

Metody i markery wykorzystywane w kryminalistyce do predykcji wieku człowieka

Streszczenie

W artykule przedstawiono wcześniejsze i obecnie stosowane metody oraz markery wykorzystywane do określania wieku człowieka. Analiza materiału biologicznego z miejsca zdarzenia stwarza szansę na oszacowanie wieku osoby, od której pochodził ślad. Nowe metody pozwalają na uzyskanie informacji dotyczących wieku dawcy z najczęściej występujących na miejscu zdarzenia śladów biologicznych, tj. krwi, śliny czy spermy z dokładnością do kilku lat. Wcześniej wykorzystywane techniki do oznaczania wieku wymagały większej ilości materiału biologicznego, a błąd predykcji sięgał nawet kilkudziesięciu lat.

Słowa kluczowe markery, szacowanie wieku, delecje mitochondrialne, skracanie telomerów, racemizacja kwasu asparaginowego, mRNA, produkty glikacji, rearanżacje receptorów limfocytów T, metylacja DNA

Wprowadzenie

W kryminalistyce od dłuższego czasu poszukuje się korelacji pomiędzy cechami fenotypowymi człowieka a osobniczymi zmianami na poziomie tkankowym czy molekularnym. Predykcja wieku sprawców i ofiar przestępstw zaimplementowana do praktyki dochodzeniowej mogłaby pomóc śledczym w zawężaniu kręgu osób poszukiwanych. Do estymacji wieku dawcy próbki biologicznej wykorzystywano dotychczas kilka metod opartych na pomiarach zmian zachodzących wraz z wiekiem w komórkach ciała ludzkiego. Weryfikacji pod kątem możliwego zastosowania poddano m.in. delecje w genomie mitochondrialnym, skracanie telomerów, racemizację kwasu asparaginowego, ekspresję mRNA, badanie zaawansowanych produktów glikacji, rearanżacje receptorów limfocytów T oraz zmiany w poziomie metylacji genomowego DNA.

Pomiar częstości delecji w mitochondrialnym DNA

Genom mitochondrialny to niezależnie replikująca się, kolista, dwuniciowa cząsteczka DNA składająca się z 16659 pz. Koduje trzynaście polipeptydów oraz tRNA i rRNA i nie zawiera intronów [17]. W komórkach w zależności od ich typu występuje w wielu kopiach, np. od 50 do 800 w plemnikach, od 80 000 do 600 000 w oocytach. Tempo mutacji mtDNA jest dużo większe niż jądrowego DNA. Dzieje się tak m.in. z powodu obecności wolnych rodników i reaktywnych form tlenu powstających ubocznie w procesach oddychania komórkowego zachodzących w błonie mitochondrialnej. Zaobserwowano, iż wraz z wiekiem

ilość mutacji punktowych, delecji oraz duplikacji tandemowych zwiększa się i ujawnia się w całej tkance, a nie tylko w jej pojedynczych komórkach. W mtDNA mogą występować duże rearanżacje-delecje m.in. delecja 4977 pz, nazywana powszechną. Występowanie tej mutacji bada się już od lat 90. XX wieku metodami opartymi na hybrydyzacji i PCR. W publikacji [23] C. Meissner i inni analizowali przydatność metody szacowania wieku w oparciu o delecję 4977 pz. W trzech eksperymentach porównywano wyniki uzyskane z próbek krwi, mięśni szkieletowych oraz z różnych fragmentów narządów, np. mózgu, serca. Potwierdzono korelację pomiędzy częstością mutacji a wiekiem badanych osób, niestety zbyt niską na potrzeby kryminalistyki. Wyniki doświadczeń pokazały także, iż częstość powszechnej delecji jest inna dla różnych tkanek u tej samej osoby, a dodatkowo zaobserwowano różnice pomiędzy komórkami danej tkanki. Może to stanowić potencjalny problem w trakcie pośmiertnej izolacji materiału do badań. Margines błędów w metodzie opartej na analizie mtDNA sięga kilkudziesięciu lat. Z doniesień wynika ponadto, iż zewnętrzne czynniki mogą wpływać na częstość poziomu delecji. Z uwagi na powyższe fakty opisany marker nie znajduje praktycznego wykorzystania w genetyce sądowej, a metodyka wymaga dalszej standaryzacji.

Pomiar długości telomerów

Telomer to końcowa część chromosomu zbudowana z DNA i białek ochronnych konieczna dla utrzymania stabilności i integralności genomu. U ludzi telomerowe DNA składa się z heksamerowych powtórzeń

(5'-TTAGGG-3') i nie zawiera genów. Zaobserwowano, iż podczas każdego podziału komórki dochodzi do utraty części sekwencji telomerowej o różnej długości w zależności od typu komórki. Ma to związek z jednokierunkowym mechanizmem replikacji DNA od końca 5' do 3' oraz miejscem przyłączania się startera. Z tego względu większość komórek dzieli się tylko określoną ilość razy definiowaną jako limit Hayflicka od nazwiska odkrywcy tego zjawiska. Krytyczna długość telomeru indukuje starzenie się komórek i przejście w spoczynek replikacyjny lub apoptozę w zależności od typu komórki. Istnieją komórkowe mechanizmy zapobiegające skracaniu się telomerów. Należy do nich ekspresja enzymu telomerazy wydłużającego telomery oraz alternatywne wydłużanie telomerów dzięki rekombinacji między chromosomami siostrzanymi [4, 13]. Opublikowano szereg prac [18, 22, 23, 36], w których analizowano powyższe zjawisko w kontekście możliwości oszacowania wieku dawcy próbki biologicznej. Metodyka pomiarów długości telomerów z komórek krwi oraz miazgi zębów opiera się na różnych technikach, tj. Southern blotting, PCR, Q-FISH, Flow-FISH i in. Autorzy potwierdzili korelację pomiędzy długością telomerów a wiekiem, jednakże wyniki były obciążone dużym błędem, podobnie jak w przypadku mtDNA. Odnotowano również zmienność w długości telomerów pomiędzy chromosomami i typami komórek a także poszczególnymi komórkami. Zaobserwowano różnice osobnicze w długości i tempie skracania się telomerów (im dłuższe, tym szybciej się skracają). Zdolność komórek do wydłużania końcówek chromosomów oraz zewnętrzne czynniki wpływające na długość tych fragmentów (np. stres oksydacyjny, choroby) dodatkowo sprawiają, iż metoda szacowania wieku oparta na takich pomiarach jest w kryminalistyce nieużyteczna.

Pomiar ilości końcowych produktów glikacji (AGE)

Zjawisko glikacji (nieenzymatycznej glikozylacji) białek, zachodzące w warunkach ponadfizjologicznych stężeń glukozy, jest znane od ponad 100 lat. W 1912 roku Louis Camille Maillard po raz pierwszy opisał reakcję spontanicznego łączenia przy pomocy kowalentnych wiązań grupy aminowej białek z grupą aldehydową cukrów prostych. Określił to jako reakcję brązowienia. W cyklu reakcji chemicznych powstaje niestabilna zasada Schiffa, szybko przekształca się do związku Amadori, którego rozpad prowadzi do powstania silnie reaktywnych dwuwęglowych pochodnych wchodzących w nieodwracalną reakcję z grupami aminowymi białek, tworząc AGEs [29]. W latach 80. XX wieku zaobserwowano, że zjawisko nasilonej glikacji wiąże się z procesem starzenia się komórek i tkanek. Obecnie wiadomo, że AGEs powodują destrukcję wielu struktur komórkowych przez indukowanie stresu

oksydacyjnego i reakcji gliko- oraz lipooksydacji. Występowanie tego zjawiska i jego związek ze starzeniem się tkanek wykorzystano do badań nad szacowaniem wieku. Metodyka pomiarów ilości AGE opiera się m.in. na metodach immunohistochemicznych, testach ELISA [23]. Produkty glikacji kumulują się w kolagenie w różnych tkankach np. soczewce oka, skórze, osierdziu, chrząstce, neuronach piramidowych centralnego układu nerwowego. Zaobserwowano korelację ilości AGE z wiekiem w tkankach, najwyższy współczynnik korelacji miały neurony. Niektóre AGE dają fluorescencję, np. pentozydyna, co pozwoliło na analizę próbek na podstawie pomiarów fluorescencji. Zaobserwowano zmiany koloru ścięgien wraz z wiekiem z żółtego na brązowe. Szacowanie wieku na tej podstawie było najbardziej precyzyjne dla osób poniżej 45. roku życia. Czynniki zewnętrzne mogą mieć wpływ na wiarygodność uzyskanych wyników. Doświadczenia potwierdziły, iż u osób chorych na cukrzycę z nasilonymi procesami glikacji predykcja wieku dawała zawyżone wartości. Wyzwania związane z oznaczaniem wieku przy użyciu tego markera wiążą się także z metodologią trudną do zastosowania przy pośmiertnej identyfikacji, niemożliwością oznaczeń ze śladów oraz zależnością reakcji glikacji od temperatury.

Racemizacja kwasu asparaginowego AAR

Kwas asparaginowy to aminokwas posiadający asymetryczny atom węgla, więc może występować w postaci dwóch izomerów optycznych (jako forma L i D). W białkach ssaków formy L aminokwasów przeważają, ale wraz z wiekiem w procesach zależnych od temperatury mogą ulegać nieenzymatycznemu przekształceniu w formę D. Zjawisko to wykorzystano do analizy wieku dawców próbek biologicznych [23]. Ocena stosunku form D/L przeprowadzona została metodą chromatografii gazowej i spektrometrii mas. Zaobserwowano korelację stosunku obu form aminokwasów z wiekiem. Najbardziej precyzyjne pomiary odnosiły się do zębiny, gdzie wiek metrykalny obliczono z dokładnością od 1,5 do 4 lat. Opracowano dotychczas protokoły analizy hydrolizatu białka z zębów (kolagen), kości (osteokalcyna) oraz więzadeł, skóry i ścian tętnic (elastyna). Plusem tej metody jest – oprócz bardzo wysokiej dokładności predykcji – stosunkowo prosta izolacja materiału w przypadku tkanek miękkich ze zwłok. Niestety nie można w ten sposób oznaczać wieku ze śladów biologicznych.

Rearanżacje receptorów limfocytów T- sTREC

Procesem podlegającym zmianom na skutek starzenia się organizmu jest dojrzewanie limfocytów T w grasicy. Narząd ten prawidłowo funkcjonuje u człowieka do okresu dojrzewania, by z upływem czasu ulec atrofii w procesie zwanym inwolucją. Tkankę grasicy stopniowo zastępują wówczas tkanka

tłuszczowa. Podczas dojrzewania w grasicy niedojrzałe komórki T przechodzą rearanżacje w *loci* receptora T (*loci* TRC). Od jednego do czterech segmentów nukleotydowych DNA zostaje włączonych do genów kodujących pierwotną strukturę białek receptora limfocytów T. Niewykorzystana część sekwencji DNA jest usuwana, ulega cyrkulacji i powstaje episomalna kolistą cząsteczka DNA – sJTREC (*T-cell receptor rearrangements excision circle*). Cząsteczki DNA-TREC pozostają na stałe w matczynej komórce i nie podlegają późniejszym podziałom mitotycznym, a więc nie są przekazywane do komórek siostrzanych [31]. Zaobserwowano, iż około 70% wszystkich dojrzałych nowo powstałych limfocytów TCRαβ+ T zawiera w sobie δRec-ψJα sJTREC. Opisano zależność logarytmiczno-liniową pomiędzy liczbą sJTREC a wiekiem (im starsza osoba, tym mniej cząsteczek). Potwierdza to proces przemiany grasicy z zahamowaniem jej aktywności biologicznej prowadzący m.in. do spadku produkcji dziewiczych limfocytów T. Do ilościowej oceny poziomu sJTREC można używać metody TaqMan qPCR. Autorzy [35, 36, 37] badali materiał, jakim były świeże i 1,5-letnie próbki krwi. Metoda ta wykazuje stabilność w czasie, dużą czułość i stosunkowo wysoką precyzję predykcji z błędem ok. 9 lat. Materiałem biologicznym do analizy próbek może być tylko krew i tkanki zawierające krew. Należy jednak pamiętać, iż patogeny i choroby wpływające na funkcjonowanie układu immunologicznego, np. HIV/AIDS czy białaczka, modyfikują ilość sJTREC, a więc także otrzymane wyniki.

Poziom ekspresji mRNA

mRNA (ang. *messenger RNA*), tzw. informacyjny, matrycowy RNA, to kwas rybonukleinowy przenoszący informację genetyczną o sekwencji białek z genów do aparatu translacyjnego. Kodony mRNA rozpoznawane są przez antykodony w tRNA transportującym aminokwasy i dzięki temu w procesie translacji powstaje właściwa sekwencja białka. Stabilność mRNA w komórce osiąga dzięki modyfikacjom potranskrypcyjnym (czapeczka, ogon poli-A) oraz sekwencjom, które wiążą specyficzne białka, zapobiegając degradacji przez rybonukleazy [19]. Kontrola ekspresji genu w komórce polega na regulacji czasu półtrwania mRNA i u ssaków waha się od kilku minut do kilku dni. Poziom ekspresji wielu genów w komórkach zmienia się z wiekiem. W pracy [36] autorzy badali poziom ekspresji wybranych dziewięciu genów i oceniali korelację pomiędzy poziomem ekspresji a wiekiem. Markerami referencyjnymi były dwa markery metabolizmu podstawowego mRNA, które korelują ze sobą i poziom ich ekspresji jest niezależny od wieku [25, 36]. Markery te pozwoliły na oszacowanie wieku z dokładnością do ok. 11,5 lat na podstawie materiału, jakim były próbki krwi. W tej metodzie warunki i długość przechowywania próbek

mają kluczowe znaczenie dla uzyskanych profili ekspresji genów.

Poziom metylacji DNA

Metylacja to proces przyłączania się grup alkilowych (metylowych) (-CH₃) do zasad azotowych, najczęściej cytozyny, prowadzący do powstania 5-metylocytozyny. Zjawisko to nie wpływa na parowanie zasad azotowych w podwójnej helisie DNA. Reakcja przebiega dzięki aktywności metylotransferaz. Cytozyny ulegające metylacji występują najczęściej w nierównomiernie rozmieszczonych w genomie (głównie w obrębie ciągów powtarzających się sekwencji, jak centromery czy retrotranspozony) dinukleotydach CpG. Zjawisko metylacji stabilizuje te fragmenty genomu. Cytozyny zlokalizowane w obrębie promotorów genów w wyspach CpG (odcinkach około 200-500 pz, z przewagą ilościową par CG) najczęściej pozostają niemetylowane (oprócz imprintingu rodzicielskiego, ciątka Baara). Jest to możliwe dzięki obecności specjalnych białek stanowiących przeszkodę dla enzymów z grupy metylotransferaz [28]. W trakcie embriogenezy następują globalne zjawiska hiper- i hipometylacji genomu. Ostatecznie utrwała się określony wzór metylacji przekazywany komórkom potomnym, charakterystyczny dla danej tkanki. Epigenom może być modyfikowany przez środowisko oraz czynniki zewnętrzne. Zaburzenia metylacji są podłożem przedwczesnego starzenia w syndromie Wernera i progerii oraz wielu chorób, tj. choroba Alzheimer, nowotwory, cukrzyca. Nieprawidłowym procesem może być zarówno hipermetylacja wcześniej niemetylowanych miejsc CpG prowadząca do wyciszenia ekspresji genów, np. odpowiedzialnych za kontrolę podziałów komórki, oraz hipometylacja/demetylacja naturalnie zmetylowanych miejsc CpG prowadząca m.in. do destabilizacji genomu i wzrostu entropii w komórce. Wraz z wiekiem proces metylacji cytozyny w parach CpG w rejonach promotorowych nasila się, prowadząc do wyciszenia genów (zanik funkcji), a demetylacja rejonów subtelomerowych indukuje szybsze skracanie się telomerów [5, 10, 16, 20, 21, 26, 34]. Zmiany epigenetyczne w obrębie genomowego DNA wraz z wiekiem stały się przedmiotem wielu doświadczeń i prac badawczych [1-3, 6-9, 11, 12, 14, 15, 24, 27, 30, 32, 33]. Autorzy tych prac analizowali profil metylacji setek powiązanych z wiekiem miejsc CpG. Zidentyfikowano wiele genów, w obrębie których CpG najlepiej korelują z wiekiem m.in. GRIA2, NPTX2, ASPA, PEDE4C, ELOVL2, EDARADD, FHL2, PENK, ITGA2B. Dokonano selekcji miejsc CpG o różnym poziomie metylacji i opracowano modele predykcji wieku oparte na różnej liczbie miejsc CpG (od 2 do 353, ale najczęściej około 3). Uzyskano dokładność predykcji wahającą się w zależności od autorów i eksperymentu od 3,07 do 11 lat. Weryfikowano użyteczność próbek z płynów

ustrojowych oraz zębów. Modele predykcji z krwi, śliny i spermy wraz z kalkulatorami są dostępne bezpłatnie online. Metodologia doświadczeń opierała się głównie na mikromacierzach oraz sekwencjonowaniu po konwersji niezmetylowanej cytozyny do uracylu wodorosiarczynem sodu. Dodatkowo identyfikacja płynów ustrojowych, tj. krwi, śliny, spermy, krwi menstruacyjnej, wydzieliny z pochwy i ich mieszanin w oparciu o metylację, dała obiecujące wyniki jako alternatywa różnicowania tkanek na podstawie ekspresji mRNA. Publikacje potwierdzają, iż biorąc pod uwagę aktualny stan wiedzy, metylacja jest najlepszym markerem wieku z uwzględnieniem różnic tkankowych.

Podsumowanie

Niestety nie wszystkie weryfikowane metody szacowania wieku okazały się przydatne w praktyce ze względu na ograniczenia techniczne, problemy z dokładnością i powtarzalnością pomiarów oraz interpretacją i statystyczną analizą wyników. Kiedy myślimy o idealnym markerze wieku w kryminalistyce, oczywiste wydaje się, że powinien być on związany z fizjologicznymi zmianami zachodzącymi w komórkach/ tkankach ludzkich wraz z wiekiem i tu wszystkie siedem omówionych powyżej markerów wpisuje się w to kryterium. Dodatkowo powinien być niezależny od wpływu czynników środowiskowych czy procesów chorobowych, ale każdy z ww. markerów w pewnym stopniu jest przez te czynniki modyfikowany. Uniwersalny marker powinien dawać możliwość predykcji wieku z wielu typów tkanek czy śladów biologicznych i założenie to spełnia metoda oznaczania poziomu metylacji DNA. Z uwagi na miejsce pobierania, charakter oraz historię próbek marker powinien być odporny na degradację i warunek ten spełniają mtDNA, sjTREC oraz metylacja. Jednym z najistotniejszych parametrów powinna być dokładność predykcji wieku osoby przy użyciu danego markera, która oscyluje w granicach 1,5 lat dla metody opartej na AAR, 9 lat dla badania ilości sjTREC w limfocytach, 11,5 lat dla analizy poziomu ekspresji mRNA oraz około 3 lat dla analizy stopnia metylacji. Ważne jest, aby taki marker możliwie jak najczęściej informował o wieku biologicznym, co jest warunkiem spełnionym dla: AGE, AAR, sjTREC, mRNA i metylacji. Ponadto idealny marker winien być prosty i wiarygodny w pomiarze oraz łatwy do interpretacji i analizy statystycznej, a te oczekiwania spełnia zarówno metylacja, jak i AAR oraz sjTREC. Badanie poziomu metylacji DNA okazało się najbardziej obiecujące ze wszystkich analizowanych metod i najlepiej wpisuje się w wymagania, jakie stawiamy przed idealnym markerem. Zmiany epigenetyczne zachodzące w obrębie jądrowego DNA są istotnie skorelowane z wiekiem i obecnie poszukiwanie nowych markerów metylacji oraz testowanie dotychczas znalezionych stanowi przedmiot badań naukowców z wielu ośrodków badawczych.

Identyfikacja wielu miejsc występowania dinukleotydów CpG, wykazujących zmienność w poziomie metylacji cytozyny wraz z wiekiem, pozwoliła na opracowanie modeli predykcyjnych z krwi, śliny i spermy, czyli śladów biologicznych występujących najczęściej na miejscu zdarzenia. Używając różnych zestawów markerów w zależności od badanej tkanki, możemy starać się określić wiek osoby z dokładnością nawet do kilku lat.

Bibliografia

1. Bekaert B. i inni, *Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers*, "Epigenetics" 2010, nr 10, s. 922-930, DOI:10.1080/15592294.2015.1080413, <http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2015.1080413>.
2. Bem J., Grabowska I., *Alchemia epigenetycznej regulacji pluripotencji*, „Postępy Biochemii” 2013, nr 59 (2), s. 144-156.
3. Bocklandt S. i inni, *Epigenetic Predictor of Age*, "PLoS ONE", nr 6(6), e14821, DOI:10.1371/journal.pone.0014821.
4. Cong Y. i inni, *Human Telomerase and Its Regulation*, "Microbiology and Molecular Biology Reviews" September 2002, t. 66, nr 3, s. 407-425.
5. Flis S., Flis K., Sptawiński J., *Modyfikacje epigenetyczne a nowotwory*, „Nowotwory. Journal of Oncology” 2007, t. 57, nr 4, s. 427-434.
6. Florath I. i inni, *Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites*, "Human Molecular Genetics" 2014, t. 23, nr 5, s. 1186-1201.
7. Forat S. i inni, *Methylation Markers for the Identification of Body Fluids and Tissues from Forensic Trace Evidence*, "PLoS ONE", nr 11(2), e0147973, DOI:10.1371/journal.pone.0147973.
8. Freire-Aradas A. i inni, *Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system*, "Forensic Science International: Genetics" September 2016, t. 24, s. 65-74.
9. Garagnani P. i inni, *Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age*, "Aging Cell", December 2012, t. 11, z. 6, s. 1132-1134.
10. Gruber B.M., *Epigenetyka a etiologia chorób neurodegeneracyjnych*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2011, nr 65, s. 542-551(online).
11. Guerrero-Bosagna C., *DNA Methylation Research Methods*, "Mater Methods" 2013, nr 3, s. 206.

12. Hannum G. i inni, *Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates*, "Molecular Cell", January 2013, t. 49, z. 2, nr 24, s. 359-367.
13. Hodes R.J., *Telomere Length, Aging, and Somatic Cell Turnover*, "Journal of Experimental Medicine" 1999, Jul 19; nr 190(2), s. 153-156.
14. Horvath S., *DNA methylation age of human tissues and cell types*, "Genome Biology" nr 14, R115, <http://genomebiology.com/14/10/R115>.
15. Johansson A. i inni, *Continuous Aging of the Human DNA Methylome Throughout the Human Lifespan*, "PLoS ONE", nr 8(6), e67378, DOI:10.1371/journal.pone.0067378.
16. Johnson K.C., Christensen B.C., *Genome-Wide DNA Methylation Changes During Aging*, "Epigenomics in Health and Disease" 2016, rozdz. 6, s. 127-144.
17. Keogh M., Chinnery P.F., *Mitochondrial DNA mutations in neurodegeneration*, "Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetic" November 2015, t. 1847, z.11, s. 1401-1411, SI: Mitochondrial dysfunction in aging.
18. Kozłowska A., Mikołajczyk A., Pawlas N., *Długość telomerów – nowy biomarker w medycynie*, „Medycyna Środowiskowa - Environmental Medicine” 2015, t. 18, nr 4, s. 7-13.
19. Linder B. i inni, *mRNA metabolism and neuronal disease*, "FEBS Letters" 22 June 2015, t. 589, z. 14, s. 1598-1606, Berlin Special Issue: The Biochemical Basis of Life.
20. Łukasik M., Karmalska J., Szutowski M.M., Łukaszewicz J., *Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu*, „Biuletyn Wydziału Farmacji WUM” 2009, nr 2, s. 13-18.
21. Majchrzak A., Baer-Dubowska W., *Markery epigenetyczne w diagnostyce: Metody oceny metylacji DNA*, „Journal of Laboratory Diagnostics” 2009, t. 45, nr 2, s. 167-173.
22. Mather K.A., Jorm A.F., Parslow R.A., Christensen H., *Is Telomere Length a Biomarker of Aging? A Review*, "Journal of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences" 2011 February, nr 66A(2), s. 202–213, DOI:10.1093/gerona/glq180.
23. Meissner C., Ritz-Timme S., *Molecular pathology and age estimation*, "Forensic Science International" 2010, nr 203, s. 34-43.
24. Park J.L. i inni, *Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use*, "Forensic Science International: Genetics" 2016, nr 23, s. 64-70.
25. Romanowski T., Markiewicz A., Bednarz N., Bielawski K.P., *Geny metabolizmu podstawowego jako geny referencyjne w ilościowym oznaczaniu ekspresji genów metodą real-time PCR*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2007, nr 61, s. 500-510 (online).
26. Sawicki W., Malejczyk J., Wróblewska M., *Starzenie: mechanizmy epigenetyczne i genetyczne*, „Gerontologia Polska” 2015, nr 2, s. 47-00.
27. Soares Bispo D., Silva S., Antunes J., Balamurugan K., Duncan G., Sampaio Alho C., McCord B., *Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging*, "Electrophoresis" 2015, nr 36, s. 1775-1780.
28. Tokarz P., Błasiak J., *Znaczenie metylacji DNA profile epigenetycznego komórek jelita grubego w ich transformacji nowotworowej*, „Postępy Biochemii” 2013, nr 59 (3), s. 267-279.
29. Warwas M., Piwowar A., Kopiec G., *Zaawansowane produkty glikacji (AGE) w organizmie – powstawanie, losy, interakcja z receptorami i jej następstwa*, „Farmakologia Polska” 2010, nr 66(8), s. 585-590.
30. Weidner C.I. i inni, *Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites*, "Genome Biology" 2014, nr 15, R24.
31. Wysoczańska B., *Kolista cząsteczka DNA-TREC jako marker prawidłowej funkcji grasicy*, „Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej” 2008, nr 62, s. 708-724 (online).
32. Young Lee H. i inni, *Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study*, "Forensic Science International: Genetics" 2015, nr 19, s. 28-34.
33. Zbieć-Piekarska R. i inni, *Use of Methylation Markers for Age Estimation of an Unknown Individual Based on Biological Traces*, © 2016 QIAGEN Application Note <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=378b6f14-e6d9-4acc-8f8a-83b324a7f0ba&lang=en>.
34. Zbieć-Piekarska R., Spólnicka M., Kupiec T., Parys-Proszek A., Makowska Ż., Pałeczka A., Kucharczyk K., Płoski R., Branicki W., *Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis*, "Forensic Science International: Genetics" 2015, nr 17, s. 173-179.
35. Zubakov D. i inni, *Estimating human age from T-cell DNA rearrangements*, "Current Biology" 2010, Nov. 23; nr 20(22), R970-1, DOI: 10.1016/j.cub.2010.10.022.
36. Zubakov D. i inni, *Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length*, "Forensic Science International: Genetics" 2016, nr 24, s. 33-43.
37. Zubakov D., *Predicting Human Age from DNA Rearrangements*, "Mater Methods" 2011; nr 1, s. 35.