniżej.

Haplogrupy uzyskane w wyniku analizy mtDNA kształtowały się następująco: R0 (w tym H i HV) 30%, K – 45%, N – 5% i W – 10%, w odniesieniu do populacji Żydów, Romów i Polaków. Grupa, w której udało się określić haplogrupę stanowiła 19 osób.

Rozkład haplogrup przedstawiony przy pomocy drzewa filogenetycznego (narzędzie PhyloTree) osobników pochodzących zarówno z pojedynczych jam grobowych i grobu masowego nie wykazał znaczącego oddalenia od siebie w zakresie analizowanych haplogrup. Nie wskazał również aby któraś z haplogrup była dominująca w obszarze, w którym się zawierały [Ryc. 1].

Tabela 13. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (188) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Polscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 192 osoby)	Rumuńscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 104 osoby)	Ukraińscy i Rosyjscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 150 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	25.5%	34.7%	44.0%	50.0%	30.0%
U (bez K)	6.3%	4.8%	7.3%	33.3%	0.0%
J	9.4%	8.7%	10.0%	16.7%	5.0%
K	37.5%	30.8%	16.7%	0.0%	45.0%
T	4.7%	2.9%	7.3%	0.0%	0.0%
N1	6.3%	10.6%	7.3%	0.0%	5.0%
I	1.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
W	3.1%	1.0%	2.7%	0.0%	10.0%
X	0.5%	1.9%	0.0%	0.0%	0.0%
L1 i L2	3.1%	1.9%	1.3%	0.0%	0.0%
M	1.0%	1.9%	0.0%	0.0%	0.0%
Pozostałe	1.0%	1.0%	3.3%	0.0%	5.0%

Tabela 13a. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (62) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Francuzcy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 46 osób)	Niemieccy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 32 osoby)	Holenderscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 20 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	15.2%	18.8%	25.0%	50.0%	30.0%
U (bez K)	2.2%	3.1%	0.0%	33.3%	0.0%
J	4.3%	9.4%	0.0%	16.7%	5.0%
A	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	41.3%	46.9%	50.0%	0.0%	45%
L2a	2.2%	3.1%	0.0%	0.0%	0.0%
M	6.5%	0.0%	5.0%	0.0%	0.0%
N (N*, N1b, N9a)	17.4%	12.5%	10.0%	0.0%	5.0%
T	6.5%	3.1%	0.0%	0.0%	0.0%
V	0.0%	3.1%	5.0%	0.0%	10%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	10%
X	2.2%	0.0%	5.0%	0.0%	0.0%

Tabela 13b. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (62) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Szwedzcy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 3 osoby)	Austro-węgierscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 29 osób)	Białoruscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 9 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	0.0%	31.0%	44.4%	50.0%	30.0%
U (bez K)	0.0%	6.9%	11.1%	33.3%	0.0%
J	0.0%	0.0%	11.1%	16.7%	5.0%
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	3.4%	0.0%	0.0%	0.0%
K	66.7%	27.6%	11.1%	0.0%	45.0%
L2a	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
M	0.0%	0.0%	11.1%	0.0%	0.0%
N (N*, N1b, N9a)	33.3%	13.8%	11.1%	0.0%	5.0%
T	0.0%	6.9%	0.0%	0.0%	0.0%
V	0.0%	6.9%	0.0%	0.0%	10.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	10.0%
X	0.0%	3.4%	0.0%	0.0%	0.0%

Tabela 13c. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (62) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Czechosłowaccy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 15 osób)	Estońscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 1 osoba)	Łotewscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 8 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	26.7%	0.0%	50.0%	50.0%	30.0%
U (bez K)	0.0%	0.0%	12.5%	33.3%	0.0%
J	0.0%	0.0%	0.0%	16.7%	5.0%
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	6.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	26.7%	0.0%	37.5%	0.0%	45.0%
L2a	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
M	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
N (N*, N1b, N9a)	13.3%	100.0%	0.0%	0.0%	5.0%
T	20.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
V	6.7%	0.0%	0.0%	0.0%	10.0%
W	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	10.0%
X	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Tabela 13d. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (62) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Litewscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 30 osób)	Moldawscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 1 osoba)	Polscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 165 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	46.7%	0.0%	22.4%	50.0%	30.0%
U (bez K)	0.0%	0.0%	6.7%	33.3%	0.0%
J	0.0%	0.0%	10.9%	16.7%	5.0%
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%
K	26.7%	100.0%	38.8%	0.0%	45.0%
L2a	0.0%	0.0%	3.0%	0.0%	0.0%
M	3.3%	0.0%	1.2%	0.0%	0.0%
N (N*, N1b, N9a)	16.7%	0.0%	6.1%	0.0%	5.0%
T	0.0%	0.0%	3.6%	0.0%	0.0%
V	6.7%	0.0%	2.4%	0.0%	10.0%
W	0.0%	0.0%	2.4%	0.0%	10.0%
X	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%

Tabela 13e. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (62) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Rumuńscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 93 osoby)	Rosyjscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 59 osób)	Ukraińscy Żydzi Aszkenazyjscy (łącznie 54 osoby)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	31.2%	33.9%	46.3%	50.0%	30.0%
U (bez K)	5.4%	6.8%	11.1%	33.3%	0.0%
J	9.7%	18.6%	3.7%	16.7%	5.0%
A	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
I	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	30.1%	13.6%	18.5%	0.0%	45.0%
L2a	2.2%	1.7%	0.0%	0.0%	0.0%
M	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
N (N*, N1b, N9a)	11.8%	10.2%	7.4%	0.0%	5.0%
T	3.2%	10.2%	5.6%	0.0%	0.0%
V	1.1%	0.0%	7.4%	0.0%	10.0%
W	1.1%	5.1%	0.0%	0.0%	10.0%
X	2.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Tabela 14a. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Romów i próbie badanej (186) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Polscy Romowie (łącznie 69 osób)	Litewscy Romowie (łącznie 18 osób)	Hiszpańscy Romowie (łącznie 25 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	15.9%	22.2%	12.0%	50.0%	30.0%
U (bez K)	36.2%	55.6%	56.0%	33.3%	0.0%
J	18.8%	0.0%	12.0%	16.7%	5.0%
M	5.8%	22.2%	20.0%	0.0%	0.0%
T	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
K	4.3%	0.0%	0.0%	0.0%	45.0%
N1b	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	5.0%
I	7.2%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
X	2.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
W	8.7%	0.0%	0.0%	0.0%	10.0%

Tabela 14b. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Romów i próbie (186) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

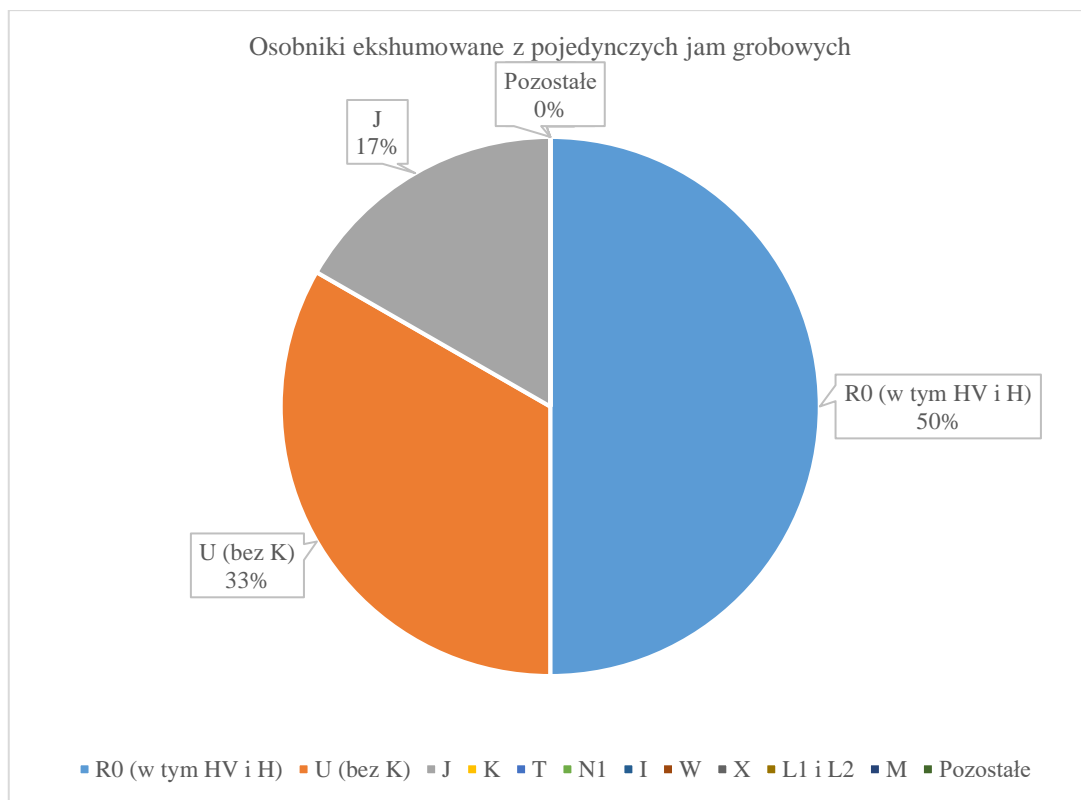
Haplogrupa mtDNA	Balkańscy Romowie (łącznie 71 osób)	Romowie Vlax (łącznie 161 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	26.8%	44.7%	50.0%	30.0%
U (bez K)	8.4%	3.1%	33.3%	0.0%
J	14.1%	7.5%	16.7%	5.0%
M	26.8%	28.0%	0.0%	0.0%
T	1.4%	3.1%	0.0%	0.0%
K	2.8%	1.2%	0.0%	45.0%
N1b	1.4%	2.5%	0.0%	5.0%
I	1.4%	2.5%	0.0%	0.0%
X	12.7%	7.5%	0.0%	0.0%
W	4.2%	0.0%	0.0%	10.0%

Tabela 15. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Romów i próbie badanej (189) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

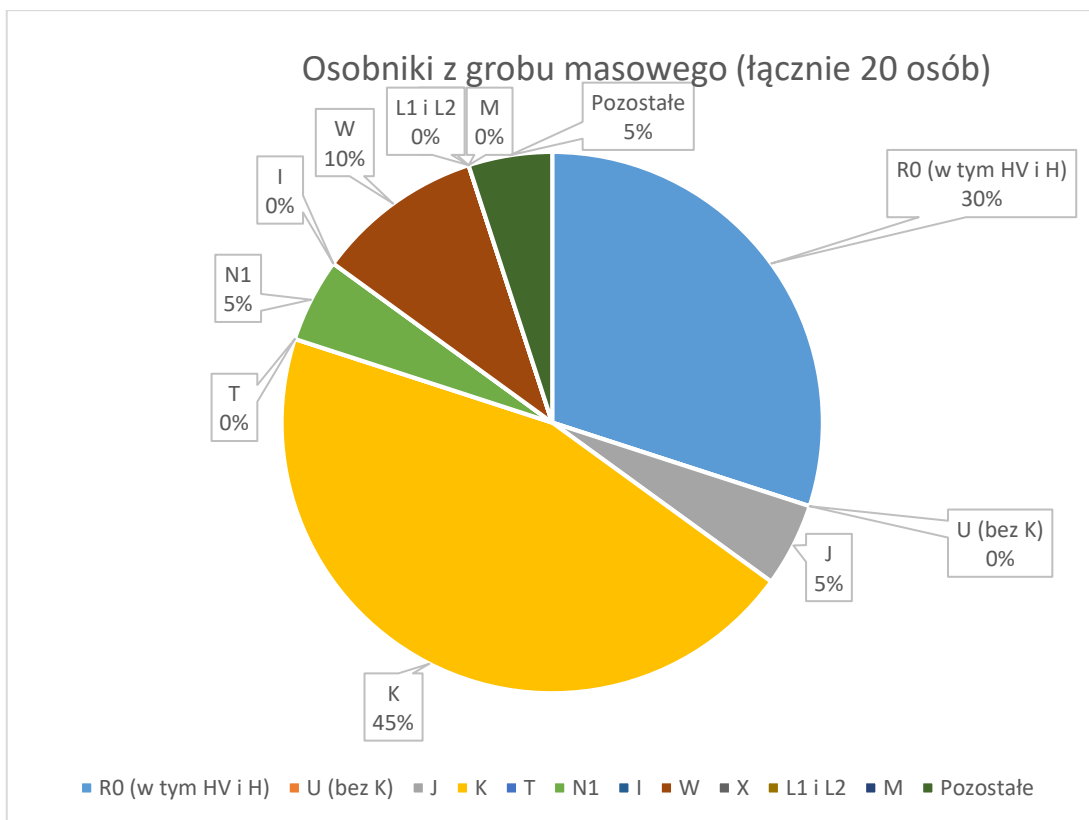
Haplogrupa mtDNA	Romowie (łącznie 275 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	35.6%	50.0%	30.0%
U (bez K)	26.5%	0.0%	0.0%
J	12.8%	33.3%	5.0%
M	9.1%	16.7%	0.0%
X	7.6%	0.0%	0.0%
I	2.2%	0.0%	0.0%
N1b	1.8%	0.0%	5.0%
T	1.8%	0.0%	0.0%
K	1.4%	0.0%	45.0%
W	1.1%	0.0%	10.0%

Tabela 16. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacji Polski i próbie badanej (49) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.

Haplogrupa mtDNA	Polska (łącznie 413 osób)	Szkielet nr: 1,2,4,5,6,7 (łącznie 6 osób)	Osobniki z grobu masowego (łącznie 20 osób)
R0 (w tym HV i H)	43.6%	50.0%	30.0%
U (bez K)	21.8%	33.3%	0.0%
J	7.7%	16.7%	5.0%
V	4.8%	0.0%	10.0%
T	7.5%	0.0%	0.0%
K	4.4%	0.0%	45.0%
R (bez R0)	0.5%	0.0%	0.0%
N1a, N1b, N1c, N*	1.5%	0.0%	5.0%
I	2.2%	0.0%	0.0%
W	3.6%	0.0%	10.0%
X	1.9%	0.0%	0.0%
C	0.2%	0.0%	0.0%
G2a	0.2%	0.0%	0.0%



Wykres 1. Graficzne zestawienie uzyskanych haplogrup mtDNA wśród osobników ekshumowanych z pojedynczych grobów, udział procentowy.



Wykres 2. Graficzne zestawienie uzyskanych haplogrup mtDNA wśród osobników ekshumowanych z grobu masowego, udział procentowy.

VI Wnioski.

1. W wyniku niniejszych badań uzyskano 23 męskie profile DNA oznaczone w systemie Global Filer i Y Filer Plus, których szczątki odnaleziono w grobie masowym na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I. W przypadku szczątków ekshumowanych z jam grobowych uzyskano w tym systemie 6 męskich profili DNA. W grobie masowym nie odnaleziono żadnych szczątków płci żeńskiej. Może to świadczyć o tym, że ofiary zostały poddane wstępnej selekcji, której dokonywano po przyjeździe do obozu. Pozwala to wyciągnąć wnioski, że ofiary przywiezione do obozu Treblinka I poddawano selekcji a następnie eksterminacji.
2. Analiza filogenetyczna DNA mitochondrialnego wykazała, że wśród 49 ofiar, których szczątki odnaleziono w grobie masowym na terenie byłego karnego obozu pracy Treblinka I, znajdują się Żydzi i Polacy. W przypadku szczątków odnalezionych w pojedynczych grobach masowych wyniki estymacji DNA mitochondrialnego osobników pochodzących z jam grobowych, nie pozwalają jednoznacznie wskazać konkretnej narodowości. Rozkład haplogrup mtDNA w grupie badanej wykazuje jednak haplogrupy charakterystyczne dla populacji Ukraińców i Rosjan. Nie odzwierciedla natomiast rozkładu haplogrup obserwowanego w populacjach Żydów, Romów oraz Polaków.
3. Dowód z badań genetycznych nie stoi w sprzeczności z ustaleniami archeologicznymi i antropologicznymi, jakoby w grobach pojedynczych pochowano sprawców zbrodni, a nie ich ofiary. Uzyskane wyniki wspierają hipotezy antropologiczne i archeologiczne.
4. Pomiędzy ofiarami ujawnionymi w grobie masowym nie wykazano pokrewieństwa w liniach: rodzic-dziecko, rodzeństwo, kuzynostwo obliczanego w programie Familias. Odnalezione ofiary mogły być przypadkowe.

VII Dyskusja.

Głównym celem niniejszej pracy było dostarczenie dowodów genetycznych wspierających hipotezy historyczne jakoby w ujawnionym na terenie byłego karnego obozu pracy przymusowej Treblinka I grobie masowym spoczywają ofiary tegoż obozu, a w pojedynczych grobach masowych strażnicy obozowi. Funkcjonariusze niemieckich władz okupacyjnych dokonali ludobójstwa obywateli polskich, żydowskich i mniejszości narodowych, w niemieckim obozie koncentracyjnym w Treblince, w okresie od lipca 1942 roku do 1944 roku (8,15,27,190) . Miejsce ekshumacji wytypowano na podstawie danych historycznych, analizy archiwalnych zdjęć lotniczych z 1944 roku oraz badań nieinwazyjnych prowadzonych na tym terenie wcześniej (4,10). Na tym etapie wspierano się również zeznaniami świadków. Ponieważ w Treblince I pomordowano ludzi wielu narodowości, spodziewaliśmy się tam również ofiar pochodzenia żydowskiego. Z uwagi na specyfikę postępowania ze szczątkami pochodzenia żydowskiego, podczas ekshumacji obecni byli przedstawiciele Komisji Rabinicznej ds. Cmentarzy Żydowskich przy Urzędzie Naczelnego Rabina Polski. Dlatego do badań wykorzystano wyłącznie zęby. Praca miała charakter interdyscyplinarny. Analizy ekshumowanych szczątków dokonano we współpracy antropologów, medyków sądowych i genetyków sądowych.

Na terenie byłego karnego obozu pracy przymusowej Treblinka I, w pobliskim lesie, odkryto masowy grób, w którym znajdowały się bez wątpienia szczątki ludzkie. Miejsce odkrytego pochówku mogło być tzw. „Miejscem Straceń”. Był to obszar zalesionego terenu, na którym grzebano zwłoki zamordowanych więźniów. W latach 1942-43 stracono tu wielu Romów, Cyganów, Żydów i Polaków. (4,191). Fakty te wskazują, że odnalezione miejsce grobu masowego mogło być takim miejscem. Obecnie teren byłego obozu pracy Treblinka I porasta bujna roślinność.. Samo „Miejsce Straceń” nie stanowiło struktur budynku, a jedynie był to obszar terenu, na którym dokonywano egzekucji. Wiemy jedynie, że miejsce to było położone postronnie, z dala od świadków, dozorowane przez strażników.

W toku oględzin kryminalistyczno-sądowych ustalono, że szczątki podniesione z grobu masowego mogą być szczątkami zamordowanych w obozie ofiar. Dowodem na to są liczne obrażenia powstałe perimortem (okołośmiertnie), ślady uderzeń narzędzi tępokrawędzistych, liczne złamania. Sam fakt, że miejsce ich pochówku stanowił wtórny zmieszany grób masowy. Literatura podaje, że tak właśnie chowano ofiary (1,3,13).

Indywidualny charakter pochówków pozostałych szczątków, wskazywał na ewentualną przynależność osobników do jednostek wartowniczych.

Badanie takich miejsc mają zazwyczaj dwa kierunki. Jednym z nich jest dostarczenie informacji dla postępowania prowadzonego przez prokuraturę IPN, mających na celu wskazanie dowodów zbrodni drugim bardzo ważnym, badania naukowe, mające na celu poszerzenie wiedzy o niezwykle tragicznym i bolesnym okresie naszej historii. Analizy genetyczne, antropologiczne i kryminalistyczne dostarczają danych mających na celu odpowiedzi na pytania dotyczące miejsca pochówku oraz jego charakteru. Z całą pewnością badania te przyczyniły się do wzbogacenia wiedzy na temat pochodzenia biogeograficznej ludności przebywającej w karnym obozie pracy Treblinka I oraz określenia struktur populacyjnych osób. Wskazały nowe drogi mające na celu wyjaśnienie dotychczas niepodejmowanych rozważań.

Badania były trudne ponieważ pracowano z materiałem silnie zdegradowanym co widać po uzyskanym całkowitym stężeniu DNA (Tabela nr 3, 4a-4d) oraz kompletności profilów genetycznych. Mimo to otrzymano 19 zadowolających wyników w obrębie analiz mtDNA (w grobie masowym) i 6 pochodzących z osobników podniesionych z pojedynczych jam grobowych, które pozwoliły określić przynależność haplogrupową. Próbę zdefiniowania haplogrup mtDNA tą samą metodą podjęli również inni badacze (192). Zaobserwowali oni cztery najczęstsze europejskie klastry haplogrup mtDNA: HV, UK, TJ, WIX. Inni autorzy wskazują również podobne haplogrupy w populacji europejskiej: H, U, J, T, K, W, I, V, X (193). Kolejni badacze wskazują, że haplogrupę H, która wywodzi się z matczynej linii haplogrupy HV, posiada około 40% Polaków (51). W przypadku haplogrupy HV oznaczono ją u 50% osobników z jam grobowych i u 30% ofiar z grobu masowego. Zaobserwowana struktura haplogrupowa nie wyklucza, że w badanym stanowisku szkieletowym znajdowały się szczątki osób polskiego pochodzenia.

W prezentowanym badaniu dla 33,3% osobników z pojedynczych grobów uzyskano haplogrupę U. Haplogrupy tej nie uzyskano w wyniku badania ofiar pochodzących z grobu masowego. Istnieją również badania, które wskazują haplogrupę U5 jako reprezentowaną przez Ukraińców i Rosjan (192) poprzez podhaplogrupę U5a1 i U5a1a (45). Dokładnie haplogrupę U5a1a wykryto u 33,3% osobników podniesionych z jam grobowych. Pozwala to wysunąć wnioski, że wśród osobników tych oznaczono haplogrupy mogący wskazywać na pochodzenie ukraińskie. Takim pochodzeniem

wyróżniały się osoby, które mogły przynależeć do jednostek wartowniczych obozu. Inne badania wskazują haplogrupę U5a jako wykazującą ograniczenie do Bliskiego Wschodu (30,194,195). Istnieją także analizy określające przynależność haplogrupy U5a2a do regionu Wołga – Ural z wyraźną ekspansją geograficzną na wschód (196). Analizując zmienność sekwencji mitochondrialnego DNA wśród Rosjan i Ukraińców, takie pochodzenie mieli głównie strażnicy obozu Treblinka I (jak wspomniano w rozdziale I), nie odnaleziono istotnych różnic w sekwencjach, które pozwoliłyby jasno odróżnić te populacje od europejskich.

Analiza genetyczna DNA mitochondrialnego ofiar grobu masowego wskazuje na haplogrupę K jako najliczniejszą. Stanowi ona 45% ilości osobników badanych. W 2006 roku badacze dokonali analizy haplogrupy K badając pokrewieństwo w linii matczynej (mtDNA) i wskazując ją jako pulę aszkenazyjskiego mtDNA (36). Szacuje się, że około 32% Żydów aszkenazyjskich posiada haplogrupę K. Prowadzono analizy określające typowe subhaplogrupy żydowskie K1a1b1a, K1a9 i K2a2a. Inne prace podają haplogrupy K1a7, K1a8, K2c jako bardzo rzadkie w aszkenazyjskim DNA (197). W przypadku niniejszej pracy 8 osobników co stanowiło 45% było przedstawicielem tej haplogrupy, z czego K- 3 osoby, K1a – 4 osoby. Pozwala się to wypowiedzieć, że istnieje duże prawdopodobieństwo, że wśród ofiar ujawnionych na terenie byłego obozu Treblinka I odnaleziono szczątki pochodzenia żydowskiego.

Badania DNA mitochondrialnego w niniejszej pracy pozwoliły oznaczyć także inne haplogrupy: J – 5% badanej populacji pochodzącej z grobu masowego, W - 10% badanej populacji pochodzącej z grobu masowego, V - 10% badanej populacji pochodzącej z grobu masowego. Haplogrupy te są również spotykane w populacji żydowskiej, co potwierdza wcześniejsze założenia. Haplogrupę J uzyskano również wśród osobników ekshumowanych z pojedynczych grobów masowych. Stanowiła ona 16,7%. Może to potwierdzać fakt, że wśród strażników obozowych były również jednostki żydowskiego pochodzenia. Często nie mieli oni wyboru, przymuszano ich do wykonywania rozkazów. Obsługiwali oni min. komory gazowe. Rozstrzeliwano ich za niewykonanie rozkazu (1,8,27). Istnieją badania, które wskazują, że częstość występowania haplogrupy J jest największa na Bliskim Wschodzie 12%, następnie w Europie 11%, Kaukazie 8%, północno-wschodniej Afryce 6% (198). Inni badacze wskazują na najwyższą częstość jej występowania u polskich Romów (186). Ci sami

autorzy zwracają uwagę również na inne haplotypy występujące u polskich Romów: H, U3, K, J1, X, I, W i M.

Dobór odpowiednich procedur laboratoryjnych i metod badawczych pozwolił uzyskać wysokiej jakości powtarzalne sekwencje DNA z dwóch niezależnych zębów pobranych od jednego osobnika, pomimo uzyskanych tak niskich stężeń całkowitego DNA ludzkiego. Odpowiednia metoda izolacji (199) jest często determinowana przez materiał biologiczny, na którym się pracuje. Tkanki twarde (kości, zęby) są często znajduwane na miejscu zbrodni związanych z masowymi katastrofami lub ekshumacjami szczątków ofiar II wojny światowej. Obserwacje morfologiczne ograniczające się do określenia wieku biologicznego, wzrostu, płci prowadzone przez antropologa, są utrudnione w przypadku szczątków wysoce rozdrobnionych i wymieszanych (200). Takim miejscem bez wątplenia był odnaleziony przez nas grób masowy. Wtedy niezastąpiona okazuje się genetyka. Materiał staje się trudny do opracowania ponieważ zawiera duże ilości inhibitorów reakcji PCR. Jest często zdegradowany więc uzyskuje się niewielkie stężenia DNA (201). Odpowiedni wybór metody ekstrakcji DNA minimalizuje inhibitory reakcji PCR i pozwala uzyskać najwyższe stężenia DNA. W pracy wykorzystano komercyjny zestaw PrepFiler® BTA (Thermo Fisher Scientific, USA), który został opracowany specjalnie do próbek trudnych. Nasze i inne badania pokazują, że mimo tak trudnego materiału uzyskano zadowalające wyniki (202,203).

Nasz zespół posiada duże doświadczenie w tego typu analizach (12,71). Prowadząc projekt Polskiej Bazy Genetycznej Ofiar Totalitaryzmów mamy do czynienia głównie z materiałem silnie zdegradowanym odnosząc liczne sukcesy w identyfikacji (81). Ostatnie lata pokazały, że zęby i kości mogą być z powodzeniem wykorzystywane do badań identyfikacyjnych osób zaginionych, ofiar wojennych oraz katastrof masowych (204–206). Praca z tego rodzaju materiałem (upływ czasu, działanie środowiska, silna degradacja, obecność inhibitorów) powoduje, że typowanie genetyczne pozostaje nadal wyzwaniem (200). Analiza takiego materiału biologicznego bardzo przypomina pracę z DNA starożytnym (136). Badania na świecie pokazują, że analiza DNA szczątków z okresu II wojny światowej są dzisiaj powszechnie wykorzystywane do identyfikacji ofiar pochodzących z grobów masowych zarówno odnalezionych w Polsce (70,71,80), jak i na świecie: Bośni i Hercegowinie (207), Słowenii (82), Rosji (208) oraz Włoszech (205). Kolejnym przykładem są ofiary hiszpańskiej wojny domowej (77,209). Powyższe prace jak i ta pokazują, że tak opracowany model badawczy można

z powodzeniem zastosować w przypadku innych niezidentyfikowanych dotąd miejsc masowych zbrodni na całym świecie.

Prowadzony przez nasz zespół projekt Polskiej Bazy Genetycznej Ofiar Totalitaryzmów pokazuje jak trudne są tego typu badania. Niejednokrotnie spotykano się z niechęcią finansowania tego rodzaju analiz, gdyż mogło wydawać się, że są one „niepoprawne” politycznie. Tego rodzaju badania obszarów masowych zbrodni przeciwko ludzkości budzą często niechęć, zapomnienie, ból ale i wstyd dla okupanta za popełnione ludobójstwo. Symbolem cierpień i największego ludobójstwa popełnionego w okresie II wojny światowej stał się Holokaust dotyczący Żydów. Mordowanie ludności żydowskiego pochodzenia odbywało się w specjalnie tworzonych obozach zagłady: Treblinka, Sobibór, Bełżec, Auschwitz, Kulmhof (15) Niemcy celowo niszczyli dowody swoich zbrodni. Może dlatego aby uniknąć kary.

Procederom eksterminacji padli również Polacy oraz Żydzi zamieszkujący tereny wołyńskie w latach 1943-44, będący ofiarami ukraińskich nacjonalistów (UPA). Proceder ten dotyczył rzezi wołyńskiej i nosił znamiona eksterminacji etnicznej. Sprawcy tych okrutnych działań nigdy nie zostali osądzeni i nigdy nie ponieśli kary za swoje czyny (210).

Podejmowano liczne próby osądzenia i ukarania zbrodniarzy niemieckich. Okazało się to niemożliwe w przypadku Sowietów głównie z powodów politycznych. Choć udowodniono pewne wydarzenia historyczne to Sowietci definitywnie odrzucali i negowali ich prawdziwość. Przed sądem nie stanęli także oprawcy katyńscy (211) oraz NKWD.

Wydarzenia te są dramatycznym okresem naszej historii ale jej niestety zmienić nie możemy. Możemy jednak zmienić podejście do pewnych wydarzeń. Należy otwarcie mówić o popełnionych zbrodniach. Wracać i badać miejsca masowego ludobójstwa. Tylko w taki sposób jesteśmy w stanie dostarczyć niezbitych dowodów na ich popełnienie. Dzisiejsza sytuacja na Ukrainie pokazuje, że nie poniesienie konsekwencji za swoje czyny sprawia, że oprawca czuje się bezkarny, „uśpiony” na pewien czas, dokonując ponownie okrutnych procederów. W dzisiejszych czasach narzędziami biologii molekularnej wspartymi analizami archeologicznymi i antropologicznymi jesteśmy w stanie odpowiedzieć na pytania kto spoczywa w danym grobie, jakiego był

pochożenia, jak zginął i czy przyczyniły się do tego osoby trzecie. Genetyka powoduje, że żadna ofiara nie pozostaje anonimowa.

VIII Wykaz tabel i rycin.

7.1 Wykaz zdjęć.

Zdjęcie 1. Grób masowy – ekshumacja – źródło Andrzej Ossowski.	10
Zdjęcie 2. Odnalezione miejsce pochówku pojedynczego – ekshumacja – źródło Andrzej Ossowski.	11

7.2 Wykaz tabel.

Tabela 1. Zabezpieczony materiał biologiczny do badań DNA pobrany ze szczątków podniesionych z pojedynczych jam grobowych.	42
Tabela 2. Zabezpieczony materiał biologiczny pochodzący z grobu masowego.	43
Tabela 3. Uzyskane profile DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z jam grobowych i grobu masowego wraz z uzyskanym stężeniem całkowitym DNA.	58
Tabela 4. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z jam grobowych.	60
Tabela 5a-d. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Global Filer™ szczątków podjętych z grobu masowego – c.d.	63
Tabela 6. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Y- Filer™ Plus szczątków podjętych z jam grobowych.	65
Tabela 7a-c. Wyniki badania polimorfizmu DNA w systemie do identyfikacji osobniczej Y- Filer™ Plus szczątków podjętych z grobu masowego:	66
Tabela 8. Uzyskane wyniki badania mtDNA (region HV1, HV2) szczątków podniesionych z jam grobowych, analizowane w bazie EMPOP.	69
Tabela 9 Zestawienie wyników badań szczątków podjętych z jam grobowych w systemie GlobalFiler, Y-Filer™ Plus oraz mtDNA.	70
Tabela 10 Uzyskane wyniki badania mtDNA (HV1, HV2) szczątków podniesionych z grobu masowego, analizowane w bazie EMPOP.	71
Tabela 11. Zestawienie poszczególnych haplogrup mtDNA szczątków podniesionych z grobu masowego i jam grobowych oszacowanych w programie HaploGrep.	73
Tabela 12. Uzyskane wyniki badania mtDNA (region HV1, HV2) oraz NGS szczątków podniesionych z jam grobowych, analizowane w bazie EMPOP.	76
Tabela 13a-e. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Żydów Aszkenazyjskich i próbie badanej (62) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań. .	83
Tabela 14a-b. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Romów i próbie badanej (186) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.	88
Tabela 15. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacjach Romów i próbie badanej (189) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.	90
Tabela 16. Porównanie częstości występowania haplogrup mtDNA w populacji Polski i próbie badanej (49) oraz wyników uzyskanych w toku niniejszych badań.	91

Literatura:

1. Jankiel Wiernik. Extract from the Written Evidence by Jacob Wiernik on the Extermination Camp At Treblinka. In: Documents on the Holocaust [Internet]. Elsevier; 1981. p. 353–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080358499501714>
2. Różycki S, Michalski M, Kopówka E. Obóz pracy Treblinka I. Metodyka integracji danych wieloźródłowych. Warszawa: Ministerstwa Kultury i Dziedzictwa Narodowego; 2011. 21–27 p.
3. Abate D, Sturdy-Colls C. A multi-level and multi-sensor documentation approach of the Treblinka extermination and labor camps. J Cult Herit [Internet]. 2018 Nov;34:129–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.culher.2018.04.012>
4. Sturdy Colls C. Holocaust Archaeology: Archaeological Approaches to Landscapes of Nazi Genocide and Persecution. J Confl Archaeol [Internet]. 2012 May 12;7(2):70–104. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1574077312Z.00000000005>
5. Sturdy Colls C, Branthwaite M. “This is Proof”? Forensic Evidence and Ambiguous Material Culture at Treblinka Extermination Camp. Int J Hist Archaeol. 2018;22(3):430–53.
6. Różycki S, Zapłata R, Karczewski J, Ossowski A, Tomczyk J. Integrated Archaeological Research: Archival Resources, Surveys, Geophysical Prospection and Excavation Approach at an Execution and Burial Site: The German Nazi Labour Camp in Treblinka. Geosciences [Internet]. 2020 Aug 24;10(9):336. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-3263/10/9/336>
7. Sturdy Colls C, Colls K. The Heart of Terror: A Forensic and Archaeological Assessment of the Old Gas Chambers at Treblinka. In: Archaeologies of Totalitarianism, Authoritarianism, and Repression. Cham: Springer International Publishing; 2020.
8. Kopówka E. Treblinka. Nigdy więcej. Polish: Siedlce : Muzeum Walki i Męczeństwa w Treblince, 2002.; 2002. 77–109 p.

9. Samuel W. Bunt w Treblince. Żydowski Instytut Historyczny, editor. 2016. 354 p.
10. Bosworth RJB. Second World War, The. In: International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences. Elsevier; 2015.
11. Ciesielska M, Grzybowski A. Jewish Dermatologists in Warsaw during the Second World War. Clin Dermatol. 2016 Sep;34(5).
12. Diepenbroek M, Amory C, Niederstätter H, Zimmermann B, Szargut M, Zielińska G, et al. Genetic and phylogeographic evidence for Jewish Holocaust victims at the Sobibór death camp. Genome Biol [Internet]. 2021 Dec 6;22(1):200. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-021-02420-0>
13. Zubrzycki G, Hayes P. Gone but not forgotten : Archaeological approaches to the site of the former Treblinka Extermination Camp in Poland. 1945;2(2003):330–50.
14. Martyna R. Obóz zagłady Treblinka II w pamięci społecznej (1943–1989). Neriton, editor. Polska; 2008.
15. Yitak Arad. Belzec, Sobibor, Treblinka The Operation Reinhard Death Camps. Revised an. 2018.
16. Colls CS. “Earth conceal not my blood”: Forensic and archaeological approaches to locating the remains of Holocaust victims. Human remains in society. 2018. 163–196 p.
17. Abate D, Sturdy Colls C, Moyssi N, Karsili D, Faka M, Anilir A, et al. Optimizing search strategies in mass grave location through the combination of digital technologies. Forensic Sci Int Synerg. 2019;1.
18. Dariusza Libionki. Akcja Reinhardt. Zagłada Żydów w Generalnym Gubernatorstwie. Narodowej IP, editor. Warszawa: Instytut Pamięci Narodowej; 2004.
19. Dariusza Libionki. Akcja Reinhardt. Zagłada Żydów w Generalnym Gubernatorstwie. Narodowej IP, editor. Warszawa; 2004.

20. Jankiel Wiernik. Rok w Treblince. Rada Ochrony Pamięci Walk i Męczeństwa, editor. Polska; 2003. 88 p.
21. Rachela Auerbach. In the fields of Treblinka,” in *The Death Camp Treblinka: A Documentary*, ed. Alexander Donat. Schocken Books, editor. New York; 1979.
22. Abram Jakub Krzepicki. Człowiek uciekł z Treblinek. Rozmowy z powracającym... Warszawa: Żydowski Instytut Historyczny; 2017.
23. Edward Kopówka PT. Treblinka. Kamienie milczą – ja pamiętam. Siedlce; 2007.
24. Cliffe KM, Day AE, Bagga M, Siggins K, Quilter CR, Lowden S, et al. Analysis of the non-recombining Y chromosome defines polymorphisms in domestic pig breeds: ancestral bases identified by comparative sequencing. *Anim Genet* [Internet]. 2010 Dec;41(6):619–29. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2010.02070.x>
25. Chrostowski Witold. Extermination camp Treblinka. London; 2004.
26. Węgrzyn Ł. Granice nazistowskich obozów koncentracyjnych i zagłady na terenie okupowanej Polski. *Stud z Geogr Polit i Hist* [Internet]. 2015;4. Available from: <http://repozytorium.uni.lodz.pl:8080/xmlui/handle/11089/17067?show=full>
27. Kopówka E. Treblinka – Historia i Pamięć. Published by muzeum regionalne w siedlcach, editor. Siedlce; 2015.
28. Brethour M, Davidson F. Visualizing intimate geographies of genocide: A spatial analysis of the Holocaust in Węgrów County, Poland (1942–1944). *J Hist Geogr*. 2021 Apr;72.
29. Mielnik-Sikorska M, Daca P, Malyarchuk B, Derenko M, Skonieczna K, Perkova M, et al. The History of Slavs Inferred from Complete Mitochondrial Genome Sequences. *Pereira LMSM*, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jan 14;8(1):e54360. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0054360>
30. Al-Zahery N, Semino O, Benuzzi G, Magri C, Passarino G, Torroni A, et al. Y-chromosome and mtDNA polymorphisms in Iraq, a crossroad of the early human dispersal and of post-Neolithic migrations. *Mol Phylogenet Evol* [Internet]. 2003 Sep;28(3):458–72. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790303000393>

31. Ralph P, Coop G. The Geography of Recent Genetic Ancestry across Europe. Tyler-Smith C, editor. *PLoS Biol* [Internet]. 2013 May 7;11(5):e1001555. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1001555>
32. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 1999 Feb;1410(2):103–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272898001613>
33. Bazaluk O. *The Theory of War and Peace: The Geophilosophy of Europe*. Cambridge Scholars Publishing; 7535BC. 185 p.
34. Diepenbroek M, Cytacka S, Szargut M, Arciszewska J, Zielińska G, Ossowski A. Analysis of male specific region of the human Y chromosome sheds light on historical events in Nazi occupied eastern Poland. *Int J Legal Med* [Internet]. 2019 Mar 5;133(2):395–409. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00414-018-1943-0>
35. Brandstätter A, Egyed B, Zimmermann B, Tordai A, Padar Z, Parson W. Mitochondrial DNA control region variation in Ashkenazi Jews from Hungary. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2008 Jan;2(1):e4–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497307001123>
36. Behar DM, Metspalu E, Kivisild T, Achilli A, Hadid Y, Tzur S, et al. The Matrilineal Ancestry of Ashkenazi Jewry: Portrait of a Recent Founder Event. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2006 Mar;78(3):487–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707623878>
37. Eberhardt P. *Political Migrations on Polish Territories (1939-1950)*. 2001.
38. Rębała K, Martínez-Cruz B, Tönjes A, Kovacs P, Stumvoll M, Lindner I, et al. Contemporary paternal genetic landscape of Polish and German populations: from early medieval Slavic expansion to post-World War II resettlements. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2013 Apr 12;21(4):415–22. Available from: <http://www.nature.com/articles/ejhg2012190>
39. Ploski R, Wozniak M, Pawlowski R, Monies D, Branicki W, Kupiec T, et al.

- Homogeneity and distinctiveness of Polish paternal lineages revealed by Y chromosome microsatellite haplotype analysis. *Hum Genet* [Internet]. 2002 Jun 22;110(6):592–600. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-002-0728-0>
40. Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelmann J, et al. Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum Genet* [Internet]. 2005 Sep 16;117(5):428–43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-005-1333-9>
 41. Woźniak M, Grzybowski T, Starzyński J, Marciniak T. Continuity of Y chromosome haplotypes in the population of Southern Poland before and after the Second World War. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2007 Jun;1(2):134–40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497307000403>
 42. Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2019 Aug 8;20(8):467–84. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41576-019-0127-1>
 43. Rosser ZH, Zerjal T, Hurles ME, Adojaan M, Alavantic D, Amorim A, et al. Y-Chromosomal Diversity in Europe Is Clinal and Influenced Primarily by Geography, Rather than by Language. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2000 Dec;67(6):1526–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707632212>
 44. Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2001 Dec;124(1):5–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073801004984>
 45. Richards MB, Macaulay VA, Bandelt H-J, Sykes BC. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet* [Internet]. 1998 May;62(3):241–60. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-1809.1998.6230241.x>

46. Macaulay V, Richards M, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V, et al. The Emerging Tree of West Eurasian mtDNAs: A Synthesis of Control-Region Sequences and RFLPs. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1999 Jan;64(1):232–49. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707616772>
47. Jarczak J, Grochowalski Ł, Marciniak B, Lach J, Słomka M, Sobalska-Kwapis M, et al. Mitochondrial DNA variability of the Polish population. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2019 Aug 21;27(8):1304–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41431-019-0381-x>
48. Malyarchuk B, Litvinov A, Derenko M, Skonieczna K, Grzybowski T, Grosheva A, et al. Mitogenomic diversity in Russians and Poles. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2017 Sep;30:51–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497317301357>
49. Grzybowski T, Malyarchuk BA, Derenko M V., Perkova MA, Bednarek J, Woźniak M. Complex interactions of the Eastern and Western Slavic populations with other European groups as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2007 Jun;1(2):141–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497307000488>
50. Malyarchuk B, Grzybowski T, Derenko M, Perkova M, Vanecek T, Lazur J, et al. Mitochondrial DNA Phylogeny in Eastern and Western Slavs. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2008 Apr 23;25(8):1651–8. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msn114>
51. Chinnery PF, Gomez-Duran A. Oldies but Goldies mtDNA Population Variants and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Oct 12;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00682/full>
52. Richards M, Macaulay V, Torroni A, Bandelt H-J. In Search of Geographical Patterns in European Mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2002 Nov;71(5):1168–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707604091>
53. Loogväli E-L, Roostalu U, Malyarchuk BA, Derenko M V., Kivisild T, Metspalu E, et al. Disuniting Uniformity: A Pied Cladistic Canvas of mtDNA Haplogroup

- H in Eurasia. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2004 Nov;21(11):2012–21. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msh209>
54. Roostalu U, Kutuev I, Loogväli E-LL, Metspalu E, Tambets K, Reidla M, et al. Origin and Expansion of Haplogroup H, the Dominant Human Mitochondrial DNA Lineage in West Eurasia: The Near Eastern and Caucasian Perspective. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2007 Feb;24(2):436–48. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msl173>
 55. Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R, et al. The Molecular Dissection of mtDNA Haplogroup H Confirms That the Franco-Cantabrian Glacial Refuge Was a Major Source for the European Gene Pool. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004 Nov;75(5):910–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707637987>
 56. Gandini F, Achilli A, Pala M, Bodner M, Brandini S, Huber G, et al. Mapping human dispersals into the Horn of Africa from Arabian Ice Age refugia using mitogenomes. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Jul 5;6(1):25472. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep25472>
 57. Quintana-Murci L, Chaix R, Wells RS, Behar DM, Sayar H, Scozzari R, et al. Where West Meets East: The Complex mtDNA Landscape of the Southwest and Central Asian Corridor. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2004 May;74(5):827–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707643523>
 58. Sahakyan H, Hooshiar Kashani B, Tamang R, Kushniarevich A, Francis A, Costa MD, et al. Origin and spread of human mitochondrial DNA haplogroup U7. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Aug 24;7(1):46044. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep46044>
 59. MALYARCHUK BA, GRZYBOWSKI T, DERENKO M V., CZARNY J, WOZNIAK M, MISCICKA-SLIWKA D. Mitochondrial DNA variability in Poles and Russians. *Ann Hum Genet* [Internet]. 2002 Jul;66(4):261–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-1809.2002.00116.x>
 60. MALYARCHUK BA, DERENKO M V. Mitochondrial DNA variability in Russians and Ukrainians: Implication to the origin of the Eastern Slavs. *Ann Hum Genet* [Internet]. 2001 Jan;65(1):63–78. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1469-1809.2001.6510063.x>

61. Richards M, Côté-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A, et al. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1996 Jul;59(1):185–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8659525>
62. Behar DM, Hammer MF, Garrigan D, Vilems R, Bonne-Tamir B, Richards M, et al. MtDNA evidence for a genetic bottleneck in the early history of the Ashkenazi Jewish population. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2004 May 14;12(5):355–64. Available from: <http://www.nature.com/articles/5201156>
63. Thomas MG, Weale ME, Jones AL, Richards M, Smith A, Redhead N, et al. Founding Mothers of Jewish Communities: Geographically Separated Jewish Groups Were Independently Founded by Very Few Female Ancestors. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2002 Jun;70(6):1411–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707606946>
64. Costa MD, Pereira JB, Pala M, Fernandes V, Olivieri A, Achilli A, et al. A substantial prehistoric European ancestry amongst Ashkenazi maternal lineages. *Nat Commun* [Internet]. 2013 Dec 8;4(1):2543. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms3543>
65. Behar DM, Metspalu E, Kivisild T, Rosset S, Tzur S, Hadid Y, et al. Counting the Founders: The Matrilineal Genetic Ancestry of the Jewish Diaspora. Macaulay V, editor. *PLoS One* [Internet]. 2008 Apr 30;3(4):e2062. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002062>
66. Behar DM, Yunusbayev B, Metspalu M, Metspalu E, Rosset S, Parik J, et al. The genome-wide structure of the Jewish people. *Nature* [Internet]. 2010 Jul 9;466(7303):238–42. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature09103>
67. Bray SM, Mulla JG, Dodd AF, Pulver AE, Wooding S, Warren ST. Signatures of founder effects, admixture, and selection in the Ashkenazi Jewish population. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2010 Sep 14;107(37):16222–7. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1004381107>
68. Zoosmann-Diskin A. The origin of Eastern European Jews revealed by

- autosomal, sex chromosomal and mtDNA polymorphisms. *Biol Direct* [Internet]. 2010;5(1):57. Available from:
<http://biologydirect.biomedcentral.com/articles/10.1186/1745-6150-5-57>
69. Atzmon G, Hao L, Pe'er I, Velez C, Pearlman A, Palamara PF, et al. Abraham's Children in the Genome Era: Major Jewish Diaspora Populations Comprise Distinct Genetic Clusters with Shared Middle Eastern Ancestry. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2010 Jun;86(6):850–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929710002466>
70. Ossowski A, Diepenbroek M, Kupiec T, Bykowska-Witowska M, Zielińska G, Dembińska T, et al. Genetic Identification of Communist Crimes' Victims (1944-1956) Based on the Analysis of One of Many Mass Graves Discovered on the Powazki Military Cemetery in Warsaw, Poland. *J Forensic Sci* [Internet]. 2016 Nov;61(6):1450–5. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.13205>
71. Ossowski A, Kuś M, Kupiec T, Bykowska M, Zielińska G, Jasiński ME, et al. The Polish Genetic Database of Victims of Totalitarianisms. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2016 Jan;258:41–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073815004557>
72. Kuś M, Ossowski A, Zielińska G. Example of genetic identifications of victims of totalitarian regimes in Poland. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2015 Dec;5:e356–7. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176815302638>
73. Dabney J, Meyer M. Extraction of Highly Degraded DNA from Ancient Bones and Teeth. In *Nat Protoc* 13; 2019. p. 25–9. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9176-1_4
74. Alaeddini R, Walsh SJ, Abbas A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2010 Apr;4(3):148–57. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497309001483>
75. Schoske R, Vallone PM, Ruitberg CM, Butler JM. Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short

- tandem repeat (STR) loci. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2003 Feb 14;375(3):333–43. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-002-1683-2>
76. Szibor R. X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2007 Jun;1(2):93–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497307000695>
77. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: A review. *PeerJ*. 2019;7.
78. Tillmar AO, Kling D, Butler JM, Parson W, Prinz M, Schneider PM, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2017 Jul;29:269–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497317301126>
79. D’Amato ME, Benjeddou M, Davison S. Evaluation of 21 Y-STRs for population and forensic studies. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2009 Dec;2(1):446–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176809001073>
80. Ossowski A, Diepenbroek M, Zwolski M, Falis A, Wróbel M, Bykowska-Witowska M, et al. A case study of an unknown mass grave — Hostages killed 70 years ago by a Nazi firing squad identified thanks to genetics. *Forensic Sci Int*. 2017;278:173–6.
81. Ossowski A, Piatek J, Brzeziński P, Zielińska G, Parafiniuk M. [Identification of the site of skeletal remains from World War II]. *Arch Med Sadowej Kryminol* [Internet]. 59(3):243–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20441087>
82. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažic J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second World War Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med*. 2010 Jul 10;124(4).
83. Bradley J. Adams P. Recovery, Analysis, and Identification of Commingled Human Remains [Internet]. 2008th ed. Adams BJ, Byrd JE, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1->

84. Watherston J, McNevin D, Gahan ME, Bruce D, Ward J. Current and emerging tools for the recovery of genetic information from post mortem samples: New directions for disaster victim identification. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2018 Nov;37:270–82. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497318301935>
85. Welch LA, Gill P, Phillips C, Ansell R, Morling N, Parson W, et al. European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2012 Dec;6(6):819–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497312000804>
86. Evett I, Pope S, Puch-Solis R. Providing scientific guidance on DNA to the judiciary. *Sci Justice* [Internet]. 2016 Jul;56(4):278–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1355030616300259>
87. Butler JM. Fundamentals of Forensic DNA Typing. *Fundam Forensic DNA Typing*. 2010;389.
88. Gusmão L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, et al. DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2006 Mar;157(2–3):187–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073805001829>
89. Re L, Birkhoff JM. The 47,XYY syndrome, 50 years of certainties and doubts: A systematic review. *Aggress Violent Behav* [Internet]. 2015 May;22:9–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359178915000348>
90. Roewer L. Y chromosome STR typing in crime casework. *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2009 Jun 20;5(2):77–84. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-009-9089-5>
91. Ginalski K, Rychlewski L, Baker D, Grishin N V. Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Feb 24;101(8):2305–10. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0306306101>

92. Jain M, Olsen HE, Turner DJ, Stoddart D, Bulazel K V, Paten B, et al. Linear assembly of a human centromere on the Y chromosome. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2018 Apr 19;36(4):321–3. Available from: <http://www.nature.com/articles/nbt.4109>
93. Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Hum Genet* [Internet]. 2017 May 29;136(5):637–55. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00439-017-1793-8>
94. Calacal GC, Delfin FC, Tan MMM, Roewer L, Magtanong DL, Lara MC, et al. Identification of Exhumed Remains of Fire Tragedy Victims Using Conventional Methods and Autosomal/Y-Chromosomal Short Tandem Repeat DNA Profiling. *Am J Forensic Med Pathol* [Internet]. 2005 Sep;26(3):285–91. Available from: <https://journals.lww.com/00000433-200509000-00016>
95. Dettlaff-Kakol A, Pawlowski R. First Polish DNA “manhunt” – an application of Y-chromosome STRs. *Int J Legal Med* [Internet]. 2002 Oct;116(5):289–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00414-002-0320-0>
96. Butler JM. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press;
97. Population data of four x-chromosome markers in Tuscany and their use in a deficiency paternity case. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2003 Nov;137(2–3):215–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037907380300361X>
98. Kapińska E, Wysocka J, Cybulska L, Rebała K, Juchniewicz P, Szczerkowska Z. Examples of application of X chromosomal markers in familial investigations and personal identification. *Arch Med Sadowej Kryminol* [Internet]. 2012;62(3):152–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23650839>
99. Pakendorf B, Stoneking M. MITOCHONDRIAL DNA AND HUMAN EVOLUTION. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2005 Sep;6(1).
100. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* [Internet]. 1981 Apr;290(5806):457–65. Available from: <http://www.nature.com/articles/290457a0>

101. Atig RK-B, Hsouna S, Beraud-Colomb E, Abdelhak S. [Mitochondrial DNA: properties and applications]. *Arch Inst Pasteur Tunis* [Internet]. 2009;86(1–4):3–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20707216>
102. Meyer S, Weiss G, von Haeseler A. Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics* [Internet]. 1999 Jul 1;152(3):1103–10. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/152/3/1103/6034955>
103. Davis C, Peters D, Warshauer D, King J, Budowle B. Sequencing the hypervariable regions of human mitochondrial DNA using massively parallel sequencing: Enhanced data acquisition for DNA samples encountered in forensic testing. *Leg Med* [Internet]. 2015 Mar;17(2):123–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1344622314001588>
104. Goncalves FT, Cardena MMSG, Gonzalez RS, Krieger JE, Pereira AC, Fridman C. The discrimination power of the hypervariable regions HV1, HV2 and HV3 of mitochondrial DNA in the Brazilian population. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2011 Dec;3(1):e311–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176811001569>
105. Hwa H-L, Ko T-M, Chen Y-C, Lin C-Y, Huang Y-H, Tseng L-H, et al. Sequence polymorphisms of mtDNA HV1, HV2 and HV3 regions in eight population groups living in Taiwan. *Aust J Forensic Sci* [Internet]. 2012 Sep;44(3):243–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00450618.2011.650208>
106. Afonso Costa H, Carvalho M, Balsa F, Bento AM, Serra A, Lopes V, et al. Crime investigation set on mitochondrial DNA analysis. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2009 Dec;2(1):217–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176809000171>
107. Luo S, Valencia CA, Zhang J, Lee N-C, Slone J, Gui B, et al. Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2018 Dec 18;115(51):13039–44. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1810946115>
108. WHITE DJ, WOLFF JN, PIERSON M, GEMMELL NJ. Revealing the hidden

- complexities of mtDNA inheritance. *Mol Ecol* [Internet]. 2008 Dec;17(23):4925–42. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2008.03982.x>
109. Lyons EA, Scheible MK, Sturk-Andreaggi K, Irwin JA, Just RS. A high-throughput Sanger strategy for human mitochondrial genome sequencing. *BMC Genomics* [Internet]. 2013 Dec 16;14(1):881. Available from: <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-881>
110. Kim NY, Lee HY, Park SJ, Yang WI, Shin K-J. Modified Midi- and Mini-Multiplex PCR Systems for Mitochondrial DNA Control Region Sequence Analysis in Degraded Samples. *J Forensic Sci* [Internet]. 2013 May;58(3):738–43. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1556-4029.12062>
111. Date Chong M, Calloway CD, Klein SB, Orrego C, Buoncristiani MR. Optimization of a duplex amplification and sequencing strategy for the HVI/HVII regions of human mitochondrial DNA for forensic casework. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2005 Nov;154(2–3):137–48. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073804006656>
112. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1977 Dec;74(12):5463–7. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.74.12.5463>
113. Bruijns B, Tiggelaar R, Gardeniers H. Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis* [Internet]. 2018 Nov;39(21):2642–54. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201800082>
114. Mascher M, Wu S, Amand P St., Stein N, Poland J. Application of Genotyping-by-Sequencing on Semiconductor Sequencing Platforms: A Comparison of Genetic and Reference-Based Marker Ordering in Barley. Candela H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 3;8(10):e76925. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0076925>
115. Pukk L, Ahmad F, Hasan S, Kisand V, Gross R, Vasemägi A. Less is more: extreme genome complexity reduction with ddRAD using Ion Torrent semiconductor technology. *Mol Ecol Resour* [Internet]. 2015 Sep;15(5):1145–52.

Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.12392>

116. Igawa K, Manabe Y, Oyamada J, Kitagawa Y, Kato K, Ikematsu K, et al. Mitochondrial DNA analysis of Yayoi period human skeletal remains from the Doigahama site. *J Hum Genet* [Internet]. 2009 Oct 21;54(10):581–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/jhg200981>
117. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, et al. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci* [Internet]. 1993 May;38(3):542–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515208>
118. Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* [Internet]. 1999 Oct;23(2):147–147. Available from: https://www.nature.com/articles/ng1099_147
119. Schwartz M, Vissing J. Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *N Engl J Med* [Internet]. 2002 Aug 22;347(8):576–80. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa020350>
120. Diroma MA, Modi A, Lari M, Sineo L, Caramelli D, Vai S. New Insights Into Mitochondrial DNA Reconstruction and Variant Detection in Ancient Samples. *Front Genet* [Internet]. 2021 Feb 18;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.619950/full>
121. Prüfer K, Stenzel U, Hofreiter M, Pääbo S, Kelso J, Green RE. Computational challenges in the analysis of ancient DNA. *Genome Biol* [Internet]. 2010;11(5):R47. Available from: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2010-11-5-r47>
122. Dabney J, Knapp M, Glocke I, Gansauge M-T, Weihmann A, Nickel B, et al. Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Sep 24;110(39):15758–63. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1314445110>
123. Roubicek DA, Souza-Pinto NC de. Mitochondria and mitochondrial DNA as

- relevant targets for environmental contaminants. *Toxicology* [Internet]. 2017 Nov;391:100–8. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X17301798>
124. Ely B, Wilson JL, Jackson F, Jackson BA. African-American mitochondrial DNAs often match mtDNAs found in multiple African ethnic groups. *BMC Biol* [Internet]. 2006 Dec 12;4(1):34. Available from:
<https://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1741-7007-4-34>
125. Fagundes NJR, Kanitz R, Bonatto SL. A Reevaluation of the Native American MtDNA Genome Diversity and Its Bearing on the Models of Early Colonization of Beringia. Harpending H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2008 Sep 17;3(9):e3157. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0003157>
126. Cardinali I, Bodner M, Capodiferro MR, Amory C, Rambaldi Migliore N, Gomez EJ, et al. Mitochondrial DNA Footprints from Western Eurasia in Modern Mongolia. *Front Genet* [Internet]. 2022 Jan 6;12. Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.819337/full>
127. Derenko M, Malyarchuk B, Denisova G, Perkova M, Rogalla U, Grzybowski T, et al. Complete Mitochondrial DNA Analysis of Eastern Eurasian Haplogroups Rarely Found in Populations of Northern Asia and Eastern Europe. Kivisild T, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Feb 21;7(2):e32179. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0032179>
128. Battaglia V, Grugni V, Perego UA, Angerhofer N, Gomez-Palmieri JE, Woodward SR, et al. The First Peopling of South America: New Evidence from Y-Chromosome Haplogroup Q. O'Rourke D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Aug 21;8(8):e71390. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0071390>
129. Chacón-Duque J-C, Adhikari K, Fuentes-Guajardo M, Mendoza-Revilla J, Acuña-Alonzo V, Barquera R, et al. Latin Americans show wide-spread Converso ancestry and imprint of local Native ancestry on physical appearance. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 19;9(1):5388. Available from:
<http://www.nature.com/articles/s41467-018-07748-z>
130. Diepenbroek M, Bayer B, Schwender K, Schiller R, Lim J, Lagacé R, et al.

- Evaluation of the Ion AmpliSeq™ PhenoTrivium Panel: MPS-Based Assay for Ancestry and Phenotype Predictions Challenged by Casework Samples. *Genes (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 25;11(12):1398. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/11/12/1398>
131. Hwa H-L, Wu M-Y, Lin C-P, Hsieh WH, Yin H-I, Lee T-T, et al. A single nucleotide polymorphism panel for individual identification and ancestry assignment in Caucasians and four East and Southeast Asian populations using a machine learning classifier. *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2019 Mar 16;15(1):67–74. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-018-0071-y>
 132. Phillips C, Parson W, Lundsberg B, Santos C, Freire-Aradas A, Torres M, et al. Building a forensic ancestry panel from the ground up: The EUROFORGEN Global AIM-SNP set. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2014 Jul;11:13–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497314000404>
 133. Phillips C. Forensic genetic analysis of bio-geographical ancestry. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2015 Sep;18:49–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497315300168>
 134. Zheng J, Li X, Shan D, Zhang H, Guan D. DNA degradation within mouse brain and dental pulp cells 72 hours postmortem. *Neural Regen Res* [Internet]. 2012 Feb 5;7(4):290–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806071>
 135. Liu L, Shu X, Ren L, Zhou H, Li Y, Liu W, et al. Determination of the early time of death by computerized image analysis of DNA degradation: Which is the best quantitative indicator of DNA degradation? *J Huazhong Univ Sci Technol* [Internet]. 2007 Aug;27(4):362–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11596-007-0404-7>
 136. Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Després V, Hebler J, Rohland N, et al. Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annu Rev Genet* [Internet]. 2004 Dec 1;38(1):645–79. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.37.110801.143214>
 137. Hofreiter M. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts

- induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 Dec 1;29(23):4793–9. Available from:
<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.23.4793>
138. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* [Internet]. 1993 Apr;362(6422):709–15. Available from:
<http://www.nature.com/articles/362709a0>
139. Graham EAM. DNA reviews: Ancient DNA. *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2007 Nov 12;3(3):221–5. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s12024-007-9009-5>
140. Hoss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Paabo S. DNA Damage and DNA Sequence Retrieval from Ancient Tissues. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1996 Apr 1;24(7):1304–7. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/24.7.1304>
141. Opel KL, Chung D, McCord BR. A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *J Forensic Sci* [Internet]. 2010 Jan;55(1):25–33. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x>
142. Gilbert MTP, Hansen AJ, Willerslev E, Rudbeck L, Barnes I, Lynnerup N, et al. Characterization of Genetic Miscoding Lesions Caused by Postmortem Damage. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2003 Jan;72(1):48–61. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707605035>
143. Gilbert MTP, Willerslev E, Hansen AJ, Barnes I, Rudbeck L, Lynnerup N, et al. Distribution Patterns of Postmortem Damage in Human Mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2003 Jan;72(1):32–47. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707605023>
144. Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P. Resistance of Bacillus Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2000 Sep;64(3):548–72. Available from:
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000>
145. Brough AL, Morgan B, Ruttly GN. The basics of disaster victim identification. *J Forensic Radiol Imaging* [Internet]. 2015 Mar;3(1):29–37. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212478015000064>

146. Lessig R, Rothschild M. International standards in cases of mass disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2012 Jun 21;8(2):197–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12024-011-9272-3>
147. van Oven M, Kayser M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum Mutat* [Internet]. 2009 Feb;30(2):E386–94. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/humu.20921>
148. Hofreiter M. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res* [Internet]. nr 29. 2001 Dec 1;29(23):4793–9. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.23.4793>
149. Marota I, Basile C., Ubaldi M. RF. DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *Am. J.Phys.* 117 N, editor. 2002. 310–318 p.
150. Pluta D, Janiszewska E, Bonar M, Alama A, Dobosz T. Muzealnictwo: nowoczesne technologie w służbie historii. Część pierwsza: Kopalne DNA – historia odkryć, perspektywy i problemy. *Opusc Musealia*. 2018;25:93–9.
151. Irwin JA, Parson W, Coble MD, Just RS. mtGenome reference population databases and the future of forensic mtDNA analysis. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2011 Jun;5(3):222–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497310000554>
152. Kloss-Brandstätter A, Pacher D, Schönherr S, Weissensteiner H, Binna R, Specht G, et al. HaploGrep: a fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups. *Hum Mutat*. 2011 Jan;32(1).
153. Salas A, Bandelt H-J, Macaulay V, Richards MB. Phylogeographic investigations: The role of trees in forensic genetics. *Forensic Sci Int*. 2007 May;168(1).
154. Salas A, Carracedo Á, Macaulay V, Richards M, Bandelt H-J. A practical guide to mitochondrial DNA error prevention in clinical, forensic, and population genetics. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2005 Sep;335(3):891–9. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X0501661X>
155. Parson W, Gusmão L, Hares DRR, Irwin JAA, Mayr WRR, Morling N, et al. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: Revised and extended guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2014 Nov;13:134–42. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497314001586>
 156. Schiermeier Q. Forensic database challenged over ethics of DNA holdings. *Nature* [Internet]. 2021 Jun 17;594(7863):320–2. Available from:
<http://www.nature.com/articles/d41586-021-01584-w>
 157. Sinha M, Rana M, Kushwaha P. Applications of Mitochondrial DNA in Forensic Science. In: *Forensic DNA Typing: Principles, Applications and Advancements* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 329–43. Available from:
http://link.springer.com/10.1007/978-981-15-6655-4_16
 158. Winder NP. The removal estimator: A ‘probable numbers’ statistic that requires no matching. *Int J Osteoarchaeol* [Internet]. 1992 Mar;2(1):15–8. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/oa.1390020103>
 159. Schaefer M. A Practical Method for Detecting Commingled Remains Using Epiphyseal Union. In: *Commingled Human Remains* [Internet]. Elsevier; 2014. p. 123–44. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012405889700006X>
 160. Beck LA. Standards for data collection from human skeletal remains. Edited by Jane E. Buikstra and Douglas H. Ubelaker. 272 pp. Fayetteville: Arkansas Archeological Survey Research Series No. 44, 1994. \$25.00 (paper). *Am J Hum Biol* [Internet]. 1995;7(5):672–672. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajhb.1310070519>
 161. Curate F, Coelho J, Gonçalves D, Coelho C, Ferreira MT, Navega D, et al. A method for sex estimation using the proximal femur. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2016 Sep;266:579.e1-579.e7. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073816302638>
 162. Brůžek J, Santos F, Dutailly B, Murail P, Cunha E. Validation and reliability of the sex estimation of the human os coxae using freely available DSP2 software

- for bioarchaeology and forensic anthropology. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 2017 Oct;164(2):440–9. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajpa.23282>
163. Craig Cunningham, Louise Scheuer, Sue Black, Louise Scheuer SB. *Developmental Juvenile Osteology* [Internet]. 1st Editio. San Diego: Elsevier; 2000. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780126240009X5000X>
164. AlQahtani SJ, Hector MP, Liversidge HM. Brief communication: The London atlas of human tooth development and eruption. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 2010 Mar 22;142(3):481–90. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajpa.21258>
165. Stewart TD. Personal identification in mass disasters [Internet]. National Museum of Natural History, Smithsonian Institution; 1970. Available from:
<https://library.si.edu/digital-library/book/personalidentifi00semi>
166. Kallenberger L, Pilbrow V. Using CRANID to test the population affinity of known crania. *J Anat* [Internet]. 2012 Nov;221(5):459–64. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-7580.2012.01558.x>
167. Navega D, Coelho C, Vicente R, Ferreira MT, Wasterlain S, Cunha E. AncesTrees: ancestry estimation with randomized decision trees. *Int J Legal Med* [Internet]. 2015 Sep 23;129(5):1145–53. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s00414-014-1050-9>
168. Elliott M, Collard M. F <scp>ordisc</scp> and the determination of ancestry from cranial measurements. *Biol Lett* [Internet]. 2009 Dec 23;5(6):849–52. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsbl.2009.0462>
169. Preuße-Prange A, Renneberg R, Schwark T, Poetsch M, Simeoni E, von Wurmb-Schwark N. The problem of DNA contamination in forensic case work—How to get rid of unwanted DNA? *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2009 Dec;2(1):185–6. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176809001772>
170. Bolnick DA, Bonine HM, Mata-Míguez J, Kemp BM, Snow MH, LeBlanc SA. Nondestructive sampling of human skeletal remains yields ancient nuclear and

- mitochondrial DNA. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 2012 Feb;147(2):293–300. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajpa.21647>
171. Harney É, Cheronet O, Fernandes DM, Sirak K, Mah M, Bernardos R, et al. A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. *Genome Res* [Internet]. 2021 Mar;31(3):472–83. Available from: <http://genome.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gr.267534.120>
172. Reference Q. PrepFiler® and PrepFiler® BTA Forensic DNA Extraction Kits. User Man. 2012;2012(4468126):8.
173. Bulletin P. Quantifiler® HP and Quantifiler® Trio DNA Quantification Kits Offering accurate results in less time for your most challenging casework samples. (Figure 1):2–5.
174. Gouveia N, Brito P, Serra A, Balsa F, Andrade L, São Bento M, et al. Validation of Quantifiler® Trio DNA Quantification kit in forensic samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2015 Dec;5:e24–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176815300913>
175. Zielińska G, Ossowski A, Kuś M. Examples of exceptional human identifications done by department of forensic genetics in Szczecin, Poland. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2015 Dec;5:e510–1. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176815302614>
176. Pereira V, Longobardi A, Børsting C. Sequencing of mitochondrial genomes using the Precision ID mtDNA Whole Genome Panel. *Electrophoresis* [Internet]. 2018 Nov;39(21):2766–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.201800088>
177. Szargut M, Diepenbroek M, Zielińska G, Cytacka S, Arciszewska J, Jałowińska K, et al. Is MPS always the answer? Use of two PCR-based methods for Y-chromosomal haplotyping in highly and moderately degraded bone material. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2019 Sep;42:181–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497319301565>
178. Thermo Fisher Scientific. GlobalFiler™ and GlobalFiler™ IQC PCR Amplification Kits User Guide Publication number 4477604 Revision F. 2019;(4476135). Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS->

Assets/LSG/manuals/4477604.pdf

179. Thermo Fisher Scientific. Yfiler® Plus PCR Amplification Kit – PCR Amplification and CE. 2014;(4484678):1–4.
180. Nilsson M, Possnert G, Edlund H, Budowle B, Kjellström A, Allen M. Analysis of the Putative Remains of a European Patron Saint–St. Birgitta. Brembs B, editor. PLoS One [Internet]. 2010 Feb 16;5(2):e8986. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0008986>
181. Qiagen. HotStarTaq® PCR Handbook [Internet]. 2010. Available from: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=53e71936-cf64-4a9b-a9d2-fccee4868aa7&lang=en>
182. Thermo Fisher Scientific. PCR Product Clean-Up Prior to Sequencing [Internet]. 2021. Available from: www.thermofisher.com/order/catalog/product/EF0654
183. Thermo Fisher Scientific. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol [Internet]. 2020. Available from: www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_081527.pdf
184. Huber N, Parson W, Dür A. Next generation database search algorithm for forensic mitogenome analyses. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2018 Nov;37:204–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497318302977>
185. Weissensteiner H, Pacher D, Kloss-Brandstätter A, Forer L, Specht G, Bandelt H-J, et al. HaploGrep 2: mitochondrial haplogroup classification in the era of high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2016 Jul 8;44(W1):W58–63. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkw233>
186. Malyarchuk BA, Grzybowski T, Derenko M V., Czarny J, Miscicka-Sliwka D. Mitochondrial DNA Diversity in the Polish Roma. *Ann Hum Genet* [Internet]. 2006 Mar;70(2):195–206. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.2005.00222.x>
187. Feder J, Blech I, Ovadia O, Amar S, Wainstein J, Raz I, et al. Differences in

- mtDNA haplogroup distribution among 3 Jewish populations alter susceptibility to T2DM complications. *BMC Genomics*. 2008 Dec 29;9(1).
188. Feder J, Ovadia O, Glaser B, Mishmar D. Ashkenazi Jewish mtDNA haplogroup distribution varies among distinct subpopulations: lessons of population substructure in a closed group. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2007 Apr 24;15(4):498–500. Available from: <http://www.nature.com/articles/5201764>
 189. Gresham D, Morar B, Underhill PA, Passarino G, Lin AA, Wise C, et al. Origins and Divergence of the Roma (Gypsies). *Am J Hum Genet* [Internet]. 2001 Dec;69(6):1314–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707612610>
 190. Baxter I. *The SS of Treblinka* [Internet]. Stroud : Spellmount; 2010. Available from: <http://pi.lib.uchicago.edu/1001/cat/bib/8121051>
 191. Stone L. Quantifying the Holocaust: Hyperintense kill rates during the Nazi genocide. *Sci Adv*. 2019 Jan 2;5(1).
 192. Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, et al. Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. *Genetics* [Internet]. 1996 Dec 1;144(4):1835–50. Available from: <https://academic.oup.com/genetics/article/144/4/1835/6017144>
 193. Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K. Phylogenetic Network for European mtDNA. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2001 Jun;68(6):1475–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707610581>
 194. Derenko M, Malyarchuk B, Bahmanimehr A, Denisova G, Perkova M, Farjadian S, et al. Complete Mitochondrial DNA Diversity in Iranians. Caramelli D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Nov 14;8(11):e80673. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0080673>
 195. Al-Zahery N, Pala M, Battaglia V, Grugni V, Hamod MA, Kashani BH, et al. In search of the genetic footprints of Sumerians: a survey of Y-chromosome and mtDNA variation in the Marsh Arabs of Iraq. *BMC Evol Biol* [Internet]. 2011 Dec 4;11(1):288. Available from: <https://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-11-288>

196. Ning C, Gao S, Deng B, Zheng H, Wei D, Lv H, et al. Ancient mitochondrial genome reveals trace of prehistoric migration in the east Pamir by pastoralists. *J Hum Genet* [Internet]. 2016 Feb 29;61(2):103–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/jhg2015128>
197. Hendrickson SL, Hutcheson HB, Ruiz-Pesini E, Poole JC, Lautenberger J, Sezgin E, et al. Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS* [Internet]. 2008 Nov 30;22(18):2429–39. Available from: <https://journals.lww.com/00002030-200811300-00003>
198. Černý V, Pereira L, Kujanová M, Vašíková A, Hájek M, Morris M, et al. Out of Arabia-The settlement of Island Soqatra as revealed by mitochondrial and Y chromosome genetic diversity. *Am J Phys Anthropol* [Internet]. 2009 Apr;138(4):439–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajpa.20960>
199. Hasap L, Chotigeat W, Pradutkanchana J, Asawutmangkul W, Kitpipit T, Thanakiatkrai P. Comparison of two DNA extraction methods: PrepFiler® BTA and modified PCI-silica based for DNA analysis from bone. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2019 Dec;7(1):669–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1875176819300848>
200. Ziętkiewicz E, Witt MM, Daca P, Żebracka-Gala J, Goniewicz M, Jarząb B, et al. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J Appl Genet* [Internet]. 2012 Feb 15;53(1):41–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13353-011-0068-7>
201. Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Jul 12;2(7):1756–62. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2007.247>
202. Barbaro A, Cormaci P, Falcone G. Validation of BTA™ lysis buffer for DNA extraction from challenged forensic samples. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2011 Dec;3(1):e61–2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187517681100031X>
203. Zupanič Pajnič I, Debska M, Gornjak Pogorelc B, Vodopivec Mohorčič K, Balažic J, Zupanc T, et al. Highly efficient automated extraction of DNA from

- old and contemporary skeletal remains. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2016 Jan;37:78–86. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1752928X15002073>
204. Quatrehomme G, Toupenay S, Delabarde T, Padovani B, Alunni V. Forensic answers to the 14th of July 2016 terrorist attack in Nice. *Int J Legal Med* [Internet]. 2019 Jan 17;133(1):277–87. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s00414-018-1833-5>
205. Pilli E, Boccone S, Agostino A, Virgili A, D’Errico G, Lari M, et al. From unknown to known: Identification of the remains at the mausoleum of fosse Ardeatine. *Sci Justice* [Internet]. 2018 Nov;58(6):469–78. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1355030618300108>
206. Parsons TJ, Huel RML, Bajunović Z, Rizvić A. Large scale DNA identification: The ICMP experience. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2019 Jan;38:236–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497318304198>
207. Marjanović D, Hadžić Metjahić N, Čakar J, Džehverović M, Dogan S, Ferić E, et al. Identification of human remains from the Second World War mass graves uncovered in Bosnia and Herzegovina. *Croat Med J*. 2015 Jun;56(3).
208. Morild I, Hamre SS, Huel R, Parsons TJ. Identification of Missing Norwegian World War II Soldiers, in Karelia Russia. *J Forensic Sci*. 2015 Jul;60(4).
209. Baeta M, Núñez C, Cardoso S, Palencia-Madrid L, Herrasti L, Etxeberria F, et al. Digging up the recent Spanish memory: genetic identification of human remains from mass graves of the Spanish Civil War and posterior dictatorship. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2015 Nov;19:272–9. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1872497315300636>
210. Motyka G. Rzeź wołyńska: skąd to okrucieństwo? Artyk Hist Polit II wojna światowa, Pol Kresy Wschod Eur Wschod [Internet]. 2020; Available from:
<https://histmag.org/Rzez-wolynska-skad-to-okrucienstwo-14222>
211. Wasilewski W. Katyń 1940 - sowieckie ludobójstwo na Polakach. *Biul IPN* [Internet]. 2007;Nr 1-2. Available from: <https://dzieje.pl/aktualnosci/zbrodnia-katynska>

