

1992. 56. 89-94. -18. Staśkiewicz J. Mądro R.: Sądowo-lekarska analiza samobójstw z uwzględnieniem materiału sekcyjnego Zakładu Medycyny Sądowej w Lublinie. Arch.Med.Sąd.Krym.1970.20. 55-61. -19. Trela F. Kunz J. Bolechała F. i in.: Przepięstwa przeciwko życiu - analiza porównawcza Materiału krakowskiego Zakładu Medycyny Sądowej w latach 1986-1990 i 1996-2000. Arch.Med.Sąd.Krym.2002.2.1-6. -20. Vanezis P. West I.E. Tentative injures in self stabbing. Forensic Sci. Int. 1983.21.65-70.

Adres pierwszego autora:
Katedra Medycyny Sądowej CM UJ
ul Grzegórzecka 16
31-531 Kraków

Renata Jacewicz, Adam Prośniak, Jarosław Berent, Stefan Szram

Genetyka populacyjna układu D1S80 w regionie centralnej Polski¹

Population genetics of the D1S80 system in a Central Poland region

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Kierownik: prof. dr hab. S. Szram

Przedstawiono bazę danych dotyczącą układu D1S80 opracowaną na podstawie analizy 775-osobowej próby populacyjnej z regionu Polski centralnej. Wykazano stan równowagi Hardy'ego i Weinberga (HWE) z zastosowaniem dwóch niezależnych podejść statystycznych. Przeprowadzono ocenę następujących parametrów przydatności markera do badań w analizowanej populacji: heterozygotyczności - 0.79, PIC - 0.77, PD - 0.93, PE - 0.62, PI - 12.8 oraz współczynnika mutacji - 0.27%.

Population data concerning the D1S80 system based on the analysis of 775 persons from Central Poland region was presented. Accordance with the Hardy and Weinberg equilibrium (HWE) was proved using two different statistical approaches. The parameters for the appropriateness of this marker for investigations in the analysed population was also assessed: heterozygosity - 0.79, PIC - 0.77, PD - 0.93, PE - 0.62, PI - 12.8 and frequency of mutation events - 0.27%.

Słowa kluczowe: lokus D1S80, HWE, populacja Polski centralnej
Key words: D1S80 locus, HWE, Central Poland population

WSTĘP

Lokus D1S80 zlokalizowany na krótkim ramieniu chromosomu pierwszego z 16 pz. jednostką powtarzalną i długością alleli 350-900 pz. to pierwszy system oznaczany techniką PCR w badaniach sądowych w Polsce, w latach dziewięćdziesiątych będący w obowiązkowym zakresie analiz spornego ojcostwa (20).

¹ Temat opracowany w ramach prac własnych uczelni nr 502-11-702(36)

Heterozygotyczność tego bimodalnego układu waha się w granicach: 0.77-0.85 i wiąże się ze stosunkowo wysokimi wartościami siły dyskryminacji i teoretycznej szansy wyłączenia (7, 18, 19, 21). Charakterystyka lokus D1S80 została przeprowadzona dotąd w próbach populacyjnych pochodzących z Polski północnej (16), Polski północno-wschodniej (17), Polski południowej (22), Polski południowo-wschodniej (4), rejonu Pomorza-Kujaw (12), Wielkopolski (9), Górnego i Dolnego Śląska (5,18). Ponadto statystyczna analiza porównawcza rozkładu cech D1S80 w tych regionach wykazała, iż populacja Polski nie jest jednorodna (18). Uzasadnia to potrzebę wypełnienia luki populacyjnej i opracowania własnej bazy danych do obliczeń, co stanowi przedmiot niniejszego opracowania.

MATERIAŁY I METODY

Materiał do badań stanowiła krew pochodząca od osób uczestniczących w 384 ekspertyzach dochodzenia spornego ojcostwa i 15 sprawach kryminalistycznych wykonywanych w Katedrze Medycyny Sądowej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. DNA do badań uzyskano wykorzystując metodę solną izolacji z pełnej krwi (10) bądź z plam w oparciu o membrany jonowymienne wiążące DNA - Spin 10X (zestaw firmy A&A Biotechnology). Amplifikację fragmentów prowadzono wykorzystując zestaw Ampli FLP D1S80 firmy Applera, zgodnie z zaleceniami producenta. Produkt po amplifikacji rozdzielano metodą wertykalnej elektroforezy w nieciągłym systemie buforowym (0,5 x TBE), z wykorzystaniem 6% żelu poliakrylamidowego (Gene Amp firmy Applera) i barwienia srebrem wobec markera wielkości alleli D1S80. Dla uzyskanych rozkładów alleli podano ich częstości oraz górny przedział ufności - UCL (ang. upper confidence limit) dla poziomu ufności 0.95 wg Budowle i Monsona (3). Analiza statystyczna stanu równowagi HW została przeprowadzona w oparciu o test exact z zastosowaniem programu komputerowego GDA (11), a także w oparciu o test χ^2 i test Carmody'ego z pakietu RXC jego autorstwa.

Ocenę przydatności układu do badań przeprowadzono w oparciu o analizę następujących parametrów: heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej (14), zawartości informacji polimorficznej (PIC) (2), siły dyskryminacji (PD) (13), teoretycznej szansy wyłączenia (PE) (23), szansy ojcostwa (1) i współczynnika mutacji.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Uzyskany rozkład alleli D1S80 w populacji centralnej Polski charakteryzuje się pełnym zestawem alleli w zakresie 15-41 powtórzeń 16 pz motywu, bez występowania interalleli, z charakterystycznym bimodalnym rozkładem cech (tabela I).

Tabela I. Rozkład alleli D1S80 w próbie 775 niespokrewnionych dorosłych z regionu centralnej Polski.

Table I. Distributon of D1S80 alleles in a sample of 775 unrelated adults from Central Poland.

Allel	Ilość Number	Częstość Frequency	UCL
15	1	0,000645	0,001264
16	1	0,000645	0,001264
17	4	0,002581	0,002526
18	383	0,247097	0,021473
19	2	0,001290	0,001787
20	37	0,023871	0,007599
21	16	0,010323	0,005032
22	84	0,054194	0,011271
23	20	0,012903	0,005618
24	556	0,358710	0,023877
25	96	0,061935	0,012000
26	35	0,022581	0,007396
27	11	0,007097	0,004179
28	86	0,005548	0,011396
29	39	0,025161	0,007797
30	23	0,014839	0,006019
31	107	0,069032	0,012620
32	10	0,006452	0,003986
33	3	0,001935	0,002188
34	3	0,001935	0,002188
36	11	0,007097	0,004179
37	18	0,011613	0,005334
38	2	0,001290	0,001787
40	1	0,000645	0,001264
41	1	0,000645	0,001264

Równowagę stanu Hardy'ego i Weiberga w badanej populacji sprawdzano dwoma niezależnymi metodami. Ocena zgodności rozkładu obserwowanego i oczekiwanego w populacji niespokrewnionych 775 dorosłych, przeprowadzona w oparciu o test exact, nie wykazała odchylenia od stanu HWE. W kolejnym etapie analizowano znamienność różnic między dwoma kolejnymi pokoleniami biorąc pod uwagę populację 386 niespokrewnionych dzieci (nie prezentowane dane). Z prawa Hardy'ego i Weinberga wynika, że populacja znajduje się w stanie równowagi wtedy, kiedy częstości alleli przy przechodzeniu z jednej generacji do drugiej pozostają niezmiennie. Uzyskane wysokie wartości prawdopodobieństwa w testach chi kwadrat i Carmody'ego potwierdzają że rozkład cech w układzie D1S80 w centralnej Polsce jest zgodny z prawem Hardy'ego i Weiberga (tabela II).

Tabela II. Ocena równowagi Hardy'ego i Weinberga w populacji Polski centralnej.

Table II. Evaluation of the Hardy and Weinberg equilibrium in a Central Poland population.

D1S80/Central Poland	HWE
Dorośli n=775 Adults n=775	Test Exact p =0.9675
Dorośli n=775/Dzieci n=386 Adults n=775/Children n=386	Test Carmody'ego G=9.2205 p=1.0+/- 0 chi ² =7.6827 p=1.0+/- 0

n- liczba osób niespokrewnionych
n- number of unrelated persons

Wskaźniki stopnia polimorfizmu układu D1S80 w badanej populacji zestawiono w tabeli III. Heterozygotyczność obserwowana odpowiada heterozygotyczności oczekiwanej i mieści się w przedziale heterozygotyczności, obserwowanym w innych populacjach Polski: 78.85-84.96% (4, 16, 18, 22). Uzyskane wartości współczynnika dyskryminacji nie odbiegają od analogicznych wartości w innych populacjach: 92.00-94.14% (7, 16, 18, 19, 21), co potwierdza znaczny stopień zmienności układu i jego przydatność do różnicowania osób w rejonie Polski centralnej.

Analizę przydatności układu do badań ojcostwa oceniano obliczając wartości teoretycznej siły wyłączenia i szansy ojcostwa, które zestawiono w tabeli IV.

Teoretyczna szansa wyłączenia mieści się w przedziale wartości uzyskanych w innych populacjach: 60,30-64.90% (8, 18, 21) i nie odbiega od wartości faktycznej siły wyłączeniowej układu uzyskanej na podstawie analizy 384 spraw o ustalenie ojcostwa - 60.76%. Analiza układu D1S80 zwiększa szansę ojcostwa od 0.82 do 1550 razy, a średnia wartość tego parametru w badanej populacji wynosi 12.8.

Tabela III. Parametry polimorfizmu układu D1S80 w populacji Polski centralnej (n=775).

Table III. Parameters of polymorphism for the D1S80 system in a population of Central Poland (n=775).

	H obs.	H ocz.	PD	PIC
D1S80	79,23%	79,37% - 1.03%	93,48%	77,07%

H obs. (observed heterozygosity) - heterozygotyczność obserwowana

H ocz. (expected heterozygosity) - heterozygotyczność oczekiwana

PIC (polymorphism information content) - zawartość informacji polimorficznej

PD (power of discrimination) - siła dyskryminacji

Tabela IV. Parametry przydatności układu D1S80 do badań ojcostwa w populacji Polski centralnej.

Table IV. Parameters for usefulness of the D1S80 system for paternity testing in a Central Poland population.

	PE	PI		
		Min.	Średnia Average	Max.
D1S80	62,16%	0.82	12.8	1550

PE (power of exclusion)- siła wyłączenia

PI (paternity index) - szansa ojcostwa

Kolejnym elementem analizy była ocena częstości występowania mutacji w lokus D1S80 biorąc pod uwagę 385 mejoz matczyńskich i 342 mejoz ojcowskich. Ojcostwo lub macierzyństwo zostało potwierdzone na podstawie badania jednego/dwóch układów typu MLP oraz co najmniej 4 wysoce polimorficznych układów typu SLP. Wyniki analizy zebrano w tabeli V. Całkowity współczynnik mutacji układu wyniósł 0,275% w badanej populacji. W ośrodku wrocławskim ujawniono 2 przypadki mutacji w całkowitej liczbie 741 analizowanych mejoz, co daje bardzo zbliżoną wartość współczynnika mutacji układu 0,270% (6). Analiza 2462 mejoz przeprowadzona w populacji czeskiej ujawniła wartość całkowitą współczynnika mutacji układu D1S80- 0.203% (0.162% w mejozach matczyńskich i 0.244% w mejozach ojcowskich).

Tabela V. Analiza częstości mutacji w lokus D1S80 w populacji Polski centralnej.

Table V. Analysis of mutation event frequency in locus D1S80 in a Central Poland population.

D1S80	Liczba mejoz Meioses no		Niezgodność Inconsistency		Współczynnik mutacji Frequency of mutation events
	matczyne maternal	ojcowskie paternal	mat- ka/dziecko mother/child	ojciec/dziecko father/child	
Central Poland	385	343	1 (0,260%)	1 (0,291%)	0,275 %

PODSUMOWANIE

Wykazano zgodność z równowagą Hardy ego i Weinberga populacji Polski centralnej w zakresie rozkładu cech w lokus D1S80 stosując dwie niezależne metody statystyczne. Uzyskane rozkłady alleli oraz obliczone wartości parametrów biostatycznych potwierdzają przydatność układu D1S80 w analizach sądowych w badanej populacji i pozwalają na obliczenia wartości szansy ojcostwa i siły dyskryminacji w konkretnych ekspertyzach. Przeprowadzone obliczenia ujawniły nie braną wcześniej pod uwagę wartość wskaźnika częstości mutacji w lokus, wynoszącą w populacji Polski centralnej 0.275%.

PIŚMIENNICTWO

1. Berent J.A., Miścicka-Śliwka D., Czarny J.: Średnie wartości szansy ojcostwa -obliczenia dla populacji polskiej. Arch. Med. Sąd. Krym., 1999, 49, 11-15 - 2. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W.: Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet., 1980, 32, 314-331. - 3. Budowle B., Monson K.L.: Perspectives on the fixed bin method and the floor approach/ ceiling principle. Proceedings from the Fourth International Symposium on Human Identification, Promega Corporation 1992, Madison WI, 391-406. - 4. Ciesielka M., Koziół P., Krajka A.: Allele frequency distributions of D1S80 in the Polish population. Forensic Sci. Int., 1996, 81, 141-147. - 5. Dobosz T.: Częstości wybranych genów warunkujących polimorfizm genetyczny w obrębie populacji dolnośląskiej. Rozprawa na stopień doktora habilitowanego. Wrocław 2000, 55-58. - 6. Dobosz T., Dmochowska G., Kowalczyk E., Szczepaniak M., Jagielski J.: Przypadki „wewnętrznej sprzeczności” poszczególnych elementów ekspertyzy DNA w sprawach o ustalenie spornego ojcostwa. Post. Med. Sąd. i Krym., Wrocław 1997, 323-327. - 7. Kloosterman A.D., Budowle B., Daselaar P.: PCR-amplification and detection of

the human D1S80 VNTR locus. Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis. Int. J. Leg. Med., 1993, 105, 257-264. - 8. Koziół P., Ciesielka M.: Ocena przydatności badań VNTR lokus D1S80 w sprawach spornego ojcostwa. Arch. Med. Sąd. Krym., 1994, 44, 459-465. - 9. Kwiatkowska J., Dziechciowska K., Lisiecka D., Słomski R.: DNA polymorphism in locus D1S80 in Poland. DNA profiling and detection of a new alleles by heteroduplex formation between alleles of the same size. J. Appl. Genet., 1997, 38. - 10. Lahiri D.K., Nurnberger Jr. J. I.: A rapid non enzymatic method for RFLP studies. Nucleic Acids. Res., 1991, 19, 5444.

11. Lewis P.O., Zaykin D., Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0, 1997, <http://chee.unm.edu/gda/> 224. - 12. Miścicka-Śliwka D., Syroczyńska A., Śliwka K., Berent J.A.: Investigation of D1S80 VNTR lokus in a Polish population. Acta Med. Leg., 1994, 44, 72-73. - 13. National Research Council Report II. The Evaluation of Forensic DNA Evidence. National Academy Press, Washington D. C. 1996, 96-97. - 14. Nei M., Roychoudhury A. K.: Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics 1974, 76, 379-390. - 15. Paternity testing workshop of the English Speaking Working Group of the IFSG, 2002 (draft report). - 16. Pawłowski R.: Polimorfizm lokus D1S80 człowieka w populacji Polski Północnej, badany techniką PCR. Genetyka populacyjna oraz zastosowanie do badania śladów biologicznych Arch. Med. Sąd. Krym., 1995, 45, 247-256. - 17. Pepiński W., Skawrońska M., Janica J.: Human population genetics of the VNTR locus D1S80 in the north-eastern Poland., 1996, Roczn. Akad. Med. Białymst. 41, 316-320. - 18. Raczek E., Polimorfizm układu D1S80 w populacji Górnego Śląska; jego przydatność w badaniach spornego ojcostwa., Arch. Med. Sąd. Krym., 2000, 50, 57-65. - 19. Sajantila A., Budowle B., Ström M., Johnsson V., Lukka M., Peltonen L., Ehnholm Ch.: PCR amplification of alleles at D1S80 locus: comparison of a Finish and a North American Caucasian population sample, and forensic casework evaluation. Am. J. Hum. Genet., 1992, 50, 816-825. - 20. Stojanowska W, Miścicka-Śliwka D.: Dowód z badań DNA, a inne dowody w procesach o ustalenie ojcostwa, Wydawnictwo Prawnicze, W-wa 2000, 129.

21. Thymann M., Nellesmann L.J., Masumba G., Irgens-Möller L., Morling N.: Analysis of the locus D1S80 by amplified fragment length polymorphism technique (AMP-FLP). Frequency distribution in Danes. Intra and inter laboratory reproducibility of the technique. For. Sci. Int., 1993, 60, 47-56. - 22. Turowska B., Sanak M., D1S80 VNTR locus genotypes in population of south Poland; meta-analysis pointer to genetic disequilibrium of human populations., Forensic Sci. Int., 1995, 75, 207-216. - 23. Weir B.S. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sutherland, Massachusetts 1996, 101-108, 209-211.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej UM w Łodzi

ul. Sędziowska 18 a

91-304 Łódź

e-mail: forensicrenia@bg.am.lodz.pl