

Monika Majsak

Ortotanazja (poglądy personelu medycznego i stanowisko doktryny)

Orthothanasia (the attitude of the medical personnel and standpoint of the doctrine)

Z Katedry Kryminologii Wydziału Prawa i Administracji Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik Katedry: prof. dr hab. A. Gaberle

W dobie postępu nauk medycznych, nowoczesnych środków leczenia i zapobiegania chorobom ciągle aktualne jest pytanie o sens uporczywego podtrzymywania wszelkimi możliwymi środkami życia osób, które w świetle dzisiejszego stanu medycyny nie rokują szans na przeżycie. Tematem artykułu jest zagadnienie ortotanazji, do której zastosowania często dochodzi w praktyce medycznej, zwłaszcza w dziedzinie intensywnej terapii i transplantologii. Praca przedstawia wyniki badań ankietowych przeprowadzonych wśród personelu medycznego i zestawionych z poglądami reprezentowanymi przez doktrynę, a dotyczących ortotanazji.

In the age of progress of medical sciences, modern medicine, prevention and treatment of diseases, it is still of importance to consider the sense of sustaining lives of patients who, from the current medical point of view, are not expected to survive, even with the best possible treatment. The paper focuses on the question of orthothanasia, which is frequently applied in medical practice, particularly in the fields of intensive care and transplantology. The paper presents results of a survey concerning the issue of orthothanasia, conducted among medical personnel; the findings of the survey have been confronted with the views represented by the doctrine concerning orthothanasia.

Słowa kluczowe: ortotanazja, środki nadzwyczajne, dopuszczalność odłączania pacjenta od aparatury, problem ortotanazji w transplantologii

Key words: orthothanasia, emergency treatment, permissibility of withdrawal of life-support systems, orthothanasia in transplantology

Zagadnienia znajdujące się na pograniczu prawa i medycyny należą nie od dziś do najbardziej kontrowersyjnych, a trudności w dokonaniu jednoznacznej ich

oceny zostały uwidocznione oraz dodatkowo wzmocnione poprzez szybki rozwój nauk przyrodniczych, zwłaszcza medycznych, przy nie nadszającym za nim rozwoju prawa. Fakt ten dostarcza także szeregu rozmaitych wątpliwości interpretacyjnych, pozostających również w związku z posiadanym przez te zagadnienia określonym wymiarem o charakterze etyczno – moralnym, decydującym o zajęciu konkretnej wobec nich postawy. Do takich właśnie kwestii, od wieków wzbudzających spory wśród lekarzy, etyków i prawników, należy eutanazja. Widoczne w jej przypadku przemieszanie wątków etyczno-prawno-medycznych nie pozwala na rozgraniczenie poszczególnych jej aspektów i oznacza niemożność rozpatrywania jej z jednego tylko punktu widzenia. Niniejsze rozważania dotyczą ortotanazji, postrzeganej niekiedy jako odmiana eutanazji (1, 8), w szczególności dotyczą one problemów mających miejsce w praktyce, w dziedzinach intensywnej terapii oraz transplantologii. Zagadnienie ortotanazji jest dziś niezwykle aktualne – kiedy w dobie nowoczesnych środków leczenia i zapobiegania chorobom pojawia się pytanie o sens ciągłego i często agresywnego utrzymywania przy życiu osób nie rokujących żadnych szans na przeżycie.

1. Stały postęp w naukach medycznych prowadzi do rozwiązywania wielu problemów, z jakimi boryka się współczesna medycyna – wiele dawniej nieuleczalnych chorób obecnie nie stanowi zagrożenia dla życia człowieka, a rozwój transplantologii stworzył ogromne możliwości zastępowania niektórych organów człowieka przez przeszczepy i udoskonił metody stosowane w celu pokonania odpowiedzi immunologicznej organizmu biorcy. Wszystkie osiągnięcia nauk medycznych prowadzą czy też w swych założeniach mają prowadzić do zapewnienia jak najskuteczniejszych metod zwalczania chorób, które ciągle jeszcze pozostają nieuleczalne. Medycyna pozwoliła na odróżnianie procesów odwracalnych od nieodwracalnych i stale zwiększa zasoby takich środków medycznych, dzięki którym możliwy jest proces podtrzymywania życia i oddalanie momentu śmierci, jednakże ani ciągle doskonała umiejętność podtrzymywania krążenia, ani nowe środki farmakologiczne i sposoby leczenia nie zawsze doprowadzają do w pełni zadowalających rezultatów. Lekarze wprowadzili coraz częściej ratują człowieka życie, potrafią je jednak utrzymać nie przywracając mu jednocześnie sprawności organizmu pozwalającej na prowadzenie samodzielnego życia. Skutkuje to wzrostem liczby ludzi nieuleczalnie czy też przewlekle chorych, niezdolnych samodzielnie funkcjonować w społeczeństwie i wymagających stałej opieki medycznej. Paradoksalne jest to, iż współczesna medycyna – przedłużając życie – wydłużyła jednocześnie proces umierania, kiedy stan chorych bardziej przypomina wegetację niż życie ludzkie: żyją oni dzięki aparaturze utrzymującej podstawowe funkcje organizmu, a jej odłączenie spowodowałoby szybki zgon. Ponadto postęp w zakresie technologii medycznej, który umożliwił przedłużanie życia ludzkiego i spowodował lepsze możliwości jego ratowania, postawił społeczność lekarską przed koniecznością rozwiązywania problemów, jakie wcześniej nie miały miejsca. Okazało się bowiem, iż

w pewnych sytuacjach zastosowanie aparatury medycznej przedłużającej życie wymaga podjęcia decyzji, którego spośród wielu chorych ratować za jej pomocą. Ów postęp w zakresie aparatury z jednoczesnym ograniczeniem z zakresie dostępności do niej nierzadko zmusza więc lekarzy do wyboru pacjentów, którzy zostaną poddani terapii. W takim właśnie kontekście problem ortotanazji uwidacznia się najczęściej.

Pojęciem przeciwstawnym do ortotanazji jest tzw. dystanazja. Mianem tym określa się w literaturze utrzymywanie przy życiu nieuleczalnie chorego przy zastosowaniu nadzwyczajnych, przeważnie bardzo kosztownych i trudnych do pozyskania środków leczniczych. Zaprzestanie, a nierzadko samo tylko ograniczenie ich stosowania, skutkuje najczęściej zgonem pacjenta. Wskazaniem do podejmowania działań dystanatycznych, mających na celu przeciwdziałanie rozwijającemu się procesowi umierania, powinna być potencjalna zdolność do życia (10, 13). Ograniczone ramy niniejszego opracowania nie pozwalają jednak bliżej zapoznać się z problematyką dystanazji, toteż w kwestii tej należy odesłać do odpowiedniej literatury (6).

2. De lege lata brak jest przepisu, który zawierałby definicję ortotanazji. Pojęcie to znane jest jednak zarówno medycynie, jak i doktrynie prawa karnego, które rozumieją pod nim zaprzestanie przedłużania życia pacjenta, co do którego w świetle aktualnego stanu wiedzy medycznej istnieje niewątpliwe przekonanie o niecelowości dalszego utrzymywania go przy życiu przy pomocy środków określanych mianem nadzwyczajnych, co zwykle oznacza zezwolenie na postęp procesu umierania zdążającego do nieuchronnej śmierci (11, 12). Tak sformułowana definicja zawiera w sobie dwie odrębne kwestie – mianowicie sposób dokonywania ortotanazji oraz pojęcie środków nadzwyczajnych. Co do zagadnienia pierwszego – M. Tarnawski (13, 14) proponuje uważać za ortotanazję jedynie takie postępowanie, które wiąże się z niepodjęciem (zaniechaniem) stosowania odpowiednich środków. Natomiast zaprzestanie stosowania środków nadzwyczajnych, a więc np. odłączenie od aparatury pacjenta, którego dalsze utrzymywanie przy życiu uznano za niecelowe, należałoby traktować – zdaniem tego autora – jako przypadek eutanazji czynnej.

Pogląd ten można zakwestionować. Ze względu na równorzędne traktowanie przez ustawę karną obydwu postaci zachowania się człowieka (działania i zaniechania) przy przestępstwach skutkowych, gdy na sprawcy ciąży prawny, szczególnie obowiązek zapobiegnięcia skutkowi (art. 2 k.k.), trafniejsze wydaje się twierdzenie, iż ortotanazji można dokonać zarówno w drodze działania, np. poprzez czynne odłączenie pacjenta od aparatury medycznej, jeżeli leczenie za jej pomocą nie przynosi pozytywnych rezultatów, jak również poprzez zaniechanie, np. niepodjęcie leczenia wobec terminalnie chorych, nie przyłączenie ich do aparatury czy też niepodawanie leków.

Ponadto nie wydaje się właściwe przyjmowanie za cechę wyróżniającą ortotanazję od innych przypadków eutanazji tylko i wyłącznie kryterium sposobu niepodtrzymywania życia pacjenta. Rozumienie ortotanazji ograniczone poprzez sposób jej dokonania tylko do zaniechania należy wręcz odrzucić, gdyż inaczej taka sama w istocie sytuacja, w jakiej znajduje się chory, cierpiący człowiek, nie

rokujący szans na przeżycie, w zależności od tego, czy w ogóle nie podjęto próby leczenia (zaniechanie), czy też próbę taką podjęto (działanie), raz będzie potraktowana jako ortotanazja, a innym razem jako eutanazja czynna. Tymczasem – jak wynika z definicji ortotanazji, decydujące znaczenie ma nieprzedłużanie życia przy pomocy środków nadzwyczajnych. I jeżeli aparatura, od której odłączony został pacjent, czy też inne zastosowane wobec niego środki, posiadają cechy pozwalające zaliczyć je do kategorii środków nadzwyczajnych, to zaprzestanie ich stosowania należy traktować jako ortotanazję.

3. Czym zatem są środki nadzwyczajne, jakie muszą posiadać cechy i jakie spełniać warunki, aby mogły być czynnikiem decydującym o potraktowaniu danego zachowania jako ortotanazji? Za pomocą jakich kryteriów określać zwyczajność jednego i nadzwyczajność innego środka? Granica między środkami zwyczajnymi a nadzwyczajnymi jest bardzo płynna, trudno jest jednoznacznie wskazać, kiedy dany środek może zostać uznany za nadzwyczajny. Pewne jest to, iż nie można przyznać atrybutu nadzwyczajności danemu środkowi *in abstracto*, ale trzeba w każdym konkretnym przypadku decydować o zakwalifikowaniu go do kategorii nadzwyczajnych i w zależności od okoliczności raz może on zostać uznany za nadzwyczajny, a innym razem nie będzie podstaw do takiego jego określenia.

Z pewnością podstawowym czynnikiem decydującym o nadzwyczajności danego środka medycznego jest kryterium pieniężne, tj. cena środka oraz koszty związane z jego stosowaniem w leczeniu nieuleczalnie chorych osób. Taki punkt widzenia jest z pewnością bardzo drastyczny – może on prowadzić do instrumentalnego *prima facie* traktowania chorych przy umieszczeniu w centrum problemu środków leczniczych spełniających (lub nie) kryteria nadzwyczajności. Jednakże niewiele jest ośrodków medycznych, które są wyposażone w niezbędny, a jednocześnie drogi sprzęt medyczny w ilościach wystarczających do zaspokojenia potrzeb wszystkich pacjentów. Głównie są to kliniki w miastach akademickich, z reguły sponsorowane przez duże zakłady przemysłowe lub różnego rodzaju fundacje, ewentualnie prywatne ośrodki medyczne. Natomiast w szpitalach znajdujących się w małych ośrodkach miejskich brakuje zwykle wszystkiego: od środków higienicznych i podstawowych leków poczynając, poprzez niewystarczającą liczbę personelu i odpowiednio wyposażonych karetek reanimacyjnych, na braku potrzebnej do ratowania życia aparatury skończywszy. Toteż owo kryterium finansowe, przyjęte za wyróżniające środki nadzwyczajne od zwyczajnych, podyktowane jest trzeźwym spojrzeniem na stan polskiej służby zdrowia i świadomością miernego wyposażenia szpitali przy ogromnym zapotrzebowaniu. Należy wyraźnie powiedzieć, że dopóki poszczególne ośrodki medyczne ubogie będą w konieczny do pracy sprzęt medyczny, dopóty będzie istniał przymus zezwalania na śmierć tych, których nie ma czym leczyć, i związany z nim stale aktualny podział środków medycznych na zwyczajne i nadzwyczajne.

Kolejnymi wyznacznikami nadzwyczajności środków medycznych są również, obok kosztów nieodłącznie towarzyszących ich stosowaniu, także dostępność oraz powszechność ich stosowania. Dany środek medyczny jest dostępny wtedy,

gdy jest stosunkowo łatwo osiągalny. Warunek ten jest spełniony, gdy z jego zdobyciem nie są związane trudności natury finansowej, ani materialnej. Ściśle jest z tym skorelowana powszechność stosowania środka – jeżeli jest on dostępny, nic nie stoi na przeszkodzie codziennemu jego stosowaniu. Jednakże nie sposób nie zauważyć, że powyższe kryteria nadzwyczajności pozostają w ścisłym związku z kwestiami finansowymi: jeżeli szpital będzie dysponował środkami na sfinansowanie leczenia przy pomocy danego aparatu, wówczas będzie on dostępny i powszechnie stosowany. Do środków nadzwyczajnych należeć będą zatem – w zależności od konkretnego stanu faktycznego – drogie lekarstwa, specjalistyczny sprzęt medyczny czy tego rodzaju zabiegi lecznicze, których zastosowanie wymaga wysokich nakładów finansowych, przy czym nie ma pewności, że środki te w ogóle zadziałają i przyniosą pożądany skutek w postaci poprawy stanu zdrowia pacjenta (6).

4. Ortotanazja staje się codzienną koniecznością – do jej zastosowania dochodzi niezwykle często, zwłaszcza w przypadkach niecelowości leczenia pacjenta wszystkimi możliwymi środkami czy też konieczności wybierania spośród kilku chorych tych, których życie będzie się podtrzymywać. Problem ortotanazji uwidacznia się także w pewnym stopniu w dziedzinie transplantologii – gdy trzeba zdecydować się na dokonanie lub nie operacji przeszczepienia niezbędnego do życia narządu z ciała dawcy do organizmu biorcy.

Występowanie ortotanazji w praktyce medycznej potwierdziły badania ankietowe, przeprowadzone wśród lekarzy i pielęgniarek w dwóch krakowskich szpitalach (w trzecim nie wyrażono zgody na przeprowadzenie tego rodzaju badań). Wyboru szpitali dokonano metodą losową spośród 15 szpitali w Krakowie, a następnie kwestionariusze pytań rozdano lekarzom i pielęgniarcom pracującym na uzgodnionych z kierownictwem szpitali oddziałach. Ogółem przebadano 56 osób, w tym 30 lekarzy i 26 pielęgniarek. Celem tychże badań była próba poznania stosunku personelu medycznego do eutanazji i związanych z nią kwestii (w ankiecie poruszony został m.in. problem ortotanazji), a w ich wyniku otrzymano szeroki wachlarz poglądów lekarzy i pielęgniarek dotyczących tych zagadnień. Analiza odpowiedzi udzielanych na pytania dotyczące kwestii ortotanatycznych pozwala na potraktowanie uzyskanych wyników badań jako dających przybliżony obraz poglądów personelu medycznego szpitali nie-onkologicznych.

Z przeprowadzonych badań jednoznacznie wynika, iż generalnie ankietowani aprobowali przyspieszanie, przy zaistnieniu pewnych konkretnych okoliczności, śmierci nieuleczalnie chorych osób, właśnie poprzez zastosowanie wobec nich ortotanazji (choć tylko niewielka część badanych – 10% – przyznała, iż w trakcie wykonywania swego zawodu zdarzyło się jej w jakiś sposób przyspieszyć nadejście śmierci nieuleczalnie chorego pacjenta). 52% respondentów (29 osób) opowiedziało się przeciwko uporczywemu stosowaniu wobec nieuleczalnie chorego nadzwyczajnych środków leczniczych, jeżeli nie niosą one ze sobą choćby najmniejszych oznak poprawy stanu jego zdrowia (przy 35% – 20 osób – deklarujących stosowanie w takiej sytuacji środków nadzwyczajnych). Powyższe stanowisko było zajmowane zwłaszcza przez tych respondentów, którzy wykonywali zawód lekarza; pielęgniarce w większym stopniu (50% ogółu

przebadanych pielęgniarek) były skłonne nieustannie leczyć pacjenta przy pomocy owych środków, także wtedy, kiedy ich stosowanie nie powodowało w jego organizmie żadnych zmian na lepsze. Zaznaczyć jednak trzeba, iż 1/5 pielęgniarek zgodziła się z poglądem, że nakłady przeznaczone na utrzymywanie przy życiu osób nieuleczalnie chorych należałoby spożytkować w celu leczenia ludzi, którym rzeczywiście można pomóc.

5. Zgodnie z nową definicją śmierci bezpowrotne ustanie funkcji pnia mózgu jest warunkiem koniecznym i wystarczającym dla rozumienia śmierci mózgu jako całości, a tym samym śmierci człowieka. Toteż wykazanie definitywnego strukturalnego uszkodzenia mózgu, będącego przyczyną zniknięcia funkcji pnia, stanowi dowód śmierci mózgu jako całości (16). Wynika stąd, że wobec osób z nieodwracalnie uszkodzonym pniem nie można rozważać zagadnienia ortotanazji, gdyż odłączenie od aparatury człowieka już zmarłego nie jest zastosowaniem nadzwyczajnych środków leczniczych funkcji życiowych człowieka, co do którego brak jest wprawdzie nadziei na jakąkolwiek poprawę stanu jego zdrowia, ale przecież człowieka żyjącego. Zaznaczmy, że W. Nasiłowski wskazuje na możliwość pojmowania ortotanazji jako rezygnacji z podtrzymywania życia na szczeblu narządowym, czy wręcz na szczeblu komórkowym, jednak wydaje się nie zgadzać z takim podejściem. (6).

Natomiast mimo jednoznacznego określenia kryteriów, kiedy ma miejsce śmierć człowieka, w praktyce często istnieje problem innego rodzaju, dotyczący osób znajdujących się w tzw. przetrwałym stanie wegetatywnym. Stan ten charakteryzuje się tym, iż przy działającym pniu mózgu są zniszczone lub znacznie uszkodzone funkcje kory mózgowej, powodując tym samym pozbawienie takiej osoby jakichkolwiek czynności psychicznych. Wówczas pomimo zachowania krążenia i oddychania człowiek jest pozbawiony – z reguły nieodwracalnie – świadomości i nic nie jest w stanie mu jej przywrócić. Ponadto często w celu zapobieżenia ewentualnej niedrożności dróg oddechowych i zaburzeniom w procesie oddychania, które doprowadziłyby w końcu do niedotlenienia mózgu i w konsekwencji do postępującego jego obrzęku, a następnie do jego śmierci, podłącza się pacjenta do podtrzymującego oddychanie respiratora. Nierzadko również dla utrzymywania przy życiu takich osób wymagane są środki nadzwyczajne, które – podtrzymując funkcje biologiczne organizmu – nie przywracają mu jednak przytomności. Ankietowani (9%) byli przeciwni stosowaniu ortotanazji wobec takich osób, uzasadniając swoje stanowisko przede wszystkim brakiem pewności, iż osoba pozbawiona w danej chwili funkcji kory mózgowej nigdy ich już nie odzyska. Toteż – z uwagi na ograniczenia metodyczne i diagnostyczne oraz stały postęp nauk medycznych – postulowali oni w celu podtrzymywania funkcji organizmów tych osób stosowanie wszystkich dostępnych środków leczniczych (również tych określanych mianem nadzwyczajnych).

6. W kontekście osób znajdujących się w przetrwałym stanie wegetatywnym uwidacznia się natomiast zagadnienie, czym w istocie jest człowiek. Bowiem czy

w stosunku do tych osób, nie potrafiących myśleć, nie będących w stanie nawiązać z nikim jakiegokolwiek kontaktu, ludzi, którzy nie posiadają świadomości swego istnienia, można stosować pojęcie „człowiek”? Pytanie takie jest z pewnością niezwykle drastyczne, odbiera bowiem leżącemu na łóżku żywemu organizmowi cechę odróżniającą go od wielu innych istot żywych: pozbawia go przecież atrybutu człowieczeństwa. Jednakże życie to nie tylko oddychanie, krążenie krwi czy odżywianie, to cały zespół doznań zmysłowych i kontaktów z otoczeniem możliwych jedynie dzięki pracy kory mózgowej, tego siedliska wrażeń i myśli, które odróżniają człowieka od innych istot żywych. Dobitym przykładem twierdzenia, iż świadomość stanowi konstytutywną cechę istnienia człowieka, jest postać wybitnego kosmologa Stephena Hawkinga, który mimo że cierpi na nieuleczalną i wyniszczającą chorobę (stwardnienie zanikowe boczne), przykuty do wózka inwalidzkiego i pozbawiony możliwości poruszania się oraz mówienia, z uporem kontynuuje badania i przeciera nowe szlaki w nauce (4). Przy ocenie człowieczeństwa znaczenie ma przede wszystkim praca kory mózgowej, warunkującej wszelkie istotne dla natury ludzkiej czynności psychiczne, mianowicie zdolność nawiązywania kontaktów, świadomą wolę trwania życia, osobowość jednostki, zdolność rozumowania i pamięci itp., a wszystko to nie jest możliwe bez istnienia świadomości. I jeżeli to właśnie takie doznania psychiczne stanowią o istocie i treści człowieczeństwa, to osoba ze zniszczoną korą mózgową (co jest przecież nieodwracalne) jest – podobnie jak osoba z obumarłym pnem – preparatem, zbiorem żywych ludzkich tkanek, których dotlenianie i odżywianie może być potrzebne ze względu na to, że stan pozostałych narządów pozwala na ich wykorzystanie w drodze transplantacji (do czego przyjdzie jeszcze powrócić). Toteż usprawiedliwione może być w takich sytuacjach wyłączenie zastosowanej aparatury i przyspieszenie śmierci w przypadku takich zmian w mózgu, które wyłączają wszelkie, nawet te najmniejsze, przejawy życia psychicznego; rozważania te nie dotyczą natomiast osób, co do których w ogóle wyklucza się możliwość odłączenia ich od aparatury ze względu na niestosowanie wobec nich postępowania kwalifikującego w celu rozpoznania śmierci pnia mózgu (16). Jednakże w stosunku do osób, u których nie można stwierdzić ostatecznej śmierci mózgu, stosowanie ortotanazji musi być bardzo ostrożne i poprzedzone dokładnym przeanalizowaniem wszystkich okoliczności danego stanu faktycznego; akceptacja dla takich działań mogłaby spowodować przekonanie o braku potrzeby leczenia takich osób.

7. Podobnie skomplikowane jest zagadnienie sytuacji pacjentów, u których nie została stwierdzona śmierć mózgu, lecz których stan w świetle najnowszych osiągnięć medycznych jest bardzo ciężki, a ich powrót do zdrowia praktycznie niemożliwy. Dotyczy to zwłaszcza sytuacji, kiedy mimo zachowanych czynności mózgu uszkodzenia pozostałych narządów są tak duże, że ciągłe utrzymywanie takiego pacjenta przy życiu za pomocą aparatury medycznej jest bezcelowe, ponieważ jej stosowanie nie skutkuje choćby niewielką poprawą stanu zdrowia chorego. Pojawia się wówczas problem, czy wolno zaprzestać stosowania środków nadzwyczajnych przedłużających życie pacjenta, w szczególności czy wolno odłączyć takiego chorego od utrzymującej go przy życiu aparatury

medycznej, zwłaszcza kiedy wiadomo, że stosowanie tej aparatury jest niezbędne do zachowania życia pacjenta. W takich przypadkach zagadnienie ortotanazji wiąże się często z celowością dalszego stosowania tzw. uporczywej terapii. „W stanach terminalnych lekarz nie ma obowiązku podejmowania i prowadzenia reanimacji lub uporczywej terapii i stosowania środków nadzwyczajnych. Decyzja o zaprzestaniu reanimacji należy do lekarza i jest związana z oceną szans leczniczych" (5). Toteż należałoby rozważyć, czy w stosunku do takich osób konieczne jest bezwzględne podtrzymywanie ich życia przy pomocy środków nadzwyczajnych, których stosowanie pociągać może za sobą – oprócz kosztów – także niepotrzebny ból, lecz które jednocześnie nie dają żadnej nadziei na poprawę. Takie działanie przedłużałoby jedynie umieranie, nie przyczyniając się do poprawy stanu zdrowia chorego, który niezależnie od tego, czy zastosowano leczenie, czy też od niego odstąpiono, musi wkrótce umrzeć. Zdaniem respondentów (11%), nie można jednak całkowicie rezygnować z jakiegokolwiek leczenia ludzi, którzy nie wykazują nawet najmniejszych szans na przeżycie. Wprost przeciwnie, trzeba podejmować działania mające na celu normalną opiekę nad pacjentem, a przede wszystkim trzeba dołożyć wszelkich starań, aby owe ostatnie chwile życia były dla umierających jak najmniej bolesne – stąd postulat jednoczesnego uśmierzania bólu pacjenta, przy zaprzestaniu przedłużania życia za wszelką cenę.

8. W badaniach poruszono problem stosowania środków łagodzących ból, jednakże ze względu na ograniczone ramy niniejszego opracowania pozostaje jedynie zasygnalizować fakt, iż ankietowani w przeważającej większości (86% – 48 osób) opowiadali się za stosowaniem wobec nieuleczalnie chorych pacjentów środków znieczulających, nawet gdyby w efekcie takich działań miał miejsce ich szkodliwy wpływ na organizm pacjenta w postaci przyspieszenia śmierci. O pozytywnym stosunku personelu medycznego do łagodzenia bólu i cierpień nieuleczalnie chorych pacjentów przy pomocy leków mogących niekorzystnie wpłynąć na ich organizmy świadczy liczba badanych wyznających taki pogląd. Tylko jedna osoba spośród ankietowanych (pielęgniarka) stanowczo wypowiedziała się przeciwko stosowaniu analgetyków w stosunku do danego pacjenta, jeżeli powodowałyby one w jego organizmie niepokojące zmiany lub wręcz nasilały występowanie symptomów śmierci.

9. Zaprzestanie leczenia przy pomocy środków nadzwyczajnych, które nie niosą ze sobą szans na poprawę stanu zdrowia chorego i są dla niego zbyt uciążliwe, nie powinno skutkować pociągnięciem do odpowiedzialności karnej lekarza, który zastosował ortotanazję. Analogicznie rezygnacja z tzw. uporczywej terapii, czyli przedłużania resztek życia znajdującego się w agonii pacjenta, u którego nic nie jest w stanie zatrzymać procesu umierania, jest działaniem moralnie i prawnie zaakceptowalnym. Rezygnacja z zabiegów, nie będących adekwatnymi do realnej sytuacji chorego, których skutkiem byłoby tylko krótkotrwałe i bolesne przedłużenie agonii, nastąpić może oczywiście po dokonaniu przez lekarza obiektywnej oceny, czy skutki stosowania tych środków są proporcjonalne do przewidywanej poprawy zdrowia. Jeżeli ich stosowanie nie

przynosi pozytywnych rezultatów, a jedynie wydłuża wypełnione często bólem i cierpieniem ostatnie chwile życia pacjenta, można zrezygnować z ich stosowania, a zachowanie takie nie może być utożsamiane z zabójstwem człowieka. Takie postępowanie nie jest równoznaczne z celowym zadaniem śmierci, oznacza ono jedynie brak możliwości przeszkodzenia jej nadejściu.

10. Pytania, jak należy postąpić i czy można zrezygnować z działań dystanacyjnych, należą do pytań szczególnie trudnych w sytuacji niedostatecznej ilości potrzebnych do wykonania danego zabiegu materiałów medycznych czy też braku potrzebnej do ratowania życia aparatury. Dylemat etyczno-moralny, którego chorego ratować, gdy możliwości niesienia pomocy są ograniczone do np. kilku chorych, a potrzebujących jest więcej, stwarzają sytuacje zmuszające lekarzy do wyboru pomiędzy życiem jednego a życiem drugiego pacjenta. Coraz trudniejsze staje się w dobie obecnej wcielanie w życie podstawowej zasady deontologii lekarskiej, zgodnie z którą dobro chorego jest naczelnym prawem (*salus aegroti suprema lex*), ponieważ na porządku dziennym są sytuacje kolizji dóbr wielu pacjentów, spośród których lekarz może uratować tylko jednego.

Kwestia konieczności dokonania wyboru pomiędzy pacjentami w celu zakwalifikowania kilku z nich do leczenia za pomocą środków nadzwyczajnych została przez ankietowanych (ponad 74% – 41 osób) potraktowana w sposób jednoznaczny, mianowicie poddany badaniom personel medyczny generalnie wypowiedział się przeciwko jakimkolwiek próbom wartościowania życia poszczególnych chorych. Tylko w nielicznych przypadkach (12% – 7 osób) zdecydowano by się na odłączenie od aparatury medycznej pacjenta z nikłymi szansami na poprawę zdrowia i przyłączenie doń lepiej rokującego. Respondenci wychodzili bowiem z założenia, że skoro ktoś już raz otrzymał szansę skorzystania z jakiegokolwiek środka nadzwyczajnego (problem ten dotyczył głównie aparatury medycznej podtrzymującej życie nieuleczalnie chorych), to nie należy go tego pozbawiać. Zaś wręcz barbarzyństwem (7% respondentów) byłoby odłączanie od aparatury chorych mających choćby minimalne szanse na poprawę stanu swego zdrowia. Toteż nawet gdyby dostarczona do szpitala osoba miała zdecydowanie lepsze prognozy niż osoba już korzystająca z aparatury, to w przypadku braku dostatecznej liczby tychże aparatów osoba ta zostałaby najprawdopodobniej pozbawiona możliwości leczenia za ich pomocą.

Wydaje się, iż w związku z zagadnieniem wyboru pacjentów należy oddzielić od siebie dwie zasadnicze kwestie: którego chorego (spośród kilku) podłączyć do aparatury oraz czy chorego leczonego za jej pomocą można odłączyć i przyłączyć doń innego. Pierwsza sytuacja ewidentnie zmusza lekarzy do dokonania oceny stanu klinicznego chorego i arbitralnego w istocie decydowania o życiu i śmierci. Jest rzeczą oczywistą, że nie powinny one mieć miejsca w codziennej pracy lekarza, jednakże w dużej mierze ich występowanie w praktyce związane jest z niedostatecznym wyposażeniem placówek medycznych w środki i materiały lecznicze. Stąd zapewne wynika postulatowy charakter niektórych wypowiedzi ankietowanych, które należałoby skierować do osób administrujących finansami szpitali, w celu zwiększenia ilości sprzętu medycznego oraz poprawy warunków panujących w szpitalach. Niemniej jednak, nawet

przy najlepszym wyposażeniu szpitali, nie da się wykluczyć możliwości występowania sytuacji, kiedy lekarze będą zmuszeni zdecydować, dla którego spośród wielu pacjentów przeznaczyć sprzęt leczniczy lub diagnostyczny, który z pewnością nie wystarczy dla zaspokojenia potrzeb wszystkich nań oczekujących. Wówczas tym, co powinno kierować postępowaniem lekarskim i decydować o wyborze pacjenta, powinny być tylko i wyłącznie kryteria medyczne, takie jak: stadium choroby, rokowanie, szansa na przeżycie itp. (3, 7) Zatem niedopuszczalne jest jakiegokolwiek wartościowanie chorych z punktu widzenia możliwości osiągnięcia jakichś korzyści majątkowych czy osobistych w wyniku zastosowania leczenia wobec konkretnego chorego.

Różnorakie dyskusje wzbudza również drugie zagadnienie, dotyczące sytuacji, kiedy lekarz dysponujący ograniczoną liczbą służących do ratowania życia aparatów staje przed koniecznością wyboru: czy pozostawić aparat przy chorym już przyłączonym i odmówić leczenia za jego pomocą choremu dostarczonemu do szpitala później, choć mającemu większe możliwości przeżycia, czy też odłączyć pacjenta od aparatu (co spowoduje z pewnością jego śmierć) i przyłączyć tego o większych szansach. Połowa spośród tych 74% ankietowanych, którzy wypowiedzieli się przeciwko odłączeniu pacjenta od aparatury, sugerowała poszukiwanie owych brakujących aparatów leczniczych na innych oddziałach danego szpitala w celu pożyczania ich dla własnych pacjentów, ewentualnie przetransportowanie chorego, dla którego zabrakło aparatu, do innego ośrodka medycznego, jeżeli mógłby uzyskać w nim pomoc. Przyczyną takiego zachowania jest z pewnością niechęć personelu medycznego do konieczności dokonywania oceny życia ludzkiego.

Jednakże wydaje się uzasadnione również w stosunku do drugiego z rozważanych zagadnień przyjęcie pewnych kryteriów pomocnych przy podejmowaniu decyzji w takich sytuacjach. Jak już wyżej wspomniano, jedynie kryteria o charakterze stricte medycznym mogłyby być decydującymi przy kwalifikowaniu poszczególnych chorych do leczenia np. przy pomocy respiratorów w sytuacji niedoboru tych ostatnich. Takie sugestie zostały wyrażone przez 3% respondentów – postulowali oni w tym celu sformułowanie jednoznacznych kryteriów, w oparciu o które można byłoby dokonywać wyboru pacjentów, przy czym wybór powinien mieć miejsce dopiero po dokładnym przebadaniu chorych oraz po konsultacji z innymi lekarzami (tak 9% ankietowanych). Wówczas można byłoby odłączyć od aparatury podtrzymującej życie pacjenta, co do którego – zgodnie z wyżej przedstawionymi założeniami – nie istnieją żadne szanse na poprawę jego stanu zdrowia, a zachodzi potrzeba zastosowania tejże aparatury wobec pacjenta bardziej potrzebującego. Śmierć odłączonego jest tak czy inaczej nieunikniona i wówczas postępowanie lekarza polegające na ocenie stanu faktycznego i skutkujące decyzją o odłączeniu jednego pacjenta na rzecz innego, mającego większe szanse na wyleczenie, jest usprawiedliwione i nie budzi wątpliwości ani zastrzeżeń. Natomiast w sytuacji, gdy stan osoby korzystającej z aparatury nie jest tak „jednoznaczny”, nie jest dopuszczalne odłączenie jej, także wtedy, gdyby do szpitala przywieziono chorego mającego większe szanse na przeżycie czy też chorego znajdującego się w gorszym stanie niż osoba podłączona do aparatury. Analogiczne stanowisko zostało zaprezentowane przez przedstawicieli doktryny prawa (9, 17).

11. Podstawowym obowiązkiem lekarza jest ratowanie życia pacjenta zgodnie ze wskazaniami wiedzy medycznej oraz przy zastosowaniu wszelkich dostępnych mu metod i środków. Tymczasem w obydwu wyżej wyszczególnionych sytuacjach zachodzi wyraźna kolizja obowiązków, będąca w gruncie rzeczy raczej kolizją dóbr, z których tylko jedno można chronić. Jednakże wskutek niedoskonałości wyposażenia w materiały lecznicze tylko jeden z tych obowiązków może być spełniony, co oznacza możliwość uratowania tylko jednego dobra. Jeśli lekarz posiada tylko niewielką ilość środków medycznych, która z pewnością nie wystarczy do uratowania wszystkich poszkodowanych, wówczas musi on dokonać wyboru, którego chorego będzie ratował najpierw. Owa kolizja obowiązków lekarskich ma również miejsce w momencie konieczności zdecydowania, czy nieuleczalnie chorego pacjenta ratować za pomocą aparatury, czy też przeznaczyć ją dla ratowania innych, lepiej rokujących chorych. Lekarz postawiony jest przed nieuchronnym dokonaniem wyboru między pacjentami, wskutek czego niemożliwe okazuje się jednoczesne wypełnienie ciężących na nim obowiązków względem wszystkich pacjentów. Toteż wydaje się uzasadnione rozpatrywanie tych przypadków w świetle art. 26 § 5 k.k., mówiącego o stosowaniu stanu wyższej konieczności w wypadku, kiedy spośród wszystkich ciężących na sprawcy obowiązków tylko jeden może być spełniony. Ponieważ zgodnie z powszechnie przyjętym porządkiem aksjologicznym każde życie ludzkie ma jednakową wartość, następuje tutaj wypełnienie obowiązku w stosunku do jednego dobra i jednoczesne niewypełnienie obowiązku wobec innego dobra, przy czym każde z tych dóbr posiada tę samą wartość. „W razie równej wartości pozostających w kolizji dóbr należy wykonać obowiązek w stosunku do tego dobra, którego szanse uratowania są większe” (2). Toteż usprawiedliwione jest działanie lekarza, który zamiast usilnie podtrzymywać gasnące życie jednego pacjenta pomaga temu, który lepiej rokuje. W przeciwnym wypadku mogłoby dojść do tego, że ratując człowieka znajdującego się na granicy życia i śmierci poświęci się życie człowieka, którego można było uratować.

Problem kolizji dóbr wielu pacjentów ma duże znaczenie w praktyce, a decyzje o odłączeniu pacjentów od aparatury i przyłączeniu doń innych z większymi szansami powinny być dokładnie przemyślane i przeanalizowane oraz oparte na obiektywnej ocenie stanu zdrowia poszczególnych chorych. Jeśli lekarz nie jest w stanie pomóc każdemu, wówczas należy – ufając jego doświadczeniu, rozwadze i umiejętnościom – pozostawić mu podjęcie właściwej decyzji. Decyzje te powinien podejmować przede wszystkim zespół doświadczonych i światłych lekarzy, mający na uwadze wyeliminowanie jakichkolwiek błędów w diagnozowaniu chorób oraz wykluczenie złej woli personelu medycznego, która mogłaby skutkować różnego rodzaju nadużyciami.

12. W związku z omawianymi dotychczas zagadnieniami pozostaje problematyka związana z przeszczepianiem narządów. Osiągnięcia w dziedzinie transplantologii postawiły problem zjawiska śmierci w zupełnie nowym świetle. Śmierć zaczęto traktować nie tylko jako zakończenie życia jednego ustroju, lecz dostrzeżono nowe możliwości dla narządów pochodzących z organizmu dawcy

w organizmie innego człowieka.

Nie jest dopuszczalne przyspieszanie śmierci dawcy przeszczepu ze względu na interes biorcy – „pobranie komórek, tkanek i narządów do przeszczepienia jest dopuszczalne dopiero po stwierdzeniu trwałego i nieodwracalnego uszkodzenia pnia mózgu (śmierci mózgowej)” (15). Reguła ta nie została wypracowana dla celów transplantologicznych, lecz dla wytyczenia rozsądnych medycznie i nienagannyh etycznie granic stosowalności intensywnej terapii. „Kładzie ona bowiem kres praktyce sztucznego wentylowania zwłok stosowanej aż do wystąpienia spontanicznego zatrzymania krążenia krwi”, a jej skutkiem ubocznym, ale bardzo istotnym „jest możliwość wcześniejszego wykorzystania przez transplantologów narządów do przeszczepiania. Znajdują się one w chwili ich eksplantacji w znacznie lepszym stanie metabolicznym niż dotychczas” (16). Zgodne z literą ustawy transplantacyjnej stanowisko takie zajęte zostało przez 40% ankietowanych (22 osoby), mianowicie uzależniali oni możliwość pobrania od dawcy narządu od stanu żywołności jego mózgu. Toteż także wtedy, gdy organizm jest nieuchronnie „skazany” na śmierć, nie można pobrać z niego niezbędnego do życia narządu, jeżeli nie zostanie stwierdzona śmierć mózgu dawcy. Natomiast 27% ankietowanych (15 osób) opowiedziało się zdecydowanie za koniecznością dokonania operacji przeszczepu serca, jeżeli takie zachowanie daje pewność uratowania życia biorcy przy braku analogicznej pewności, jeżeli chodzi o uratowanie życia dawcy.

Nie powinny mieć miejsca żadne wątpliwości, jeżeli chodzi o przerwanie zabiegów reanimacyjnych i wykorzystanie narządów pochodzących od człowieka, którego mózg nie żyje. Jeżeli w takiej sytuacji istniałaby konieczność podtrzymania akcji serca w celu zachowania narządów w należyłym stanie, wówczas lekarz powinien podejmować wszelkie czynności służące podtrzymaniu pracy serca, jednakże motywem takiego zachowania powinna być jedynie możliwość wykorzystania narządów dla uratowania życia innemu człowiekowi (takie stanowisko zajęło 9% ankietowanych); mimo ogromnego postępu w medycynie, nie jest jednak możliwe utrzymywanie ad infinitum w należyłym stanie narządów osoby, u której nastąpiła śmierć mózgu. Natomiast jeżeli potencjalny dawca narządów, mimo ustania akcji serca wskutek choroby czy nieszczęśliwego wypadku i zatrzymania krążenia, ma całkowicie zachowany centralny układ nerwowy, nie można przerwać stosowanych względem niego zabiegów reanimacyjnych. Mimo iż jego narządy znakomicie nadawałyby się do transplantacji ze względu na ich należyte ukrwienie, nie traktuje się takiej osoby jako potencjalnego dawcy. Po spełnieniu wszystkich wymaganych warunków można pobrać narządy od osoby zmarłej, ale dopóki człowiek żyje, należy mu się taka sama ochrona, jak każdemu innemu zdrowemu człowiekowi.

13. Pozbawione racji byłoby rozpatrywanie w kategoriach stanu wyższej konieczności działania lekarza, który pozbawia życia, nawet śmiertelnie chorego pacjenta, w celu ratowania życia innego człowieka. Zastosowanie w tym przypadku art. 26 § 5 k.k. nie jest możliwe, gdyż w takiej sytuacji motywowanie skrócenia życia człowieka kolizją ciężących na sprawcy obowiązków, z których tylko jeden może być spełniony, nie wchodzi w rachubę. O ile taka możliwość

istniała w przypadkach uwarunkowanej brakami w materiałach medycznych konieczności dokonania wyboru spośród pacjentów, z których nie wszystkich można uratować, o tyle uzasadnianie przyspieszenia śmierci człowieka poprzez konieczność pobrania od niego niezbędnego do życia narządu obowiązkiem ratowania innej osoby jest niedopuszczalne. Przemawia za tym choćby wyraźny przepis prawny, zgodnie z którym pobranie narządu jest dopuszczalne dopiero po stwierdzeniu śmierci mózgowej. Zastosowanie ortotanazji skutkować będzie najprawdopodobniej rychłym zgonem pacjenta, czym innym jednakże jest przerwanie uporczywej i bezskutecznej terapii wobec nieuleczalnie chorej osoby, a czym innym wyjęcie z jego organizmu narządu i spowodowanie w ten sposób jego śmierci. W przypadku, gdy przestaje się korzystać ze środków nadzwyczajnych nie przynoszących pozytywnych rezultatów, pacjent umiera niejako w sposób naturalny, natomiast przez pobranie np. serca z organizmu żyjącego jeszcze dawcy, zabija się człowieka.

Odłączając pacjenta od aparatury, której stosowanie nie przynosiło pozytywnych rezultatów i przeznaczając ją dla innego chorego, lekarz przyspieszał wprawdzie w pewien sposób śmierć odłączonego, jednakże nie jest ona bezpośrednim skutkiem postępowania lekarza. Ów chory nie miał szans przeżycia, toteż przerywano stosowanie wobec niego działań dystanatywnych, co dodatkowo było uzasadnione faktem oczekiwania na aparaturę ze strony innego pacjenta, posiadającego szansę na uratowanie życia. Bezpośrednią przyczyną śmierci nie jest wobec tego samo odłączenie od aparatury, ale choroba wyniszczająca organizm pacjenta do tego stopnia, że trzeba było – w celu opóźnienia zejścia śmiertelnego – podtrzymywać funkcje organizmu chorego poprzez stosowanie aparatury medycznej. Dotyczy to przede wszystkim sytuacji, kiedy ortotanazja jest podyktowana bezcelowością dalszego leczenia i oznacza zaprzestanie kontynuowania uporczywej terapii, ale również można taki punkt widzenia odnieść do sytuacji człowieka trwale pozbawionego czynności kory mózgowej. Natomiast inaczej trzeba ocenić wypadek, gdy bezpośrednim powodem śmierci jest interwencja lekarska, naruszająca integralność ciała poprzez pobranie z niego organu. Nawet jeżeli celem takiego działania było uratowanie życia innemu człowiekowi, nie należy rozszerzać możliwości pobierania narządów od jeszcze żywych osób poza uregulowania ustawowe.

Można byłoby ewentualnie rozważyć możliwość pobrania zdrowego serca od pacjenta trwale odkorowanego, ale tylko i wyłącznie po całkowitym wykluczeniu możliwości ponownego podjęcia czynności przez korę mózgową. Nie może być dopuszczalne pod presją postępu w dziedzinie transplantologii, choć niewątpliwe wymaga on wielu ofiar, traktowanie każdego chorego znajdującego się w przetrwałym stanie wegetatywnym jako potencjalnego dawcy narządów, a widoki na uzyskanie przeszczepu nie mogą wpływać na zaniechanie zabiegów ratujących życie. Zalegalizowanie pobierania narządów od ludzi żyjących mogłoby spowodować ogólne przekonanie o braku konieczności leczenia wszystkimi możliwymi sposobami. Takie postępowanie lekarskie mogłoby skutkować również osłabieniem zaufania społeczeństwa do lekarzy oraz wzrostem możliwości różnego rodzaju nadużyć, nie mających nic wspólnego z powołaniem lekarza jako obrońcy życia ludzkiego.

PIŚMIENICTWO

1. Bogusz J.: *Zasady deontologiczne rodzone przez postępy wiedzy lekarskiej*, [w:] *Wybrane zagadnienia z etyki i deontologii lekarskiej*, pod red. T. Kielanowskiego, PZWL, Warszawa 1980, 83; –2. Buchała K., Zoll A.: *Kodeks karny. Komentarz*, Zakamycze, Kraków 1998, 245–246; –3. Jaroszek J.: *Prawnokarne problemy eutanazji w drodze transplantacji*, ZN ASW 1990, 58, 114; –4. Kaku M.: *Hiperprzestrzeń*, Prószyński i Sp–a, Warszawa 1996, s. 323; –5. Kodeks etyki lekarskiej – art. 32 (cyt. za Gubiński A.: *Komentarz do kodeksu etyki lekarskiej poprzedzony podstawami odpowiedzialności karnej lekarza*, Zakład Informacyjno–Wydawniczo–Kolportażowy Okręgowej Izby Lekarskiej w Warszawie, Warszawa 1994, 97; –6. Nasilowski W.: *Dystanacja jako problem prawny i medyczny*, ZN Katedry Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej 1998, 6, 5–10; –7. Raszeja S.: *Współczesne dylematy lekarza wobec prawa i deontologii*, Pol. Tyg. Lek. 1989, 1, 5; –8. Sawicki J.: *Z problematyki lekarskiej w polskim prawie karnym*, [w:] Williams G.: *Świętość życia a prawo karne*, PZWL, Warszawa 1960, 353; –9. Sośniak M.: *Śmierć. (Problematyka lekarsko-prawna)*, PiP 1970, 3–4, 516; –10. Sych M.: *Eutanazja – zagrożenie wartości życia*, Nowiny Lekarskie 1996, 65/3, 351;

11. Sych M.: *Granice intensywnej terapii – aspekty etyczne i prawne*, [w:] *Eutanazja a opieka paliatywna. Aspekty etyczne, religijne, psychologiczne i prawne*, pod red. A. Bieli, Wydawca – KUL i Akademia Medyczna w Lublinie, Lublin 1996, 93; –12. Tarnawski M.: *Człowiek w obliczu śmierci*, RPEiS 1980 nr 2, 342; –13. Tarnawski M.: *Eutanazja*, Studia Prawnicze 1982, 3–4, 320; –14. Tarnawski M.: *Problematyka prawna stosowania aparatury podtrzymującej życie*, [w:] *Prawo a medycyna u progu XXI wieku*, Materiały z sympozjum naukowego w Toruniu w dniach 18–19 maja 1987 r., pod red. M. Filara, Towarzystwo Naukowe w Toruniu, Toruń 1987, 34; –15. Ustawa z dnia 26 października 1995 r. o pobieraniu i przeszczepianiu komórek, tkanek i narządów – art. 7 (Dz. U. z dnia 6 grudnia 1995 r., Nr 138, poz. 682); –16. *Wytyczne Krajowych Zespołów Specjalistycznych w dziedzinach: anestezjologii i intensywnej terapii, neurologii, neurochirurgii i medycyny sądowej w sprawie kryteriów śmierci mózgu*, Dz. Urz. MZiOS z dnia 6 czerwca 1984 r., Nr 6, poz. 38; treść komunikatu – cyt. za Służba Zdrowia 1994, 43–44, 8–9; –17. Ziemiński Z.: *Prawne i moralne problemy śmierci i umierania*, Etyka 1975, 14, 109.

Adres autora:
Katedra Kryminologii UJ
ul. Olszewskiego 2
31–007 Kraków

Bożena Turowska*, Marek Sanak, Barbara Opolska-Bogusz***

Częstość alleli układów STR:LPL, F13B i HPRTB w populacji Polski Południowej

Allele frequencies of STR systems LPL, F13B and HPRTB in the South Poland population

* Z Katedry Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. B. Turowska

** Z Katedry Chorób Wewnętrznych CMUJ w Krakowie

Kierownik: prof. dr hab. A. Szczeklik

Określono częstości występowania alleli systemów STR: LPL, F13B i HPRTB u 170 osób populacji Polski Południowej. DNA izolowano rutynowo z próbek krwi, osób niespokrewnionych, obojga płci. Najczęściej występującymi w układzie LPL są allele 10 (40,1%), 11 (27,3%) i 12 (23,8%). W układzie F13B najczęstszym allelem jest 10 (44,7%) i 8 (26,5%). Dla układu HPRTB częstość alleli 12 i 13 wynosi odpowiednio dla kobiet 37,8% i 32,0% a u mężczyzn 35,4% i 26,8%. Nie stwierdzono odchyżeń od prawa Hardy–Weinberga. Podano obliczenia współczynników: ME, DP, PE, PM, PIC i wartości heterozygot dla badanych układów.

Allele frequencies of LPL, F13B and HPRTB systems in 170 DNA samples were determined. DNA was isolated from unrelated individuals of both sexes. The most frequent alleles of the LPL system were 10 (40,1%), 11 (27,3%) and 12 (23,8%). The frequencies of alleles 10 and 8 of the F13B system were 44,7% and 26,5% respectively. Allele 12 and 13 of the HPRTB system were most frequent in women 37,8% and 32,0% respectively and in men were 35,4% and 26,8%. Distribution of LPL, F13B and HPRTB alleles in the South Poland population do not deviate from the Hardy–Weinberg equation. Statistical parameters ME, DP, PE, PM, PIC and heterozygosity were calculated.

Słowa kluczowe STR:LPL, F13B, HPRTB, częstość alleli.

Key words: STR:LPL, F13B, HPRTB, allele frequencies.

Dotychczasowe wyniki badań nad układami STR polimorfizmu DNA wskazują, że określanie ich jest niezwykle przydatne w sprawach identyfikacyjnych w badaniu śladów biologicznych a także w dochodzeniu spornego ojcostwa. Przydatność ta wiąże się ściśle z poznaniem występowania alleli badanych układów wśród ludności danej populacji.

Z tego względu opracowano wyniki badań częstości alleli trzech STR-loci a mianowicie LPL, F13B i HPRTB (2, 6, 8) wśród mieszkańców Polski Południowej.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań pobrano próbki krwi od 170 osób dorosłych, w tym 86 kobiet i 84 mężczyzn, niespokrewnionych ze sobą, zgłaszających się do Katedry Medycyny Sądowej CMUJ w sprawach o dochodzenie spornego ojcostwa. Po wyizolowaniu DNA metodą nieenzymatyczną (5) przeprowadzono jednoczesną amplifikację dla systemów LPL, F13B i HPRTB, stosując reakcję multipleksową przygotowaną z poszczególnych primerów firmy Promega. Produkty amplifikacji rozdzielano na 6% żelach poliakrylamidowych stosując aparat SA 32 firmy BRL. Uzyskane elektroferogramy barwiono metodą srebrzenia a fenotypy ustalano na podstawie porównania z allelicznymi markerami firmy Promega.

Częstości alleli a także wartości heterozygot były obliczone dla każdego systemu STR, po sprawdzeniu czy nie występuje odchylenie od prawa Hardy-Weinberga. Dla poszczególnych systemów obliczono parametry ważne przy wydawaniu opinii sądowo lekarskich a mianowicie: współczynnik dyskryminacji, siłę wykluczeniową układu, prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności, szansę wykluczenia i informatywność polimorficznego układu (1, 3, 4, 7).

Układ HPRTB jest związany z płcią w związku z czym wszystkich mężczyzn traktuje się jako homozygoty i tym samym parametry dla potrzeb sądowych dotyczące tego układu zostały obliczone tylko dla kobiet.

Homogenność populacji była testowana przy użyciu komputerowego programu opracowanego przez G. Carmody (Carleton University, Ottawa, Canada).

WYNIKI I OMÓWIENIE

W tabelach I – III przedstawiono wyniki badań częstości występowania alleli dla 3 układów STR: LPL, F13B i HPRTB w populacji Polski Południowej. Nie stwierdzono odchylenia standardowego od prawa Hardy-Weinberga ani przy badaniu pojedynczych loci ani też przy ich kombinacji.

Tabela I. Częstość alleli w układzie LPL w populacji Polski Południowej
Table I. Allele frequency distribution for system LPL in the South Poland population

Allel	Częstość Frequency
9	0,070
10	0,401
11	0,273
12	0,238
13	0,012
14	0,000
15	0,000
16	0,006

Tabela II. Częstość alleli w układzie F13B w populacji Polski Południowej
 Table II. Allele frequency distribution for system F13B in the South Poland population

Allel	Częstość Frequency
6	0,082
7	0,000
8	0,265
9	0,200
10	0,447
11	0,006

Tabela III. Częstość alleli w układzie HPRTB w populacji Polski Południowej
 Table III. Allele frequency distribution for system HPRTB in the South Poland population

Allel	Częstość Frequency Kobiety Females	Częstość Frequency Mężczyźni Males
8	0,006	0,000
9	0,017	0,012
10	0,037	0,024
11	0,099	0,220
12	0,378	0,354
13	0,320	0,268
14	0,105	0,085
15	0,023	0,024
16	0,006	0,012

Najczęściej występującymi allelami w układzie LPL są allele 10 (40,1%), 11 (27,3%) i 12 (23,8%) natomiast nie obserwowano alleli 14 i 15. W układzie F13B nie stwierdzono allela 7 a najczęściej występujący jest allel 10 (44,7%). W trzecim badanym systemie STR-HPRTB zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn w wysokim procencie stwierdzono allel 12 i 13.

Obliczone wartości dotyczące występowania heterozygot w badanej populacji wynoszą dla układu LPL 0,738, F13B 0,690, dla HPRTB u kobiet 0,628 a teoretyczna wartość oczekiwanych heterozygot dla tych systemów odpowiednio 0,703 – 0,683 – 0,731.

W tabeli IV zestawiono parametry, które stanowią ważny element przy przeprowadzaniu badań i wydawaniu opinii sądowo-lekarskich. Obliczone współczynniki charakteryzujące polimorficzne układy wskazują na ich przydatność do badań identyfikacyjnych i mogą być z dużym powodzeniem stosowane do badań w hemogenetyce sądowej.

Tabela IV. Współczynniki ME, DP, PE, PM i PIC dla układów LPL, F13B i HPRTB

Table IV. Statistical parameters ME, DP, PE, PM and PIC for systems LPL, F13B and HPRTB

UKŁAD SYSTEM	ME	DP	PE	PM	PIC
LPL	0,413	0,858	0,504	0,337	0,649
F13B	0,397	0,846	0,483	0,334	0,629
HPRTB Kobiety Females	0,468	0,886	0,551	0,346	0,690
Łącznie Total	0,811693	0,997507	0,884862	0,711221	

PIŚMIENNICTWO

1. Brenner C., Morris J.: Paternity index calculations in single locus hypervariable DNA probes: validation and other studies. In: Proceedings of the international symposium on human identification 1989. Promega. Corporation, Madison, 1990.21–53
- 2. Edwards A., Hartmut V., Rice P., Civitello A., Stegemann J., Schwager C., Zimmermann J., Erfle H.H., Cashey C.T., Anson W.: Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics* 1990, 6, 593–608
- 3. Fisher R.A.: Standard calculations for evaluating a blood group system. *Heredity*. 1951, 5, 95–102
- 4. Kruger J., Fuhrmann W., Lichte K.H., Steffens C.: Zur Verwendung des Polymorphismus der sauren Erythrocytenphosphatase bei der Vaterschafts-begutachtung. *Dtsch. Z. Gerichtl. Med.* 1968, 64, 127–146
- 5. Lahiri D.K., Bye S., Numberger J.I., Hodes M.E., Crisp M.: A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole blood samples than do nine other methods tested. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 1992, 25, 193–205
- 6. Nishimura D.Y., Murray J.C.: A tetranucleotide repeat for the F13B locus. *Nucleic Acids Res.* 1992, 20, 1167
- 7. Ott J.: Analysis of human genetic linkage. Johns Hopkins University Press, 1991
- 8. Zuliani G., Hobbs H.H.: Tetranucleotide repeat polymorphism in the LPL gene. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18, 4958.

Adres pierwszego autora:

Katedra Medycyny Sądowej CMUJ

31–531 Kraków

ul. Grzegórzecka 16

Ryszard Pawłowski, Sylwia Boluk-Sobolewska

Polimorfizm α -amylazy w ślinie ludzkiej badany metodą izoelektroogniskowania (IEF)

Polymorphism of α -amylase analysed using isoelectric focusing (IEF)

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku
Kierownik: prof. dr hab. R. Hauser

Fenotypy α -amylazy (AMY1) oznaczono w próbkach śliny pochodzących od 120 niespokrewnionych osób z rejonu Polski północnej metodą izoelektroogniskowania w 5% żelu poliakrylamidowym zawierającym amfolinę o zakresie pH 5,0–8,0 oraz ACES jako separator. Do detekcji izoenzymów AMY1 zastosowano metodę barwienia żelu poliakrylamidowego roztworem azotanu srebra. W badanej populacji stwierdzono obecność trzech alleli AMY1: AMY1*1, AMY1*2, AMY1*var występujących z częstością: AMY1*1=0,942, AMY1*2=0,054, AMY1*var. = 0,004. Badana próbka populacyjna znajduje się w stanie równowagi opisanym przez równanie Hardy'ego–Weinberga. Przydatność AMY1 do badań identyfikacyjnych w genetyce sądowej należy określić jako niewielką.

Phenotypes of alpha-amylase were determined in a population sample of 120 individuals from Northern Poland using the method of isoelectric focusing in a 5% polyacrylamide gel containing Ampholine at pH 5.0–8.0 and ACES as a separator. The AMY1 isoenzymes were using silver nitrate. In the analysed population sample three alleles were detected AMY1: AMY1*1, AMY1*2, AMY1*var present with a following frequencies: AMY1*1=0,942, AMY1*2=0,054, AMY1*var. = 0,004. The analysed population sample was in a Hardy–Weinberg equilibrium. Usefulness of the AMY1 system in forensic practice is evaluated to be low.

Słowa kluczowe: α -amylaza, genetyka populacyjna, genetyka sądowa, izoelektroogniskowanie.

Key words: α -amylase, population genetics, forensic genetics, isoelectric focusing

WSTĘP

W przyrodzie występują trzy rodzaje amylaz: α , β i γ . Różnią się między sobą miejscem działania na cząsteczki wielocukrów oraz produktami reakcji. α -Amylaza jest endoenzymem, tzn. enzymem hydrolizującym wewnętrzne wiązania α -1,4-glukozydowe wielocukrów. Alfa-amylaza należy do białek zbudowanych z dwóch łańcuchów polipeptydowych o stosunkowo niedużych masach cząsteczkowych, mieszczących się w granicach 45 – 60 tys. Da (16). Alfa-amylaza występuje u człowieka w narządach i płynach ustrojowych. Najwyższą aktywność wykazuje sok trzustkowy i ślina, a następnie surowica krwi i moczu. Z narządów, obok trzustki i gruczołów śliniankowych (szczególnie przyusznych), stosunkowo wysoką aktywnością cechują się: wątroba, nerki i płuca, a w dalszej kolejności: śledziona, serce, mięśnie szkieletowe i mózg (1). U człowieka występują dwa typy α -amylaz: śliniankowa i trzustkowa. Oba wykazują wiele podobieństw zarówno biochemicznych jak i immunologicznych. W soku trzustkowym, surowicy krwi i w moczu obserwujemy głównie aktywność amylazy trzustkowej (AMY2), a w ślinie amylazy śliniankowej (AMY1). Badania genetyczne dowiodły, że są one produktami translacji dwóch osobnych loci AMY1 i AMY2 na chromosomie 1 człowieka (12).

Polimorfizm α -amylazy

Od długiego czasu wiadomo, że enzym ten występuje w wielu formach molekularnych. Kamaryt i Laxova (6) w latach 60-tych jako pierwsi zaobserwowali izoenzymy amylazy przy użyciu elektroforezy w żelu agarozowym. Jednak już wkrótce okazało się, że określenie początkowo tylko dwóch izoenzymów: trzustkowego i śliniankowego było dużym uproszczeniem. Wprowadzając elektroforezę w żelu poliakryloamidowym (PAGE), Merritt i Kann (9) zaobserwowali trzy różne warianty AMY1 wśród 961 białych Amerykanów, jednak częstość występowania heterozygot AMY1 B,C i D stanowiła tylko 1%, co nie wskazywało na istnienie polimorfizmu AMY1. Dopiero zastosowanie techniki izoelektroogniskowania (IEF) w żelu poliakryloamidowym zdecydowanie polepszyło rozdział izoenzymów. Prace dotyczące polimorfizmu AMY1 przedstawił m.in. Pronk (11), Pronk i in. (14), De Soyza (2), Kühnl i Tischberger (8) definiując kolejno nowe allele: AMY R1-1 lub AMY2-1, AMY3-1, AMY4-1, AMY5-1. Aktualnie metoda IEF w zakresie pH 5,0–8,0 umożliwia wykrycie siedmiu występujących fenotypów AMY1: AMY1-1, AMY2-1, AMY5-1, AMY3-1, AMY4-1, AMY2-2, AMY3-3.

Obecnie wiadomo, że heterogenność izoenzymów α -amylazy jest uwarunkowana przez: a) dwa sprzężone loci genowe AMY1 i AMY2, b) występowanie alleli obydwu loci nazwanych: AMY1-1, AMY1-2, AMY1-3 itd. i AMY2-A, AMY2-B itd., oraz przez potranslacyjne modyfikacje produktów genu α -amylazy np. glikozylację, deglikozylację, deaminację. Dwa loci, AMY1 i AMY2 produkują różne allele (7), które dziedziczone są zgodnie z prawami Mendla, wyjątek stanowi recesywny allel AMY1-R (8).

MATERIAŁY I METODY

Badany materiał

Próbki śliny pobrano od 120 zdrowych, niespokrewnionych osób obu płci zamieszkujących teren Gdańska. Materiał poddawano badaniu bezpośrednio po pobraniu i odwirowaniu (5 minut w 2000 rpm), lub po zamrożeniu w temperaturze -20°C .

Oznaczanie fenotypów AMY1–izoelektroogniskowanie (IEF)

Celem ustalenia najlepszych warunków identyfikacji alleli AMY1 przeprowadzono optymalizację istotnych parametrów izoelektroogniskowania. Z uwagi na fakt, że izoenzymy AMY1 mieszczą się w zakresie pH od 5,2 do 6,8 (8) należało zmodyfikować warunki tak, by uzyskać możliwie najlepszy rozdział w tym zakresie pH. W wyniku szeregu eksperymentów przyjęto zakres pH 4–8 oraz ACES (4) jako separator modyfikujący gradient pH na tyle, że elektroforegramy izoenzymów alfa–amylazy były wyraźnie czytelne. W celu uzyskania prostego do interpretacji obrazu izoenzymów AMY1 zastosowano inną niż powszechnie używaną metodę detekcji izoenzymów polegającą na barwieniu żeli poliakryloamidowych roztworem srebra. Synchronizując obraz po barwieniu na aktywność α -amylazy z barwieniem srebrem oraz znając rozmieszczenie innych białek śliny w badanym zakresie pH (5) uzyskano obraz nie budzący wątpliwości interpretacyjnych.

Próbki rozdzielano w 300 μm żelu poliakryloamidowym (5% T, 3% C) zawierającym 5% mieszaninę (1:1 obj.) Ampholiny pH 5.0–7.0 i Pharmalytu pH 6.0–8.0, 14% glicerol i 0.3% ACES jako separator. Anolit i katolit stanowiła odpowiednio 2% Ampholina pH 4,0–6,0 i 1 M NaOH. Żel preogniskowano (Ultraphor LKB) przez ok. 45 min. rozpoczynając od 150 V do momentu osiągnięcia 550 V (przy parametrze stałej mocy). Próbki nanoszono w odległości 2 cm od katody i ogniskowano przez 25 min. przy stałym napięciu 550 V. Po tym czasie ogniskowano dalej przez 75 min. począwszy od 1200 V. Przez cały czas elektroforezy układ chłodzono cieczą o temp. 5°C .

Detekcja fenotypów AMY 1

Po zakończeniu izoelektroogniskowania żele poliakryloamidowe barwiono roztworem azotanu srebra wg zmodyfikowanej metody Weber'a i Osborna (15).

Obliczenia statystyczne

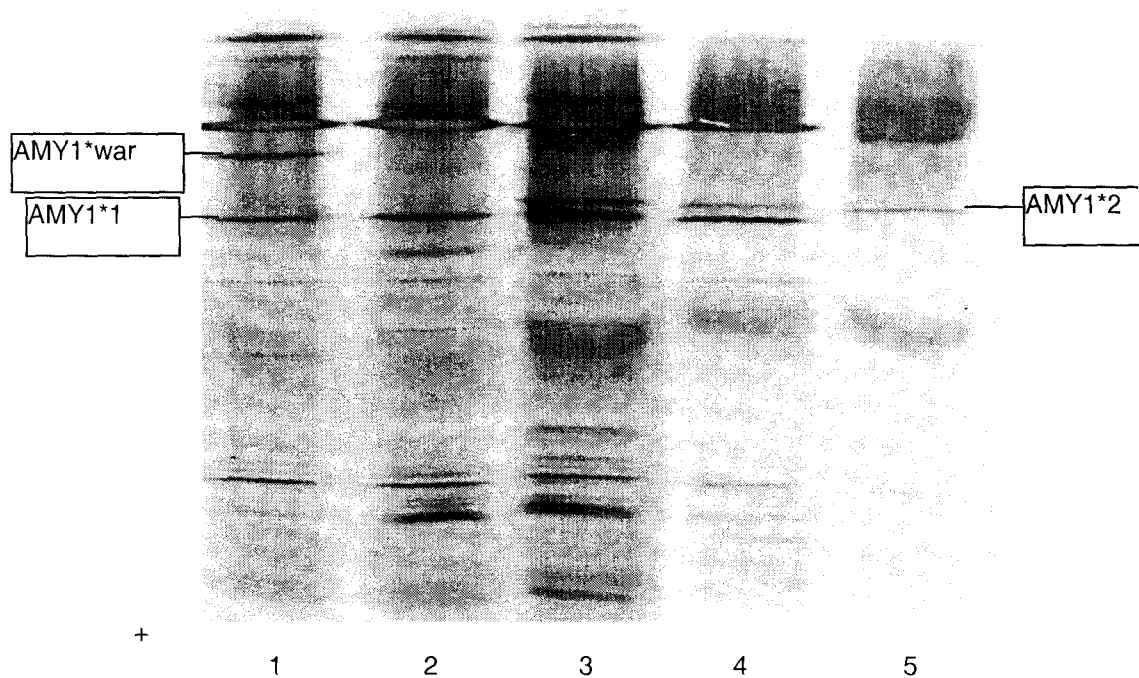
Porównania obserwowanych częstości alleli AMY 1 pomiędzy poszczególnymi populacjami dokonano przy użyciu programu komputerowego dostarczonego przez dr G. Carmody'ego (10).

WYNIKI I DYSKUSJA

Identyfikacja fenotypów AMY1 w próbkach śliny metodą izoelektroogniskowania (IEF)

Optymalizacja rozdziału AMY1 metodą IEF.

Fenotypy AMY 1 oznaczono w próbkach śliny pochodzącej od niespokrewnionych i losowo wybranych osób reprezentujących populację Polski Północnej. Badając populację Polski Północnej zaobserwowano nowy wariant AMY1 (Ryc. 1, ścieżka 1). Według autorów stwierdzony wariant AMY1, do tej pory nie został opisany w żadnej badanej populacji. W obrazie elektroforetycznym AMY1 obserwuje się, że białka kodowane przez najczęstszy allel AMY1*1 posiadają najniższy punkt izoelektryczny i wędrują w stronę anody najszybciej. Nieco wyższy punkt izoelektryczny cechuje izoenzymy kodowane przez AMY1*2.



Ryc. 1. Elektroforegram rozdziału metodą IEF trzech zaobserwowanych fenotypów AMY1. Ścieżki od 1 do 5 przedstawiają następujące fenotypy AMY1: 1-wariant, 1-1, 2-1, 2-1, 2-2. Strzałki wskazują miejsca występowania allela AMY1*1, AMY1*2 oraz wariantu AMY1* 1-variant.

Fig. 1. Electrophoregram presents IEF separation of three observed AMY1 phenotypes. Lanes 1 to 5 present AMY1 phenotypes: : 1-variant, 1-1, 2-1, 2-1, 2-2. Arrows indicate positions of common AMY1 alleles and variant.

Genetyka populacyjna AMY1

W grupie 120 osób z obszaru Polski Północnej stwierdzono obecność trzech alleli AMY1: AMY1*1, AMY1*2 i nowego nieopisanego do tej pory allele AMY1*war oraz czterech fenotypów AMY1: AMY1-1, AMY2-1, AMY2-2, AMY1-1war z sześciu teoretycznie możliwych.

Tabela I przedstawia rozkład częstości obserwowanych i oczekiwanych fenotypów AMY1 oraz rozkład częstości genowych dla badanej populacji. Najczęstszym fenotypem AMY1 w naszej populacji jest homozygota AMY1-1 pojawiająca się z częstością prawie 90%. Poza najczęściej występującym fenotypem AMY1-1 dla populacji Polski Północnej stwierdzono występowania heterozygoty AMY2-1 z częstością 9,2%. Fenotyp AMY2-2 pojawiający się bardzo rzadko w populacjach europejskich oraz nowo odkryty wariant AMY1 występuje w badanej populacji z częstością 0,8%. W populacji Polski Północnej stwierdzono obecność trzech alleli, z których najbardziej powszechnym jest allel AMY1*1 stanowiący aż 94,2% badanej populacji. Pozostałe allele występują rzadziej poniżej 6% (AMY1*2 – 5,4%) a nowy allel AMY1*war z częstością 0,4%. Badana populacja znajduje się w stanie równowagi opisanej równaniem Hardy'ego–Weinberga (Tab. I). Obliczone współczynniki heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej jak również współczynnik PIC wskazują na niewielką przydatność locus AMY1 do badań identyfikacyjnych jednakże, ze względu na znaczne różnice w częstości obserwowanych alleli pomiędzy grupami etnicznymi AMY1 stanowi cenny marker antropologiczny.

Tabela I. Rozkład obserwowanych i oczekiwanych częstości fenotypów AMY1 oraz rozkład częstości genowych w populacji Polski Północnej.

Table I. Observed and expected frequency distribution of AMY1 phenotypes and allele frequencies in a population from North Poland.

Fenotyp Phenotype	Wartość obserwowana Number observed N(liczba fenotypów) % Number of phenotypes		Wartość oczekiwana Number expected N (liczba fenotypów) % Number of phenotypes		Częstość genu Gene frequency
1-1	107	89,2	106,5	88,7	AMY1*1 = 0,942
1-2	11	9,2	12,2	10,2	AMY1*2 = 0,054
2-2	1	0,8	0,4	0,3	AMY1*War.=0,004
War.AMY1	1	0,8	0,9	0,8	
Suma Total	120	100	120	100	1

$\chi^2=0.12$; $0.7 < P < 0.8$; d.f.=1; $H_{\text{obserwowana}}=0.100$ (H_{observed}); $H_{\text{oczekiwana}} = 0.126 \pm 0.030$; (H_{expected}); PIC=0.105.

Przedstawione w niniejszej pracy częstości alleli AMY1 są zbliżone do częstości obserwowanych dla innych populacji europejskich, m.in.: brytyjskiej (2), niemieckiej (8), holenderskiej (11). Tabela II wskazuje, że najczęściej obserwo-

wanym allelem w wyżej wymienionych populacjach, tak jak w populacji Polski Północnej, jest allel AMY1*1, który występuje z częstością od 0,8906 do 0,942. Drugim pod względem częstości jest allel AMY1*2, pojawiający się w wymienionych populacjach europejskich z częstością 0,054–0,081. W populacji Polski Północnej zidentyfikowany został rzadko występujący wariant AMY1, który jak dotąd nie został jeszcze nigdzie opisany. W populacji holenderskiej i brytyjskiej zaobserwowano występowanie allela AMY1*3 z częstościami 0,021–0,0375. Podczas badań prowadzonych w populacji Polski Północnej nie stwierdzono allela AMY1*3.

Tabela II. Porównanie częstości alleli AMY1 w różnych populacjach
Table II. Comparison of AMY1 allele distribution in different populations

Kraj Country	N Liczba osób Number of individuals	Częstość (Frequen- cy) AMY1*1	Częstość (Frequen- cy) AMY1*2	Częstość (Frequen- cy) AMY1*3	Częstość (Frequen- cy) AMY1*4	Inne others	Piśmi- nictwo Biblio- graph
Holandia 1 The Netherlands	43	0,919	0,081	–	–		(11)
W. Brytania United Kingdom	160	0,8906	0,0688	0,0375	0,031		(2)
Mali (Bozo), Afryka	71	0,979	0,007	–	–	0,014	(13)
Niemcy Germany	170	0,909	0,07	0,021	–		(8)
Holandia 2 The Netherlands 2	144	0,91	0,06	0,03	–		(13)
Polska Płn. North Poland	120	0,942	0,054	–	–	0,004	

Porównanie częstości alleli AMY1*1 i AMY1*2 występujących w badanej populacji z częstościami obserwowanymi w populacji Niemiec, Wielkiej Brytanii, Holandii nie wykazało znamienych statystycznie różnic dla alleli AMY1*1 i AMY1*2 (tabela II).

Częstości alleli dla populacji europejskich są rozbieżne z częstościami obserwowanymi dla populacji afrykańskiej, w której najczęściej pojawia się allel AMY1*1 (0,979) z częstością znacznie przewyższającą obserwowaną dla populacji europejskich. Częstość obserwowana allela AMY1*2 jest natomiast dużo niższa (13). Obok dwu powszechnie występujących alleli AMY1*1 i AMY1*2 w populacji afrykańskiej zidentyfikowano wariant AMY1, który może być charakterystyczny jedynie dla tej rasy. Cechuje się on występowaniem izoenzymów o zbliżonych punktach izoelektrycznych do produktów allela AMY1*1.

Tabela III przedstawia porównanie homogenności rozkładu alleli AMY1 pomiędzy populacją polską a innymi krajami.

Tabela III. Porównanie homogenności rozkładu częstości alleli AMY1 pomiędzy populacją polską a innymi krajami.

Table III. Comparison of homogeneity of AMY1 allele frequency distribution in Poland and other countries

Populacja Population	χ^2	P
PL x H (11)	1,1595	0,5970 \pm 0,0155
PL x M (13)	6,6525	0,0200 \pm 0,0044
PL x N (8)	7,1171	0,0510 \pm 0,0066

PL–Polska (Poland), H– Holandia (Netherlands) M–Mali (Afryka) Mali Africa, N– Niemcy (Germany)

Porównując homogenność rozkładu alleli AMY 1 stwierdzono znamienne statystycznie różnice pomiędzy populacją polską a populacją afrykańską (Mali) (13). Różnic takich nie zaobserwowano natomiast porównując populację polską z niemiecką (8) i holenderską (11).

PIŚMIENNICTWO

1. Angielski S., Rogulski J.: Biochemia kliniczna, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Wyd.III, 1991, 189–196.
2. De Soyza K.: Polymorphism of human salivary amylase. Hum. Genet., 1978, 45,189–192.
3. De Soyza K.: Determination of phenotypes of salivary amylase in liquid saliva and saliva stains. Forensic Sci. Int. 1982,20,1–7.
4. Gill P.: Application of separator isoelectric focusing within the pH range 4–6. Electrophoresis 1985, 6, 282–286.
5. Ikemoto S., Tsuchida S., Hinohara H., Nishiumi E., Kajii E., Nagai A., Tomita K., Huang DY.: Further evidence for phenotypes and gene frequencies of nine salivary polymorphisms in Japanese population. Forensic Sci. Int 1987,35,119–123.
6. Kamaryt J., Laxova R.: Amylase heterogeneity; Some genetic and clinical aspects. Humangenetik 1965, 1, 579–586.
7. Karn R.C., Shulkin J.D., Merritt A.D., Newell R.C.: Evidence for post-translational modification of human salivary amylase (AMY1) isozymes. Biochemical Genetics 1973,10, 341–350.
8. Kühnl P., Tischberger H. Amylase 1 polymorphism of human parotid saliva: Detection of a new allele, AMY 5–1 by isoelectric focusing and AMY1 population data from Germany. Electrophoresis 1980,1,186–190.
9. Merritt A.D., Karn R.C.: The human α -amylases. Advances in Human Genetics, Plenum New York, 1977.
10. Pawłowski R., HUMFIBRA allele distribution in the Northern Poland using capillary electrophoresis. Int J Legal Med. 1999, 112, 139–141.
11. Pronk J.C.: A genetic variant of amylase of human parotid saliva detected by isoelectric focusing. [w:] Radola i Graesslinn Electrophoresis and Isoelectrophoresis. Wyd. de Gruyter, Berlin, 1977.
12. Pronk J.C., Frants R.R., Jansen W., Eriksson A.W., Tonino G.J.M.: Evidence for duplication of the human

salivary amylase gene. *Hum. Genet.* 1982, 60, 32–35. –13. Pronk J.C., Frants R.R.: New genetic variants of parotid salivary amylase. *Hum Hered.* 1979, 29, 181–186. –14. Pronk J.C., Jansen W.J., Pronk A., Chistien F.A.M., Frants R.R., Eriksson A.W.: Salivary protein polymorphism in Kenya: evidence for a new AMY1 allele. *Hum Hered.* 1984, 34, 212–216. –15. Weber K., Osborne M.: The reliability of molecular determinations by dodecyl sulfate– polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 4406–4412. –16. Zakowski J., Bruns D.E.: Biochemistry of human alpha amylase isoenzymes. *Critical Rev. Clin. Lab. Sci.* 1985, 21, 283–322.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
80–210 Gdańsk
ul. Skłodowskiej-Curie 3a

Ewa Raczek^{*}, Jarosław A. Berent^{}**

Mutacje zaobserwowane w MLP i SLP wśród tercetów badanych w sprawach spornego ojcostwa^{*}**

MLPs and SLPs mutations in trios investigated in paternity testing

^{*} Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Śląskiej AM w Katowicach
Kierownik: prof. dr hab. H. Sybirska

^{**} Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. K. Śliwka

Opiniowanie w sprawach spornego ojcostwa na podstawie badań polimorfizmu DNA typu RFLP–VNTR (MLP, SLP) w cięciu najbardziej popularnymi enzymami restrykcyjnymi utrudnia możliwość wystąpienia mutacji. Typy mutacji mogą być różne, zawsze jednak powodują pojawienie się nowej cechy, która może, ale nie musi być dziedziczona. Praca opisuje rodzaje mutacji zaobserwowanych w praktyce KMS ŚIAM i dyskutuje ich charakterystykę z dostępnym piśmiennictwem.

In this paper there were cases of heredity aberrations in pairs described: the putative father – the child. Authors have presented different kinds of mutation: length mutation, restriction site mutation and pseudomutation. Last mutation has been explained by existence of the cover, short fragment in the D16S309 locus in the pair: father–child. The phenomenon has been detected by means of combined restriction and amplification methods. Characteristics of the mutations were also presented, and at the same time compared with the data of other authors.

Słowa kluczowe: polimorfizm DNA typu RFLP–VNTR, rodzaje mutacji

Key words: RFLP–VNTR polymorphism of DNA, kinds of mutations

^{***} Wg referatu wygłoszonego na XI Zjeździe PTMSiK w Łodzi (2–5 IX 1998)

WPROWADZENIE

Polimorfizm DNA typu RFLP–VNTR badany z zastosowaniem prób jednomiejscowych (SLP) i wielomiejscowych (MLP) w cięciu różnymi enzymami restrykcyjnymi jest szczególnie użyteczny w opiniowaniu spraw spornego ojcostwa (2,5,10,13,18). Stosując polimorfizm typu RFLP–VNTR w badaniach spornego ojcostwa należy pamiętać, iż w regionach tych występują nowe mutacje, czyli spontaniczne zmiany, co prawda sporadyczne ale prowadzące do powstania nowych alleli (15) a w konsekwencji do dalszego zróżnicowania osobniczego. Mają również istotne znaczenie we wnioskowaniu o pokrewieństwie. Henke i wsp. (8–11), uważają, że każdy fragment, którego tożsamości nie możemy wykazać z żadnym z fragmentów rodzicielskich jest fragmentem mutacyjnym i w opiniowaniu odgrywa rolę podobną do tej, jaką przypisuje się genom zerowym w serologii klasycznej.

Mutacje obserwowane przy stosowaniu MLP i SLP to zmiany długości fragmentu polegające na zmniejszeniu lub zwiększeniu liczby jednostek repetytywnych (9, 11) lub zmiany sekwencji DNA, naruszające czytelność miejsca restrykcyjnego, prowadzące do powstania nowego lub zniszczenia starego (12,16). Według Henke i wsp. (6) może – choć rzadko – wystąpić również nałożenie się obu rodzajów mutacji (1:500000).

Częstość mutacji obserwowanych w profilach prób wielomiejscowych nie przekracza 1% w przeliczeniu na mejozę=gametę czy 0.04% w przeliczeniu na fragment=lokus, przyjmując 26 fragmentów DNA dla 1 osobnika (17). Również dla większości prób jednomiejscowych, powszechnie stosowanych częstość mutacji nie przekracza 1%, z wyjątkiem lokus D1S7 (MS1).

Specyficzną mutacją teoretycznie możliwą jest ta, która prowadzi do przeciwstawności homozygotycznej w parze rodzic–dziecko. Można ją tłumaczyć jako zmianę zaistniałą w gamecie rodzicielskiej osobnika homozygotycznego, która doprowadziła do powstania allelu tożsamego z jednym z dwu alleli drugiego, heterozygotycznego rodzica (15). Powstały po zapłodnieniu organizm jest homozygotą, która ma cechy przeciwstawne do mutującego, homozygotycznego rodzica. Inną możliwością tłumaczenia niezgodności rodzic–dziecko jest mutacja typu „niemego”; następuje taka zmiana miejsca restrykcyjnego w gamecie jednego z rodziców (dziedziczona przez dziecko), że przestaje ono być czytelne dla stosowanych enzymów restrykcyjnych i w efekcie otrzymujemy 1 fragmentowy model dla danego lokus (przeciwstawność homozygotyczną w parze rodzic–dziecko). Kolejną możliwością to delecja bądź częściowa delecja fragmentu DNA i przekazanie okrojonego lokus dziecku, które staje się odmienne pod względem tej cechy od swego rodzica w danym miejscu polimorficznym (15). Dalszą możliwością wytłumaczenia przeciwstawności cech u jednego z rodziców i dziecka jest niemożność wykrycia drugiego fragmentu metodami tradycyjnie stosowanymi w polimorfizmie RFLP–VNTR (restrykcja, blotting Southerna i hybrydyzacja z odpowiednią próbą), gdyż jest on ukrytym, zbyt krótkim fragmentem (1,3,8,15). Chakraborty i wsp., (3) nazywają go wręcz allelem zerowym. Należy wtedy zastosować kolejno: inne enzymy restrykcyjne, zmienione warunki elektroforezy i hybrydyzacji czy amplifikację, by wyjaśnić

zaistniałe zjawisko (1,3,8,15). Należy dodać, że tego rodzaju przypadki nie tylko utrudniają opiniowanie spraw spornego ojcostwa ale również pozornie zmieniają stosunek heterozygot do homozygot występujący w danej populacji, czyli informację ważną, dotyczącą polimorfizmu danego lokus (1,3). Stosowane przez hemogenetyków sądowo-lekarskich próby jedno- i wielomiejscowe charakteryzują się wysoką heterozygotycznością, satysfakcjonującą dla ustalania stosunków pokrewieństwa między badanymi osobami. O ile przy zastosowaniu MLP mutacje nie wpływają w sposób istotny na opiniowanie, o tyle przy SLP mogą prowadzić do fałszywych wniosków (6,7,9,18).

Opisane powyżej zjawiska powodują, że w przeciwieństwie do serologii klasycznej, która fałszywie włączała mężczyzn, nie będących ojcami, polimorfizm DNA typu RFLP-VNTR może fałszywie wyłączać prawdziwych ojców. Porównanie można również przeprowadzić między genem zerowym, spotykanym w klasycznej serologii a niemym typem mutacji (nową mutacją, delecją bądź częściową delecją) w danym lokus w badaniu polimorfizmu DNA. Jedno i drugie fałszywie wyłącza prawdziwych ojców. Zaś zbyt łatwe tłumaczenie aberracji w parze pozwany-dziecko – mutacją może być powodem fałszywych włączeń mężczyzn, nie będących ojcami (6,7,9,18).

Celem pracy było przedstawienie omawianego zagadnienia a w szczególności rodzajów i częstości mutacji zaobserwowanych w praktyce KMS ŚIAM w Katowicach.

MATERIAŁ I METODY

W niniejszej pracy poddano analizie 99 ekspertyz opracowanych w sprawach spornego ojcostwa przez Katedrę Medycyny Sądowej ŚIAM w Katowicach w latach 1996–1998.

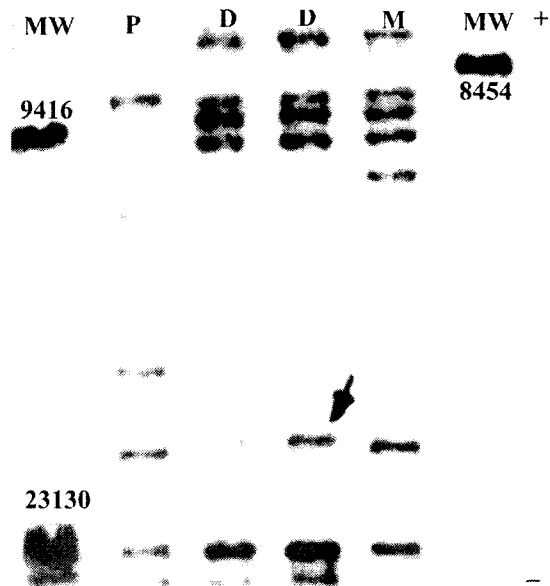
Stosowano powszechnie znane metody oznaczania polimorfizmu DNA typu RFLP-VNTR i PCR-VNTR. Oznaczano: MLP (MZ1.3, 33.15, 33.6 w cięciu Hinf I i HaeIII), SLP (MS8, MS205, MS43a, MS31 w cięciu HinfI, HaeIII, AluI i MboI), D1S80, DQA1, Polymarker. We wszystkich tercetach, w których wykazano mutację przeprowadzono ponadto badania serohematologiczne. W celu wyjaśnienia pozornej mutacji w lokus D16S309 (MS205) wykorzystano technikę PCR stosując primery A i B dla tego lokus otrzymane od J.A.L. Armour'a z Katedry Genetyki Uniwersytetu w Nottingham.

Mutację, jej rodzaj i częstość definiowano za Henke i wsp. (8–11) oraz Schneiderem i wsp. (17). Prawdopodobieństwo ojcostwa liczone na podstawie układów dających się fenotypować, korzystając z programu Serolog ver. 1.1 autorstwa Berenta (KMS AM w Bydgoszczy).

WYNIKI I DYSKUSJA

Tabele I i II przedstawiają mutacje zaobserwowane odpowiednio w MLP i SLP

oraz ich charakterystykę. Ryc. 1 to przykład mutacji wykazanej w MLP u bliźniąt jednojajowych.



Ryc. 1. Mutacja w MLP (MZ1.3/HaeIII) u bliźniąt jednojajowych.
Fig. 1. Mutation in monozygous twins in MLP (MZ1.3/HaeIII).

Tabela I. Mutacje zaobserwowane w MLP (polimorfizm RFLP-VNTR).
Table I. MLPs mutations (RFLP-VNTR polymorphism).

Próba Probe	Liczba tercetów Number of trios	Liczba mutacji Amount of mutations	Częstość mutacji Mutation rate			Prawdopodobieństwo ojcostwa, %* Probability of paternity, %*
			na mejozę per meiosis	na mejozę na fragment per meiosis per fragment	na mejozę na fragment per meiosis per fragment	
MZ1.3 Hinf I, Hae III	41 (19)	3	0.0366	0.0019	1. 99.95 2. 98.63 3. 95.55	
33.15 Hinf I, Hae III	41 (21)	1	0.0122	0.0006	1. 97.89	
33.6 Hinf I, Hae III	13 (19)	2	0.0769	0.0040	1. 99.99 2. 98.66	
Σ	95	6	0.0316	0.0016	—	

- * – prawdopodobieństwo liczone bez MLP i SLP
- * – probability calculated without MLP and SLP

Tabela II. Mutacje zaobserwowane w SLP (polimorfizm RFLP–VNTR).
Table II. SLPs mutations (RFLP–VNTR polymorphism).

Lokus Locus (Próba) (Probe)	Liczba tercetów Number of trios	Liczba mutacji Amount of mutations	Częstość mutacji Mutation rate	Prawdopodobieństwo ojcostwa, %* Probability of paternity, %*	Źródło mutacji Mutation origin		Rodzaj mutacji Kind of mutation
			na mejozę per meiosis				
D5S43 (MS8)	99	1	0.0050	99.95	+	–	dodatkowe miejsce restrykcji additional restriction site
D7S21 (MS31)	34	0	–	–	–	–	–
D12S11 (MS43a)	75	0	–	–	–	–	–
D16S309 (MS205)	79	1	0.0063	99.65	+	–	wydłużenie fragmentu fragment elongation
		+1 pozorna +1 pseudo		99.97	+	–	pozorne przeciwstawne homozygoty pseudoopposite homozygotes

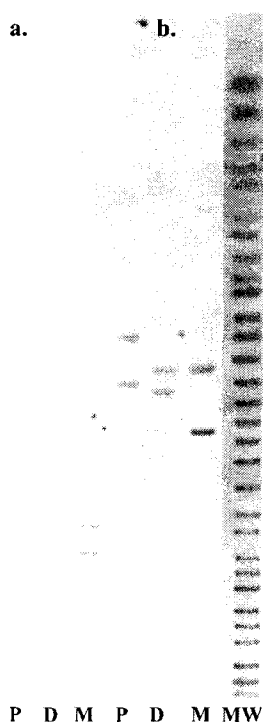
* – prawdopodobieństwo liczone bez MLP i SLP
* – probability calculated without MLP and SLP

Ryc. 2 i tabela III obrazują zaobserwowaną u dziecka zmianę długości fragmentu odcjowskiego w lokus D16S309 w cięciu zarówno HinfI jak i MboI. Henke i Henke (11) nazywają ten typ mutacji – odcjowską, gdyż bliższy zmutowanemu fragmentowi dziecka jest fragment domniemanego ojca. Dziedziczenie w tej parze w loci D12S11 i D7S21 w cięciu HinfI i MboI było poprawne.

Tabela III. Długości fragmentów w lokus D16S309 po cięciu różnymi enzymami restrykcyjnymi i hybrydyzacji z próbą MS205.

Table III. D16S309 fragment sizes after the cleavage with different restriction enzymes and hybridization with MS205 probe.

Osoba Person	Długość fragmentu, pz Fragment length, bp	
	Hinf I	Mbo I
Matka Mother	2320, 2970	4590, 5290
Dziecko Child	2320, 2530	4590, 4820
Domniemany ojciec Putative father	2020, 2450	4290, 4720



Ryc. 2. Mutacja długości w D16S309/Mbol (a) i D16S309/Hinfl (b).

Fig. 2. Length mutation in the locus D16S309/Mbol (a) and D16S309/Hinfl (b).

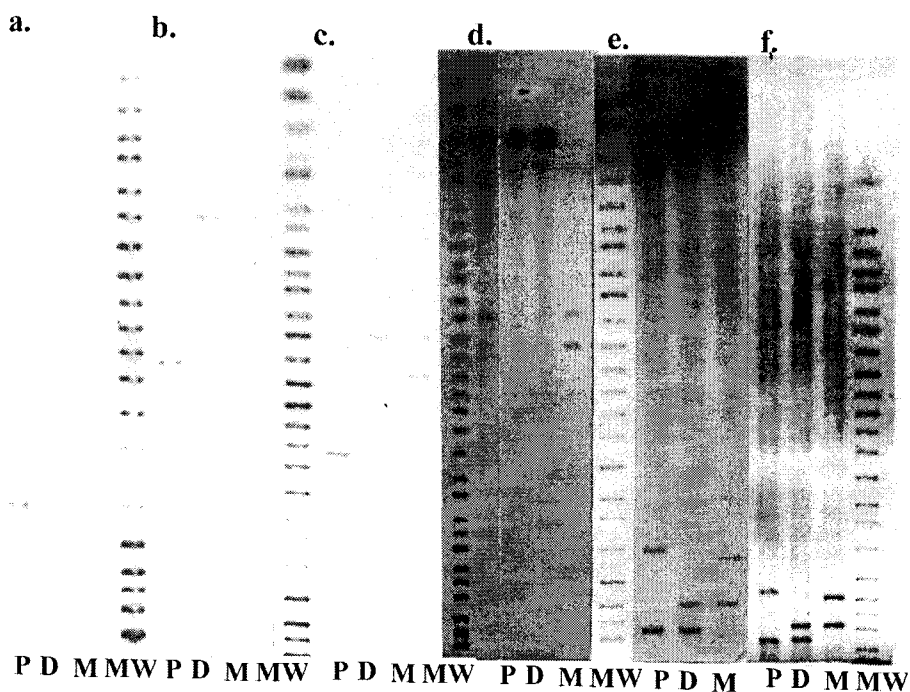
Mutację miejsca restrykcyjnego przedstawioną w tabelach II i VI opisano szczegółowo w poprzednim doniesieniu (16).

Ryc. 3 i tabela IV dokumentują obserwowane zjawiska pozornej mutacji stwierdzonej u domniemanego ojca i dziecka w locus D16S309 w cięciu Hinfl, Mbol i Alul. Dziedziczenie w locus D12S11 w cięciu Hinfl i Mbol było zgodne z prawem Mendla. Natomiast po zastosowaniu metody PCR, w uzupełnieniu technik rutynowo stosowanych w badaniu polimorfizmu typu RFLP-VNTR, uzyskano jednoznaczne wytłumaczenie aberracji w parze pozwany-dziecko. Powodem niezgodności dziedziczenia była obecność „ukrytego” allelu (780pz), uwidocznionego dopiero po zastosowaniu techniki PCR (ryc. 3d, tabela IV). Według Armour’a (korespondencja prywatna) krótkie fragmenty częściej zdarzają się w populacji negroidalnej.

Prawdopodobieństwo ojcostwa obliczone w „trójkach” z wykazanymi mutacjami jest bardzo różne. W wielu przypadkach przekracza jednak 99.73% co zgodnie ze słowną interpretacją skali prawdopodobieństwa wg Schwidetzky’ego jest ojcostwem praktycznie pewnym.

Porównanie częstości pojawienia się mutacji w MLP w kilku regionach Polski ukazuje tabela V. Zdecydowanie duży – i odbiegający od pozostałych – procent

mutacji odnotowano w ośrodku wrocławskim (4). Przekracza on znacznie cytowane w piśmiennictwie częstości mutacji (13,14). Tabela VI obrazuje z kolei częstość mutacji obserwowanych w analizie SLP, porównuje wyniki badań własnych i dane z populacji europejskich. Mutacje w loci D5S43 i D16S309, spotkane w praktyce KMS ŚIAM opisano również w populacjach Europy (Anglia-13, Niemcy – 10).



Ryc. 3. Pozorna mutacja w D16S309/Mbol (a), D16S309/AluI (b) i D16S309/HinfI (c). Ujawnienie „ukrytego” fragmentu u dziecka i pozwanego po amplifikacji (d). Poprawne dziedziczenie w locus D12S11 w cięciu HinfI (e) i Mbol (f) w badanym trio. M – matka, D – dziecko, P – domniemany ojciec, MW – marker wielkości, * – obraz fragmentów DNA w locus D16S309 u dziecka uzyskany po zmieszaniu DNA oznaczonego metodą restrykcji i hybrydyzacji (HinfI-MS205) oraz amplifikacji.

Fig. 3. Pseudo-mutation in the locus D16S309/Mbol (a), D16S309/AluI (b) and D16S309/HinfI (c). Detection of the cover fragment in the child and putative father after amplification (d). Heredity in the D12S11 locus after HinfI (e) and Mbol (f) cleavage in the tested trio. M – mother, D – child, P – putative father, MW – size marker, * – D16S309 fragments in child – mix child's DNA examined without and with amplification.

Tabela IV. Długości fragmentów w lokus D16S309 i D12S11 po cięciu różnymi enzymami restrykcyjnymi i hybridyzacji z próbami MS205 i MS43a
 Table IV. D16S309 and D12S11 fragment sizes after the cleavage with different restriction enzymes and hybridization with MS205 and MS43a probes

Długość fragmentu (pz) Fragment length (bp) Osoba Person	D16S309 (MS205)			D12S11 (MS43a)	
	Hinf I	Mbo I	Alu I	Hinf I	Mbo I
Matka Mother	2050, 2370	4230, 4550	2020, 2330	5640, 7340	7360, 9200
Dziecko Child	2050, 780*	4230, nb	2020, 840*	7340, 8840	9200, 10580
Domniemany ojciec Putative father	3210, 780*	5380, nb	3200, nb	5460, 8840	7070, 10580

* – po amplifikacji z primerami A i B

* – after amplification with A and B primers

nb – nie badano

nb – not tested

Tabela V. Częstość mutacji w MLP.

Table V. Mutation rate in MLP

Piśmiennictwo Mutacje References Mutations	Dobosz i wsp. (4)	Kozioł i wsp. (14)	Obserwacje własne This work
Liczba tercetów Number of trios	1351	269	95
Liczba mutacji Amount of mutation	259	9	6
Częstość mutacji, % Mutation rate, %	9.6*	1.6**	3.2

* – ogólnie dla prób MLP

* – generally for MLP probes

** – dla próby MZ 1.3 z enzymami restrykcyjnymi Hinf I i Hae III

** – for MZ 1.3 probe after Hinf I and Hae III cleavage

Należy ponadto zauważyć, że kilka cech mutacji takich jak: częstość, jej zależność od heterozygotyczności układu, opisanych przez Alonso i wsp. (1), Chakraborty'ego i wsp. (3) oraz Jeffreys'a i wsp. (13) zdecydowanie różni się od naszych obserwacji. Być może należy to zjawisko tłumaczyć zbyt małą liczbą analizowanych „trójek”, w których oznaczano polimorfizm DNA z wykorzystaniem technik RFLP–VNTR. Zgodne są natomiast spostrzeżenia, że częściej występują odojcowskie niż odmatczyne mutacje, i że częstość mutacji w lokus D5S43 i D16S309 nie przekracza 1%. Należy również podkreślić, że wniosek końcowy

plynący z niniejszej pracy jest zgodny ze spostrzeżeniami innych autorów (1,3,13), iż w przypadku aberracji dziedziczenia w parze pozwany–dziecko należy, uwzględniając wszystkie możliwości badawcze i interpretacyjne, wyjaśnić jednoznacznie zaistniałe zjawisko, by nie popełnić błędu orzeczniczego.

Tabela VI. Częstość mutacji w SLP.

Table VI. Mutation rate in SLP.

Lokus Locus (Próba) (Probe)	Heterozygotyczność obserwowana, % Observed heterozygosity, %			Częstość mutacji, % Mutation rate, %		
	Jeffreys i wsp. (13)	Henke i wsp. (10)	obserwacje własne this work	Jeffreys i wsp. (13)	Henke i wsp. (10)	Obserwacje własne this work
D5S43 (MS8)	85.1	–	74.3	do 0.3	–	0.5
D7S21 (MS31)	98.0	94.08	91.2	do 1.5	0.99	–
D12S11 (MS43a)	95.9	94.57	90.7	do 0.3	0.10	–
D16S309 (MS205)	–	96.40	96.5	–	0.43	0.6

PIŚMIENNICTWO

- Alonso S., Castro A., Fernandez–Fernandez I., de Pancorbo M.M.: Short alleles revealed by PCR demonstrate no heterozygote deficiency at minisatellite loci D1S7, D7S21, and D12S11. *Am. J. Hum. Genet.*, 1997, 60, 417–425. –2. Armour J.A.L., Wong Z., Wilson W., Royle N.J., Jeffreys A.J.: Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with random and dispersed repeat elements. *Nucl. Acids Res.*, 1989, 13, 4925–4935. –3. Chakraborty R., Zhong Y., Jin L., Budowle B.: Nondetectability of restriction fragment and independence of DNA fragment sizes within and between loci in RFLP typing of DNA. *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 55, 391–401. –4. Dobosz T., Szczepaniak M., Dmochowska G., Świątek B., Jagielski J.: Z kazuistyki badania polimorfizmu DNA w sprawach o ustalenie ojcostwa. *Postępy Med. Sąd. i Krym.*, 1997, 3, 329–334. –5. Flint J., Boyce A.J., Martinson J.J., Clegg J.B.: Population bottlenecks in Polynesia revealed by minisatellites. *Hum. Genet.*, 1989, 83, 257–263. –6. Henke L., Cleef S., Zakrzewska M., Henke J.: BamHI polymorphism of locus D2S44 in a West German population as revealed by VNTR probe YNH24. *Int. J. Leg. Med.*, 1990, 104, 33–38. –7. Henke L., Cleef S., Zakrzewska M., Henke J.: Population genetic data determined for five different single locus minisatellite probes. w: *DNA fingerprinting: Approaches and applications*, wyd. T. Burke i wsp., Birkhäuser Verlag, Basel, 1991, 144–153. –8. Henke L., Cleef S., Tahar M., Kops I., Henke J.: Population genetic and family data for the human minisatellite locus D16S309 (MS205) in Germans. *Int. J. Leg. Med.*, 1996, 109, 178–180. –9. Henke J., Henke L., Cleef S., Zakrzewska M., Sander K.: Segregation of single–locus DNA–fragments in a large family. w: *Advances in forensic haemogenetics*, wyd. H.W. Polesky i W.R. Mayr, Springer Verlag, Berlin, 1990, 3, 75–76. –10. Henke J., Fimmers R., Baur M.P., Henke L.: DNA–minisatellite mutations: recent investigations concerning distribution and impact on parentage testing. *Int. J. Leg. Med.*, 1993, 105, 217–222.

11. Henke J., Henke L.: Recent observations in human DNA–minisatellite mutations. *Int. J. Leg. Med.*, 1995, 107, 204–208. –12. Holmlund G., Wahlgren B., Lindblom B.: D12S11 (MS43a) allele with an internal Hinf I restriction site. *Forensic Sci. Int.*, 1994, 66, 105–109. –13. Jeffreys A.J., Royle N.J., Wilson V., Wong Z.: Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem – repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 1988, 332, 278–281. –14. Kozioł P., Krajka A., Mądro R.: Analiza segregacji fragmentów DNA wielolokusowej sondy MZ1.3 w badaniach genetycznych spornego ojcostwa. *Postępy Med. Sąd. i Krym.*, 1997, 3, 265–278. –15. Möller A., Wiegand P., Brinkmann B.: Observation of null alleles apparently due to deletions. *Int. J. Leg. Med.*, 1995, 108, 90–92. –16. Raczek E., Berent J.A.: D5S43 (MS8) allele with an internal Hae III restriction site. *Forensic Sci. Int.*, 1997, 89, 199–202. –17. Schneider P.M., Fimmers R., Bertrams J., Birkner P., Braunbeck K., Bulnheim U., Feuerbach M., Henke L., Iten E., Osterhaus E., Prinz M., Simeoni E., Rittner Ch.: Biostatistical basis of individualisation and segregation analysis using the multilocus DNA probe MZ1.3: results of the collaborative study. *Forensic Sci. Int.*, 1992, 55, 45–58. –18. Smith J.C., Anwar R., Riley J., Jenner D., Markham A.F., Jeffreys A.J.: Highly polymorphic minisatellite sequences: allele frequencies and mutation rates for five locus–specific probes in a Caucasian population. *JFSS*, 1990, 30, 19–32.

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

Tomasz Gos, Roman Hauser, Maciej Krzyżanowski

Stężenie glutaminianu w tkance mózgowej jako odzwierciedlenie krótkiej awersyjnej stymulacji bezpośrednio przed śmiercią

The concentration of glutamate in cerebral tissue reflects short aversive stimulation before death

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku
Kierownik: Prof. dr hab. R. Hauser

Praca prezentuje stężenie glutaminianu w półkulach mózgow i kompleksach mózdek–most–rdzeń przedłużony u szczurów poddanych stymulacji wzrokowej i słuchowej przed śmiercią jak i w grupie kontrolnej. Uzyskano statystycznie znamienne różnice w stężeniu tego neurotransmitera w wyżej opisanych kompleksach po stresie trwającym 1 minutę, natomiast nie uzyskano statystycznie znamiennych wyników w tych kompleksach u zwierząt stresowanych przez 10 minut, jak i w półkulach. Wyniki te różnią się od wcześniej uzyskanych na modelu eksperymentalnym z użyciem bodźców mechanicznych (dotykowych). Sugeruje to, możliwość określenia rodzaju awersyjnej sensorycznej stymulacji, która ma miejsce bezpośrednio przed śmiercią.

In this paper the concentration of glutamate in the brain hemispheres and the complexes: cerebellum–pons–medulla oblongata of rats exposed to visual and acoustic stimulation before death and of control rats are presented. Statistically significant differences in the concentration of this neurotransmitter were found in the above mentioned complexes in stress lasting 1 min but not after stress of 10 min duration and not in the hemispheres at all. These results differed from obtained in a previous experimental model with mechanical stimuli applied. This suggests that it may be possible to approach the pattern of aversive sensory stimulation which takes place a short time directly before death.

Słowa kluczowe: szczury, centralny system nerwowy, emocjonalna odpowiedź, glutaminian

Key words: rats, central nervous system, emotional response, glutamate

W procesach emocjonalnych i poznawczych biorą udział składowe układu limbicznego, wzgórce, kora mózgu, prądkowie (8,11,14). W tworzeniu pamięci

emocjonalnej zasadniczą rolę odgrywa ciało migdałowe (14). W tworzeniu pamięci opisowej dominujące znaczenie posiada zespół hipokampa (4). Oba rodzaje pamięci przywoływane są równocześnie. Dzięki wzajemnym połączeniom ciała migdałowego, zespołu hipokampa oraz określonych pól kory nowej tworzą one w naszej świadomości jedno doznanie zapewniając pod wpływem sytuacji stresowej, spowodowanej uprzednio uwarunkowanym bodźcem zewnętrznym, emocjonalną odpowiedź (9). Warunkowanie emocjonalnych reakcji było przedmiotem licznych badań. Stosowano w nich, oceniając reakcje behawioralne zwierząt, różne modele eksperymentalne (13,18). Odpowiedź lękowa ma miejsce nie tylko w procesach związanych z bodźcem warunkowym. Zachodzi ona także w następstwie działania bodźców nieznanych, posiadających charakter awersyjnych bodźców bezwarunkowych (13).

W procesach poznawczych i emocjonalnych bierze udział także mózdzek (11,15). Stwierdzono, że niezależnie od roli w kształtowaniu funkcji motorycznych, uczestniczy on w odbiorze bodźców sensorycznych, tworzeniu koncentracji uwagi, pamięci krótkotrwałej, w podejmowaniu decyzji i działań (9). Posiada zasadnicze znaczenie w nauczaniu warunkowym (4).

Głównym neuroprzekaźnikiem działającym w transmisji pobudzającej OUN jest glutaminian. Aktywuje on receptory iGluR (non-NMDA i NMDA) i mGluR neuronów i astrocytów (10,12). W stymulacji receptorów glutaminowych kluczową, pośrednią rolę odgrywa tlenek azotu. Aktywując rozpuszczalną cyklazę guanylową wrażliwą na tlenek azotu (nitric-oxide-sensitive soluble guanylyl cyclase – NOGC) wpływa na uwalnianie glutaminianu do przestrzeni synaptycznej (9,10).

Wzrost stężenia glutaminianu w określonych strukturach OUN jest jednym z molekularnych wykładników reakcji lękowej. Stosując techniki mikrodializy wykazano podwyższony poziom glutaminianu w przestrzeni międzykomórkowej kory przedczołowej i hipokampa szczurów drażnionych bodźcami bólowymi (2). Wzrost stężenia tego neuroprzekaźnika stwierdzono także w badaniach pośmiertnych tkanki mózgowej szczurów poddanych awersyjnej stymulacji stosowanymi łącznie bodźcami mechanicznymi, wzrokowymi i słuchowymi różnymi od tych powszechnie stosowanych w procedurach eksperymentalnych, ale za to zbliżonych do spotykanych w rzeczywistości (10).

Celem pracy jest ocena stężeń glutaminianu w półkulach mózgow szczurów, wobec których stosowano jedynie awersyjne bodźce wzrokowe i słuchowe. Badania te uzupełniono o pomiary stężeń glutaminianu w kompleksach: mózdzek–most–rdzeń przedłużony.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 49 szczurach płci męskiej rasy Wistar, których masa wynosiła 270 – 580 g a masa ich mózgow 1,6 – 2,1 g. W czasie trwania doświadczeń zwierzęta miały zapewniony swobodny dostęp do wody i standardowej paszy. Wszystkie szczury umierały w podobny sposób, z tym, że 25 z nich podzielono na dwie grupy i poddano przed śmiercią stymulacji sensorycznej

trwającej 1 minutę (n=13) i 10 min (n=12). Każdej grupie stymulowanych zwierząt towarzyszyła grupa kontrolna. Szczury z grupy kontrolnej, w liczbie 2 na każdy eksperyment, umieszczano w pleksiglasowej klatce własnej konstrukcji o wymiarach 55cmx40cmx7cm z ruchomą pokrywą, pozostawiając je tam przez noc na okres dwunastu godzin. Następnego dnia rano opuszczano pokrywę w taki sposób, aby nie niepokoić zwierząt, po czym wpuszczano do klatki przez przytwierdzone na stałe plastikowe węże znajdujący się w butli pod ciśnieniem dwutlenek węgla. Zgon następował w ciągu minuty. Podczas całej tej procedury zwierzęta nie widziały eksperymentatorów. W tym czasie obserwowano je przez wizjer z sąsiedniego pomieszczenia

Następnie zwierzęta natychmiast dekapitowano, otwierano ich jamy czaszkowe, wyjmowano mózgi i sekcjonowano je na lodzie. Mózgi wszystkich zwierząt zostały podzielone na dwie części: 1. obie półkule 2. kompleks mózdek–most–rdzeń przedłużony (oddzielone na wysokości wzgórki dolne pokrywy śródmózgowia – jądra mostu). Fragmenty te ważono i umieszczano w ciekłym azocie, stosując pojemnik typu Dewar CP65 firmy Taylor–Wharton. Czas trwania całej procedury od chwili zgonu zwierzęcia do momentu umieszczenia tkanki w niskiej temperaturze nie przekraczał pięciu minut.

Szczury poddawano działaniu dwóch typów bodźców sensorycznych: słuchowych i wzrokowych; bodźce te stosowano jednocześnie. Charakter zastosowanych bodźców miał być zbliżony do tych opisywanych w przypadkach sądowo-lekarskich.

Pierwszy rodzaj bodźca uzyskiwano na dwa sposoby: używając dwóch gwizdków akustycznych oraz poprzez pocieranie metalowym prętem o metalową kratkę. Charakterystyka bodźców słuchowych była mierzona przez analizator akustyczny Swan 910. Źródło dźwięku i mikrofon zostały umieszczone w pokoju dźwiękoszczelnym z pomijalnym poziomem zakłóceń zewnętrznych.

Pierwszy z owych gwizdków, z dwoma kulkami w komorze rezonansowej produkował główną harmoniczną A przy częstotliwości 2624 Hz o poziomie akustycznym 100 dB. Druga harmoniczna B wykazywała wartość poziomu akustycznego 80 dB a trzecia harmoniczna C – 64 dB. Ostry koniec w spektrum D był zlokalizowany około 11 kHz. Maksymalny poziom zakresu wysokiej częstotliwości E wynosił około 60 dB. Taka wartość poziomu akustycznego obowiązywała dla częstotliwości pomiędzy 14 kHz i 16 kHz.

Drugi gwizdek z jedną kulką w komorze rezonansowej produkował główną harmoniczną A przy częstotliwości 3840 Hz o poziomie akustycznym 107 dB.

Gwizdek ten generował także ultradźwięki na wysokim poziomie akustycznym; dla przykładu: przy częstotliwości 22700 Hz średni poziom akustyczny wynosił 50 dB.

Pocieranie prętem o kratkę generowało dźwięk o stacjonarnym widmie głośności z główną częstotliwością 200 Hz na poziomie akustycznym równym 54 dB, które spłaszczało się w zakresie górnych częstotliwości urządzenia analizującego.

Bodźce wzrokowe były generowane przez lampę stroboskopową S 100 W z regulowaną częstotliwością. Charakterystyka tych bodźców była mierzona przy pomocy standardowego fotometru fotoelektrycznego (Carl Zeiss Jena) z detektorem używanym do fotometrii wzrokowej. Bodźce wzrokowe generowano

z częstotliwością błysków równą 6 Hz. Średnia wartość natężenia światła w punkcie oddalonym 30 cm od lampy wynosiła 10000 lx. Wartość ta była stała z mniejszym niż 5% odchyleniem.

Po okresie stymulacji klatkę zamykano, napełniano ją dwutlenkiem węgla a po śmierci szczurów powtarzano procedurę pobierania fragmentów półkul mózgu jak w przypadku zwierząt kontrolnych.

OZNACZANIE STĘŻENIA GLUTAMINIANU

1 g tkanki mózgu homogenizowano ręcznie w 5 ml chłodzonego lodem środowiska izolacyjnego zawierającego: 20 Mm bufor Tris-Cl, pH 7,4 i 0,2 % Triton X-100. Po homogenizacji dodawano 5 ml chłodzonego lodem 1 M HClO₄ i całość intensywnie mieszano. Następnie homogenat był wirowany przez 10 minut w 3000xg. Otrzymany osad pozostawiano do oznaczenia stężenia białka, a do 5 ml nadsącza dodawano 0,5 ml 1,9 M K₃PO₄, następnie mieszano i wirowano przez 10 minut w 3000xg. Uzyskany nadsącz (50 µg) stosowano do oznaczania stężenia glutaminianu przy pomocy dehydrogenazy glutaminianowej i NAD w sposób opisany przez Bernta i Bergmeyera (3). Ujmując tę metodę pokrótce: do 0,6 ml buforu glicynowo-hydrazynowego (0,5 M glicyny + 0,4 M hydrazyny, pH 9,0) dodano reagenty: 50 µg próbki (albo 50 µg H₂O ślepej próby) uzyskanej jak opisano powyżej, 30 µl 33,5 mM ADP, 60 µl 27 mM NAD i 0,21 ml H₂O. Próbkę mieszano i odczytywano absorbancję. Następnie dodawano 50 µl (4,5 U/ml) dehydrogenazy glutaminianowej i po 45 minutach ponownie odczytywano absorbancję. Do obliczenia stężenia glutaminianu używano wzoru: $\Delta A \text{ glutaminianu} = \Delta A \text{ próbki} - \Delta \text{ próby ślepej}$.

Względne odchylenie standardowe tej metody wynosiło 2 % (3).

W celu oznaczania stężenia białka, osad uzyskany w podany sposób rozpuszczano w 12 ml 1 M NaOH i rozcieńczano 10 razy wodą destylowaną. 50 µl takiego roztworu używano do oznaczania stężenia białka metodą Petersona (16) stosując jako standard surowicę wołową.

Do porównania średnich z prób po sprawdzeniu, czy uzyskane pule wyników odpowiadają rozkładowi normalnemu oraz czy ich wariancje są równe zastosowano test "t". Jako poziom istotności przyjęto 0,05.

WYNIKI

Stresowane zwierzęta w pierwszych sekundach stymulacji akustycznej i optycznej wyraźnie zamierały (reakcja typu freezing) po czym wykazywały kilkusekundowe pobudzenie ruchowe (reakcja typu startle). W przebiegu dalszej stymulacji zachowywały się spokojnie, m.in. wykazując stereotypową reakcję „mycia się” (reakcja typu grooming).

Tabela I. Stężenie glutaminianu (nmol /mg białka) w półkulach mózgu

i kompleksach mózdek–most–rdzeń przedłużony u zwierząt poddanych 1 minutowej stymulacji sensorycznej (S) i w grupie kontrolnej (N)

n – liczba osobników , SD – odchylenie standardowe, P – poziom istotności

Table I. Concentration of glutamate (nmol /mg protein) in the hemispheres and complexes: cerebellum–pons–medulla oblongata of animals subjected to sensory stimuli (S) for 1 minute and of those from the control group (N).

n – number of individuals, SD – standard deviation, P –significance level

	Półkule Hemispheres		Kompleksy Complexes	
	N	S	N	S
n	12	13	12	13
średnia mean	101.58	106.85	75.92	87.23
SD	14.83	15.51	8.46	10.82
P	> 0.05		0.02	

Tabela II. Stężenie glutaminianu (nmol / mg białka) w półkulach mózgu i kompleksach mózdek–most–rdzeń przedłużony u zwierząt poddanych 10 minutowej stymulacji sensorycznej (S) i w grupie kontrolnej (N)

n – liczba osobników , SD – odchylenie standardowe, P – poziom istotności

Table II. Concentration of glutamate (nmol /mg protein) in the hemispheres and complexes: cerebellum–pons–medulla oblongata of animals subjected to sensory stimuli (S) for 10 minute and of those from the control group (N).

n – number of individuals, SD – standard deviation, P – significance level

	Półkule Hemispheres		Kompleksy Complexes	
	N	S	N	S
n	12	12	12	12
średnia mean	116.58	128.25	89.92	90.08
SD	14.56	26.56	22.38	11.23
P	> 0.05		> 0,05	

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic między stężeniami glutaminianu

w półkulach mózgow szczerów poddanych bodźcom sensorycznym przez 10 min. i 1 min. i w półkulach mózgow osobników kontrolnych. Znamienny wzrost stężeń glutaminianu stwierdzono jedynie w kompleksach mózdek–most–rdzeń przedłużony po stymulacji sensorycznej trwającej 1 min ($P=0,02$).

DYSKUSJA

Otrzymane wyniki różnią się w sposób istotny od wyników badań autorów, w których stosowano łącznie trzy rodzaje stymulacji awersyjnej: mechaniczną, akustyczną i optyczną (10). Obserwowano wówczas znamienny statystycznie wzrost stężeń glutaminianu wobec grup kontrolnych w półkulach mózgow zwierząt stresowanych przez 1 min. ($P=0,02$) i 10 min. ($P=0,001$). W badaniach prezentowanych obecnie bodźce mechaniczne pominięto a ograniczono się wyłącznie do bodźców wzrokowych i słuchowych o parametrach identycznych jak stosowane poprzednio (10). Istotnych statystycznie różnic między stężeniami glutaminianu w półkulach mózgow osobników stresowanych i kontrolnych nie wykazano, chociaż procedura zabijania zwierząt grupy kontrolnej gwarantowała całkowity ich spokój w momencie śmierci. Wykazywała ona zdecydowaną przewagę nad zwykle stosowaną dekapitacją. Zestawienie otrzymanych wyników z wynikami badań poprzednich (10) wskazuje na bezpośredni związek zmian stężeń glutaminianu w półkulach mózgow jedynie z działaniem bodźców mechanicznych. Ich charakter (wielokrotnie powtarzany, krótkotrwały ucisk tułowia wywierany ze średnią siłą 3 N) odbiegał od powszechnie stosowanych bodźców bólowych. Podwyższony poziom glutaminianu obserwowano *in vivo* w przestrzeni pozakomórkowej kory przedczołowej i hipokampów szczerów kłutych w ogon (2). Istnieją także liczne publikacje dotyczące pośmiertnej oceny stężenia glutaminianu w mózgu szczerów poddanych procedurom stresowania (6,7)

Zmiany stężenia monoamin i ich metabolitów stwierdzano *post mortem* w strukturach układu limbicznego i prądkowiu szczerów drażnionych m.in. prądem elektrycznym (1,5). Czas zastosowanych procedur stresowania jest zdecydowanie dłuższy niż ten, który ma miejsce w naszym modelu eksperymentalnym.

W transmisji zachodzącej w drogach rdzeniowo-mózdkowych, mostowo-mózdkowych oraz wewnątrz-mózdkowo istotną rolę odgrywa glutaminian oddziaływujący wzajemnie z kwasem γ -aminomasłowym (GABA) (17).

Przedstawione badania wykazały wzrost stężeń glutaminianu w kompleksach mózdek–most–rdzeń przedłużony po 1 min. stymulacji optycznej i akustycznej. Nie obserwowano tego po stymulacji trwającej 10 min. Wyniki te mogą wskazywać na udział określonych struktur mózgu i/lub pnia mózgu w odpowiedzi na bodźce wzrokowe i/lub słuchowe i na jej wygaszanie po dłuższym okresie bodźcowania. Pobudzenie sensoryczne powoduje rozprzestrzenioną aktywację kory mózgu (13,18). Mózdek otrzymuje impulsy wzrokowe z kory wzrokowej i ze śródmózgowia (13,18). W rdzeniu przedłużonym i moście zlokalizowane są niektóre składowe szlaków słuchowych (13,17,18). Obserwowany wzrost stężeń glutaminianu może być więc wynikiem aktywacji

wymienionych struktur w percepcji bodźców wzrokowych i słuchowych. Przy takim założeniu niezrozumiałym jest jednak brak w nich uchwytnych zmian w stężeniach glutaminianu po stymulacji optycznej i akustycznej trwającej 10 min. Może mieć on związek ze zjawiskiem blokowania impulsów pobudzających korę mózdzku przewodzonych przez włókna pnące (18).

Zastosowane bodźce wzrokowe i słuchowe miały charakter bodźców niewyuczonych, awersyjnych. W pierwszych sekundach stymulacji akustycznej i optycznej obserwowano u szczurów typowe wykładniki reakcji lękowej. W trakcie dalszego bodźcowania zachowywały się one spokojnie. Główne szlaki mózdzku do- i wyprowadzające mają, poza korą ruchową, połączenia z polami czuciowymi kory mózgu (15). Donosi się o udziale robaka mózdzku w przyspieszeniu akcji serca będącym jednym z elementów reakcji emocjonalnej (18). Nasuwa się więc przypuszczenie, że wzrost stężeń glutaminianu w kompleksach mózdzek–most–rdzeń przedłużony po 1 min. stresowania może być wykładnikiem krótkotrwałego lęku na zastosowane bodźce awersyjne. Jego szybkie zanikanie mogło być związane z habituacją zwierząt do tych bodźców. Przypuszczenie to może wydawać się wątpliwe wobec stwierdzonego braku zmian stężeń glutaminianu w półkulach mózgowych, w których zlokalizowane są wszystkie składowe układu limbicznego. Podwyższenie poziomu glutaminianu obserwowano w półkulach mózgow szczurów w następstwie łącznego stosowania stymulacji mechanicznej, optycznej i akustycznej (10). Brak wzrostu stężenia neurotransmitera nie wyklucza jego zwiększonego poziomu w szczelinie synaptycznej i pobudzenia neuronów (1,5). Z drugiej strony obserwowane w tkance mózgowej zwiększenie stężenia glutaminianu, związane ze wzrostem syntezy wewnątrzkomórkowej, nie musi odpowiadać większemu jego stężeniu w przestrzeni synaptycznej (1,6).

Ocena stężeń glutaminianu i jego rozmieszczenia w wybranych strukturach mózgow szczurów po różnych okresach oddzielnego stosowania bodźców sensorycznych: wzrokowych, słuchowych, mechanicznych będzie przedmiotem najbliższych badań biochemicznych i immunohistochemicznych.

Podziękowania:

Autorzy pragną podziękować Prof. J. Świerczyńskiemu z Katedry Biochemii Akademii Medycznej w Gdańsku za cenne uwagi i pomoc techniczną.

PIŚMIENNICTWO

1. Abercrombie E.D., Keefe K.A., DiFrischia D.S., Zigmond M.J.: Differential effects of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J. Neurochem.*, 1989, 52, 1655–1658. –2. Bagley J., Moghaddam B.: Temporal dynamics of glutamate efflux in the prefrontal cortex and in the hippocampus following repeated stress: effects of pretreatment with saline or diazepam. *Neurosci.*, 1997, 77, 65–73. –3. Bernt E., Bergmeyer H.U.: L-glutamate UV-assay with glutamate dehydrogenase and NAD. In: Bergmeyer HA (ed) *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Academic Press, 1974, 4,

1704–1717. –4. Clark R.E., Squire L.R.: Classical conditioning and brain system: the role of awareness. *Science*, 1998, 280, 77–81. –5. Feenstra M.G.P., Botterblom M.H.A., van Uum J.F.M.: Local activation of metabotropic glutamate receptors inhibits the handling-induced increased release of dopamine in nucleus accumbens but not that of dopamine or noradrenaline in the prefrontal cortex. *J. Neurochem.*, 1998, 70, 1104–1113. –6. Fonnum F.: Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.*, 1984, 42, 1–11. –7. Gilad G.M., Gilad V.H., Wyatt R.J., Tizabi Y.: Region-selective stress-induced increase of glutamate uptake and release in rat forebrain. *Brain Res.*, 1990, 525, 335–338. –8. Gos T., Hauser R.: Evaluation of the emotional state shortly before death – science-fiction or a new challenge? *Int. J. Legal. Med.* 1996, 108, 327–328. –9. Hauser R., Gos T., Krzyżanowski M.: Neurobiology – can it help forensic medicine? The function of selected neurotransmitters in the forming of central emotional response. *Problems of Forensic Science*, 1998, 37, 9–27. –10. Hauser R., Gos T., Krzyżanowski M., Goyke E.: The concentration of glutamate in cerebral tissue as a factor for the assesment of the emotional state before death. A preliminary report. *Int. J. Legal. Med.*, (in press)

11. Lane R.D., Reiman E.M., Bradley M.M.: Neuroanatomical correlates of pleasant and unpleasant emotion. *Neuropsychologia*, 1997, 35, 1437–1444. –12. Lasoń W., Turchan J., Przewłocka B., Łabuz D., Przewłocki R.: Effects of repeated MK-801 administration on the glutamate receptor gene expression in the rat hippocampus. *Pol. J. Pharmacol.*, 1997, 49, 249–253. –13. Lavond D.G., Kim J.J., Thompson R.F.: Mammalian brain substrates of aversive classical conditioning. *Annu. Rev. Psychol.*, 1993, 44, 317–342. –14. LeDoux J.E.: The emotional brain. New York, Simon & Shuster, 1996. –15. Middleton F.A., Strick P.L.: Cerebellar output channels. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1997, 41, 61–82. –16. Peterson G.L.: A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 1977, 83, 346–356. –17. Sastry B.R., Morishita W., Yip S., Shew T.: GABA-ergic transmission in deep cerebellar nuclei. *Prog. Neurobiol.*, 1997, 53, 259–271. –18. Thompson R.F., Krupa D.J.: Organization of memory traces in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1994, 17, 519–549.

Adres pierwszego autora:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
80–210 Gdańsk
ul. Skłodowskiej-Curie 3a

Od redakcji: chociaż niniejsza praca nie jest ściśle związana z klasyczną medycyną sądową umieszczamy ją w druku, widząc potrzebę propagowania metodyk doświadczalnych w medycynie sądowej, zwłaszcza w obszarze tematów i badaniach tanatologicznych. Metodyki te mogą znacząco przyczynić się do rozwoju badań naukowych w medycynie sądowej.

**Stefan Szram, Krzysztof Trojanowski, Krzysztof Zieliński,
Krystyna Bielnik, Dariusz Młockowski, Robert Koktycz, Piotr
Wołkanin, Marian Stępień**

Ocena morfometryczna i ultrastrukturalna zmienności jąder hepatocytów w przebiegu przewlekłej doświadczalnej intoksykacji glikolem etylenowym

Morphometric and ultrastructural analysis of hepatocyte nucleic variability in the course of long-term experimental ethylene glycol intoxication

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Łodzi

Kierownik Katedry: prof. dr hab. med. S. Szram

Z Pracowni Patologii Ultrastrukturalnej Zakładu Patomorfologii Klinicznej WAM
w Łodzi

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. K. Zieliński

Autorzy dokonali ilościowej oceny zachowania się wybranych parametrów jądra hepatocyta i jego ultrastruktury w wątrobie szczurów poddanych przewlekłej intoksykacji glikolem etylenowym. Badania morfometryczne przeprowadzono na analizatorze obrazu firmy Kontron z pakietem programowym IBAS 2000. Ocenę ultrastrukturalną dokonano w mikroskopie transmisyjnym 10 CR firmy Zeiss. Przeprowadzone badania ujawniły, że w przewlekłej intoksykacji glikolem etylenowym dochodzi do statystycznie znaczącego wzrostu pola powierzchni i liczebności zbryleń chromatyny jądrowej w hepatocytach. Przeprowadzone badania ultrastrukturalne ujawniły, że dochodzi do zaburzeń w formowaniu jąderka i rozkładzie oraz zmianach w chromatynie jądrowej.

The authors have made a quantitative evaluation of the behaviour of the hepatocyte nucleus selected parameters and its ultrastructure in rat liver subjected to long-term ethylene glycol intoxication. Morphometric examinations were carried out with Kontron picture analyser with IBAS 2000 software. Ultrastructural analysis was undertaken with the Zeiss 10 CR transmission microscope. The investigations revealed that in long-term ethylene glycol intoxication there is a statistically significant increase of the area and number of nucleus chromatin clumping in hepatocytes. Ultrastructural examination showed disorders in nucleolus formation and distribution and changes in nuclear chromatin.

Słowa kluczowe: morfometria, ultrastruktura wątroby, hepatocyt, glikol etylenowy, przewlekła intoksykacja

Key words: morphometry, liver ultrastructure, hepatocyte, ethylene glycol, chronic intoxication

WSTĘP

Przeprowadzone wcześniej badania nad procesami zachodzącymi w hepatocycie w przewlekłym zatruciu glikolem etylenowym (GE) ujawniły morfologiczne wykładniki zwyrodnienia, w tym głównie glikogenowego a ponadto różnie wyrażoną martwicę przeważnie rozplywną komórek wątrobowych (15).

Analiza mikroskopowa, w tym szczególnie dotycząca jąder hepatocytów wykazała, że ich chromatyna jest z reguły gruboziarnista i zagęszczona przy błonie jądrowej, co sprawiało wrażenie wakuolizacji tej struktury komórki. W tych przypadkach, mimo poszukiwań nie ujawniono obrysów jąder. Ocena zmian w zakresie jądra była jednak bardzo obiektywna i skłoniło to nas do podjęcia próby rozbudowania badania jakościowego o ocenę morfometryczną i ultrastrukturalną.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 80 szczurach obojga płci, szczepu wsobnego Wistar – w wieku 5 miesięcy, o masie ciała 150–180 g. Zwierzęta podzielono na grupę doświadczalną (D) i porównawczą (K). Zwierzętom grupy porównawczej podawano jedynie paszę granulowaną "Murigan" oraz wodą pitną w dowolnej ilości. Szczurom grupy D obok tej samej paszy podawano 1,25% roztwór glikolu etylenowego w pojkach. Stężenie GE zostało ustalone we wstępnym badaniu pilotażowym. Zwierzęta uśmiercano przez otwarcie klatki piersiowej w znieczuleniu ogólnym, eterowym w 12, 14 i 16 tygodniu intoksykacji. Wycinki z wątroby do badań w mikroskopie świetlnym utrwalano w 7% roztworze zobojętnionej formaliny a do badań w mikroskopie elektronowym w 3,6% roztworze glutaraldehydu w 0,13 M buforze kakodylanowym o pH=7,2. Materiał tkankowy do oceny histopatologicznej opracowano techniką parafinową w procesorze tkankowym Hipocenter (firmy Shendon). Uzyskane preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną, wykonano odczyn PAS wg McManusa z trawieniem diastazą. Z materiału mrożakowego w preparatach został wykonany odczyn na tłuszcze obojętne przy pomocy barwienia Oil Redem. Materiał do oceny ultrastrukturalnej dotrwalano w 2% roztworze czterotlenku osmu a następnie zatapiano w eponie. Preparaty do oceny krojono Ultramikrotomem LKB-5 i kontrastowano automatycznie w urządzeniu Ultrasteiner firmy LKB oraz oceniano w mikroskopie elektronowym 10CR Zeiss.

Ocenę ilościową jąder hepatocytów w preparatach barwionych hematoksyliną

i eozyną prowadzono przy pomocy własnego algorytmu na analizatorze obrazu firmy Kontron z pakietem IBAS 2000. Obrazy do analizy wczytywano z mikroskopu przy powiększeniu 100x obiektywem planapochromatycznym Zeiss z umieszczonym w drodze optycznej filtrem czerwonym. Po wstępnym przetworzeniu obrazu o wielu stopniach luminacji wydzielono obszar profili pojedynczych jąder hepatocytów. Segmentację obrazu przeprowadzono półautomatycznie a następnie wydzielono automatycznie obszary jądra odpowiadające zbryleniom chromatyny jądrowej. Analizie poddano następujący zestaw zmiennych morfometrycznych:

pole profilu jądra (POLE JĄDRA), obwód profilu jądra (OBWÓD JĄDRA), współczynnik elipsoidalności (ELIP JĄDRA), odchylenie standardowe jasności (STD JĄDRA).

Liczebność zbryleń chromatyny jądrowej (LICZ CHROM), pole profilu zbryleń chromatyny jądrowej (POLE CHROM), współczynnik elipsoidalności profili zbryleń chromatyny jądrowej (ELIP CHROM), odchylenie standardowe jasności (STD CHROM).

Długość błony jądrowej (DŁUGOŚĆ).

W każdym preparacie, w danym punkcie czasowym, dokonano oceny losowo wybranych 10 hepatocytów. Uzyskane dane morfometryczne poddano analizie statystycznej z użyciem typowych miar położenia i rozproszenia: średniej, odchylenia standardowego, mediany, pierwszego i trzeciego centyla. Do analizy danych nominalnych i rangowych zastosowano test Anova wg Friedmana oraz współczynnik zgodności Kendala. Nieparametryczne testy statystyczne zastosowano po uprzedniej ocenie normalności rozkładów testem Kruskal'a-Wallis'a oraz istotności różnic wariancji w próbach testem F-Snedecora. Wszystkie różnice przyjmowano za istotne statystycznie dla $p < 0,05$.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

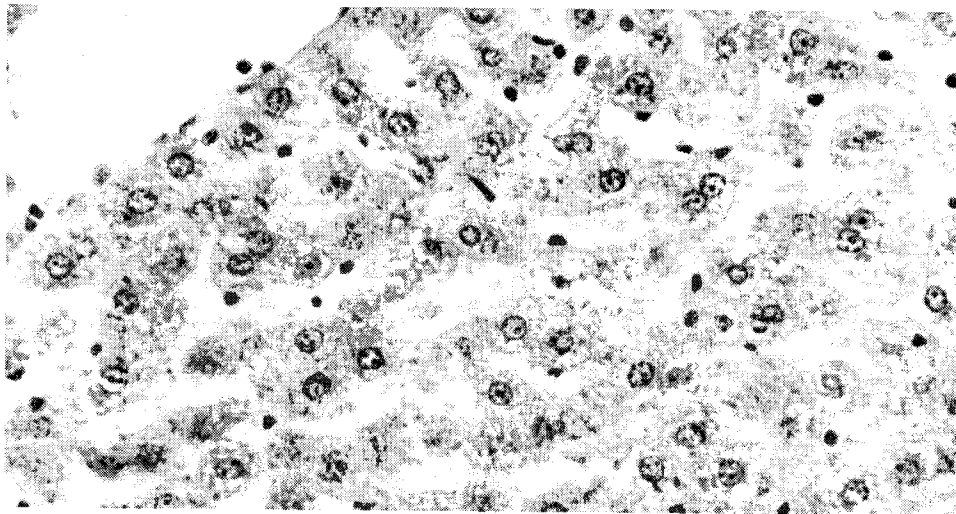
A. Ocena mikroskopowo-światlna

Badaniem mikroskopowym w preparatach z wątroby zwierząt poddanych intoksykacji GE stwierdzono już w 12 tygodniu obserwacji wzrost liczebności zbryleń chromatyny z jednoczesnym jej rozproszeniem i grupowaniem się w pobliżu błony jądrowej, co sprawiało wrażenie pustego lub zwakuolizowanego jądra (ryc. 1). Powyższe zmiany nasilały się w miarę trwania doświadczenia. Sama chromatyna jądrowa stawała się coraz bardziej ziarnista i dobrze wysycona.

B. Ocena morfometryczna

Wstępne analizy statystyczne nie wykazały jednak, znamienych statystycznie różnic zmiennych morfometrycznych: POLE JĄDRA, OBWÓD JĄDRA, ELIP

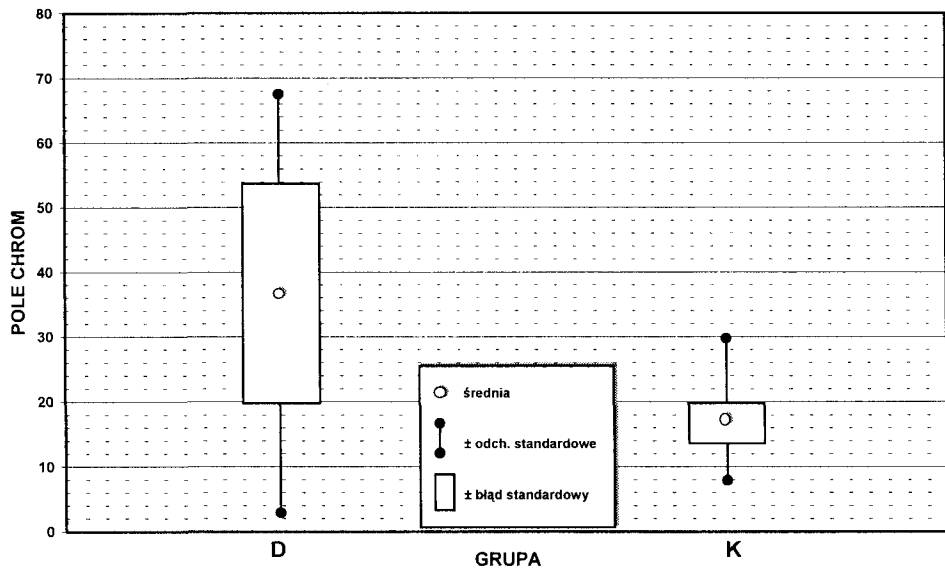
JĄDRA i STD JĄDRA oraz ELIP CHROM, STD CHROM i DŁUGOŚĆ. Natomiast ujawniono istotne statystycznie różnice w POLE CHROM pomiędzy grupami D i K we wszystkich punktach czasowych (ryc. 2, 3, 4). Wykazano ponadto znamienne statystycznie różnice w zakresie liczebności zbryleń chromatyny (LICZ CHROM) w obrębie jądra hepatocytów i ujawniono je we wszystkich punktach czasowych (ryc. 5, 6, 7). Porównanie zmiennej pola powierzchni zbryleń chromatyny (POLE CHROM) w jądrze komórkowym dla poszczególnych punktów czasowych wykazała, że średnia powierzchnia tego parametru morfometrycznego rosła pomiędzy 12, 14 i 16 tygodniem obserwacji. Największy przyrost średniego pola powierzchni zbryleń był widoczny pomiędzy wartościami grupy D i K w 12 tygodniu doświadczenia. W kolejnych punktach czasowych stwierdzono znamienne zmniejszenie rozrzutu wartości pól powierzchni zbryleń (POLE-CHROM) wokół mediany (ryc. 5, 6).



Ryc. 1. Wycinek z wątroby szczura grupy doświadczalnej w 16 tygodniu doświadczenia. Obwodowe zagęszczenie chromatyny w jądrze z pustymi rzekomo-wodniczkowymi przestrzeniami. Barwienie HE, pow. 1 200 x.

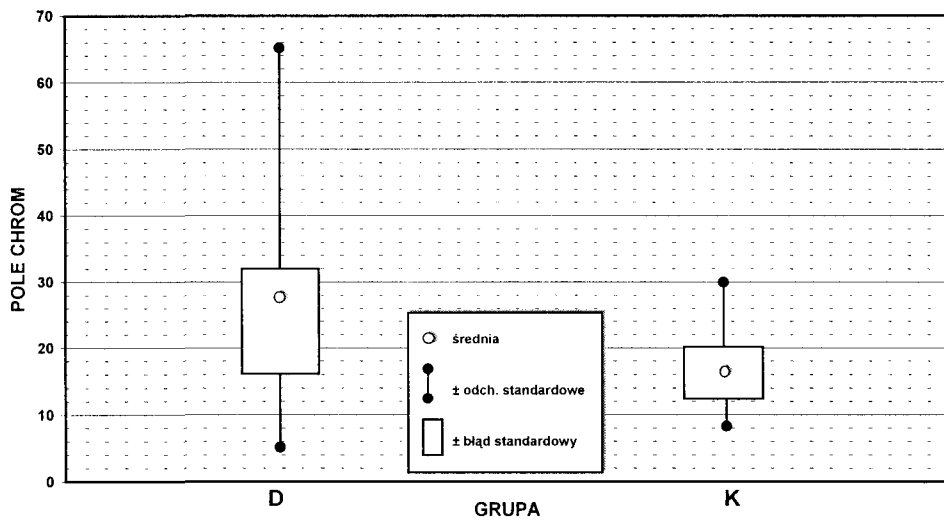
Fig. 1. Experimental group rat liver specimen in 16 week of the experiment. Peripheral concentration of chromatin in nucleus with empty pseudo vacuolar areas. HE staining, enl. 1 200x.

Zmienność LICZ CHROM wskazywała nieco inny przebieg. Średnia liczebność zbryleń chromatyny jądrowej w 12, 14 i 16 tygodniu doświadczenia była statystycznie znamienne większa od stwierdzanych w grupie porównawczej. W 14 tygodniu intoksykacji wielkość tego parametru osiągnęła największą wartość, po czym malała, jednak w 16 tygodniu nadal była wyższa od wyjściowej z 12 tygodnia.



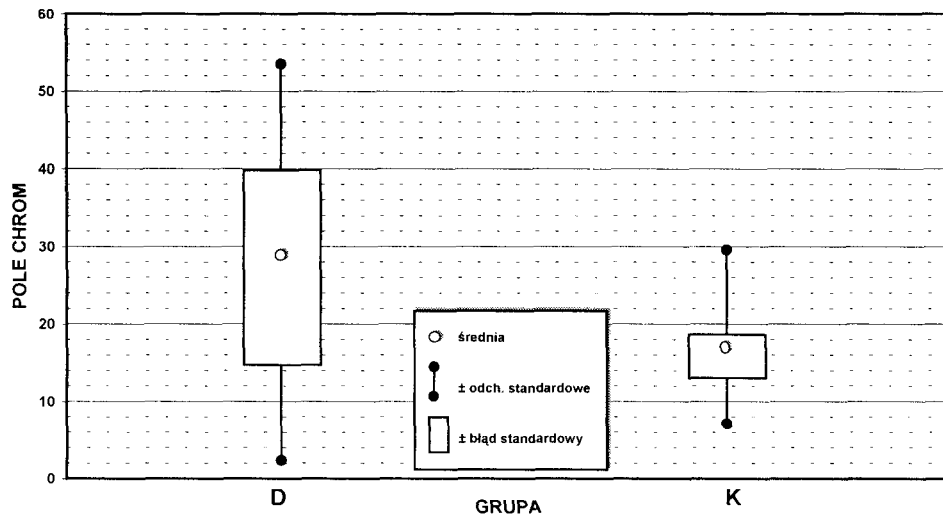
Ryc. 2. Pola powierzchni zbyleń chromatyny jądrowej w 12 tygodniu doświadczenia.

Fig. 2. Surface area of chromatin clumps after 12-th week of investigation.



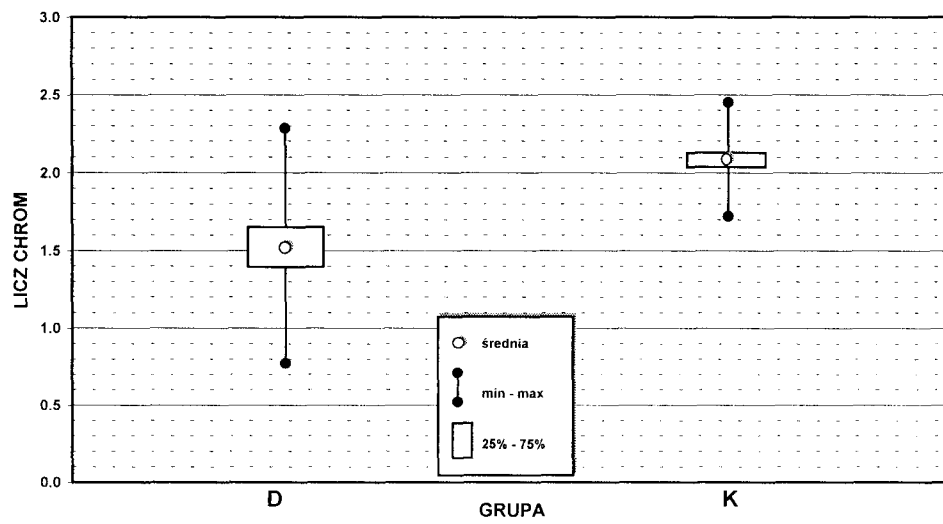
Ryc. 3. Pola powierzchni zbyleń chromatyny jądrowej w 14 tygodniu doświadczenia.

Fig. 3. Surface area of chromatin clumps after 14-th week of investigation.



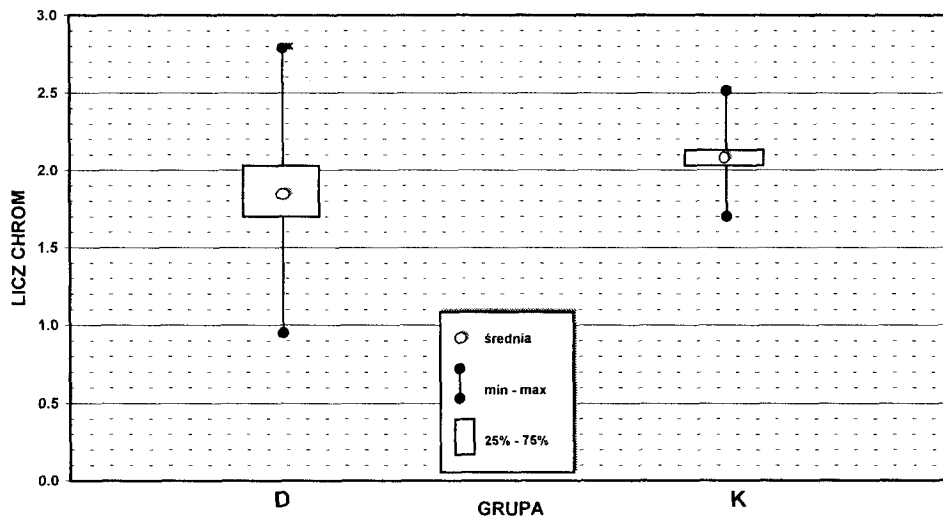
Ryc. 4. Pola powierzchni zbryleń chromatyny jądrowej w 16 tygodniu doświadczenia.

Fig. 4. Surface area of chromatin clumps after 16-th week of investigation.



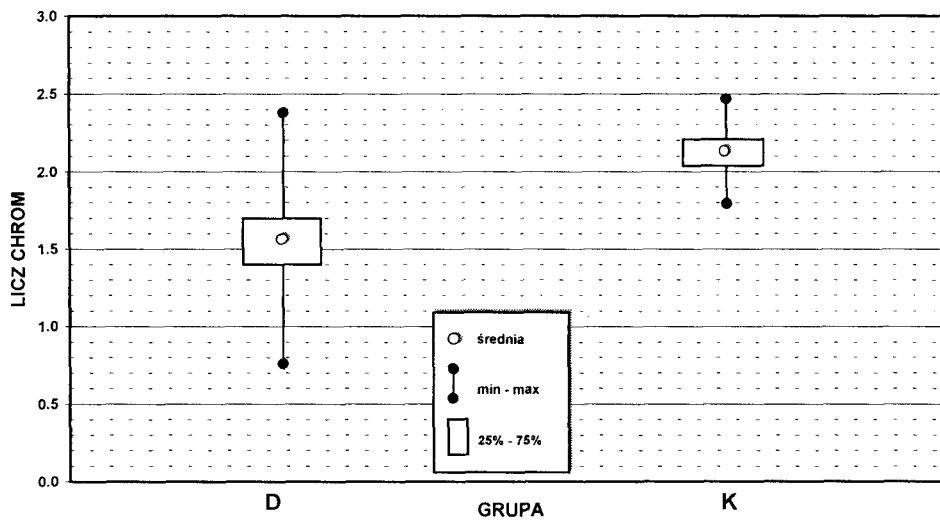
Ryc. 5. Średnie liczebności zbryleń chromatyny w jądrze komórkowym w 12 tygodniu doświadczenia.

Fig. 5. Mean chromatin clump count after 12-th week of investigation.



Ryc. 6. Średnie liczebności zbryleń chromatyny w jądrze komórkowym w 14 tygodniu doświadczenia.

Fig. 6. Mean chromatin clump count after 14-th week of investigation.



Ryc. 7. Średnie liczebności zbryleń chromatyny w jądrze komórkowym w 16 tygodniu doświadczenia.

Fig. 7. Mean chromatin clump count after 16-th week of investigation.

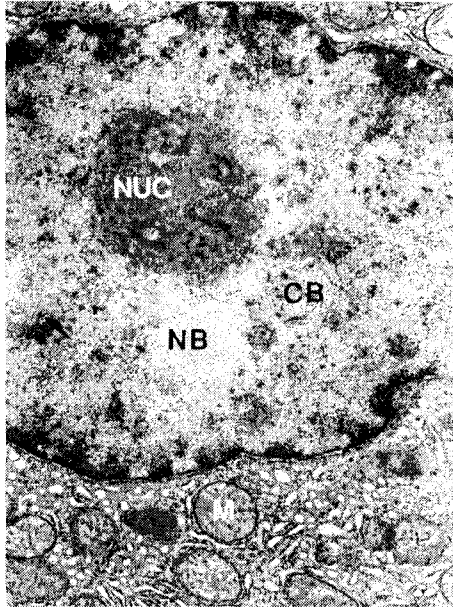
C. Ocena ultrastrukturalna

Przeprowadzone badania mikroskopowo–elektronowe wykazały, że w hepatocytach grupy D w 12 tygodniu podawania glikolu etylenowego w obrębie jądra sporadycznie ujawniały się zmiany typu „nuclear bodies” i „coiled bodies” (ryc. 8). Dodatkowo w tym czasie obserwowano niekiedy brak odtwarzania jąderka w specyficznych okolicach chromosomów (NOR). Wymienione wyżej przy opisie materiału doświadczalnego w mikroskopie świetlnym zbrylenia chromatyny jądrowej okazały się być głównie nagromadzeniami ziarnistości peri– (PG) i interchromatynowych (IG). W elektronogramach z 14 i 16 tygodnia zatrucia nie obserwowano już zmian o typie „nuclear” i „coiled bodies” a ziarnistości chromatynowe grupowały się zwykle w pobliżu jąderka i zazwyczaj spostrzegano ich więcej aniżeli w 12 tygodniu obserwacji (ryc. 9). Chromatyna zlokalizowana obwodowo wokół błony jądrowej była w tym czasie gęstsza elektronowo i bardziej zwarta (ryc. 10). W 16 tygodniu w większości hepatocytów nie dochodziło do formowania jąderka bądź też było ono w formie resztkowej. Chromatyna jądrowa była reprezentowana przez skupione ziarnistości peri– i interchromatynowe (ryc. 11).

DYSKUSJA

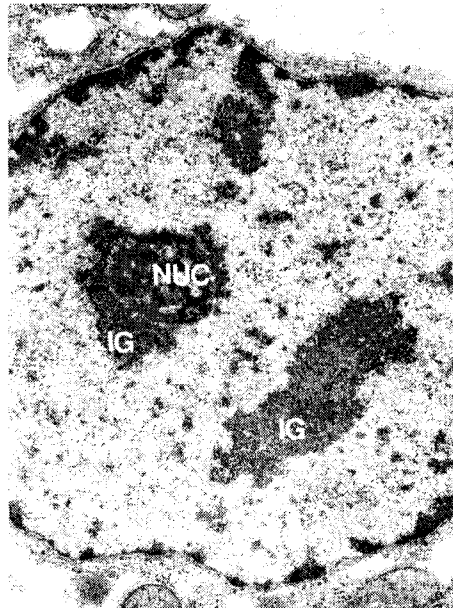
W czasie przemian metabolicznych jakim ulega glikol etylenowy dochodzi do jego utleniania przez dehydrogenazę alkoholową do aldehydu glikolowego (3). Badania ostatnich lat wykazały, że glikol etylenowy może być również utleniony do formaldehydu. W czasie tych reakcji dochodzi do uwolnienia nadtlenu wodoru o znanym potencjale uszkodzającym (4). Istnieje stosunkowo dużo danych, że anion ponadtlenkowy, powstający w warunkach zwiększonego napływu glikolu etylenowego do hepatocyta, może być odpowiedzialny za niektóre następstwa toksycznego działania GE i wystąpienia tzw. szoku tlenowego (7). Uwolnienie aktywnych form tlenu (wolnych rodników) odgrywa szczególnie ważną rolę w patogenezie zmian patologicznych wywołanych przez GE (10, 11, 12). Prowadzą one do destrukcji DNA, mRNA i rRNA a przeprowadzona ocena w mikroskopie świetlnym, a zwłaszcza elektronowym całkowicie potwierdza te doniesienia. Stwierdzono bowiem wykładniki toksycznego hamowania przemian głównie rRNA, premRNA i RNA. Wiadomo, że jąderko w hepatocytach pojawia się w telofazie w ściśle zdeterminowanych okolicach chromosomów (tzw. NOR–ach). Proces odtwarzania jąderka rozpoczyna się od skupienia materiału jądrowego w twory określane jako ciała przedjąderkowe (PNB – „prenuclear bodies”). Ciała te gromadzą się dookoła NOR–ów i następnie przekształcają się w jąderko (1, 5). Brak odtwarzania jąderka obserwowany sporadycznie w 12 tygodniu a w pełni w 14 i 16 tygodniu doświadczenia świadczy o hamowaniu na poziomie transkrypcji rRNA (2).

Obserwowane w kilku elektronogramach z grupy doświadczalnej w 12 tygodniu ciała jąderkowe (NB) (6, 8) są subkomórkowym wykładnikiem zaburzenia przez GE syntezy RNA (14).



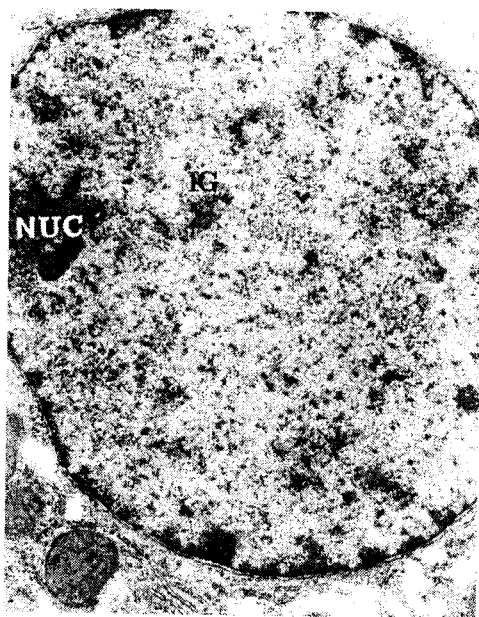
Ryc. 8. W jądrze widoczne wyraźnie uformowane jąderko (NUC) oraz zmiany o charakterze „nuclear bodies” (NB) i „coiled bodies” (CB). Elektronogram wątroby szczura grupy doświadczalnej. 12 tydzień doświadczenia. Pow. 30 000 x.

Fig. 8. Clearly formed nucleolus (NUC) seen in the nucleus and changes of nuclear bodies (NB) and coiled bodies (CB) nature. Experimental group rat liver electronogram, 12 week of the experiment. Enl. 30 000x



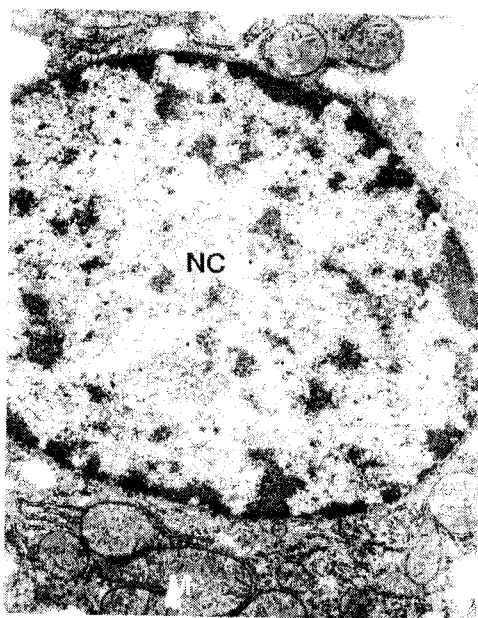
Ryc. 9. Elektronogram wątroby grupy D z 14 tygodnia doświadczenia. Liczne ziarnistości interchromatynowe (IG) zgrupowane wokół jąderka (NU). Pojedyncze skupiska IG w obszarze jądra. Pow. 30 000 x.

Fig. 9. Group D liver electronogram from the 14th week of the experiment. Numerous interchromatin granules (IG) grouped around the nucleolus (NU). Single IG clusters in the nucleus area. Enl. 30 000x.



Ryc. 10. Elektronogram wątroby grupy D – 14 tydzień doświadczenia. Widoczne rzeźnie uformowane jąderko (NU) z bardzo gęstymi elektronowo skupiskami ziarnistości interchromatynowych (IG). Pow. 30 000 x.

Fig. 10. Group D liver electronogram – 14th week of the experiment. Borderly formed nucleolus (NU) with a very thick electron concentration of interchromatin granules (IG) seen. Enl. 30 000x.



Ryc. 11. Rozproszone ziarnistości inter- i perichromatynowe bez formowania jąderka. Szczur grupy D 16 tydzień doświadczenia. Pow. 25 000 x.

Fig. 11. Dispersed inter- and perichromatin granules without nucleolus formation. Group D rat, 16th week of the experiment. Enl. 25 000x.

Jak wspomniano wyżej analiza elektronogramów wycinków z wątroby grupy doświadczalnej wykazała gromadzenie się w jądrze w nadmiernej ilości ziarnistości peri- i interchromatynowych. Pojawienie się zwiększonej ilości ziarnistości zwłaszcza perichromatynowych (PG) jest wyrazem toksycznego hamowania transportu premRNA do cytoplazmy (13). Jak wykazały badania Krzyżowskiej–Grucy i wsp. (9) oraz Zborka (16) pod wpływem różnorodnych czynników zaburzających metabolizm komórkowy może dojść do zwiększenia się liczby także ziarnistości interchromatynowych (IG) a także często dochodzi do ich skupiania. Te ostatnie spostrzeżenia obserwowano w 14 oraz 16 tygodniu intoksykacji.

WNIOSKI

Przeprowadzone badania wykazały, że podczas przewlekłej intoksykacji glikolem etylenowym dochodzi do jakościowych i ilościowych zmian w zakresie chromatyny jądrowej.

Przeprowadzone pomiary morfometryczne hepatocytów wykazały statystycznie znamiennej wzrost liczebności i pola powierzchni zbryleń chromatyny jądrowej.

Zastosowanie metod oceny morfometrycznej jest cennym uzupełnieniem badań histopatologicznych szczególnie przy braku możliwości wykonania badań mikroskopowo-elektronowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Bell P., Dabauvalle M.Ch., Scheer U.: In vitro assembly of prenucleolar bodies in *Xenopus* egg extract. *J. Cell Biol.*, 1992, 118: 1297. –2. Benavente R., Rose K., Reimer M., Hugle–Dorr B., Scheer U.: Inhibition of nuclear reformation after microinjection of antibodies to RNA polymerase I into mitotic cells. *J. Cell Biol.*, 1987, 105: 1483. –3. Clay K.L., Murphy R.C.: On the metabolic acidosis of ethylene glycol intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1977, 39: 39. –4. Clejan L.A., Cederbaum A.I.: Oxidation of pyrazole by reconstituted system containing cytochrome P 450 II E1., *Biochim. Biophys. Acta.* 1990, 1034: 233. –5. De la Torre C., Gimenez–Martin G.: The nuclear cycle. The nucleolus. Ed.: E.G. Jordan and A. Culis, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1982, 153. –6. Fakan S., Puvion E., Spohr G.: Localisation and characterisation of newly synthesized nuclear RNA in isolated rat hepatocytes, *Exp. Cell Res.*, 1976, 99: 155. –7. Fridovich I.: Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: *Free radicals in biology.* Ed.: W.A. Pryor, Academic Press, N. York, 1976: 249. –8. Hruban Z., Rechcigl M.: Microbodies and related particles, morphology, biochemistry and physiology. *Int. Rev. Cytol., Supplement*, 1969, 1: 1. –9. Krzyżowska–Gruca S., Zborek A., Gruca S.: Distribution of interchromatin granules in nuclear matrices obtained from nuclei exhibiting different degree of

chromatin condensation. *Cell Tissue Res.*, 1983, 231: 427. –10. Kuthan H., Tsuji H., Graf H., Ullrich V., Werringloer J., Estabrook R.W.: Generation of superoxide anion as a source of hydrogen peroxide in a monooxygenase system. *FEBS Lett.*, 1978, 91: 343.

11. Kuthan H., Ullrich V.: Oxidase and oxygenase function of the microsomal cytochrome P 450 monooxygenase system. *Eur. J. Biochem.*, 1982, 126: 583. –12. Nakamura K., Oliver C., Stadtman E.R.: Inactivation of glutamine synthetase by a purified rabbit liver microsomal cytochrome P 450 system. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1985, 240: 319. –13. Schroder H.C., Buchmann M., Diehl-Seifert B., Muller W.E.G.: Transport of mRNAs from nucleus cytoplasm. *Prog. Nucl. Acids Biol.*, 1987, 34: 89. –14. Sollner-Webb B., Mongey E.B.: News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem.Sci.*, 1991, 16: 58. –15. Szram S., Bielnik K., Trojanowski K., Młockowski D., Wołkanin P.: Analiza morfologiczna mikroskopowo-światlna i elektronowa zmian w wątrobie w przewlekłej doświadczalnej intoksykacji glikolem etylenowym. *Materiały XI Ogólnopolskiego Zjazdu Pol. Tow. Med. Sąd. i Kryminol.* Łódź, 1998. –16. Zborek A.: Ziarnistości interchromatynowe. *Post. Biol. Kom.*, 1987, 4: 327.

Adres pierwszego autora:
Katedra Medycyny Sądowej
91-304 Łódź
ul. Sędziowska 18a