



THE ROLE OF FLOW CYTOMETRY IN FORENSIC INVESTIGATION: A REVIEW

Sachil KUMAR¹, Tulsidas R. BAGGI²

¹ *Amity Institute of Forensic Sciences, Amity University, Noida, Uttar Pradesh India*

² *Central Forensic Science Laboratory, Ministry of Home Affairs, Govt. of India, Ramanthapur, Hyderabad, India*

Abstract

Flow cytometry is a laser-based technique that analyses single cells or particles suspended in a buffered salt-based solution. It has applications in multiple areas, including cancer biology, molecular biology, virology, immunology, and infectious disease monitoring. In forensic investigations, flow cytometry has been employed to analyse a variety of samples. Flow cytometry has indeed found significant applications in forensic science, particularly in determining the post-mortem interval (PMI), investigating sexual assault cases and analyzing 'touch DNA' for identifying perpetrators. This review is an overview of how flow cytometry has been utilized in these areas, based on studies from 1999 to 2021. Articles were retrieved using academic search systems such as Google Scholar, PubMed, MEDLINE, Scopus, and Science Direct, using keywords such as flow cytometry, forensic pathology, forensic medicine, sexual assault, touch DNA, post-mortem interval, PMI, and forensic science. A total of 86 publications were assessed, of which 52 met our criteria. Many studies have explored the use of flow cytometry for PMI estimation and perpetrator identification in sexual assault cases. Flow cytometry is particularly beneficial for accurate and non-destructive assessment of touch DNA samples that are processed simultaneously with routine casework procedures for DNA analysis. Flow cytometry is useful in forensic pathology when other techniques fail, because it detects various common genetic abnormalities in dead cells and tissues. In summary, flow cytometry is a superior alternative to other methods because it offers rapid analysis, high sensitivity, and ease of use. These benefits make it an invaluable tool in research and clinical settings, providing efficient and accurate cell analysis that can significantly enhance both diagnostic and therapeutic processes.

Keywords

Flow cytometry; Touch DNA; Forensic sciences; Sexual assault; Post-mortem interval; Species identification.

Received 29 April 2024; accepted 20 August 2024

Introduction

Forensic technology is constantly evolving to more effectively address criminal incidents. This evolution enables greater protection of innocent people and prosecution of perpetrators, instilling confidence to law enforcement agencies, the criminal justice system, and society. Technological advances and new discoveries have expanded the toolkit available to forensic scientists [53].

Flow cytometry is a robust analytical technique that has established a significant niche as an emerging forensic tool [1, 2]. The three main systems of the flow cytometer are fluidics, optics, and electronics. The laminar flow sheath principle is the primary working principle. Flow cytometry investigates individual cells or particles by passing them through one or more lasers while they are suspended in a solution containing buffered salts. Each particle undergoes analysis to determine its visible light dispersion and one or more

fluorescence properties. The quantification of visible light scatter involves two unique orientations: forward scatter (FSC), which indicates the relative size of the cell, and side scatter (SSC), which discloses the internal complexity or granularity of the cell [8]. Fluorescence has no impact on the scattering of light. Fluorescence measurement samples are generated by introducing and activating fluorescent proteins (such as green fluorescent protein, GFP), the application of fluorescent dyes (such as propidium iodide for DNA staining), or the use of antibodies linked to fluorescent molecules (such as CD3 FITC; Fig. 1). Tens of thousands of cells can be analysed quickly, and the data is processed by a computer.

Flow cytometry offers significant benefits over histology and immunohistochemistry, including precision in estimating antigen levels and the ability to stain individual cells with multiple antibodies and fluorophores. It has a wide range of applications in cellular and molecular biology. The main advantages of flow cytometry are its potential to measure and analyse a 'large' number of parameters (2–30 or even more) on the same sample, as well as its ability to gather data from millions of cells in a fraction of minutes [3]. The use of flow cytometry in clinical laboratories has become popular over the last decade.

Flow cytometry has been used in several experiments to analyse a wide variety of samples for forensic applications [4, 5, 6, 7]. This study provides a comprehensive review of recent developments in forensic techniques related to post-mortem interval (PMI) estimation, sexual assault analysis and the use of touch DNA analysis.

Methodology

To minimize bias, a comprehensive literature search and an objective assessment of the retrieved papers were carried out by two independent researchers. A search was conducted in the Google Scholar, PubMed, MEDLINE, Scopus, and Science Direct databases until 2021.

The search keywords included in various combinations were flow cytometry, forensic pathology, forensic medicine, sexual assault, touch DNA, post-mortem interval (PMI), and forensic science. The data were extracted by one reviewer and validated by another reviewer. This systematic review critically appraised 52 relevant studies (Figure 2).

Forensic applications of flow cytometry

Application of flow cytometry in determination of PMI (Table 1)

The accurate determination of the PMI is one of the most discussed and complex issues in forensic medicine. Different methods for estimating the PMI have been used and standardized over time [8, 9, 10, 11, 54]. These approaches have significant inaccuracies and shortcomings in their implementation. Recently, a wide range of experimental methods have been investigated to correctly determine the PMI. In reality, an accurate assessment of the PMI requires the use of a parameter that shows a continuous and proportional linear relationship with the time of death (TOD) [12].

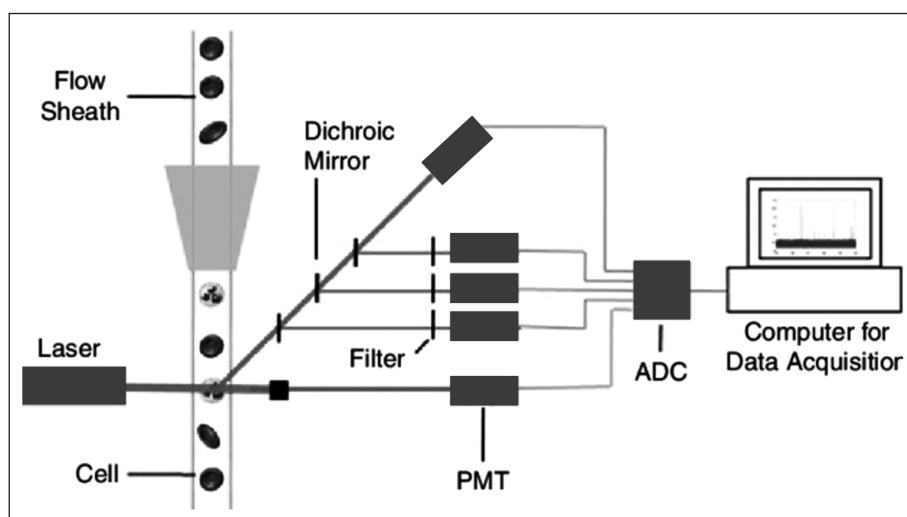


Figure 1. Schematic diagram of flow cytometry.

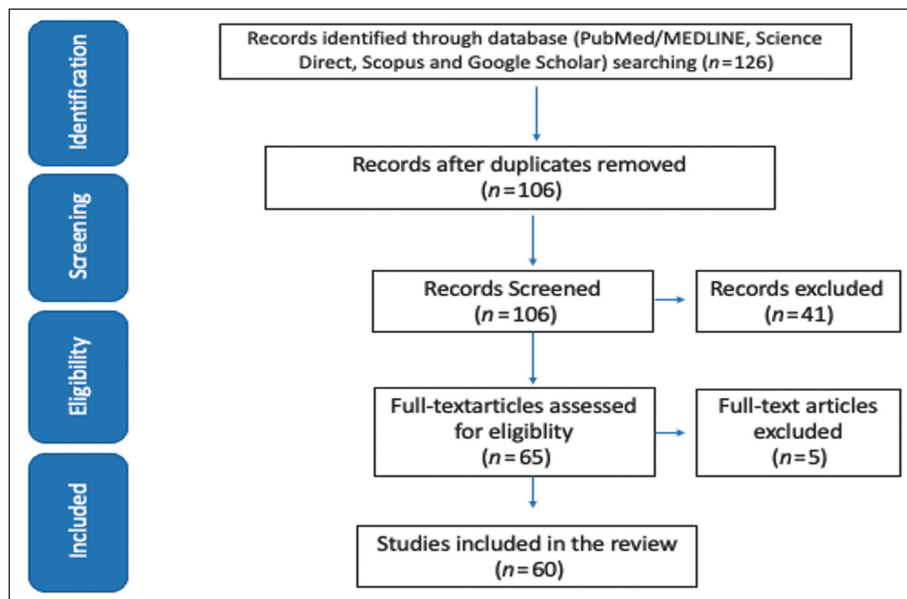


Figure 2. Flow diagram for the method used for web search.

Table 1
Flow cytometry and post-mortem interval (PMI) at different points

Authors [Reference]	Tissues and organs/ sample source	Time frame assessed	Remarks
Fengying et al., 1988 [14]	Heart, liver, kidney (rats)	–	Quantitative determination of cell DNA in the tissues, may provide an objective and reliable approach for the estimation of PMI
Di Nunno et al., 199 [17]	Spleens	60–72 h	–
Chengyi et al., 2002 [21]	Spleens	4–40 h	DNA degradation (human spleen) linked to PMI
Di Nunno et al., 2002 [18]	Liver and spleen/ human	24–65 h	Hepatic tissue showed a linear correlation between the PMI and the level of DNA degradation
Boy et al., 2003 [12]	Teeth/human	24–144 h	Dental pulp tissue exhibited minimal DNA degradation by 144 h post-extraction, and no constant relation was found between time and DNA degradation
Liu et al., 2004 [19]	Heart, liver, spleen and kidney/rat	–	DNA amount of all the viscera showed a decreased trend after death, especially in spleen
Long et al., 2005 [25]	Rib and teeth/human	0–15 d	DNA content was degraded with the prolongation of PMI
Chen et al., 2005 [16]	Heart, liver, spleen and kidney/human	–	DNA and human tissue degradation shows a well relationship with PMI, particularly in the spleen
Aglan et al., 2014 [23]	Liver and spleen/ human	–	Histogram showed a progressive denaturation of the DNA molecule of splenic or liver samples, increased from the first to the third day after death, then denaturation was accelerated after that time, and histograms tended to overlap showing this massive denaturation of DNA, and there was no relation between weight or size of the spleen and DNA denaturation and thus it is considered a reliable method for detecting early PMI
Williams et al., 2015 [22]	Brain and spleen/ human	17–60 h	DNA degradation was more rapid in samples stored at RT as compared with refrigerated ones. Brain showed slower DNA decay than spleen
Corderio et al., 2015 [27]	Vitreous humor/ human	–	Quantifies blood contamination and is able to detect erythrocytes in 1 : 750,000 dilution of contaminated VH which affects the results of hypoxanthine
Shaari et al., 2016 [29]	Hepatic tissue	–	Hepatic tissue autolysis is a good indicator of PMI (dogs)
Tome, 2017 [28]	Vitreous humor and cerebrospinal fluid	–	Cellular death progression (VH and CSF) can be an important strategy to estimate the PMI

The application of flow cytometry is an evolving approach that can prove its utility in the assessment of PMI. Immediately after death, decay of the DNA is initiated, which leads to damage of inter- and intramolecular crosslinking, strand fragmentation onsets, and variation in nucleotide composition [13]. For the first time, Fengying et al. (1988) employed flow cytometry to measure the DNA content in the rat kidney, heart, and liver at various PMIs [14]. The findings showed that, compared to zero hours, the mean cellular DNA content was 99.5% at 6 h, 91.3% at 12 h, 87.1% at 18 h, 81.3% at 24 h, 76.7% at 30 h, 74.3% at 36 h, and 72.3% at 48 h. These findings indicate that quantitative determination of cellular DNA content in tissues may be used as an accurate method for estimating PMI [14].

DNA degradation varies with temperature, as it affects autolytic and metabolic activities [15]. Chen et al. (2005) examined DNA degradation in different body tissues and found that the amount of human DNA in kidney, liver, and heart degraded rapidly in the first 6 hours after death, although the spleen showed a better relationship between PMI and DNA degradation. Their findings were confirmed by flow cytometry, and they concluded that DNA degradation in human tissues is significantly associated with PMI, particularly in the spleen [16]. Di Nunno et al. (1999) proved that flow cytometry is easy to use and may be utilized to refine PMI in homicide/suicide cases [17]. In a subsequent article published in 2002 [18], the same research team compared data on DNA degradation in spleen tissue with that in peripheral blood and liver ($n = 25$; cause and TOD were known to be between 24 and 65 h) to determine which cells could be easily collected and preserved during death investigations for subsequent cytofluorometric analysis to assist in determining TOD. Hepatocyte DNA degradation is more strongly associated with the time since death than DNA degradation in peripheral blood or spleen tissues. Liu et al. (2004) corroborated previous findings by applying cytofluorometric techniques to investigate the law of variation of DNA concentration at different PMIs in a variety of tissue samples (kidney, spleen, liver, and heart). All visceral tissues, but especially the spleen, showed a decreasing trend in DNA content [19].

Chengyi et al. (2002) reported that after death, the degradation of the nuclear DNA of lymphocyte in human spleen was clearly related to PMI [21]. Five cadavers with a known time of death were selected. The spleens were isolated, covered with moistened fabric, and sampled every 4–7 hours over a period of 40 hours. Cell suspensions were prepared, digested with RNase, stained with PI, and analysed using

fluorescence-activated cell sorting (FACS) with flow cytometry.

Williams et al. (2015) used flow cytometry to determine the effect of temperature on the rate of cellular degradation. Human spleen and brain tissues ($n = 15$) were collected and examined for over 96 h at 4°C and 21°C, mimicking winter and summer conditions [22]. It was found that the DNA degradation rate of the brain cells was considerably slower than that of the spleen cells. DNA fragmentation was greater in samples stored at room temperature than in those stored in the refrigerator after 48 h. As a result, the brain has been recognized as an acceptable substitute organ that does not deteriorate as quickly as the spleen, but cannot be used in cases of drowning or direct head trauma.

Aglan et al. (2014) studied the relevance of flow cytometric techniques in calculation of PMI using 70 cases [23]. All cases were autopsied using conventional procedures, the liver and spleen were excised, weighed, and sections were prepared for flow cytometric measurements at 24 h intervals. The findings indicate that histograms obtained from the samples showed a progressive degradation of spleen or liver DNA samples, increasing from the first to the third day after death, then the degradation accelerated, histograms tended to overlap, showing massive DNA degradation, and that there was no relation between weight or size of the spleen and DNA degradation, indicating that it runs a relatively fixed course regardless of other parameters; thus, it is considered a reliable method for detecting early PMI.

Several academic researchers have begun to examine dental pulp tissue to determine PMI [12]. The surrounding hard dental tissue protects the pulp cavity and its cellular content from bacterial invasion and decomposition [24]. For the first time, Boy et al. [12] employed flow cytometry to examine the usefulness of dental pulp tissue for estimating PMI. Pulp tissue was removed from the third molars ($n = 57$) at 24, 48, 72, 96, 120, and 144 hours after tooth extraction. Participants were aged between 15 and 30 years. Since consistent correlation between time and DNA deterioration was observed within the first 144 h after extraction, they concluded that pulp tissue was ineffective in detecting early PMI, but it may be a promising substrate in the later phases. In contrast to Boy's study [12], Long et al. [25] reported that the PMI and average DNA content were significantly correlated in human dental pulp and costal cartilage cells that were held at different ambient temperatures (30–35°C, 15–20°C) for long periods (up to 15 days). As a result, they established the reliability of dental pulp tissue for

late PMI calculations. They also discovered a 0–4 day plateau phase for dental pulp cells at 15–20°C.

Vitreous humor (VH) has also been frequently used to calculate PMI because it is topographically isolated and highly protected, leading to a delayed process known as autolysis. PMI was calculated using the potassium content in the VH [26]. However, contamination in VH may have influenced the findings. Corderio et al. (2015) used flow cytometry to detect and eliminate blood contamination in the VH. They reported that even at a dilution of 1 : 750,000 in the contaminated VH, flow cytometry could detect erythrocytes [27].

Tome (2017) employed flow cytometry to evaluate the cellular viability, necrosis or apoptotic state of cells in cerebrospinal fluid (CSF) and VH obtained from corpses (human) to correlate them with the PMI [28]. CSF has a much higher cell count than VH. As a result, the CSF appears to be a more suitable biological matrix for the intended function. In the CSF samples, cellular density (number of cells) showed an increasing trend with increasing PMI. In addition, for viable cells, there was a tendency for increasing values (from 5.78% to 88.04%) with increasing PMI for CSF. Other test parameters (i.e., cells of interest, cellular debris, and percentage of cells in necrosis or apoptosis) showed contradictory findings. This preliminary analysis revealed that studying the progression of cell death in the CSF and VH can be an effective method for determining PMI.

Shaari et al. (2016) aimed to correlate hepatic tissue necrosis with PMI in dogs for use in forensic application. Hepatic tissues from three ($n = 3$) female dogs were sampled at 6 h intervals up to 18 h post-mortem, to assess the rate of autolysis during this period. Propidium iodide staining was used to filter dead cells from live cells by flow cytometry. The results, analysed by descriptive statistics in percentages and coefficients, summarily showed a strong positive linear correlation ($R^2 = 0.98$) between post-mortem hepatic tissue autolysis and post-mortem interval in dogs [29].

Application of flow cytometry in sexual assault cases

Sex crime investigation necessitates the involvement of a multidisciplinary approach of forensic specialists who specialize in the identification, collection, packaging, and analysis of evidentiary material [30].

In cases of sexual assault, techniques such as preferential lysis and density gradient centrifugation [31, 32] are utilized to separate and identify sperm cells from the vaginal fluid wash. Resistance of cells to

proteolytic digestion was used in the preferential lysis technique. Unfortunately, these techniques involve several steps that may result in contamination and sperm cell loss. If there are few sperm cells and many vaginal cells, sperm identification becomes more difficult.

Additional methods have been developed, to separate sperm cells from epithelial cells (EPs) based on differences in shape and size to obtain individual genotypes. Low-volume polymerase chain reaction (LV-PCR) is another innovative cell separation approach used to isolate and detect individual sperm cells. It is based on immunolabeling, microfluidic devices, aspiration capillaries, the mDip approach, and fluorescence-activated cell sorting (FACS) with flow cytometry and is only relevant for fresh vaginal swabs (or lavages), not smears or archival material [33].

To distinguish between vaginal and sperm cells, Schoell et al. (1999) suggested utilising cell sorting with flow cytometry, since it is effective even in the presence of minute amounts of sperm. Using this method, six thousand spermatocytes were separated from one million vaginal cells [34]. Di Nunno et al. (2003) examined the efficiency of flow cytometry in distinguishing haploid sperm cells from diploid vaginal cells using propidium iodide (PI) staining. Vaginal wash samples were collected from 20 women with no sexual experience in the past 1 week and sperm samples from 20 healthy males. The samples were then combined with varying aliquots of sperm with the vaginal wash to replicate a genuine scenario, and samples were analysed for flow cytometry data for cells with and without PI staining [35]. Flow cytometry readings revealed a morphology-based area with the highest likelihood of identifying sperm cells in the case of sexual assault, which can be used to identify and segregate accused individual [35].

Grosjean and Castella (2015) developed a novel and time-efficient approach for recovering and separating cells from swabs (cotton) and other substrates. In this method, magnetic beads coupled with antibodies specific to the CD52 sperm antigen and using appropriate magnetic columns, allow the recovery of the sperm fraction from the semen of the alleged perpetrator and the non-sperm fraction from the victim [36].

This method was tested on fresh and six-month-old fake vaginal samples mixed with sperm dilutions in buccal swabs, resulting in entire single DNA profiles of the sperm and epithelial cell donors for the sperm and non-sperm fractions, respectively. Epithelial cell donor DNA profiles were processed in parallel for confirmation [36].

Xu et al. (2016) used fluorescence-activated cell sorting (FACS) and magnetic-activated cell sorting (MACS) to isolate spermatozoa from a single donor from samples containing a mixture of spermatozoa and vaginal epithelial cells from several donors.

Magnetic-activated cell sorting (MACS) was used to isolate sperm from a vaginal swab using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated A-kinase anchor protein-3 (AKAP-3) antibody. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to distinguish target individual sperm cells from different donors using FITC-conjugated blood group A/B antigen antibody. Full STR profiles of the individual donors were effectively generated from EPs/sperm cells and sperm mixtures from two donors [37].

Urey et al. (2021) developed a levitational cell cytometry technique for differential extraction of cells in a biological sample and spatiotemporal separation of EPs and sperm cells by leveraging differences in the density and paramagnetic medium. This method augments the precise sorting of sperm at low concentrations (100 sperms per sample) in 30 μ L sample volumes with a reduced differential extraction time from 8 h to 20 min, resulting in unprecedented sperm detection and sorting proficiency, which are not feasible with other possible methods [38].

DeCorte (2022) developed a new forensic signature system to increase the probative value of DNA profiles generated from specific types of sexual assault evidence samples: cellular mixtures resulting from digital penetration, consisting of trace hand epidermal cells and vaginal cells, and from mouth-to-skin contact, consisting of trace hand epidermal cells and cellular components of saliva (i.e., buccal cells) [56]. Cells were characterized using imaging flow cytometry (IFC) and then analyzed utilizing data imaging and statistical analysis tools. The obtained data was utilized to develop cell filters inside the data imaging program, resulting in a way for successfully filter out all hand cells and potentially identifying a vaginal cell signature. The cells filtered by the image analysis filter were then run through a series of discriminant function tests to boost classification and to predict group membership of unknown cells from fake forensic samples. The study's findings revealed that the great majority of these unknown cells were correctly categorized into the predicted category, with only a few exceptions. Furthermore, correct classifications were backed by strong posterior probability, which contrasted sharply with the posterior probabilities of misclassifying cells. These findings suggest that this technique may successfully discriminate between the cell populations under consideration, as well as identify potential false

positive misclassifications, and may provide a viable new way for front-end analysis prior to DNA profiling. The capacity to identify the components of a biological mixture prior to STR analysis increases effectiveness and reduces bias, which can frequently mislead activity-level results in trace mixture sample analysis.

Fokias et al. (2022) established a technique to select sperm from epithelial cells by combining the Sperm Hy-Liter™ labeling kit with FACS [58]. The sorted sperm cells are subsequently submitted to a direct lysis and low volume PCR (LV-PCR) procedure. Preliminary data show that both cell types can be successfully separated at sperm/epithelial cell ratios as high as 1 : 500. The direct lysis and LV-PCR protocols enable for the production of entire haploid profiles from single sperm cells and, in most cases, full diploid profiles from ten spermatozoa. These findings indicate that the suggested methodologies are possibly practical for forensic casework; nevertheless, further testing is necessary for validation.

Ingram and colleagues (2023) developed a new biological signature system that enhances the probative value of samples containing epidermal and vaginal cells, as seen in cases of digital penetration, based on morphological and autofluorescence properties [59]. Comparisons to reference cell populations from vaginal tissue and epidermal cells obtained from hands indicated considerable multivariate differences in >80 cellular parameters. These distinctions were utilized to develop a prediction framework for identifying unknown cell types as being derived from epithelial cells associated with digital penetration or epidermal tissue. As part of the categorization process, the posterior probability of each cell belonging to a given tissue category was calculated, as well as its multivariate resemblance to that tissue type. We evaluated this method on cell populations from reference tissues, as well as fake casework samples using hand swabs after digital vaginal penetration. Digital penetration hand swab samples had significantly more cells classified as non-epidermal tissue than control hand swabs. To reduce false positives, minimal interpretation thresholds were developed; these thresholds were also effective when screening licked hands, indicating the potential utility of this method for a variety of biological mixture types and depositional events relevant to forensic casework. Results showed that samples collected subsequent to digital penetration had significantly higher numbers of cells classified as vaginal tissue, as well as higher posterior probabilities.

Application of flow cytometry in touch DNA samples

The analysis of ‘touch’ (or cells from trace/touch mixes) is an important issue for forensic DNA case-work units. The interpretation of mixed STR (or short tandem repeat) DNA data from touched surfaces is a subjective procedure that requires a lot of time, lowers the probative value of the evidence, and has been heavily criticized for lacking scientific credibility [39]. Probabilistic genotyping can be used to perform complex mixture analyses. However, implementing the system requires cost and time as well as a huge task, including validation, legal clashes over proprietary software, difficulty in convincing the jury with probabilistic information [40], and the erroneous assessment of the number of contributors to a sample affects probabilistic results, as there are limits to the addition of the number of contributors that can be analysed [41]. There is still a substantial need for front-end approaches that can segregate cell populations from various contributors prior to DNA analysis, allowing for the creation of single-source STR profiles and/or the simplification of multi-contributor samples [42].

Microfluidics, micromanipulation, laser capture microdissection, and FACS are the existing methods used to isolate single cells from a mixture [43, 44, 45, 46]. These techniques apply either immunochemical or morphological variation between cells to effectively resolve mixtures containing multiple cell types (e.g., sperm-epithelial) [45, 47], blood-saliva [46], and mixtures of multiple individuals contributing to the same cell type [43].

Yet, limitations exist in the separation strategies on ‘touch’ mixture samples consisting of epidermal cells, possessing a different structural and biological properties from other forensically relevant cell types (e.g., white blood cells, buccal and vaginal cells).

Stanciu et al. investigated the contribution of different genetic and cellular components created by touch or contact in biological samples. The touch DNA samples were eluted from the collection swabs, which were taken from the objects held by an individual for 5 minutes. These samples were then analysed for epidermal cells, extracellular DNA, and DNA from pelleted cellular material. Individuals who had washed their hands immediately before handling the object and those who had not were distinguished. Around 84–100% of this DNA was extracellular and exhibited no relation with the detected epidermal cells. No extracellular or cell pellet-associated DNA was found between the subjects who washed their hands before object handling, and a notable number of epidermal

cells ($\sim 5 \times 10^3$ to $\sim 1 \times 10^5$) were recovered from these samples, indicating that other types of biological information may be available, even though no amplifiable genomic DNA is present. These findings indicate that touch samples and their associated factors form patterns of DNA transfer and persistence in forensic evidence [48].

Kwon et al. (2016) reported the results of antibody hybridization surveys utilizing cytokeratin probes and human leukocyte antigens, including surveys of optical characteristics of deposited cells, such as forward and side scatter, and fluorescence emission in the allophycocyanin channel. To investigate inter- and intra-contributor variability, all analyses were performed on ‘touch’ samples that were deposited immediately (e.g., ‘fresh samples’), as well as those collected up to 7 days following deposition [49].

Burrill et al. (2020) investigated the cellular content present in the rinses of unwashed and washed hands, nasal, saliva, and eye washes as potential sources of DNA transferred to hands. Size, granularity, and nucleic acid fluorescence data were determined using flow cytometry and microscopic examination. Although there was considerable disparities among donors, the cellular composition did not vary considerably within one person. Saliva contains DNA from positive populations of epithelial cells, other smaller cells, and debris. Hand rinses were nearly exclusively composed of anucleate corneocytes; many of these stained positive for nucleic acids, raising queries regarding previously assumed insignificant shed corneocyte DNA content [50].

Ingram et al. (2022) used epithelial cell morphology and autofluorescence to determine the period from DNA sample deposition. Individual cells were imaged using flow cytometry before being subjected to multivariate modeling and predictive categorization [55]. Epithelial cell populations are properly divided into three time-since-deposition groups: <1 week, 1 week to 2 months, and >2 months. Differences across age groups are mostly due to lower brightfield contrast and higher autofluorescence intensity. For forensic purposes, 47 donor cell populations were blindly categorized against the full data set, yielding classification accuracies of 95% for samples containing at least 75 cells and 97% for individual time periods (2 months). This shows that autofluorescence and morphological investigations might give useful information about the period after deposition of trace DNA samples.

In conclusion, while microscopic methods have their place, flow cytometry is generally considered superior for touch DNA analysis due to its sensitivity, precision, and efficiency. This makes it a preferred

choice in many forensic and research scenarios where touch DNA is involved.

Other applications of flow cytometry

Abortion diagnosis is a topic that occasionally comes up in medico-legal practice. It can be performed on the conceptus or on live or deceased women. The distinction between non-spontaneous and spontaneous abortion is critical [20]. In forensic medicine, spontaneous abortions are important because knowing the natural causes of abortion is necessary to rule out illegal interruption of pregnancy. Dating burn injuries in humans remains a challenge in forensic medicine. T lymphocytes play a fundamental role in the healing process of burn injuries. Elgazzar et al. (2021) characterized time-dependent changes in T-cytotoxic lymphocytes (CD8+) and T-helper lymphocytes (CD4+) in human blood following thermal injury and to elucidate their accuracy in dating dry burn injuries by flow cytometry [51].

The ABO blood group system is vital not only for organ transplantation and transfusion, but also for identifying an individual in forensic investigations. The hemagglutination test is the commonly used method for detecting ABO antigens. However, it has severe limitations, including the inability to quantify ABO antigens on red blood cells (RBCs) and the inability to properly determine ABO blood type in normal individuals or subgroups. Aki et al. devised two analytical techniques for ABO phenotyping and genotyping based on PCR amplification of particular alleles (PASA) and flow cytometry. Flow cytometry analysis can quantify A, B, and H antigens on RBCs, and the PASA method allows rapid detection of several single nucleotide polymorphism (SNPs) sites on the ABO gene. These techniques are simple and effective for ABO blood group system determination and genotyping, and are frequently utilized in clinical and forensic laboratories [52].

Gentry et al. (2023) investigated whether morphological and autofluorescence measurements of forensically-relevant cell populations generated by IFC can be used to predict the TSD of 'touch' or trace biological samples [57]. To this end, three different prediction frameworks for estimating the number of days of TSD were evaluated: the elastic net, gradient boosting machines (GBM), and generalized linear mixed model (GLMM) LASSO. Additionally, we transformed these continuous predictions into a series of binary classifiers to evaluate the potential utility for forensic casework. Results showed that GBM and GLMM-LASSO showed the highest accuracy, with mean absolute error

estimates in a hold-out test set of 29 and 21 days, respectively. Binary classifiers for these models correctly binned 94–96% and 98–99% of the age estimates as over/under 7 or 180 days, respectively. This suggests that predicted TSD using IFC measurements coupled with one or possibly a combination of binary classification decision rules, may provide probative information for trace biological samples encountered in forensic casework.

Tewari et al. (2023) [60] detected body fluids (blood, saliva, and urine) based on specific protein biomarkers using cytometric bead array flow cytometry. Samples were collected from 10 healthy donors, selected through stratified sampling from Prayagraj after written consent and subjected to cytometric bead array flow cytometry for the detection of specific body fluid biomarkers. Body fluids were analyzed by calculating median fluorescence intensities for selected biomarkers in body fluid combinations. MFI values of specific biomarkers in pure body fluid samples ranges between 90–150 and in binary mixtures of body fluids (1 : 1 ratio), ranges between 80–130. In case of other proportions (ratios of 1 : 3, 1 : 5, 3 : 1, and 5 : 1) MFI values of biomarkers range between 40–80 and 100–240 for positive detections. However, MFI values below 20 were considered as negative detection for that biomarker. Flow cytometry successfully identifies the body fluids based on their biomarkers even in trace quantity or in mixed states. However, in mixed state conditions, the MFI for the body fluid in larger quantity was considerably large in contrast to the one which was present in traced amount

Limitations of flow cytometry

Flow cytometry is a very efficient method that can assess a large number of cells, reaching up to millions. Unfortunately, there are several drawbacks [8]. The sorting process has a sluggish pace; allowing the cells to move at a rapid rate could have negative consequences, while enhancing cell viability results in a reduction in the velocity of flow of the stream. A clear constraint of flow cytometry is its inability to evaluate cells that are not in a suspended state, such as those adhering to a medium or organized within a tissue. In order to make single-cell droplets, it is necessary to split all samples into cell suspensions. As a result, it is not possible to investigate cell-cell interactions.

Other constraints encompass the cytometer's capacity to induce harm to cells, hence impacting the analysis and subsequent cultivation during cell sorting, as well as the incapacity of single cell analysis to furnish data on tissue attributes.

Conclusions

The researchers found a significant correlation between PMI and DNA degradation with flow cytometry, but they also identified certain shortcomings. Due to the limitations in the cited studies, as well as the development of modern and more advanced DNA analysis techniques, flow cytometry is no longer a viable option for determining PMI.

Flow cytometry has been a significant part of the new techniques being developed for the investigation in sexual assault cases, as it has proven to be very effective in separating vaginal and sperm cells even if the quantity of sperm cells present in the sample is very low or even if the sample is very old, which has been a major shortfall of traditionally used methods. Hence, flow cytometry may be used to analyze vaginal wash fluid and identify and separate sperm cells for further genotyping and DNA profiling based on morphology.

In forensic investigations based on touch samples, the separation of multiple cell types from multiple contributors has always posed a significant challenge. Flow cytometry is beneficial for isolating cell populations from distinct contributors before DNA analysis, facilitating the creation of single-source STR profiles from multi-contributor samples.

Flow cytometry, in combination with microscopic examination, was utilized to detect the size, granularity, and nucleic acid fluorescence data from rinses obtained from unwashed and washed hands, nasal fluid, and saliva. Flow cytometry was able to generate cell information worthy of DNA profiling in all samples. This provides a way to develop new definitive techniques for forensic investigations based on touch samples, which has been a challenging area for investigators. Flow cytometry can also help forensic entomologists identify sex and speciation.

Several methodologies are used to determine the postmortem interval (PMI) using various biological, physical, and chemical indicators. However, most of them are not completely accurate. Flow cytometry is an emerging technology that is widely used for single cell analysis in the field of clinical pathology. It allows for the resolution of multiple fluorophores, enabling the use of additional fluorophores and extending immunophenotyping panels beyond 40. It also quantifies cellular autofluorescence as an independent parameter, improving the accuracy of detecting target-specific signals. However, panel design and intricate subset characterization require more skill and standardized techniques. Expanding the number of characteristics

could offer a more comprehensive understanding of immune cells and their subsets.

List of abbreviations

High molecular weight-DNA: HMW-DNA; magnetic-activated cell sorting: MACS; PCR amplification of specific alleles: PASA; fluorescent-activated cell sorting: FACS; low-volume polymerase chain reaction: LV-PCR; cerebrospinal fluid: CSF; post-mortem interval: PMI; epithelial cells: EPs; red blood cells: RBCs; short tandem repeat: STR, time of death: TOD; imaging flow cytometry: IFC.

References

1. Bakdash A, Kumar S, Gautam KA, Mishra VC. Use of flow cytometry in forensic medicine: current scenario and future prospects. *J Forensic Leg Med*. 2018 Nov 1;60:42-44.
2. Shukla RK. Forensic biotechnology: application of flow cytometry in legal medicine. *Int J Forensic Sci*. 2016;1:1-2.
3. O'donnell EA, Ernst DN, Hingorani R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. *Immune Netw*. 2013 Apr;13(2):43-54.
4. Philpott MK, Stanciu CE, Kwon YJ, Bustamante EE, Greenspoon SA, Ehrhardt CJ. Analysis of cellular autofluorescence in touch samples by flow cytometry: implications for front end separation of trace mixture evidence. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Jul;409(17):4167-4179.
5. Williams T, Soni S, White J, Can G, Javan GT. Evaluation of DNA degradation using flow cytometry: promising tool for postmortem interval determination. *Am J Forensic Med Pathol*. 2015 Jun 1;36(2):104-110.
6. González BR, Mercado MC, Salas OS, Reyes JC, Ramos MG, Esquivel ES, Aguilar GC, Torres PD, et al. Biological evidence analysis in cases of sexual assault. In: Boldura O-M, Balta C, Awwad NS, editors. *Biochemical analysis tools-methods for bio-molecules studies*. IntechOpen. 2019.
7. Schoell WM, Klintschar M, Mirhashemi R, Pertl B. Separation of sperm and vaginal cells with flow cytometry for DNA typing after sexual assault. *Obstet Gynecol*. 1999 Oct 1;94(4):623-627.
8. Shapiro HM. *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons; 2005.
9. Madea, B. Methods for determining time of death. *Forensic Sci Med Pathol*. 2016;12:451-485.
10. Kumar S, Verma AK. Estimation of postmortem interval using the data of insulin level in the cadaver's blood. *Data Brief*. 2016 Jun 1;7:354-356.

11. Kumar S, Singh P, Sandhu S. Indian forensic academic's contributions to postmortem interval determination: a review. *J Forensic Med Toxicol.* 2020;37(1):62-72.
12. Boy SC, Bernitz H; Van Heerden WF. Flow cytometric evaluation of postmortem pulp DNA degradation. *Am J Forensic Med Pathol.* 2003;24:123-127.
13. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 1993 Apr;362(6422):709-715.
14. Fengying QI, Shutang XU, Liu R, Zuo L, Guo J. Quantitative analysis of tissues cell DNA content in different postmortem interval. *Chinese Journal of Forensic Medicine.* 1988 Jan;1(4).
15. Tozzo P, Scrivano S, Sanavio M, Caenazzo L. The role of DNA degradation in the estimation of post-mortem interval: a systematic review of the current literature. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(10):3540.
16. Chen X, Shen YW, Gu YJ. The research of relationship between DNA degradation and postmortem interval. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2005;21(2):115-117.
17. Di Nunno N, Costantinides F, Melato M. Determination of the time of death in a homicide-suicide case using flow cytometry. *Am J Forensic Med Pathol.* 1999 Sep 1;20(3):228-231.
18. Di Nunno N, Costantinides F, Cina SJ, Rizzardi C, Di Nunno C, Melato M. What is the best sample for determining the early postmortem period by on-the-spot flow cytometry analysis? *Am J Forensic Med Pathol.* 2002;23:173-180.
19. Liu ZP, Chen X, She YW. Investigate the relationship between postmortem interval (PMI) and the metabolic law of the amount of DNA in cells of rat. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2004;20:68-69.
20. Alves C, Jenkins SM, Rapp A. Early pregnancy loss (spontaneous abortion). Treasure Island: StatPearls Publishing; 2023.
21. Chengyi W, Xuerong G, Liang R. The degradation of nuclear DNA of lymphocytes in human spleen as the PMI lasted. *Chinese Journal of Forensic Medicine.* 2002:04.
22. Williams T, Soni S, White J, Can G, Javan GT. Evaluation of DNA degradation using flow cytometry: promising tool for postmortem interval determination. *Am J Forensic Med Pathol.* 2015;36:104-110.
23. Aglan M, Khater M, El Saied MH. Flow cytometry in postmortem interval determination. *Asian Acad Manag J.* 2014;12(2):274-289.
24. Duy JB, Waterfield JD, Skinner MF. Isolation of tooth pulp cells for sex chromatin studies in experimental dehydrated and cremated remains. *Forensic Sci Int.* 1991;49:127-141.
25. Long R, Wang WP, Xiong P. Correlation between PMI and DNA degradation of costicartilage and dental pulp cells in human being. *Fa Yi Xue Za Zhi.* 2005;21:174-176.
26. Madea B, Herrmann N, Henbge C. Precision of estimating the time since death by vitreous potassium – comparison of two different equations. *Forensic Sci Int.* 1990 Jul 1;46(3):277-284.
27. Cordeiro C, Seoane R, Camba A, et al. The application of flow cytometry as a rapid and sensitive screening method to detect contamination of vitreous humor samples and avoid miscalculation of the postmortem interval. *J Forensic Sci.* 2015 Sep 1;60(5):1346-1349.
28. Tomé MCF. Estimation of postmortem interval based on cell death progression in biological fluids. Dissertation for the master degree in forensic sciences. Porto: Universidade do Porto; 2017.
29. Shaari RB, Bin Abu Daud NH, Okene IA, Mohamed Mustapha NB. Hepatic cytometry: an indicator of post-mortem interval in dogs. *International Medical Journal.* 2016 Dec 1;23(6).
30. González B, Mercado M, Salas O, Reyes J, Ramos M, Esquivel E, Aguilar G, Torres P, et al. Biological evidence analysis in cases of sexual assault. *Biochemical analysis tools-methods for bio-molecules studies.* Intech Open. 2020.
31. Chen MJ, Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod.* 1999 Mar 1;14(3):759-764.
32. Carson C, Garvin A, Gorman K. Automated processing of sexual assault cases using selective degradation. Final technical report. U.S. Department of Justice, National Institute of Justice; 2013.
33. Han JP, Yang F, Xu C, Wei YL, Zhao XC, Hu L, Ye J, Li CX. A new strategy for sperm isolation and STR typing from multi-donor sperm mixtures. *Forensic Sci Int Genet.* 2014 Nov 1;13:239-46.
34. Schoell WM, Klintschar M, Mirhashemi R, Pertl B. Separation of sperm and vaginal cells with flow cytometry for DNA typing after sexual assault. *Obstet Gynecol.* 1999 Oct 1;94(4):623-627.
35. Di Nunno N, Melato M, Vimercati A, et al. DNA identification of sperm cells collected and sorted by flow cytometry. *Am J Forensic Med Pathol.* 2003 Sep 1;24(3):254-270.
36. Grosjean F, Castella V. A new approach for the separation of spermatozoa from other cell types in forensically relevant samples. *Forensic Sci Int Genet.* 2015 Dec 1;5:e653-e655.
37. Xu Y, Xie J, Chen R, Cao Y, Ping Y, Xu Q, Hu W, Wu D, Gu L, Zhou H, Chen X. Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to separate spermatozoa involving plural contributors from biological mixtures for human identification. *Sci Rep.* 2016 Nov 18;6(1):1-2.
38. Urey DY, Chan HM, Durmus NG. Levitational cell cytometry for forensics. *Adv Biol.* 2021 Mar;5(3):2000441.
39. Report to the President: forensic science in criminal courts: ensuring scientific validity of feature comparison methods. Executive Office of the President, President's Council of Advisors on Science and Technology. 2016. Available from: https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/microsites/ostp/PCAST/pcast_forensic_science_report_final.pdf

40. Haned H, Benschop CC, Gill PD, Sijen T. Complex DNA mixture analysis in a forensic context: evaluating the probative value using a likelihood ratio model. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;16:17-25.
41. Coyle HM. Sources of computational error in probabilistic genotyping software used for DNA mixture interpretation. *Int Res J Comput Sci.* 2015;2(5):12-6.
42. Van Oorschot RA, Ballantyne KN, Mitchell RJ. Forensic trace DNA: a review. *Investig Genet.* 2010;1(1):14.
43. Dean L, Kwon YJ, Philpott MK, Stanciu CE, Seashols-Williams SJ, Dawson Cruz T, et al. Separation of uncompromised whole blood mixtures for single source STR profiling using fluorescently labeled human leukocyte antigen (HLA) probes and fluorescence activated cell sorting (FACS). *Forensic Sci Int Genet.* 2015;17:8-16.
44. Anslinger K, Bayer B, Mack B, Eisenmenger W. Sex-specific fluorescent labelling of cells for laser microdissection and DNA profiling. *Int J Legal Med.* 2007;121(1):54-6.
45. Horsman KM, Barker SL, Ferrance JP, Forrest KA, Koen KA, Landers JP. Separation of sperm and epithelial cells in a microfabricated device: potential application to forensic analysis of sexual assault evidence. *Anal Chem.* 2005;77(3):742-9.
46. Verdon TJ, Mitchell RJ, Chen W, Xiao K, van Oorschot RA. FACS separation of non-compromised forensically relevant biological mixtures. *Forensic Sci Int Genet.* 2015; 14:194-200.
47. Schoell WM, Klintschar M, Mirhashemi R, Strunk D, Giuliani A, Bogensberger G, et al. Separation of sperm and vaginal cells based on ploidy, MHC class I-, CD45-, and cytokeratin expression for enhancement of DNA typing after sexual assault. *Cytometry.* 1999;36(4):319-23.
48. Stanciu CE, Philpott MK, Kwon YJ, Bustamante EE, Ehrhardt CJ. Optical characterization of epidermal cells and their relationship to DNA recovery from touch samples. *F1000Research.* 2015;4.
49. Kwon YJ, Stanciu CE, Philpott MK, Ehrhardt CJ. Flow cytometry dataset for cells collected from touched surfaces. *F1000Research.* 2016;5.
50. Burrill J, Daniel B, Frascione N. Illuminating touch deposits through cellular characterization of hand rinses and body fluids with nucleic acid fluorescence. *Forensic Sci Int Genet.* 2020 May 1;46:102269.
51. Elgazzar F, Alsharkawy K, Elkholy R, Lashin H. Dating dry burn injury in human patients by flow cytometry of CD4+ and CD8+ T-cells in the blood. *Egypt J Forensic Sci Appl Toxicol.* 2021 Sep 1;21(3):61-73.
52. Aki K, Izumi A, Hosoi E. The evaluation of histo-blood group ABO typing by flow cytometric and PCR-amplification of specific alleles analyses and their application in clinical laboratories. *J Med Invest.* 2012;59(1, 2):143-151.
53. Byrne J, Marx G. Technological innovations in crime prevention and policing. A review of the research on implementation and impact. *Journal of Police Studies.* 2011 Jan 1;20(3):17-40.
54. Moitas B, Caldas IM, Sampaio-Maia B. Microbiology and postmortem interval: a systematic review. *Forensic Sci Med Pathol.* 2023 Oct 16:1-20.
55. Ingram S, Philpott MK, Ehrhardt CJ. Novel cellular signatures for determining time since deposition for trace DNA evidence. *Forensic Sci Int Genet.* 2022 Dec 1;8:268-70.
56. DeCorte AD. Classification and differentiation of forensically relevant cell populations using imaging flow cytometry. Dissertation for the master degree in forensic sciences. Virginia Commonwealth University; 2022.
57. Gentry AE, Ingram S, Philpott MK, Archer KJ, Ehrhardt CJ. Preliminary assessment of three quantitative approaches for estimating time-since-deposition from autofluorescence and morphological profiles of cell populations from forensic biological samples. *PLOS One.* 2023 Oct 12;18(10):e0292789.
58. Fokias K, Bekaert B. Separation of sperm and epithelial cells based on fluorescence-activated cell sorting. *Forensic Sci Int Genet.* 2022 Dec 1;8:239-241.
59. Ingram S, DeCorte A, Gentry AE, Philpott MK, Moldenhauer T, Stadler S, Steinberg C, Millman J, Ehrhardt CJ. Differentiation of vaginal cells from epidermal cells using morphological and autofluorescence properties: Implications for sexual assault casework involving digital penetration. *Forensic Sci Int Genet.* 2023 Sep 1;66:102909.
60. Tewari S, Mishra MK, Tripathi V, Saran V. Detection of forensically relevant body fluids using specific biomarkers through flow cytometry. *J Punjab Acad Forensic Med Toxicol.* 2023;23(1):87-92.

Corresponding author

Assoc. Prof. Dr. Sachil Kumar
Amity Institute of Forensic Sciences
Amity University
Noida, Uttar Pradesh, India
e-mail: skumar63@amity.edu

ROLA CYTOMETRII W BADANIACH KRYMINALISTYCZNYCH – PRZEGLĄD

Wprowadzenie

Ciągły postęp technologiczny w medycynie sądowej sprawia, że analiza przyczyn i okoliczności przestępstw jest coraz skuteczniejsza. Poprawia to bezpieczeństwo obywateli i pozwala sprawniej ścigać sprawców, zwiększając zaufanie ogółu społeczeństwa do organów ochrony porządku publicznego i systemu sprawiedliwości. Na rozwój technologiczny w medycynie sądowej znaczący wpływ ma pojawienie się nowych narzędzi analitycznych [53], takich jak cytometria przepływowowa, która jest rzetelną techniką o rosnącej popularności, wypełniającą istotną niszę w badaniach kryminalistycznych [1, 2]. Głównymi systemami cytometru przepływowego są układ płynów osłaniających, optyka i elektronika, a podstawą działania jest przepływ laminarny. Badania za pomocą cytometrii przepływowej polegają na naświetlaniu wiązkami laserowymi poszczególnych komórek lub cząstek zawieszonych w roztworze zawierającym sole buforowane. Dla każdej takiej komórki lub cząstki mierzy się rozpraszanie światła i wybrane właściwości fluorescencyjne. Rozpraszanie światła widzialnego jest kwantyfikowane na podstawie dwóch niepowtarzalnych orientacji: rozpraszania do przodu (*forward scatter*, FSC), które informuje o względnej wielkości komórki, oraz rozpraszania na boki (*side scatter*, SSC), które informuje o jej złożoności wewnętrznej i ziarnistości [8]. Fluorescencja nie wpływa na rozpraszanie światła. Próbkę do pomiaru fluorescencji otrzymuje się, wprowadzając i aktywując białka fluorescencyjne (np. białko zielonej fluorescencji – *green fluorescent protein*, GFP), stosując barwniki fluorescencyjne (np. jodek propidyny do barwienia DNA) lub używając przeciwciał połączonych z cząsteczkami fluorescencyjnymi (np. CD3 FITC; Ryc. 1). Technika ta pozwala szybko analizować dziesiątki tysięcy komórek, a otrzymane dane są przetwarzane komputerowo.

Cytometria przepływowowa ma istotne zalety w porównaniu do histologii i immunohistochemii, należy do nich precyzja szacowania poziomu antygenów i możliwość barwienia pojedynczych komórek różnymi antygenami i fluoroforami. Jest ona szeroko stosowana w biologii komórkowej i molekularnej, ponieważ daje możliwość pomiaru i analizy wielu parametrów (od 2 do 30, a nawet więcej) w tej samej próbce, a także zbierania danych z milionów komórek w ciągu niecałej minuty [3]. W ostatnim dziesięcioleciu w laboratoriach klinicznych popularność jej stosowania znacząco wzrosła.

Zastosowano ją w kilku doświadczeniach analizujących różnorodne próbki na potrzeby medycyny sądowej [4, 5, 6, 7]. Niniejsza praca stanowi szczegółowy przegląd

najnowszych postępów w technikach kryminalistycznych związanych z szacowaniem czasu, jaki upłynął od zgonu (*post-mortem interval*, PMI), badaniem przypadków napaści na tle seksualnym i analizą DNA pozostawionego na miejscu przestępstwa (DNA dotykowego).

Metodologia

Szczegółowy przegląd literatury i obiektywna ocena wybranych publikacji zostały przeprowadzone przez dwóch niezależnych badaczy. Ich praca polegała na przeszukiwaniu danych opublikowanych do roku 2021, znajdujących się w bazach Google Scholar, PubMed, MEDLINE, Scopus i Science Direct.

Wyszukiwane słowa kluczowe obejmowały różne kombinacje cytometrii przepływowej (*flow cytometry*), patologii kryminalistycznej (*forensic pathology*), medycyny sądowej (*forensic medicine*), napaści na tle seksualnym (*sexual assault*), DNA dotykowego (*touch DNA*), czasu upływającego od zgonu (*postmortem interval*, PMI) i kryminalistyki (*forensic science*). Jeden badacz pozyskiwał dane, a drugi je zatwierdzał. Łącznie analizie krytycznej poddano 52 związane z tematem prace (Ryc. 2).

Zastosowania cytometrii przepływowej w kryminalistyce

Zastosowanie cytometrii przepływowej do ustalania PMI (Tabela 1)

Trafne ustalenie PMI to jeden z najczęściej omawianych i skomplikowanych problemów w kryminalistyce. Z biegiem czasu wdrożono i ustandaryzowano różne metody szacowania tego parametru [8, 9, 10, 11, 54], ich stosowanie wiąże się jednak z poważną niedokładnością i innymi wadami. Niedawno sprawdzono wiele metod doświadczalnych pod kątem dokładności uzyskiwanego za ich pomocą PMI. W praktyce do dokładnego pomiaru PMI jest potrzebny parametr odzwierciedlający ciągłą i proporcjonalną zależność liniową z czasem zgonu [12].

Cytometria przepływowowa to nieustannie rozwijające się narzędzie do ustalania PMI o dużym potencjale. Natychmiast po śmierci zaczyna się rozkład DNA, prowadzi on do uszkodzenia sieciowania między- i wewnątrzcząsteczkowego, fragmentacji nici i zmian w składzie nukleotydów [13]. Cytometrię przepływową po raz

pierwszy zastosowano w takim celu do pomiaru zawartości DNA w nerkach, sercu i wątrobie szczura. Fengying i in. w swojej pracy [14] stwierdzili, że w porównaniu do stanu wyjściowego średnia zawartość DNA komórkowego wynosiła 99,5% po 6 h, 91,3% po 12 h, 87,1% po 18 h, 81,3% po 24 h, 76,7% po 30 h, 74,3% po 36 h i 72,3% po 48 h. Wyniki te pokazują, że pomiar ilościowy zawartości DNA komórkowego w tkankach jest dokładną metodą ustalania PMI [14].

Tempo rozkładu DNA zależy od temperatury, ponieważ wpływa ona na procesy autolityczne i metaboliczne [15]. Chen i in. (2005) badali rozkład DNA w różnych tkankach ludzkich. Zauważyli, że zawartość DNA w nerkach, wątrobie i sercu gwałtownie zmniejszała się przez pierwsze 6 h po zgonie, przy czym śledziona wykazywała silniejszą zależność pomiędzy PMI a rozkładem DNA. Chen i in. potwierdzili uzyskane wyniki za pomocą cytometrii przepływowej, dochodząc do wniosku, że rozkład DNA w tkankach ludzkich, a zwłaszcza w śledzionie, wiąże się istotnie z PMI [16]. Di Nunno i in. (1999) udowodnili, że cytometria przepływowa stanowi prostą w użyciu metodę wpływającą na poprawę dokładności oceny PMI w przypadkach zabójstwa i samobójstwa [17]. Ten sam zespół w innym badaniu z 2002 roku [18] porównywał dane dotyczące rozkładu DNA w tkance śledziona z danymi dotyczącymi rozkładu DNA we krwi obwodowej i wątrobie ($n = 25$; przyczyna i czas zgonu wynosiły od 24 do 65 h), aby określić, które komórki można łatwo pobrać po zgonie i zachować do późniejszej analizy cytofluorometrycznej, ustalając w ten sposób czas zgonu. Rozkład DNA hepatocytów silniej wiąże się z PMI niż rozkład DNA we krwi obwodowej lub tkance śledziona. Liu i in. (2004) potwierdzili wcześniejsze obserwacje, badając za pomocą metody cytofluorometrycznej zasadę zmienności stężenia DNA w zależności od PMI w próbkach różnorodnych tkanek (nerka, śledziona, wątroby i serca). Wszystkie tkanki organów wewnętrznych, szczególnie tkanki śledziona, wykazywały tendencję do spadku zawartości DNA [19].

Chengyi i in. (2002) podają, że pośmiertny rozkład DNA jądrowego w limfocytach ludzkiej śledziona ma wyraźny związek z PMI [21]. W prowadzonych przez nich badaniach wybrano ciała pięciu osób o znanym czasie zgonu, wyodrębniono z nich śledziona, które przykryto wilgotną tkaniną, a następnie przez 40 godzin pobierano z nich próbki co 4–7 godzin. Sporządzono zawiesiny komórek, strawiono je RNazą, wybarwiono PI i zanalizowano przy użyciu sortowania komórek aktywowanego fluorescencją (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) z cytometrią przepływową.

Williams i in. (2015) za pomocą cytometrii przepływowej ocenili wpływ temperatury na tempo rozkładu komórkowego. Pobrane tkanki ludzkiej śledziona i ludzkiego mózgu ($n = 15$) badano przez 96 h w temperaturze 4°C i 21°C, symulując w ten sposób warunki zimowe

i letnie [22]. Okazało się, że rozkład DNA w komórkach mózgu zachodził znacznie wolniej niż w komórkach śledziona. Fragmentacja DNA w próbkach przechowywanych w temperaturze otoczenia była wyższa po 48 h od fragmentacji w próbkach przechowywanych w lodówce. Mózg został więc uznany za dobry zamiennik śledziona w takich analizach z uwagi na wolniejsze tempo rozkładu; jednak z wykluczeniem przypadków utonięcia lub bezpośredniego urazu głowy.

Aglan i in. (2014) badali skuteczność cytometrii przepływowej w obliczaniu PMI na podstawie analizy 70 przypadków [23] – po standardowych sekcjach zwłok każdorazowo wycięto i zważono wątrobę i śledzionę, a następnie sporządzono ich wycinki służące do pomiarów za pomocą cytometrii przepływowej co 24 h. Na uzyskanych w badaniu histogramach widoczny był postępujący rozkład próbek DNA pochodzących z tych organów, wzrastał on w okresie od pierwszego do trzeciego dnia po zgonie. Następnie rozkład przyspieszał, a histogramy zaczęły nakładać się na siebie, co wskazywało na intensywny rozkład DNA oraz przeczyło istnieniu związku pomiędzy wagą i wielkością śledziona a rozkładem DNA. Rozkład DNA był więc procesem względnie stałym, niezależnym od innych parametrów, i stanowił tym samym wiarygodną metodę oceny wczesnego PMI.

Kilkoro naukowców podjęło badania nad tkanką miążgi zęba w celu ustalenia PMI [12]. Otaczająca miążgę twarda jego tkanka chroni jamę miążgi i zawarte w niej komórki przed bakteriami i rozkładem [24]. Boy i in. [12] po raz pierwszy zastosowali cytometrię przepływową, aby zbadać użyteczność tkanki miążgi zęba do szacowania PMI. Tkankę tę pobrano z trzecich zębów trzonowych osób w wieku od 15 do 30 lat ($n = 57$) 24, 48, 72, 96, 120 oraz 144 h po ekstrakcji zęba. Ponieważ zaobserwowano spójną korelację pomiędzy czasem a rozkładem DNA w pierwszych 144 h po ekstrakcji, autorzy doszli do wniosku, że o ile analiza tkanki zęba nie była skutecznym sposobem oceny wczesnego PMI, o tyle była ona obiecująca w odniesieniu do późniejszych stadiów. W odróżnieniu od Boya i in. [12], Long i in. w swojej pracy [25] zaobserwowali istotną korelację pomiędzy PMI a średnią zawartością DNA w tkankach miążgi zęba i komórkach chrząstki żebrowej przechowywanych w różnych temperaturach otoczenia (30–35°C, 15–20°C) przez długi czas (do 15 dni). Pozwoliło to ustalić wiarygodność analizy tkanki miążgi zęba w obliczeniach późnego PMI. Autorzy odkryli również, że komórki miążgi zęba wykazują fazę wypłaszczenia w okresie 0–4 dni w temperaturze 15–20°C.

Bardzo często do wyznaczania PMI stosowano też ciecz szklistą ze względu na wyodrębnienie topograficzne i potężną warstwę ochronną, które opóźniają autolizę. PMI obliczano na podstawie zawartości potasu w cieczy szklistej [26]. Należy jednak zaznaczyć, że jej zanieczyszczenie mogło wpłynąć na wyniki. Corderio

i in. (2015) przy użyciu cytometrii przepływowej wykryli i usunęli zanieczyszczenia krwi w cieczy szklistej. Za pomocą tej techniki udało im się wykryć erytrocyty w zanieczyszczonej cieczy nawet przy rozcieńczeniu 1 : 750 000 [27].

Tome (2017) wykorzystał cytometrię przepływową do oceny żywotności, martwicy i stanu apoptotycznego komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) i cieczy szklistej pobranych ze zwłok ludzkich oraz ich korelacji z PMI [28]. Ponieważ w PMR znajduje się znacznie więcej komórek niż w cieczy szklistej, wydaje się on lepszym materiałem biologicznym do takich celów. W próbkach PMR gęstość (liczba) komórek przejawiała tendencję wzrostową wraz ze wzrostem PMI. Co więcej, żywotne komórki w tychże próbkach przejawiały tendencję do wzrostu wartości (z 5,78% do 88,04%) ze wzrostem PMI. Wyniki dotyczące pozostałych parametrów testu (tj. komórek docelowych, zanieczyszczeń komórkowych i odsetka komórek w stanie martwicy lub apoptozy) były sprzeczne. Ta wstępna analiza udowodniła, że badanie procesu śmierci komórkowej w PMR i cieczy szklistej może być skuteczną metodą oceny PMI.

Shaari i in. (2016) badali korelację pomiędzy martwicą tkanek wątroby a PMI u psa na potrzeby medycyny sądowej. Tkanki wątroby pobrano od trzech ($n = 3$) suk w odstępach sześciogodzinnych do 18 h po śmierci, aby ocenić tempo autolizy zachodzącej w tym okresie. Zastosowano barwienie jodkiem propidyny (PI) do oddzielenia martwych komórek od żywych techniką cytometrii przepływowej. Wyniki analizowano metodą statystyki opisowej i wyrażono za pomocą wartości procentowych i współczynników. Stwierdzono silną ogólną korelację liniową ($R^2 = 0,98$) pomiędzy pośmiertną autolizą tkanek wątroby a PMI u psów [29].

Zastosowanie cytometrii przepływowej do badania przypadków napaści na tle seksualnym

Badanie przestępstw seksualnych wymaga multidyscyplinarnego podejścia i współpracy pomiędzy ekspertami sądowymi specjalizującymi się w identyfikacji, zbieraniu, zabezpieczeniu i analizie materiału dowodowego [30].

W przypadkach napaści na tle seksualnym stosuje się techniki pozwalające na wydzielenie plemników z popłuczyn z pochwy i ich identyfikację, takie jak liza preferencyjna czy wirowanie frakcjonujące [31, 32]. Liza preferencyjna opiera się na odporności komórek na trawienie proteolityczne. Techniki te mają jednak tę wadę, że przebiegają w kilku etapach, podczas których może dojść do zanieczyszczenia próbki i utraty plemników. Jeśli próbka zawiera mało plemników, a wiele komórek pochwy, identyfikacja tych pierwszych jest utrudniona.

Opracowano dodatkowe metody pozwalające oddzielić plemniki od komórek nabłonkowych i uzyskać

osobne genotypy na podstawie różnic w kształcie i wielkości. Innym sposobem na separację komórek stosowanym do izolacji i wykrywania pojedynczych plemników jest reakcja łańcuchowa polimerazy o małej objętości (*low-volume polymerase chain reaction*, LV-PCR), która wykorzystuje znakowanie immunologiczne, urządzenia mikroprzepływowe, kapilary aspiracyjne, metodę mDip i FACS z cytometrią przepływową. Jest przeznaczona do analizy tylko świeżych wymazów z pochwy (lub popłuczyn), nie do wymazów lub materiałów starszych [33].

Schoell i in. (1999) proponują odróżniać plemniki od komórek pochwy za pomocą sortowania komórek z użyciem cytometrii przepływowej, ponieważ podejście to jest skuteczne nawet przy bardzo niewielkiej liczbie plemników. Tym sposobem oddzielono sześć tysięcy spermatoctów od miliona komórek pochwy [34]. Di Nunno i in. (2003) badali wydajność cytometrii przepływowej stosowanej do odróżniania komórek haploidalnych od diploidalnych za pomocą barwienia jodkiem propidyny. Próbki popłuczyn z pochwy pobrano od 20 kobiet, które nie miały doświadczeń seksualnych na tydzień przed poborem oraz próbki nasienia od 20 zdrowych mężczyzn. Próbki nasienia o różnej wielkości połączono z próbkami popłuczyn z pochwy, co miało symulować sytuację, gdy dochodzi do aktu seksualnego, a następnie techniką cytometrii przepływowej wykrywano komórki zabarwione i niezabarwione jodkiem propidyny [35]. Wyniki analizy ujawniły zależący od morfologii obszar o największym prawdopodobieństwie zidentyfikowania plemników w przypadku napaści na tle seksualnym, co może doprowadzić do ustalenia tożsamości oskarżonego i zatrzymania go [35].

Grosjean i Castella (2015) opracowali innowacyjne i wydajne podejście do pobierania i rozdzielania komórek z wacików bawełnianych oraz innych materiałów. W tej metodzie kulki magnetyczne sprzężone z przeciwciałami specyficznymi dla antygenu CD52 plemników i przy zastosowaniu odpowiednich kolumn magnetycznych pozwalają na odzyskanie frakcji plemników z nasienia domniemanego sprawcy i frakcji nieplemnikowej od ofiary [36].

Podejście to sprawdzono na świeżych i sześciomiesięcznych sztucznych próbkach z pochwy zmieszanych z rozcieńczonymi plemnikami w wymazach z policzka, w wyniku czego uzyskano całe pojedyncze profile DNA dawców nasienia i komórek nabłonkowych odpowiednio dla frakcji plemników i frakcji niezawierających plemników. Profile DNA dawczyń komórek nabłonkowych były przetwarzane równolegle w celu potwierdzenia wyników [36].

Xu i in. (2016) za pomocą fluorescencyjnego i magnetycznego sortowania komórek (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS; *magnetic-activated cell sorting*, MACS) wyizolowali plemniki od pojedynczego dawcy

z próbek zawierających mieszaninę plemników i komórek epitelialnych pochwy od kilku dawców.

Magnetycznie aktywowane sortowanie komórek MACS pozwoliło wyizolować plemniki z wymazu z pochwy przy użyciu sprzężonego z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) przeciwciała białka kotwiczącego A-kinazy-3 (AKAP-3). Metodę FACS wykorzystano do rozróżnienia docelowych pojedynczych plemników od różnych dawców za pomocą przeciwciała antygenowego grup krwi A/B sprzężonego z FITC. Metodą tą, bazując na komórkach nabłonkowych i plemnikach oraz mieszance nasienia od dwóch dawców, uzyskano pełne profile STR poszczególnych dawców [37].

Urey i in. (2021) opracowali lewitacyjną technikę cytometrii komórkowej do różnicowej ekstrakcji komórek w próbce biologicznej i przestrzenno-czasowego oddzielania komórek nabłonkowych i plemników na podstawie różnic w gęstości i medium paramagnetycznym. Metoda ta pozwala zwiększyć precyzję sortowania plemników przy niskich stężeniach (100 plemników na próbkę) w próbkach o objętości 30 μ L i czasie ekstrakcji różnicowej skróconym z 8 godzin do 20 minut, w wyniku której osiągnięto niespotykaną dotąd skuteczność w wykrywaniu i sortowaniu plemników, co jest niemożliwe w przypadku innych podejść [38].

DeCorte (2022) opracował nowy system sygnatur kryminalistycznych dążący do zwiększenia wartości dowodowej profili DNA uzyskanych z określonych rodzajów próbek dowodów napaści na tle seksualnym: mieszanin komórkowych powstających podczas penetracji palcami, składających się ze śladowych ilości komórek naskórka dłoni i pochwy oraz podczas kontaktu usta-skóra, zawierających śladowe ilości komórek naskórka dłoni i składników komórkowych śliny (tj. komórek policzkowych) [56]. Komórki charakteryzowano za pomocą cytometrii przepływowej z obrazowaniem (imaging flow cytometry, IFC), a następnie analizowano narzędziami do obrazowania danych i analizy statystycznej. Uzyskane dane posłużyły do opracowania filtrów komórkowych w programie do obrazowania, co umożliwiło usunięcie wszystkich komórek pochodzących z ręki i, potencjalnie, identyfikację sygnatury komórek pochwy. Następnie usunięte filtrem do analizy obrazu komórki poddano sekwencji testów funkcji dyskryminacyjnej, aby usprawnić klasyfikację i przewidywanie przynależności grupowych nieznanych komórek pochodzących ze sztucznych próbek kryminalistycznych. Okazało się, że znaczna większość tych nieznanych komórek tylko z nielicznymi wyjątkami została prawidłowo przydzielona do przewidywanej kategorii. Co więcej, prawidłowa klasyfikacja była wspierana przez wysokie prawdopodobieństwo *a posteriori*, w przeciwieństwie do prawdopodobieństwa *a posteriori* obserwowanych dla komórek nieprawidłowo sklasyfikowanych. Wyniki sugerują, że omawiana technika pozwala rozróżnić analizowane populacje

i identyfikować klasyfikacje fałszywie pozytywne, może także stanowić skuteczne nowe narzędzie do wstępnej analizy poprzedzającej profilowanie DNA. Możliwość identyfikacji składników mieszanki biologicznej przed analizą STR zwiększa skuteczność i zmniejsza obciążenie, które często zniekształca wyniki na poziomie aktywności w analizie próbek mieszanin śladowych.

Fokias i in. (2022) opracowali technikę izolacji plemników z komórek nabłonkowych, łączącą zestaw do znakowania Sperm Hy-Liter™ i FACS [58]. Posortowane plemniki przechodzą bezpośrednią lizę i LV-PCR. Ze wstępnych danych wynika, że oba typy komórek można oddzielić nawet w proporcji 1 : 500 plemników do komórek nabłonkowych. Procedury bezpośredniej lizy i LV-PCR pozwalają uzyskać pełne profile haploidalne z pojedynczych plemników, a w większości przypadków również pełnych profili diploidalnych z dziesięciu plemników. Uzyskane wyniki wskazują, że sugerowane metody mogą mieć wartość praktyczną w kryminalistyce. Są jednak potrzebne dalsze badania w celu ich potwierdzenia.

Ingram i in. (2023) opracowali nowy system sygnatur biologicznych zwiększający wartość dowodową próbek zawierających komórki naskórka i komórki pochwy, które występują w przypadkach penetracji palcami, wykorzystujący właściwości morfologiczne i fluorescencyjne [59]. Zestawienie z porównawczymi populacjami komórek tkanki pochwy i komórek naskórka pozyskanych z rąk wykazały znaczne wieloczynnikowe różnice w ponad 80 parametrach komórkowych. Różnice te wykorzystano to opracowania ram predykcyjnych do identyfikacji nieznanych typów komórek pochodzących z komórek nabłonkowych związanych z penetracją palcami i tkankami naskórka. W trakcie kategoryzacji obliczono prawdopodobieństwo *a posteriori* poszczególnych komórek należących do danej kategorii tkanek oraz ich wieloczynnikowe podobieństwo do tejże kategorii. Metodę sprawdzono na populacjach komórek pochodzących z tkanek porównawczych oraz fałszywych próbek kryminalistycznych na podstawie wymazów z ręki pobranych po penetracji pochwy palcami. Wymazy te zawierały istotnie więcej komórek zaklasyfikowanych jako tkanka nienaskórkowa niż wymazy kontrolne z ręki. Opracowano minimalne progi interpretacji, aby zmniejszyć liczbę wyników fałszywie pozytywnych. Progi te okazały się też pomocne w ocenie polizanych rąk, co wskazało na potencjalne zastosowanie tej metody do różnych typów mieszanek i przy różnych typach zdarzeń, w trakcie których dochodzi do zdeponowania materiału, związanych ze sprawami kryminalnymi. Wyniki pokazują, że próbki pobrane po penetracji palcami zawierały istotnie więcej komórek zaklasyfikowanych jako tkanka pochwy, a także większe prawdopodobieństwa *a posteriori*.

Zastosowanie cytometrii przepływowej do próbek DNA dotykowego

Analiza DNA dotykowego (bądź mieszanin komórek śladowych i dotykowych) jest ważnym zagadnieniem dla kryminalistów badających DNA. Interpretacja mieszanych danych STR (*short tandem repeat* – krótkie tandemowe powtórzenia) dotyczących DNA z dotykanych powierzchni jest procedurą subiektywną i czasochłonną, obniżającą wartość dowodową próbek i mocno krytykowaną za brak wiarygodności naukowej [39]. Genotypowanie probabilistyczne pozwala analizować skomplikowane mieszaniny. Wdrożenie takiego systemu jest jednak kosztowne, czasochłonne i pracochłonne – wymaga ono walidacji; należy też spodziewać się konfliktów prawnych dotyczących zastrzeżonego oprogramowania i trudności w przekonaniu przysięgłych danymi probabilistycznymi [40], a błędna ocena liczby uczestników, od których pochodzi próbka, wpływa na wyniki probabilistyczne, ponieważ liczba dodatkowych uczestników do analizy może być ograniczana [41]. Nadal zachodzi pilna potrzeba opracowania podejść do analizy wstępnej (tj. podejść typu *front-end*), którymi będzie można segregować populacje komórek od różnych dawców przed analizą DNA, co pozwoli na tworzenie profili STR z jednego źródła lub uproszczenie próbek pochodzących od wielu dawców [42].

Mikroprzepływy, mikromanipulacja, mikrodyssekcja laserowa i FACS to metody stosowane do izolowania pojedynczych komórek z mieszaniny [43, 44, 45, 46]. Metody te wprowadzają różnorodność międzykomórkową pod względem immunochemicznym bądź morfologicznym, co pozwala skutecznie analizować mieszanki zawierające wiele typów komórek (np. nasienie i nabłonek [45, 47], krew i ślina [46]) czy mieszanki komórek tego samego typu, ale pochodzące od różnych osób [43].

Strategie separacji próbek mieszanin dotykowych składających się z komórek naskórka, posiadających inne właściwości strukturalne i biologiczne niż pozostałe typy komórek istotnych z punktu widzenia medycyny sądowej (np. białe krwinki, komórki policzka, komórki pochwy), mają jednak swoje ograniczenia.

Stanciu i in. badali rolę różnych składników genetycznych i komórkowych w próbkach biologicznych powstających w wyniku dotyku lub kontaktu. Próbki DNA dotykowego wymywano z wymazów pobranych z przedmiotów trzymanyh przez osobę przez 5 minut. Następnie próbki analizowano pod względem zawartości komórek naskórka, DNA pozakomórkowego oraz DNA z granulowanego materiału komórkowego. Odróżniano osoby, które umyły ręce bezpośrednio przed dotykaniem przedmiotu od tych, które nie umyły rąk. DNA pozakomórkowe stanowiło 84–100% i nie wykazywało związku z wykrytymi komórkami naskórka. Nie stwierdzono DNA pozakomórkowego ani DNA związanego z granulkami

komórkowymi DNA wśród osób, które umyły ręce przed dotykaniem przedmiotu, a z próbek odzyskano znaczną liczbę komórek naskórka (od $\sim 5 \times 10^3$ do $\sim 1 \times 10^5$ próbek), co wskazuje, że mogą być dostępne inne rodzaje informacji biologicznych, nawet jeśli w próbkach nie ma amplifikowanego genomowego DNA. Powyższe wyniki wskazują, że próbki dotykowe i związane z nimi czynniki tworzą wzory przenoszenia DNA i trwałości w dowodach kryminalistycznych [48].

Kwon i in. (2016) opublikowali wyniki dotyczące hybrydyzacji przeciwciał za pomocą sond cytokeratynowych i antygenów ludzkich leukocytów, w tym dane o właściwościach optycznych osadzonych komórek, takich jak rozpraszanie do przodu i na boki oraz emisja fluorescencji w kanale allofikocyjaniny. Aby zbadać zmienność między dawcami i u poszczególnych dawców, wszystkie analizy przeprowadzono na próbkach dotykowych pozostawionych (pobranych natychmiast, np. „świeże próbki”) i próbkach zebranych do 7 dni po pozostawieniu [49].

Burrill i in. (2020) badali zawartość komórkową obecną w popłuczynach mytych i niemytych rąk oraz popłuczynach z nosa, śliny i oczu jako potencjalnych źródeł DNA przenoszonego na ręce. Dane o wielkości, ziarnistości i fluorescencji jądrowej uzyskano za pomocą cytometrii przepływowej i obserwacji pod mikroskopem. Mimo że stwierdzono znaczne różnice pomiędzy dawcami, skład komórkowy danej osoby nie wykazywał dużej zmienności. Ślina zawiera DNA pozytywnych populacji komórek nabłonkowych i innych, a także zanieczyszczenia. Popłuczyny rąk składały się prawie wyłącznie z bezjądrzastych korneocytów. Wiele takich próbek wybarwiło się pozytywnie na kwasy nukleinowe, co podało w wątpliwość wcześniejsze założenia o nieznacznej wartości pozostawionego DNA korneocytów [50].

Ingram i in. (2022) na podstawie autofluorescencji i morfologii komórek nabłonkowych ustalali czas, jaki upłynął od naniesienia próbki DNA. Pojedyncze komórki obrazowano z użyciem cytometrii przepływowej, po czym przeprowadzono na nich modelowanie wieloczynnikowe i kategoryzację predykcyjną [55]. Populacje komórek nabłonkowych podzielono na trzy grupy w zależności od czasu od naniesienia: mniej niż 1 tydzień, 1 tydzień do 2 miesięcy oraz ponad 2 miesiące. Różnice pomiędzy grupami wynikały głównie z mniejszego kontrastu jasnego pola i intensywniejszej autofluorescencji. Na potrzeby badań kryminalistycznych 47 populacji komórek dawców zostało ślepo skategoryzowanych w odniesieniu do pełnego zestawu danych. Uzyskano w ten sposób dokładność klasyfikacji na poziomie 95% dla próbek zawierających co najmniej 75 komórek i 97% dla poszczególnych okresów (2 miesiące). Zatem ocena autofluorescencji i morfologii może dostarczyć użytecznych informacji o czasie po naniesieniu śladowych próbek DNA.

Podsumowując, o ile wiele metod mikroskopowych ma swoje zastosowania, cytometria przepływowa jest powszechnie uznawana za najlepszą metodę analizy DNA dotykowego ze względu na dużą czułość, dokładność i wydajność, przez co jest też zalecana w wielu kontekstach kryminalistycznych i badawczych związanych z DNA dotykowym.

Inne zastosowania cytometrii przepływowej

Zagadnieniem spotykanym od czasu do czasu w praktyce medyczno-prawnej jest stwierdzanie aborcji, które można przeprowadzić na płodzie bądź na żywych lub martwych kobietach. Możliwość odróżnienia aborcji spontanicznej od niespontanicznej jest kluczowa [20]. Aborcja spontaniczna jest istotnym zjawiskiem w medycynie sądowej, ponieważ wiedza o naturalnych przyczynach aborcji pozwala wykluczyć nielegalne jej przerwanie. Określanie czasu powstania ran oparzeniowych u człowieka wciąż stanowi wyzwanie dla medycyny sądowej. Limfocyty T odgrywają zasadniczą rolę w gojeniu ran oparzeniowych. Elgazzar i in. (2021) scharakteryzowali zależne od czasu zmiany w limfocytach T-cytotoksycznych (CD8+) i limfocytach T-pomocniczych (CD4+) w ludzkiej krwi po urazie cieplnym, aby wyjaśnić ich dokładność w rozpoznawaniu suchych urazów oparzeniowych za pomocą cytometrii przepływowej [51].

Układ grup krwi ABO jest niezbędny nie tylko do przeszczepu narządów i transfuzji, ale także do identyfikacji osób w dochodzeniach kryminalistycznych. Test hemaglutynacji jest powszechnie stosowaną metodą wykrywania antygenów ABO. Wiąże się jednak z poważnymi ograniczeniami, w tym z brakiem możliwości policzenia antygenów ABO na krwinkach czerwonych czy właściwej oceny grupy krwi ABO u zdrowych osób bądź w podgrupach. Aki i in. opracowali dwie techniki analityczne do fenotypowania i genotypowania ABO na podstawie amplifikacji allelo-specyficznej metodą PCR (*PCR amplification of particular alleles*, PASA) i cytometrii przepływowej. Cytometria przepływowa pozwala policzyć antygeny A, B i H na krwinkach czerwonych, a PASA umożliwia szybkie wykrycie kilku miejsc polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (*single nucleotide polymorphism*, SNP) w genie ABO. Techniki te są nieskomplikowane i skuteczne w wykrywaniu grupy krwi ABO oraz genotypowaniu. Często stosuje się je też w laboratoriach klinicznych i sądowych [52].

Gentry i in. (2023) sprawdzali, czy wykonane metodą IFC pomiary morfologii i autofluorescencji populacji komórek istotnych z punktu widzenia kryminalistyki mogą posłużyć do przewidywania czasu od naniesienia dotykowych lub śladowych próbek biologicznych [57]. W tym celu zespół ocenił trzy różne ramy predykcyjne do szacowania liczby dni od naniesienia: sieć elastyczną, maszyny wzmacniające gradient (*gradient boosting machines*,

GBM) i uogólniony liniowy model mieszany (*generalized linear mixed model*, GLMM) LASSO. Dodatkowo na podstawie tych predykcji ciągłych stworzono szereg klasyfikatorów binarnych do szacowania potencjalnych zastosowań w kryminalistyce. Wyniki pokazały, że GBM i GLMM-LASSO wykazywały się najlepszą dokładnością: średni bezwzględny błąd szacunkowy w zestawie testowym typu *hold-out* wynosił odpowiednio 29 i 21 dni. Klasyfikatory binarne dla tych modeli prawidłowo przyporządkowały 94–96% i 98–99% szacunków czasu do grupy odpowiednio powyżej lub poniżej 7 lub 180 dni. Sugeruje to, że czas od naniesienia przewidywany za pomocą IFC w połączeniu z jedną zasadą decyzyjną klasyfikacji binarnej (bądź wieloma takimi zasadami) może dostarczyć informacji dowodowych o śladowych próbkach biologicznych spotykanych w praktyce kryminalistycznej.

W badaniu autorstwa Tewari i in. (2023) wykrywano płyny ustrojowe (krew, ślinę i mocz) na podstawie specyficznych biomarkerów białkowych za pomocą cytometrii przepływowej wykorzystującej zestaw kulek cytometrycznych (*cytometric bead array*, CBA) [60]. Próbkę pobrano od 10 zdrowych dawców z Prayagraju, wybranych metodą warstwowego doboru próbek, po uzyskaniu od nich pisemnej zgody, a następnie poddano je analizie CBA w celu wykrycia specyficznych biomarkerów płynów ustrojowych. Płyny ustrojowe badano, obliczając medianę intensywności fluorescencji (MFI) dla wybranych biomarkerów w różnych kombinacjach płynów ustrojowych. Wartości MFI specyficznych biomarkerów w czystych próbkach płynów ustrojowych mieściły się w przedziale 90–150, a mieszaninach binarnych (w proporcji 1 : 1) – w przedziale 80–130. W przypadku innych proporcji (1 : 3, 1 : 5, 3 : 1 i 5 : 1) wartości MFI biomarkerów dla wykrycia pozytywnych wynosiły od 40–80 do 100–240, przy czym MFI poniżej 20 uznawano za wykrycie negatywne dla danego biomarkera. Cytometria przepływowa pozwala skutecznie identyfikować płyny ustrojowe na odpowiednich biomarkerach – nawet w śladowych ilościach albo mieszaninach. W tych ostatnich wartość MFI dla dużych ilości płynów była jednak znacznie większa niż dla płynów w śladowych ilościach.

Ograniczenia cytometrii przepływowej

Cytometria przepływowa to bardzo wydajna metoda oceny znacznej liczby – nawet milionów – komórek. Ma niestety kilka wad [8]. Sortowanie przebiega powoli, ponieważ szybki przepływ komórek mógłby wywołać negatywne skutki, a zwiększenie żywotności komórek zmniejsza prędkość przepływu. Wyraźnym ograniczeniem cytometrii przepływowej jest brak możliwości oceny komórek niezawieszonych, np. komórek przylegających do medium czy zawartych w strukturze tkanek. Aby utworzyć kropelki jednokomórkowe, konieczne

jest podzielenie wszystkich próbek na zawiesiny komórkowe. Uniemożliwia to analizę interakcji pomiędzy komórkami.

Pozostałe wady dotyczą ryzyka uszkodzenia komórek przez cytometr, co wpływa na analizę i późniejszą hodowlę podczas sortowania komórek, a także brak możliwości analizy pojedynczych komórek w celu uzyskania informacji o atrybutach tkanek.

Wnioski

Badacze zaobserwowali istotną korelację pomiędzy PMI a rozkładem DNA za pomocą cytometrii przepływowej, ale stwierdzili również pewne wady tej metody. Z powodu ograniczonej liczby przytaczanych prac i rozwoju nowoczesnych, bardziej zaawansowanych technik analizy DNA cytometria przepływowa przestała być praktyczną opcją oznaczania PMI.

Cytometria przepływowa jest ważnym elementem nowych technik opracowywanych obecnie w celu badania przypadków napaści na tle seksualnym. Okazało się także, że jest wyjątkowo skuteczna przy oddzieleniu komórek pochwy od plemników nawet przy bardzo niewielkiej ich liczbie w próbce albo w bardzo starych próbkach, co było znacznym problemem w przypadku tradycyjnych metod. Cytometrię przepływową można zatem wykorzystać do analizy popłuczyn z pochwy oraz identyfikacji i oddzielania plemników do dalszego genotypowania i profilowania DNA na podstawie morfologii.

Oddzielanie różnych typów komórek od wielu dawców od zawsze sprawiało trudności w badaniach kryminalistycznych opierających się na próbkach dotykowych. Pomocna w izolowaniu populacji komórek w próbkach pochodzących od różnych dawców przed analizą DNA jest cytometria przepływowa, ułatwiająca tworzenie indywidualnych profili STR.

Cytometrię przepływową w połączeniu z obserwacją pod mikroskopem wykorzystano do pomiaru wielkości, ziarnistości i fluorescencji kwasów nukleinowych w popłuczynach z umytych i nieumytych rąk, płynie z nozdrzy i ślinie. Technika tą uzyskano również informacje o komórkach nadające się do profilowania DNA we wszystkich próbkach. Cytometria przepływowa to sposób na opracowanie nowych, bardzo skutecznych technik kryminalistycznych opartych na próbkach dotykowych, co do tej pory stanowi wyzwanie dla śledczych. Może także pomóc entomologom sądowym w identyfikacji płci i specjacji.

Do oceny PMI stosuje się kilka metodologii opartych na różnych biologicznych, fizycznych i chemicznych wskaźnikach. Większość tych metodologii nie jest jednak całkowicie dokładna. Cytometria przepływowa to rozwijająca się technika szeroko stosowana w patologii klinicznej do analizy pojedynczych komórek.

Pozwala ona wykorzystać wiele fluoroforów naraz, co z kolei umożliwia zwiększenie liczby zarówno fluoroforów, jak i paneli do immunofenotypowania do ponad 40. Ponadto cytometria przepływowa kwantyfikuje autofluorescencję komórkową jako niezależny parametr, co poprawia dokładność wykrywania docelowych sygnałów. Opracowywanie paneli i ocena skomplikowanych podgrup wymagają jednak odpowiednich umiejętności i ustandaryzowanych metod. Zwiększenie liczby charakterystyk mogłoby doprowadzić do lepszego zrozumienia komórek odpornościowych i ich podgrup.

Wykaz skrótów

Sortowanie komórek aktywowane magnetycznie (*magnetic-activated cell sorting*): MACS; amplifikacja allelo-specyficzna metodą PCR (*PCR amplification of specific alleles*): PASA; sortowanie komórek aktywowane fluorescencją (*fluorescent-activated cell sorting*): FACS; reakcja łańcuchowa polimerazy o małej objętości (*low-volume polymerase chain reaction*): LV-PCR; płyn mózgowo-rdzeniowy: PMR; czas, jaki upłynął od zgonu (*postmortem interval*): PMI; krótkie tandemowe powtórzenia (*short tandem repeat*): STR; czas zgonu (*time of death*): TOD; cytometria przepływowa z obrazowaniem (*imaging flow cytometry*): IFC.