

Renata Jacewicz*, Piotr Wołkanin, Stefan Szram***

Genetyczne zróżnicowanie układu VNTR–D5S110 w populacji Polski centralnej i jego zastosowanie w dochodzeniu spornego ojcostwa

Genetic diversity of the VNTR system – D5S110 in Central Poland population and its application to paternity testing

* Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. med. S. Szram

** Z Katedry Patomorfologii Klinicznej Wojskowej Akademii Medycznej w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Zieliński

Przedstawiono wyniki badań polimorfizmu zmiennej ilości tandemowych powtórzeń (VNTR) locus D5S110 wykrywanego przez próbkę MS621 i enzym restrykcyjny Hinf I wśród 155 niespokrewnionych mieszkańców centralnej Polski, a ponadto wyniki analizy 158 spraw dochodzenia spornego ojcostwa. Wyniki poddano ocenie statystycznej stosując metodę grupowania alleli w stałe przedziały wielkości i porównano z wynikami uzyskanymi dla Polski południowo-wschodniej. Rozkład częstości genotypów i alleli w locus D5S110 wskazuje na zgodność badanej populacji z równowagą Hardy'ego–Weinberga (HWE), a obliczone parametry świadczą o jego wysokiej przydatności do badań identyfikacyjnych i oceny spornego ojcostwa.

The polymorphism of a variable number of tandem repeat (VNTR) locus D5S110 detected by molecular probe MS621 and restriction enzyme Hinf I in 155 unrelated inhabitants of Central Poland and the evaluation of 158 cases of disputed paternity were presented. The data was analyzed statistically using the fixed bin method and compared with data received for population of South–Eastern Poland. The genotype and allele frequency distribution for the D5S110 locus indicates that the investigated population is in agreement with the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE). The calculated parameters are evidence of high utility of the locus D5S110 for human identification and paternity determination.

Słowa kluczowe: RFLP, VNTR, D5S110, Hinf I, badanie ojcostwa, centralna Polska, HWE

Key words: RFLP, VNTR, D5S110, Hinf I, paternity testing, Central Poland, HWE

WSTĘP

Minisatelitarny region ludzkiego DNA–D5S110 został wykryty przez Armoura i wsp. i zlokalizowany w części dystalnej chromosomu 5 p (2).

Dwie główne klasy jednostki powtarzalnej lokus D5S110 różnią się między sobą ilością powtórzeń wewnętrznego 11 pz motywu NNCTGGGGGCT tworząc wariant jednostki powtarzalnej typu T (trimer – 53 pz) oraz wariant jednostki powtarzalnej typu D (dimer – 41/42 pz) (1).

Dotychczas przeprowadzone badania populacyjne wskazują na wysoki stopień zmienności lokus D5S110, a więc szczególną jego przydatność do badań identyfikacyjnych i badań pokrewieństwa (2, 5, 7, 8, 9, 14),

CEL PRACY

Celem tego opracowania jest:

1. Zaprezentowanie rozkładu „alleli” VNTR – D5S110/Hinf I w populacji Polski centralnej.
2. Porównanie z analogicznym rozkładem uzyskanym dla populacji Polski południowo-wschodniej.
3. Ocena zgodności wyników z regułą Hardy’ego–Weinberga.
4. Zebranie danych wynikających z zastosowania układu D5S110/Hinf I w dochodzeniu spornego ojcostwa.
5. Obliczenie parametrów oceniających przydatność układu D5S110/Hinf I do badań sądowych w Polsce.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto krwi pochodzącej od 155 niespokrewnionych mieszkańców Polski centralnej, uczestniczących w dochodzeniu spornego ojcostwa.

Metodyka badań obejmowała:

- izolację DNA metodą solną wg. Lahiri i wsp. (15)
- spektrofotometryczną ocenę uzyskanego DNA
- trawienie restryktazą Hinf I (30 U/5 µg DNA)
- rozdział elektroforetyczny (0,7% agarozą, bufor TBE).
- próżniowy transfer DNA
- hybrydyzację z próbami MS621, MW100 (Cellmark Diagnostics).
- chemiluminescencyjną detekcję przy użyciu substratu Lumi Phos 530 (19)
- obliczenie wielkości fragmentów DNA metodą lokalnej korelacji w odniesieniu do markera wielkości Nice™ / DNA (Life Technologies) wykrywanego przez próbę MW100.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej stosując metodę grupowania alleli w stałe przedziały wielkości (ang. fixed bins) (6). Utworzono:

- przedziały co 100 pz (utworzenie histogramu, obliczenia parametrów charakteryzujących lokus)
- przedziały oparte na 30–fragmentowym wzorcu wielkości Nice™/DNA (testowanie równowagi Hardy'ego–Weinberga, porównanie rozkładów „alleli” między populacjami).

Przy obliczaniu częstości alleli podano 95% przedział ufności (CL) (13).

Sprawdzenie zgodności uzyskanych wyników z hipotezą Hardy'ego–Weinberga przeprowadzono w oparciu o:

- test homozygotyczny (16)
- test „exact” (11)
- test ilorazu największej wiarygodności – LR (21)

Aby uniknąć błędnej interpretacji wyników testów na skutek niskich częstości niektórych genotypów połączono zestawy alleli tak, aby ich liczba w klasie nie była mniejsza od 5 (6, 20).

Obliczono następujące parametry oceniające przydatność badanego układu do badań sądowych:

H_{oczek} – heterozygotyczność oczekiwana (17)

$\pm H_{oczek}$ – błąd standardowy dla H_{oczek} (12)

PIC – wskaźnik informacji o polimorfizmie (polymorphism information content) (18)

PD – siłę dyskryminacji (power of discrimination) (10)

DI – współczynnik dyskryminacji (discrimination index) (22)

EP – teoretyczną szansę wykluczenia ojcostwa (exclusion probability) (4)

PI – współczynnik ojcostwa (paternity index) (4).

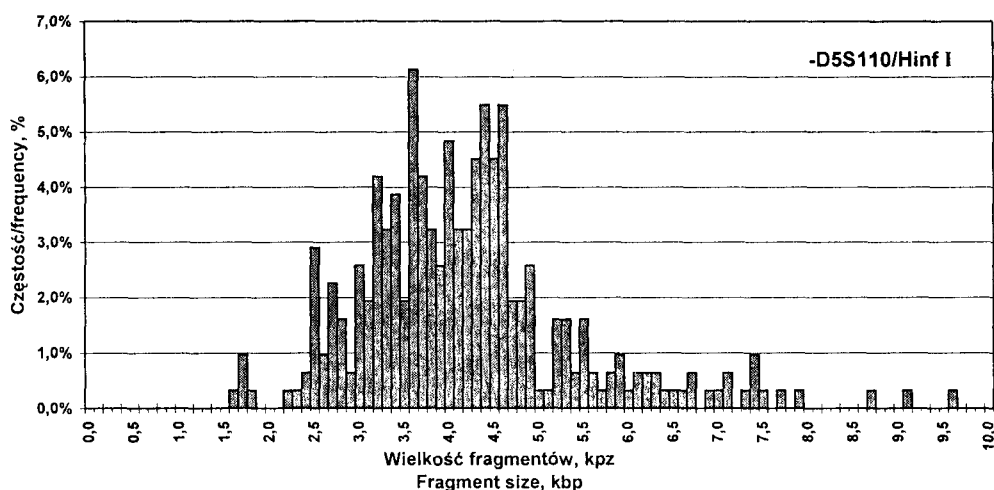
WYNIKI I OMÓWIENIE

1. Rozkład fragmentów restrykcyjnych D5S110/Hinf I

Wielkości fragmentów restrykcyjnych uzyskanych po trawieniu restryktazą Hinf I w lokus D5S110 u 155 niespokrewnionych mieszkańców centralnej Polski w przedziałach 0,1 kpz przedstawiono na rycinie 1.

Obserwowany przedział alleli D5S110/Hinf I w populacji Polski centralnej wynosi: 1,7 – 9,7 kpz. Z częstością powyżej 2% występują allele w przedziale: 2,6 – 5,0 kpz. Najpowszechniej występujący przedział wielkości (6,13%) to przedział: 3,6 – 3,7 kpz.

W oparciu o częstości alleli i fenotypów lokus D5S110 pogrupowanych w przedziały 100 pz obliczono parametry oceniające przydatność badanego układu do badań sądowych (tabela I).



Ryc. 1. Rozkład wielkości i częstości alleli VNTR w locus D5S110 (próba MS621) w populacji centralnej Polski (N=155)

Fig. 1. Size and frequency distribution of VNTR alleles at locus D5S110 (probe MS621) in Central Poland population (N=155)

Tabela I. Wartości wskaźników stopnia polimorfizmu układu D5S110/Hinf I w populacji Polski centralnej

Table I. The values of polymorphism indices for the D5S110/Hinf I system in Central Poland population

D5S110/Hinf I				
$H_{uzysk.}$ $H_{obs.}$	H_{oczek} $H_{exp.}$	PIC	PD	DI
0,974	0,984±0,01	0,967	0,992	1,3x10 ⁻³

Odzwierciedlająca stopień polimorfizmu w populacji heterozygotyczność locus D5S110 wynosi – 0,974. Wartość ta mieści się w granicach heterozygotyczności oczekiwanej – 0,984±0,010. Uzyskana wartość wskaźnika informacji o polimorfizmie – 0,967 wskazuje na bardzo wysoką informatywność badanego locus (3). Siła dyskryminacji układu D5S110/Hinf I wynosi – 0,992, a prawdopodobieństwo powtórzenia się identycznego fenotypu u dwóch niespokrewnionych osób – 1,3x10⁻³.

Do oceny równowagi Hardy'ego–Weinberga w populacji pogrupowano allele D5S110/Hinf I w przedziały oparte na markerze wielkości NiceTM/DNA łącząc przedziały alleli z ilością mniejszą od 5 (tabela II).

Tabela II. Ocena równowagi Hardy'ego–Weinberga przy użyciu grupowania fenotypów i alleli D5S110/Hinf I występujących w populacji Polski centralnej w stałe przedziały wielkości

Table II. The evaluation of Hardy–Weinberg equilibrium of binned genotype and allele frequencies at locus D5S110/(Hinf I) in Central Poland

Nr No	Przedział wielkości Size range (kpb) (kbp)	Allele Alleles		±95% CL
		Ilość Number	Częstość Frequency	
1–9	0.000–1.568	0 ¹	0,000	0,000
10	1.569–1.672	1 ¹	0,003	0,007
11	1.673–1.861	4 ¹	0,013	0,015
12	1.862–2.015	0 ¹	0,000	0,000
13	2.016–2.213	0 ¹	0,000	0,000
14	2.214–2.433	3 ¹	0,010	0,013
15	2.434–2.650	12	0,039	0,025
16	2.651–2.876	12	0,039	0,025
17	2.877–3.101	12	0,039	0,025
18	3.102–3.397	28	0,090	0,038
19	3.398–3.812	53	0,171	0,050
20	3.813–4.333	55	0,177	0,050
21	4.334–4.716	59	0,190	0,052
22	4.717–5.415	30	0,097	0,039
23	5.416–5.861	11	0,035	0,024
24	5.862–6.442	12	0,039	0,025
25	6.443–7.421	9	0,029	0,022
26	7.422–8.271	6 ²	0,019	0,018
27	8.272–9.416	2 ²	0,006	0,011
28	9.417–11.919	1 ²	0,003	0,007
29–31	11.920–>22.621	0 ²	0,000	0,000

^{1,2} – klasy połączonych zestawów alleli do oceny HWE w populacji

^{1,2} – the classes of rebinned alleles for the HWE evaluation

test homozygotyczny/homozygosity test $P=0,190$ ($\chi^2=1,68$ $df=1$)

exact test $P=0,736$ ($\chi^2=68,88$ $df=77$)

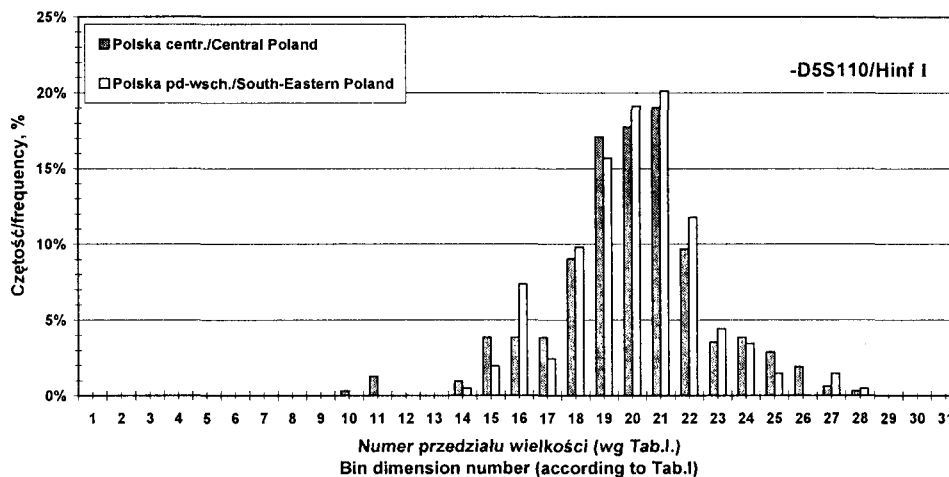
likelihood ratio test $P=0,367$ ($-2\ln(L)=80,84$ $df=77$)

Zebrano wielkości alleli w multinominalny rozdział analogiczny do rozdziału fenotypów złożony z 13 możliwych homozygot (fragmentów leżących wewnątrz tego samego przedziału) oraz 78 możliwych heterozygot (fragmentów należących do dwóch różnych przedziałów).

Uzyskane wartości prawdopodobieństwa w oparciu o: test homozygotyczny – $P=0,19$, test „exact” – $P=0,736$ i test LR – $P=0,367$ wskazują na istnienie

równowagi Hardy'ego–Weinberga w populacji Polski centralnej w locus D5S110.

Dane oceniające rozkład wielkości fragmentów restrykcyjnych D5S110/Hinf I w populacji Polski centralnej porównano z analogicznymi danymi uzyskanymi dla Polski południowo-wschodniej (osobista komunikacja) (rycina 2).



Ryc. 2. Porównanie rozkładu wielkości i częstości alleli w locus D5S110 (próba MS621) między populacjami: Polski centralnej (N=155) i Polski południowo-wschodniej (N=102)

Fig. 2. Comparison of allele size and frequencies for locus D5S110 (probe MS621) between Central Poland (N=155) and South-Eastern Poland (N=102) populations

Rozkład częstości i wielkości alleli VNTR – D5S110/Hinf I wskazuje na istnienie dużego podobieństwa między porównywanymi populacjami. Zbliżone częstości obserwujemy w zakresie wielkości między przedziałem 18 a 24, a najczęściej występujący przedział wielkości w obydwu populacjach to przedział 21. Stosunkowo największe różnice dotyczą przedziałów skrajnych, grupujących najrzadziej występujące allele.

Zestawienie parametrów statystycznych opisujących rozdział fragmentów restrykcyjnych D5S110/Hinf I w Polsce centralnej i południowo-wschodniej potwierdza uprzednio poczynione spostrzeżenia (tabela III).

Do oceny statystycznej znamienności różnic między badanymi populacjami połączono zestawy alleli w 11 klas, tak aby uniknąć porównywania wartości mniejszych od 5 (tabela IV).

Statystyczną istotność różnic odnotowano jedynie dla przedziału pierwszego grupującego allele o niskich częstościach, co może być rezultatem badania stosunkowo małych prób populacyjnych (155 i 102 osób). Jednak globalne porównanie 11 przedziałów wielkości alleli wskazuje na to, że w zakresie układu D5S110/Hinf I obie polskie populacje nie różnią się od siebie w sposób statystycznie znamienny.

Tabela III. Parametry statystyczne opisujące rozkład fragmentów restrykcyjnych D5S110/Hinf I w populacji Polski: centralnej i południowo-wschodniej (wielkości fragmentów w kpz)

Table III. The statistical parameters describing the distribution of restriction fragments D5S110/Hinf I in Central and South–Eastern Poland (the fragment size in kpb)

D5S110/Hinf I	Polska/Poland	
	centralna/Central	pd-wsch./South–Eastern
Ilość badanych fragmentów Total number of fragments	310	204
Min. wielkość fragmentu Min. fragment size	1,66	2,28
Max. wielkość fragmentu Max. fragment size	9,65	10,77
Średnia wielkość fragmentu Mean fragment size	4,24	4,26
Mediana/Median	4,11	4,18
Odchylenie standardowe Standard deviation	1,23	1,19
Wariancja/Variance	1,50	1,42

Tabela IV. Porównanie rozkładu 11 przedziałów wielkości alleli VNTR – D5S110/Hinf I w populacji Polski centralnej i południowo-wschodniej

Table IV. The comparison of 11 bin dimension of alleles VNTR – D5S110/Hinf I in Central and South–Eastern Poland populations

Nr No	Przedział wielkości Size range (kpz) (kpb)	Ilość (częstość) alleli w populacji Polski Allele number (frequencies) in Poland		χ^2 df = 1	P
		centralnej Central	pd-wsch. South–Eastern		
1	0.000–0.2650	20 (0,064)	5 (0,024)	4,26*	0,05>p>0,02
2	2.651–2.876	12 (0,039)	15 (0,073)	3,00	0,1>p>0,05
3	2.877–3.101	12 (0,039)	5 (0,024)	0,78	0,5>p>0,3
4	3.102–3.397	28 (0,090)	20 (0,098)	0,09	0,8>p>0,7
5	3.398–3.812	53 (0,171)	32 (0,157)	0,18	0,7>p>0,5
6	3.813–4.333	55 (0,177)	39 (0,191)	0,16	0,7>p>0,5
7	4.334–4.716	59 (0,190)	41 (0,201)	0,09	0,8>p>0,7
8	4.717–5.415	30 (0,097)	24 (0,118)	0,57	0,5>p>0,3
9	5.416–5.861	11 (0,035)	9 (0,044)	0,24	0,7>p>0,5
10	5.862–6.442	12 (0,039)	7 (0,034)	0,07	0,8>p>0,7
11	6.443–11.919	18 (0,058)	7 (0,034)	1,50	0,3>p>0,2
Ogółem Total	0.000–11.919	310 (0,999)	204 (0,998)	10,94 df = 10	0,5>p>0,3

* – statystycznie znaczne różnice

* – statistically significant differences

2. Analiza układu D5S110/Hinf I w oparciu o badania spornego ojcostwa (tabela V).

Tabela V. Dochodzenie spornego ojcostwa w oparciu o układ D5S110/Hinf I w populacji Polski centralnej

Table V. Paternity testing with D5S110/Hinf I system in the population of Central Poland

Szansa wyłączenia Exclusion probability	uzyskana/observed oczekiwana/expected	% %	96,87 94,78
Liczba mejoz Number of meioses	matczyne/maternal		158
	ojcowskie/paternal		126
	ogółem/total		284
Allele zmutowane Mutated alleles	matczyne/maternal	n %	1 0,6
	ojcowskie/paternal	n %	1 0,8
	ogółem/total	n %	2 0,7
Indeks ojcostwa Paternity Index	średni mean	15,5	8,16–155,00

Ocenę przydatności locus D5S110 do badań spornego ojcostwa w Polsce przeprowadzono w oparciu o analizę 158 „trójek” matka–dziecko–pozwany. Poddano je również badaniu w zakresie co najmniej trzech innych układów jednolokusowych oraz analizie multilokusowej.

Spośród 32 spraw wyłączających ojcostwo (20,25%) w oparciu o analizę polimorfizmu DNA w 31 z nich badanie locus D5S110 dało podstawę do wykluczenia ojcostwa. Uzyskana wartość siły wykluczeniowej układu nie różni się w sposób statystycznie znamieny od wartości teoretycznej szansy wykluczenia – 94,78% ($\chi^2=0,55$, $0,3>P>0,5$).

Częstość mutacji w locus oceniano analizując 158 par matka/dziecko oraz 126 spraw z ojcostwem potwierdzonym na podstawie wyników badania układu multilokusowego: D7S437 lub D1S111 oraz co najmniej trzech układów jednolokusowych z zakresu: D1S7, D7S21, D12S11, D7S22, D5S110, D2S44, D1S80. W dwóch sprawach nie wykazano segregacji fragmentu restrykcyjnego między rodzicem a dzieckiem tylko w locus D5S110. Uzyskana wartość współczynnika mutacji (μ) dla populacji Polski centralnej – 0,007 jest zbliżona do współczynników mutacji obserwowanych dla układu D5S110 w innych populacjach (8,9). Średnia wartość współczynnika ojcostwa dla badanych „trójek” – 15,5 zbliżona do wartości PI – 14,9 uzyskanej dla innej polskiej populacji (14), wskazuje na dużą przydatność układu D5S110/Hinf I w testowaniu spornego ojcostwa.

WNIOSKI

1. Populacja Polski centralnej nie wykazuje odchyżeń od równowagi Hardy'ego–Weinberga w zakresie systemu VNTR – D5S110/Hinf I.
2. Brak statystycznej znamienności różnic przy globalnym porównaniu różnych populacji może świadczyć o homogenności populacji Polski w zakresie badanego układu.
3. Wskaźniki stopnia polimorfizmu (H, PIC, DP, DI, EP, PI, μ) potwierdzają wysoką zmienność lokus i świadczą o jego dużej przydatności do analiz sądowych w Polsce.
4. Uzyskany rozkład częstości alleli może stanowić wstępną bazę danych do ustalenia częstości wystąpienia określonego genotypu D5S110 w populacji i obliczeń prawdopodobieństwa ojcostwa.

PIŚMIENNICTWO

1. Armour J. A. L., Crosier M., Jeffreys A. J.: Distribution of tandem repeat polymorphism within minisatellite MS621 (D5S110). *Ann. Hum. Genet.*, 1996, 60, 11–20.
2. Armour J. A. L., Povey S., Jeremiah S., Jeffreys A. J.: Systematic cloning of human minisatellites from ordered array charomid libraries. *Genomics*, 1990, 8, 501–512.
3. Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, 32, 314–331.
4. Brenner Ch., Morris J. W.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. *Proceedings to the International Symposium on Human Identification*, 1989, 21–53.
5. Budowle B., Giusti A. M.: Fixed bin frequency distribution for the VNTR locus D5S110 in general United States references databases. *J. For. Sci.*, 1995, 40, 236–238.
6. Budowle B., Giusti A. M., Wayne J. S., Baechtel F. S., Fournery R. M., Adams D. E., Presley L. A., Deadman H. A., Monson K. L.: Fixed bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons. *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 48, 841–855.
7. Budowle B., Klevan L., Eisenberg A. J.: RFLP typing – a new highly polymorphic VNTR locus and chemiluminescent detection. *Adv. in Forens. Haemogenet.*, 5, Bar W., Fiori A., Rossi U. (eds) Springer–Verlag, Berlin, 1993, 245–252.
8. Eisenberg A. J., Clement M., Bever R. A., Gaskill M. E., Carlson D. P., Klevan L.: Further characterization of the VNTR probe LH1 (D5S110) and applications for DNA typing. *Adv. in Forens. Haemogenet.* 5, 1993, 142–144.
9. Eisenberg A. J., Clement M., Gaskill M. E., Carlson D. P., Klevan L.: Characterization of a new single–locus VNTR probe for RFLP analysis: LH1 (D5S110). *Materials from the Second International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis. Forensic Science Research and Training Center, 29.03–2.04.1993.*
10. Fisher R. A.: Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity*, 1951, 5, 95–102

11. Guo S. W., Thompson E. A.: Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992, 48, 361-372. -12. Kloosterman A. D., Budowle B., Riley E. L.: Population data of the HLA-DQ α locus in Dutch caucasians. Comparison with other population studies. *Int. J. Leg. Med.*, 1993, 105, 233-238. -13. Kloosterman A. D., Daselaar P., Budowle B., Riley E. L.: Population genetic study on the HLA-DQ α and the D1S80 locus in Dutch Caucasian. *Proceedings from the Third International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, 1992, 292-335. -14. Koziół P., Tokarzewska J., Krajka A., Mądro R.: Polimorfizm locus D5S110 w populacji Polski południowo-wschodniej i ocena przydatności w ekspertyzie genetycznej ojcostwa. *Postępy Med. Sąd. Krym.*, 1997, 3, 279-288. -15. Lahiri D. K., Nurnberger Jr. J. I.: A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acid Res.*, 1991, 19, 5444. -16. Parker R.E.: Wprowadzenie do statystyki dla biologów. PWN W-wa 1978, 57-64. -17. Nei M., Roychoudhury A. K.: Sampling variants of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 1974, 76, 379-390. -18. Puers Ch., Lins A. M., Spencer C. J., Brinkmann B., Schumm J. S.: Analysis of polymorphic short tandem repeat loci using well - characterized allelic ladders. *Proceedings from the Fourth International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation, 1993, 177-189. -19. Schaap A. P., Akhavan H., Romano L. J.: Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes. *Clin.Chem.*, 1989, 35, 1863-1864. -20. Scharma B. R., Thompson M., Bolding J. R., Zhong Y., Jin L., Chakraborty R.: A comparative study of genetic variation at five VNTR loci in three ethnic groups of Huston, Texas. *J. For. Sci.*, 1995, 40, 933-942.
21. Weir B. S.: Independence of VNTR alleles defined as fixed bins. *Genetics*, 1992, 130, 873-887. -22. Wong Z., Wilson V., Patel I., Povey S., Jeffreys A. J.: Characterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA. *Ann. Hum. Genet.*, 1987, 51, 269-288

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Łodzi
91-304 Łódź
ul. Sędziowska 18a

Jarosław A. Berent, Danuta Miścicka-Śliwka, Jakub Czarny

Średnie wartości szansy ojcostwa – obliczenia dla populacji polskiej*

Mean values of paternity indices – calculations for Polish population

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

W pracy przedstawiono wyniki obliczeń średnich, maksymalnych oraz minimalnych szans ojcostwa dla 52 układów grupowych stosowanych w dochodzeniu spornego ojcostwa. Wyniki uzyskano drogą numeryczną przez obliczenie szans ojcostwa dla wszystkich teoretycznie możliwych kombinacji trójek matka – dziecko – pozwany mężczyzna oraz przez obliczenie odpowiednich średnich zważonych faktyczną częstością populacyjną danej trójki. Wartości średnie wahały się w granicach od 1.0886 (Sese) do 12.2943 (D1S80), wartości minimalne od 0.0004 (Rh) do 2.5435 (D1S7, MS1/Hae III), a maksymalne od 2.0408 (PM HBG) do 1210.0000 (D1S80). Przeprowadzona analiza pozwala na inne niż analiza przydatności (obliczenia teoretycznej szansy wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny) podejście do oceny wartości dowodowej poszczególnych układów w dochodzeniu ojcostwa.

Minimal, maximal and mean values of paternity indices for 52 blood group systems have been presented in this paper. PI values for all theoretically possible combinations of trios mother – child – putative fathers have been calculated using the computing module from Serolog 3.0 computer program. Mean PI ranged from 1.0886 (Sese) to 12.2943 (D1S80), minimum PI ranged from 0.0004 (Rh) to 2.5435 (D1S7, MS1/Hae III), and maximal PI ranged from 2.0408 (PM HBG) to 1210.0000 (D1S80). This analysis allows for different evaluation of evidential value of particular systems in paternity surveys than mean exclusion chance studies.

Słowa kluczowe: szansa ojcostwa, populacja polska, badania ojcostwa

Key words: paternity index, polish population, paternity expertise

* Praca była zaprezentowana podczas XI Krajowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, Łódź 2–5 wrzesień 1998 r.

Szansa ojcostwa PI jest parametrem pozwalającym ocenić wartość dowodową badania w danym układzie podczas badania w sprawach dochodzenia spornego ojcostwa. Jest to parametr obliczany a posteriori, tzn. po oznaczeniu alleli dla całej trójki matka – dziecko – pozwany mężczyzna. Istnieje też możliwość obliczenia średniej wartości PI dla wszystkich teoretycznie możliwych trójek, przy czym obliczona średnia musi być średnią ważoną w stosunku do faktycznej częstości populacyjnej poszczególnych trójek. Taki parametr jest określony a priori, tzn. abstrahując od znajomości alleli w danej trójce. Już z powyższej definicji wynika, że średnia szansa ojcostwa określa faktyczną wartość danego układu w dochodzeniu ojcostwa. Jest więc pewnym analogiem przydatności układu (teoretycznej szansy wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny).

Średnią szansę ojcostwa można obliczać w sposób przybliżony na podstawie wzorów bazujących na heterozygotyczności, ale dokładną wartość można uzyskać dopiero po obliczeniu szans ojcostwa dla wszystkich teoretycznie możliwych trójek w populacji (2).

Celem pracy było porównanie średnich, minimalnych i maksymalnych szans ojcostwa dla układów grupowych stosowanych w badania spornego ojcostwa.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano 52 układy analizowane przez program do obliczeń szansy ojcostwa i prawdopodobieństwa ojcostwa Serolog 3.0 (1). Są to: ABO, Rh, MN, Gm(1), Gm(1,2), Kell, Sese, Km, Hp, C3, ACP, PGM1, PGM1–podtypy, GC, GC–podtypy, GPT, AK, ADA, ESD, GLO I, PGP, vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, LPL, F13B, FESFPS, F13A01, D3S1358, FGA, D1S80, YNZ22, Apo B, Col 2A1, DQA1, PM LDLR, PM GYPA, PM HBG, PM D7S8, PM GC, D1S7 (MS1) dla restrykcji enzymami Hinf I i Hae III, D7S21 (MS31) dla Hinf I, D12S11 (MS43A) dla Hinf I, D5S43 (MS8) dla Hinf I i Hae III i D16S309 (MS205) dla Hinf I.

Obliczenia prowadzono dla danych populacyjnych bez odnoszenia się do konkretnych trójek matka – dziecko – pozwany mężczyzna. Dla każdego układu numerycznie symulowano wszystkie możliwe układy trójek. Dla każdej tak uzyskanej hipotetycznej trójki obliczano wartość szansy ojcostwa PI. Po obliczeniu wartości cząstkowych wyznaczono wartości skrajne (minimalną i maksymalną) oraz wartość średnią (jako średnią ważoną względem faktycznej częstości danej trójki w populacji).

Obliczenia przeprowadzono przy pomocy programu statystycznego napisanego samodzielnie w języku Turbo Pascal 7.0 firmy Borland, bazującego na module obliczeniowym wchodzącym w skład programu Serolog 3.0.

WYNIKI

Wyniki obliczeń przedstawiono w tabeli I. W kolejnych kolumnach zawiera ona nazwę danego układu, minimalną wartość PI spotykaną w obliczeniach, maksymalną wartość i średnią szansę ojcostwa dla tego układu.

Tabela I. Zestawienie średnich szans ojcostwa oraz minimalnych i maksymalnych dla 52 układów grupowych.

Table I. Mean paternity indices and appropriate minimal and maximal values for 52 blood group systems.

Nazwa układu	Minimalne PI	Maksymalne PI	Średnie PI
AB0	0.1817	9.3486	1.9910
Rh	0.0004	588.2400	2.6657
MN	0.8399	2.4710	1.3795
Gm(1)	0.5556	2.7778	1.3065
Gm(1,2)	0.5146	9.0447	1.7344
Kell	0.5108	12.1319	1.4505
Sese	0.7192	2.5608	1.0886
Km	0.5188	7.4019	1.4207
Hp	0.7983	2.6759	1.3830
C3	0.6060	5.7176	1.4278
ACP	0.5421	12.8866	1.8625
PGM1	0.6741	3.8715	1.4042
PGM1-podtypy	0.6026	18.3150	2.3624
GC	0.7229	3.2436	1.3934
GC-podtypy	0.5724	7.9051	1.8576
GPT	0.5005	1111.1111	1.8748
AK	0.5145	33.4610	1.4863
ADA	0.5387	13.9276	1.4667
ESP	0.5476	11.5075	1.4603
GLO I	0.8563	2.4033	1.3785
PGP	0.5128	40.1606	1.9400
vWA	1.0511	163.9344	4.2969
TH01	0.9112	136.9863	3.3062
TPOX	0.6508	29.3255	2.8375
CSF1PO	0.8578	416.6667	4.3131
D5S818	0.7218	416.6667	3.8192
D13S317	0.8914	400.0000	4.3035
D7S820	1.0200	102.0408	3.7986
D16S539	0.8651	204.0816	4.3068

Ciąg dalszy tabeli I.

LPL	0.7000	38.1679	2.8296
F13B	0.7421	434.7826	3.8662
FESFPS	0.6604	208.3333	4.3306
F13A01	0.7553	140.8451	5.3140
D3S1358	0.9766	416.6667	3.8021
FGA	1.5743	416.6667	7.7815
D1S80	0.9139	1210.0000	12.2943
YNZ22	1.1234	277.8611	6.2883
Apo B	0.8099	370.4074	7.3050
Col 2A1	0.6259	109.8901	3.3471
DQA1	0.9183	28.9855	3.3062
PM LDLR	0.8065	2.6316	1.3822
PM GYPA	0.9259	2.1739	1.3758
PM HBGG	0.9804	2.0408	1.3751
PM D7S8	0.8475	2.4390	1.3791
PMGC	0.5376	14.2857	1.8595
D7S21 (MS31)/ Hinf I	1.2105	27.6004	4.3201
D12S11 (MS43A)/ Hinf I	1.1064	20.8000	4.2897
D1S7 (MS1)/ Hinf I	2.3889	34.4000	10.2649
D1S7 (MS1)/ Hae III	2.5435	46.8000	11.7641
D5S43 (MS8)/ Hinf I	1.4167	40.8000	8.7748
D5S43 (MS8)/ Hae III	1.6279	23.3333	6.2749
D16S309 (MS205)/ Hinf I	0.8197	20.0000	2.8150

DYSKUSJA

Obliczone wartości szans ojcostwa zmieniają się w poszczególnych układach w szerokich granicach. Dla większości układów (42/52) spotykane wartości minimalne szans ojcostwa są mniejsze od 1. Oznacza to, że w niektórych przypadkach wykonanie badania w tym układzie zmniejszy całkowitą szansę ojcostwa, a więc obniży wartość dowodową badań. Stanie się tak wówczas, kiedy prawdopodobieństwo spotkania danego zestawu alleli w trójce z dowolnym mężczyzną z populacji będzie wyższe niż w trójce z ojcem biologicznym (4). Dla pozostałych układów (10/52) wartości minimalne są większe od 1, a więc przeprowadzenie badania w tych układach zawsze zwiększy wartość dowodową ekspertyzy. Wartości minimalne wahały się od 0.0004 (Rh) do 2.5435 (D1S7, MS1/Hae III).

Wartości maksymalne wahały się od 2.0408 (PM HBGG) do 1210.0000 (D1S80). Warto zauważyć, że wartość maksymalna zależy nie tyle od polimorficzności danego układu, co od częstości najrzadszego allelu w populacji. Dlatego np. dla stosunkowo mało polimorficznego układu aminotransferazy

alaninowej GPT uzyskano olbrzymią wartość maksymalną. Podobna, jeszcze wyższa wartość dla układu D1S80 nie wynika z mnogości alleli w tym układzie, lecz z faktu, że pewne allele są w nim niezwykle rzadkie.

Wartości skrajne dają obraz zakresu zmienności szans ojcostwa, ale nie oddają faktycznej wartości układu w badaniach ojcostwa. Taką wartość można ocenić dopiero po analizie wartości średnich. Wartości te wahały się w granicach od 1.0886 (Sese) do 12.2943 (D1S80). Dopiero ten parametr jest rzeczywistym odbiciem polimorficzności układu, mało podatnym na „zaburzenia” wnoszone przez pojedyncze, rzadkie allele, spotykane w populacji. Z tabeli I wynika, że układy klasyczne mają niskie średnie szanse ojcostwa. Natomiast układy DNA, zarówno oznaczane PCR jak i z sondą jednolocusową SLP, na skutek wyższej polimorficzności dają znacznie wyższe średnie szanse ojcostwa. Spośród układów DNA jedynie PolyMarker ma bardzo niskie wartości, co znalazło odbicie w praktyce – układ ten po przejściowym zainteresowaniu hemogenetyków nie jest obecnie zupełnie wykorzystywany w badaniach ojcostwa, chociaż ma zastosowanie w badaniach klinicznych (3).

WNIOSKI

1. Średnia szansa ojcostwa jest dobrym estymatorem wartości dowodowej układów polimorficznych.
2. Średnia szansa ojcostwa zależy od polimorficzności układu, natomiast jest mało podatna na wpływ pojedynczych, rzadko spotykanych alleli.
3. Średnie szanse ojcostwa dla układów klasycznych są znacznie niższe niż odpowiednie wartości dla polimorficznych układów DNA.

PIŚMIENNICTWO

1. Berent J.A., Miścicka-Śliwka D.: Algorytm do obliczeń prawdopodobieństwa ojcostwa dla układów dyskretnych i jego praktyczna realizacja. *Post. Med. Sąd. Krym.*, 1997, 3, 301–314. –2. Brenner C., Morris J.W.: Paternity index calculation in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. *Proceedings from the International Symposium on Human Identification 1989*, Promega, Madison 1990, 21–52. –3. Miścicka-Śliwka D., Pleszyńska B.: Polimorfizm locus HLA DQA1 w populacji regionu Pomorsko-Kujawskiego. *Post. Med. Sąd. Krym.*, 1997, 3, 315–318. –4. Szczotka H., Schlesinger D.: Tablice do obliczeń prawdopodobieństwa ojcostwa w populacji polskiej. *Mat. i Prace Antrop.*, 1980, 98, 3–52.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
85–094 Bydgoszcz
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9.

Komunikat

Instytut Ekspertyz Sądowych im. Prof. Jana Sehna w Krakowie oraz Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Lublinie zapraszają do udziału w dorocznym spotkaniu toksykologów sądowych, które odbędzie się w dniach 6-7 maja 1999 roku w Kazimierzu Dolnym.

Program ramowy konferencji:

6 maja (czwartek)

Rozpoczęcie XVI Konferencji Toksykologów Sądowych.

Dowód z opinii biegłego w postępowaniu sądowym.

Prof. dr hab. Tadeusz Tomaszewski z Katedry Kryminalistyki Uniwersytetu Warszawskiego.

Sesja I: „Elektroforeza kapilarna”

Prof. dr hab. Bogusław Buszewski z Zakładu Chemii Środowiska i Ekotoksykologii Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Techniki elektromigracyjne jako nowy kierunek w analityce.

Dr hab. Paweł Kościelniak z Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego i Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie.

Wstrzykowa technika przepływowa w elektroforezie kapilarnej.

Mgr Tomasz Kupiec z Pracowni Hemogenetyki Sądowej Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie.

Wykorzystanie elektroforezy kapilarnej w badaniach hemogenetycznych.

Sesja II: „Doniesienia z bieżących prac badawczych oraz ekspertyz”

7 maja (piątek)

Sesja II c.d.: „Doniesienia z bieżących prac badawczych oraz ekspertyz”

Adres organizatorów:

Zakład Toksykologii Sądowej Instytutu Ekspertyz Sądowych

31-033 Kraków, ul. Westerplatte 9

tel(012) 4228755

Joanna Kulikowska, Halina Sybirska, Artur Soja, Małgorzata Albert

Obserwacje analityczno-toksykologiczne różnych postaci konopi Cannabis Sativa*

Analytico-toxicological observation of different types of cannabis

Z Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. H. Sybirska

Nowa ustawa o przeciwdziałaniu narkomanii przyniosła praktyce toksykologicznej problematykę badań identyfikacyjnych różnych środków roślinnych, będących w obrocie w środowisku narkomanów. Z obserwacji zebranych w Katedrze Medycyny Sądowej w Katowicach wynika, że najczęściej zakwestionowanych przez policję materiałów roślinnych dotyczy różnych postaci konopi. Od grudnia 1997 r. do maja 1998 r. przeprowadzono badania 54 dowodów rzeczowych. Był to susz roślinny w postaci kwiatostanów, łodyg, nasion, sprasowanej krajanki roślinnej, a także pozostałości niecałkowicie wypalonych substancji w fajkach. Oznaczona zawartość głównego składnika konopi – Δ^9 tetrahydrokannabinolu (Δ^9 THC), w suszu roślinnym (17 dowodów rzeczowych) zawarta była w granicach $< 0,1 - 2,8\% >$, w nasionach (9 dowodów rzeczowych) – $< \text{bardzo małe ilości} - 0,63\% >$, a w sprasowanej krajance (13 dowodów rzeczowych) – $< 2,5 - 37\% >$.

When a new law aimed at counteraction of drug abuse was put into force, it brought medico – legal toxicology practice problems connected with the examination of different kinds of the vegetal agents used by drug – addicts.

As it appears from observations made at the Forensic Medicine Department in Katowice, during the last half year the greatest deal of the vegetal material collected by police was cannabis of different kinds.

From December 1997 through May 1998 54 pieces of evidence was examined. This was dried plants in the shape of inflorescences, stems, seeds, slices of dried plants and debris of powdered substances from pipes. After drying to its constant weight, the material was extracted with methanol and then examined by thin – layer chromatography in chosen optimal development systems with use of a Fast Blue reagent showing cannabinoids. Extracts were examined simultaneously with standard solutions of Δ^9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC), Δ^8 tetrahydrocannabinol (Δ^8 THC) and cannabidiol

* Doniesienie przedstawiono na XI Krajowym Zjeździe Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii, Łódź 2–5 wrzesień 1998 r.

(CBD). Further identification examination of cannabinoids and quantitative examinations of Δ^9 THC were carried out by HPLC utilising a diode detector. The content of the main component of cannabis was in the range of <0,1 – 2,8%> in dried plants (17 pieces of evidence), < very small amount – 0,63% > in seeds (9 pieces of evidence), < 2,5 – 37,0% > in slices of dried plants (13 pieces of evidence).

Słowa kluczowe: Δ^9 tetrahydrokannabinol (Δ^9 THC) w suszu konopi, oznaczenie ilościowe, HPLC

Key words: Δ^9 tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) in dried cannabis, quantitative examination, HPLC

Ze współczesnego stanu wiedzy na temat psychoaktywnych substancji zawartych w zielu konopi wynika jasno, że kannabinoidy nie są, jak powszechnie się sądzi, miękkim narkotykiem o niewielkiej szkodliwości.

Ich oddziaływanie w tym głównie Δ^9 tetrahydrokannabinolu (Δ^9 THC), na organizm polega na blokowaniu specyficznego receptora znajdującego się na powierzchni błony komórkowej komórek nerwowych mózgu, a przede wszystkim w mózdzku i podstawowych splotach nerwowych. Zablockowanie tych receptorów zaburza przepływ informacji w centralnym systemie nerwowym ze wszystkimi konsekwencjami zdrowotnymi w psychicznej i fizycznej naturze człowieka.

Upośledzenie funkcji intelektualnych przy sporadycznym zażywaniu kannabinoli jest przemijające. Przy stałej konsumpcji zaburzenia te mogą przejść w stan chroniczny prowadząc do trwałych zmian w osobowości aż do wystąpienia zaburzeń typowych dla schizofrenii (4).

Upowszechniająca się wśród młodzieży moda na palenie marihuany musi więc budzić uzasadnione obawy.

Przyjmowanie bowiem produktów konopi może wytworzyć nałóg zażywania środków odurzających i często stanowi wstęp do przejścia na narkotyki twarde.

Wprowadzenie w życie nowej „Ustawy o przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 24.04.1997 r.” (Dz.U. Nr 75), która uwzględni również cannabis sativa, przyniosło praktyce toksykologii sądowo-lekarskiej problematykę oceny zawartości czynnych substancji odurzających w różnych postaciach konopi będących w obrocie w środowisku narkomanów. Oznaczenie bowiem poziomu Δ^9 THC zgodnie z zapisem Ustawy stanowi podstawę do zaszeregowania zakwestionowanego suszu roślinnego do środków odurzających.

MATERIAŁ I METODY

Dotychczasowa stosunkowo krótka praktyka Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej ujawniła znaczną różnorodność rodzajów i postaci konopi rozprowadzanych przez handlarzy narkotyków.

Od grudnia 1997 r. do obecnej chwili przeprowadzono badania 56 zakwestionowanych produktów roślinnych u osób podejrzanych o handel środkami odurzającymi. Były to próby rozdrobnionego suszu roślinnego, krajanki,

nasion, fragmentów łodyg i kwiatostanów.

Z materiałów tych do analizy pobrano próbki reprezentatywne, które rozdrobiono i suszono do stałej wagi, po czym substancje czynne wyosobniono metodą ekstrakcji za pomocą metanolu (1). Jednorazowa ekstrakcja, jak sprawdzono, była wystarczająca do prawie całkowitego wymycia kannabinoidów z materiału roślinnego. W przypadku dowodów rzeczowych w postaci bardzo niewielkich resztek roślinnych znajdujących się na ściankach wewnętrznych woreczków foliowych, materiał do badania metodą TLC stanowiły podgęszczone popłuczyny metanolowe uzyskane z przemycia tych woreczków. Ekstrakty metanolowe po podgęszczeniu badano metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).

Badania wykonano na płytkach firmy Merck z żelazem krzemionkowym G nr kat. 5553 w wybranym układzie rozwijającym złożonym z eteru etylowego i eteru naftowego o temp. wrzenia 35 – 55 °C w stosunku objętościowym (9:1). Proces chromatograficzny prowadzono dwukrotnie w tym samym układzie rozwijającym. Równoległe z ekstraktami badanymi chromatografowano roztwory wzorcowe Δ^9 THC, Δ^8 tetrahydrokannabinolu (Δ^8 THC) oraz kannabinoli. Do ujawnienia na chromatogramach rozdzielonych substancji zastosowano odczynnik Błękit Sól B (Fast Blue B) (1,5).

Dalsze badania identyfikacyjne wykrytych substancji przeprowadzono metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu aparatu TSP wyposażonego w detektor z szeregiem diod. Proces chromatograficzny badanych ekstraktów prowadzono na kolumnie Spherisorb RP-C-18 5 μ o długości 15 cm i średnicy wewnętrznej 0,46 cm przy pomocy fazy ruchomej złożonej z mieszaniny acetonitrylu i buforu fosforanowego o pH=3 w stosunku objętościowym (7:3) (1,5).

Do analizy ilościowej Δ^9 THC zastosowano również metodę HPLC w oparciu o krzywą wzorcową sporządzoną ze wzorca Δ^9 THC o stężeniu 1mg/ml firmy Promochem.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

W tabeli I przedstawiono rezultaty badań metodą chromatografii cienkowarstwowej niektórych zakwestionowanych materiałów z roztworami wzorcowymi.

Z tabeli wynika, że zawartość głównego składnika czynnego Δ^9 THC w poszczególnych grupach materiału badanego kształtowała się w szerokich granicach.

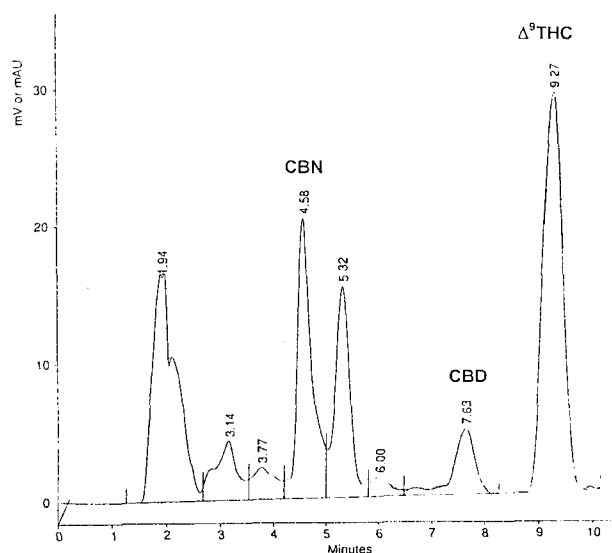
Wskazywać to może na różne pochodzenie narkotyku, w tym również z uprawy krajowej, jego znaczną niejednorodność pod względem doboru fragmentów roślinnych w rozdrobnionym suszu roślinnym (przewaga łodyg nad liśćmi i kwiatostanami). Również czas i warunki przechowania gotowego suszu mogą oddziaływać w znaczący sposób na poziom głównego składnika. Z obserwacji wielu autorów wiadomo, że w czasie przechowywania gotowego suszu w temperaturze pokojowej następuje zmiana poziomu substancji psychoaktywnych w tym Δ^9 THC (2, 3).

Tabela I. Wyniki badania metodą chromatografii cienkowarstwowej w układzie eter etylowy: eter naftowy (9:1)

Table I. Results of examination by TLC in the system of ethyl ether: paraffin oil ether (9:1)

materiał badany material examined	współczynnik rozdziału Rf x 100 Rf x100 values
wzorzec standard Δ^9 tetrahydrokannabinolu (Δ^9 THC)	48
wzorzec standard Δ^8 tetrahydrokannabinolu (Δ^8 THC)	56
wzorzec standard kannabinolu (CBN)	59
wzorzec standard kannabidiolu (CBD)	44
susz roślinny dried plants	0, 12, 44, 48, 56, 58
sprasowana krajanka slices of dried plants	0, 12, 44, 48, 56, 59

Na rycinie 1 przedstawiono rezultaty rozdziału uzyskane za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC) dla substancji wzorcowych i przykładowego dowodu rzeczowego.



Ryc. 1. Chromatogram (HPLC) czynnych składników psychoaktywnych wyosobnionych z suszu konopi

Fig. 1. Chromatogram of psychoactive agents obtained from dried cannabis aparat firmy TSP/apparatus TSP

Objaśnienie do ryciny 1.

kolumna C-18/C-18 column

faza ruchoma: acetonitryl : bufor fosforanowy o pH=5 (7:3)

mobile phase: acetonitrile:phosphoric buffer pH=5 (7:3)

wzorzec Δ^9 tetrahydrokannabinolu (Δ^9 THC) RT- 9,20 min/ Δ^9 THC standard

wzorzec kannabinolu (CBN) RT - 4,58/standard

wzorzec kannabidiolu (CBD) RT- 7,60 min/cannabidiol standard

W tabeli II zebrano wyniki badań ilościowych Δ^9 THC w zbadanych materiałach.

Tabela II. Wyniki badań ilościowych Δ^9 tetrahydrokannabinolu

Table II. Results of quantitative examination of Δ^9 tetrahydrocannabinol

Rodzaj dowodów rzeczowych Type of evidence	liczebność number n	zawartość Δ^9 THC w % Δ^9 THC in %	
			zakres zmienności variation range
susz roślinny w postaci całej rośliny dried plants as whole plants	13	0,14, 0,16, 0,22, 0,38, 0,40, 0,55, 0,87, 0,87, 0,87, 0,93, 1,77, 2,80, 5,45	<0,14 - 5,45>
susz roślinny w postaci liści dried plants as leaves	5	0,10, 0,20, 0,36, 0,55, 4,05	<0,10 - 4,05>
susz roślinny w postaci kwiatostanów dried plants as inflorescence	1	0,10	
susz roślinny w postaci łodyg dried plants as stems	1	niewielkie ilości small amounts	
nasiona barwy oliwkowo-beżowej olive - beige seeds	9	b.m., b.m., b.m., 0,01, 0,01, 0,03, 0,06, 0,33, 0,63	< b.m. - 0,63> „trace”
nasiona barwy ciemnobrązowej dark brown seeds	1	b.m. „trace”	
resztki na ściankach woreczków remains on bag walls	9	b.m., b.m., b.m., b.m., b.m., b.m., „trace” niewielkie ilości/small amounts , 0,21, znaczne ilości/large amounts	
sprasowana krajanka slices of dried plants	14	2,50, 2,50, 2,80, 2,90, 3,00, 3,00, 3,10, 3,10, 3,20, 4,70, 5,20, 8,30, 12,13, 37,00	< 2,50 - 37,00>
wypalone resztki substancji roślinnych z fajek burnt remains of vegetal substances from pipes	3	niewielkie ilości small amounts, znaczne ilości large amounts, 2,76	
razem total	56		

Zastosowany tok postępowania analitycznego umożliwia zadawalające wyosobnienie przy użyciu metanolu substancji psychoaktywnych z różnych postaci konopi. Użyte metody TLC i HPLC pozwalają w oparciu o odpowiednie substancje wzorcowe różnicować poszczególne składniki i oznaczyć ilościowo Δ^9 THC w różnych fragmentach roślinnych.

PIŚMIENNICTWO

1. Borkowski T., Kała M., Gut W., Janowska E., Madej A.: A comparison of the cannabinoid and content of *cannabis sativa* L. of various origin, *Z Zagadnień Nauk Sądowych*, 1995, 31, 23–31. –2. Comparini –Barini I.: Packed column chromatography, high resolution gas chromatography and HPLC in comparison for the analysis of cannabis constituents, *Foren. Sci. Int.*, 1983, 21, 129–137. –3. Hatone G., Cosa E.D.: Analysis of the ageing processes in hashish samples from different geographic origin, *For. Sci. Int.*, 1990, 47, 147–155. –4. Kubalski J., Tobolska-Rydz H.: *Środki uzależniające*. PZWN, Warszawa, 1984. –5. Szukalski B.: *Metody analizy środków odurzających*. Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa, 1997.

Adres pierwszego autora:
Katedra Medycyny Sądowej
40–752 Katowice
ul. Medyków 18