

w medycynie sądowej. Arch. Med. Sąd. Krym., 2000, 50, 199-206. -17. Szczerkowska Z., Kapińska E., Wysocka J., Jezierski G.: Rzadki wariant STR locus HumCSFIPO. Arch. Med. Sąd. Krym., 2001, 51, 315-319. -18. Turowska M.B., Sanak M., Opolska-Bogusz B.: Częstości alleli systemów STR: D13S317, D7S820 i D16S539 w populacji Polski Południowej. Arch. Med. Sąd. Krym., 2000.50, 193-197. -19. Turowska B., Sanak M., Opolska-Bogusz B.: Wstępne badania populacji Polski Południowej w zakresie 10 STR loci z zestawu AmpFISTR SGM Plus. Arch. Med. Sąd. Krym., 2001, 51, 93-96. -20. Urquhart A., Oldroyd N.J., Kimpton C.P., Gili P.: Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. Biotechniques, 1995, 18, 116-121.

21. Walsch S.J.: Commentary on article of Margolis-Nunno et al., J.Forensic Sci., 2002, 47.

Adres autora:

Katedra Medycyny Sądowej Śląskiej AM
ul. Medyków 18
40-752 Katowice
e-mail: medsad@slam.katowice.pl

Ewa Raczek

Opiniowanie w sprawach sądowego ustalenia ojcostwa względem bliźniąt w praktyce Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach w latach 1996-2003*

Mono - and dizygotic twins in forensic paternity testing in practice at the Department of Forensic Medicine (Silesian Academy of Medicine, Katowice) in the years 1996-2003

Z Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach
Kierownik: dr hab. Z Olszowy - profesor Śląskiej AM

Opiniowanie spraw spornego ojcostwa z udziałem bliźniąt jednojajowych w praktyce KMS ŚAM w Katowicach pozwoliło ukazać ich idealną zgodność pod względem badanych markerów genetycznych - nawet mutacja uwidoczniła techniką RFLP-VNTR (MZ1.3/Hae III) wystąpiła u obu bliźniaczych siostr. W przypadku bliźniąt dwujajowych wykazano zdecydowane zróżnicowanie szans i prawdopodobieństw ojcostwa będące konsekwencją niezależnej segregacji cech w pierwszym - redukującym podziale mejotycznym. Natomiast rzadki, pozadrambinowy allel 16 w lokus CSF1PO został przekazany przez pozwanego zarówno córce jak i synowi - bliźniaczemu rodzeństwu.

Giving an opinion on disputable paternity, concerning monozygotic twins in practice at the Department of Forensic Medicine (Silesian Academy of Medicine, Katowice) demonstrated their ideal agreement according to examined genetic markers possible. Even the mutation, which was revealed using the RFLP-VNTR method was the same for both twin sisters. In the case of dizygotic twins a firm differentiation of paternity index and probability of paternity was proved. This was the consequence of independent features segregation in first, reductive meiotic division. While the rare, out-ladder allele 16 at the CSF1PO locus was transmitted to both twins: a daughter and a son by the putative father.

Słowa kluczowe: bliźnięta jedno- i dwujajowe, sądowe ustalenie ojcostwa

Key words: mono- and dizygotic twins, forensic paternity testing

WPROWADZENIE

Ciąża bliźniacza to rodzaj ciąży wielopłodowej, gdzie ma miejsce jednoczesny rozwój dwóch płodów. Bliźnięta jednojajowe MZ (monozygotyczne, identyczne) powstają wtedy gdy z nieznanymi przyczynami następuje podział jednej zapłodnionej komórki jajowej na dwie, z których rozwijają się genetycznie identyczne płody. W szczególnym przypadku mutacji bliźnięta MZ mogą się różnić genetycznie (7). Bliźnięta dwujajowe DZ (dizygotyczne, braterskie) powstają w wyniku zapłodnienia 2 jaj (owulujących w jednym cyklu - superfekundacja lub w następujących po sobie, skróconych cyklach - superfetacja) przez 2 plemniki; genetycznie są więc nie bardziej podobne niż rodzeństwo nie bliźniacze. Skoro bliźnięta dwujajowe wymagają dwóch plemników do zapłodnienia, to każde z bliźniąt może mieć innego ojca - szczególnie przypadek DZ to bliźnięta dwuojcowskie (7).

Ciąże bliźniacze zalicza się do ciąży wysokiego ryzyka; obserwuje się bowiem sześciokrotnie większą umieralność i ośmiokrotnie częstsze przedwczesne porody w tej grupie w porównaniu z ciążami jedno- i dwupłodowymi (10).

Praca przedstawia opiniowanie spraw spornego ojcostwa względem bliźniąt w praktyce KMS ŚAM w Katowicach w latach 1996-2003.

MATERIAŁ I METODY

Opiniowanie w przedstawionych sprawach spornego ojcostwa względem bliźniąt opierało się o badania polimorfizmu DNA zarówno metodami RFLP-VNTR (z jedno- i wielolokusowymi próbkami) jak i PCR-VNTR (AmpliFLP i STR). W pewnych sprawach prowadzono również fenotypowanie metodami serologii klasycznej.

DNA izolowano zmodyfikowaną metodą Kunkela i wsp., (8).

Restrykcję, elektroforezę poziomą, hybrydyzację z próbkami jedno- i wielolokusowymi oraz barwienie w układzie NBT/BCIP prowadzono zgodnie z instrukcjami firm Biotest i Cellmark - producentów stosowanych zestawów do profilowania ludzkiego DNA (2, 3, 4).

Amplifikację, elektroforezę pionową, barwienie srebrem oraz fenotypowanie w oparciu o drabiny alleliczne wykonywano zgodnie z rekomendacją firm Perkin Elmer i Promega - producentów zastosowanych mono- i tripleksów: D1S80, LPL, F13B, HPRTB, CTT, SilverSTR^{III} i FFV (9, 11).

Szansę ojcostwa (PI) i prawdopodobieństwo ojcostwa (P) liczone stosując programy komputerowe Berenta (1) i Dudka (5).

Statystykę urodzeń bliźniąt na terenie województwa śląskiego podano za Departamentem Analiz i Udostępniania Informacji GUS w Warszawie i Katowicach.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Statystykę porodów bliźniaczych w województwie śląskim przedstawia tabela I. Z danych w niej zawartych wynika, że 1.96% ogólnej liczby rozwiązań stanowią urodzenia bliźniąt, czyli 2 porody na 100, to porody bliźniacze. W rasie kaukazo-oidalnej bliźnięta rodzą się raz na 100 odebranych porodów, zaś u Azjatów jeszcze rzadziej (6, 10). Czy podwyższona na Górnym Śląsku liczba ciąż bliźniaczych, zaliczanych do ciąż nieprawidłowych może być daleką konsekwencją zanieczyszczeń środowiskowych regionu. Trudno wnioskować. Nie ma bowiem rozróżnienia wśród rodzących się bliźniąt na jedno- i dwujajowe; podana zaś liczba bliźniąt jest liczbą urodzeń żywych i martwych. Z literatury (6) wynika, że uwarunkowania genetyczne (cech rodzinna) dotyczą tylko bliźniąt dwujajowych.

Tabela I. Liczba porodów bliźniaczych i w ogóle na terenie województwa śląskiego (katowickiego) w latach 1996 - 2002.

Table I. Number of twins and total births in the Silesian (Katowice)

Województwo Province Lata Years	Liczba porodów, n Number of births, n	
	bliźnięta twins	ogółem total
Województwo katowickie Province of Katowice		
1996	703	37 298
1997	741	35 562
1998	596	34 232
Województwo śląskie Silesian province		
1999	852	42 232
2000	778	42 503
2001	840	40 986
2002	815	39 557
I	5 325	272 370

Względem niektórych z bliźniąt prowadzone jest sądowe ustalenie ojcostwa. Tabela II przedstawia udział (1.11%) spraw bliźniąt w ogólnej liczbie spraw spornego ojcostwa prowadzonych w KMS ŚAM w Katowicach w latach 1996-2003.

Tabela II. Udział spraw spornego ojcostwa względem bliźniąt w ogólnej liczbie sądowych spraw ustalenia ojcostwa w praktyce KMS ŚAM w latach 1996-2003.

Table II. Number of forensic paternity testing for twins within a total number of paternity testing in the practice of the Department of Forensic Medicine (Silesian Academy of Medicine) in the years 1996-2003.

Lata Years	Sprawy spornego ojcostwa, n Paternity testing, n		
	Ogółem Total	MZ	DZ
1996	26	0	0
1997	45	1	0
1998	66	0	0
1999	84	1	0
2000	81	0	0
2001	94	0	0
2002	98	0	1
2003	135	1	3
	629	3	4

Tabela III stanowi przegląd spraw prowadzonych względem bliźniąt jednojajowych z podaniem wartości szansy (PI) i prawdopodobieństwa ojcostwa (P) uzyskanych po przeprowadzonych badaniach. Opiniowanie sprawy z 1997 roku (6/56-59/97/DNA) w oparciu o techniki RFLP-VNTR (MZ1.3 i MS8/ HaeIII) i PCR-VNTR (D1S80, TH01, VWA), bo takie były ówczesne wymogi Komisji Hemogenetyki Sądowej PTMSiK, dało o wiele niższe wartości PI i P niż te policzone - dla potrzeb niniejszej pracy - w oparciu o fenotypowanie Ampli FLP- i STRowych loci (D1S80, LPL, F13B, CTT, SilverSTR@III i FFV) oraz układy serologii klasycznej. Wystąpienie mutacji (MZ1.3/Hae III - (12)) spowodowało zaniżenie prawdopodobieństwa liczonego z MLP.

Tabela III. Prawdopodobieństwo ojcostwa (P) i szansa ojcostwa (PI) w sprawach spornego ojcostwa z udziałem bliźniąt jednojajowych.

Table III. Probability of paternity (P) and paternity index (PI) in paternity testing for monozygotic twins.

Ekspertyza Expertise	Płeć Sex	P_{rMLP}	PI_{rIMLP}	p_{rsi}	PI_{rIsL}
56 - 59/97	żeńską female	0.999987	81 105	0.999999	1 333 426
246 - 249/99		-	-	-	-
52 - 55/03		0.999991	114 880	0.999878	8 218

Zupełnie odmiennie kształtuje się prawdopodobieństwo ojcostwa obliczone w sprawie 6/52-55/03/DNA po przeprowadzeniu badań techniką PCR-STR w zakresie 11 loci. Brak wymaganego w 2003 roku przez Komisję Hemogenetyki Sądowej prognozy prawdopodobieństwa ($P=0.99999$) uznającego pozwanego za biologicznego ojca z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością wymógł konieczność uzupełnienia badań polimorfizmu DNA o techniki RFLP-VNTR (33.15/Hinf I), które to pozwoliły osiągnąć konieczne prawdopodobieństwo ($P=0.99999$).

W trzeciej ze spraw z udziałem bliźniąt MZ pozwanego wykluczono jako ojca spornych bliźniaczek (tabela III).

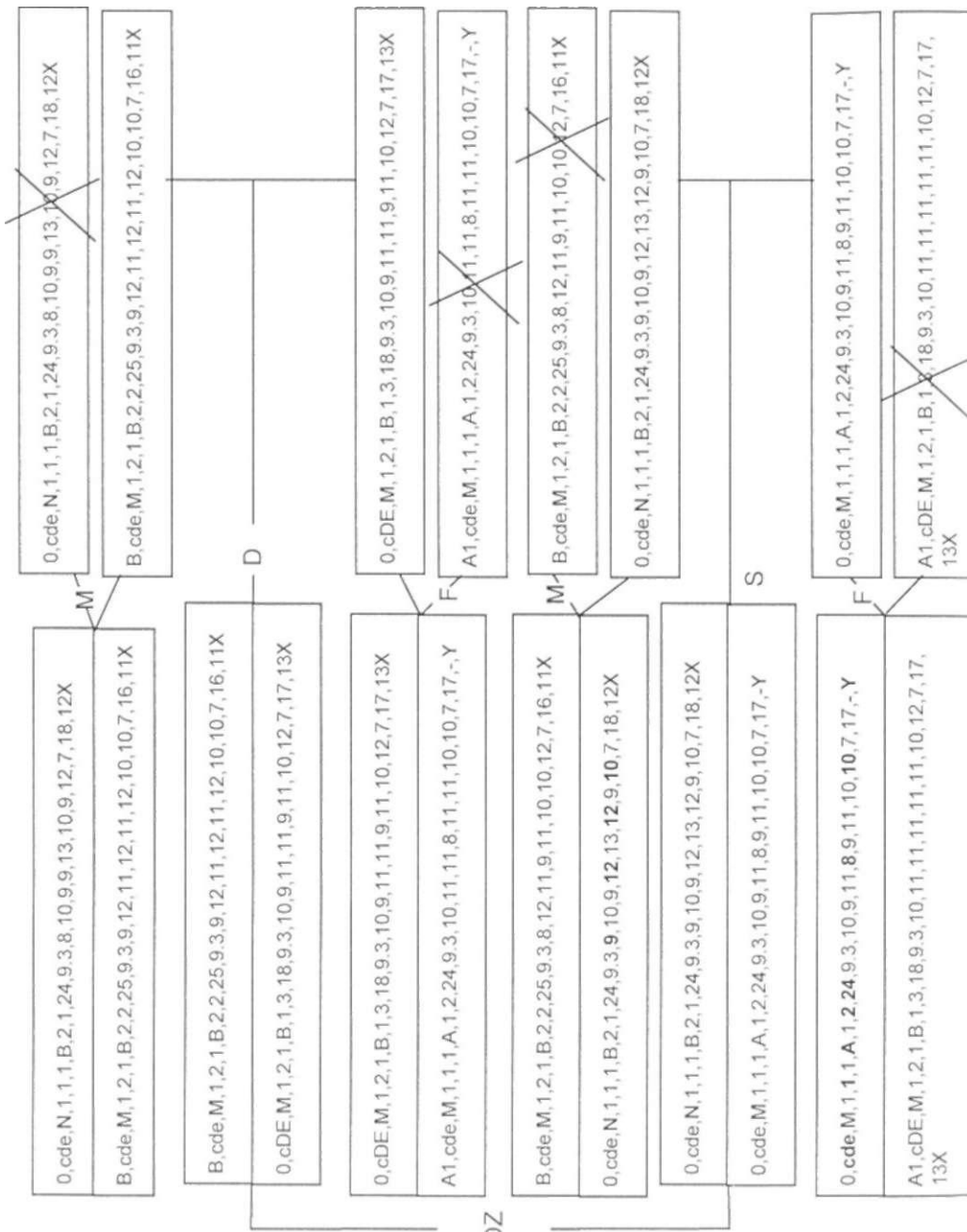
Tabela IV. Prawdopodobieństwo ojcostwa (P) i szansa ojcostwa (PI) w sprawach spornego ojcostwa z udziałem bliźniąt dwujajowych.

Table IV. Probability of paternity (P) and paternity index (PI) in forensic paternity testing for dizygotic twins.

Ekspertyza Expertise	Płeć Sex	PI _{SL}	PI _{ISL}	P _{2SL}	PI _{2SL}
261 - 264/02	żeńską (1) i męską (2) female (1) and male (2)	0.999971	35 207	0.999980	51 970
39 - 43/03	żeńską (1) i męską (2) female (1) and male (2)	0.999999999	5 924 892 823	0.999999	6 500 232
126 - 129/03	żeńską (1 ; 2) female (1 and 2)	0.999974	39 998	0.999993	147 992
158-161/03	żeńską (1) i męską (2) female (1) and male (2)	-	-	-	-

Natomiast podobna analiza danych z tabeli IV, w której zebrano szansę ojcostwa (PI) i jego prawdopodobieństwo (P) w sprawach bliźniąt dwujajowych ukazuje zróżnicowanie wskaźników statystycznych mówiących o ojcostwie względem każdego z badanych bliźniąt.

Prześledźmy na przykładzie sprawy 6/39-43/03/R/DNA uwarunkowania (powody) tych różnic. Niezależna segregacja cech podczas dwóch odrębnych mejozycznych podziałów redukujących (Ryc. 1 - wytłuszczony druk) różnicuje (dyskryminuje) syna pozwanego w porównaniu z jego córką pod względem PI i P. Tabela V wskazuje, które z loci dają uprzywilejowanie bliźniaczce, a które bliźniakowi; zaś fenotypowanie w których z loci skutkuje takimi samymi wartościami PI i P. W 10 (48%) z 21 badanych loci szansa ojcostwa dla obu bliźniąt jest taka sama, w pozostałych 11 (52%) odmienna. Uprzywilejowanie córce przynosi 8 loci - najwyższą wartość PI i P osiągnięto w układzie PGP (serologia klasyczna). Dodatkowo wzmacnia opiniowanie na rzecz biologicznego ojcostwa pozwanego względem córki locus HPRTB, choć bez wymiernej wartości liczbowej. Tylko w 3 z badanych loci pozwany osiąga wyższe wartości PI i P względem syna niż córki. Również w sprawie 6/126-129/03/DNA, mimo iż bliźnięta są tej samej płci, to względem jednej z córek pozwany osiąga prawdopodobieństwo ojcostwa o jeden rząd wielkości wyższe niż względem drugiej.



Ryc. 1. Dziedziczenie alleli w układach serologii klasycznej i w STRowych loci (kolejność układów jak w tabeli V) w czwórce: matka (M) - dwujajowe bliźnięta (DZ): córka (D) i syn (S) - domniemany ojciec (F).
 Fig. 1. Heredity of alleles in systems of classical serology and at STRs (succession of systems as in table V) in quartet: mother (M) - dizygotic twins (DZ): daughter (D) and son (S) - putative father (F).

Tabela V. Częstkowe i łączne wartości szansy ojcostwa (PI) względem każdego z bliźniąt dwujajowych w przykładowej sprawie 39 - 43/03.

Table V. Partial and combined paternity index (PI) for each of the dizygotic twins in exemplary expertise 39 - 43/03.

Układ System	Fenotypy Phenotypes				PI	
	Matka Mother	Córka Daughter	Syn Son	Domniemany ojciec Putative father	Dla córki For daughter	Dla syna For son
ABO	B	B	0	A1	0.4584	0.6805
Rh	ccddee	ccDEe	ccddee	ccDEe	3.7207	1.1531
MN	MN	M	MN	M	1.6798	1.0000
Hp	1	1	1	1	2.6759	2.6759
PGM1	2-1	2	1	2-1	1.9357	0.6741
ESD	1	1	1	1	1.0952	1.0952
ACP	B	B	BA	BA	0.8964	1.3714
GLO	2	2-1	2-1	1	2.4033	2.4033
PGP	2-1	3-2	2-1	3-2	20.0803	0.5128
D1S80	24-25	18-25	24-24	18-24	2.3092	1.5125
TH01	9.3-9.3	9.3-9.3	9.3-9.3	9.3-9.3	3.2258	3.2258
TPOX	8-9	9-10	9-10	10-10	14.0200	14.0200
CSF1PO	10-12	9-12	9-10	9-11	11.6667	11.6667
D13S317	9-11	11-11	9-11	11-11	2.6022	2.1407
D7S820	9-12	11-12	8-12	8-11	2.5362	2.8455
D16S539	11-13	9-11	9-13	9-11	5.3030	5.3030
LPL	10-12	11-12	11-12	11-11	3.6269	3.6269
F13B	9-10	10-10	9-10	10-10	2.3810	1.5184
FESFPS	10-12	10-12	10-10	10-12	2.2801	1.7413
F13A01	7-7	7-7	7-7	7-7	2.9536	2.9536
VWA	16-18	16-17	17-18	17-17	3.3981	3.3981
HPRTB	11-12	11-13	12 -	13 -	-	-
				Łączne PI Combined PI	5 924 892 823	6 500 232

Stygmat „ślepego losu”?! niech unaoczní tabela VI, w której na użytek tej pracy pokazano faktyczne dziedziczenie w czwórce: matka - bliźnięta dwujajowe - domniemany ojciec i przekazywanie cech „sfalszowane” tylko w jednym z badanych loci, w którym to u pozwanego i jego potomstwa wystąpił rzadki, pozadrabinowy allel. Falsz polegał na zastąpieniu u córki w locus CSF1PO rzadkiego allela 16 powszechnym allelem 12. Wyliczone prawdopodobieństwo ojcostwa względem „sfalszowanej” córki wynosi 0.9843, a więc jest zaledwie bardzo prawdopodobne (PI=62), zaś z prawdopodobieństwem wyliczonym dla

syna równym 0.99999995 (PI=23294992), pozwany jest zgodnie z wymogami Komisji Hemogenetyki Sądowej PTMSiK uznany ojcem biologicznym.

Zastosowany fałsz pozwolił przejawiać niepokój wnioskowania o ojcostwie względem bliźniąt DZ gdy występują tak znaczne różnice w obliczonych PI i P. Gdyby nie brać pod uwagę „sfalszowanego” fenotypu bliźniaczki w lokus CSF1PO, to różnice w obliczonych PI i P dla każdego z bliźniąt pozostają dalej znaczne. Względem córki (P=0.999978, PI=45526) pozwany nadal nie spełnia wymogów Komisji Hemogenetyki Sądowej, by móc nazwać go biologicznym ojcem z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością.

Tabela VI. Jedna z wielu możliwości segregacji cech rodzicielskich u bliźniąt dwujajowych; szanse ojcostwa (PI) dla każdego z bliźniąt (7 - 10/04).

Table VI. Exemplary segregation of parental alleles in dizygotic twins; paternity index for each of the twins (7 - 10/04).

Lokus Locus	Fenotypy Phenotypes				PI	
	Matka Mother	Córka Daughter	Syn Son	Domniemany ojciec Putative father	Dla córki For daughter	Dla syna For son
TH01	8-9.3	9.3-9.3	7-8	7-9.3	1.4573	3.4836
TPOX	8-11	8-8	9-11	8-9	0.9033	4.7438
CSF1PO	10-12	12-16 10-12'	12-16	12-16	625.0000 0.8620'	625.0000
D13S317	12-12	11-12	8-12	8-11	1.3931	3.8343
D7S820	11-12	10-11	12-13	10-13	1.8663	19.3050
D16S539	12-13	11-12	11-13	11-12	1.6441	1.6441
VWA	15-16	16-17	15-17	17-17	3.6456	3.6456
FESFPS	10-11	11-11	10-10	10-11	1.1140	1.8234
F13A01	3.2-6	6-6	3.2-6	6-6	3.1867	2.8530
				Łączne PI Combined PI	45 526 62"	23 294 992

* - sfalszowany fenotyp w lokus CSF1 PO

* - imitated phenotype at the locus CSF1 PO

Przywołane tu sprawy spornego ojcostwa z udziałem bliźniąt ukazują wystąpienie mutacji, pozadrambinowego allela czy fizjologicznych procesów superfekundacji i superfetacji. Przynoszą również zaniepokojenie wnioskowaniem o ojcostwie przy tak zróżnicowanych wartościach PI i P względem każdego z bliźniąt. Należy mieć nadzieję, że mimo różnic w P pozwani w przedstawionych sprawach są biologicznymi ojcami względem obu bliźniaków, gdyż w żadnej ze wzmiankowanych czwórek nie znaleziono u badanych bliźniąt cechy obcej, której wcześniej nie byłoby u ich biologicznych rodziców.

PIŚMIENNICTWO

I. Berent J. A. : Program komputerowy „Ojcostwo”, 1998. - 2. Biotest - B.E.S.T. - probe MZ1.3 digoxigenin, 1992. - 3. Cellmark - Non-isotopic chemilluminiscent enhanced (NICE™) probes. Multi-locus DNA probes (33.15 and 33.6) procedures, 1996. - 4. Cellmark - Non-isotopic chemilluminiscent enhanced (NICE™) probes. Single locus probe and marker probe procedures, 1996. - 5. Dudek G.: Program komputerowy FatRec, 2003. - 6. Girela E., Lorente J.A., Alvarez J.C., Rodrigo M.D., Lorente M., Villanueva E.: Indisputable double paternity in dizygous twins. Fertility and Sterility. 1997, 67, 1159-1161. - 7. Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J., White R.L. Medical Genetics. Mosby St. Louis, 1999. str.:247-250. - 8. Kunkel L.M., Smith K.D., Bayer S.H.! Borgaonkar D.S., Wachtel S.S., Miller O.J., Berg W.R., Jones H.W., Rary J.M.: Analysis of human Y-chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1977, 74, 1245-1249. - 9. Perkin Elmer - Ampli FLP D1S80 PCR amplification kit, 1995. - 10. Pisarski T. (red.) Położnictwo I ginekologia. PZWL, Warszawa, 1998, 528-539.

II. Promega - Gene print[®]STR systems (silver stain detection) - technical manual, 2001. - 12. Raczek E., Berent J.A.: Mutacje zaobserwowane w MLP i SLP wśród tercetów badanych w sprawach spornego ojcostwa. Arch. Med. Sąd Krym., 1999, 49, 161-170.

Adres autora:

Katedra Medycyny Sądowej Śląskiej AM

ul. Medyków 18

40-752 Katowice

e-mail: medsad@slam.katowice.pl