

JUBILEUSZ PROF. STEFANA RASZEJI



PL ISSN 0324-8267 Indeks 351857

kwartalnik 2012 tom 62, nr 3
lipiec-wrzesień
www.amsik.pl

archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Czasopismo indeksowane:
INDEX MEDICUS / MEDLINE

Index Copernicus (2011): 6,31

Organ Polskiego Towarzystwa Medycyny Sądowej i Kryminologii
finansowany ze środków własnych Towarzystwa

ARCHIWUM MEDYCYNY SĄDOWEJ I KRYMINOLOGII

TOM LXII
Nr 3 (2012)
lipiec
wrzesień

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA MEDYCYNY SĄDOWEJ I KRYMINOLOGII

REDAKTOR NACZELNY: **dr med. Krzysztof Woźniak**
ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO: **dr med. Filip Bolechała**
SEKRETARZ REDAKCJI: **lek. med. Artur Moskała**

KOLEGIUM REDAKCYJNE:

Prof. Jarosław Berent – Łódź, Polska
Prof. Bernd Brinkmann – Münster, Niemcy
Prof. Richard Dirnhofer – Berno, Szwajcaria
Prof. Noriaki Ikeda – Fukuoka, Japonia
Prof. Jerzy Janica – Białystok, Polska
Dr hab. Zbigniew Jankowski – Gdańsk, Polska
Prof. Małgorzata Kłys – Kraków, Polska
Dr hab. Paweł Krajewski – Warszawa, Polska
Prof. Eduard Peter Leinzinger – Graz, Austria
Prof. Patrice Mangin – Lozanna – Genewa, Szwajcaria
Prof. Zdzisław Marek – Kraków, Polska
Prof. Zofia Olszowy – Sosnowiec, Polska
Prof. Derrick J. Ponder – Dundee, Szkocja
Prof. Zygmunt Przybylski – Poznań, Polska
Prof. Stefan Raszeja – Gdańsk, Polska
Prof. Guy N. Ruttly – Leicester, Anglia
Prof. Pekka Saukko – Turku, Finlandia
Prof. Volker Schmidt – Halle – Wittenberg, Niemcy
Prof. Stefan Szram – Łódź, Polska
Prof. Karol Śliwka – Bydgoszcz, Polska
Prof. Barbara Świątek – Wrocław, Polska
Prof. Akihiro Takatsu – Tokio, Japonia
Prof. Michael Thali – Zurich, Szwajcaria
Dr Kurt Trübner – Essen, Niemcy
Prof. Duarte Nuno Vieira – Coimbra, Portugalia

e-mail: redakcja@amsik.pl

www.amsik.pl

Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii
ul. Sędziowska 18a
91-304 Łódź

archiwum medycyny sądowej i kryminologii

Kwartalnik 2012

Organ Polskiego Towarzystwa
Medycyny Sądowej i Kryminologii
tom 62, nr 3

1. Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii przyjmuje w języku polskim i angielskim: prace oryginalne, kazuistyczne, poglądowe oraz historyczne z medycyny sądowej, kryminalistyki i dziedzin pokrewnych, opracowania z zakresu etyki i deontologii lekarskiej, recenzje książek, sprawozdania z działalności PTMSiK, komunikaty Zarządu Głównego PTMSiK, sprawozdania ze zjazdów krajowych i zagranicznych, listy do Redakcji. Autor powinien podać, do jakiej kategorii zalicza tekst nadesłanej pracy.
2. Prace przyjmuje Redakcja na adres mailowy w postaci pliku w formacie dowolnego, używanego powszechnie w Polsce procesora tekstu (typ pliku np. OpenDocument, Word lub sformatowany RTF), w stanie gotowym do składu, z zachowaniem obowiązujących zasad pisowni polskiej i polskiego mianownictwa.
3. Praca powinna być napisana w formacie A4, z marginesami od góry, dołu, strony lewej i prawej po 2,5 cm, czcionką prostą wielkości 12 pkt. i z odstępami 1,5 wiersza (około 30 wierszy na stronie).
4. Objętość całości (wraz z rycinami, tabelami, piśmiennictwem i streszczeniem) prac oryginalnych i poglądowych nie powinna przekraczać 12 stron A4, kazuistycznych 7 i innych 5. W uzasadnionych przypadkach Redakcja może przyjąć do druku prace obszerniejsze.
5. Na pierwszej stronie przed właściwym tekstem pracy należy umieścić imię i nazwisko autora (autorów), tytuł pracy w języku polskim i angielskim, nazwę instytucji, z której praca pochodzi oraz tytuł naukowy (skrót), pierwszą literę imienia i nazwisko kierownika akceptującego pracę. W kolejności należy przedstawić streszczenie w języku polskim, nie przekraczające 10 wierszy, zawierające cel i wyniki pracy bez informacji o metodycie. Poniżej należy zamieścić streszczenie w języku angielskim, zawierające cel i wyniki pracy oraz informację o metodycie pracy. Następnie należy umieścić słowa kluczowe w języku polskim i angielskim.
6. Właściwy tekst pracy rozpoczyna się od drugiej strony. Praca oryginalna powinna mieć typową strukturę (Wstęp. Materiał. Metoda. Wyniki. Dyskusja. Wnioski). Tytuły podrozdziałów powinny być umieszczone w oddzielnych wierszach. W tekście pracy należy zaznaczyć miejsca umieszczenia tabel i / lub rycin.
7. Tabele i / lub ryciny należy zamieszczać w liczbie koniecznej do zrozumienia tekstu. Podpisy pod rycinami i ich oznaczenia oraz tytuły tabel wraz z objaśnieniami należy podawać w języku polskim i angielskim. Ryciny mają numerację arabską, a tabele rzymską. Wielkość rycin powinna być taka, aby były one czytelne po zmniejszeniu ich podstawy do 120 mm. Tabele oraz ryciny (wykresy i fotografie) powinny być dołączone w postaci oddzielnych plików: pochodzących z powszechnie używanych programów biurowych i graficznych. Wskazane jest przygotowanie plików graficznych w formacie jpg.
8. Tabele i ryciny drukowane są bez kolorów (w skali szarości). Jeśli autor życzy sobie wydrukowania elementów pracy w kolorze, powinien skontaktować się w tej sprawie z Redakcją. Wymagane jest pokrycie różnicy kosztów druku pomiędzy drukiem standardowym a kolorowym (różne w zależności od zajęcia liczby arkuszy wydawniczych czy wkładki). W podobny sposób możliwe jest dołączenie do Archiwum płyty CD z plikami przydatnymi do ilustracji drukowanej pracy.
9. Piśmiennictwo należy umieścić na oddzielnej stronie. W oryginalnej pracy nie powinno obejmować ono więcej niż 20 pozycji, w doniesieniu kazuistycznym 15, a w pracy poglądowej 30. Wykaz piśmiennictwa należy ułożyć według kolejności cytowania w tekście, w osobnych liniach. Każda pozycja musi zawierać nazwisko i pierwszą literę imienia autora (autorów), tytuł pracy, tytuł czasopisma według skrótów używanych w Index Medicus (w czasopiśmie pisanych cyrylicą przyjąć transkrypcję obowiązującą w Polsce) oraz kolejno rok, numer tomu, pierwszą i ostatnią stronę pracy (przykład: Autor A., Autor B.: Tytuł pracy. Arch. Med. Sąd. Kryminol. 2010, 60: 1-5). W przypadku pozycji książkowych należy ponadto podać pełny tytuł dzieła, wydawcę, miejsce i rok wydania.
10. Na końcu pracy należy umieścić adres jednego z autorów (przede wszystkim e-mail), na który będzie kierowana wszelka korespondencja dotycząca pracy.
11. Do pracy należy dołączyć pliki PDF zawierające podpisane:
 - zgodę Kierownika instytucji (Katedry, Zakładu) na opublikowanie pracy,
 - oświadczenie pierwszego autora, że praca nie została złożona równocześnie w innym czasopiśmie oraz że nie była w całości, jak i we fragmentach, wcześniej drukowana.
12. W przypadku, gdy praca doświadczalna prowadzona była na osobach żyjących, na zwłokach lub na zwierzętach, należy dołączyć zgodę właściwej komisji uczelnianej na prowadzenie takich badań.
13. Potwierdzenie otrzymania pracy do rozpatrzenia następuje drogą mailową na adres mailowy, z którego nadesłano pliki.
14. Praca nie odpowiadająca Regulaminowi nie jest rozpatrywana pod względem merytorycznym. Wszystkie nadesłane prace zgodne z Regulaminem będą recenzowane. O nieprzyjęciu pracy do druku Redakcja informuje drogą elektroniczną (e-mail) wykazanego w pracy autora-korespondenta.
15. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania niezbędnych poprawek, w tym stylistycznych i skrótów – bez porozumienia z Autorem.
16. Honoraria autorskie za publikowane prace nie będą wypłacane. Autorzy nie otrzymują odbitek pracy: na stronie www.amsik.pl artykuł jest dostępny w pliku PDF w formie dokładnie takiej, jak został wydrukowany.
17. Po akceptacji pracy do druku prawa autorskie zostają przekazane przez Autorów – Redakcji Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii.

1. The Archives of Forensic Medicine and Criminology is a peer-reviewed scientific journal published by the Polish Society of Forensic Medicine and Criminology (PTMSiK) for the publication in both the Polish and English languages of original articles, case reports, review articles, historical papers on forensic medicine, forensic science and related fields, medical ethics and deontology, activity reports and announcements of the PTMSiK, reports on national and international conferences, book reviews and letters to the Editor. The author should indicate which category refers to the text of the submitted work.
2. The article should be submitted to the Editor by e-mail as a file in any format of commonly used word processing program (e.g. a file of the OpenDocument, Word or RTF type), with a proper application of grammar, spelling and terminology requirements.
3. The paper should be submitted in A4 format with 2.5 cm margins at the top, bottom, left and right, font size 12 points and 1.5 line spacing (approximately 30 lines per page).
4. The volume of total original and review articles (including figures, tables, references and summary) should not exceed 12 A4 pages, for case reports – 7 pages, and for other papers – 5 pages. In justified cases, the editors may accept for publication a more extensive paper.
5. On the first page, before the text itself, there should be indicated the name of the author (s), the title of the paper in both the Polish and English languages, the name of the institution from which the work originates, and the academic title (an acronym), the first letter of the first name and the full surname of the head of the institution, who approved the paper for submission. An abstract in Polish should not exceed 10 lines, including the purpose and results of research, without information about the methodology. The abstract must be followed by an abstract in English, including the purpose and results of the research and information on the methodology of work. Then, the keywords in English and Polish should be placed.
6. The proper text of the paper starts from the second page. Original paper should have a typical structure (Introduction. Material and Methods. Results. Discussion. Conclusions.). The titles of subsections should be placed in separate rows. The placement of tables and/or figures should be indicated in the text.
7. The tables and/or figures must appear in the number which is necessary to understand the text. The legends to the illustrations and symbols employed, as well as the titles of tables with explanations should be given in English and Polish. The figures are numbered using Arabic and the tables – Roman numerals. The size of the figures should be appropriate to be legible after reduction of the base to 120mm. The tables and figures (diagrams and photographs) should be attached as separate files formatted in commonly used office software and graphics. It is advisable to prepare the image files in the jpg format.
8. The tables and figures are printed without color (the gray scale). The authors who wish to print elements of their paper in color should contact the Editor with respect to this issue: in such cases, the difference of costs between standard printing and color printing (depending on the area of printing sheet taken up by color parts of the publications/inserts) should be fully covered by the authors. In a similar manner, it is possible to attach to the journal a CD with files useful to illustrate the publication.
9. References should be placed on a separate page. In original papers, the section „References“ should not include more than 20 items, in case reports – 15, and in review papers – 30. The list of references should be arranged in order of citation in the text in separate lines. Each entry must contain the surname and the first letter of the author's (autohors') name, title, journal title according to the abbreviations used in the Index Medicus (in journals written in Cyrillic – a Latin transcription) and subsequently the year, volume number, first and last pages of the paper, as per the following example: Author A, Author B: The title of the paper, Arch Med Sadowej Kryminol. 2010, 60 (1): 1-5. In the case of handbooks, the full title, the publisher, place and year of publication should be also specified.
10. At the end of the paper, the address of one corresponding author (especially the e-mail address) should be specified.
11. The files containing the paper for publication should have PDF files attaches, the files containing:
 - the consent of the Head of the institution (Chair, Department) for publication of the paper,
 - the statement of the first author that the manuscript has not been submitted simultaneously to another journal and that it was not, in its entirety or fragments, printed in another journal.
12. If the experimental study was conducted in living people, cadavers or animals, the approval of an appropriate university commission for carrying out such research should be included.
13. The confirmation of receipt of the paper for evaluation will be sent to the e-mail address from which the files were submitted.
14. Papers not adhering to the above specified the Regulations shall not be evaluated. The articles prepared works in accordance with the Regulations will be reviewed. The Editors will dispatch notification about the refusal to accept the paper for publication via e-mail to the address of the corresponding author.
15. The Editors reserve the right to make necessary corrections, including stylistic revisions and shortening the text, without consulting the author.
16. No royalties shall be paid for the published works. The authors do not receive printouts of the published papers: the articles are available as PDF files exactly as printed on the website www.amsik.pl.
17. The copyrights to papers accepted for publication will be transferred by the authors to the Editors of the Archives of Forensic Medicine and Criminology.

OD REDAKCJI / EDITORIAL	139
ARTYKUŁY JUBILEUSZOWE / JUBILEE PAPERS	
90-lecie Urodzin Zasłużonego Nestora polskiej medycyny sądowej Pana prof. dr. hab. n. med. dr. h.c. Stefana Raszeji 90 th birth anniversary of the Distinguished Nestor of Polish Forensic Medicine, Professor Stefan Raszeja, MD, PhD, Dr. h.c.	141
Laudacja Profesora Władysława Nasitowskiego Laudation by Professor Władysław Nasitowski	145
PRACE ORYGINALNE / ORIGINAL PAPERS	
Joanna Wysocka, Aneta Stasiewicz, Krzysztof Rębała, Ewa Kapińska, Lidia Cybulska, Zofia Szczerkowska Analiza częstości mutacji w parach ojciec–syn w wybranych markerach Y-STR Analysis of mutations in father-son pairs within selected Y-STR loci	147
Ewa Kapińska, Joanna Wysocka, Lidia Cybulska, Krzysztof Rębała, Patrycja Juchniewicz, Zofia Szczerkowska Przykłady zastosowania markerów chromosomu X w badaniach rodzinnych i identyfikacyjnych Examples of application of X chromosomal markers in familial investigations and personal identification	152
Monika Reichert, Agnieszka Maciejewska, Krzysztof Talarczyk, Regina Paszkowska, Joanna Jakubowska, Anita Dettlaff-Kąkol, Izabela Maciejewska, Ryszard Pawłowski Polimorfizm locus SE33 w populacji polskiej Polymorphism in the SE33 locus in the Polish population	160
Krzysztof Rębała, Iosif S. Tsybovsky, Alexei I. Mikulich, Zofia Szczerkowska Identyfikacja polimorfizmu typu Y-SNP w genie USP9Y i jego znaczenie w genotypowaniu alleli locus M46 Identification of a novel Y-SNP in the USP9Y gene and its impact on genotyping alleles of the M46 locus	165
Tomasz Gos, Zbigniew Jankowski Samobójstwo a depresja w świetle pośmiertnej oceny zaburzeń aktywności neuronalnej Suicide and depression in the postmortem evaluation of disturbed neuronal activity	171
Marek Wiergowski Propozycja interpretacji wyników analitycznych uzyskanych w pobliżu prawnej granicy stężeń dla stanu po użyciu alkoholu lub stanu nietrzeźwości Proposal of interpreting analytical results indicating borderline-legal alcohol concentration values in individuals after alcohol consumption or being alcohol-intoxicated	178
Marek Wiergowski, Zbigniew Jankowski, Ewa Tomczak, Jacek Sein Anand, Rafał Ziółkowski, Janusz Staniszewski Propozycja testów oceniających zdolności psychomotoryczne kierowcy oraz protokołu do zastosowania w trakcie pobrania i badania śliny, krwi oraz moczu w przypadku podejrzenia przyjęcia środków działających podobnie do alkoholu Proposal of psychomotor skill assessment tests for drivers and a protocol for sampling and testing of saliva, blood and urine when there is reason to suspect involvement of substances with alcohol-like effect	186

PRACE KAZUISTYCZNE / CASE REPORTS

Ewa Tomczak, Marek Wiergowski, Zbigniew Jankowski, Jolanta Anita Wilmanowska

Dekstrometorfan (DXM): nowe metody odurzania się nastolatków – opis przypadku

Dextromethorphan (DXM): new methods of intoxications among teenagers – a case description197

Michał Kaliszan

Próba określenia czasu zgonu na podstawie ograniczonych danych z miejsca ujawnienia zwłok

An attempt at estimating the time of death based on limited data from death scene203

Michał Kaliszan, Karol Karnecki, Zbigniew Jankowski

Przypadek śmiertelnego rażenia piorunem w nietypowym miejscu – centrum miasta

A case of fatal lightning stroke at an unusual site – the city center208

Katarzyna Skonieczna, Jarosław Bednarek, Urszula Rogalla, Marcin Woźniak, Marta Gorzkiewicz,

Katarzyna Linkowska, Anna Duleba, Karol Śliwka, Tomasz Grzybowski

Wykorzystanie osiągnięć genomiki mitochondrialnej w badaniach genetyczno-sądowych opartych na analizie sekwencji ludzkiego mitochondrialnego DNA

The application of mitochondrial genomics into forensic investigations based on human mitochondrial DNA testing213

PRACE POGLĄDOWE / REVIEW PAPERS

Ryszard Pawłowski

Co każdy lekarz o sądowym badaniu DNA wiedzieć powinien

What every physician should know about forensic DNA testing219

Barbara Sumińska-Ziemann, Tomasz Gos, Zbigniew Jankowski

Fenomen hyperostosis frontalis interna – aktualny stan wiedzy

The phenomenon of hyperostosis frontalis interna – state of the art knowledge226

Niniejszy numer Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii jest dedykowany Profesorowi Stefanowi Raszeji.

*Szanowny Panie Profesorze,
składamy najserdeczniejsze jubileuszowe życzenia zdrowia,
wszelkiej pomyślności i codziennych radości w życiu osobistym,
a także dalszej owocnej pracy naukowej.*

*Krzysztof Woźniak
Redaktor Naczelny*



90-lecie urodzin Zastężonego Nestora polskiej medycyny sądowej Pana prof. dr. hab. n. med. dr. h.c. Stefana Raszeji

90th birth anniversary of the Distinguished Nestor of Polish Forensic Medicine,
Professor Stefan Raszeja, MD, PhD, Dr. h.c.

Pan prof. Stefan Raszeja w grudniu 2012 roku ukończy 90 lat życia. Posiada niezwykle dar analitycznego i krytycznego myślenia, z jednoczesną umiejętnością syntetycznej formy prezentacji myśli, zawsze wyrażanej poprawną polszczyzną. Jest człowiekiem o szerokich horyzontach myślowych, wyrozumiałym, tolerancyjnym, przyjaznym ludziom i światu. Powoduje to, że dokonanie zwięzłej charakterystyki sylwetki Pana Profesora pod kątem Jego zasług i dokonań jest bardzo trudne.

Pan Profesor urodził się na terenie Kociewia, w Starogardzie Gdańskim, w rodzinie nauczycielskiej. Przez całe życie czuje się bardzo związany z ziemią kociewską. Zawsze interesował się historią i tradycją tego regionu i całego Pomorza, popularyzując wiedzę o nim, także wśród młodszego pokolenia.

Do chwili wybuchu II wojny światowej zdążył ukończyć szkołę podstawową i gimnazjum, aktywnie działając w harcerstwie. W czasie wojny, podobnie jak większość rówieśników, musiał przerwać edukację i podjąć fizyczną pracę zarobkową, a w latach 1943-1945 walczył z okupantem na terenie Borów Tucholskich i Kociewia, początkowo w oddziale „Gryfa Pomorskiego”, później w Armii Krajowej.

Będąc na emeryturze przybliżył wiedzę historyczną dotyczącą tego okresu na Pomorzu młodzieży szkolnej, uczestnicząc w spotkaniach, na które jest często zapraszany do szkół. Pan Profesor bardzo ceni sobie te spotkania.

Po wojnie w 1945 roku zdał maturę i rozpoczął studia na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Poznańskiego uzyskując w 1950 roku absolutorium, a w 1951 roku dyplom lekarza. W czasie studiów, w związku z udziałem w demonstracji studenckiej w 1946 roku, przez cztery tygodnie przebywał w areszcie WUBP w Poznaniu. Jako student w 1947 roku został kontraktowym pracownikiem dydaktycznym w Zakładzie Anatomii Patologicznej u prof. Kazimierza Stojatowskiego, a od 1948 roku był za-

trudniony przez prof. Sergiusza Schilling-Siengalewicz w charakterze młodszego asystenta bez dyplomu w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej (KiZMS) Uniwersytetu Poznańskiego. Od tego czasu do 1964 roku pracował w ZMS AM w Poznaniu, osiągając kolejne stopnie awansu pracownika naukowo-dydaktycznego do stopnia doktora habilitowanego, zwanego wówczas docentem. W 1964 roku Pan Profesor wygrał konkurs i został kierownikiem KiZMS AM w Gdańsku, którym kierował do chwili przejścia na emeryturę w 1993 roku, Wymieniona na wstępie charakterystyka sylwetki Pana Profesora, duże zdolności kierowania zespołem pracowników, odpowiadające współczesnym „zdolnościom menadżerskim”, dar właściwej oceny ludzi i związana z nim umiejętność doboru pracowników, przy odrobinie szczęścia do ludzi, przyczyniły się do stworzenia „gdańskiej szkoły medycyny sądowej”, z której wywodziło się wielu doświadczonych i znanych medyków sądowych.

Stosując myśl „I rest, I rust” („spocznę, to zarzewię”) po przejściu na emeryturę Pan Profesor, do chwili obecnej, regularnie, codziennie przychodzi do Zakładu, gdzie zajmuje się czynnie opiniowaniem sądowo-lekarskim w sprawach podejrzenia o błąd medyczny, a także służy radą młodszemu kolegom w ich działalności opiniodawczej oraz naukowej, jeśli zwrócą się z prośbą o radę lub pomoc. Pan Profesor nadal aktywnie działa w Niezależnej Komisji Bioetycznej przy naszej Uczelni.

Wszechstronne, rozległe i wielokierunkowe zainteresowania naukowe Pana Profesora miały wpływ na Jego działalność naukową i wynikały z trudności napotykanych przez medyków sądowych w ich działalności opiniodawczej dla potrzeb wymiaru sprawiedliwości i organów ścigania. Dzięki szerokim zainteresowaniom oraz kontaktom z wiodącymi zagranicznymi ośrodkami medycyny sądowej Pan Profesor w swojej działalności naukowej starał się wykorzystać i przystosować do praktycznej medy-

cyny sądowej aktualne osiągnięcia różnych nauk, jak np. patomorfologii, biochemii, genetyki itp. Znajduje to potwierdzenie w publikacjach naukowych, także obcojęzycznych, zestawionych w tabeli.

Badania naukowe w czasie pracy w KiZMS w Poznaniu dotyczyły patomorfologii zespołu błon szklanych i niedodmy płuc u noworodków, stanowiących najczęstszą przyczynę zgonów okołoporodowych. Badania te były pionierskie w tamtym czasie nie tylko w Polsce, ale i w świecie, a ich wyniki wniosły istotny cząstkowy wkład do neonatologii.

Z kolei badania nad patomorfologią zatruc grzybami (bardzo częstymi w tamtym okresie) zaowocowały obroną w 1959 roku rozprawą doktorską „Sądowo-lekarska diagnostyka śmiertelnych zatruc muchomorem sromotnikowym”. Kontynuacja zainteresowań grzybami i głęboka wiedza w tym zakresie umożliwiła Panu Profesorowi wykrycie fitohemaglutynin w grzybach wyższych i wykazanie ich praktycznej przydatności do identyfikacji krwi ludzkiej i śladów biologicznych (krew, nasienie, mleko matki). Podsumowaniem tych badań była rozprawa habilitacyjna „Zastosowanie hemaglutynin i hemolizyn uzyskanych z grzybów wyższych do badań sądowo-lekarskich”, na podstawie której uzyskał stopień naukowy doktora habilitowanego w 1963 roku.

W czasie kierowania KiZMS AM w Gdańsku Pan Profesor Stefan Raszeja zajmował się biochemią procesów umierania. Szczególną uwagę wraz z zespołem poświęcił reakcjom interletalnym i możliwościami ich praktycznego wykorzystania do ustalania czasu śmierci, czego owocem były publikacje m.in. w piśmiennictwie zagranicznym oraz cytowanie jednej z nich we współczesnej monografii dotyczącej ustalania czasu śmierci. Badania te kontynuowali uczniowie Pana Profesora m.in.: prof. prof. Danuta i Karol Śliwowie z AM w Bydgoszczy oraz prof. Roman Hauser z Gdańska, a obecnie badania nad ustalaniem czasu śmierci kontynuuje „wnuczek naukowy” Pana Profesora – dr Michał Kaliszan.

Ponadto Pan Profesor zajmował się badaniami identyfikacyjnymi tkanek ludzkich i genetyką populacyjną, deontologią i odpowiedzialnością prawną lekarza, a także uczestniczył wraz z innymi specjalistami w pracach dotyczących opracowania procedur i kryteriów ustalania śmierci dla potrzeb transplantologii.

Tabela I. Zestawienie i ogólna charakterystyka opublikowanego dorobku naukowego Prof. Stefana Raszeji.

Table I. Listing and general characteristics of Professor Stefan Raszeja's research publications.

Dział Medycyny Sądowej Forensic medicine	Liczba publikacji Number of publications
Medycyna sądowa klasyczna „czysta” Classic, "pure" forensic medicine	47
Medycyna sądowa + patomorfologia Forensic medicine + pathomorphology	18
Medycyna sądowa + biochemia Forensic medicine + biochemistry	6
Toksykologia Toxicology	27
Genetyka sądowa Forensic genetics	50
Deontologia, etyka, błędy medyczne Deontology, ethics, medical errors	38
Inne Others	85
Razem Total	271

W krótkim czasie Profesor wypracowywał stopnie naukowe, w równie krótkim czasie Rada Państwa nadała Panu Profesorowi tytuły naukowe: profesora nadzwyczajnego w 1969 roku, zwyczajnego w 1976 roku.

Panu Profesorowi Raszeji, podobnie jak Jego kolegom, ówczesnym kierownikom KiZMS szczególnie na sercu leżała pozycja i znaczenie medycyny sądowej w Polsce. W latach 1975-1991 pełnił funkcję wiceprzewodniczącego Zespołu Krajowych Specjalistów ds. Medycyny Sądowej (należy żałować, że taki zespół nie istnieje i nie funkcjonuje we współczesnej Polsce). Efektami działalności Zespołu były: przywrócenie I° specjalizacji z medycyny sądowej (do tej zmiany zamiast I° specjalizacji z medycyny sądowej obowiązywał I° specjalizacji

z anatomii patologicznej); tworzenie terenowej służby sądowo-lekarskiej przy zakładach patomorfologii szpitali wojewódzkich oraz organizowanie kursów podyplomowych.

W czasach rozwoju transplantologii w Polsce Pan Profesor był jedynym reprezentantem medycyny sądowej w Komisji Rady Naukowej Ministerstwa Zdrowia i Opieki Społecznej (MZiOS) ds. Ustalania Kryteriów Śmierci Człowieka. Efektem pracy były opracowane w 1984 i 1990 roku wytyczne zawierające kryteria obowiązujące przy ustalaniu śmierci przed eksplantacją narządów oraz procedury postępowania kwalifikacyjnego i badawcze przed stwierdzeniem zgonu.

Pan Profesor był pomysłodawcą i twórcą Komisji ds. Urazowości działającej w ramach komitetu patofizjologii klinicznej PAN. Komisja ta (w skład której oprócz chirurgów urazowych wchodziło kilku profesorów medycyny sądowej) pod przewodnictwem Profesora Raszeji przygotowała materiały stanowiące podstawę do „raportu” o stanie urazowości w kraju i do przygotowania wytycznych dla profilaktyki oraz właściwego postępowania lekarskiego w tym zakresie.

Oprócz wielokierunkowej działalności na polu medycyny sądowej Pan Profesor znajdował czas na działalność „pozamedyczną”, aby „zostawić ślad za sobą”.

W 1978 roku był inicjatorem powołania przy AMG Zespołu ds. Oceny Deontologicznej Badań Naukowych i został jego przewodniczącym. Była to wówczas pierwsza tego typu Komisja Etyczna w Polsce. Po upływie czterech lat – w 1982 roku – był z kolei współorganizatorem pierwszej ogólnopolskiej Komisji ds. Badań na Ludziach przy Radzie Naukowej MZiOS oraz współautorem regulaminu tej Komisji, a do chwili obecnej działa w Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym, przez ponad 30 lat pełniąc funkcję jej przewodniczącego.

Wspólnie z ówczesnym rektorem AMG – prof. Marianem Górskim oraz docentami z Bydgoszczy: Bogdanem Romańskim, Janem Domaniewskim Profesor Raszeja jest współautorem pomysłu powołania i współtwórcą Akademii Medycznej w Bydgoszczy ustanowionej na bazie Szpitala Wojewódzkiego, początkowo jako zespół nauczania klinicznego w Bydgoszczy, stanowiącego bazę AMG, przekształconego

następnie w filię AMG w Bydgoszczy, a następnie w samodzielną placówkę naukowo-dydaktyczną i leczniczą – Akademię Medyczną w Bydgoszczy. W dumę wprawilo Pana Profesora wybranie na rektora tej Uczelni ulubionej i cenionej uczennicy – prof. Danuty Miścickiej-Śliwki, która przyczyniła się do połączenia tej Uczelni z Uniwersytem Mikołaja Kopernika w Toruniu i stworzenia Collegium Medicum tej Uczelni. Społeczność akademicka w Bydgoszczy doceniając zasługi Profesora w 1999 roku nadała Panu Profesorowi tytuł Doktora Honoris Causa. Pan Profesor pełnił również funkcję rektora Akademii Medycznej w Gdańsku w latach 1972-1975, także przyczyniając się do szeregu inwestycji w Uczelni, o czym często w chwili obecnej się nie pamięta.

W latach 1979-1999 był wiceprzewodniczącym Rad Naukowych przy Instytucie Ekspertyz Sądowych w Krakowie oraz przy Instytucie Problematyki Przestępczości w Warszawie, a ponadto był współredaktorem lub członkiem komitetów redakcyjnych międzynarodowych czasopism naukowych w USA i w RFN.

Nadano Mu honorowe członkostwo sześciu zagranicznych towarzystw naukowych z zakresu medycyny sądowej, a także dwóch polskich towarzystw, w tym PTMSiK.

Według dewizy życiowej Pana Profesora: „każdego, a zwłaszcza profesora powinno się oceniać wg wykształconych przez niego uczniów, ci zaś powinni przerastać mistrza”. Stosując tę dewizę Pan Profesor został promotorem 9 zakończonych doktoratów. Pewnie wśród samodzielnych pracowników naukowych – medyków sądowych w Polsce, są osoby mogące poszczycić się większą liczbą doktorantów, ale – według mojej wiedzy – na pewno nie ma takich, którzy przyczyniliby się do zakończenia aż 7 przewodów habilitacyjnych. „Utytułowani” uczniowie Pana Profesora to:

Prof. dr hab. A. Dubrzyński (†)
Prof. dr hab. K. Śliwka
Prof. dr hab. D. Miścicka-Śliwka (†)
Prof. dr hab. R. Hauser (†)
Prof. dr hab. Z. Szczerkowska
Prof. dr hab. R. Pawłowski
dr hab. Z. Jankowski

Prawie wszyscy wyżej wymienieni samodzielnymi pracownikami naukowymi, pewnie z wyjątkiem ostatniego, to znane, zasłużone postacie medycyny sądowej.

W uznaniu za zasługi Pan Profesor Raszeja był wielokrotnie nagradzany licznymi odznaczeniami państwowymi, resortowymi i regionalnymi, łącznie otrzymał ok. 45 różnego rodzaju odznaczeń szczegółowo wymienionych w artykule z okazji 80-tej

rocznicy urodzin (Arch. Med. Sąd. Kryminol. 2002, 52: 245-249).

dr hab. med. Zbigniew Jankowski
uczeń Pana Profesora Stefana Raszeji

Szanowny Jubilacie! Szanowne Prezydium!

Z wielką satysfakcją przyjąłem zaproszenie do wygłoszenia laudacji na cześć mojego przyjaciela Profesora Stefana Raszeji. Dokonania Jubilata przekraczają jednak i ograniczają czasowo możliwości mego wystąpienia. Przede wszystkim przeszkodą jest szerokość i suma Jego dokonań... nie tylko na polu medycyny sądowej. Postać Profesora i przegląd Jego dorobku oraz wpływ, jaki wywiera nie tylko na nasze otoczenie zawodowe i kształt medycyny sądowej wymagają dużej monografii... i mam wątpliwości czy tylko jednej.

Zarys części naukowej tejże działalności przedstawił w skrócie Pan docent Jankowski. Przegląd ten jest oczywiście niepełny. Sylwetka Profesora wypełnia i historyczny, i aktualny obraz budowniczego szeroko rozumianej medycyny sądowej. Ponad 60 lat Jego działalności pozwala potwierdzić – nie tylko przez Jego uczniów i całą szkołę Gdańskiej Medycyny Sądowej – że Profesor jest uznanym Pater Familiae Medicinae Legalis.

Szczyć się przyjaźnią z Profesorem i wspólnotą naszych poglądów, i naszej drogi zawodowej – od lat studiów poznańskich... a być może wspólnotą i podobieństwem wychowania patriotycznego w rodzinach nauczycielskich, do których należała rodzina Profesora i moja.

Łączyły nas wspólne dyskusje, wspólna praca naukowa, ale także nieraz spory i różnice na temat drogi medycyny sądowej. Podobieństwa sięgały głębiej – do czasu partyzantki, tajnego nauczania, okupacji... poglądu na temat roli publicznej i znaczenia nauk prawnych... nie tylko w medycynie sądowej.

Kalendarium naszych spotkań sięga czasu lat pięćdziesiątych i sześćdziesiątych ubiegłego wieku.

Podsumowując nasze wspólne podróże i spotkania oraz udział w licznych kongresach i zjazdach – w Austrii, Niemczech, Szwajcarii, na Słowacji i na Węgrzech – imponowała mi zawsze świetna znajomość języków obcych oraz swoboda z jaką się poruszała w zagranicznych środowiskach naukowych. Stąd też płynęły liczne wyróżnienia i honorowe członkowstwa Naukowych Towarzystw Zagranicznych.

Wracając do sumy dokonań naukowych i organizacyjnych – licznych publikacji, wystąpień – sukcesów Jubilata i poszukując ich syntezy można próbować je streścić stwierdzając, że Profesor jest utalentowaną nie tylko osobą, ale... osobowością publiczną.

Można także po prostu pokłonić się przed Jego wielkim dorobkiem... i postacią. Wychowawca i pedagog, propagujący i pielęgnujący syntetyczny kierunek medycyny sądowej zawierającej obok elementów klasycznych liczne jej gałęzie – m.in. toksykologię, genetykę, opiniodawstwo – wszędzie sprawując je po mistrzowsku.

Można Profesora określić nie tylko jako utalentowanego medyka sądowego, ale także jako znawcę prawa, humanistę, etyka, znawcę zagadnień błędu lekarskiego, opiniodawcę... często rozjemcę... mediatora, racjonalnie rozstrzygającego spory nie tylko naukowe.

A więc człowiek renesansu – w obecnym świecie specjalistów i wąskich specjalizacji to zupełna wyjątkowość godna tylko jednego wyraźnego określenia... FILOZOF... ale realista – obdarzony talentem i talentami konstruktywizmu. Można także określić Go jako BUDOWNICZEGO.

Myślę, że Jego talenty – ale i cechy charakteru – są to prawie cechy ewangeliczne – rozwagi, heroizmu, rozsądku, roztropności... czynią Go naturalnym przywódcą różnych gremiów, które spotykał na swojej drodze życia.

Na koniec – kilka refleksji i próba analizy Jego postaci oraz tych wspaniałych osiągnięć i przebytej – nie tylko zawodowej – drogi życiowej. Przywołuję w tym miejscu myśli profesora Tadeusza Gadacza i księdza Józefa Tischnera na temat pytania, jak w świetle determinizmu kształtują się losy ludzkie, istoty obdarzonej przecież wolnością wyboru, a zatem i odpowiedzialnością.

Gdy w niektórych naszych wspólnych dyskusjach Stefan – mój rozmówca – przyjmował postawę rozstrzygającą, zakończającą spór, kwitowałem to stwierdzeniem „Ty jesteś Kociewiak“... mając na myśli te wszystkie nasze uwarunkowania dyktowane wychowaniem i profilem genetycznym. Po cichu rozważałem, że może Ród Raszejów, a zatem i genotyp naszego Profesora, związany jest z arche-mate-

riałem genetycznym walecznych Prusów, a być może Waregów, wędrujących przez Kociewie dwa tysiące lat temu.

A jednak – indeterminizm, wolna wola, swoboda wyboru, pracowitość i systematyczność, trafne decyzje dnia codziennego a także te zasadnicze, dotyczące wyboru drogi życiowej (m.in. zawodu) kształtowały Jego życie. Dewizą powodzenia było znalezienie tej właściwej drogi – zgodnej z wychowaniem i genotypami jakimi obdarzyli Go rodzice... i los. Udało się to w pełni Jubilatowi, który w życiu nie tylko zawodowym był i jest nadal wierny zasadzie *quidquid agis, prudenter agas et respice finem*.

Panie Profesorze! Drogi Stefanie!

Ad multos annos – niech zdrowie i siły twórcze służą Ci nadal w Twojej roli sternika i pedagoga!

Władysław Nasiłowski

Joanna Wysocka, Aneta Stasiewicz¹, Krzysztof Rębała, Ewa Kapińska, Lidia Cybulska, Zofia Szczerkowska

Analiza częstości mutacji w parach ojciec-syn w wybranych markerach Y-STR

Analysis of mutations in father-son pairs within selected Y-STR loci

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

¹ Z Samodzielnej Pracowni Embriologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. M. Cichorek

Określono mutacyjność markerów loci chromosomu Y w 200 parach ojciec-syn z terenu Polski północnej, w których ojcostwo potwierdzono uprzednio w analizach autosomalnych systemów STR ($PI \geq 100\ 000$) badając standardowo profil genetyczny matki, dziecka i domniemanego ojca. Zakres badań obejmował 18 markerów typu Y-STR. W przeanalizowanej grupie zaobserwowano 11 mutacji. Pięć z nich miało charakter insercyjny, natomiast pozostałe sześć to mutacje delecyjne. Większość niezgodności wynikała ze zmiany liczby pojedynczego powtórzenia jednostki repetytywnej. W locus DYS385, w dwóch parach ojciec/syn, obserwowano utratę dwóch jednostek repetytywnych. Całkowita częstość mutacji dla 18-tu markerów chromosomu Y wyniosła 0,0031. W loci Y-STR 200-tu zbadanych par ojciec/syn nie zaobserwowano znaczących różnic w wartości częstości mutacji z danymi pochodzącymi ze światowej bazy danych YHRD.

The objective of the study was to examine the mutation rates of Y-chromosomal STR from father-son pairs. The paternity in these cases was confirmed previously with the use of autosomal STR system performing standard analyses of genetic profiles of the mother, child and putative father ($PI \geq 100000$). We examined 200 father-son sample pairs from Northern Poland using the Y-STR 18-plex. We identified eleven mutations. Five mutations resulted in the gain of a repeat in the sons' chromosome and six resulted in a loss of a repeat. All the samples resulted in single repeat mutations from one sample, which contained a two repeat

loss at DYS385. The overall average mutation rate estimate was 0.0031. There was no significant difference in the mutation rate between Y-STR loci of the 200 tested father-son pairs and the YHRD base.

Słowa kluczowe:

Y-STR, częstości mutacji, ustalanie ojcostwa

Key words:

Y-STR, mutation rates, paternity testing

WSTĘP

Określenie polimorficznych sekwencji DNA stało się w ostatnich latach rutynową praktyką laboratoriów genetyczno-sądowych. Wykorzystuje się je w szerokim zakresie zarówno w badaniu śladów biologicznych i identyfikacji osobniczej, jak również w ustalaniu pokrewieństwa, w tym ojcostwa.

Początkowo w badaniach znalazły zastosowanie markery chromosomów autosomalnych, zwłaszcza krótkie repetytywne powtórzenia nukleotydowe typu STR. Stało się tak z uwagi na powszechność ich występowania w genomie ludzkim i wysoki polimorfizm.

W ostatnich latach obiektem dużego zainteresowania genetyków sądowych stały się polimorficzne markery płci, a zwłaszcza chromosomu Y. Stanowi on zaledwie 2% genomu człowieka, a większa jego część (95%) nie podlega rekombinacji. Posiada jednak szczególne właściwości –

charakterystyczny jest dla osobników płci męskiej i dziedziczony jest w linii ojciec-syn. Ta unikalna specyfika chromosomu Y sprawia, że oznaczenie jego markerów jest niezwykle przydatne w sprawach dotyczących m.in. dochodzenia ojcostwa (gdy dziecko jest płci męskiej).

W każdym przypadku badań DNA w ustalaniu ojcostwa, w którym obserwuje się zgodność profili DNA domniemanego ojca i dziecka, niezbędna jest analiza statystyczna otrzymanych wyników. W rachunku tym brana jest pod uwagę częstość występowania w populacji układu cech odziedziczonych po ojcu, z uwzględnieniem ewentualnych mutacji, których obecność w znaczący sposób obniża indeks ojcostwa, a tym samym, prawdopodobieństwo ojcostwa. Najprostszym sposobem ich analizy jest bezpośrednia detekcja przez genotypowanie. Z badań J. C. Roach wynika, że średni stopień mutacji u człowieka wynosi $\sim 1,1 \times 10^{-8}$ na zasadę w haploidalnym genomie [1], zaś średnia częstość mutacji dla wszystkich 17 Y-STR loci (zestaw AmpFISTR-filer f-my Applied Biosystems) osiąga wartość 0,0025 [2].

W niniejszych badaniach podjęto ocenę częstości mutacji dla 18-tu Y-STR loci znajdujących coraz częstsze zastosowanie w genetyce sądowej [3].

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił DNA wyizolowany z krwi lub wymazów z jamy ustnej pochodzący od 200-tu par ojciec-syn z terenu Polski północnej, w których ojcostwo potwierdzono analizą autosomalnych systemów STR ($PI >= 100\ 000$) – archiwum Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej GUMed).

Zakres badań obejmował Y-STR 18-plex: DYS19, DYS385a/b, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS388, DYS426, DYS437, DYS348, DYS439, DYS460, GATA H4.1, YCA II. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyclerze Mastercycler Gradient (f-my Eppendorf) w całkowitej objętości 5 μ l, w warunkach opisanych przez K. Rębałę [3]. Produkty amplifikacji rozdzielano drogą elektroforezy kapilarnej przy użyciu analizatora genetycznego 3130 ABI Prism (Applied Biosystems) i genetypowano stosując program GeneMapper Id v.3.2 software.

WYNIKI I DISKUSJA

Analizie poddano 18 markerów Y-STR: DYS19, DYS385a/b, DYS383I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS426, DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, GATA H4.1, YCA II, DYS388. W tym zakresie mieści się 9 systemów tworzących tzw. „minimalny haplotyp”. Przyjęte nazewnictwo alleli było zgodne z zaleceniami ISFG.

Wśród poddanych badaniom osób w obrębie 18-tu Y-STR loci zaobserwowano 11 niezgodności w parach ojciec-syn. Pięć z nich wynikało z pojawienia się dodatkowej jednostki repetytywnej u dziecka (insercja), sześć pozostałych było wynikiem jej utraty (delecja). Podczas analizy badanych próbek określono profil DNA zawierający dodatkowy allel. W locus DYS438 u ojca zaobserwowano duplikację, obecność dwóch alleli 9 i 11, podczas gdy u dziecka w tym samym markerze genetycznym pojawił się tylko allel 11 (tabela I).

Tabela I. Rodzaje zaobserwowanych mutacji w 200-tu parach ojciec-syn w 18-tu Y-STR loci.

Table I. Types of mutations observed in 200 father-son pairs in 18 Y-STR loci.

Lp.	Locus Locus	Allel ojca Paternal allele	Allel syna Filial allele	Rodzaj mutacji Type of mutation
1	DYS39 II	30	31	insercja / insertion
2	DYS 19	15	16	insercja / insertion
3	DYS 390	25	26	insercja / insertion
4	DYS 389 I	13	14	insercja / insertion
5	DYS 390	26	27	insercja / insertion
6	DYS 439	13	12	delecja / deletion
7	DYS 385 a/b	14,17	12,17	delecja / deletion
8	DYS 385 a/b	11,14	11,12	delecja / deletion
9	DYS 385 a/b	14,16	14,15	delecja / deletion
10	DYS 460	11	10	delecja / deletion
11	DYS 438	9,11	11	duplikacja / duplication

Większość niezgodności w parach ojciec-syn, które odnotowano przy analizie markerów Y-STR było konsekwencją zmiany długości allele o pojedynczą jednostkę repetytywną (tabela II). W jednym przypadku zaobserwowano obecność dodatkowej mutacji w obrębie markerów autosomalnych.

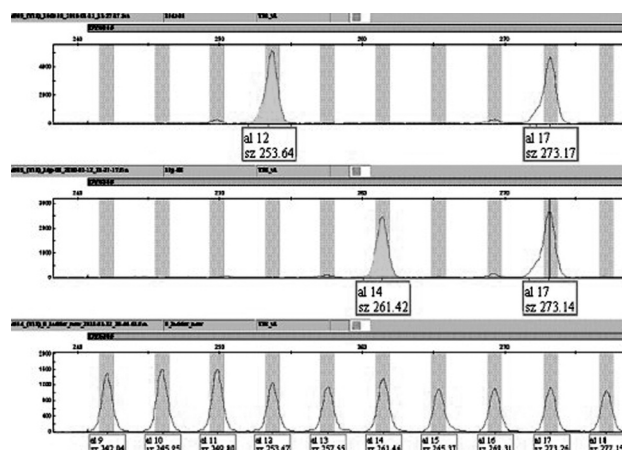
Tabela II. Liczba i częstość mutacji w 18-tu Y-STR loci wykazanych w analizowanej populacji Polski północnej.

Table II. The number and frequency of mutations in 18 Y-STR loci observed in the population of Northern Poland.

Locus Locus	Liczba mutacji Number of mutations	Mejozy Meioses	Częstość mutacji Frequency of mutations
DYS 391	0	200	---
DYS 389 I	1	200	0,005
DYS 437	0	200	---
DYS 439	1	200	0,005
DYS 389 II	1	200	0,005
DYS 426	0	200	---
DYS 393	0	200	---
YCA II	0	200	---
DYS 390	2	200	0,010
DYS 385 a/b	3	200	0,015
DYS 460	1	200	0,005
GATA H4.1	0	200	---
DYS 388	0	200	---
DYS 19	1	200	0,005
DYS 438	1	200	0,005
DYS 392	0	200	---
Całkowita częstość mutacji Total frequency of mutations	11	200	0,0031

Najwyższa obliczona wartość częstości mutacji wynosiła 0,015 i wystąpiła w locus *DYS385*, który został uznany za najbardziej polimorficzny marker badanego multipleksu [3]. Ten sam parametr w oparciu o analizę znacznie większej populacji (aż 25'306 par mężczyzn) wyniósł zaledwie 0,00213 [4].

Na podstawie przeprowadzonych badań zauważono, że jedynie w przypadku mutacji delecyjnej, zmiany, które zaszły dotyczyły utraty dwóch jednostek repetytywnych. W wysoce polimorficznym markerze *DYS 385 a/b* zaobserwowano 3 niezgodności w parach ojciec-syn, w tym dwie, które dotyczyły utraty dwóch jednostek repetytywnych (ryc. 1).



Ryc. 1. Elektroforegram przedstawiający zmianę długości allele o dwie jednostki repetytywne w locus *DYS385* (panel górny – syn, panel środkowy – ojciec).

Fig. 1. Electropherogram presenting a change in the length of the allele, resulting in a shift from allele 14 to 12, in *DYS438* locus (upper panel – son, middle panel – father).

W sześciu markerach: *DYS389 I*, *DYS439*, *DYS389 II*, *DYS460*, *DYS19* oraz *DYS438* wystąpiły pojedyncze mutacje, a ich częstość dla wszystkich wynosiła 0,005.

Częstości mutacji wykazane w przeprowadzonych badaniach nie odbiegają w znaczący sposób od wyników przeanalizowanych tysięcy par ojciec-syn z obszaru całego świata. Niewielkie rozbieżności zaobserwowane w częstościach mutacji dla

poszczególnych markerów chromosomu Y badanej grupy 200 par ojciec-syn wynikają z różnicy pomiędzy liczebnością zbadanych mejoz. Obliczona całkowita częstość mutacji dla badanego multiplexu Y-STR wyniosła 0,0031. Zbliżoną średnią wartość mutacji zaobserwowano dla 17 loci Y-STR (Y-filer, Applied Biosystems), analizując dwukrotnie większą grupę osób [5].

W tabeli III przedstawiono uzyskane wyniki wraz z danymi występującymi w międzynarodowej bazie danych YHRD i z publikacji naukowych [2, 4, 6, 7].

Uzyskane wyniki badań i dane z innych populacji wskazują, że mutacje w markerach Y-STR pojawiają się niezwykle rzadko, stąd ich wysoka przydatność w genetyce sądowej. Mutacje w markerach Y-STR występują znacznie rzadziej niż w loci autosomalnych [8].

Zmienność mutacyjna jest podstawą procesów ewolucyjnych. Dzięki niej powstają nowe allele, a tym samym wzrasta polimorficzność genu, przyczyniając się do zwiększenia jego informatywności. Odkąd istotne zróżnicowanie haplotypów Y-STR pomiędzy populacjami, jak i wewnątrz nich znalazło szerokie zastosowanie w badaniach filogenetycznych, ewolucyjnych, a przede wszystkim w medycynie sądowej w ustalaniu pokrewieństwa, w tym ojcostwa, zestaw analizowanych i dobrze poznanych markerów sukcesywnie rośnie.

Wykazane w przedstawionej pracy właściwości mutacyjne loci Y-STR mają znaczący wpływ na interpretację wyników, stąd znajomość współczynnika mutacji dla poszczególnych markerów genetycznych wydaje się być niezbędną do prawidłowego opiniowania w sprawach sądowych. Wiedza ta jest konieczna szczególnie w przypadkach analizy pokrewieństwa, gdy dostępny jest wyłącznie materiał porównawczy od osób niespokrewnionych w pierwszej linii [9].

Tabela III. Tabela przedstawiająca obliczone częstości mutacji dla 200 par ojciec-syn wraz z danymi występującymi w międzynarodowej bazie danych YHRD i z publikacji naukowych.

Table III. Mutation rates for 200 father-son pairs with the data from YHRD database scientific papers.

YHRD/ dane z literatury + badana próbka 200 par ojciec/syn YHRD/data from literature + investigated sample of 200 father-son pairs			
Locus Locus	Mutacje Mutations	Mejozy Meioses	Częstość mutacji Frequency of mutations
DYS 391	38	14`821	0,00256
DYS 389 I	35	13`674	0,00256
DYS 437	12	9`987	0,00120
DYS 439	52	9`982	0,00520
DYS 389 II	50	13`645	0,00366
DYS 438	4	10`008	0,00039
DYS 426	0	1`258	---
DYS 393	14	13`539	0,00103
YCAII a/b	0	1`058	---
DYS 390	33	14`947	0,00220
DYS 385 a/b	57	25`506	0,00223
DYS 460	3	1`310	0,00229
GATA H4.1	18	7`595	0,00236
DYS 388	0	1`246	---
DYS 19	36	15`425	0,00233
DYS 392	6	14`753	0,00040

PIŚMIENNICTWO

1. Roach J. C., Glusman G., Smit A. F. A i wsp.: Analysis of Genetic Inheritance in a Family Quartet by Whole-Genome Sequencing. *Science*, 2010, 328: 636-639.

2. Goedbloed M. i wsp.: Comprehensive mutation of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR®Yfiler® PCR amplification kit; *International Journal of Legal Medicine*. 2009, 6: 471-482.

3. Rębała K., Szczerkowska Z.: Polish population study on Y chromosome haplotypes defined by 18 STR loci, *International Journal of Legal Medicine*. 2005, 119: 303-305.

4. www.yhrd.org

5. Roewer L.: Jaki ojciec taki syn, *Genetyka*

i prawo, *Kwartalnik Naukowy Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej*. Bydgoszcz 2009, 2: 4-5.

6. Hadley K. i wsp.: Non-paternity and locus Specific Mutation Rates of 36 Y Chromosome STRs, *American Society of Human Genetics*, 2004.

7. Pepiński W. i wsp.: Population genetics of Y-chromosome STRs in a population of Podlasie, northeastern Poland, *Forensic Sci. Int.* 2004, 144: 77-82.

8. Decker A. i wsp.: Analysis of mutation in father-son pairs with 17 Y-STR loci, *Forensic Sci. Int.: Genetics*. 2008, 2: 31-35.

9. Woźniak M., Skowron A., Bednarek J.: Ocena polimorfizmu loci STR chromosomu Y: DYS 19, DYS 389I, DYS 389II i DYS 390 w populacji Kujawsko-Pomorskiej, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2001, 3: 239-141.

Adres do korespondencji:

Dr n. med. Joanna Wysocka

wysocka@gumed.edu.pl

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

Ewa Kapińska, Joanna Wysocka, Lidia Cybulska, Krzysztof Rębała, Patrycja Juchniewicz¹, Zofia Szczerkowska

Przykłady zastosowania markerów chromosomu X w badaniach rodzinnych i identyfikacyjnych

Examples of application of X chromosomal markers in familial investigations and personal identification

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

¹ Z Wydziału Biologii (Biologia Sądowa) Uniwersytetu Gdańskiego

W badaniach genetycznych dotyczących ustalania spornego ojcostwa lub identyfikacji osobniczej coraz częściej, obok autosomalnych STR loci, wykorzystuje się markery chromosomów płci: X i Y. W pracy przedstawiono przypadki, w których analiza mikrosatelitarnych loci chromosomu X (X-STR) włączona do rutynowych badań, umożliwiła jednoznaczne określenie pokrewieństwa badanych osób. Przedstawione sprawy dotyczyły ustalenia ojcostwa w linii córki/ojciec, określenia czy badane kobiety są przyrodnymi siostrami (mają wspólnego ojca) oraz ustalenia tożsamości zmarłego mężczyzny. W żadnej z przeprowadzonych ekspertyz próbka DNA domniemanego ojca nie była dostępna. Typowanie markerów X-STR wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu *Mentype® Argus X-8 Amplification Kit* firmy Biotype oraz *Investigator Argus X-12* firmy Qiagen.

Besides autosomal STR loci, markers of sex chromosomes, X and Y, are increasingly more commonly used in genetic analyses aiming at paternity testing or personal identification. The paper presents cases in which analysis of microsatellite loci of the X chromosome (X-STRs) was included in the routine examination and allowed for an unambiguous determination of the relationship between the tested individuals. The cases addressed paternity testing of female children, determination whether the examined women were paternal half-sisters, as well as personal identification of a deceased man. In none of the conducted expert opinions, the putative father's DNA sample was't available. Genotyping of X-STR

markers was carried out with the use of commercial kits: *Mentype Argus X-8 PCR Amplification Kit* (Biotype) and *Investigator Argus X-12 Kit* (Qiagen).

Słowa kluczowe:

chromosom X, X-STR, pokrewieństwo, ustalanie ojcostwa

Key words:

X chromosome, X-STR, kinship testing, paternity testing

WSTĘP

Polimorficzne markery DNA umieszczone na ludzkich chromosomach płci stanowią, oprócz rutynowo analizowanych loci autosomalnych, cenne źródło informacji wykorzystywanej w badaniach kryminalistycznych i identyfikacyjnych. Specyficzny wzór dziedziczenia chromosomu X sprawia, że analiza mikrosatelitarnych loci X-STR (określonych na chromosomie X) znalazła szerokie zastosowanie w ekspertyzach genetycznych włączanych do opinii sądowo-lekarskich. Odgrywają one szczególną rolę w przypadkach ustalania ojcostwa, gdy spornym dzieckiem jest córka oraz w sprawach o dochodzenie ojcostwa, gdy kwestionowane jest ono w stosunku do jednej z sióstr. W sytuacji gdy domniemany ojciec jest nieobecny, markery chromosomu X wykazane u matki pozwanego i dziecka, pozwolą na wnioskowanie odnośnie ojcostwa.

Każdy mężczyzna ma tylko jeden chromosom X, który dziedziczony jest przez potomstwo płci żeń-

skiej. W rezultacie ojciec przekazuje wszystkim swoim córkom identyczny wzór alleli chromosomu X – tzw. allele odcjowskie.

Typowanie sekwencji X-STR stosuje się również w badaniach skomplikowanych przypadków pokrewieństwa (np. kazirodztwo) gdy istnieje podejrzenie, że domniemanym ojcem dziecka płci żeńskiej może być pozwany mężczyzna lub jego syn. W tym przypadku X-STR-y są bardziej przydatnym narzędziem badawczym niż loci autosomalne, ponieważ ojciec i syn posiadają różne profile chromosomu X. Markery te wykorzystuje się również w przypadkach ekspertyz dotyczących osób zaginionych lub ofiar katastrof, gdzie bezpośrednie próbki referencyjne nie są dostępne i porównanie do bliskich krewnych (np. matka-syn, matka-córka, córka-ojciec, wnuczka-matka ojca, siostra-siostra) może pomóc w ich identyfikacji [1, 2, 3, 4].

W niniejszej pracy przedstawiono przypadki, w których analiza polimorficznych loci X-STR pozwoliła na wydanie jednoznacznych opinii.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom poddano próbki krwi obwodowej oraz wymazy z nabłonka jamy ustnej pobrane od stron występujących w omawianych sprawach. Z zabezpieczonego materiału biologicznego wyizolowano DNA stosując metodę nieenzymatyczną oraz zestaw do izolacji DNA „Sherlock AX”, firmy A&A Biotechnology. Ilość i jakość uzyskanego DNA oznaczano metodą spektrofotometryczną (NanoDrop® ND-1000 V3.1.0 Spectrophotometr), a następnie poddawano go badaniom genetyczno-molekularnym.

Do określenia autosomalnych markerów STR wykorzystano multipleksowe zestawy amplifikacyjne: AmpFSTR® Identifier® PCR Amplification, AmpFISTR® SEfiler™ PCR Amplification Kit (firmy Applied Biosystems, USA) oraz GenePrint®FFFL Multiplex Kit, PowerPlex® 16 System i PowerPlex® ESX 17 System firmy Promega. Typowanie markerów X-STR wykonano przy użyciu komercyjnych zestawów: Mentype® Argus X-8 Amplification Kit firmy Biotype oraz Investigator Argus X-12 firmy Qiagen [5, 6]. Procedurę amplifikacyjną przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producentów multipleksów. Produkty PCR rozdzielono metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze 3130 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems) i analizowano przy użyciu programu GeneMapper ID v 3.2.

Wyniki uzyskane z badania autosomalnych loci poddano rutynowej analizie statystycznej obliczając prawdopodobieństwo ojcostwa i pokrewieństwa wg programu komputerowego DNA-VIEW v. 27.12, 2005, CH. Brennera.

W analizie statystycznej markerów chromosomu X uwzględniono zjawisko tzw. nierównowagi sprzężeń (ang. linkage disequilibrium), polegające na wspólnym dziedziczeniu loci (alleli) chromosomu X leżących blisko siebie. Tworzą one wówczas stabilny haplotyp, który powinien być analizowany jako całość. W obliczeniach uwzględniać należy wówczas częstości obserwowanych haplotypów a nie częstości alleli pojedynczych loci. Ze względu na położenie markerów X STR na chromosomie X wyróżniono 4 grupy sprzężeń (ang. linkage group): 1. DXS10135-DXS8378, 2. DXS7132-DXS10074, 3. HPRTB-DXS10101, 4. DXS10134-DXS7423 obserwowane w zestawie Argus X-8 oraz 1. DXS8378-DXS10135-DXS10148, 2. DXS7132-DXS10134-DXS10079, 3. HPRTB-DXS10101-DXS10103, 4. DXS7423-DXS100749-DXS10146 występujące w multipleksie Investigator Argus X-12. Allele układów należących do różnych grup sprzężeń są dziedziczone niezależnie z wyjątkiem grup 3 i 4, które mogą być częściowo sprzężone [3, 7, 8].

Analiza statystyczna markerów X-STR obejmowała loci chromosomu X pochodzące z różnych grup sprzężeń, oddalone od siebie o co najmniej 50 cM [8]. Wzory parametrów statystycznych, uwzględniające specyfikę dziedziczenia przez potomstwo markerów X-STR od ich rodziców, określono w oparciu o program komputerowy DNA-VIEW v. 27.12, 2005, CH. Brennera. W badaniach wykorzystano częstości alleli dla poszczególnych loci występujące w populacji polskiej [9, 10, 11, 12, 13].

WYNIKI

Ustalenie pokrewieństwa domniemanych przyrodniczych sióstr

Analizowany przypadek dotyczył dwóch kobiet, które zgłosiły się do Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w celu określenia czy są one przyrodnimi siostrami. Jedna z nich była córką zmarłego mężczyzny, na-

leżało ustalić czy zmarły był również biologicznym ojcem drugiej z kobiet.

Od stron zabezpieczono krew, wyizolowano DNA i poddano go badaniom. Ekspertyzę wykonano wyłącznie w oparciu o markery chromosomu X (Argus X-12 f-my Qiagen), które mężczyzna przekazuje swoim córkom. W przypadku, gdy mają one wspólnego ojca, w analizowanych X-STR loci wystąpią u sióstr identyczne, odcjowskie allele. Uzyskane genotypy przedstawiono w tabeli I i na rycinie 1.

Tabela I. Profile genetyczne badanych kobiet (Argus X-12). Zaobserwowano brak wspólnych alleli w 7 badanych markerach X-STR (podkreślone loci).

Table I. Genetic profiles of the tested women (Argus X-12). No shared alleles were observed in the 7 X-STR markers (underlined loci).

Marker Marker	Kobieta I Female I	Kobieta II Female II
AMGY	XX	XX
DXS10103	18/18	16/19
DXS8378	11/11	9/10
DXS7132	13/14	12/13
DXS10134	36/37	37/41.3
DXS10074	8/7	16/16
DXS10101	28.2/29	31/31.2
DXS10135	25.1/27	23/28
DXS7423	15/15	15/15
DXS10146	25/30	28/40.2
DXS10079	17/20	19/20
HPRTB	12/12	13/13
DXS10148	23.1/28.1	28.1/28.1

Analiza polimorfizmu X-STR wykazała brak wspólnych alleli między profilami genetycznymi badanych kobiet. Niezgodności wystąpiły w 7 systemach chromosomu X: DXS10103, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10135, DXS10146, HPRTB.

Przyjmując, iż kobieta II jest biologiczną córką zmarłego mężczyzny, wykluczono ojcostwo tego mężczyzny w stosunku do kobiety I.

Określenie pokrewieństwa 4 badanych kobiet – ustalenie czy są one biologicznymi siostrami

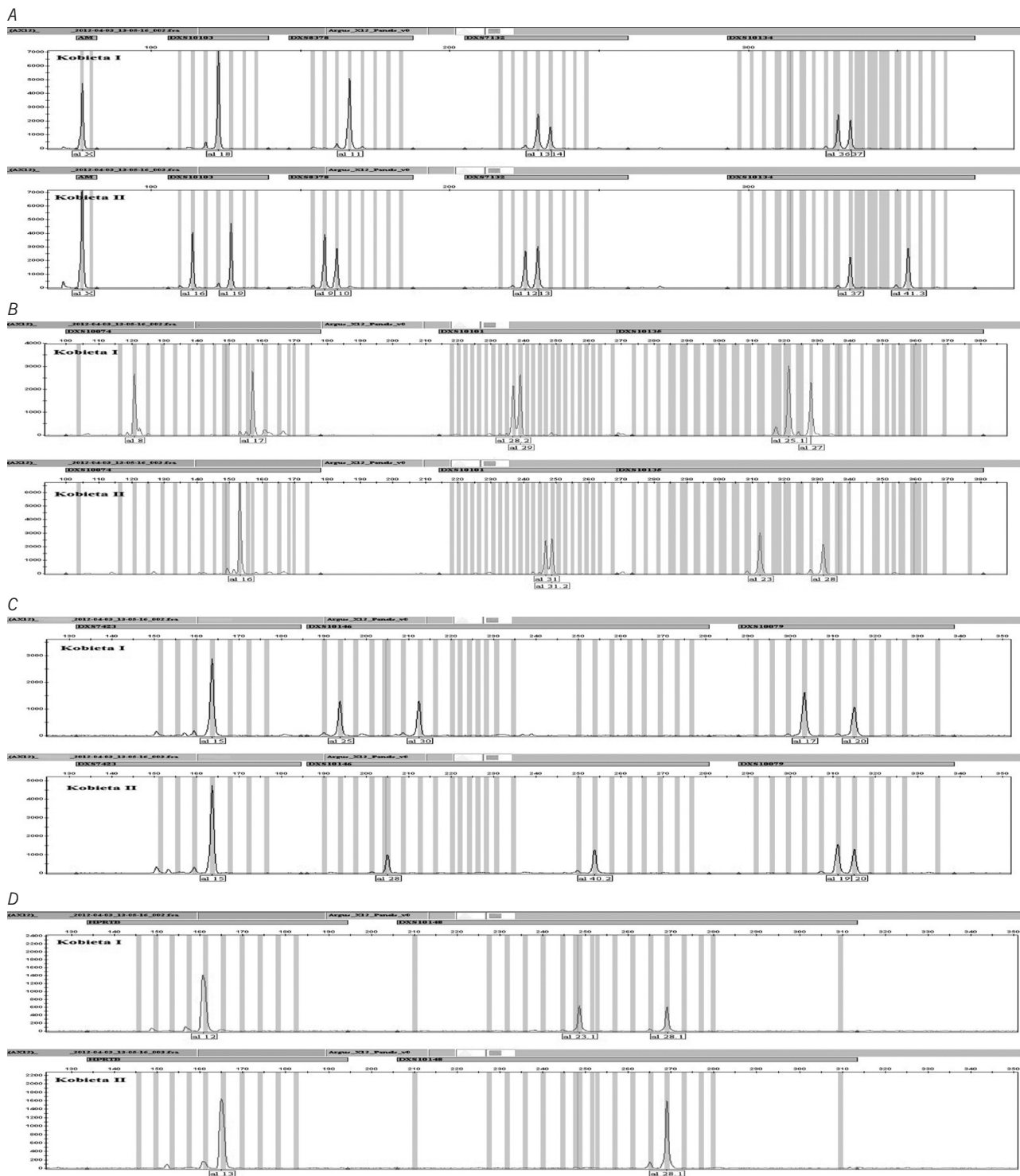
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego otrzymał polecenie wykonania badań genetycznych w sprawie o zaprzeczenie ojcostwa nieżyjącego mężczyzny, w stosunku do dwóch z czterech badanych kobiet. Na badanie zgłosiła się matka z córkami, oznaczonymi w sprawie jako: DZ1, DZ2, DZ3 i DZ4. Zgodnie z postanowieniem sądu należało przeprowadzić badanie genetyczne na okoliczność czy DZ1 i DZ2 pochodzą od tego samego ojca co DZ3 i DZ4, ustalić czy badane kobiety są biologicznym rodzeństwem.

W pierwszym etapie do określenia stopnia pokrewieństwa między badanymi osobami wykorzystano bardzo szeroki zestaw 27 autosomalnych STR loci oraz locus amelogeniny. Uzyskane wyniki amplifikacji badanego materiału przedstawiono w tabeli II.

Analiza polimorfizmu DNA osób występujących w sprawie potwierdziła macierzyństwo kobiety, określonej jako matka, w stosunku do wszystkich badanych córek. Stwierdzono również, że w 13 systemach STR (D7S820, CSF1PO, TH01, D2S1338, D19S433, D18S51, D5S818, FGA, SE33, Penta E, D10S1248, D22S1045, F13A01) w puli alleli dziedziczonych po ojcu pojawiły się więcej niż 2 allele. Oznaczało to, że w badanej sprawie występuje co najmniej dwóch mężczyzn.

W kolejnym etapie do badań włączono markery chromosomu X w celu określenia, które z badanych sióstr mają tego samego ojca. Przy użyciu zestawu Mentype® Argus X-8 PCR oznaczono 8 loci chromosomu X: DXS7132, DXS7423, DXS8378, DXS10074, DXS10101, DXS10134, DXS10135, HPRTB i AMGY (tabela III).

Zgodnie z zasadami dziedziczenia córki otrzymują jeden chromosom X od matki i jeden od ojca. Znając układ alleli matki można u dzieci płci żeń-



Ryc. 1. Profile X-STR dwóch kobiet określone przy użyciu zestawu Investigator Argus X-12 Kit (panel A loci: AMGY, DXS10103, DXS8378, DXS7132, DXS10134; panel B: DXS10074, DXS10101, DXS10135; panel C: DXS7423, DXS10146, DXS10079; panel D: HPR1B, DXS10148).

Fig. 1. X-STR profiles of two women genotyped with the use of the Investigator Argus X-12 Kit (panel A loci: AMGY, DXS10103, DXS8378, DXS7132, DXS10134; panel B: DXS10074, DXS10101, DXS10135; panel C: DXS7423, DXS10146, DXS10079; panel D: HPR1B, DXS10148).

Tabela II. Wynik badania polimorfizmu 27 autosomalnych loci STR i amelogeniny.

Table II. Result of analysis of polymorphism of 27 autosomal STR loci and amelogenin.

Locus	Matka Mother	DZ 1 Child 1	DZ 2 Child 2	DZ 3 Child 3	DZ 4 Child 4
D8S1179	13/14	12/14	12/13	12/13	12/14
D21S11	30/30	30/30	30/30	29/30	29/30
D7S820	8/12	8/11	8/12	8/9	9/12
CSF1PO	12/12	12/12	10/12	11/12	12/12
D3S1358	17/18	14/17	15/17	14/17	15/17
TH01	7/9	6/7	6/9	7/8	9/9
D13S317	11/12	11/11	11/11	11/12	11/12
D16S539	13/14	12/14	12/14	11/13	11/14
D2S1338	17/20	17/20	17/25	19/20	19/20
D19S433	14/16.2	12/14	13/16.2	15/16.2	15/16.2
VWA	16/17	14/16	14/17	16/17	16/17
TPOX	9/11	8/9	8/11	8/9	8/11
D18S51	15/16	16/17	14/15	13/15	13/16
AMGY	XX	XX	XX	XX	XX
D5S818	12/12	12/12	11/12	10/12	11/12
FGA	20/23	20/25	20/21	20/20	23/24
SE 33	23.2/29.2	19/29.2	23.2/32.2	23.2/29.2	29.2/30.2
Penta E	10/11	10/11	5/10	10/17	10/17
Penta D	9/10	10/14	10/14	9/10	9/10
D10S1248	14/14	13/14	13/14	12/14	14/14
D22S1045	16/16	11/16	11/16	16/18	16/16
D2S441	11/14	10/14	10/11	11/11	11/14
D1S1656	12/16	12/16	16/16	12/14	12/14
D12S391	18/20	18/22	20/22	17/20	17/20
LPL	11/12	10/11	10/11	9/12	10/11
F13B	9/9	9/10	9/10	9/10	9/10
FESFPS	10/12	10/11	10/11	11/12	11/12
F13A01	5/6	3.2/6	3.2/5	5/7	5/5

Tabela III. Wynik badania 8 loci X-STR i locus amelogeniny.

Table III. Result of analysis of 8 X-STR loci and amelogenin locus.

Locus	Matka Mother	DZ 1 Child 1	DZ 2 Child 2	DZ 3 Child 3	DZ 4 Child 4
AMGY	XX	XX	XX	XX	XX
DXS8378	10/12	10/11	10/11	10/12	10/12
HPRTB	13/13	13/16	13/16	12/13	12/13
DXS7423	15/16	15/15	15/15	16/16	16/16
DXS7132	14/15	14/15	15/15	13/14	13/14
DXS10134	36/39	36/36	36/36	34/39	34/39
<u>DXS10074</u>	16/18	17/18	16/16	18/18	18/18
DXS10101	32/32.2	30/32	30/32.2	32/32	32/32.2
DXS10135	20/31	20/26	20/26	23/31	23/31

skiej określić ojcowski wzór chromosomu X. Badanie to wykazało, iż DZ1 i DZ2 dziedziczą w linii męskiej identyczny haplotyp X-STR (z wyjątkiem locus DXS10074) różny jednak od haplotypu X-STR wspólnego dla DZ3 i DZ4. Test ten potwierdził wcześniejsze przypuszczenia, że kobiety nie mają wspólnego ojca, a w omawianej sprawie występuje dwóch mężczyzn. Jeden z nich jest ojcem kobiet oznaczonych jako DZ1 i DZ2, drugi natomiast ojcem DZ3 i DZ4. Niezgodność w systemie DXS10074 uznano za mutację.

W oparciu o kompleksowe wyniki analizy DNA (markerów autosomalnych, loci chromosomu X i przy uwzględnieniu mutacji) zastosowano rachunek statystyczny określając prawdopodobieństwo, że badane osoby są biologicznymi siostrami. Uzyskano odpowiednio wartości 99,9996% dla pary DZ1/DZ2, oraz 99,9999% dla DZ3/DZ4.

Powyższe dowodzi, że kobiety oznaczone jako DZ1 i DZ2 pochodzą od innego ojca niż DZ3 i DZ4.

Badanie identyfikacyjne – ustalenie tożsamości zmarłego mężczyzny

W Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej GUM przeprowadzono sekcję zwłok mężczyzny o nieznannej tożsamości, który poniósł śmierć w wypadku

drogowym. Do badań genetycznych zabezpieczono krew. W późniejszym czasie, do tut. Zakładu dostarczono materiał porównawczy w postaci wymazów z jamy ustnej, pobrany od domniemanej matki denata. Należało wykonać badania genetyczne zabezpieczonego w ww. sprawie materiału biologicznego w celu ustalenia czy sekcjonowany mężczyzna może być synem typowanej kobiety.

Do określenia 20 markerów autosomalnego DNA i locus amelogeniny wykorzystano zestawy: AmpFISTR Identifier, AmpFISTR SEfiler oraz GenePrint®FFFL Multiplex Kit. Uzyskane genotypy przedstawiono w tabeli IV.

Analiza uzyskanych genotypów wykazała, że NN mężczyzna i domniemana matka posiadają wspólne allele we wszystkich badanych układach. Prawdopodobieństwo, że analizowana kobieta jest matką denata wyniosło 99,98%. W celu zwiększenia wartości dowodowej przeprowadzanych badań i uzyskania prawdopodobieństwa pokrewieństwa $\geq 99,9999\%$ (odpowiadającego wartości W jaką należy osiągnąć w przypadku potwierdzenia ojcostwa – *Komisja Hemogenetyki Sądowej PTMSiK, Zasady Atestacji na lata 2012-2013, III Atestacja w zakresie ustalania pokrewieństwa, w tym ojcostwa*) badanie rozszerzono o markery chromosomu X ty-

Tabela IV. Wynik analizy polimorfizmu 20 autosomalnych loci STR i amelogeniny.

Table IV. Result of analysis of polymorphism of 20 autosomal STR loci and amelogenin.

Locus	NN mężczyzna Unidentified man	Matka Mother
D8S1179	13/13	13/13
D21S11	28/31	28/30
D7S820	8/11	9/11
CSF1PO	11/11	10/11
D3S1358	14/17	14/16
TH01	6/9.3	6/9.3
D13S317	9/11	11/11
D16S539	11/13	11/15
D2S1338	23/25	17/25
D19S433	13/14	14/16
VWA	15/17	15/17
TPOX	8/11	8/11
D18S51	14/15	14/18
AMGY	XY	XX
D5S818	11/12	9/11
FGA	21/22	20/21
SE33	17/21	14/17
LPL	11/12	11/12
F13B	10/10	10/10
FESFPS	10/13	10/11
F13A01	6/7	6/7

pując allele 8 systemów X-STR: DXS8378, HPRTB, DXS7423, DXS7132, DXS10134, DXS10074, DXS10101, DXS10135 (tabela V).

Tabela V. Genotypy 8 X-STR loci i amelogeniny.

Table V. Genotypes of 8 X-STR loci and amelogenin.

Locus	NN mężczyzna Unidentified man	Matka Mother
AMGY	XY	XX
DXS8378	10	10/12
HPRTB	13	11/13
DXS7423	14	14/14
DXS10134	40.3	35/40.3
DXS10074	9	9/17
DXS10101	29.2	29.2/31.2
DXS10135	19	19/23

Syn dziedziczy po matce chromosom X. Allele X-STR obecne u NN mężczyzny występowały także w profilu chromosomu X badanej kobiety.

Wyniki analizy chromosomu X włączono do obliczeń statystycznych i ponownie określono prawdopodobieństwo macierzyństwa badanej kobiety w stosunku do sekcjonowanego NN mężczyzny. Uzyskano wartość równą 99,999999%, która pozwoliła z bardzo wysokim prawdopodobieństwem stwierdzić, iż zmarły mężczyzna był synem typowanej kobiety.

WNIOSKI

W niniejszej pracy przedstawiono przypadki, w których do analizy genetycznej włączono polimorficzne, mikrosatelitarne loci chromosomu X. Stały się one dodatkowym, a w niektórych sprawach jedynym źródłem informacji genetycznej niezbędnej do opiniowania. Opierając się na zasadach dziedziczenia chromosomów płci możliwe było przeprowadzenie ekspertyzy genetycznej, nawet przy braku materiału biologicznego pochodzącego od domniemanego ojca. Analiza markerów X-STR umożliwiła uzyskanie odpowiednio wysokiej wartości prawdopodobieństwa (min. 99.9999%) potwierdzającego

pokrewieństwo badanych osób. Wysokie częstości określonych alleli autosomalnych, wspólnych dla analizowanych osób mogą sprawić, że nawet przy zastosowaniu kilku multipleksowych zestawów PCR, nie będzie możliwe uzyskanie tak wysokich parametrów statystycznych.

Przeprowadzone badania dowodzą, że wprowadzenie do analizy nowych markerów genetycznych (X-STR) jest niezbędne do zwiększenia wartości dowodowej ekspertyzy i wydania prawidłowej opinii.

PIŚMIENNICTWO

1. Butler J. M.: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*. Academic Press Elsevier, USA 2011.

2. Toni Ch., Presciuttini S., Spinetti I., Domenici R.: Population data of four X-chromosome markers in Tuscany, and their use in a deficiency paternity case. *Forensic Sci. Int.* 2003, 137: 215-216.

3. Szibor R.: X-chromosomal markers: Past, present and future. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007, 1(2): 93-99.

4. Szibor R., Plate I., Edelman J., Hering S., Kuhlisch E., Michael M., Krause D.: Chromosome X haplotyping in deficiency paternity testing principles and case report. *International Congress Series* 1239. 2003, 815-820.

5. *Mentype Argus X-8 PCR Amplification Kit Manual*, Biotype AG, Germany 2007.

6. *Investigator Argus X-12 Handbook*, April 2010.

7. Tillmar A. O., Mostad P., Egeland T., Lindblom B., Holmlund G., Montelius K.: Analysis of linkage and linkage disequilibrium for eight X-STR markers. *Forensic Science International: Genetics* 2008, 3: 37-41.

8. Machado F., Medina-Acosta E.: Genetic map of human X-linked microsatellites used in forensic

practice, *Letter to the Editor, Forensic Science International: Genetics* 2009, 3: 202-204.

9. Branicki W., Wolańska-Nowak P., Parys-Proszek A., Kupiec T.: Application of the Mentype Argus X-8 kit to forensic casework. *Problems of Forensic Sciences*. 2008, 73: 53-64.

10. Pepiński W., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A.: Polymorphism of four X-chromosomal STRs in a Polish population sample. *Forensic Sci. Int.* 2005, 151: 93-95.

11. Czarnogórska M., Sanak M., Piniewska D., Polańska N., Stawowiak A., Opolska-Bogusz B.: Identyfikacja rzadkich wariantów genetycznych w loci DXS10074, DXS10079, DXS10146 oraz DXS10148 multipleksu Investigator Argus X-12 w populacji Polski południowej. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2010, 4: 235-242.

12. Jędrzejczyk M., Jacewicz R., Berent J.: Polimorfizm loci STR chromosomu X: DXS8378, DXS7132, HPRTB, DXS7423 w populacji Polski centralnej. *Problems of Forensic Sciences*. 2008, 73: 65-69.

13. Jędrzejczyk M., Jacewicz R., Berent J.: Zróżnicowanie markerów STR chromosomu X: DXS10135, DXS10074, DXS10101, DXS10134 i ich przydatność w genetyce sądowej. *Problems of Forensic Sciences*. 2009, 77: 89-97.

Adres do korespondencji:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębowa 23
80-204 Gdańsk
e-mail: e.kapinska@gumed.edu.pl

Monika Reichert, Agnieszka Maciejewska, Krzysztof Talarczyk, Regina Paszkowska, Joanna Jakubowska, Anita Dettlaff-Kąkol, Izabela Maciejewska¹, Ryszard Pawłowski

Polimorfizm locus SE33 w populacji polskiej

Polymorphism in the SE33 locus in the Polish population

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

¹ Katedra i Zakład Protetyki Stomatologicznej

Kierownik: prof. dr hab. Z. Bereznowski

Locus ACTBP2 (human beta-actin related pseudogene; SE33) jest najbardziej polimorficznym ze wszystkich, dotychczas stosowanych markerów w genetyce sądowej, zarówno do celów badania pokrewieństwa jak i identyfikacji śladów biologicznych. Ze względu na bardzo liczne allele i stosunkowo małą tendencję do tworzenia stutterów, jest prawie idealnym kandydatem do zastosowań z zakresu genetyki sądowej [1]. Do wad tego systemu należą stosunkowo długie amplikony, które mogą sprawiać trudności w przypadku badania zdegradowanego DNA. Duża długość amplikonów SE33 jest oczywiście związana z ogromną liczbą alleli obserwowanych dla tego locus. Hiperzmienny locus SE33 zlokalizowany jest na 6 chromosomie człowieka (GeneBank Accession: V00481) i wykazuje szczególnie złożony polimorfizm, na który składa się flankujący obszar 5', centralna sekwencja repetytywna i flankujący obszar 3' [2]. W zależności od rodzaju komercyjnego zestawu użytego do badania polimorfizmu SE33, a tym samym rodzajem startów użytych do powielania tego locus, obserwowane wielkości amplikonów mieszczą się w zakresie od 197 do 381pz dla zestawu ABI SEfiler, od 258 do 442pz dla ESX17 Promegi oraz od 300 do 484pz dla zestawu ES17 Promegi (zakres alleli od 3-49). Dotychczas opisano aż 178 alleli w zakresie tego locus [3]. Ze względu między innymi na bardzo wysoką siłę dyskryminacji, locus ten znalazł się wśród ośmiu wybranych loci do Niemieckiej Bazy DNA (D3S1358, FGA, D8S1179, D18S51, D21S11, TH01, VWA, SE33, amelogenina) [4, 5].

Poza genetyką sądową locus SE33 znalazł również zastosowanie między innymi w badaniu chimerizmu po przeszczepach szpiku kostnego [6, 7].

Celem niniejszej pracy jest ponowna analiza polimorfizmu tego locus przeprowadzona dla populacji Polski północnej w liczącej ponad 1000 osobników próbie populacyjnej.

MATERIAŁ I METODY

Badaniom populacyjnym poddano materiał biologiczny pochodzący od 1007 osobników obu płci zamieszkujących głównie obszar Polski północnej. Badaniom poddano tylko próbki pochodzące od niespokrewnionych osób, przesyłanych jako materiał referencyjny do spraw badanych w Pracowni Biologii i Genetyki Sądowej ZMS GUMed. DNA izolowano metodą organiczną fenol-chloroform. Ilość wyizolowanego DNA oznaczano techniką RT PCR z zastosowaniem zestawu Quantifiler™ na urządzeniu 7900HT RealTime Fast PCR System (Applied Biosystems), jak również techniką fluorymetrii z fluorochromem PicoGreen™ (Fluoroskan Ascent, ThermoLabsystem, Finlandia).

Do namnażania DNA użyto komercyjnych zestawów PowerPlex ESX17 firmy Promega (USA) oraz SEfiler firmy ABI (USA). Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze ABI 9700 firmy Applied Biosystems, zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty PCR identyfikowano metodą elektroforezy kapilarnej na sekwenatorze ABI 3130 Avant firmy Applied Biosystems (USA) wykorzystując oprogramowanie Data Collection v. 3.0 i Gene Mapper v. 3.2. Jako standardu wewnętrznego wielkości DNA użyto markera CC5 ILS500 firmy Promega (USA) dla zestawu PowerPlex ESX17 oraz LIZ500 w przypadku zestawu SEfiler. Otrzymane fragmenty DNA porównywano z drabiną alleli (Promega, USA), która zawie-

rafa 37 alleli: 4.2, 6.3, 8-20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2 35-37, 39 i 42 lub z drabiną dla zestawu SEfiler zawierającą łącznie 50 alleli: 4.2, 6.3, 8-37, 21.1, 21.2, 22.2, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2, 35.2, 36, 37.

Obliczenia statystyczne

Weryfikację zgodności z równaniem Hardy'ego-Weinberga przeprowadzono za pomocą programu komputerowego HWE wersja 1.20 [8]. Obserwowaną heterozygotyczność (H), siłę dyskryminacji (PD), średnią szansę wykluczenia (MEC) i zawartość informacji polimorficznej (PIC) obliczano jak uprzednio [9, 10, 11]. Homogenność rozkładu alleli SE33 pomiędzy badaną próbką populacyjną, a innymi populacjami prowadzono programem Conting v. 2.36 [12]. Zróznicowanie rozkładu alleli pomiędzy populacjami oceniano również za pomocą programu Arlequin v. 3.1, badając wartości F_{ST} dla poszczególnych par populacji [13].

WYNIKI I Dyskusja

Tabela I przedstawia obserwowany rozkład częstości alleli SE33 w populacji Polski północnej A, dla 1007 osobników oraz dla dwóch innych, uprzednich badań populacyjnych Podlasia (N=220) [14] i Polski północnej B (N=255) [15].

W naszych badaniach obserwowaliśmy łącznie 46 alleli, w porównaniu do 35 w populacji Podlasia i 37 w populacji Polski północnej B, na co wyraźny wpływ miała wielkość próbki populacyjnej. Nasze poprzednie badania dotyczące polimorfizmu DNA dla locus SE33 opublikowane w 1996 roku dla próbki 176 osób, pozwoliły na zidentyfikowanie tylko 25 alleli [16]. Liczba ta wydaje się być zaniżona, ze względu na stosowaną metodę detekcji amplikonów za pomocą elektroforezy na ultracienkich, poziomych żelach poliakrylamidowych. Niektóre z obserwowanych alleli nie były obecne w komercyjnych drabinach alleli, a ich oznaczenie zostało oparte na precyzyjnym pomiarze wielkości fragmentów i nie było weryfikowane sekwencjonowaniem. Dotyczyło to alleli 12.2, 13.2, 14.2, 15.2, 15.3, 16.2, 19.2 i 30.3. Badania 1007 próbek DNA dla populacji Polski północnej A prowadzono w większości stosując zestaw PowerPlex ESX17

(785 próbek), pozostałe zestawem SEfiler. Żadna z próbek nie była weryfikowana ponownym badaniem innym zestawem, chociaż miałyby to swoje logiczne uzasadnienie zważywszy na fakt obserwowanych niezgodności przy zastosowaniu innych starterów [17, 18].

Najczęściej obserwowanym allelem dla próbki 2014 alleli był allel 17 ($f=0,077$), a obok niego 27.2 ($f=0,076$), 28.2 ($f=0,075$), 19 ($f=0,065$) i 29.2 ($f=0,061$). Dla populacji Polski północnej B, w której badano 510 alleli [15], najczęstszy był allel 28.2 ($f=0,092$), a obok niego 19 ($f=0,080$), 29.2 ($f=0,075$) i 17 wraz z 19 ($f=0,067$). Badanie porównawcze częstości alleli, zaobserwowanych w tych dwóch badaniach dla Polski północnej A i B, nie wykazały znaczących różnic statystycznych ($\chi^2=9,07$; 8df; $p=0,17$ oraz $F_{ST}=0,00005$; $P=0,40451$).

W populacji z Podlasia [14] najczęściej obserwowanym allelem były allele 28 i 28.2 ($f=0,084$), a ponadto 19 ($f=0,082$), 17 ($f=0,070$) oraz 30.2 ($f=0,063$). Rozkład alleli różnił się znamienne statystycznie przy porównaniu zarówno z populacją A z Polski północnej ($F_{ST}=0,00662$; $P=0,00000$, a dla testu $\chi^2=49,8$; 8df; $p=0,000$) jak i z populacją B z Polski północnej ($F_{ST}=0,00590$; $P=0,00000$). Zważywszy na raczej dużą jednorodność populacji polskiej obserwowanej dla różnych innych autosomalnych markerów genetycznych typu STR, te różnice wydają się być zaskakujące. Ponieważ przyczyna różnego rozkładu alleli pomiędzy populacją z Polski północnej, a Podlasiem nie jest jasna, wydaje się, że wskazane byłoby przy prowadzeniu obliczeń statystycznych w sprawach identyfikacyjnych czy badania pokrewieństwa stosowanie jednak lokalnych częstości alleli.

Badanie zgodności rozkładu częstości obserwowanych i oczekiwanych alleli w populacji, z prawem Hardy-Weinberga wykazało brak odstępstwa od tego prawa ($\chi^2=42,8$; 45df; $p=0,23$).

Locus ten, jak już wspomniano na wstępie, jest uważany za najbardziej polimorficzny z dotychczas stosowanych w badaniach z zakresu genetyki sądowej, zarówno do celów badania pokrewieństwa jak i identyfikacji śladów biologicznych. Potwierdzają to również badania przeprowadzone dla dużej próbki populacyjnej z obszaru Polski północnej. W żadnym z dotychczas rutynowo badanych loci dostępnych w komercyjnych zestawach nie obser-

Tabela I. Częstości alleli oraz podstawowe parametry statystyczne dla locus SE33 w trzech populacjach z obszaru Polski.

Table I. Allele frequency and major statistical parameters for the SE33 locus in three Polish populations.

Allele	Częstości alleli w populacji Polski północnej A (N=1007) Allele frequency in the Northern Polish population A (N=1007)		Częstości alleli w populacji Polski północnej B (N=255) Allele frequency in the Northern Polish population B (N=255)		Częstości alleli w populacji Podlasia (N=220) Allele frequency in the Podlasie region population (N=220)	
11	0.0000	0	0.0000	0	0.0023	1
11.2	0.0000	0	0.0020	1	0.0000	0
12	0.0030	6	0.0059	3	0.0136	6
12.2	0.0005	1	0.0000	0	0.0000	0
13	0.0070	14	0.0098	5	0.0023	1
13.2	0.0015	3	0.0020	1	0.0023	1
14	0.0318	64	0.0235	12	0.0273	12
14.2	0.0070	14	0.0000	0	0.0000	0
15	0.0422	85	0.0510	26	0.0500	22
15.2	0.0010	2	0.0000	0	0.0000	0
15.3	0.0005	1	0.0020	1	0.0000	0
16	0.0501	101	0.0431	22	0.0477	21
16.2	0.0010	2	0.0000	0	0.0000	0
17	0.0775	156	0.0529	27	0.0705	31
17.3	0.0000	0	0.0000	0	0.0023	1
18	0.0546	110	0.0667	34	0.0432	19
18.3	0.0000	0	0.0000	0	0.0023	1
19	0.0650	131	0.0804	41	0.0818	36
19.2	0.0050	10	0.0059	3	0.0091	4
20	0.0546	110	0.0588	30	0.0432	19
20.2	0.0119	24	0.0020	1	0.0091	4
21	0.0223	45	0.0294	15	0.0341	15
21.1	0.0000	0	0.0020	1	0.0000	0
21.2	0.0209	42	0.0137	7	0.0182	8
22	0.0094	19	0.0039	2	0.0068	3
22.2	0.0283	57	0.0275	14	0.0341	15
23	0.0015	3	0.0020	1	0.0000	0
23.2	0.0397	80	0.0412	21	0.0227	10
24	0.0030	6	0.0000	0	0.0023	1
24.2	0.0482	97	0.0373	19	0.0341	15
25	0.0005	1	0.0000	0	0.0000	0
25.2	0.0407	82	0.0510	26	0.0432	19
26	0.0015	3	0.0000	0	0.0000	0
26.2	0.0586	118	0.0608	31	0.0432	19
27	0.0005	1	0.0000	0	0.0000	0
27.2	0.0765	154	0.0667	34	0.0000	0
28	0.0015	3	0.0000	0	0.0841	37
28.2	0.0755	152	0.0922	47	0.0841	37
29	0.0015	3	0.0000	0	0.0000	0
29.2	0.0611	123	0.0745	38	0.0523	23
30	0.0005	1	0.0000	0	0.0023	1
30.2	0.0427	86	0.0373	19	0.0636	28
30.3	0.0005	1	0.0000	0	0.0000	0
31	0.0015	3	0.0020	1	0.0000	0
31.2	0.0248	50	0.0196	10	0.0273	12
32	0.0000	0	0.0020	1	0.0000	0
32.2	0.0114	23	0.0118	6	0.0227	10
33	0.0020	4	0.0000	0	0.0091	4
33.2	0.0045	9	0.0118	6	0.0045	2
34	0.0035	7	0.0020	1	0.0023	1
34.2	0.0015	3	0.0020	1	0.0000	0
35.2	0.0020	4	0.0020	1	0.0000	0
36	0.0000	0	0.0020	1	0.0023	1
Het		0.938		0.941		0.949
PIC		0.950		0.940		0.950
PD		0.994		0.991		0.990
PE		0.874		0.880		-
pM		0.006		0.009		0.010

wowano tak wielu alleli o tak korzystnym dla celów genetyki sądowej rozkładzie częstości. Zgodnie z oczekiwaniami dla locus SE33 obserwowano bardzo wysokie wartości parametrów statystycznych jak: PIC (zawartość informacji polimorficznej), Het (obserwowana heterozygotyczność), PD (siła dyskryminacji), PE (Power of exclusion – siła wykluczenia) czy pM (prawdopodobieństwo przypadkowej zgodności) potwierdzających jego ogromną

przydatność do celów identyfikacyjnych (tab. I). Najwyższe wartości siły dyskryminacji (PD), a tym samym najmniejsze wartości przypadkowej zgodności (pM) uzyskano dla populacji z Polski północnej A. Wynosiły one odpowiednio 0,994 i 0,006 i potwierdzają ogromną przydatność tego locus do celów identyfikacji śladów biologicznych, w tym interpretacji złożonych profili DNA w postaci ich mieszanin.

PIŚMIENNICTWO

1. Ghosh A., Seshadri M.: Forensic assessment of ACTBP2 (SE33) microsatellite. *J Forensic Sci* 2003, 48: 1195-1196.

2. Dauber E. M., Schwartz-Jungl E. M., Wenda S., Dorner G., Glock B., Mayr W. R.: Further allelic variation at the STR-loci ACTBP2 (SE33), D3S1358, D8S1132, D18S51 and D21S11 *Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series*. 2009, 1: 41-42.

3. *Advanced Topics In Forensic DNA Typing: Methodology* John M. Butler, Elsevier 2012.

4. Müller K., Klein R., Miltner E., Wiegand P.: Validation of the Short Amplicon Multiplex Q8 Including the German DNA Database Systems. *J Forensic Sci*. 2009, 54: 862-865.

5. Martin P. D., Schmitter H., Schneider P. M.: A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int*. 2001, 19: 225-231.

6. Hellmann A., Zaucha M., Pawłowski R., Welz A., Hałaburda K.: Amplification of the VNTR systems HUMACTBP2 and HUMTHO1 by the polymerase chain reaction for documentation of residual recipient cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Appl. Biol. Commun.* 1996, 6, suppl. 1: 127-134.

7. Zaucha J. M., Pawłowski R., Welz A., Prejzner W., Hauser R., Hellmann A.: Ocena przyjęcia przeszczepu szpiku oraz chimeryzmu hemopoetycznego przy użyciu amplifikacji metodą PCR hiperzmiennych sekwencji typu VNTR. *Pol. Tyg. Lekarski*. 1995, 50: 73-74.

8. Ott J.: Utility programs for analysis of Genetic

Linkage, program HWE version 1.10, Rockefeller University, NY, USA.

9. Pawłowski R.: HUMFIBRA allele distribution in Northern Poland using capillary electrophoresis. *Int. J. Legal Med.* 1999, 112: 139-141.

10. Pawłowski R., Maciejewska A.: The forensic validation of multiplex containing nine STRs – population genetics in Northern Poland. *Int. J. Legal Med.* 2000, 114: 45-49.

11. Pawłowski R., Maciejewska A., Paszkowska R., Welz A.: Frequencies of the five short tandem repeat systems (STR) in a population from North Poland. *Int. J. Legal Med.* 1997, 110: 10-13.

12. Ott J.: Utility programs for analysis of Genetic Linkage, program CONTING v. 2.36, Rockefeller University, NY, USA.

13. Excoffier L., Laval G., Schneider S.: Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online* 2005, 1: 47-50.

14. Janica J., Pepiński W., Skawrońska M., Niemcunowicz-Janica A., Koc-Żórawska E.: Polimorfizm 10 autosomalnych loci STR w populacji Podlasia – rozszerzenie typowego panelu badawczego. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2007, 57: 248-251.

15. Wysocka J., Kapińska E., Cybulska L., Rębała K., Szczerkowska Z.: Identyfikacja osobnicza w oparciu o analizę 11 polimorficznych loci DNA typu STR. *Badania populacji Polski północnej z wykorzystaniem zestawu AmpFISTR SEfiler TM Kit*, *Ann. Acad. Med. Gedan.* 2008, 38: 91-96.

16. Pawłowski R., Maciejewska A., Paszkowska R. and Welz A.: The current status of forensic DNA analysis in Poland. *Proceedings from the First*

European Symposium on Human Identification. 1996: 116-125.

17. Davis C., Ge J., King J., Malik N., Weirich V. Eisenberg A. J., Budowle B.: Variants observed for STR locus SE33: A concordance study. *Forensic Sci. Int: Genetics* 2012, 6: 494-497.

18. Butler J. M., Hill C. R., Kline M. C., Bastisch I., Weirich V., McLaren R. S., Storts D. R: SE33 variant alleles: sequences and implications. *Forensic Sci. Int. Genet.*: 2011, Suppl. Ser. 3: e502-e503.

Adres do korespondencji:

Zakład Medycyny Sądowej GUMed,

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

e-mail: Richard@gumed.edu.pl (R. Pawłowski)

Krzysztof Rębała, Iosif S. Tsybovsky¹, Alexei I. Mikulich², Zofia Szczerkowska

Identyfikacja polimorfizmu typu Y-SNP w genie USP9Y i jego znaczenie w genotypowaniu alleli locus M46

Identification of a novel Y-SNP in the USP9Y gene and its impact on genotyping alleles of the M46 locus

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

¹ Z Centrum Ekspertyz Sądowych i Kryminalistyki, Mińsk, Białoruś

² Z Zakładu Antropologii i Ekologii Instytutu Historii Narodowej Akademii Nauk, Mińsk, Białoruś

Markery SNP chromosomu Y skupiają coraz większe zainteresowanie genetyków sądowych, jednak z uwagi na fakt, że stanowią one warianty charakterystyczne dla pochodzenia etnicznego, konieczne są bardzo szczegółowe badania populacyjne. W toku badań nad częstością haplogrupy N-M46 w populacji białoruskiej allel zmutowany zaobserwowano u 22 mężczyzn, spośród których jeden wyróżnił się nietypowym układem alleli Y-STR. Sekwencjonowanie locus M46 tego mężczyzny wykazało obecność nowego, nieopisanego dotąd polimorfizmu Y-SNP w pobliżu locus M46, który odpowiadał za błędne przypisanie do haplogrupy N-M46. W pracy omówiono wpływ tego polimorfizmu na genotypowanie alleli locus M46 różnymi metodami oraz zaproponowano rozwiązania zapewniające poprawność uzyskiwanych wyników.

Y-chromosomal SNP markers are becoming increasingly more popular among forensic geneticists, but since they constitute variants specific to the ethnic origin, detailed population studies are required. Research into frequency of haplogroup N-M46 in the Belarusian population detected a mutated allele in 22 males, including one with a very distinct Y-STR haplotype. Sequencing of the M46 locus of this individual revealed the presence of a novel Y-SNP nearby the M46 locus, which was responsible for the erroneous assignment of the Y chromosome to the haplogroup N-M46. An impact of the identified polymorphism on discrimination of alleles of the M46 locus with various techniques was discussed, and solutions ensuring correctness of the genotyping results were proposed.

Słowa kluczowe:

chromosom Y, polimorfizm SNP,
haplogrupa N-M46, populacja białoruska

Key words:

Y chromosome,
single nucleotide polymorphism,
haplogroup N-M46, Belarusian population

WSTĘP

Markery sprzężone z chromosomem Y stosowane są w wykrywaniu i różnicowaniu materiału genetycznego pochodzącego od mężczyzn [1] w śladach biologicznych zawierających mieszaninę DNA osób obu płci, często spotykanych w przypadku przestępstw na tle seksualnym. Wykorzystuje się je również w ustalaniu pokrewieństwa między mężczyznami, w tym w dochodzeniu spornego ojcostwa, kiedy domniemany ojciec jest nieosiągalny i możliwa jest analiza DNA jego krewnych w linii męskiej. Spośród licznych markerów zlokalizowanych na tym chromosomie, największe zastosowanie w praktyce medyczno-sądowej znalazły markery mikrosatelitarne, jednakże uwaga genetyków sądowych coraz bardziej zwraca się w stronę polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP). Jako że ogromna większość markerów typu SNP jest efektem pojedynczej mutacji punktowej, która zaszła w czasie ewolucji gatunku ludzkiego, chromosomy Y o identycznej mutacji punktowej zazwyczaj mają wspólne pochodzenie i określane są mianem haplogrupy. Mimo stosunkowo niskiej siły dyskryminacji markery typu Y-SNP stanowią wartościowy i prosty w uzy-

skaniu i interpretacji dowód wykluczenia pokrewieństwa porównywanych osób lub popełnienia przestępstwa przez podejrzanego w sprawie karnej. Wielką zaletą analizy markerów SNP jest możliwość detekcji dużo mniejszych fragmentów DNA, co znajduje zastosowanie w przypadku silnego zdegradowania materiału biologicznego [2]. Haplogrupy chromosomu Y definiowane przez markery typu SNP nie są przypadkowo rozmieszczone wśród populacji ludzkich, stanowiąc warianty charakterystyczne dla pochodzenia etnicznego, co w genetyce sądowej znajduje potencjalne zastosowanie, np. w przewidywaniu pochodzenia sprawcy przestępstwa [1].

Jedną z haplogrup częściej oznaczanych w populacjach europejskich jest haplogrupa N-M46, którą charakteryzuje polimorfizm markera M46 (znanego również jako Tat lub rs34442126), zlokalizowanego w intronie 28 genu USP9Y (proteazy specyficznej dla ubikwityny 9) w locus Yq11.21 w postaci transycji USP9Y g.101203T>C. Mutacja ta pojawiła się przypuszczalnie ok. 12 000 lat temu w północnych Chinach, skąd rozprzestrzeniła się na całą północną Eurazję. W Europie z dużą częstością występuje w północno-wschodniej części kontynentu wśród ludów ugrofińskich i bałtyckich [3]. W Polsce należy do niej ok. 4% mężczyzn [4]. Jako że haplogrupa N-M46 występuje z dużą częstością w populacjach ugrofińskich i bałtyckich, zaś jest znacznie rzadsza u Słowian [5], stanowi ona potencjalny marker substratu ugrofińskiego i bałtyckiego w populacjach słowiańskich.

Metodą często stosowaną w genotypowaniu alleli locus M46 jest technika PCR-RFLP. Polega ona na amplifikacji fragmentu DNA obejmującego badany polimorfizm przy użyciu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) i trawieniu produktu amplifikacji enzymem restrykcyjnym Hsp92II lub jego izoschizomerem NlaIII, które specyficznie rozpoznają i tną sekwencję CATG, charakterystyczną dla allelu niezmutowanego M46*T. Sekwencja CACT, obecna w przypadku allelu zmutowanego M46*C, nie jest rozpoznawana przez wspomniane enzymy i pozostaje nietknięta, co w badaniach populacyjnych uwidacznia się jako polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) [4].

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił DNA pochodzący od

196 niespokrewnionych mężczyzn z populacji białoruskiej [5]. Allele locus M46 genotypowano metodą PCR-RFLP z użyciem starterów opisanych w pracy Kaysera i wsp. [4] oraz endonukleazy Hsp92II. Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w żelach poliakrylamidowych i barwiono srebrem. Dodatkowo u badanych osób oznaczono polimorfizm 22 loci Y-STR: DYS19, DYS388, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS426, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS460, DYS635, GATA H4.1, DYS385 a/b, YCAII a/b [5, 6]. Jednokrokowe mutacje dzielące poszczególne haplotypy przedstawiono graficznie w oparciu o program komputerowy NETWORK 4.6 (Fluxus Technology), obliczając sieć typu „median-joining network”. System DYS389 analizowano jako dwa niezależne loci: DYS389I i DYS389II-I, zaś w przypadku systemów DYS385 i YCAII allele przypisano różnym loci w zależności od wielkości allelu. Wybrane produkty PCR oczyszczono i poddano sekwencjonowaniu zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [7], zaś uzyskane sekwencje porównano z sekwencją referencyjną NC_000024, zdeponowaną w internetowej bazie danych amerykańskiego Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej (NCBI). Przynależność haplogrupową badanego haplotypu Y-STR określono przy użyciu bayesowskiego algorytmu wykorzystującego różnice w częstościach alleli w poszczególnych haplogrupach [8].

WYNIKI

Na 196 mężczyzn z populacji białoruskiej, u których oznaczono polimorfizm locus M46 metodą PCR-RFLP, w przypadku 22 próbek DNA (11,2%) produkt PCR nie ulegał trawieniu przez restryktazę Hsp92II, co sugerowało obecność allelu zmutowanego M46*C i przynależność do haplogrupy N-M46. Analiza wyników genotypowania markerów mikrosatelitarnych chromosomu Y wykazała jednak, iż jeden ze wspomnianych mężczyzn, pochodzący z rejonu Połocka w północnej Białorusi, wyróżniał się nietypowym układem alleli Y-STR, wyraźnie odległym od haplotypów pozostałych mężczyzn. Przykładowo wszyscy badani mężczyźni z haplogrupy N-M46 posiadali identyczne allele w systemie YCAII (YCAII*18,20), który to system charakteryzuje się niską częstością mutacji [9], podczas gdy

wyróżniający się chromosom Y posiadał w tym systemie allele YCAII*21,21 (tabela 1). Wyjątkowy zestaw alleli Y-STR u wspomnianego mężczyzny z haplogrupy N-M46 potwierdziła również sieć typu „median-joining network“ (ryc. 1).

Locus M46 tego mężczyzny poddano sekwencjonowaniu, które wykazało allel niezmutowany M46*T i wykluczyło przynależność badanego chromosomu do haplogrupy N-M46. Stwierdzono u niego natomiast nowy, nieopisany dotąd polimorfizm w pobliżu locus M46 w miejscu rozpoznawanym przez enzym Hsp92II w postaci transwersji USP9Y g.101201C>G. Polimorfizm ten tworzy w miejscu restrykcyjnym sekwencję GATG nierozpoznawaną przez enzym, co skutkowało brakiem trawienia

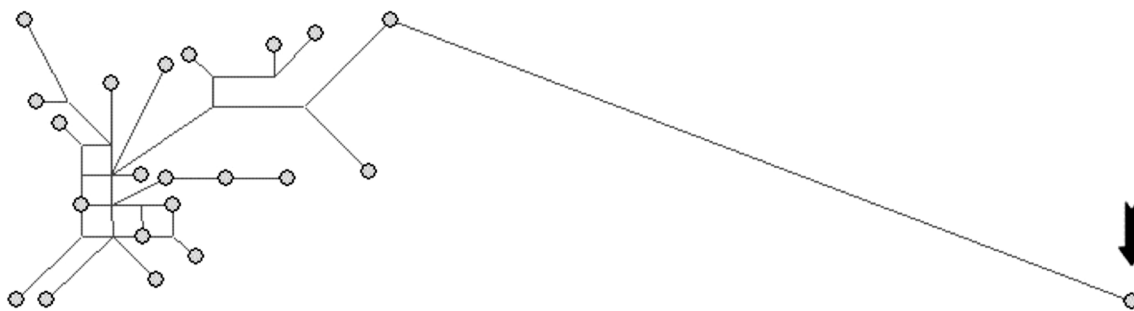
i błędnym przypisaniem do haplogrupy N-M46.

Analiza występowania alleli Y-STR oznaczonych u badanego mężczyzny w różnych haplogrupach wykazała, iż mężczyzna ten z prawdopodobieństwem wyliczonym metodą bayesowską równym 100,0% należy do haplogrupy I-P37.2*(xM26). W związku z tym rzeczywista częstość haplogrupy N-M46 wśród 196 badanych Białorusinów była nieco niższa, niż wskazywały to wyniki analizy PCR-RFLP, i wynosiła 10,7%. Jako że badana osoba pochodziła z północnej Białorusi, rzeczywista częstość tej haplogrupy wśród 53 mężczyzn z tego regionu wynosiła 17,0%, nie zaś 18,9%, jak sugerowały to wcześniejsze doniesienia [5].

Tabela 1. Haplotypy Y-STR 22 mężczyzn z populacji białoruskiej, u których nie stwierdzono trawienia locus M46 enzymem restrykcyjnym Hsp92II.

Table 1. Y-STR haplotypes of 22 males from the Belarusian population, for which no digestion of the M46 locus with Hsp92II restriction enzyme was observed.

Lp.	DYS 19	DYS 388	DYS 389I	DYS 389II-I	DYS 390	DYS 391	DYS 392	DYS 393	DYS 426	DYS 437	DYS 438	DYS 439	DYS 448	DYS 456	DYS 458	DYS 460	DYS 635	GATA H4.1	DYS 385	YCAII
1.	14	12	13	15	23	11	14	13	11	14	10	10	19	14	17	12	21	21	11,13	18,20
2.	14	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	22	21	11,13	18,20
3.	14	12	13	16	24	10	14	13	11	14	10	10	19	16	16	11	23	21	11,15	18,20
4.	14	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	19	11	22	21	11,13	18,20
5.	14	12	14	18	24	11	14	13	11	14	10	10	19	16	16	11	23	20	11,13	18,20
6.	15	11	13	16	23	12	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	21	21	11,13	18,20
7.	15	12	13	16	23	10	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	21	21	11,11	18,20
8.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	13	17	12	22	21	11,13	18,20
9.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	21	21	11,14	18,20
10.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	17	11	22	20	11,14	18,20
11.	15	12	13	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	18	11	21	20	11,14	18,20
12.	15	12	14	16	23	11	14	13	11	14	10	10	19	14	17	11	22	21	11,13	18,20
13.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	19	14	18	11	22	22	10,13	18,20
14.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	20	15	16	12	24	21	11,14	18,20
15.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	20	16	15	11	23	21	11,13	18,20
16.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	10	20	17	16	12	23	21	11,14	18,20
17.	15	12	14	16	23	11	14	14	11	14	10	11	19	13	17	12	22	21	11,13	18,20
18.	15	12	14	16	23	11	15	14	11	14	10	10	19	13	18	10	22	21	11,13	18,20
19.	15	12	14	16	24	10	14	14	11	14	10	10	19	13	18	10	21	21	11,13	18,20
20.	15	12	14	17	23	10	14	15	11	14	10	10	19	13	17	11	22	21	11,13	18,20
21.	15	12	14	17	23	11	14	14	11	14	10	11	19	13	17	12	23	21	11,13	18,20
22.	17	13	13	19	24	10	11	13	11	15	10	12	20	15	18	10	23	20	11,15	21,21



Ryc. 1. Sieć typu „median-joining network” haplotypów obejmujących 22 loci Y-STR, oznaczone u 22 mężczyzn z populacji białoruskiej, u których nie stwierdzono trawienia locus M46 enzymem restrykcyjnym Hsp92II. Strzałka wskazuje mężczyznę o nietypowym układzie alleli Y-STR.

Fig. 1. Median-joining network of haplotypes involving 22 Y-STR loci, genotyped in 22 males from the Belarusian population, in which no digestion of the M46 locus with Hsp92II restriction enzyme was observed. An arrow indicates an individual with a distinct Y-STR haplotype.

DYSKUSJA

Spośród 196 badanych osób z populacji białoruskiej nowo zidentyfikowany polimorfizm Y-SNP zaobserwowano zaledwie u jednego mężczyzny (0,5%), zatem faktyczna częstość tego wariantu u Białorusinów w badaniach populacyjnych na większą skalę może okazać się bardzo niewielka. Polimorfizm ten może okazać się częstszy w populacjach, w których z dużą częstością występuje haplogrupa I-P37.2*(xM26), jednak potwierdzenie tego wymaga dodatkowych badań.

Mimo że częstość tego polimorfizmu w różnych populacjach europejskich pozostaje nieznaną, wyniki naszych badań wskazują, że może on być przyczyną błędów w oznaczaniu haplogrupy N-M46 przy użyciu opisaną w niniejszej pracy, często stosowanej metody PCR-RFLP z użyciem enzymów restrykcyjnych Hsp92II lub NlaIII. Problem ten w prosty sposób eliminuje weryfikacja obecności allelu zmutowanego M46*C poprzez trawienie restryktazą Maell, rozpoznającą sekwencję ACGT [10] (dla allelu niezmutowanego M46*T charakterystyczna jest sekwencja ATGT, nierozpoznawana przez ten enzym).

Polimorfizm ten może również utrudniać dyskryminację alleli locus M46 w przypadku coraz bardziej popularnej techniki opartej na reakcji PCR w czasie rzeczywistym (qPCR), np. z użyciem sond

TaqMan. Miejsce polimorficzne wykrywane przez taką sondę zazwyczaj umiejscowione jest w środkowej części sondy i dodatkowy polimorfizm SNP w pobliżu badanego miejsca może obniżać wydajność wiązania się sondy do rozpoznawanej sekwencji i utrudniać oznaczenie genotypu.

W celu zapobieżenia błędom w genotypowaniu alleli locus M46 przydatne może być jednoczesne oznaczanie innych markerów Y-SNP, które potwierdzają pozycję badanego chromosomu Y na drzewie filogenetycznym, np. LLY22g, ponieważ wszyscy mężczyźni z haplogrupy N-M46 posiadają również zmutowany allel w tym markerze [11]. W naszym przypadku w wykryciu błędu w genotypowaniu pomocne byłoby również np. oznaczenie markera P37.2, jako że opisany w niniejszej pracy chromosom Y najprawdopodobniej należy do haplogrupy I-P37.2*(xM26). Marker M46 można również w przyszłości zastąpić markerem P105, gdyż mutacje w obu markerach obserwowane są zawsze razem [11]. Genotypowanie alleli locus P105 (zamiast locus M46) coraz częściej wykorzystywane jest w badaniach populacyjnych [12].

Innym rozwiązaniem, które zastosowano w niniejszym przypadku, jest dodatkowe oznaczenie haplotypu Y-STR w celu oszacowania przynależności haplogrupowej badanego mężczyzny przy użyciu dostępnych algorytmów [8, 13]. Na przydatność zależności pomiędzy przynależnością haplogrupową

a haplotypem Y-STR w kontroli poprawności analiz genetycznych w medycynie sądowej zwrócili uwagę Woźniak i wsp. [14].

Nasze badania wykazały częstość haplogrupy N-M46 w populacji białoruskiej na poziomie 10,7% i są w zgodzie z wynikami badań Kushniarevich i wsp. [15] na grupie 574 Białorusinów, wśród których do haplogrupy tej należało 9,6% badanych mężczyzn. Również wyższą częstość tej haplogrupy w północnej Białorusi (17,0%) w stosunku do środkowej i południowej części kraju (odpo-

wiednio 8,8% i 8,1%) [5] potwierdzają wyniki badań wspomnianych autorów [15], którzy zaobserwowali najwyższą częstość tej haplogrupy w północnej i zachodniej Białorusi w dorzeczu Dźwiny i Niemna (odpowiednio 14,7% i 12,0%), a więc w regionach graniczących z Łotwą i Litwą, krajami zamieszkanymi przez ludność mówiącą językami bałtyckimi. Potwierdza to przydatność haplogrupy N-M46 jako markera substratu bałtyckiego w populacjach słowiańskich.

PIŚMIENNICTWO

1. Jobling M. A.: Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.* 2001, 118: 158-162.

2. Bąbol-Pokora K., Prośniak A., Jacewicz R., Berent J.: Przydatność markerów SNP do analiz materiału biologicznego o wysokim stopniu degradacji. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2009, 59: 118-123.

3. Rootsi S., Zhivotovsky L. A., Baldovič M., Kayser M., Kutuev I. A., Khusainova R., Bermisheva M. A., Gubina M., Fedorova S. A., Ilumäe A. M., Khusnutdinova E. K., Voevoda M. I., Osipova L. P., Stoneking M., Lin A. A., Ferak V., Parik J., Kivisild T., Underhill P. A., Villems R.: A counter-clockwise northern route of the Y-chromosome haplogroup N from Southeast Asia towards Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 2007, 15: 204-211.

4. Kayser M., Lao O., Anslinger K., Augustin C., Bargel G., Edelman J., Elias S., Heinrich M., Henke J., Henke L., Hohoff C., Illing A., Jonkisz A., Kuzniar P., Lebioda A., Lessig R., Lewicki S., Maciejewska A., Monies D. M., Pawłowski R., Poetsch M., Schmid D., Schmidt U., Schneider P. M., Stradmann-Bellinghausen B., Szibor R., Wegener R., Wozniak M., Zoledziwska M., Roewer L., Dobosz T., Ploski R.: Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political borders, as revealed by Y-chromosome analysis. *Hum. Genet.* 2005, 117: 428-443.

5. Rębała K., Mikulich A. I., Tsybovsky I. S., Siváková D., Džupinková Z., Szczerkowska-Dobosz A., Szczerkowska Z.: Y-STR variation among Slavs:

evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin. *J. Hum. Genet.* 2007, 52: 406-414.

6. Rębała K., Tsybovsky I. S., Bogacheva A. V., Kotova S. A., Mikulich A. I., Szczerkowska Z.: Forensic analysis of polymorphism and regional stratification of Y-chromosomal microsatellites in Belarus. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011, 5: e17-e20.

7. Rębała K., Szczerkowska Z.: Identyfikacja bardzo krótkiego allela YCAII w populacji północnej Polski. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2004, 54: 17-24.

8. Athey T. W.: Haplogroup prediction from Y-STR values using an allele-frequency approach. *J. Genet. Geneal.* 2006, 2: 34-39.

9. Quintana-Murci L., Semino O., Poloni E. S., Liu A., van Gijn M., Passarino G., Brega A., Nasidze I. S., Maccioni L., Cossu G., Al-Zahery N., Kidd J. R., Kidd K. K., Santachiara-Benerecetti A. S.: Y-chromosome specific YCAII, DYS19 and YAP polymorphisms in human populations: a comparative study. *Ann. Hum. Genet.* 1999, 63: 153-166.

10. Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A., Kayser M., Roewer L., Santos F. R., Schiefenhövel W., Fretwell N., Jobling M. A., Harihara S., Shimizu K., Semjiddmaa D., Sajantila A., Salo P., Crawford M. H., Ginter E. K., Evgrafov O. V., Tyler-Smith C.: Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 1997, 60: 1174-1183.

11. Karafet T. M., Mendez F. L., Meilerman M. B., Underhill P. A., Zegura S. L., Hammer M. F.: New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 2008, 18: 830-838.

12. Martínez-Cruz B., Ziegle J., Sanz P., Sotelo G., Anglada R., Plaza S., Comas D., Genographic Consortium: Multiplex single-nucleotide polymorphism typing of the human Y chromosome using TaqMan probes. *Investig. Genet.* 2011, 2: 13.

13. Schlecht J., Kaplan M. E., Barnard K., Karafet T., Hammer M. F., Merchant N. C.: Machine-learning approaches for classifying haplogroup from Y chromosome STR data. *PLoS Comput. Biol.* 2008, 4: e1000093.

14. Woźniak M., Grzybowski T., Starzyński J.,

Papuga M., Stopińska K., Łuczak S.: Zależności pomiędzy przynależnością haplogrupową a haplotypem Y-STR jako potencjalny element kontroli poprawności analiz w medycynie sądowej. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2006, 56: 155-164.

15. Kushniarevich A. I., Sivitskaya L. N., Danilenko N. G., Kozhukh G. K., Tsybovsky I. S., Villems R., Davydenko O. G.: Y chromosome gene pool of Belarusians – clues from biallelic markers study. *Dokl. Nac. Akad. Nauk Belarusi.* 2007, 51: 100-105.

Adres do korespondencji:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębowa 23
80-204 Gdańsk
k.rebala@gumed.edu.pl

Tomasz Gos, Zbigniew Jankowski

Samobójstwo a depresja w świetle pośmiertnej oceny zaburzeń aktywności neuronalnej

Suicide and depression in the postmortem evaluation of disturbed neuronal activity

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

W pracy omówiono wyniki własnych badań neurohistologicznych metodą AgNOR dotyczących oceny zaburzeń aktywności struktur mózgu ważnych w patofizjologii depresji. Wyniki te wskazywały pośrednio na przewlekłe zaburzenia aktywności transkrypcyjnej rybosomalnego DNA w neuronach limbicznej kory przedczołowej, ciała migdałowego, gałki bladej bocznej i serotonergicznego jądra grzbietowego szwu. Wpływ procesów prowadzących do samobójstwa został wyraźnie zaakcentowany w przeciwieństwie do słabo zaznaczonej różnicy pomiędzy depresją jedno- i dwubiegunową. Uzyskane wyniki potwierdzają pogląd, że procesy te i depresja to zjawiska patologiczne o częściowo odrębnej neurobiologii. Wyniki te mogą mieć znaczenie także dla medycyny sądowej.

The authors have reviewed the results of their post-mortem neurohistological investigations related to the evaluation of impaired activity of brain structures relevant to pathophysiology of depression. Chronic changes in ribosomal DNA transcriptional activity have been indirectly suggested by the AgNOR staining method in neurons of the prefrontal limbic regions, the amygdala, the external globus pallidus, and the serotonergic dorsal raphe nucleus. The impact of processes leading to suicide has been clearly accentuated in contrast to the weak influence of unipolar-bipolar dichotomy. The present results support the view that suicide and depression constitute pathological phenomena with partially different neurobiology. They may be also relevant to forensic pathology.

Słowa kluczowe:

depresja, samobójstwo, biegunowość, barwienie metodą AgNOR

Key words:

depression, suicide, polarity, AgNOR staining method

WPROWADZENIE

Transkrypcja rybosomalnego DNA (rDNA) odpowiedzialna za produkcję około połowy całkowitego RNA w komórce jest miarodajnym wskaźnikiem integralności genomu, bardzo wrażliwym na czynniki uszkadzające go. Aktywność transkrypcyjna rDNA podczas interfazy może być oceniana pośrednio przy pomocy mikroskopu świetlnego dzięki pomiarom kariometrycznych parametrów AgNOR (skrót angielskiej nazwy regionu organizującego jąderko – *argyrophilic nucleolar organising region*). Są to: powierzchnia AgNOR, liczba AgNOR i wskaźnik AgNOR definiowany jako iloraz powierzchni AgNOR i powierzchni przekroju jądra komórkowego (określany także jako względna powierzchnia AgNOR). Ocena dotyczy preparatów barwionych metodą AgNOR, będącą formą uproszczonego wysrebrzenia [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7].

Ścisły związek pomiędzy zmianami morfologicznymi w jądrze komórkowym i aktywnością neuronalną został potwierdzony najnowszymi metodami badawczymi [8, 9], podobnie jak kluczowa rola transkrypcji rDNA w plastyczności neuronalnej [10] mającej znaczenie fundamentalne dla funkcji mózgu. Nie budzi więc zdziwienia fakt, że niedawne badania molekularne wykazały spadek aktywności transkrypcyjnej rDNA w zaburzeniach psychicznych [11, 12]. Szczególnie ważne jest stwierdzenie związanego z mechanizmami epigenetycznymi spadku

tej aktywności w hipokampie u cierpiących na depresję samobójców, którzy przeżyli w dzieciństwie ciężki uraz psychiczny [12].

Względnie prosta metoda barwienia AgNOR posiada ustalone miejsce w neuropatologii, przede wszystkim w ilościowej ocenie aktywności proliferacyjnej guzów nowotworowych. Metodę tę zastosowano w badaniach własnych nad depresją w celu pośredniej oceny zmian aktywności transkrypcyjnej rDNA neuronów projekcyjnych wybranych struktur mózgu [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7] (podsumowanie wyników w tab. I). Tak więc badania metodą AgNOR stanowią uzupełnienie badań sygnału spoczynkowego (ang. *resting-state signal*) metodami neuroobrazowania czynnościowego, odzwierciedlającymi przede wszystkim aktywność aferentnego unerwienia glutaminianergicznego i miejscowe przetwarzanie związanego z nią sygnału, a nie aktywność neuronów projekcyjnych w badanym obszarze [13].

Różnorodne objawy depresji (w tym zachowania samobójcze) są najprawdopodobniej związane z zaburzeniami sieci utworzonej przez wiele struktur mózgu, obejmujących przede wszystkim obszary kory przedczołowej (ang. *prefrontal cortex*, PFC), zespół hipokampa, układ prążkowiowo-gałkowy, ciało migdałowe, podwzgórze, wzgórze i monoaminoergiczne układy aktywujące pnia mózgu (przegląd w [7]). W związku z tym badania własne metodą AgNOR obejmowały obszary limbiczne PFC, ciało migdałowe, gałkę bładą boczną i serotonergiczne jądro grzbietowe szwu jako ważne komponenty tej sieci neuronalnej (ryc. 1). Badania zostały przeprowadzone na pochodzących z Magdeburgskiego Banku Mózgów (ang. *Magdeburg Brain Bank*) mózgach samobójców i niesamobójców z dobrze udokumentowanym epizodem depresyjnym w przebiegu tzw. dużej depresji (ang. *major depressive disorder*, MDD) lub choroby dwubiegunowej (ang. *bipolar disorder*, BD) w myśl kryteriów DSM IV, a więc określając skrótowo – cierpiących na depresję jedno- lub dwubiegunową oraz na mózgach osobników kontrolnych bez zaburzeń psychicznych. Celem badań była przede wszystkim ocena wpływu procesów prowadzących do samobójstwa; ocena wpływu dychotomii MDD-BD (biegunowości) była aspektem drugorzędym z punktu widzenia medycyny sądowej.

Tabela I. Sumaryczne ujęcie wyników oceny aktywności transkrypcyjnej rybosomalnego DNA (rDNA) metodą AgNOR w badanych strukturach mózgu.

Table I. Summarized results of the evaluation of ribosomal DNA (rDNA) transcriptional activity by the AgNOR method in the analysed brain structures.

Struktura mózgu Brain structure	Aktywność Activity				
	D	S	NS	MDD	BD
ACd r	→	→	→	↓*	→
ACd l	→	→	→	→	→
ACv r	↓	→	→	→	→
ACv l	→	↓	→	→	→
OFC r	→	→	↑	→	→
OFC l	→	→	→	→	→
AM r	↑	↑	→	→	→
AM l	→	→	→	→	→
EGP r	→	→	→	→	→
EGP l	↓	→	→	→	→
DRN	→	↓	→	→	→

AC – przednia część zakrętu obręczy / Anterior cingulate

ACd – część grzbietowa / Dorsal part

ACv – część brzuszna / Ventral part

OFC – kora oczodołowo-czołowa / Orbitofrontal cortex

AM – ciało migdałowe / Amygdala

EGP – gałka błada boczna / External globus pallidus

DRN – jądro grzbietowe szwu / Dorsal raphe nucleus

r – prawa / right

l – lewa / left

D – wszyscy chorzy na depresję / All depressed patients

S – samobójcy / Suicides

NS – niesamobójcy / Non-Suicides

MDD – jednobiegunowa / unipolar

BD – dwubiegunowa grupa diagnostyczna / bipolar subgroup of depressed patients

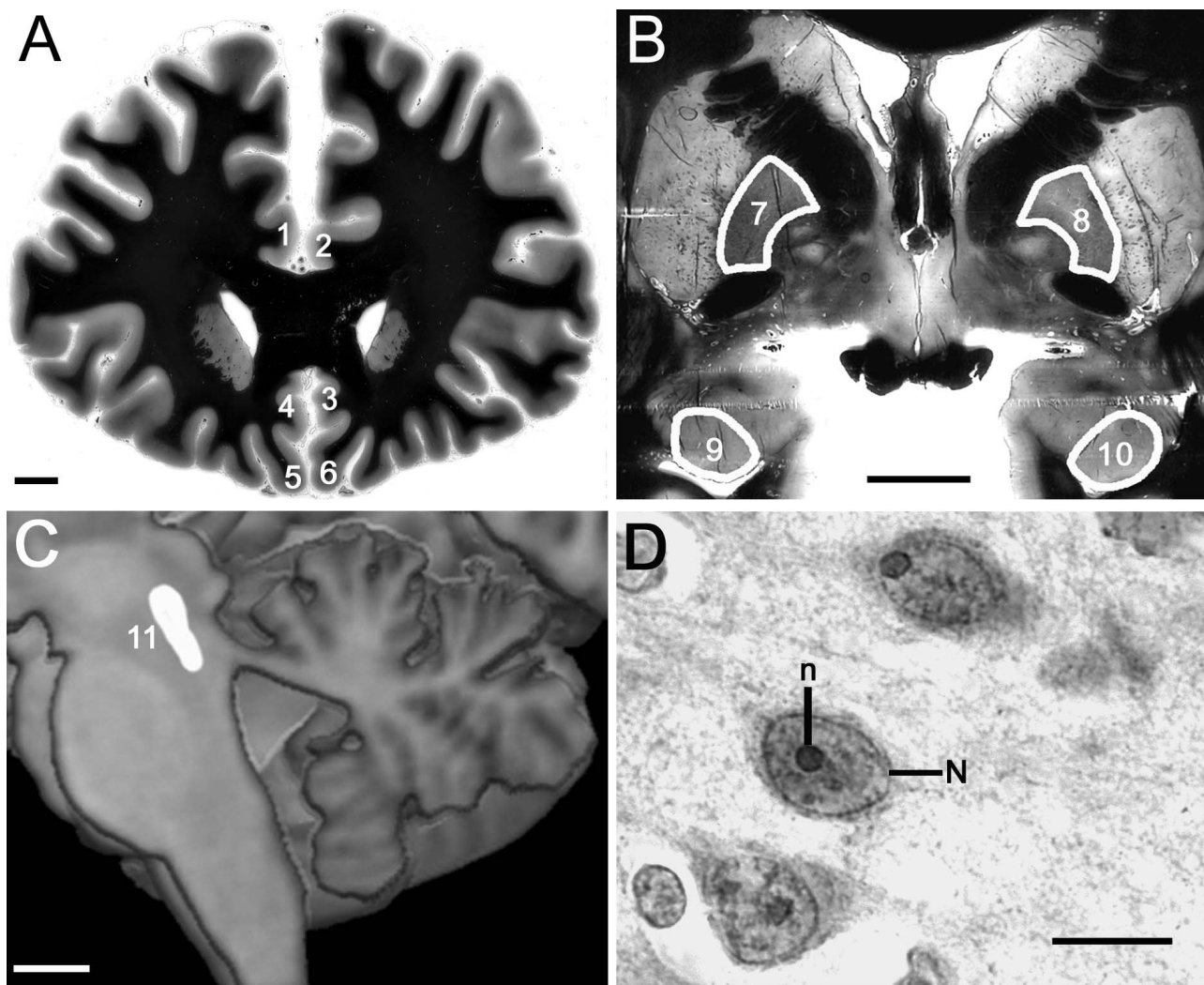
w porównaniu z grupą kontrolną: / compared with controls:

→ – niezmienniona / unchanged

↑ – podwyższona / increased

↓ – obniżona aktywność transkrypcyjna rDNA / decreased rDNA transcriptional activity

* – wyniki nieopublikowane / unpublished results



Ryc. 1. A, B, C – Badane struktury: 1 – prawa i 2 – lewa kora przedniej części zakrętu obręczy, część grzbietowa; 3 – lewa i 4 – prawa kora przedniej części zakrętu obręczy, część brzuszna; 5 – prawa i 6 – lewa kora oczodołowo-czołowa; 7 – prawa i 8 – lewa gałka biała; 9 – prawa i 10 – lewe jądro boczne ciała migdałowatego; 11 – jądro grzbietowe szwu (paski kalibracyjne 10 mm). D – Przykładowe barwienie metodą AgNOR neuronów piramidowych kory oczodołowo-czołowej, uwidaczniające wyraźnie granice jądra (N) i reprezentującego jąderko obszaru AgNOR (n) (pasek kalibracyjny 10 μ m). Różnice parametrów AgNOR były nieuchwytnie w ocenie jakościowej i mogły zostać stwierdzone jedynie przy pomocy pomiarów.

Fig. 1. A, B, C – The regions of interest: 1 – the right, and 2 – the left anterior cingulate cortex, dorsal part; 3 – the left, and 4 – the right anterior cingulate cortex, ventral part; 5 – the right, and 6 – the left orbitofrontal cortex; 7 – the right, and 8 – the left external globus pallidus; 9 – the right, and 10 – the left lateral amygdaloid nucleus; 11 – the dorsal raphe nucleus (scale bars 10 mm). D – After AgNOR staining, the borders of the nucleus (N) and the AgNOR area (representing the nucleolus) (n) are clearly visible within orbitofrontal pyramidal neurons as an example of this staining method (scale bar 10 μ m). The differences in AgNOR parameters were beyond qualitative evaluation and they could only be captured by means of quantitative measurements.

Obszary limbiczne PFC

Obszary limbiczne PFC pełnią najprawdopodobniej decydującą rolę w powstawaniu objawów depresji właściwych tylko człowiekowi (tendencji samobójczych, poczucia beznadziejności, winy, bycia bezwartościowym itp.) [2, 4]. Ten obszar limbicznej PFC, który jest określany mianem kory przedniej części zakrętu obręczy (ang. *anterior cingulate cortex*, AC) może być podzielony pod względem czynnościowym na część „afektywną”, zlokalizowaną brzusznie (ACv) i do przodu od kolana spoidła wielkiego oraz na „kognitywną” część grzbietową (ACd) [2]. Inny limbiczny obszar PFC noszący nazwę kory oczodołowo-czołowej (ang. *orbitofrontal cortex*, OFC) jest zaangażowany w ocenę znaczenia emocjonalnego różnych bodźców sensorycznych jak również konsekwencji związanych z działaniami pod ich wpływem [4]. Liczne i różnorodne badania neuropatologiczne i obrazowe udowodniły znaczenie zaburzeń tych obszarów korowych w patofizjologii depresji [2, 4].

Zarówno w AC jak i OFC zostały stwierdzone odchylenia parametrów AgNOR w najważniejszych neuronach projekcyjnych (tj. w komórkach piramidowych warstwy V kory) związane przede wszystkim z procesami prowadzącymi do samobójstwa i w znacznie mniejszym stopniu z biegunowością [2, 4, 7]. Ponadto OFC była jedyną z badanych struktur mózgu, w której zaznaczył się wyraźnie pozytywny, przeciwdziałający samobójstwu efekt leków psychotropowych (neuroleptyków) [4]. W uzupełnieniu badań metodą AgNOR, ostatnie badania własne markerów układu GABAergicznego [14, 15, 16] i aktywacji mikrogleju [17] w obszarach PFC potwierdziły pogląd o dominującym wpływie procesów prowadzących do samobójstwa na ilościowe zmiany neurohistologiczne stwierdzane w depresji.

Ciało migdałowe

Ciało migdałowe posiada silne wzajemne połączenia z omówionymi obszarami limbicznymi PFC. Odgrywa ono zasadniczą rolę w powstawaniu emocji a jego jądro boczne (ang. *lateral amygdaloid nucleus*, La) jest strukturą, w której zachodzą zmiany plastyczne w neuronach projekcyjnych mające kluczowe znaczenie dla powstawania pamięci z komponentą emocjonalną. Zaburzenia ciała migdałowego w depresji zostały potwierdzone licznymi bada-

niami neuroobrazowymi i w porównaniu z nimi ilość badań neuropatologicznych jest skąpa. Wykazano kluczową rolę tej struktury, także w powstawaniu agresji zarówno skierowanej na otoczenie jak i ksobnej, na co wskazują m.in. badania molekularne zaburzeń ekspresji genów w ciele migdałowatym samobójców [6].

W sposób odpowiadający doniesieniom opartym na innej metodyce, wyniki badań własnych metodą AgNOR wskazywały, że u chorych na depresję występował wzrost aktywności transkrypcyjnej rDNA w neuronach projekcyjnych prawego La. Analiza statystyczna *post hoc* wykazała jednak, że efekt ten był spowodowany wzrostem aktywności jedynie w grupie samobójców bez żadnego wpływu biegunowości. Co więcej, stwierdzono właściwą dla grupy samobójców oraz dla grupy pacjentów jedno-biegunowych silną, dodatnią korelację pomiędzy wielkością jądra komórkowego neuronów projekcyjnych La i komórek piramidowych badanych obszarów PFC po stronie prawej [6]. Tak więc wyniki badań własnych korespondowały z wynikami czynnościowego neuroobrazowania depresji, także w zakresie potwierdzenia zaburzeń w oddziaływaniu pomiędzy korą przedczołową a ciałem migdałowatym.

Gałka biała boczna

Układ prążkowiowo-gałkowy stanowiący największą część jąder podstawy wchodzi w skład złożonych obwodów podkorowo-korowych (limbiczno-korowo-prążkowiowo-gałkowo-wzgórzowych) stanowiących sieci neuronalne zaangażowane w modulację nastroju, funkcji poznawczych i zachowania. Anatomiczno-czynnościowe właściwości tego układu powodują, że wszystkie jego części (limbiczna, asocjacyjna i zuciowo-ruchowa) uczestniczą w przetworzeniu motywacji na działanie. Gałka biała boczna (ang. *external globus pallidus*, EGP) ma odgrywać najistotniejszą rolę integrującą i przewodzącą w układzie prążkowiowo-gałkowym naczelnym, w tym człowieka. Jednakże ilość doniesień na temat odchyień w gałce białej w zaburzeniach afektywnych jest skąpa w porównaniu z publikacjami dotyczącymi innych struktur mózgu, a ponadto eksponują one znaczenie przede wszystkim części limbicznej układu prążkowiowo-gałkowego [5].

Badania własne metodą AgNOR wskazywały na spadek aktywności transkrypcyjnej rDNA w dużych

neuronach projekcyjnych części czuciowo-ruchowej lewej EGP u wszystkich chorych w porównaniu z osobnikami kontrolnymi. Znamienne, że efekt ten nie dotyczył w sposób wybiórczy żadnej z analizowanych grup, tj. był niezależny od procesów prowadzących do samobójstwa czy biegunowości [5]. Aktywacja EGP prowadzi najprawdopodobniej pośrednio do wzrostu aktywności obszarów kory nowej poprzez odhamowanie pobudzających połączeń wzgórzowo-korowych. Oznacza to, że spadek aktywności EGP występujący prawdopodobnie w depresji i chorobie Parkinsona może powodować zjawisko odwrotne. Obniżona aktywność obszarów kory nowej stwierdzana w obu stanach chorobowych wydaje się potwierdzać tę hipotezę [5].

Jądro grzbietowe szwu

Zaburzenia ośrodkowego układu serotonergicznego implikują etiologię depresji, agresji, impulsywności i procesów prowadzących do samobójstwa. Mogą one być niezależnym od zasadniczego zaburzenia psychicznego czynnikiem zachowania samobójczego, na które składają się jako tzw. endofenotypy m.in. autoagresywność i impulsywność. Dysfunkcja może być ograniczona do niewielkiej struktury mózgu, jaką jest należące do kompleksu serotonergicznego jądro szwu, znajdujące się w śródmózgowiu i moście jądro grzbietowe szwu (ang. *dorsal raphe nucleus*, DRN), mające wpływ na złożone sieci neuronalne. Znaczenie jego zaburzeń w procesach prowadzących do samobójstwa wykazały liczne badania pośmiertne [1, 3].

W badaniach własnych metodą AgNOR stwierdzono cechy obniżonej aktywności transkrypcyjnej rDNA w neuronach DRN jedynie u samobójców niezależnie od grupy diagnostycznej. Wskazując na obniżoną aktywność serotonergiczną, były to wyniki zgodne z wcześniejszymi doniesieniami. W sposób przekonujący został wykazany wpływ pozio-

mu autoagresywności w akcie samobójczym [3], potwierdzony przez dalsze badania własne dotyczące oceny immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej w neuronach miejsca sinawego jako kluczowej struktury noradrenergicznego układu aktywującego [18]. Były to pierwsze doniesienia, w których przedstawiono możliwość oceny poziomu autoagresywności w oparciu o pośmiertne badania morfologiczne struktur mózgu. Samobójstwo o nasilonym poziomie autoagresywności (ang. *violent suicide*) prowadzi do uszkodzeń, których interpretacja może nastroczać trudności z sądowo-lekarskiego punktu widzenia. Oznacza to potencjalne znaczenie ilościowych badań neurohistologicznych mózgu dla różnicowania pomiędzy samobójstwem, zabójstwem i zgonem wypadkowym, co stanowi w medycynie sądowej problem podstawowy, lecz nie do końca rozwiązany.

WNIOSKI

Metoda AgNOR okazała się skuteczna w odniesieniu do pośmiertnych badań zaburzeń afektywnych. Ich wyniki potwierdzają pogląd, że depresja i procesy prowadzące do samobójstwa to stany chorobowe mózgu o częściowo odrębnej neurobiologii. Wskazują one również, że depresja jedno- i dwubiegunowa posiadają odmienne podłoże neurobiologiczne. Wpływ biegunowości był jednak znacznie słabszy niż procesów prowadzących do samobójstwa. Okazało się, że leki psychotropowe (w tym przeciwdepresyjne i typowe neuroleptyki) przeciwdziałają zmianom właściwym dla tych procesów w sposób bardzo ograniczony. Ilościowe badania neurohistologiczne struktur mózgu w zaburzeniach psychicznych mają znaczenie interdyscyplinarne, także dla medycyny sądowej z uwagi na potencjalne znaczenie w diagnostyce samobójstwa.

PIŚMIENNICTWO

1. Gos T., Krell D., Brisch R., Bielau H., Trübner K., Bernstein H. G., Bogerts B.: The changes in AgNOR parameters of dorsal raphe nucleus neurons are related to suicide. *Leg. Med. (Tokyo)* 2007, 9 (5): 251-257.
2. Gos T., Krell D., Brisch R., Bielau H., Trübner K., Bernstein H. G., Bogerts B.: The changes of AgNOR parameters of anterior cingulate pyramidal neurons are region-specific in suicidal and non-suicidal depressive patients. *World J. Biol. Psychiatry*. 2007, 8 (4): 245-255.
3. Gos T., Krell D., Brisch R., Bielau H., Trübner K., Steiner J., Bernstein H. G., Bogerts B.: Demonstration of decreased activity of dorsal raphe nucleus neurons in depressed suicidal patients by the AgNOR staining method. *J. Affect. Disord.* 2008, 111 (2-3): 251-260.
4. Gos T., Krell D., Bielau H., Steiner J., Mawrin C., Trübner K., Bernstein H. G., Jankowski Z., Bogerts B.: Demonstration of disturbed activity of orbitofrontal pyramidal neurons in depressed patients by the AgNOR staining method. *J. Affect. Disord.* 2009, 118 (1-3): 131-138.
5. Gos T., Krell D., Bielau H., Steiner J., Trübner K., Brisch R., Bernstein H. G., Jankowski Z., Bogerts B.: Demonstration of disturbed activity of external globus pallidus projecting neurons in depressed patients by the AgNOR staining method. *J. Affect. Disord.* 2009, 119 (1-3): 149-155.
6. Gos T., Krell D., Bielau H., Steiner J., Mawrin C., Trübner K., Brisch R., Bernstein H. G., Jankowski Z., Bogerts B.: Demonstration of disturbed activity of the lateral amygdaloid nucleus projection neurons in depressed patients by the AgNOR staining method. *J. Affect. Disord.* 2010, 126 (3): 402-410.
7. Gos T., Bogerts B., Steiner J.: Neuronal activity patterns in depression assessed post mortem – which impacts have suicidality and unipolar-bipolar dichotomy? *Nervenheilkunde*. 2011, 30 (11): 909-913.
8. Jordan B. A., Fernholz B. D., Khatri L., Ziff E. B.: Activity-dependent AIDA-1 nuclear signaling regulates nucleolar numbers and protein synthesis in neurons. *Nat. Neurosci.* 2007, 10 (4): 427-435.
9. Wittmann M., Queisser G., Eder A., Wiegert J. S., Bengtson C. P., Hellwig A., Badring H.: Synaptic activity induces dramatic changes in the geometry of the cell nucleus: interplay between nuclear structure, histone H3 phosphorylation, and nuclear calcium signaling. *J. Neurosci.* 2009, 29 (47): 14 687-14 700.
10. Gomes C., Smith S., Youssef M., Zheng J., Hagg T., Hetman M.: RNA Polymerase 1-driven transcription as a mediator of BDNF-induced neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 2011, 286 (6): 4357-4363.
11. Ding Q., Markesbery W. R., Chen Q., Li F., Keller J. N.: Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2005, 25 (40): 9171-9175.
12. McGowan P. O., Szyf M.: The epigenetics of social adversity in early life: implications for mental health outcomes. *Neurobiol. Dis.* 2010, 39 (1): 66-72.
13. Logothetis N. K.: What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* 2008, 453 (7197): 869-878.
14. Bielau H., Steiner J., Mawrin C., Trübner K., Brisch R., Meyer-Lotz G., Brodhun M., Dobrowolny H., Baumann B., Gos T., Bernstein H. G., Bogerts B.: Dysregulation of GABAergic neurotransmission in mood disorders: a postmortem study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1096: 157-169.
15. Gos T., Günther K., Bielau H., Dobrowolny H., Mawrin C., Trübner K., Brisch R., Steiner J., Bernstein H. G., Jankowski Z., Bogerts B.: Suicide and depression in the quantitative analysis of glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neuropil. *J. Affect. Disord.* 2009, 113 (1-2): 45-55.
16. Gos T., Steiner J., Bielau H., Dobrowolny H., Günther K., Mawrin C., Krzyżanowski M., Hauser R., Brisch R., Bernstein H. G., Jankowski Z., Braun K., Bogerts B.: Differences between unipolar and bipolar I depression in the quantitative analysis of glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neuropil. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2012, DOI 10.1007/s00406-012-0315-x.
17. Steiner J., Walter M., Gos T., Guillemin G., Bernstein H., Sarnyai Z., Mawrin C., Brisch R., Bielau H., Schwabedissen L., Bogerts B., Myint A.: Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immunomodulated glutamatergic neurotransmission? *J. Neuroinflammation* 2011, 8: 94.

18. Gos T., Krell D., Bielau H., Brisch R., Trübner K., Steiner J., Bernstein H. G., Jankowski Z., Bogerts B.: Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the locus coeruleus is elevated in violent suicidal depressive patients. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2008, 258 (8): 513-520.

Adres do korespondencji:

Tomasz Gos

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

e-mail: gost@gumed.edu.pl

Marek Wiergowski

Propozycja interpretacji wyników analitycznych uzyskanych w pobliżu prawnej granicy stężeń dla stanu po użyciu alkoholu lub stanu nietrzeźwości

Proposal of interpreting analytical results indicating borderline-legal alcohol concentration values in individuals after alcohol consumption or being alcohol-intoxicated

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

Interpretacja wyników analitycznych uzyskanych w pobliżu prawnej granicy stężeń dla stanu po użyciu alkoholu lub stanu nietrzeźwości wymaga uwzględnienia wielu czynników, takich jak: bezpieczeństwo ruchu drogowego, niepewność pomiarową oznaczenia etanolu w powietrzu wydychanym, procesy metaboliczne alkoholu w organizmie, możliwość wystąpienia alkoholu zalegającego w jamie ustnej. Zarządzenie nr 738 Komendanta Głównego Policji z dnia 21 czerwca 2011 roku wprowadza obowiązek weryfikacji wyników w pobliżu granicy stężenia 0,1 mg/l poprzez wykonanie trzeciego pomiaru, jednak interpretacja tych wyników jest dyskusyjna. W pracy zaproponowano nowy sposób przeprowadzenia pomiarów i ich interpretacji.

Interpretation of analytical results indicating borderline-legal alcohol concentration values after the substance intake or intoxication requires consideration of many factors, such as: road safety, measurement uncertainty, determination of ethanol in breath, alcohol metabolism in the body, the possibility of residual alcohol in the mouth. Decree No 738 of the Chief of Police issued on 21 June 2011, introduces the obligation to verify the results ranging close to the borderline concentration of 0.1 mg/l by executing the third measurement, but the interpretation of these results is questionable. The paper proposes a new manner of taking measurements and their interpretation. Upon arriving at the scene the police should record the starting time of testing the driver and wait 15 minutes (the time required to eliminate residual

alcohol). If, after that time, the first result falls within the borderline values legally described as the condition after alcohol consumption or alcohol intoxication, the second and third measurements should be taken immediately. Thus, three measurements taken quickly in a few minutes should not be affected by the alcohol metabolism in the body. If two of the three determined values are less than or equal to 0.09 mg/l, the driver should be pronounced sober. If two of the three results are within the range of 0.10-0.25 mg/l, the result indicates condition after alcohol intake. If two of the three results are equal to or more than 0.26 mg/l, the status of the driver may be described as alcohol intoxication.

Słowa kluczowe:

interpretacja stężenia etanolu w powietrzu wydychanym i we krwi,
prawna granica stanu po użyciu alkoholu
i stan nietrzeźwości

Key words:

interpretation of ethanol concentration in breath and blood,
borderline-legal alcohol concentration values and state of alcohol intoxication

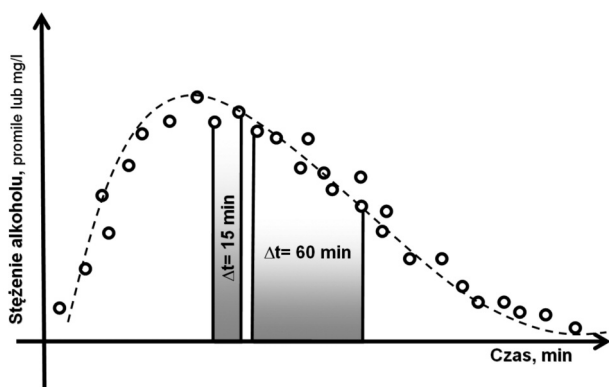
WSTĘP

Problematyka określania stanu trzeźwości kierowcy, u którego oznaczono stężenie alkoholu w powietrzu wydychanym lub we krwi na granicy okre-

ślonej prawnie stężenia stanu po użyciu alkoholu lub stanu nietrzeźwości, stanowi zagadnienie o charakterze wielopłaszczyznowym, będące źródłem nieporozumień w ich interpretacji. Inne spojrzenie na powyższą kwestię mogą prezentować prawnicy, inną analitycy a jeszcze inny punkt widzenia może być prezentowany przez funkcjonariuszy policji. Czy jest więc możliwe wypracowanie spójnej i jednoznacznej interpretacji wyników na granicy stężeń stanu nietrzeźwości lub stanu po użyciu alkoholu?

Farmakokinetyka etanolu w organizmie

Alkohol wchłania się w organizmie w czasie 0,5-1,5 godziny od chwili zakończenia konsumpcji alkoholu (stężenie etanolu we krwi w tym okresie dynamicznie wzrasta), po czym po kilku- kilkunastominutowym okresie stabilizacji stężenia we krwi, alkohol ulega eliminacji (stężenie etanolu w tej fazie maleje ze średnią prędkością około 0,15 promila lub w zakresie 0,1-0,2 promila na godzinę). W niniejszej pracy jednostkę „promil” zastosowano dla wyrażenia stężenia etanolu we krwi (1 promil = 1‰ = 1 g/l), natomiast jednostkę „mg/l” dla stężenia etanolu w powietrzu wydychanym (1 mg/l = 1 mg/dm³). Rzeczywisty przebieg krzywej alkoholowej uwzględniający fluktuacje pomiarowe został przedstawiony na rycinie 1.



Ryc. 1. Rzeczywisty przebieg krzywej alkoholowej uwzględniający fluktuacje pomiarowe, Δt – przedział czasowy między pomiarami stężenia alkoholu.

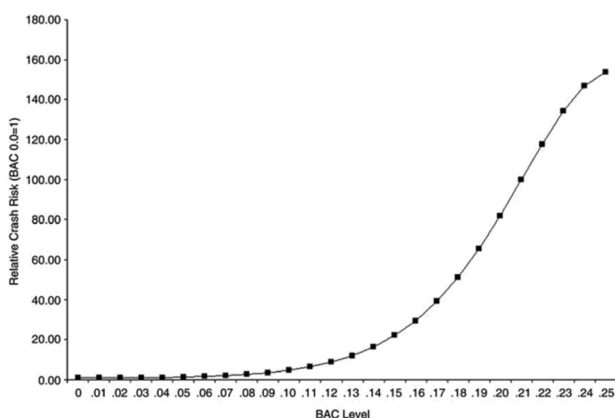
Fig. 1. Actual alcohol curve taking into consideration measurement fluctuations, Δt – the time interval between the measurements of alcohol concentration.

Należy zwrócić uwagę, iż niezależnie od tego czy oznaczanie stężenia etanolu zostało przeprowadzone w powietrzu wydychanym, czy we krwi zawsze pomiary są obarczone błędami pomiarowymi. Rzeczywiste punkty pomiarowe zaznaczone na rycinie 1 odbiegają od aproksymującej linii teoretycznej (linia kreskowana na rycinie 1). Z tego wynika praktyczny wniosek, iż nie wolno wyznaczać fazy metabolizmu alkoholu, jeśli dysponujemy dwoma wynikami pomiarów stężenia alkoholu w krótkim odstępie czasowym (np. 15 minut zaznaczone na rycinie 1). Dopiero dłuższe odstępy czasowe (co najmniej pół godzinne) umożliwiają miarodajną ocenę fazy metabolizmu (na rycinie 1 zaznaczono przykładowy odstęp 60 minutowy). Ponadto należy zwrócić uwagę, iż dopuszczalny błąd pomiaru analizatorem wydechu wynosi często ok. $\pm 0,02$ mg/l, czyli ok. $\pm 0,04$ promila we krwi. Podobne wartości stężeń (0,03-0,05 promila) w odstępie 15 minut wynikają z godzinowego współczynnika eliminacji etanolu z organizmu ($\beta_{60}=0,1-0,2$ promila). Faza eliminacji alkoholu w organizmie ludzkim zachodzi zgodnie z kinetyką Michaelisa–Menten’a, co oznacza iż spadek stężenia alkoholu w tej fazie nie jest cały czas liniowy. Przy stężeniu 0,2-0,4 promila eliminacja alkoholu przekształca się z reakcji zerowego rzędu (prostoliniowa zależność krzywej alkoholowej) w reakcję pierwszego rzędu (krzywoliniowa zależność). Tak więc interpretacja wyników pomiarów poniżej 0,2-0,4 promila (czy poniżej 0,1-0,2 mg/l) powinna być bardzo ostrożna w odniesieniu do ustalania fazy metabolizmu i obliczeń retrospektywnych.

Bezpieczeństwo ruchu drogowego

Z punktu widzenia bezpieczeństwa ruchu drogowego obecność alkoholu w powietrzu wydychanym w zakresie 0,1-0,25 mg/l (co odpowiada stężeniu 0,2-0,5 promila we krwi) wiąże się m.in. z takimi objawami upośledzenia zdolności psychomotorycznych jak: obniżenie podzielności uwagi, osłabienie zdolności do śledzenia poruszającego się przedmiotu czy zawężenie pola uwagi. Przy stężeniu ok. 0,25 mg/l etanolu w powietrzu wydychanym (0,5 promila we krwi) czas reakcji kierowcy wydłuża się o około 30-50%. Tak więc prawne limity zawartości alkoholu 0,1 mg/l i 0,25 mg/l (odpowiednio 0,2 i 0,5 promila we krwi) odzwierciedlają stopień odurzenia alkoholowego. Jakkolwiek nikt nie dyskutuje ze stanowiskiem, iż alkohol zaburza

sprawność psychomotoryczną, to dyskusyjna może być sama wartość stężenia etanolu we krwi lub powietrzu wydychanym, od której ryzyko spowodowania wypadku samochodowego znacząco wzrasta. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w USA w latach 1997-1999 oznaczono stężenie alkoholu w organizmie 4 919 kierowców, którzy spowodowali poważne wypadki drogowe oraz 10 066 kontrolnych kierowców, którzy jechali pojazdem w podobnym miejscu, czasie i kierunku jazdy [1]. Wzrost względnego ryzyka spowodowania wypadku drogowego (rycina 2) został odnotowany u kierowców ze stężeniem alkoholu 0,4-0,5 promila (na wykresie pozostawiono jednostki stężenia etanolu we krwi „BAC Level“ wyrażone procentowo, które należy przemnożyć przez wartość 10, aby uzyskać stężenie w promilach).



Ryc. 2. Względne ryzyko spowodowania wypadku drogowego (ang. *Relative Crash Risk*) w funkcji procentowego stężenia alkoholu we krwi (ang. *BAC Level*); założono iż względne ryzyko spowodowania wypadku drogowego przy stężeniu BAC=0,0% wynosi 1 [1].

Fig. 2. *Relative Crash Risk as a function of BAC level based on the assumption that the relative risk of causing a traffic accident at a concentration of BAC=0.0% is 1 [1].*

Znaczący wzrost względnego ryzyka zaobserwowano przy wartości stężenia wynoszącego 1,0 pro-

mil. Autorzy zaproponowali stężenie alkoholu we krwi 0,8 promila jako próg oddzielający stan trzeźwości i nietrzeźwości (prawo *per se*), natomiast dla kierowców, w których organizmach stężenie alkoholu we krwi przekracza wartość 1,5 promila zaproponowali znacznie poważniejsze sankcje prawne. Zwrócili również uwagę na trudności w określeniu stężenia alkoholu we krwi kierowców, którzy zbiegli z miejsca wypadku (ang. *hit-and-run drivers*), co było źródłem niedoszacowania wyników badań.

Pomimo powyższych zaleceń naukowców amerykańskich tytuł najnowszego raportu („*Drink Driving: Towards Zero Tolerance*“) zespołu ekspertów skupionych wokół Europejskiej Rady Bezpieczeństwa Transportu (ang. *European Transport Safety Council*) wyraźnie wskazuje, iż należy dążyć w uregulowaniach prawnych do ustanowienia jak najniższego progu stężenia alkoholu w organizmie (bliskiemu zero) jako prawnej granicy stanu nietrzeźwości [2]. Wg autorów raportu ryzyko śmiertelnego wypadku samochodowego wzrasta 5-krotnie, jeśli kierowca ma we krwi 0,5 promila (0,25 mg/l). Podobne ryzyko śmiertelnego wypadku pojawia się przy zwiększeniu szybkości o 50% (np. do 75 km/h na drodze, gdzie dopuszczalne było 50 km/h). Postulowane jest wprowadzenie możliwie niskiego progu stanu nietrzeźwości (np. 0,2 promila alkoholu we krwi), gdyż w świadomości kierowcy powinna być utrwalona informacja, iż nie powinien prowadzić samochodu po spożyciu jakichkolwiek napojów alkoholowych. W polskim prawie związanym z bezpieczeństwem ruchu drogowego przyjęto podział na stan po użyciu alkoholu i stan nietrzeźwości, co właściwie nie ma żadnego odzwierciedlenia w ustawodawstwie europejskim. Prawne granice stanu nietrzeźwości dla 27 krajów Unii Europejskiej (tabela I) [2] są zróżnicowane, ale dotyczą one grupy kierowców zawodowych oraz kierowców niedoświadczonych, dla których powinny obowiązywać bardziej zaostrzone standardy.

Gdyby w tabeli I uśredniono wyniki dla wszystkich krajów Unii Europejskiej z wyjątkiem Malty i Wielkiej Brytanii (dla których prawna granica stężenia jest najwyższa i wynosi 0,8 promila), to wówczas uśredniona wartość stężenia określona w tabeli I jako podstawowa nie uległaby zmianie (0,4 promila), natomiast dla kierowców zawodowych i niedoświadczonych wynosiłaby 0,2 promila.

Tabela 1. Prawne granice stanu nietrzeźwości dla 27 krajów Unii Europejskiej [2].

Table 1. Legal alcohol intoxication limits for the 27 countries of the European Union [2].

Państwo Country	Prawna granica stanu nietrzeźwości, promile Legal alcohol intoxication limits, per mille		
	Podstawowa Standard	Dla kierowców zawodowych For commercial drivers	Dla niedoświadczonych kierowców For novice drivers
Austria / Austria	0.5	0.1	0.1
Belgia / Belgium	0.5	0.5	0.5
Bułgaria / Bulgaria	0.5	0.5	0.5
Cypr / Cyprus	0.5	0.5	0.5
Czechy / Czech Republic	0.0	0.0	0.0
Dania / Denmark	0.5	0.5	0.5
Estonia / Estonia	0.2	0.2	0.2
Finlandia / Finland	0.5	0.5	0.5
Francja / France	0.5	0.5 (0,2 dla kierowców autobusów) 0.5 (0.2 bus drivers)	0.5
Niemcy / Germany	0.5	0.0	0.0
Grecja / Greece	0.5	0.2	0.2
Węgry / Hungary	0.0	0.0	0.0
Irlandia / Ireland	0.5	0.2	0.2
Włochy / Italy	0.5	0.0	0.0
Łotwa / Latvia	0.5	0.5	0.2
Litwa / Lithuania	0.4	0.2	0.2
Luksemburg / Luxembourg	0.5	0.1	0.1
Malta / Malta	0.8	0.8	0.8
Holandia / Netherlands	0.5	0.2	0.2
Polska / Poland	0.2	0.2	0.2
Portugalia / Portugal	0.5	0.5	0.5
Rumunia / Romania	0.0	0.0	0.0
Słowacja / Slovakia	0.0	0.0	0.0
Słowenia / Slovenia	0.2	0.0	0.0
Hiszpania / Spain	0.5	0.3	0.3
Szwecja / Sweden	0.2	0.2	0.2
Wielka Brytania / UK	0.8	0.8	0.8
Średnio / Average	0.4	0.3	0.3

Niepewność pomiarowa

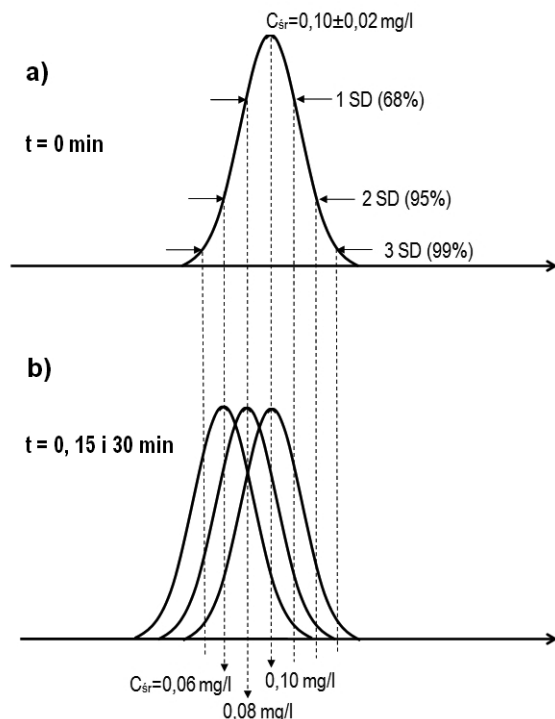
W naukach przyrodniczych „błąd“ lub „niepewność pomiarowa“ nie jest synonimem „pomyłki“. „Błąd pomiarowy“ – występujący w pomiarze urządzeniem zalegalizowanym i wzorcowanym – oznacza niemożliwą do uniknięcia niepewność nierozdzielnie związaną z istotą pomiaru. W tym sensie błędy pomiarowe nie oznaczają pomyłek i nie sposób ich uniknąć zachowując większą staranność [3]. Stąd niepewność pomiarowa powinna być jak najmniejsza i trzeba ją oszacować dla każdej procedury pomiarowej. Osiągnięcie w badaniu powietrza wydychanego przez kierowcę wartości granicznej etanolu np. dla stanu po użyciu 0,1 mg/l daje podstawę do stwierdzenia, iż dany wynik znajduje się z 95% ufnością w przedziale określonym niepewnością pomiarową dla danego urządzenia (dwie wartości odchylenia standardowego). Na rycinie 3 przedstawiono rozkład stężenia alkoholu w powietrzu wydychanym w organizmie człowieka o wartości 0,1 mg/l przy założeniu wykonywania pomiarów w bardzo krótkim przedziale czasowym (czas pomiarów w przybliżeniu $t=0$ min) oraz dla trzech pomiarów wykonanych w czasie $t=0, 15$ i 30 min, przy którym wartość stężenia malała w wyniku metabolizmu (zakładając szybkość eliminacji ok. 0,2 promila na godzinę), wynosząc odpowiednio 0,10, 0,08 i 0,06 mg/l.

Podstawą zastosowania rozkładu normalnego do analizy statystycznej wyników jest niezmiennosc badanego obiektu (w tym przypadku niezmiennosc stężenia etanolu) w określonym czasie (rycina 3 pkt a), co jest bardzo utrudnione jeśli uwzględnimy postępujący metabolizm alkoholu w organizmie (rycina 3 pkt b). Stąd postulat wykonywania dwóch lub trzech pomiarów zawartości alkoholu w powietrzu wydychanym w jak najkrótszym przedziale czasowym jest jak najbardziej uzasadniony, gdyż wówczas dopiero możemy zastosować analizę błędów statystycznego charakterystycznego dla rozkładu krzywej Gaussa.

Ustawy i rozporządzenia

Stan „po użyciu alkoholu“ oraz „stan nietrzeźwości“ zostały zdefiniowane m.in. w artykule 46 ustawy z dnia 26 października 1982 roku o wychowaniu w trzeźwości i przeciwdziałaniu alkoholizmowi [4]. Stan „po użyciu alkoholu“ występuje wówczas gdy alternatywnie:

- zawartość alkoholu we krwi wynosi od 0,2 do 0,5 promila albo prowadzi do takiego stężenia
- obecność alkoholu wynosi od 0,1 mg do 0,25 mg w 1 dm³ wydychanego powietrza albo prowadzi do takiego stężenia.



Ryc. 3. Rozkład stężenia alkoholu w powietrzu wydychanym w organizmie człowieka o wartości $C_{sr} = 0,10$ mg/l przy założeniu wykonywania pomiarów w bardzo krótkim przedziale czasowym (czas pomiarów w przybliżeniu $t=0$ min) (a) oraz trzech pomiarów wykonanych w czasie $t=0, 15$ i 30 min (b), przy którym wartość stężenia malała w wyniku metabolizmu odpowiednio $C_{sr} = 0,10, 0,08$ i $0,06$ mg/l.

Fig. 3. Distribution of alcohol concentration obtained from breath samples at the level of $C_{sr} = 0.10$ mg/l based on the assumption that the measurements were taken at very short time intervals (measurement time of approximately $t=0$ min) (a) and the three measurements taken at time $t = 0, 15$ and 30 min (b), where the concentration was decreased by metabolism by $C_{sr} = 0.10, 0.08$ and 0.06 mg/l, respectively.

Osoba zatrzymana w stanie po użyciu alkoholu popełnia wykroczenie (art. 86 lub 87 §1 „Kodeksu wykroczeń” [5]) i jest zagrożona karą aresztu, grzywną do 5000 zł i czasowym zatrzymaniem prawa jazdy.

Stan nietrzeźwości wg artykułu 115 § 16 „Kodeksu karnego” (kk) zachodzi wówczas, gdy równoprawnie [6]:

- zawartość alkoholu we krwi przekracza 0,5 promila albo prowadzi do stężenia przekraczającego tę wartość
- zawartość alkoholu w 1 dm³ wydychanego powietrza przekracza 0,25 mg albo prowadzi do stężenia przekraczającego tę wartość.

Odpowiedzialność za prowadzenie pojazdu w stanie nietrzeźwości opisuje art. 178a kk, w którym penalizacja jest dotkliwsza niż w przypadku stanu po użyciu alkoholu (osoba w tym stanie podlega grzywnie, karze ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 2). Ważnym stwierdzeniem w definicji stanu nietrzeźwości jest sformułowanie „prowadzi do”, gdyż nawet gdyby kierowca spożył alkohol tuż przed zdarzeniem lub kontrolą drogową, to może później odpowiadać za stan, w jakim się znalazł jego organizm po wchłonięciu całej porcji spożytego alkoholu (po pełnej absorpcji alkoholu). Inną konsekwencją definicji stanu nietrzeźwości jest również sama wartość stężenia alkoholu określona przez wyrażenie „przekracza”. W praktyce stan nietrzeźwości jest w Polsce interpretowany od stężenia alkoholu o wartości 0,6 promila we krwi lub 0,26 mg/l powietrza wydychanego.

W przypadku wystąpienia zjawiska tzw. alkoholu zalegającego (resztkowego) oznaczone stężenie etanolu w ogóle nie odzwierciedla stężenia alkoholu w organizmie, a tylko chwilowe stężenie w jamie ustnej, więc wynik tak zafałszowany powinien być odrzucony. W praktyce w takim przypadku obserwowany jest znaczący spadek stężenia alkoholu w powietrzu wydychanym (najczęściej obniżenie stężenia o ponad 20% w stosunku do wyniku pierwszego pomiaru w czasie 15 minut). Podobne zjawisko pojawia się w wyniku chwilowej eruktacji (odbicie się, cofanie się powietrza zawartego w żołądku, przy jednoczesnej obecności nie wchłoniętego alkoholu). Wpływ alkoholu zalegającego i innych chwilowych zaburzeń pomiaru alkoholu w powietrzu wydychanym może być zminimalizowany poprzez wykonanie trzech pomiarów, co było już wiele lat

temu proponowane przez Wojciecha Gubałę z Instytutu Ekspertyz Sądowych w Krakowie [7]. Procedura z trzema pomiarami stężenia alkoholu została wprowadzona nowelizacją Zarządzenia Komendanta Głównego Policji nr 738 z dnia 21.06.2011 roku w sprawie badań na zawartość w organizmie alkoholu lub środka działającego podobnie do alkoholu, która wprowadza szczegółowy algorytm postępowania [8]. Procedura ta została wprowadzona w celu właściwej interpretacji „znacznej rozbieżności” w wynikach pomiarów w pobliżu prawnej granicy stanu po użyciu alkoholu ($0,1 \text{ mg/dm}^3$) i brzmi ona następująco:

§ 3. 1. W przypadku dokonania pierwszego pomiaru urządzeniem, o którym mowa w § 2 ust. 1 pkt 1 i uzyskania wyniku ponad $0,00 \text{ mg/dm}^3$, należy niezwłocznie dokonać drugiego pomiaru.

2. W przypadku dokonania pierwszego pomiaru urządzeniem, o którym mowa w § 2 ust. 1 pkt 2 i uzyskania wyniku ponad $0,00 \text{ mg/dm}^3$, należy dokonać drugiego pomiaru po upływie 15 minut.

3. W przypadku uzyskania w pomiarach, o których mowa w ust. 2, wyników: w pierwszym pomiarze – równego lub większego od $0,1 \text{ mg/dm}^3$, a w drugim – $0,00 \text{ mg/dm}^3$, należy niezwłocznie dokonać trzeciego pomiaru tym samym urządzeniem. Gdy wynik trzeciego pomiaru wyniesie $0,00 \text{ mg/dm}^3$, nie zachodzi uzasadnione podejrzenie, że kierujący znajduje się w stanie po użyciu alkoholu.

4. W przypadku uzyskania w pierwszym pomiarze, o którym mowa w ust. 2, wyniku równego lub większego od $0,1 \text{ mg/dm}^3$, a w drugim – wyniku ponad $0,00 \text{ mg/dm}^3$, ale poniżej $0,1 \text{ mg/dm}^3$, należy niezwłocznie dokonać trzeciego pomiaru tym samym urządzeniem. Gdy wynik trzeciego pomiaru wyniesie $0,00 \text{ mg/dm}^3$ lub powyżej $0,00 \text{ mg/dm}^3$ zachodzi uzasadnione podejrzenie, że badany w chwili kierowania pojazdem znajdował się w stanie po użyciu alkoholu.

W poniższej tabeli II zawarto potencjalne wyniki wraz z interpretacją zgodną z Zarządzeniem Komendanta Głównego Policji nr 738.

Powyższe zarządzenie zostało wprowadzone w celu usprawnienia pracy funkcjonariuszy policji, którzy w chwili uzyskania wyniku poniżej i powyżej prawnej granicy stanu po użyciu alkoholu odwozili kierowcę na komendę, gdzie dokonywano weryfikacji wyniku na analizatorze stacjonarnym działają-

Tabela II. Interpretacja trzech wyników pomiarów stężenia alkoholu w pobliżu granicy stanu po użyciu alkoholu ($0,1 \text{ mg/l}$) zgodnej z Zarządzeniem Komendanta Głównego Policji nr 738 z dnia 21.06.2011 roku; C_I , C_{II} i C_{III} – stężenia alkoholu w powietrzu wydychanym otrzymane odpowiednio w badaniu I, II i III.

Table II. Interpretation of the three alcohol concentration measurements falling near the borderline values indicating condition after alcohol intake (0.1 mg/l) in accordance with the Chief of Police Ordinance No 738 of 21.06.2011: C_I , C_{II} and C_{III} – the concentration of alcohol in breath obtained in study I, II and III, respectively.

Badanie I Measurement I $t = 0 \text{ min}$	Badanie II Measurement II $t = 15 \text{ min}$	Badanie III niezwłocznie po badaniu II Measurement III immediately after measurement II	Stan Condition
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} = 0,00$	$C_{III} = 0,00$	Trzeźwości Sobriety
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \leq 0,09$	$C_{III} = 0,00$	Po użyciu alkoholu After alcohol intake
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \leq 0,09$	$C_{III} \leq 0,09$	Po użyciu alkoholu After alcohol intake
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \leq 0,09$	$C_{III} \geq 0,10$	Po użyciu alkoholu After alcohol intake

cym na zasadzie absorpcji promieniowania podczerwonego. Przeprowadzenie obecnie trzeciego pomiaru ma za zadanie ewentualne wykrycie i potwierdzenie obecności alkoholu zalegającego w jamie ustnej i jednocześnie przyspieszenie procedury weryfikującej kierowców będących w stanie po użyciu alkoholu. Jednak powyższa procedura jest skomplikowana i może być trudna w interpretacji.

Propozycja przeprowadzenia pomiarów i ich interpretacji

W celu uzyskania miarodajnych wyników (odzwierciedlających rzeczywistą zawartość alkoholu w organizmie kierowcy) należy uwzględnić dynamiczne procesy metaboliczne alkoholu w ludzkim organizmie, uwarunkowania statystyczne (niepewność pomiarowa), legislacyjne oraz możliwość wystąpienia znacznej rozbieżności wyników w przypadku obecności alkoholu zalegającego w jamie ustnej. W związku z tym proponuję zmianę procedury oznaczania alkoholu w powietrzu wydychanym na granicy stężeń. Po przybyciu na miejsce zdarzenia policja powinna odnotować czas rozpoczęcia kontroli kierowcy i poczekać 15 min (czas konieczny na eliminację alkoholu zalegającego). Po tym czasie należy wykonać pierwszy pomiar i odnotować stężenie dla pierwszego pomiaru. Jeśli pierwszy wynik będzie na granicy ustawowo określonej dla stanu po użyciu lub stanu nietrzeźwości, to należy drugi pomiar wykonać natychmiast (jak tylko urządzenie pomiarowe osiągnie stan gotowości). Trzeci pomiar należy również wykonać jak najszybciej, podobnie jak w przypadku drugiego pomiaru. Tak więc szybko wykonane trzy pomiary w czasie kilku minut nie powinny być zaburzone przez metabolizm alkoholu w organizmie (obiekt badany nie zmienia swoich właściwości w czasie i spełnia warunki rozkładu normalnego danych pomiarowych).

W przypadku wykonywania pomiarów na szeroką skalę wśród kierujących (np. akcja „Znicz”) funkcjonariusze policji powinni wykonywać pierwszy pomiar w trybie pasywnym natychmiast po zatrzymaniu do kontroli (bez czekania 15 minut). Takie badanie ma charakter jakościowy (przesiewowy), a nie ilościowy. Dopiero po uzyskaniu pozytywnego jakościowego wyniku należałoby odczekać 15 minut i zapisać pierwszy pomiar właśnie po tym czasie.

Jeśli postulowana procedura byłaby wprowadzona w praktyce to interpretacja trzech wyników dla pomiarów wykonanych w jak najkrótszym czasie powinna być następująca (tabela III):

- Jeśli dwa spośród trzech wyników są mniejsze lub równe 0,09 mg/l, to należałoby stwierdzić stan trzeźwości.

- Jeśli dwa spośród trzech wyników uzyskano w zakresie 0,10-0,25 mg/l, to należałoby stwierdzić stan po użyciu.

- Jeśli dwa spośród trzech wyników są równe lub powyżej 0,26 mg/l, to należałoby stwierdzić stan nietrzeźwości.

Tabela III. Proponowana interpretacja trzech wyników pomiarów stężenia alkoholu w pobliżu granicy stanu po użyciu alkoholu (0,10 mg/l); C_I , C_{II} i C_{III} – stężenia alkoholu w powietrzu wydychanym otrzymane odpowiednio w badaniu I, II i III.

Table III. Suggested interpretation of the three alcohol concentration measurements falling near the borderline values indicating condition after alcohol intake (0.10 mg/l); C_I , C_{II} and C_{III} – the concentration of alcohol in breath obtained in study I, II and III, respectively.

Badanie I Measurement I $t = 0$ min	Badanie II niezwłocznie po badaniu I Measurement II immediately after measurement I	Badanie III niezwłocznie po badaniu II Measurement III immediately after measurement II	Stan Condition
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} = 0,00$	$C_{III} = 0,00$	Trzeźwości Sobriety
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \leq 0,09$	$C_{III} = 0,00$	Trzeźwości Sobriety
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \leq 0,09$	$C_{III} \leq 0,09$	Trzeźwości Sobriety
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \leq 0,09$	$C_{III} \geq 0,10$	Po użyciu alkoholu After alcohol intake
$C_I \geq 0,10$	$C_{II} \geq 0,10$	$C_{III} \leq 0,09$	Po użyciu alkoholu After alcohol intake

PODSUMOWANIE

Po przybyciu na miejsce zdarzenia policja powinna odnotować czas rozpoczęcia kontroli kierowcy i poczekać 15 min (czas konieczny na elimi-

nację alkoholu zalegającego). Jeśli po tym czasie pierwszy wynik będzie na granicy ustawowo określonej dla stanu po użyciu alkoholu lub stanu nietrzeźwości, to należy drugi i trzeci pomiar wykonać bezzwłocznie. Tak więc szybko wykonane trzy pomiary w czasie kilku minut nie powinny być zaburzone przez metabolizm alkoholu w organizmie. Jeśli dwa spośród trzech wyników są mniejsze lub równe 0,09 mg/l, to należałoby stwierdzić stan trzeźwości. Analogicznie dla pozostałych stanów określonych w polskim prawie: jeśli dwa spośród

trzech wyników uzyskano w zakresie 0,10-0,25 mg/l, to należałoby stwierdzić stan po użyciu alkoholu, a jeśli dwa spośród trzech wyników są równe lub powyżej 0,26 mg/l, to należałoby stwierdzić stan nietrzeźwości. Ustalanie stanu trzeźwości w pobliżu granicznych wartości stężenia alkoholu na podstawie analizy próbek krwi dla osób żyjących wymaga w znacznie większym stopniu uwzględnienia zmian metabolicznych alkoholu w organizmie oraz okoliczności zdarzenia.

PIŚMIENNICTWO

1. Blomberg R. D., Peck R. C., Moskowitz H., Burns M., Fiorentino D.: The Long Beach/Fort Lauderdale relative risk study, *Journal of Safety Research*. 2009, 40: 285-292.

2. Podda F. (ed.): *Drink Driving: Towards Zero Tolerance*, European Transport Safety Council, 24.04.2012.

3. Taylor J. R.: *Wstęp do analizy błędu pomiarowego*, PWN. 1995: 15.

4. Ustawa z dnia 26 października 1982 roku o wychowaniu w trzeźwości i przeciwdziałaniu alkoholizmowi, Dz.U. 1982 nr 35 poz. 230, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU19820350230>.

5. Ustawa z dnia 20 maja 1971 roku Kodeks wykroczeń., Dz.U. 1971 nr 12 poz. 114,

<http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU19710120114>.

6. Ustawa z dnia 6 czerwca 1997 roku, Kodeks karny, Dz.U. 1997 nr 88 poz. 553, <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU19970880553>.

7. Gubała W.: *Toksykologia alkoholu: wybrane zagadnienia*, IES, Kraków, 1997.

8. Zarządzenie nr 738 Komendanta Głównego Policji z dnia 21 czerwca 2011 roku zmieniające zarządzenie w sprawie badań na zawartość w organizmie alkoholu lub środka działającego podobnie do alkoholu, Informacyjny Serwis Policji, Komenda Główna Policji, http://isp.policja.pl/palm/isp/97/2306/Zarzadzenie_nr_738_Komendanta_Glownego_Policji_z_dnia_21_czerwca_2011_r_zmienaj.html

Adres do korespondencji:

Marek Wiergowski

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

e-mail: marwier@gumed.edu.pl

Marek Wiergowski, Zbigniew Jankowski, Ewa Tomczak, Jacek Sein Anand^{1,2},
Rafał Ziółkowski³, Janusz Staniszewski³

Propozycja testów oceniających zdolności psychomotoryczne kierowcy oraz protokołu do zastosowania w trakcie pobrania i badania śliny, krwi oraz moczu w przypadku podejrzenia przyjęcia środków działających podobnie do alkoholu

Proposal of psychomotor skill assessment tests for drivers and a protocol for sampling and testing of saliva, blood and urine when there is reason to suspect involvement of substances with alcohol-like effect

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. n. med. Z. Jankowski

¹ Z Zakładu Toksykologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. n. med. J. Sein Anand

² Z Pomorskiego Centrum Toksykologii

Kierownik: dr n. med. W. Waldman

³ Z Wydziału Ruchu Drogowego Komendy Wojewódzkiej Policji w Gdańsku

Kierownik: naczelnik, mł. insp. J. Staniszewski

W pracy zaproponowano testy, których zastosowanie ma na celu ocenę występowania zaburzeń psychomotorycznych u kierowcy. Ponadto autorzy przedstawili propozycję protokołu do zastosowania w trakcie pobrania i badania śliny, krwi oraz moczu w przypadku podejrzenia przyjęcia przez uczestnika ruchu drogowego środków działających podobnie do alkoholu. Szczegółową procedurę postępowania przygotowano w oparciu o doświadczenia własne, z uwzględnieniem procedur stosowanych przez policję niemiecką i amerykańską. Załącznik ma na celu ułatwienie funkcjonariuszowi policji przeprowadzenie i udokumentowanie wyników testów psychomotorycznych stwierdzających upośledzenie zdolności psychomotorycznych i jednocześnie stanowić podstawę do wykonania analizy śliny, moczu i krwi.

The paper proposes tests to assess psychomotor impairment in drivers suspected of using substances acting similarly to alcohol. The authors also present a proposal for the protocol to be used in sampling and testing of saliva, blood and urine

when psychoactive substance abuse has been suspected. A detailed procedure is based on the joined experience of German, U.S. and Polish police from Gdansk. The purpose of the appendix is to help police officers to perform and document tests confirming psychomotor impairment, as well as to provide the basis for saliva, urine and blood analysis.

Słowa kluczowe:

procedura postępowania, osłabienie zdolności psychomotorycznych kierowcy, substancje odurzające lub psychotropowe

Key words:

checklist procedure, impairment of psychomotor driving skills, narcotic or psychotropic substances

WSTĘP

Bezpieczeństwo drogowe to jedno z priorytetowych działań wielu krajów europejskich. Na łączną liczbę 1,3 mln wypadków drogowych odnotowy-

wanych corocznie w Unii Europejskiej liczba ofiar śmiertelnych jest stosunkowo wysoka i wynosi około 43 tys. osób (około 1,7 mln osób odnosi obrażenia) [1].

W Polsce liczba zgonów w wypadkach drogowych należy do najwyższych w krajach Unii Europejskiej i w 2010 roku wynosiła około 100 osób na milion mieszkańców. Więcej zgonów odnotowano jedynie w Rumunii, Bułgarii i Grecji. W pozostałych krajach unijnych średnia śmiertelność w analizowanym roku wynosiła natomiast 62 zgony na milion mieszkańców [2].

Za główną przyczynę tak wysokiej śmiertelności uznaje się czynnik ludzki, w tym przede wszystkim nieprzestrzeganie przepisów ruchu drogowego: rozwijanie nadmiernej prędkości, prowadzenie pojazdów pod wpływem substancji psychoaktywnych (alkohol, środki odurzające, leki), niezapięcie pasów bezpieczeństwa, a w przypadku motocyklistów – jazda bez kasku. Ważnym czynnikiem jest również zmęczenie i jazda nocą [1, 2].

Grupę największego ryzyka, jako sprawcy wypadków, stanowią kierowcy do 25 roku życia. Duża śmiertelność w tej populacji jest najczęściej skutkiem rozwijania nadmiernej prędkości oraz prowadzenia pojazdów pod wpływem alkoholu i środków psychoaktywnych [2].

Wbrew obiegowym opiniom liczba kontroli drogowych kierowców w Polsce, w celu badania trzeźwości, należy do najniższych w Europie (ok. 88 kontroli na 1000 mieszkańców w 2010 roku). Z drugiej jednak strony odsetek osób z dodatnim wynikiem okazał się jednym z najwyższych w krajach europejskich i wynosił 4,9% [2].

W reprezentatywnych badaniach przeprowadzonych w ramach europejskiego programu DRUID (ang. *Driving under the Influence of Drugs, Alcohol and Medicines*), badaniom poddano 4005 polskich kierowców. U 49 z nich (1,2%) stwierdzono „stan po użyciu” lub „stan pod wpływem” alkoholu etylowego. Natomiast u 53 kierowców (1,3%) odnotowano stan po przyjęciu substancji psychoaktywnych innych niż alkohol etylowy, w tym po przyjęciu: THC (u 33 kierowców), benzodiazepin (8), amfetaminy i jej analogów (6), opiatów i opioidów (4) oraz po przyjęciu dwu lub więcej środków odurzających (2). Kokainy oraz leków nasennych zolpidemu i zopiklonu nie stwierdzono u żadnego z polskich kierowców [3].

W związku z powyższym wydaje się, iż w celu faktycznego zwiększenia bezpieczeństwa na drodze konieczne jest podjęcie skutecznych i częstych kontrolnych działań prewencyjnych, ze zwróceniem szczególnej uwagi na populację młodych kierowców.

Wśród czynników, które poważnie utrudniają takie działania są: niewystarczająca liczba szkoleń policjantów, a także niejednoznaczne procedury postępowania z osobami podejrzanymi o przyjęcie środków odurzających.

Podczas kontroli drogowej w Polsce funkcjonariusze Policji stosują wytyczne zawarte w Zarządzeniu nr 496 Komendanta Głównego Policji z dnia 25 maja 2004 roku w sprawie badań na zawartość w organizmie alkoholu lub środka działającego podobnie do alkoholu.

W przypadkach podejrzenia przyjęcia takiego środka przez kierującego, policjanci postępują zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 11 czerwca 2003 roku w sprawie wykazu środków działających podobnie do alkoholu oraz warunków i sposobu przeprowadzania badań na ich obecność w organizmie, nadzorując m.in. wypełnianie „Protokołu badania śliny/krwi/moczu”.

Powyższe przepisy nie zawierają jednak dokładnych informacji na temat kryteriów, na podstawie których powinno być dokonane zabezpieczenie do badań chemiczno-toksykologicznych materiału biologicznego w przypadku podejrzenia przyjęcia substancji działającej podobnie do alkoholu.

Ponadto z prawnego punktu widzenia sytuację komplikuje brak w ustawodawstwie polskim wartości stężeń progowych dla środków odurzających, *per analogiam* do alkoholu etylowego, w którym to stężenie alkoholu we krwi 0,2-0,5‰ odpowiada stanowi po użyciu alkoholu, a powyżej 0,5‰ stanowi nietrzeźwość.

Tak więc powyższe dokumenty nie są wystarczająco precyzyjne w praktyce. Utrudnia to poważnie wstępną selekcję kierowców podejrzanym o przyjęcie środka odurzającego i późniejszą jednoznaczną ocenę, m.in. przez biegłego toksykologa sądowego i wymiar sprawiedliwości czy kierujący znajdował się pod wpływem, czy jedynie po użyciu środka odurzającego. Brak właściwego postępowania przy pobraniu materiału biologicznego uniemożliwia także późniejszą ocenę czy sprawca dopuścił się popełnienia czynu zabronionego określonego w kodeksie wykroczeń, czy kodeksie karnym.

Testy oceniające zdolności psychomotoryczne kierowcy – przeprowadzane zarówno przez funkcjonariuszy policji jak i w trakcie badania lekarskiego – są obecnie stosowane w bardzo ograniczonym stopniu lub wcale. Ponadto ich wartość diagnostyczna w stosunku do wyników analizy materiału biologicznego jest oceniana bardzo krytycznie. Porównanie wyników badań toksykologicznych z oceną lekarską w materiałach Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach wskazują, że nie ma istotnej korelacji pomiędzy stężeniem substancji psychoaktywnej we krwi, a stwierdzonymi przez lekarza objawami jej działania. Tylko w 31% zbadanych przypadków pozytywne wyniki badań toksykologicznych krwi korelowały ze stwierdzonymi przez lekarza objawami klinicznymi [4].

Autorzy niniejszego artykułu rozpoczęli prace nad wykorzystaniem programów komputerowych i aplikacji na telefony komórkowe w celu stwierdzenia zaburzeń stanu psychomotorycznego kierowcy. Dla przykładu czas reakcji kierowcy mierzony w sekundach można sprawdzić za pomocą dostępnego w Internecie programu „Think Fast!” utworzonego na wydziale medycyny „Harvard Medical School”, zajmującej się zagadnieniami zaburzeń snu [5]. Tego rodzaju aplikacje mogłyby w niedalekiej przyszłości znacząco pomóc funkcjonariuszowi policji w bardziej miarodajnej selekcji kierowców z zaburzeniami psychomotorycznymi.

Na marginesie należy zaznaczyć, iż treść „Protokołu badania śliny/krwii/moczu” jest bardzo podobna do „Protokołu pobrania krwi”, który jest dołączany przez producenta do pakietów zawierających szklane fiolki. Wydaje się, że w niedalekiej przyszłości Ministerstwo Zdrowia powinno stworzyć jeden, dobrze przemyślany protokół, unikając zbędnej biurokracji i powtarzania informacji w kilku dokumentach wypełnianych przez policjantów w tym samym czasie.

CEL PRACY

W pracy podjęto próbę opracowania szczegółowej procedury postępowania funkcjonariusza policji dokonującego kontroli drogowej kierowców. Jej podstawę stanowiły doświadczenia własne autorów z uwzględnieniem procedur wykorzystywanych przez policję niemiecką [6] i amerykańską [7].

Celem załącznika, zamieszczonego w końcowej części artykułu, jest ułatwienie funkcjonariuszowi policji przeprowadzania testów stwierdzających ewentualne upośledzenie zdolności psychomotorycznych kierowcy w celu wstępnej selekcji osób budzących podejrzenie, że znajdują się pod wpływem substancji psychoaktywnych. Ułatwi to także pracę lekarza SOR uczestniczącego w pobraniu krwi do badania chemiczno-toksykologicznego.

Głównym celem proponowanego schematu postępowania jest udokumentowanie upośledzenia zdolności psychomotorycznych kierującego pojazdem na podstawie zaobserwowanych przez policjanta i lekarza objawów, badania wstępnego śliny lub moczu, a następnie pobrania i badania próbki krwi.

Powyższą procedurę, wraz z załącznikiem, prezentowano w trakcie szkoleń funkcjonariuszy policji przeprowadzonych w jednostkach Wydziału Ruchu Drogowego województwa pomorskiego oraz w trakcie II Ogólnopolskiej Konferencji „Fizykochemiczne badania śladów kryminalistycznych”, która miała miejsce w dniach 20-23.11.2012 roku w Serocku pod auspicjami Instytutu Badawczego Centralnego Laboratorium Kryminalistycznego Policji w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Kryminalistycznego. W trakcie szkoleń funkcjonariusze policji zwracali uwagę na konieczność ograniczenia do niezbędnego minimum procedury dokumentacji zdarzeń z udziałem osób podejrzanych o przyjęcie substancji psychoaktywnych z uwagi na brak czasu na miejscu zdarzenia. Wskazywali również, iż niektóre testy psychomotoryczne trudno jest wykonywać w praktyce ze względu na zagrożenie bezpieczeństwa ruchu drogowego, w tym np. test badający umiejętność chodzenia po linii prostej. Algorytm postępowania powinien – zdaniem uczestników konferencji w Serocku – jasno precyzować, jakie badania oceniające zaburzenia psychomotoryczne kierowcy są wykonywane przez lekarza, a jakie mogą być wykonywane przez funkcjonariuszy policji.

DYSKUSJA

Właściwa interpretacja stanu psychomotorycznego kierowcy wymaga, w miarę możliwości, znajomości wszystkich okoliczności, które wskazywałyby na spożycie alkoholu lub zażycie środka działającego podobnie do alkoholu.

Dotyczy to przede wszystkim nietypowego zacho-

wania prowadzącego pojazd jak również okoliczności zdarzenia lub zatrzymania do kontroli. Konieczne jest również odnotowywanie czasu i miejsca wykonywanych czynności służbowych, a zwłaszcza daty i godziny zatrzymania do kontroli, przeprowadzenia badania przesiewowego śliny, badania lekarskiego oraz pobrania moczu i krwi.

Czynności pobrania i analizy śliny lub moczu powinny być wykonane bezzwłocznie, tak szybko jak to jest tylko możliwe w danych warunkach. Wstępna selekcja kierowców odbywa się na podstawie obserwacji funkcjonariuszy policji.

Należy pamiętać, że każdy z płynów biologicznych pobieranych od kierowcy do analizy toksykologicznej ma swoje zalety i ograniczenia (tabela 1) [8, 9].

Badanie śliny i moczu testem przesiewowym umożliwia zarówno szybką analizę – w czasie ok. 15 min – jak i odstępianie od dalszych procedur i badań w przypadku uzyskania wyniku negatywnego. Preferowanym materiałem do szybkich badań przesiewowych pozostaje ślina, gdyż w sposób bardziej miarodajny niż mocz pozwala na stwierdzenie rzeczywistych zaburzeń psychomotorycznych w chwili zdarzenia czy zatrzymania do kontroli drogowej. Świadczy o tym zamieszczone w tabeli 1 tzw. „okno detekcji“, czyli czas wykrywania środków odurzających od momentu przyjęcia do chwili pobrania materiału do badań, który dla śliny i krwi jest zbliżony (zwykle 1-12 h) i odzwierciedla stan kierowcy w chwili zdarzenia, natomiast w przypadku moczu jest zbyt długi (3-5 dni). Warto podkreślić, że stężenie we krwi i w ślinie miarodajnie oddaje działanie środka psychoaktywnego w organizmie, natomiast obecność środka odurzającego w moczu odpowiada substancji wyeliminowanej z organizmu i nie oddziałującej na organizm. Ponadto na stężenie środka odurzającego w moczu duży wpływ ma stopień jego rozcieńczenia bądź zagęszczenia. W związku z tym w niniejszej pracy zaproponowano do badań przesiewowych analizę śliny, a badanie moczu dopiero w przypadku braku testerów na ślinę.

Dodatni wynik badania przesiewowego dla tych materiałów biologicznych umożliwia wdrożenie kolejnych procedur postępowania, w celu potwierdzenia dodatniego wyniku wstępnego badania przesiewowego. Dalsze laboratoryjne badania potwierdzające powinny być wykonane w próbce krwi po-

Tabela 1. Właściwości materiałów biologicznych – krwi, śliny i moczu – stosowanych do wykrywania i oznaczania środków odurzających u kierowców [8, 9].

Table 1. Properties of biological materials – blood, saliva and urine – used for the detection and identification of illicit drugs in drivers [8, 9].

Parametr Parameter	Ślina Saliva	Krew Blood	Mocz Urine
Okno detekcji Detection window	1-12 h 1-12 h	1-12 h 1-12 h	3-5 dni 3-5 days
Możliwość wykrycia wyjściowego środka odurzającego Possibility of detection of parent illicit drug	tak yes	tak yes	ograniczona limited
Możliwość wykrycia metabolitów środka odurzającego Possibility of detection of metabolites of illicit drug	ograniczona limited	tak yes	tak yes
Średnie stężenia substancji psychoaktywnych i ich metabolitów Mean concentrations of psychoactive substances and their metabolites	małe low	małe low	duże high
Interpretacja wyników analizy Interpretation of results	jakościowa qualitative	jakościowa i ilościowa qualitative and quantitative	jakościowa qualitative
Objętość próbki Volume of sample	mała low	ograniczona limited	duża high
Pobranie Sampling	nieinwazyjne non-invasive	inwazyjne invasive	nieinwazyjne non-invasive
Czas wykonania analizy Time of analysis	15 min 15 min.	1 dzień 1 day	15 min 15 min.

branej w jak najkrótszym czasie od chwili badania przesiewowego w związku z postępującą biotransformacją użytego środka odurzającego w organizmie. Analiza krwi jest wykonywana w celu potwierdzenia wyników dodatnich badania przesiewowego śliny lub moczu.

Opracowany załącznik do „Protokołu badania śliny/krw/moczu“ składa się z czterech odrębnych części dotyczących procedury postępowania z osobą podejrzaną o zażycie środka odurzającego.

Schemat postępowania z osobą podejrzaną o zażycie środka odurzającego

Celem dołączonego graficznego algorytmu postępowania jest całościowe określenie możliwych ścieżek decyzyjnych funkcjonariuszy policji. Na wstępie należy przeprowadzić badanie trzeźwości przy użyciu analizatorów wydechu. Stwierdzenie stanu nietrzeźwości nie wyklucza, iż kierowca może znajdować się także pod wpływem innych substancji działających podobnie do alkoholu. Konieczność zweryfikowania tej tezy wymaga zastosowania testów przesiewowych wykonanych w ślinie lub moczu zatrzymanego kierowcy. Przed wykonaniem testu przesiewowego należy stwierdzić (bez wypełniania opracowanego załącznika), czy u zatrzymanego występują objawy wskazujące na możliwość zażycia środków odurzających (wymienione w pkt. 2 – *Opis objawów i okoliczności*). W przypadku gdy funkcjonariusze policji nie mogą szybko zweryfikować przyczyny zaobserwowanych objawów obniżenia sprawności psychomotorycznej kierowcy (nie posiadają testów na ślinę lub analiza moczu jest niemożliwa), należy przeprowadzić kolejne badania (wymienione w pkt. 3 pt. *Dodatkowe testy badające upośledzenie zdolności psychomotorycznych kierowcy*), umożliwiające stwierdzenie objawów zaburzeń psychomotorycznych. Stwierdzenie objawów upośledzenia zdolności psychomotorycznych u kierowcy (pkt. 2 i 3 załącznika), przy braku możliwości wykonania testu przesiewowego śliny lub moczu, powinny być podstawą do pobrania próby krwi w kierunku wykrycia obecności i oznaczenia substancji podobnie działających do alkoholu.

Opis objawów i okoliczności

W tej części załącznika do „Protokołu badania śliny/krwi/moczu” wymieniono punkty tzw. listy kontrolnej (ang. *checklist*). Są to m.in.: sposób poruszania się pojazdem po drodze, nienaturalne zachowanie kierowcy po zatrzymaniu do kontroli, sposób mówienia, nastrój, zachowanie, sposób wychodzenia z samochodu, chód, badanie na zawartość alkoholu w powietrzu wydychanym, wygląd oczu, w tym głównie źrenic i inne dodatkowe obserwacje. Ze względu na wzmożony ruch turystyczny w niektórych częściach Polski niekiedy istotne jest ustalenie znajomości języka polskiego, co w sposób oczywisty może ograniczać komunikację werbalną z kierowcą. Zarówno w tej jak i w innych

częściach załącznika w odpowiednich kratkach należy zaznaczyć znakiem krzyżyka „x” występowanie wymienionego objawu lub określonego wyboru. Występujące w niektórych protokołach zalecenia podkreślenia lub przekreślenia (np. w „Protokole pobrania krwi”) są mylące z powodu trudności w odróżnieniu podkreślenia od przekreślenia i nie powinny być dalej stosowane. Spośród podanych objawów wymienionych w tej części załącznika duże znaczenie ma szerokość źrenic (prawidłowa średnica źrenic 3,0-6,5 mm) oraz reakcja źrenic na światło. Ocena wymienionych dwóch objawów jest łatwa i możliwa do przeprowadzenia w miejscu zatrzymania do kontroli. Szerokość źrenic może wskazywać na działanie środków odurzających. Szerokie źrenice obserwuje się po zażyciu kokainy, amfetaminy i jej pochodnych, niekiedy po produktach konopi innych niż włókniste (marihuanie, haszyszu), natomiast wąskie źrenice są charakterystyczne dla stosowania opiatów czy benzodiazepin. Należy zwrócić uwagę, iż w następstwie mechanicznego urazu u kierowcy mogą pojawić się nierówne średnice źrenic (stan taki powinien być wskazaniem do pilnej konsultacji lekarskiej).

Celem tej części protokołu jest ocena nietypowego zachowania kierowców w celu dokonania wstępnej selekcji tych osób, które są podejrzan o przyjęcie środków odurzających. Należy pamiętać, iż nie można rozpoznać przyjęcia określonej substancji psychoaktywnej wyłącznie na podstawie objawów klinicznych. Istotne jest to, aby policjant na podstawie kilku różnych objawów, w tym sposobu mówienia i zachowania, mógł podejrzewać ekspozycję na środki odurzające. Warto też pamiętać, że część opisanych objawów może być także spowodowana innymi przyczynami. Dla przykładu kierowca, który próbuje spoufalać się z funkcjonariuszem policji może się tak zachowywać, ponieważ znajduje się pod wpływem narkotyku czy alkoholu, ale równie dobrze próbuje uniknąć kary bo przekroczył limit punktów karnych lub przewozi niedozwoloną liczbę pasażerów w samochodzie.

Dodatkowe testy umożliwiające stwierdzenie zaburzeń psychomotorycznych kierowcy (w przypadku braku testera na ślinę lub mocz)

W warunkach polskich często brak jest możliwości wykonania wstępnej przesiewowej analizy próbki śliny, najczęściej z powodu braku odpowied-

nich testerów. Podobnie analiza próbki moczu może być niemożliwa do wykonania, zwłaszcza w godzinach nocnych, poza godzinami pracy laboratoriów medycznych. W przypadku moczu dodatkowe utrudnienie sprawia również uzyskanie próbki do badania. W takim przypadku wykonanie dodatkowych badań-testów może umożliwić uzasadnienie podejrzenia, że kierowca znajduje się pod wpływem środków odurzających. Do najczęściej polecanych i prostych badań należą: test stania na jednej nodze, próba palec-nos, próba Romberga i test poziomego oczopląsu. Jeśli wykonanie wymienionych testów umożliwi stwierdzenie 50% lub więcej objawów z listy kontrolnej (w zaproponowanych testach – dwóch lub więcej), należy uznać, iż próba jest dodatnia i budzi uzasadnione podejrzenie obecności środków odurzających w organizmie. Na przykład w teście stania na jednej nodze i liczenia na głos wynik powinien być uznany za pozytywny, jeżeli u badanej osoby wystąpią co najmniej dwa spośród czterech podanych objawów: *nie zrozumie poleceń, myli się podczas liczenia, co najmniej trzykrotnie będzie stawiała stopę na ziemi, podskakiwała lub używała ramion dla zachowania równowagi*. Czas wypowiedzanych liczb („1001, 1002, ...“) w sposób prawidłowy trwa około 1 sekundy dla każdej liczby, dlatego po odliczeniu do 1030 czas ten wyniósłby ok. 30 sekund. Podobny czas zostanie osiągnięty przy odliczaniu w zakresie od 21 do 51. Znaczące spowolnienie odliczania w omawianym zakresie (np. w czasie 40 sekund lub więcej) może być uznane jako „mylenie się podczas liczenia“. Należy zauważyć, iż dość często testy psychomotoryczne wymienione w tej części proponowanego protokołu nie wskazują wyraźnie na upośledzenie zdolności psychomotorycznych.

Dodatkowe testy wymienione w tej części powinny być również przeprowadzone w przypadku ujemnego wyniku dla śliny lub moczu przy jednoczesnym wyraźnym zaburzeniu psychomotorycznym kierowcy, co może mieć miejsce np. po przyjęciu nowych narkotyków (tzw. dopalaczy) lub psychoaktywnych leków nie objętych kontrolą prawną. W przypadku stwierdzenia 50% lub więcej objawów z listy kontrolnej dodatkowych testów należy pobrać krew do dalszych badań laboratoryjnych w kierunku obecności substancji działających podobnie do alkoholu.

Protokół badania próbki śliny

Badanie próbki śliny jest jednym z najbardziej miarodajnych, łatwych do wykonania i obiektywnych metod na sprawdzenie obecności substancji działających podobnie do alkoholu. Obecnie polska policja coraz częściej stosuje automatyczne testy śliny (np. „Dräger Drug-Test 5000“), dokonujące interpretacji wyniku analizy oraz umożliwiające wydruk wyniku.

Nadal dużo bardziej rozpowszechnione są jednak testy manualne (np. „Mavand RapidSTAT“, „Securetec DrugWipe 6+“, „Branan Oratect III“), w których interpretacja wyniku może być utrudniona, ponieważ w zależności od producenta i rodzaju testera na ślinę wynik pozytywny stwierdza się w niektórych z nich na podstawie pojawiającego się paska, a w innych na podstawie jego braku. Wątpliwości w interpretacji mogą się również pojawić ze względu na czas odczytu wyniku testu. Po zainicjowaniu reakcji na testerze manualnym należy przestrzegać instrukcji producenta, co do określonego czasu odczytu wyniku. Używając testerów manualnych policjant dokonuje interpretacji uzyskanego wyniku na miejscu kontroli. Ta część załącznika ma pomóc funkcjonariuszowi policji we właściwej interpretacji i dokumentacji analizy śliny.

WNIOSKI

Procedura postępowania funkcjonariuszy policji z osobą podejrzaną o przyjęcie środka odurzającego wymaga doprecyzowania, ujednoczenia i uproszczenia (tam gdzie to jest możliwe) w skali całego kraju.

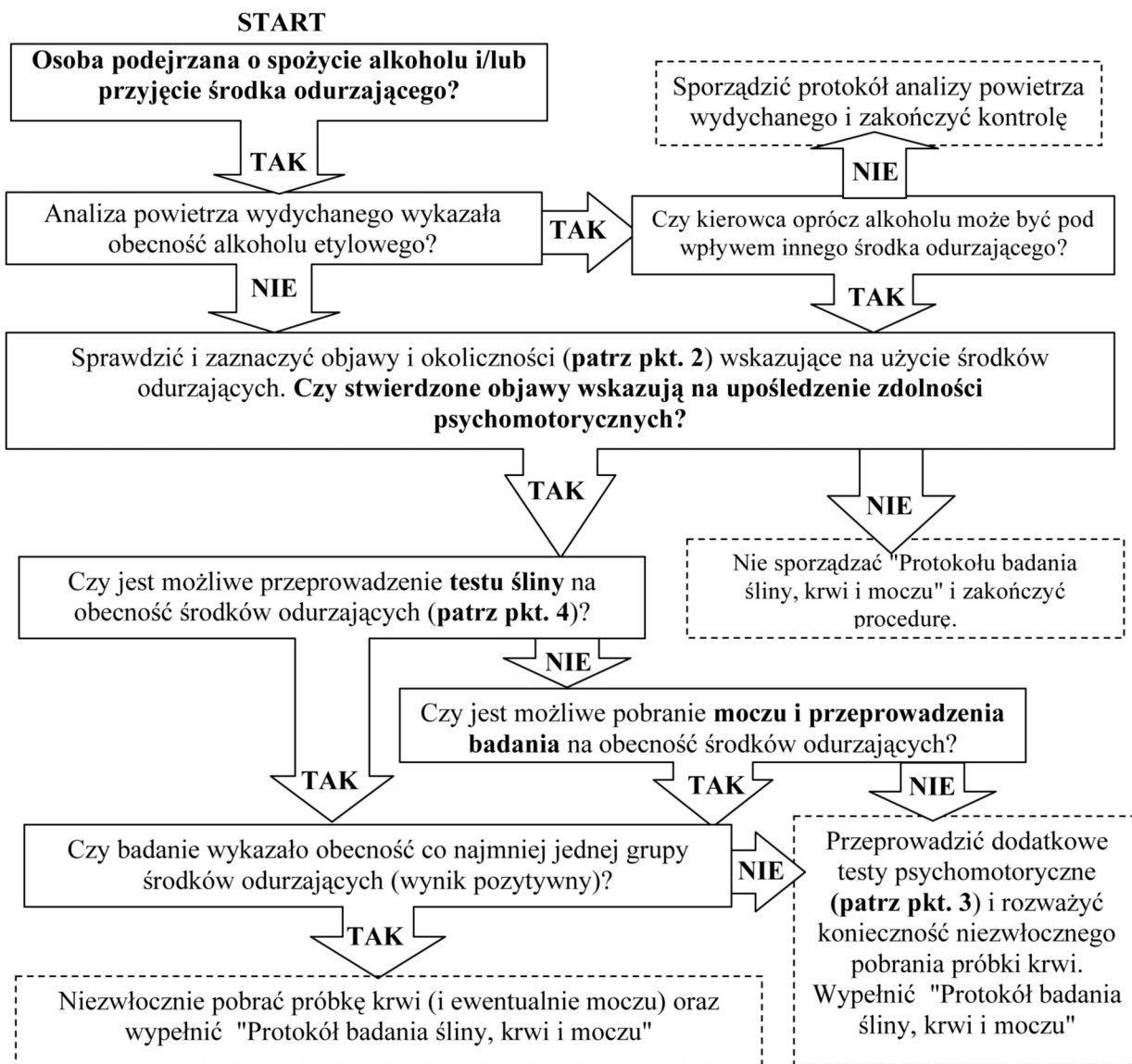
Właściwie udokumentowane badania materiału biologicznego i testy psychomotoryczne związane z zaburzeniem świadomości kierowców, przeprowadzane pod nadzorem funkcjonariuszy policji, stanowią obok badań lekarskich miarodajne podstawy do wydania jednoznacznej opinii przez biegłych sądowych. Tego rodzaju dokumentacja jest szczególnie istotna wobec braku prawnych granic stężenia substancji psychoaktywnych wskazujących na osłabienie zdolności psychomotorycznych.

Należy stwierdzić, iż na obecnym etapie rozwoju nauk związanych z bezpieczeństwem ruchu drogowego w aspekcie wpływu środków odurzających na zdolności psychomotoryczne kierowców należy zintensyfikować szkolenia funkcjonariuszy policji w zakresie rozpoznawania upośledzenia zdolności do

kierowania pojazdami mechanicznymi przez osoby
będące pod ich wpływem.

Załącznik do „protokołu badania śliny/krwi/moczu”.
Appendix to the protocol of saliva/blood/urine testing.

1) Schemat postępowania z osobą podejrzaną o przyjęcie środka odurzającego



2) Opis objawów i okoliczności *

<p>Sposób poruszania się pojazdem po drodze:</p> <ul style="list-style-type: none"> •nieutrzymywanie prostego toru jazdy<input type="checkbox"/>; •niewłaściwa prędkość<input type="checkbox"/>; •nieustąpienie przejazdu<input type="checkbox"/>; •zagrożający bezpieczeństwu<input type="checkbox"/>; • kierowca w inny sposób zwrócił na siebie uwagę funkcjonariusza<input type="checkbox"/> 	<p>Średnica źrenic, mm</p>
<p>Po zatrzymaniu do kontroli zaobserwowano nienaturalne objawy fizyczne:</p> <ul style="list-style-type: none"> • brak<input type="checkbox"/>; • pocenie się<input type="checkbox"/>; • pobudzenie<input type="checkbox"/>; • wymioty<input type="checkbox"/>; • drgawki<input type="checkbox"/>; inne objawy<input type="checkbox"/> 	<p>● 9,0</p> <p>● 8,5</p> <p>● 8,0</p>
<p>Znajomość języka polskiego: •tak<input type="checkbox"/>, •nie<input type="checkbox"/>, •słaba<input type="checkbox"/>, •inne uwagi<input type="checkbox"/></p> <p>.....</p>	<p>● 7,5</p>
<p>Sposób mówienia: •wyraźny<input type="checkbox"/>; •jąkanie<input type="checkbox"/>; •niewyraźny<input type="checkbox"/>; •bełkotliwy<input type="checkbox"/>; •słowotok<input type="checkbox"/>; •odmawia rozmowy<input type="checkbox"/>; inne uwagi<input type="checkbox"/></p> <p>.....</p>	<p>● 7,0</p> <p>● 6,5</p>
<p>Nastrój / zachowanie kierowcy: •spokojny/opanowany<input type="checkbox"/>; •pobudzony<input type="checkbox"/>; •nienaturalnie wesoły<input type="checkbox"/>; •obojętny<input type="checkbox"/>; •próbuję się spoufalać<input type="checkbox"/>; •prowokacyjne<input type="checkbox"/>; •agresywne<input type="checkbox"/>; •zapłakany<input type="checkbox"/>; •inne<input type="checkbox"/>:</p> <p>.....</p>	<p>● 6,0</p>
<p>Wychodzenie kierowcy z samochodu: •normalnie<input type="checkbox"/>; •chwiejnie<input type="checkbox"/>; •musi trzymać się pojazdu<input type="checkbox"/>; •inne<input type="checkbox"/>:.....</p>	<p>● 5,5</p>
<p>Chód: •stabilny<input type="checkbox"/>; •powłóczyący nogami<input type="checkbox"/>; •niepewny<input type="checkbox"/>; •zataczający się<input type="checkbox"/>; •inne<input type="checkbox"/></p> <p>.....</p>	<p>● 5,0</p> <p>● 4,5</p>
<p>Badanie na zawartość alkoholu: •Tak<input type="checkbox"/>; •Nie<input type="checkbox"/>; •sporządzono odrębny protokół z badania<input type="checkbox"/>.</p> <p>Wynik badania powietrza wydychanego: •ujemny<input type="checkbox"/>, •dodatni<input type="checkbox"/> •w stężeniu mg/dm³.</p>	<p>● 4,0</p> <p>● 3,5</p>
<p>Oczy: •normalne<input type="checkbox"/>; •przekrwione<input type="checkbox"/>; •zażawione<input type="checkbox"/>; •błyszczące<input type="checkbox"/>; •rozbiegane<input type="checkbox"/>; •inne<input type="checkbox"/>:.....</p> <p>.....</p>	<p>● 3,0</p>
<p>Źrenice: •<u>prawa</u>: średnica około.....mm; •<u>lewa</u>: średnica około.....mm;</p> <ul style="list-style-type: none"> •Prawidłowa szerokość źrenic 3,0-6,5 mm<input type="checkbox"/>, •Nieprawidłowa szerokość źrenic: wąskie (<3,0mm)<input type="checkbox"/>, szerokie (>6,5 mm)<input type="checkbox"/>, •Średnice: równe<input type="checkbox"/>; nierówne<input type="checkbox"/>. •Występuje reakcja na światło: TAK <input type="checkbox"/> NIE<input type="checkbox"/> <p>inne uwagi:.....</p>	<p>● 2,5</p> <p>● 2,0</p> <p>● 1,5</p> <p>● 1,0</p>
<p>Inne obserwacje:</p> <ul style="list-style-type: none"> •znaleziono substancje: w proszku<input type="checkbox"/>, tabletki<input type="checkbox"/> etc.: • nietypowe przedmioty w samochodzie<input type="checkbox"/>, przy osobie<input type="checkbox"/> • inne uwagi:..... 	
<p>W przypadku braku testera na ślinę lub moczu, należy przeprowadzić DODATKOWE TESTY (patrz punkt 3)</p>	

* w przypadku wystąpienia danej cechy, zaznaczyć w kratkach odpowiednio znakiem krzyżyka „x“

3) DODATKOWE TESTY* umożliwiające ocenę zaburzenia zdolności psychomotorycznych kierowcy (w przypadku braku testera na ślinę lub mocz)

• **test stania na jednej nodze:** nie wykonywać testu w przypadku osób powyżej 65 lat, jednoocznych i z wyraźną nadwagą. Osoby z niewygodnym obuwiem (np. z wysokimi obcasami) powinny mieć możliwość jego zmiany. Kierowca stoi przez ok. 30 sekund wyprostowany z uniesioną prawą nogą do tyłu nad ziemią. W takiej pozycji powinien zacząć liczyć głośno: „*tysiąc jeden, tysiąc dwa, tysiąc trzy*” itd. Liczenie ma się odbywać tak długo, aż policjant poprosi go o przerwanie po ok. 30 sekundach. Test jest powtarzany z uniesioną lewą nogą.

Test jest pozytywny jeżeli (jeśli wystąpią co najmniej dwa elementy spośród czterech wymienionych): badana osoba nie rozumie poleceń , myli się podczas liczenia , podczas badania co najmniej trzykrotnie stawiała stopę na ziemi , podskakiwała lub używała ramion dla zachowania równowagi .

Brak opisanych w tym teście objawów obniżonej sprawności psychomotorycznej .

• **próba palec-nos:** kierowca próbuje dotknąć palcem wskazującym końca swojego nosa stojąc wyprostowany z odchyloną do tyłu głową. Osoba badana dotyka z zamkniętymi oczami palcem wskazującym prawej i lewej ręki naprzemiennie np. w kolejności: lewa-prawa, lewa-prawa, prawa-lewa.

Test jest pozytywny jeżeli (co najmniej dwa elementy spośród czterech wymienionych): badana osoba nie zrozumie poleceń , nie trafia palcem w koniec nosa , myli strony lewa-prawa lub nadmiernie chwieje się na boki oraz do przodu i do tyłu .

Brak opisanych w tym teście objawów obniżonej sprawności psychomotorycznej .

• **próba Romberga:** kierowca stoi przez 30 sekund ze złączonymi stopami, zamkniętymi oczami oraz opuszczonymi kończynami górnymi. Badany sygnalizuje, że upłynęło 30 sekund opuszczając głowę w dół.

Test jest pozytywny jeżeli (co najmniej dwa elementy spośród czterech wymienionych): badana osoba nie zrozumie poleceń , oszacowany przez kierowcę czas różni się o co najmniej plus/minus 10 sekund , kierowca niezdolny jest do stania ze złączonymi stopami lub nadmiernie chwieje się na boki oraz do przodu i do tyłu .

Brak opisanych w tym teście objawów obniżonej sprawności psychomotorycznej .

• **test poziomego oczopląsu:** policjant trzyma pewien przedmiot (np. długopis) na przeciwko oczu kierowcy. Następnie policjant zaczyna przesuwając przedmiot w lewą i prawą stronę prosząc jednocześnie kierowcę, aby trzymał głowę prosto i tylko oczami (nie ruszając głową) śledził ruch przedmiotu. Policjant obserwuje ruch oczu (żrenic) kierowcy.

Test jest pozytywny jeżeli (co najmniej dwa elementy spośród trzech wymienionych): u badanej osoby ruch oczu za przedmiotem będzie nierówny i nerwowy , kierowca będzie miał trudności w stabilnym utrzymaniu głowy z tendencją do poruszania całą głową w celu śledzenia ruchu przedmiotu .

Brak opisanych w tym teście objawów obniżonej sprawności psychomotorycznej .

Zachowanie podczas kontroli: (czas trwania kontroli: od godz. : do godz. :)

•nie uległo zmianie , •coraz bardziej odbiegało od normy , •stawało się bardziej normalne .

Inne obserwacje:.....

Objawy stwierdził i protokół sporządził:

.....

Imię i nazwisko

Podpis

* w przypadku wystąpienia danej cechy, zaznaczyć w kratkach odpowiednio znakiem krzyżyka „x”

4) Protokół badania próbki śliny *

Nazwa handlowa zastosowanego testu:

W przypadku badania śliny zaznacz (zgodnie z instrukcją obsługi producenta testera śliny), czy **wynik pozytywny (=obecny środek odurzający)** jest wtedy, gdy:

- pojawia się pasek ;
- nie pojawia się pasek .

Wg instrukcji wynik testu należy odczytać w czasie od do minut.

Wynik testu odczytano po upływie: minut.

Linie barwne (paski) przy grupach substancji psychoaktywnych:

Pasek:	AMP*	BZO	COC	OPI	MET-MDMA	THC
wyraźny	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
słabo widoczny	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
brak	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kontrolny (C)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

* - należy sprawdzić, jakim skrótem nazw na testerach odpowiadają jakie grupy substancji psychoaktywnych. Powyżej przyjęto: AMP – amfetaminy, BZO – benzodiazepiny, COC – kokaina, OPI – opiaty, MET-/MDMA - metamfetamina i MDMA, THC – tetrahydrokannabinole. W przypadku różnic należy skreślić skrót i wpisać prawidłowy.

Wynik badania próbki śliny:

- negatywny (ujemy) ,
- dodatni (pozytywny) wykazujący obecność substancji psychoaktywnej z grupy:
-
-

.....
data, godzina i czytelny podpis osoby przeprowadzającej badania

.....
czytelny podpis osoby badanej

* w przypadku wystąpienia danej cechy, zaznaczyć w kratkach odpowiednio znakiem krzyżyka „x“

PIŚMIENICTWO

1. Portal zdrowia publicznego Komisji Europejskiej, Bezpieczeństwo drogowe, DG Health and Consumer Protection, Brussels (odczytano: 16.08.2012).

http://ec.europa.eu/health-eu/my_environment/road_safety/index_pl.htm

2. Podda F., Drink Driving: Towards Zero Tolerance, European Transport Safety Council, Brussels, 24.04.2012,

http://www.etsc.eu/documents/Drink_Driving_Towards_Zero_Tolerance.pdf

3. Hargutt V., Krüger H. P., Knoche A.: Driving under the influence of alcohol, illicit drugs and medicines. Risk estimations from different methodological approaches, Project No. TREN-05-FP6TR-S07.61320-518404-DRUID, 6th Framework Programme, Deliverable (1.3.1), 28.11.2011, University of Würzburg, Germany, p. 28.

http://www.druid-project.eu/cln_031/nn_107548/Druid/EN/deliverables-list/downloads/Deliverable_1_3_1,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/Deliverable_1_3_1.pdf

4. Korczyńska M., Kulikowska J., Celiński R., Nowicka J., Rojek S., Uttecht-Pudętko A.: Stan

„pod wpływem substancji odurzających lub psychotropowych“ – porównanie wyników badań toksykologicznych z oceną lekarską w materiałach Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej i Toksykologii Sądowo-Lekarskiej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Arch. Med. Sąd. Kryminol., 2011, LXI: 35-42.

5. Think Fast!, GAME: Test Your Reaction Time, program komputerowy, Division of Sleep Medicine, Harvard Medical School (odczytano: 24.12.2012) <http://healthysleep.med.harvard.edu/railroad-sleep/read-your-signals/game-reaction-time>

6. Moeller M. R., Steinmeyer S., Bregel S., The German approach to solving the problem of driving under the influence of drugs, Problems of Forensic Sciences, vol. XLII, 2000: 152-159.

7. Moffat A. C., Osselton M., David M., Widdop B., Watts J.: Alcohol, drugs and driving, Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Fourth edition, Pharmaceutical Press, London, 2011.

8. Flanagan R. J., Taylor A., Watson I. D., Whelpton R.: Fundamentals of analytical toxicology, Wiley 2007.

9. Szukalski B.: NARKOTYKI – kompendium wiedzy o środkach uzależniających, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa 2005.

Adres do korespondencji:

Marek Wiergowski

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

e-mail: marwier@gumed.edu.pl

Ewa Tomczak, Marek Wiergowski, Zbigniew Jankowski, Jolanta Anita Wilmanowska

Dekstrometorfan (DXM): nowe metody odurzania się nastolatków – opis przypadku

Dextromethorphan (DXM): new methods of intoxications among teenagers – a case description

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

W pracy zwrócono uwagę na problem odurzania się przy użyciu substancji i/lub preparatów, do których obecnie młodzież ma nieograniczony dostęp. Na podstawie przypadku opracowanego w tujejszym Zakładzie autorzy dotarli do informacji, które ukazują „pomysłowość“ dzisiejszych nastolatków przejawiającą się w rodzajach preparatów wykorzystywanych do wprowadzenia się w stan euforii i odurzenia. W pracy opierano się na sprawie 17-letniej kobiety, która – w celu wywołania efektów psychoaktywnych – zażyła Acodin oraz powietrze sprężone do czyszczenia klawiatur komputerowych. W badaniach jakościowych i ilościowych wykorzystano metody: GC-FID i GC-MS. Uzyskane wyniki porównano z istniejącymi danymi literaturowymi.

The study highlighted the problem of intoxication using substances and/or preparations, to which nowadays young people have unrestricted access. Based on the case developed in the Department of Forensic Medicine of the Medical University of Gdansk, our team members were able to gather information showing „ingenuity“ of today’s teenagers, which was reflected in the types of preparations used to induce a state of euphoria and intoxication. The study was based on the case of a 17-year-old woman, who took Acodin in combination with compressed air used to clean computer keyboards in order to induce psychoactive effects. The study used qualitative and quantitative methods: GC-FID and GC-MS. The results were compared with data from the literature.

Słowa kluczowe:

dekstrometorfan, sprężone powietrze,

zjawisko tolerancji,
substancje odurzające
i psychotropowe

Key words:

dextromethorphan, compressed air,
phenomenon of tolerance,
narcotic and psychotropic substances

WSTĘP

Wyniki badania, przeprowadzonego w 2008 roku, mającego na celu oszacowanie skali używania przez młodzież w Polsce narkotyków, wskazują na tendencję spadkową w porównaniu z okresem wcześniejszym (o 9% w odniesieniu do 2003 roku). Nasuwa się więc pytanie, co dzisiejsza młodzież postrzega jako substancje narkotyczne. Analiza danych statystycznych i piśmiennictwa [1] oraz doniesień medialnych wskazuje, że nastolatki coraz częściej sięgają po łatwo dostępne środki farmakologiczne i inne substancje chemiczne nie będące lekami, co zapewnia im osiągnięcie efektu odurzenia porównywalnego do typowych narkotyków takich jak np. kannabinoidy czy amfetamina. Wirtualny świat Internetu, w tym m.in. amatorskie filmy, dostarcza im informacji o rodzajach takich środków, sposobach na ich zdobycie, a także instruuje o sposobie zażycia oraz o dawce, jaka jest niezbędna do wywołania pożądanego efektu farmakologicznego. Zachęcające do takiego eksperymentowania mogą być również zamieszczane na forach internetowych wpisy, niejednokrotnie bardzo szczegółowo obrazujące doznania występujące po zażyciu danego środka.

OPIS PRZYPADKU

W czerwcu 2011 roku na stadionie w miejscowości P. w województwie pomorskim ujawniono zwłoki 17-letniej kobiety. W czasie śledztwa ustalono, że poprzedniego dnia w godzinach południowych miała ona zażyć 40 tabletek leku Acodin, a ponadto przyjmując drogą wziewną zawartość trzech puszek sprężonego powietrza. Przez kilka następnych godzin po zażyciu ww. środków spędzała czas ze znajomymi, swoim zachowaniem sprawiając wrażenie osoby będącej pod działaniem alkoholu. Ponadto miała bardzo wąskie źrenice i wymiotowała. Mówiła do świadków, że jest „kostką, pajaczką, piłeczką”. Około godziny 23.00 udała się ze swoim chłopakiem na teren stadionu miejskiego, gdzie – po kilkukrotnie odbytym stosunku płciowym – doszło między nimi do kłótni. W celu uciszenia kobiety mężczyzna stojąc za nią uciskał jej szyję umieszczoną w jego zgięciu łokciowym. Robił to przez około 5 minut – do chwili utraty przez nią przytomności, a następnie zgonu. Wyniki sądowo-lekarskiej sekcji zwłok oraz badania histopatologiczne wskazały, że kobieta zmarła śmiercią nagłą wskutek uduszenia gwałtownego, a bezpośrednią przyczyną jej zgonu było rozlane, ostre niedokrwienie i niedotlenienie mózgu.

W czasie oględzin i otwarcia zwłok stwierdzono pasmowate otarcie naskórka, przechodzące w pasmowate zaczerwienienie obejmujące ok. ¼ obwodu na skórze szyi, a w narządach szyi wylew w przyczepie lewego mięśnia mostkowo-obojęczkowo-sutkowego i w jednym z mięśni podgnykowych po stronie lewej oraz pod torebką prawego płata tarczycy, współistniejące z zasinieniem powłok twarzy i górnej części szyi, z bardzo licznymi wybroczynami śródskórnymi w powłokach twarzy i w spojówkach, pod czepcem ścięgnistym i w błonie śluzowej ust. Ponadto odnotowano dwie powierzchowne rany cięte w okolicy nadgarstka prawego. W czasie badania histopatologicznego z istotnych odchyłeń od stanu prawidłowego stwierdzono: przekrwienie i obrzęk płuc z licznymi, dość dużymi ogniskami niedodmy oraz przekrwienie i krwinkotoki okołonaczyniowe w mózgu. Wynik badania pośmiertnego oraz ustalone w czasie dochodzenia okoliczności i warunki śmierci wskazywały na uduszenie wskutek zagardlenia, co potwierdzono w czasie rozprawy sądowej.

Według zamieszczonych w aktach sprawy zeznań świadków kobieta już wcześniej zażywała Acodin oraz odurzała się sprężonym powietrzem.

MATERIAŁ

W czasie oględzin i otwarcia zwłok zabezpieczono wycinki narządów do badania histopatologicznego; krew i mocz do badania na zawartość alkoholu oraz krew, mocz i fragmenty wątroby, nerki, mózgu oraz ścianę żołądka z jego zawartością do analizy chemiczno-toksykologicznej.

METODYKA I WYNIKI ANALIZY TOKSYKOLOGICZNEJ

Etanol oraz wybrane lotne substancje organiczne (aceton, aldehyd octowy, metanol, propanole, butanole) oznaczano w próbach krwi i moczu rutynową metodą chromatografii gazowej sprężoną z techniką analizy fazy gazowej nadpowierzchniowej („head-space“) przy zastosowaniu detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID) [2].

Przesiewowa analiza toksykologiczna krwi i moczu w celu jakościowego wykrycia substancji odurzających (opiaty, benzodiazepiny, kokaina i jej metabolity, amfetamina/metamfetamina i ich pochodne, trójcykliczne leki przeciwdepresyjne, barbiturany) została przeprowadzona w moczu przy użyciu testów immunochromatograficznych „Syva Rapid Test d.a.u.“ firmy Siemens oraz we krwi metodą immunoenzymosorbcyjną (ELISA) przy użyciu testów firmy „Neogen“.

Badania potwierdzające w materiale biologicznym wykonano stosując metodę ekstrakcji cieczy-ciecz i kolumny ekstrakcyjne Extrelut firmy Merck [3] oraz techniką chromatografii gazowej. Po ekstrakcji zabezpieczonego materiału biologicznego badania potwierdzające przeprowadzono metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID) przy wykorzystaniu chromatografu *Focus GC* firmy ThermoFinnigan. Warunki analizy chromatograficznej: kolumna kapilarna Zebron ZB-5 firmy Phenomenex; temperatura detektora 330°C, temperatura dozownika 270°C, temperatura pieca programowana: od 200°C do 310°C (5°C/min), 310°C (5 min); gaz nośny: wodór o stałym natężeniu przepływu 1,5 ml/min. Równolegle analizowano roztwory wzorcowe dekstrome-

torfanu oraz opiatów: morfiny, 6-monoacetylmorfiny i kodeiny. Ponadto w celu wykrycia obecności innych substancji farmakologicznie czynnych ekstrakty krwi i moczu poddano analizie metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC-MS), używając chromatografu gazowego „DSQ Trace” firmy ThermoFinnigan pracującego w trybie skanowania jonów fragmentarycznych (SCAN) od 35 do 380 m/z. Analiza była prowadzona w następujących warunkach: kolumna kapilarna Zebron ZB-5 firmy Phenomenex, temperatura źródła jonów: 280°C, temperatura dozowania 250°C, temperatura programowana chromatografu: 50°C (1 min), 50°C do 200°C (20°C/min), 200°C (5 min), 200°C do 240°C (10°C/min), 240°C (5 min), 240°C do 285°C (10°C/min), 285°C (5 min); gaz nośny – hel, stałe natężenie przepływu 1,0 ml/min. Uzyskane wyniki analizy chromatograficznej GC/MS-SCAN porównywano z biblioteką widm masowych NIST/EPA/NIH z 2008 roku, zawierającej widma większości substancji farmakologicznie czynnych.

W celu wykrycia lotnych substancji organicznych wchodzących w skład sprężonego powietrza stosowanego do czyszczenia klawiatur (tj. propanu, butanu oraz pochodnych freonu w postaci 1,1,1,2-tetrafluoroetanu i 1,1-difluoroetanu) zastosowano technikę mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) z fazy gazowej w połączeniu z chromatografem gazowym i spektrometrem mas GC/MS „QP2010 Ultra” firmy Shimadzu w warunkach opisanych powyżej dla aparatu GC/MS firmy ThermoFinnigan. Do analizy składników lotnych stosowano polimerowe włókno sorpcyjne diwinylobenzen/karboksen/polidimetylosiloksan (DVB/CAR/PDMS) o grubości ww. sorbentów 50/30 μm i długości 2 cm firmy Supelco. Sorpcję lotnych składników na włóknie przeprowadzono w fazie gazowej nadpowierzchniowej przez 15 min, a następnie desorpcję wykonano w gorącym dozowniku ww. chromatografu gazowego przez 15 min (w trybie „Splitless”).

We krwi i w moczu nie stwierdzono obecności alkoholu etylowego oraz acetonu, aldehydu octowego, metanolu, propanoli i butanoli. Badania przesiewowe moczu umożliwiające wykrycie środków odurzających sugerowały obecność opiatów. W analogicznych badaniach przesiewowych krwi nie stwierdzono obecności: opiatów, amfetaminy, metamfetaminy i/lub jej pochodnych, kannabinoidów, kokainy i/lub jej metabolitów, benzodiazepin,

barbituranów i trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych. W badanych ekstraktach z krwi i moczu nie stwierdzono również obecności innych związków chemicznych, poza dekskrometorfaniem, dających się wykryć w zastosowanych warunkach chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Analiza chemiczno-toksykologiczna zabezpieczonych w czasie sekcji płynów ustrojowych i fragmentów narządów wewnętrznych pobranych ze zwłok kobiety wykazała obecność dekskrometorfanu (dalej opisywanym również jako „DXM”) w stężeniach przedstawionych w tabeli I [4, 5].

Tabela I. Porównanie stężeń DXM we krwi, moczu i narządach wewnętrznych zmarłej ze stężeniami śmiertelnymi DXM w piśmiennictwie [4, 5].

Table I. Comparison of DXM concentrations in blood, urine and internal organs of the deceased with fatal concentrations of DXM in the literature [4, 5].

Materiał badany Examined material	Stężenie DXM w analizowanym materiale biologicznym Concentrations of DXM in the analyzed biological material	Referencyjne stężenia śmiertelne DXM Reference fatal concentrations of DXM
Krew Blood	1,3 $\mu\text{g/ml}$	3,3 $\mu\text{g/ml}$ 5,1 $\mu\text{g/ml}$ 9,2 $\mu\text{g/ml}$
Mocz Urine	10,5 $\mu\text{g/ml}$	3,3 $\mu\text{g/ml}$
Treść żołądka Stomach contents	3,2 $\mu\text{g/ml}$	brak danych no data available
Wątroba Liver	11,8 $\mu\text{g/g}$	10,7 $\mu\text{g/g}$ 31,2 $\mu\text{g/g}$ 230,0 $\mu\text{g/g}$
Nerka Kidney	5,5 $\mu\text{g/g}$	4,3 $\mu\text{g/g}$
Mózg Brain	9,9 $\mu\text{g/g}$	3,5 $\mu\text{g/g}$

Uzyskane wartości stężeń DXM w badanym materiale biologicznym, w odniesieniu do śmiertelnych stężeń referencyjnych, potwierdzają, że kobieta zażyła ten środek na kilka godzin przed śmiercią.

Wykonana analiza jakościowa nie wykazała obecności substancji chemicznych, wchodzących w skład sprężonego powietrza do czyszczenia klawiatur (tj. propanu, butanu oraz ewentualnych pochodnych freonu: 1,1,1,2-tetrafluoroetanu i 1,1-difluoroetanu) w płynach ustrojowych i narządach wewnętrznych pobranych ze zwłok zmarłej kobiety.

OMÓWIENIE

Jak donoszą opracowania zrealizowanych w naszym kraju projektów traktujących o tym zagadnieniu, zażywanie przez młodzież leków dostępnych bez recepty (OCT, ang. *over-the-counter*) jest zjawiskiem zataczającym coraz szersze kręgi [6]. Dostępne w aptekach, kioskach, a także w sklepach spożywczych farmaceutyki o działaniu przeciwbólowym, przeciwkaszlowym i uspokajającym nie stanowią dla młodzieży bariery związanej z ich zakupem, tak jak mogło to być w przypadku typowych narkotyków. Nieograniczony dostęp do takich leków jak: dekstrometorfan, ibuprofen czy paracetamol prowadzi do rozwijania się zjawiska tolerancji organizmu polskich nastolatków na te środki farmakologiczne, coraz częściej używanych przez nich niezależnie od płci, statusu społecznego czy przekonań religijnych [2].

Obok ogólnodostępnych farmaceutyków coraz popularniejsze wśród naszej młodzieży są substancje chemiczne wprowadzane do organizmu drogą wziewną. Współczesny nastolatek coraz częściej zamienia klej na sprężone powietrze, używane do czyszczenia klawiatur w komputerach. Zjawisko to nadal jest rzadko opisywane w polskim piśmiennictwie naukowym oraz w tematycznych forach internetowych, natomiast stanowi od dawna znany problem m.in. wśród amerykańskiej młodzieży. Tak zwany „huffing”, czyli wdychanie aerozoli w celu wywołania odurzenia, jest od wielu lat zjawiskiem monitorowanym w USA. Już w 1999 roku National Institute on Drug Abuse (NIDA) w swoim raporcie wykazał, że ponad 19% populacji osiemnastolatków przynajmniej raz wykorzystowało aerozole w celu odurzenia [7].

Zarówno brak statystycznych danych pochodzących z polskich raportów i opracowań, a także brak znajomości zagadnienia wśród rodziców, pedagogów i lekarzy, nie pozwala na oszacowanie skali tego zjawiska w naszym kraju. Niemniej jednak konsekwencje nieograniczonego, łatwego dostępu zarówno do leków przeciwbólowych, przeciwkaszlowych, uspokajających, jak i substancji chemicznych obecnych w aerozolach – przeznaczonych do zgoła odmiennego zastosowania – już dziś są widoczne w Polsce. Według raportu organizacji *The European School Survey Project on Alcohol and Other Drugs* (ESPAD) z 2011 roku, dotyczącego używek stosowanych przez młodzież, wynika, że do nadużywania leków w Polsce przyznaje się 15% nastolatków, co świadczy, że ponad dwukrotnie przekraczamy europejską średnią [8].

Źródłem dostarczającym informacji na temat narkotyków jest od wielu lat Internet. Na ogół dostęp do tych danych jest ograniczany tylko na podstawie deklaracji dojrzałości lub koniecznością wcześniejszej rejestracji, co praktycznie nie stanowi przeszkody dla współczesnej młodzieży. W popularnym portalu „YouTube” są zamieszczone krótkie filmy na temat efektów działania stosowanego przez młodzież DXM, co jest łatwe do odnalezienia w samych tytułach filmów, np. „DXM 600 mg Trip”, „1000 mg dxm trip” czy „1440 mg of dxm tripping balls”. Film o nazwie „DXM tripping” zaczyna się od wyświetlenia tekstu w języku angielskim: *Jest godzina 00:30. Wzięteś około 400 mg DXM około godziny temu. Rzeczy stają się po prostu trochę dziwaczne.* Pod filmem autor filmu podał następującą informację: *To jest krótki film o tym, jakie są wizualne efekty działania dekstrometorfanu przypominające podróż. Zasadniczo, taka podróż występuje po przyjęciu podanej dawki. Ekstremalna dezorientacja, utrata tożsamości, przypadkowe obrazy migające przed oczami, utrata rzeczywistości, słyszenie muzyki, paranoja i euforia* [9]. Na tym samym portalu umieszczone są również filmy, które w zamierzeniu mają odstraszać od przyjmowania narkotyków, ale w rzeczywistości również stanowią źródło informacji praktycznych dla korzystających młodych osób. Przykładem może być film z nastoletnią Allison, która jest uzależniona od wdychania składników sprężonego powietrza do czyszczenia sprzętu komputerowego z kurzu (wg opisu prezentowanego w trakcie wyświetlania filmu Allison wdycha

cha do 10 puszek ze sprężonym powietrzem dziennie) [10].

Dekstrometorfan jest nieopiodowym syntetycznym analogiem kodeiny, czego skutkiem jest jego działanie przeciwkaszlowe. Oddziałując na rdzeń przedłużony podwyższa próg kaszlowy. Dekstrometorfan jest szybko wchłaniany z przewodu pokarmowego osiągając maksimum stężenia we krwi w ciągu 2,5 godziny od zażycia, a jego okres półtrwania wynosi 3-6 godzin. W organizmie ulega procesom biotransformacji w wątrobie przez układ cytochromu P₄₅₀ (CYP2D6). DXM w dawkach terapeutycznych nie powoduje uczucia euforii, efektów uzależnienia, jak również nie uśmierza bólu [11].

Dekstrometorfan, jako agonista receptora σ -1 i antagonistą receptora NMDA (N-metyl-D-asparaginianu), powoduje podobne efekty farmakodynamiczne jak LSD (dietylamid kwasu lizergowego), ketamina czy psylocybina. W związku z tym DXM należy do grupy substancji charakteryzujących się wywoływaniem psychoaktywnego i dysocjacyjnego efektu. Do niedawna DXM ze względu na strukturę chemiczną podobną do kodeiny był klasyfikowany jako syntetyczny opioid. Obecnie nie jest zaliczany do grupy opioidów. W przeciwieństwie do większości opioidów, DXM nie wykazuje powinowactwa do receptorów μ i δ . Jego przeciwkaszlowy efekt działania wywołany jest za pośrednictwem receptorów σ -1 i NMDA. W etiopatogenezie uzależnienia od DXM upatruje się decydującej roli w zaburzeniach mechanizmu działania układów GABA-ergicznego i glutaminergicznego [12]. Wg części badaczy dekstrometorfan, będąc antagonistą receptora NMDA, a tym samym układu glutaminergicznego – posiada potencjał uzależniający, a wywołany przez niego efekt psychotropowy można porównać do upojenia alkoholowego [13].

Dekstrometorfan na polskim rynku farmaceutycznym występuje w preparacie o nazwie Acodin w postaci tabletek zawierających 15 mg bromowodoru dekstrometorfanu w jednej tabletkie [14]. Wg piśmiennictwa toksykologicznego minimalna dawka śmiertelna DXM wynosi 500 mg [15], co wymaga zażycia 33 tabletek dostępnego w Polsce leku Acodin. Tak więc biorąc pod uwagę powyższe źródło informacji można uznać, że w opisywanym przypadku zażyta dawka leku mogła doprowadzić do zgonu. Należy zwrócić uwagę, że według portalu zwolenników narkotyków „The Vaults of Erowid”,

zawierającego informacje o dawkach DXM przyjmowanych przez młode osoby w celu odurzenia wraz z opisem efektów ich działania, dawki te (stwarzające ryzyko śmierci) są większe od podawanych w piśmiennictwie toksykologicznym (tabela II) [16].

Tabela II. Szacowane dawki i działanie „rekreacyjne” DXM prezentowane w Internecie przez portal „The Vaults of Erowid” [16].

Table II. Estimated doses and “recreational” effect of DXM presented on the Internet through the portal “The Vaults of Erowid” [16].

Dawka i działanie DXM przyjętej doustnie Dose and effect of DXM taken orally	
Progowa / Threshold	nieznana dawka dose unknown
Słabe / Mild	100-200 mg
Średnie / Moderate	200-400 mg
Silne / Strong	300-600 mg
Bardzo silne / Very strong	600-1500 mg
Ryzyko śmierci / Death risk	2500-20 000 mg

Wg tego źródła informacji zażycie 40 tabletek Acodinu (czyli 600 mg DXM) mogłoby wywołać działanie „silne” i „bardzo silne”, jednak nie przekraczające dawki określonej w tabeli II jako „ryzyko śmierci” (powyżej 2500 mg DXM).

WNIOSKI

Leki dostępne bez recepty (OTC) są często nadużywane przez młode osoby i stosowane poza jakąkolwiek kontrolą medyczną. Duże dawki takich leków jak DXM są stosowane w celu odurzenia, a rozpowszechnieniu ich stosowania sprzyja swobodny dostęp do informacji w Internecie. Podobnie groźne i uzależniające są lotne węglowodory zawarte w sprężonym powietrzu do czyszczenia urządzeń i akcesoriów komputerowych. W opisa-

nym przypadku zgon siedemnastolatki nastąpił wskutek uduszenia gwałtownego (konkretnie: wskutek zadławienia, to jest zbrodniczego ucisku na narządy szyi), a bezpośrednią przyczyną jej zgonu było rozlane, ostre niedokrwienie i niedotlenienie mózgu.

PIŚMIENNICTWO

1. Kolbowska A.: Konsumpcja substancji psychoaktywnych przez młodzież szkolną, Serwis informacyjny NARKOMANIA, Krajowe Biuro ds. Przeciwdziałania Narkomanii, 2009, 1(45): 33-41. <http://www.narkomania.org.pl/czasopisma/Serwis-Informacyjny-Narkomania>.

2. Wiergowski M., Tomczak E., Szpiech B.: Oznaczanie etanolu w płynach ustrojowych metodą chromatografii gazowej HS-GC-FID, Standardowa Procedura Postępowania, SOP 11/01/toks, 15.03.2011.

3. Galer-Tatarowicz K., Szpiech B., Wiergowski M.: Oznaczenia opiatów w materiale biologicznym w układzie GC/MS-SIM, Standardowa Procedura Postępowania, SOP 9/01/toks, 29.09.2010.

4. Kintz P., Mangin P.: Toxicological findings in a Heath involving dextrometorphan and terfenadine, *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1992, 13: 351-352.

5. Rammer L., Holmgren P., Sandler H.: Fatal intoxication by dextrometorphan: a report on two cases. *Forensic Sci. Int.*, 1988, 37: 233-236.

6. Pisarska A.: Doświadczenia i opinie młodzieży na temat leków dostępnych bez recepty, Serwis Informacyjny NARKOMANIA, Krajowe Biuro ds. Przeciwdziałania Narkomanii, 2008, 4(43): 35-40. <http://www.narkomania.org.pl/czasopisma/Serwis-Informacyjny-Narkomania>.

7. Volkow N. D. (ed.): Inhalant Abuse, Research Report Series, National Institute on Drug Abuse, July 2012, 10-3818, 1-8. <http://www.drugabuse.gov/sites/default/files/rrinhalants.pdf>.

8. Hibell B., Guttormsson U., Ahlström S., Bala-kireva O., Bjarnason T., Kokkevi A., Kraus L.: Substance Use Among Students in 36 European

Zażyte przez nią wcześniej preparaty zawierające DXM oraz lotne substancje organiczne wpłynęły na jej znaczne odurzenie i nie w pełni świadome działanie w okresie przed tragicznym wydarzeniem.

Countries, The 2011 ESPAD Report, ESPAD, May 2012, 115. http://www.espad.org/Uploads/ESPAD_reports/2011/The_2011_ESPAD_Report_FULL_2012_06-08.pdf.

9. Crocadum, DXM tripping, YouTube, wprowadzono do portalu – 05.03.2009 roku, <http://www.youtube.com/watch?feature=fwp&NR=1&v=7rOiPDxWwZo>.

10. Doddsy, Meet Allison, the teenage girl who inhales computer duster cleaner for fun, 24hrs a day, YouTube, wprowadzono do portalu – 28.06.2009 roku, <http://www.youtube.com/watch?v=Zsz2yT9ZNxl>.

11. Bem J. L., Peck R.: Dextrometorphan: an overview of safety issues. *Drug Saf.* 1992, 7: 190-9.

12. Romanelli F., Smith K. M.: Dextrometorphan abuse: clinical effects and management. *J Am Pharm Assoc* 2003; 49: 20-5 i 8-Miller S. C.: Dextrometorphan psychosis, dependence and physical withdrawal. *Addict Biol*, 2005, 10: 325-327.

13. Soyka M., Bondy B., Eisenburg B., Schütz C. G.: NMDA receptor challenge with dextrometorphan-subjective response, neuroendocrinological findings and possible clinical implications. *J Neural Transm*, 2000, 6: 701-714.

14. Podlewski J., Chwalibogowska-Podlewska A.: Leki współczesnej terapii. Medical Tribune Polska, Warszawa 2009, wydanie XIX: 238.

15. Moffat A. C., Osselton M. D., Widdop B., Watts J.: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 4th edition, Pharmaceutical Press, Londyn, 2011, 1218-1219.

16. The Vaults of Erowid, DXM Dosage, informacja odczytana w Internecie w dniu 29.08.2012 roku, http://www.erowid.org/chemicals/dxm/dxm_dose.shtml

Adres do korespondencji:

Ewa Tomczak
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębowa 23, 80-204 Gdańsk
e-mail: ewatomczak@gumed.edu.pl

Michał Kaliszan

Próba określenia czasu zgonu na podstawie ograniczonych danych z miejsca ujawnienia zwłok

An attempt at estimating the time of death based on limited data from death scene

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

W pracy przedstawiono przypadek zabójstwa, w którym istotnym faktem dla śledztwa było określenie czasu zgonu. Problemem okazał się brak istotnych danych z miejsca ujawnienia zwłok wynikający z późno i pobieżnie wykonanych oględzin ciała, a przede wszystkim braku wykonanego pomiaru temperatury ciała. Ze względu na powagę sprawy, mimo braku pomiaru temperatury ciała podjęto próbę określenia przedziału czasowego, w którym mógł nastąpić zgon. Ustalony przedział czasowy obejmował 10 godzin, w czasie których najprawdopodobniej nastąpił zgon i został określony na podstawie zachowania plam opadowych, stężenia pośmiertnego i zeznań świadków. Gdyby jednak wykonano pomiar temperatury ciała, który powinien być czynnością rutynową w czasie oględzin zwłok w miejscu ich ujawnienia, dokładność ustalenia czasu zgonu byłaby najprawdopodobniej znacznie większa.

The paper presents a case of murder, in which an important fact for the investigation was determination of the time of death. The problem was lack of relevant data from the death scene resulting from delayed and mismanaged external body examination, and particularly lack of body temperature measurement. Due to the gravity of the case, despite the lack of body temperature record, an attempt at estimating the time interval in which death occurred was undertaken. The time interval of 10 hours during which death most probably occurred was determined based on the stage of development of postmortem lividity, rigor mortis and also depositions of witnesses. If, however, body temperature at the death scene had been recorded, which should have been a routine action, the accuracy of the time of death estimation would most probably have been much higher.

Słowa kluczowe:

czas zgonu, temperatura ciała,
ogłędziny zewnętrzne zwłok,
miejsce ujawnienia zwłok,
plamy opadowe, stężenie pośmiertne

Key words:

time of death, body temperature,
external body examination, death scene,
postmortem lividity, rigor mortis

WSTĘP

Określanie czasu zgonu jest problemem od zawsze towarzyszącym medycynie sądowej i należy do głównych zadań medyka sądowego obecnego na miejscu ujawnienia zwłok. Prowadzone przez policję i prokuratora czynności śledcze przebiegają najwydajniej, jeżeli lekarz obecny przy oględzinach zwłok w miejscu ich ujawnienia jest w stanie stwierdzić, jaki w przybliżeniu czas minął od chwili śmierci. Możliwie precyzyjne ustalenie czasu śmierci pozwala na weryfikację zeznań świadków i ocenę ewentualnego alibi osób podejrzanych. Ustalenie czasu śmierci ma też niekiedy znaczenie z punktu widzenia prawa cywilnego, gdyż od kolejności zgonów może zależeć m.in. kolejność dziedziczenia [1, 2].

W praktyce do ustalania czasu śmierci we wczesnym okresie po śmierci, nie przekraczającym kilkunastu godzin, stosuje się metody polegające na pomiarze temperatury ciała, zazwyczaj mierzonej w odczynie oraz metody oparte na ocenie zmian pośmiertnych [1, 2, 3, 4, 5].

Dlatego też istotne jest zebranie jak największej ilości danych w czasie oględzin zwłok w miejscu ich ujawnienia, aby określenie czasu zgonu mogło być

jak najbardziej dokładne. Do czynności lekarza należy przede wszystkim pomiar temperatury ciała oraz dokładna ocena cech plam opadowych i stężenia pośmiertnego, a także ewentualnych późnych przemian pośmiertnych. Przydatnym może być także zbadanie reakcji interleukynowych, takich jak mechaniczna i elektryczna pobudliwość mięśni czy reakcja źrenicy na podawane do worka spojówkowego lub gałki ocznej substancje farmakologiczne o działaniu rozszerzającym lub zwężającym źrenicę (atropina, acetylocholina, pilokarpina) [1, 2, 3].

Problem pojawia się natomiast jeśli podstawowe badania nie zostaną wcale lub prawidłowo przeprowadzone podczas oględzin zwłok, zwłaszcza wówczas gdy sprawa ma charakter kryminalny i określenie czasu zgonu jest decydujące dla śledztwa.

W niniejszej pracy przedstawiono próbę określenia czasu zgonu w przypadku zabójstwa, mimo braku istotnych badań wykonanych w czasie oględzin zwłok w miejscu ich ujawnienia, przede wszystkim przy braku pomiaru temperatury zwłok. Ze względu na wątpliwości pojawiające się w toku śledztwa ustalenie przybliżonego czasu zgonu było w tym przypadku kluczowe.

OPIS PRZYPADKU

Zwłoki kobiety zostały ujawnione przez syna w jej mieszkaniu około godz. 15.00. Zwłoki, ubrane w koszulę nocną, znajdowały się w łazience w pustej wannie w pozycji na brzuchu. Na szyi związana była pętla z tkanego paska. Syn przybył do mieszkania matki zaniepokojony telefonem od pracodawcy o niezgłoszeniu się matki na godz. 13.00 do pracy. Około godz. 16.00 przybyły na miejsce lekarz pogotowia ratunkowego stwierdził zgon, notując przy tym „ciało wychłodzone, sztywne”. Później wyjaśnił, że ciało było zimne w dotyku, a stężenie pośmiertne było wówczas silnie wykształcone w mięśniach żuchwy i kończyn. Wezwany na miejsce biegły lekarz dotarł około godz. 22.00. W czasie wykonanych oględzin zewnętrznych zwłok zanotował obecność wysyconych plam opadowych na przedniej powierzchni ciała, blednących przy ucisku palcem. Stężenie pośmiertne było silnie wyrażone we wszystkich grupach mięśniowych. Ciało było chłodne w dotyku – temperatura ciała nie została zmierzona. Biegły nie wykonywał więcej badań mających na celu ustalenie czasu

śmierci. Ustalono później, że temperatura otoczenia w łazience wynosiła między 23-25°C. Bezpośrednio z miejsca ujawnienia, ciało zostało przewiezione do prosektorium, gdzie znajdowało się przez kolejne 35 godzin ułożone na wznak w chłodni. Podczas oględzin ciała bezpośrednio przed sekcją zwłok stwierdzono m.in. plamy opadowe zlokalizowane na przedniej powierzchni ciała, na karku, bokach tułowia oraz w okolicy krzyżowej pleców. Stężenie pośmiertne było wówczas silnie wyrażone we wszystkich grupach mięśniowych. Cech rozkładu pośmiertnego nie stwierdzono. Masa ciała zmarłej wynosiła 75 kg. Na podstawie oględzin zewnętrznych i wewnętrznych zwłok przyczyna śmierci została określona jako zadzierzgnięcie w wyniku działania ręki obcej.

W czasie policyjnego śledztwa ustalono ponadto, że ofiara była na pewno widziana żywa w dzień poprzedzający ujawnienie zwłok około godz. 19.00, kiedy odwiedziła znajomą. Ustalono także, że ofiara miała w zwyczaju opuszczać mieszkanie około godz. 11.30 udając się do pracy.

Obecny na miejscu ujawnienia zwłok biegły na podstawie danych z oględzin ciała na miejscu ich ujawnienia oraz badań cech śmierci wykonanych bezpośrednio przed sekcją zwłok, wydał opinię, że do zgonu doszło nie wcześniej niż około godz. 10.00 w dniu ujawnienia zwłok. Wersji tej sprzyjały ponadto zeznania sąsiadki, mówiącej, że tego dnia około godz. 9.00 widziała ofiarę żywą w windzie, jadącą na dół i wychodzącą z bloku na dwór.

Wstępnie o zabójstwo został posądzony mąż zmarłej, z którym w ostatnim czasie przeżywała silny konflikt. Miał on jednak „alibi”, gdyż o godz. 5.15 opuścił mieszkanie i wyszedł do pracy, w której przebywał nieprzerwanie do godz. 17.00. Fakt ten został potwierdzony przez nagrania monitoringu, miejsca logowania jego telefonu komórkowego i zeznania współpracowników. Te okoliczności zmusiły prokuratora do zwolnienia uprzednio zatrzymanego męża ofiary i dalszego prowadzenia śledztwa.

Kolejna analiza danych z akt sprawy dokonana na okoliczność ustalenia możliwego przedziału czasowego, w którym nastąpił zgon wykazała, że skąpa ilość danych z miejsca ujawnienia zwłok nie pozwala na ustalenie przybliżonego czasu śmierci. Zakwestionowano przy tym przekonanie z uzyskanej wcześniej opinii, że do zgonu miałyby dojść nie

wcześniej niż około godz. 10.00 w dniu ujawnienia zwłok oraz interpretację określenia „przemieszczalności plam opadowych”. Według kwestionowanej opinii, skoro „przemieszczalność plam opadowych” występuje tylko do 12 godzin po śmierci [1], to gdyby do śmierci doszło przed godz. 10.00, to po odwróceniu ciała i ułożeniu go około godz. 22.00 w chłodni, w pozycji na wznak, plamy opadowe nie przemieściłyby się. Natomiast w protokole sekcyjnym plamy opadowe zostały odnotowane na przedniej, ale także tylnej powierzchni ciała.

W tym miejscu pojawia się jednak problem błędnej interpretacji „przemieszczalności plam opadowych”. Przez określenie „przemieszczalność plam opadowych” powinno się bowiem rozumieć zniknięcie („całkowita przemieszczalność” – do około 6 godz. pm) bądź wyraźne zblednięcie („częściowa przemieszczalność” – do około 12 godz. pm) plam opadowych na jednej powierzchni ciała i pojawienie się plam na przeciwległej powierzchni po odwróceniu zwłok [1]. W opisywanym przypadku plamy opadowe nawet nie zbledły istotnie na jednej powierzchni ciała, natomiast pojawiły się na drugiej przyjmując charakter dwumiejscowy [6].

Aby w świetle uprzednio wydanej opinii wykazać praktycznie, że plamy opadowe pojawiają się na powierzchniach ciała znajdujących się bliżej podłoża po odwróceniu ciała, nawet po kilkunastu godzinach po śmierci i mają wówczas podwójną lokalizację [6], wykonano demonstrację na zwłokach, którą udokumentowano fotograficznie. Demonstracja polegała na odwróceniu zwłok osoby zmarłej śmiercią nagłą z przyczyn chorobowych o dokładnie znanym czasie śmierci, po ich 16 godzinym przebywaniu w pozycji leżącej „na wznak”. Przed odwróceniem zwłok do pozycji „na brzuch” plamy opadowe były zlokalizowane na tylnej powierzchni ciała (ryc. 1). Po kolejnych 16 godzinach przebywania zwłok w pozycji „na brzuchu” ponownie oceniono lokalizację plam opadowych, stwierdzając obecność plam opadowych na tylnej powierzchni ciała (bez istotnych zmian względem uprzedniej lokalizacji) oraz pojawienie się „nowych”, mniej wysyconych plam opadowych na przedniej powierzchni ciała (ryc. 2). Analogiczną zmienność lokalizacji plam opadowych względem przedniej i tylnej powierzchni ciała stwierdzono w przedstawionym przypadku zwłok ofiary zabójstwa. Tak więc, wynik demonstracji potwierdził dane literaturowe [1, 6] i wykazał, że przynajmniej po 16 godzinach od śmierci plamy opadowe nie przemieszczają się z ustalonej wcześniej lokalizacji, natomiast w dalszym ciągu mogą pojawiać się „nowe” plamy opadowe po zmianie ułożenia zwłok. Te „nowe” plamy opadowe pojawiają się w przypadku przełożenia (obrócenia) zwłok tak długo, dopóki ich obraz nie zostanie zamazany przez zmiany gnilne w postaci zielonkawego podbarwienia skóry [6].



Ryc. 1. Lokalizacja plam opadowych po 16 godzinach przebywania ciała w pozycji na wznak. Plamy opadowe są dobrze widoczne na tylnej powierzchni ciała, przy ich braku na przedniej powierzchni.

Fig. 1. Location of postmortem lividity on the body with the corpse in the supine position for 16 hours after death. The postmortem lividity is well visible on the back, while it is not present on the frontal surface of the body.



Ryc. 2. Lokalizacja plam opadowych po obróceniu ciała widocznego na ryc. 1 do pozycji na brzuchu i przebywaniu w tej pozycji kolejne 16 godzin. Plamy opadowe są widoczne zarówno na tylnej powierzchni ciała (jak na ryc. 1) jak i na górnej i bocznych częściach klatki piersiowej i bocznej powierzchni brzucha i ud.

Fig. 2. Location of postmortem lividity after the body seen. in Fig. 1 was turned into the prone position and kept thus for another 16 hours. The postmortem lividity is visible both on the back (same position as in Fig. 1.) and also on the upper and lateral parts of the chest and lateral parts of the abdomen and thighs.

DYSKUSJA

Niecodzienny zbieg okoliczności w postaci pobieżnie przeprowadzonych oględzin zwłok w miejscu ich ujawnienia, opinia odnośnie czasu zgonu oparta o błędną interpretację pośmiertnego zachowania plam opadowych oraz nieprawdziwe zeznania istotnego świadka wpłynęły na nieprawidłowe określenie czasu zgonu i wprowadziły zamieszanie do śledztwa. Ponowna analiza akt sprawy oraz zachowania się plam opadowych na podobnym przypadku pozwoliły jednakże na zakreślenie przedziału czasowego, w którym mogło dojść do śmierci na okres między godz. 22.00 dnia poprzedzającego ujawnienie zwłok a godz. 8.00 w dniu ujawnienia zwłok (10 godzin). Aktualne wnioski dotyczące minimalnego czasu zgonu oparte były głównie o zeznania lekarza stwierdzającego zgon o godz. 16.00, który zanotował oziębienie i sztywność zwłok oraz brak cech rozkładu pośmiertnego mimo przebywania zwłok w temperaturze około 23-25°C do godz. 22.00, tj. do czasu przewiezienia ciała do chłodni. Za takim przedziałem czasowym przemawiał fakt, że do całkowitego wykształcenia się stężenia pośmiertnego i wychłodzenia ciała, które jest wyczu-

walne dotykem dochodzi nie wcześniej niż po 8 godzinach od śmierci jeżeli ciało przebywa w temperaturze pokojowej [1, 2, 6]. Praktyczna demonstracja możliwości wystąpienia dwumiejscowej lokalizacji plam opadowych wskazała, że od śmierci do odwrócenia zwłok na plecy podczas transportu do prosektorium mogło minąć 16 godzin, a nawet więcej. Natomiast za nie dłuższym niż 24-godzinny okres przebywania zwłok w mieszkaniu przemawiał brak cech rozkładu zwłok stwierdzony w czasie oględzin zewnętrznych mimo dość wysokiej temperatury otoczenia. Na godziny nocne lub poranne zgonu wskazywał z kolei pośrednio fakt, iż ofiara w chwili zabójstwa była ubrana w koszulę nocną.

Przedstawienie takich ustaleń odnośnie czasu śmierci spowodowało iż dotychczas wypierający się udziału w zbrodni podejrzany, mąż ofiary, przyznał iż w dniu ujawnienia zwłok wychodząc o godz. 5.15 do pracy wpuścił do mieszkania wcześniej wynajętych zabójców, którzy chwilę potem zamordowali jego żonę i opuścili mieszkanie. W międzyczasie okazało się, że wspomniana sąsiadka zeznająca, iż widziała ofiarę w dniu ujawnienia zwłok w windzie, cierpi na poważne zaburzenia pamięci i stąd jej zeznania stały się niewiarygodne.

WNIOSKI

Przedstawiony przypadek pokazuje jak ważne dla prawidłowego ustalenia przedziału czasowego, w którym nastąpił zgon jest dokładne przeprowadzenie oględzin zwłok w miejscu ich ujawnienia, włącznie z pomiarem temperatury ciała. W opisanym przypadku wynik pomiaru temperatury ciała najprawdopodobniej byłby kluczowym parametrem pomocnym w ustaleniu wąskiego przedziału czasowego, w którym nastąpił zgon, np. przy zastosowaniu nomogramu Henssgego [3] lub wykorzystaniu bazy opracowanych eksperymentalnie krzywych

pośmiertnego stygnięcia ciała [7]. Mógłby też zapobiec konieczności zlecenia dodatkowych analiz mających na celu ustalenie czasu zgonu, które mimo wszystko nie gwarantowały sukcesu. Niewykonanie istotnych, niepowtarzalnych czynności podczas oględzin zwłok w miejscu ich ujawnienia, co niestety czasami ma miejsce, powoduje utratę możliwości uzyskania ważnych danych, koniecznych dla ustalenia czasu zgonu. Wskutek niedokładnego lub błędnego określenia czasu śmierci może dojść do niepotrzebnego zagmatwania śledztwa, niewykrycia sprawców zabójstwa lub w najgorszym wypadku skazania niewinnego człowieka.

PIŚMIENNICTWO

1. Raszeja S., Nasiłowski W., Markiewicz J.: *Medycyna Sądowa*, PZWL, Warszawa, 1993.

2. Kaliszan M., Hauser R., Kernbach-Wighton G.: Estimation of the time of death based on the assessment of post mortem processes with emphasis on body cooling. *Legal Medicine* 2009, 11: 111-117.

3. Henssge C.: Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Sci. Int.* 1988, 38: 209-236.

4. Knight B. [red.]: *The estimation of the time since death in the early postmortem period*, Arnold, London 2002.

5. Althaus L., Henssge C.: Rectal temperature time of death nomogram: sudden change of ambient temperature. *Forensic Sci. Int.* 1999, 99: 171-178.

6. Pounder D. J.: Postmortem interval, [w:] *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine*, Payne-James J. [red.], Elsevier, Oxford, UK, 2005, 485-486.

7. Muggenthaler H., Sinicina I., Hubig M., Mall G.: Database of post-mortem rectal cooling cases under strictly controlled conditions: a useful tool in death time estimation. *Int. J. Legal Med.* 2012, 126: 79-87.

Adres do korespondencji:
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Dębowa 23
80-204 Gdańsk
e-mail: michalkal@gumed.edu.pl

Michał Kaliszan, Karol Karnecki, Zbigniew Jankowski

Przypadek śmiertelnego rażenia piorunem w nietypowym miejscu – centrum miasta

A case of fatal lightning stroke at an unusual site – the city center

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

W pracy przedstawiono przypadek śmiertelnego rażenia piorunem młodego mężczyzny przebywającego w czasie burzy w centrum dużego miasta. Nietypowość tego typu przypadku wynika z tego, że do rażenia piorunem dochodzi zazwyczaj na terenach otwartych (góry, pola, łąki) lub np. w przypadku osób próbujących schronić się przed burzą pod drzewem lub obiektem stojącym pojedynczo na otwartej przestrzeni. W opisanym przypadku do rażenia piorunem przyczynił się fakt, że mężczyzna ten najprawdopodobniej znajdował się w czasie burzy na metalowych rurach ciepłowniczych, budowanych w latach 70 i 80-tych, które niekiedy na długich odcinkach biegną w mieście wysoko nad ziemią. Metal, z którego wykonane są rury najprawdopodobniej spowodował przyciągnięcie pioruna, a powstały prąd śmiertelnie raził znajdującego się na nich człowieka.

A case of a fatal lightning stroke involving a young man staying in a storm near the center of a big city is presented. The atypical character of this case lies in the fact that the lightning stroke usually occurs in open areas (mountains, fields, meadows), or involves people trying to find shelter from the storm under a tree or an isolated object in an open area. In the described case, a contributory factor to the lightning stroke was the fact that during the storm, the man was most probably standing on metal heating pipes, built in the 70's and 80's, long stretches of which were erected high above the ground. Metal used in the construction of the pipes most probably attracted lightning and generated the current which electrocuted the man standing on their surface.

Słowa kluczowe:

rażenie piorunem, śmierć, uszkodzenia ciała

Key words:

lightning stroke, death, body injuries

WSTĘP

Wśród różnych rodzajów śmierci gwałtownej spotyka się przypadki, które są następstwem niekorzystnego oddziaływania warunków atmosferycznych. Oprócz dość często spotykanych przypadków śmierci z ochłodzenia (hipotermii) na uwagę zasługują stosunkowo rzadko spotykane przypadki śmierci wskutek porażenia piorunem. Do śmiertelnego porażenia piorunem dochodzi najczęściej w górach, rzadziej na dużych zbiornikach wodnych oraz rozległych, otwartych przestrzeniach z wysokimi drzewami i/lub budynkami [1, 2]. Według danych statystycznych w Polsce rocznie notuje się od kilkunastu do kilkudziesięciu śmiertelnych porażen piorunem [1]. W przypadkach śmiertelnego rażenia piorunem w czasie badania pośmiertnego oprócz zmian morfologicznych, uważanych za charakterystyczne dla tego rodzaju śmierci, takich jak tzw. figury piorunowe Lichtenberga, przypominające kształtem liść paproci [3], stwierdza się także inne zmiany, będące następstwem działania wysokiej temperatury oraz urazów mechanicznych, co powoduje, że przypadki takie mogą stwarzać trudności w ustaleniu przyczyny i okoliczności zgonu, często budząc podejrzenie przestępstwa. Wskutek porażenia niejednokrotnie dochodzi do powstania rozległych obrażeń ciała, najczęściej w postaci oparzeń widocznych w powłokach [2]. Ponadto u ofiar rażenia piorunem opisywano rozległe uszkodzenia ciała, włącznie ze złamaniem licznych kości [4], a u osób, które przeżyły obserwowano często przejściowe lub trwałe uszkodzenia, w tym układu nerwowego

w postaci paraliżu kończyn (*keratoparalysis*) [5], układu sercowo-naczyniowego [6], upośledzenie słuchu [7], a nawet zaburzenie funkcji układu pokarmowego w postaci np. ostrej rozstrzeni żołądka [1] czy upośledzenie funkcji nerek [8]. Skutkiem rażenia piorunem mogą być rany, niekiedy budzące podejrzenie ich spowodowania ręką obcą [9]. Opisano również powstałe na skutek wyładowania elektrycznego „wypalenia“ w powłokach kształtów metalowych przedmiotów np. biżuterii czy znajdujących się w kieszeni monet [10], a także zmiany termiczne we włosach w postaci charakterystycznego, perłowatego stopienia keratyny [11].

W niniejszej pracy, ze względu na nietypowe warunki i okoliczności ujawnienia zwłok oraz w celu edukacyjnego przedstawienia zagadnienia rażenia piorunem, postanowiono omówić przypadek takiego zgonu.

OPIS PRZYPADKU

W letni, sierpniowy poranek 2010 roku w jednej z dzielnic w bezpośredniej bliskości centrum miasta G., w okolicy dwupoziomowych, metalowych rur ciepłowniczych przebiegających na skrawku przystocznionych terenów zielonych, ujawniono zwłoki 38-letniego mężczyzny (ryc. 1). Ubrane w letnią odzież ciało leżało w odległości około 1 metra od rur ciepłowniczych, których drugi poziom znajdował się na wysokości około 8 metrów nad ziemią. Około 2 metrów od zwłok ujawniono otwarty, pusty plecak, a 4 metry dalej telefon komórkowy należący do zmarłego. Ponadto wokół zwłok znajdowały się rozrzucone, należące do zmarłego sandały. W czasie oględzin zwłok na miejscu ich znalezienia stwierdzono rozległe oparzenie prawego ramienia i przedramienia, wyraźnie odgraniczone od góry od skóry nieuszkodzonej (okrytej przez krótki rękaw koszulki, którą miał na sobie zmarły) (ryc. 2) oraz ranę tłuczoną głowy zlokalizowaną na potylicy w linii środkowej. Rana głowy oraz ślady mogące wskazywać na przeszukiwanie zmarłego i jego plecaka przez inne osoby wzbudziły podejrzenie śmierci wskutek przestępstwa. Wynik badania znamion śmierci, w tym pomiar temperatury w odbytnicy, wykazały, że mężczyzna zmarł w nocy poprzedzającej dzień ujawnienia jego zwłok.

W czasie oględzin i otwarcia zwłok stwierdzono rozległe termiczne uszkodzenie dolnej części ra-

mienia prawego oraz łokcia i przylegającej części przedramienia, z częściowym, powierzchownym zwęgleniem tkanek oraz obecnością różnej wielkości, po części łączących się ze sobą, uszkodzonych pęcherzy. Na dłoni lewej w okolicy kłębaka widoczne były zmiany o cechach makroskopowych znamienia prądu w postaci przyschniętych, szarobiaławych, twardych pęcherzyków, z zagłębieniem w części centralnej. Podobne zmiany stwierdzono na powierzchni grzbietowej palca II i III stopy lewej. Na głowie w okolicy potylicznej stwierdzono ranę tłuczoną, z wylewem krwawym w tkance podskórnej oraz w prawym mięśniu skroniowym. Zmianom tym nie towarzyszyło uszkodzenie kości czaszki ani makroskopowe zmiany urazowe wewnątrzczaszkowe. W czasie sekcji karku i pleców stwierdzono rozległe, masywne wylewy krwawe w mięśniach i w przestrzeniach międzymięśniowych zlokalizowane głównie w okolicy łopatek i w okolicy łądźwiowej (ryc. 3). Ponadto stwierdzono przekrwienie narządów wewnętrznych z obrzękiem płuc oraz płynną krew w dużych naczyniach i zatokach opony twardej mózgu jako cechy śmierci nagłej. W badanych narządach nie stwierdzono zmian chorobowych. W czasie oględzin zwłok nie stwierdzono na skórze zmian morfologicznych o cechach figury piorunowej zwanej figurą Lichtenberga. Na skórze brzucha stwierdzono natomiast lekkie zazielenienie jako wynik zmian pośmiertnych.

W czasie badania histopatologicznego w mózgu, płucach, sercu, wątrobie i nerkach stwierdzono autolizę i cechy zmian gnilnych. W zmienionej makroskopowo skórze ramienia wraz z przylegającą tkanką podskórną i mięśniem szkieletowym stwierdzono cechy termicznego uszkodzenia skóry właściwej oraz cechy morfologiczne znamienia prądu w naskórku (ryc. 4).

Badaniem chemicznym metodą enzymatyczną ADH i chromatografii gazowej we krwi pobranej ze zwłok zmarłego stwierdzono 1,0‰ alkoholu etylowego.

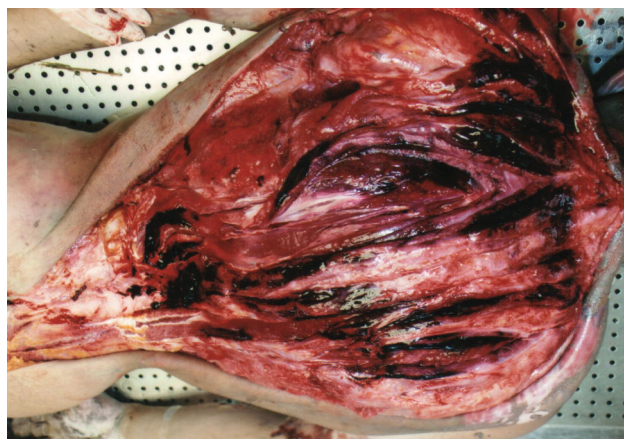
W obrębie odzieży (koszulka z krótkim rękawem – „T-shirt“, kąpielówki i krótkie spodenki) nie stwierdzono uszkodzeń mechanicznych ani termicznych.

W czasie śledztwa ustalono, że zmarły wieczorem poprzedniego dnia spożywał alkohol w towarzystwie znajomych, po czym wracał pieszo do domu trasą, na której znajdowało się miejsce ujawnienia jego zwłok. Ustalono ponadto, że tej nocy nad



Ryc. 1. Rury ciepłownicze, przy których znaleziono zwłoki.

Fig. 1. Heating pipes near which the body was found.



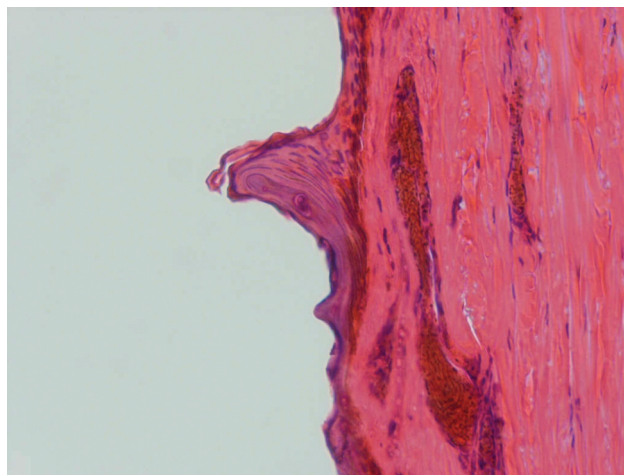
Ryc. 3. Obfite wylewy krwawe w mięśniach pleców.

Fig. 3. Massive hemorrhages in the muscles of the back.



Ryc. 2. Rozległe oparzenie prawej kończyny górnej.

Fig. 2. Extensive burns of the right upper limb.



Ryc. 4. Skóra – zmiany w jądrach komórkowych w naskórku charakterystyczne dla znamienia prądu elektrycznego oraz homogenizacja skóry właściwej odpowiadająca termicznemu uszkodzeniu. H+E 100 x.

Fig. 4. Skin – changes in epidermal cellular nuclei characteristic for electrical burns and homogenization of dermis reflecting a thermal lesion. H+E 100 x.

miastem przeszła silna burza z licznymi wyładowaniami atmosferycznymi.

DYSKUSJA

Piorun to chwilowe, przejściowe wyładowanie atmosferyczne o bardzo dużym ładunku elektrycznym, do którego dochodzi między chmurami lub między chmurą a ziemią. Najczęściej do wyładowań dochodzi w chmurach, a tylko niektóre zachodzą między chmurami a ziemią [12]. Prąd elektryczny w piorunie ma natężenie od 10.000 do 200.000 A, osiągające szczyt po upływie 5-10 mikrosekund, a napięcie od 20.000.000 do 1.000.000.000 V [13]. Uważa się, że do wyładowania dochodzi, kiedy różnica napięcia pomiędzy chmurą a ziemią lub innym obiektem przekroczy 2.000.000 V/m [12]. Temperatura wewnątrz (w rdzeniu) pioruna wynosi około 8.000°C [14]. Czas kontaktu wyładowania pioruna z rażonym przedmiotem lub człowiekiem trwa około 0,0001-0,001 sekundy [10]. Piorunowi towarzyszy także powstawanie fali uderzeniowej z bardzo silnym podmuchem powietrza [13].

Z powyższego wynika, że uszkodzenia ciała powstałe u osób porażonych piorunem są następstwem różnych mechanizmów działania. Wyróżnia się 4 mechanizmy rażenia piorunem [1, 15]:

- bezpośrednie uderzenie w ciało;
- wyładowanie iskrowe (flash discharge) powodujące przejście prądu po powierzchni ciała i związane z tym zazwyczaj rozległe oparzenia powłok i uszkodzenia ubrania;
- uderzenie pioruna w ziemię w pobliżu znajdującej się osoby powodujące wystąpienie tzw. „napięcia krokowego“;
- fala uderzeniowa powodująca uraz mechaniczny.

Tak więc stwierdzane u ofiar rażenia piorunem obrażenia ciała mogą być skutkiem bezpośredniego porażenia prądem, w związku z przepływem przez organizm prądu o bardzo wysokim natężeniu, a tak-

że skutkiem działania wysokiej temperatury oraz urazu mechanicznego [1, 2, 3, 4, 12]. Uraz mechaniczny może być następstwem zarówno działania fali uderzeniowej, jak i wtórnego odrzucenia ciała bądź upadku z wysokości.

W przedstawionym przypadku stwierdzone na ciele zmarłego uszkodzenia termiczne w postaci oparzenia ramienia i przedramienia odpowiadały tym spotykanym u ofiar rażenia piorunem [1, 2, 3, 4, 12] w mechanizmie wyładowania iskrowego i/lub wystąpienia napięcia krokowego. Potwierdzenie znamienia prądu uzyskano po badaniu histopatologicznym wycinków z oparzonej skóry prawej kończyny górnej zmarłego [16].

Na podstawie wyniku sekcji zwłok, analizy danych z miejsca ujawnienia zwłok oraz oględzin zewnętrznych zwłok w miejscu ich znalezienia, najbardziej prawdopodobnym wydaje się, że do porażenia prądem doszło wskutek uderzenia pioruna w metalowe rury ciepłownicze, na których mężczyzna ten wówczas przebywał lub ich dotykał. Lokalizacja rany tłuczonej głowy oraz stłuczenia mięśni pleców wskazywała, że w wyniku rażenia prądem doszło do upadku ww. z wysokości na tylną powierzchnię ciała (prawdopodobnie upadku z drugiego poziomu rur ciepłowniczych) i uderzenia plecami i tyłem głowy o rury znajdujące się poniżej, podłoże lub znajdujące się w pobliżu inne przedmioty. Niemniej jednak, do powstania wylewów krwawych w mięśniach pleców mogło dojść także w wyniku bardzo silnego skurczu mięśni z ich uszkodzeniem, w następstwie działania prądu elektrycznego „przeszywającego“ ciało pokrzywdzonego w chwili rażenia piorunem.

Obecność należącego do zmarłego plecaka, telefonu komórkowego i obuwia w odległości kilku metrów od zwłok można tłumaczyć tym, że w wyniku uderzenia pioruna doszło do odrzucenia ciała i ww. przedmiotów na pewną odległość, aczkolwiek nie można wykluczyć, że inna osoba po znalezieniu zwłok przeszukała zmarłego i nie zgłosiła tego faktu policji.

PIŚMIENICTWO

1. Skrok M., Nowicka A.: Skutki porażień wyładowaniami atmosferycznymi. *Na ratunek* 2009; 3: 34-37.
2. Sabała-Krzepkowski S., Guła P., Kosiński S., Jarczy J.: Porażenia piorunem w Tatrach Polskich. *Med. Intens. Rat.* 2008, 11: 5-10.
3. Resnik B. I., Wetli C. V.: Lichtenberg figures. *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1996, 17: 99-102.
4. Browne B. J., Gaasch W. R.: Electrical injuries and lightning. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 1992, 10: 211-229.
5. ten Duis H. J., Klasen H. J.: Keraunoparalysis, a "specific" lightning injury. *Burns* 1995, 12: 54-57.
6. Fontanarosa P. B.: Electrical shock and lightning strike. *Ann. Emerg. Med.* 1993, 22: 378-387.
7. Namysłowski G., Czecior E., Stęszewska U., Anyczkowska M.: Przypadek oparzenia ucha zewnętrznego i błony bębenkowej piorunem. *Otolaryngol. Pol.* 1995, 49: 356-358.
8. Okafor U. V.: Lightning injuries and acute renal failure: a review. *Renal Failure* 2005, 27: 129-134.
9. Chagowski W.: Przypadek porażenia piorunem wstępnie rozpoznany jako zabójstwo. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 1998, 38 (3): 168-170.
10. Wankede A. G., Agraval V. R., Sariya D. R.: An injury subjacent to lac ornament in a case of lightning. *Forensic Sci. Int.* 2010, 195: e9-e12.
11. Raszeja S., Nasiłowski W., Markiewicz J. *Medycyna Sądowa*, PZWL, Warszawa, 1993.
12. Ritenour A. E., Morton M. J., McManus J. G., Barillo D. J., Cancio L. C.: Lightning injury: A review. *Burns* 2008, 34: 585-594.
13. Murty O. P., Kah Kian C., Husrul Ali Husin M., Kumar R., Mohammed Yusuf W. Y. W.: Fatal lightning strikes in Malaysia. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 2009, 30: 246-251.
14. Masselo W.: Lightning deaths. *Medico-Legal Bull.* 1988, 37: 1-7.
15. Celikoz B., Isik S., Turegun M., Selmanpakoglu N.: An unusual case of lightning strike: full-thickness burns of the cranial bones. *Burns* 1996, 22: 417-419.
16. Murty O. P.: Lightning fatality with blast, flame, heat and current effects: A macroscopic and microscopic view. *J. Forens. Leg. Med.* 2009, 16: 162-167.

Adres do korespondencji:

Dr med. Michał Kaliszan

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

michalkal@gumed.edu.pl

Katarzyna Skonieczna, Jarosław Bednarek, Urszula Rogalla, Marcin Woźniak,
Marta Gorzkiewicz, Katarzyna Linkowska, Anna Duleba, Karol Śliwka¹,
Tomasz Grzybowski

Wykorzystanie osiągnięć genomiki mitochondrialnej w badaniach genetyczno-sądowych opartych na analizie sekwencji ludzkiego mitochondrialnego DNA

The application of mitochondrial genomics to forensic investigations based on human mitochondrial DNA testing

Z Zakładu Genetyki Molekularnej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

¹ Z Zakładu Medycyny Sądowej Katedry Medycyny Sądowej, Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik: prof. dr hab. n. med. T. Grzybowski

Standardowa analiza mtDNA w badaniach genetyczno-sądowych ogranicza się zazwyczaj do dwóch niewielkich fragmentów hiperzmiennych, HVS I oraz HVS II. Jednakże w przypadkach, gdy profil mtDNA śladu biologicznego oraz materiału porównawczego jest zgodny i występuje z wysoką częstością w populacji, istnieje konieczność podjęcia dalszych badań mogących zweryfikować czy pochodzą one z tej samej linii żeńskiej. Na podstawie dwóch przypadków zbadanych przez Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej CM UMK w Bydgoszczy wykazano użyteczność analizy pozycji polimorficznych zlokalizowanych poza standardowo badanymi regionami hiperzmiennymi mtDNA w rozstrzygnięciu spraw genetyczno-sądowych.

In this study we present two forensic cases where mitochondrial DNA HVS I and HVS II haplotypes of evidentiary hairs match reference samples. Based on the information retrieved from mtDNA coding region of reference material, we selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) located outside the HVS I and HVS II regions that could increase the informativeness of mtDNA analysis. The SNPs were typed via SNaPshot or dideoxy sequencing technology. In both cases the SNP results allowed for unambiguous exclusion of the evidence and for determining that reference samples originated from the same person.

Słowa kluczowe:

mitochondrialny DNA, haplogrupa, haplotyp, mtSNP, genetyka sądowa

Key words:

mitochondrial DNA, haplogroup, haplotype, mtSNP, forensic genetics

WSTĘP

Identyfikacja osoby, od której pochodzą ślady biologiczne ujawnione na miejscu przestępstwa w znakomitej większości przypadków dokonywana jest na podstawie analizy mikrosatelitów DNA jądrowego. Zdarza się jednak, że taka analiza nie może zostać przeprowadzona, ponieważ w zabezpieczonym materiale biologicznym DNA jądra komórkowego jest silnie zdegradowany i występuje w śladowych ilościach (np. włosy, zęby lub kości, które były poddane wieloletniej ekspozycji na niekorzystne czynniki środowiskowe) lub w ogóle nie jest obecny (np. włosy pozbawione cebulek, które zawierają wyłącznie materiał genetyczny mitochondrialny). W takich przypadkach jedynym rozwiązaniem jest podjęcie badań mitochondrialnego DNA (mtDNA), który jest bardziej odporny na degradację, a liczba jego kopii w komórkach ludzkich jest ok. 1000 razy wyższa niż DNA jądrowego. Tym samym podjęcie badań mtDNA zwiększa prawdopodobieństwo uzyskania profilu genetycznego i rozstrzygnięcia przypadków, w których analiza mikro-

satelitów jądrowych jest niemożliwa do przeprowadzenia.

Mimo, że mtDNA składa się z ok. 16569 nukleotydów [1], to dla potrzeb identyfikacyjnych większość laboratoriów genetyczno-sądowych poddaje analizie jedynie dwa jego niewielkie fragmenty, HVS I (ang. *Hypervariable Segment I*) oraz HVS II (ang. *Hypervariable Segment II*), które położone są w obrębie regionu kontrolnego, a ich wielkość wynosi łącznie ok 600 p.z. Charakteryzują się one szczególnie wysoką zmiennością międzyosobniczą. Należy jednak zauważyć, że ze względu na sposób dziedziczenia w linii żeńskiej bez rekombinacji, uzyskany w toku badań profil mtDNA nie pozwala jednoznacznie wskazać osoby, od której pochodzi badany materiał, choć umożliwia wykluczenie jej z kręgu osób wytypowanych ze 100% pewnością. W przypadkach, gdy profil regionów HVS I oraz HVS II śladu biologicznego oraz materiału porównawczego jest zgodny, można wskazać grupę osób o identycznej sekwencji, która ze względu na częstość występowania w ogólnej populacji może być mniej lub bardziej liczna. Istotność takiego dowodu genetycznego jest jednak niewielka, gdy ustalony haplotyp występuje z bardzo wysoką częstością w analizowanej populacji. W odniesieniu do populacji europejskich, problem ten dotyczy szczególnie haplotypów należących do najczęściej występujących kładów, zwłaszcza dla haplogrupy H stanowiącej do 45% puli mtDNA populacji Europy [2]. Choć zróżnicowanie w obrębie haplogrupy H jest ogromne [3], to jednak w większości przypadków mutacje definiujące określone podhaplogrupy zlokalizowane są w regionie kodującym, co z oczywistych względów wyklucza możliwość ich wyróżnienia na podstawie standardowo badanych regionów HVS I oraz HVS II. Jedynym rozwiązaniem pozostaje więc rozszerzenie analizy sekwencji mtDNA poprzez zbadanie zestawu dodatkowych miejsc znajdujących się poza wspomnianymi regionami hiperzmiennymi.

Postęp w dziedzinie genomiki mitochondrialnej jaki dokonał się w ostatniej dekadzie, zaowocował znaczącym przyrostem danych o zróżnicowaniu sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych [3]. To z kolei przyczyniło się do zidentyfikowania nowych markerów SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) występujących w obrębie regionu kodującego, które znalazły zastosowanie w badaniach genetyczno-sądowych [4, 5]. W niniejszej

pracy omówione zostały dwa przypadki spraw sądowych, do rozstrzygnięcia których koniecznym było przeprowadzenie analizy pozycji polimorficznych zlokalizowanych poza regionami HVS I oraz HVS II. Analizowane pozycje polimorficzne zostały starannie wytypowane na podstawie analizy zróżnicowania sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych.

MATERIAŁ I METODY

Badany materiał biologiczny pochodził z dwóch spraw karnych, w ramach których Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej Katedry Medycyny Sądowej CM UMK wydał ekspertyzy oparte na analizie sekwencji mtDNA.

Przypadek 1

W ramach sprawy o zabójstwo mężczyzny dokonane na terenie województwa kujawsko-pomorskiego badaniem genetycznym objęto 3 włosy ludzkie (nienależące do ofiary) zabezpieczone w samochodzie, w którym ujawniono zwłoki. Jako materiał porównawczy wykorzystano wymaz ze słuzówki policzków mężczyzny podejrzanego o popełnienie tego przestępstwa.

Przypadek 2

W ramach sprawy o zabójstwo kobiety, której zwłoki ujawniono na terenie województwa wielkopolskiego, badaniom poddano dwa włosy ludzkie (nienależące do ofiary) znalezione na ubraniu ofiary. Materiał porównawczy stanowił wymaz ze słuzówki policzków mężczyzny podejrzanego o popełnienie tego przestępstwa.

Analiza sekwencji mtDNA

DNA izolowano metodą organiczną lub z wykorzystaniem zestawu *GeneMATRIX Bio-Trace DNA Purification Kit* (EURx). Sekwencje regionów HVS I oraz HVS II wszystkich próbek, w zakresie odpowiednio 15999-16400 oraz 30-407 p.z. ustalono zgodnie z procedurą opisaną przez Sullivana i wsp. [6]. Sekwencje pełnego genomu mitochondrialnego oraz wybranych fragmentów regionu kodującego i kontrolnego wyselekcjonowanych próbek (pozycje 477, 960.1C oraz polimorfizmy długości w pozycjach 523-524) określono zgodnie z metodologią przedstawioną przez Torrioni'ego i wsp. [7]. Po-

nadto analizę dodatkowych pozycji nukleotydowych regionu kodującego (3010 oraz 13759) wybranych próbek przeprowadzono zgodnie z procedurą minisekwencjonowania opisaną przez Brandstätter i wsp. [8]. Reakcje sekwencjonowania przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), a minisekwencjonowania z wykorzystaniem zestawu *SNaPshot Multiplex Kit* (Applied Biosystems). Produkty sekwencjonowania rozdzielano na automatycznym sekwencjonatorze DNA model *ABI PRISM 377* (Applied Biosystems) lub analizatorze *3130xl* (Applied Biosystems) i analizowano odpowiednio przy użyciu programów *Sequence Navigator v. 1.0.1.* (Applied Biosystems) lub *SeqScape v. 2.5* (Applied Biosystems). Otrzymane sekwencje porównano z sekwencją referencyjną rCRS [9]. Klasyfikacji haplogrupowej dokonano na podstawie opracowania van Ovena i Kaysera z aktualizacją z dn. 30.09.2012 [3]. Do obliczenia częstości występowania haplotypów w populacji europejskiej wykorzystano 648 sekwencji regionu kontrolnego z populacji polskiej, ukraińskiej i czeskiej [10] oraz 8240 haplotypów z populacji europejskich zdeponowanych w bazie danych EMPOP [11] (łącznie 8888 haplotypów).

WYNIKI I DYSKUSJA

Dane przedstawione w tabeli I wskazują na całkowitą zgodność haplotypów HVS I oraz HVS II materiału porównawczego (1-MP) i włosa dowodowego oznaczonego identyfikatorem 1-1 w przypadku nr 1. Haplotyp ten, zaklasyfikowany do haplogrupy H, w populacji europejskiej występuje z częstością 0,038, czyli raz na ok. 26 osób. Pozostałe dwa włosy dowodowe oznaczone identyfikatorami 1-2 oraz 1-3 różnią się obecnością dodatkowej mutacji w postaci tranzycji w pozycjach odpowiednio 150 oraz 152 (tabela I). Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Genetyki Sądowej [12] uzyskane dla segmentów HVS I oraz HVS II haplotypy mtDNA nie pozwalają wykluczyć, iż badane włosy dowodowe pochodzą od mężczyzny podejrzanego o popełnienie zabójstwa w tej sprawie (próbka porównawcza 1-MP), a wysoka częstość z jaką obserwowany jest ten haplotyp w populacji europejskiej świadczy o niewielkiej sile dowodowej uzyskanych wyników.

Haplogrupa H, do której należą próbki z przypadku 1. jest jedną z najczęściej występujących w populacji europejskiej, a zróżnicowanie w jej obrębie jest ogromne, co unaocznia fakt, iż do tej pory wyróżniono ponad 90 jej podkladów [3]. W znakomitej większości podhaplogrupy te charakteryzują się obecnością identycznego profilu regionu kontrolnego, ale można je od siebie odróżnić na podstawie dodatkowych mutacji zlokalizowanych w regionie kodującym. Zwiększenie rozdzielczości badań materiału porównawczego (oznaczonego 1-MP) do poziomu całej cząsteczki mitochondrialnego DNA wykazało obecność dziewięciu dodatkowych zmian w stosunku do sekwencji rCRS (tabela II). Na podstawie panelu mutacji 750G – 1438G – 4769G – 8860G – 15326G potwierdzono przynależność próbki do haplogrupy H, a obecność dodatkowych zmian w pozycjach: 3010, 477 oraz 13759 wskazała na przynależność tego haplotypu do podkladu H1c4. Peryferyjną mutacją pozostawała jedynie tranzycja w pozycji 16519. Pozycja ta należy do tzw. „gorących miejsc mutacji“ w mtDNA [12], a przez to, że jest wysoce niestabilna w sekwencji mitochondrialnego DNA, zmian w jej obrębie nie uwzględnia się podczas rekonstrukcji filogenetycznej. Pozostawało więc sprawdzić przynależność haplogrupową próbek dowodowych opierając się na danych uzyskanych dla haplotypu materiału porównawczego.

W tym celu dla włosów dowodowych przeprowadzono diagnostykę mutacji w pozycjach 3010, 477, oraz 13759. Reakcja ta, ukierunkowana na diagnostykę mutacji w pozycji 3010 pozwoliła wykazać, iż włos dowodowy oznaczony identyfikatorem 1-2 nie należy do haplogrupy H1 (zawiera guaninę w pozycji 3010), co łącznie z obecnością mutacji w pozycji 152 pozwoliło wykluczyć, iż pochodzi on od mężczyzny podejrzanego w sprawie. Pozostałe próbki dowodowe oznaczone identyfikatorami 1-1 oraz 1-3 posiadały tranzycje w pozycji 3010, podobnie jak haplotyp materiału porównawczego, co klasyfikowało je w obrębie haplogrupy H1. Dalsze analizy zmienności w obrębie haplogrupy H1, tj. pozycji 477 (definiująca podhaplogrupę H1c) oraz 13759 (definiująca podhaplogrupę H1c4) wykazały różnice w obydwu tych pozycjach w haplocyfie próbki oznaczonej 1-1, wykluczając, iż może ona pochodzić od mężczyzny podejrzanego w sprawie. Z kolei, mtDNA włosa oznaczonego identyfikatorem 1-3 charakteryzowała tranzycja z ty-

Tabela I. Haplotypy regionu kontrolnego mtDNA (HVS I oraz HVS II) materiału porównawczego (MP) i dowodowego wraz z ich klasyfikacją haplogrupową. Mutacje określano względem sekwencji rCRS, wskazując zmienioną zasadę za wskazaną pozycją nukleotydową, w której wystąpiła mutacja. Insercje reszt cytozyny oznaczono przyrostkami „.1C“.

Table I. mtDNA control region haplotypes (HVS I and HVS II) of evidence and reference samples (MP) and their haplogroup assignment. Mutations were scored according to rCRS sequence. Mutations are shown by indicating changed nucleotide following the nucleotide position. Cytosine insertions were marked by “.1C“ following the nucleotide position.

Przypadek Case	Nazwa próbki Sample type	Haplogrupa Haplogroup	Haplotyp mtDNA mtDNA haplotype						
nr 1 No. 1	1-1	H	rCRS				263G	315.1C	
	1-2	H	rCRS				150T	263G	315.1C
	1-3	H	rCRS				152C	263G	315.1C
	1-MP	H	rCRS				263G	315.1C	
nr 2 No. 2	2-1	U5a	16192T	16256T	16270T		73G	263G	315.1C
	2-2	U5a	16192T	16256T	16270T		73G	263G	315.1C
	2-MP	U5a	16136C	16192T	16256T	16270T	73G	263G	315.1C

Tabela II. Dodatkowe, polimorficzne pozycje sekwencji mtDNA materiału porównawczego (MP) i dowodowego. Mutacje określano względem sekwencji rCRS, wskazując oznaczoną zasadę za wskazaną pozycją nukleotydową. Insercje reszt cytozyny oznaczono przyrostkami „.1C“. Delecje adeniny i cytozyny oznaczono “delAC“.

Table II. Additional mtDNA polymorphic positions of evidentiary and reference samples (MP). Mutations were scored according to rCRS sequence. Mutations are shown by indicating typed nucleotide following the nucleotide position. Cytosine insertions were marked by “.1C“ following the nucleotide position. Adenine and cytosine deletions were marked by “delAC“.

Przypadek Case	Nazwa próbki Sample type	Dodatkowo oznaczone, polimorficzne pozycje w mtDNA Additional mtDNA polymorphic positions						
nr 1 No. 1	1-1	477T	3010A	13759G				
	1-2	3010G						
	1-3	477C	523-524delAC	3010A	13759G			
	1-MP	477C	750G	1438G	3010A	4769G		
		8860G	13759A	15326G	16519C			
nr 2 No. 2	2-1	rCRS						
	2-2	rCRS						
	2-MP	960.1C						

miny do cytozyny w pozycji 477, co klasyfikowało go w obrębie podhaplogrupy H1c. Jednakże haplotyp ten nie zawierał adeniny w pozycji 13759, co wykluczało jego przynależność do podhaplogrupy H1c4. Biorąc pod uwagę fakt, iż w haplocyfie włosów 1-3 występowały również delecje adeniny i cytozyny w pozycjach odpowiednio 523 i 524 (które nie pojawiały się w mtDNA materiału porównawczego), ostatecznie wykluczono, iż włos ten pochodzi od mężczyzny podejrzanego w sprawie o zabójstwo. Tym samym analiza zmienności w obrębie pełnego genomu mitochondrialnego pozwoliła ostatecznie wykazać, iż żaden z włosów dowodowych nie pochodził od podejrzanego.

Z danych przedstawionych w tabeli I wynika, iż w przypadku nr 2 haplotypy włosów dowodowych (oznaczonych jako 2-1 oraz 2-2) są takie same. Identyfikacyjny dla obydwu włosów haplotyp mtDNA w populacji europejskiej obserwowany jest z częstością 0,0034, co oznacza, iż występuje raz na 294 osoby. Profile mtDNA próbek dowodowych różnią się zaledwie jedną pozycją nukleotydową w stosunku do haplotypu uzyskanego dla materiału porównawczego (oznaczonego 2-MP). Różnica ta zlokalizowana jest w pozycji 16136 i dotyczy zamiany tyminy na cytozynę. Analizy pełnogenomowe przeprowadzone przez Soaresa i wsp. [13] wykazały, iż pozycja ta należy do jednej z bardziej zmiennych w mtDNA. Jej obecność w globalnym drzewie sekwencji pełnych genomów mitochondrialnych zaznacza się w siedmiu różnych liniach mitochondrialnego DNA [3]. Warto również zauważyć, że w populacji światowej tymina w pozycji 16136 występuje w 150 haplotypach [11], natomiast w populacji europejskiej zanotowano ją u 12 osób [11]. Tym samym na podstawie wyłącznie różnicy w pozycji 16136 pomiędzy haplotypami próbek dowodowych i materiału porównawczego, nie można ostatecznie wykazać, iż próbki te nie pochodzą z tej samej linii żeńskiej. Aby rozstrzygnąć tę kwestię należało zatem wskazać ewentualne dodatkowe różnice w haplotypach badanych próbek. Zarówno haplotyp materiału porównawczego, jak i próbek dowodowych można zaklasyfikować do haplogrupy U5a (tabela I). W populacji Europy środkowo-wschodniej sekwencje pełnych genomów

mitochondrialnych należących do haplogrupy U5a ustalone zostały dla 79 Słowian [14]. Przeszukanie zbioru tych haplotypów pod względem obecności mutacji w pozycji 16136 umożliwiło odszukanie próbki z populacji rosyjskiej, która należała do podhaplogrupy U5a2b1. Podhaplogrupa U5a2b1 definiowana jest insercją cytozyny za pozycją 960 [14]. Ukierunkowane na diagnostykę tej mutacji sekwencjonowanie fragmentu regionu kodującego obejmującego pozycje od 910 do 1010 wykazało, iż haplotyp materiału porównawczego, tak samo jak próbka z populacji rosyjskiej (z peryferyjną mutacją w pozycji 16136) należy do podhaplogrupy U5a2b1 (tabela II). Jednocześnie haplotypy obydwu włosów dowodowych, pozbawione były dodatkowej cytozyny za pozycją 960 (tabela II), co ostatecznie pozwoliło dowiedzieć, że włosy znalezione na ubraniu ofiary nie pochodziły od podejrzanego.

PODSUMOWANIE

Omówione przypadki ilustrują użyteczność analiz dodatkowych pozycji polimorficznych, zlokalizowanych poza standardowo badanymi regionami hiperzmiennymi mtDNA w badaniach genetyczno-sądowych. Przyjęcie odpowiedniej strategii badawczej miało w opisanych sprawach bardzo duże znaczenie, ze względu na ryzyko utraty materiału genetycznego z włosów dowodowych w przypadku podjęcia niewłaściwych decyzji co do zakresu badań. Z tego powodu powstrzymano się od rozszerzania badań sekwencji regionu kontrolnego (np. o region HVS III, pozycje 438-576) bez żadnych wstępnych założeń co do spodziewanych pozycji polimorficznych, a zamiast tego wytypowano konkretne pozycje regionu kontrolnego (477) oraz kodującego (960.1C, 3010, 13759) na podstawie analizy przynależności (pod)haplogrupowej badanych próbek. Dzięki temu wykazano, iż niestandardowe podejście do badań mitochondrialnego DNA, wsparte znajomością filogenezy tego markera skutecznie zwiększa jego informatywność w badaniach śladów biologicznych. W efekcie, w obu analizowanych przypadkach możliwe było ostateczne wykluczenie pochodzenia zabezpieczonych włosów dowodowych od głównych podejrzanych.

PIŚMIENICTWO

1. Anderson S., Bankier A. T., Borel B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F. i wsp.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981, 290: 457-465.

2. Achilli A., Rengo C., Magri C., Battaglia V., Olivieri A., Scozzari R., Cruciani F., Zeviani M., Briem E., Carelli V. i wsp.: The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet*. 2004, 75: 910-918.

3. van Oven M., Kayser M.: Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. *Hum. Mutat*. 2009, 30: E386-394.

4. Just R. S., Leney M. D., Barritt S. M., Los C. W., Smith B. C., Holland T. D., Parsons T. J.: The use of mitochondrial DNA single nucleotide polymorphisms to assist in the resolution of three challenging forensic cases. *J Forensic Sci*. 2009, 54: 887-891.

5. Köhneemann S., Pfeiffer H.: Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet*. 2011, 5: 216-221.

6. Sullivan K. M., Hoggood R., Gill P.: Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int J Legal Med*. 1992, 105: 83-86.

7. Torroni A., Rengo C., Guida V., Cruciani F., Sellitto D., Coppa A., Calderon F. L., Simionati B., Valle G., Richards M., Macaulay V., Scozzari R.: Do the four clades of the mtDNA haplogroup L2

evolve at different rates? *Am J Hum Genet*. 2001, 69: 1348-1356.

8. Brandstätter A., Salas A., Niederstätter H., Gassner C., Carracedo A., Parson W.: Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis*. 2006, 27: 2541-2550.

9. Andrews R. M., Kubacka I., Chinnery P. F., Lightowlers R. N., Turnbull D. M., Howell N.: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet*. 1999, 23: 147.

10. Mielnik-Sikorska M., Dąca P., Malyarchuk B., Derenko M., Skonieczna K., Perkova M., Dobosz T., Grzybowski T.: The history of Slavs inferred from complete mitochondrial genome sequences. *PLoS One*. 2013, 8:e54360.

11. www.empop.org

12. Carracedo A., Bär W., Lincoln P., Mayr W., Morling N., Olaisen B., Schneider P., Budowle B., Brinkmann B., Gill P., Holland M., Tully G., Wilson M.: DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int*. 2000, 110: 79-85.

13. Soares P., Ermini L., Thomson N., Mormina M., Rito T., Röhl A., Salas A., Oppenheimer S., Macaulay V., Richards M. B.: Correcting for purifying selection: an improved human mitochondrial molecular clock. *Am. J. Hum. Genet*. 2009, 84: 740-759.

14. Malyarchuk B., Derenko M., Grzybowski T., Perkova M., Rogalla U., Vanecek T., Tsybovsky I.: The peopling of Europe from the mitochondrial haplogroup U5 perspective. *PLoS One* 2010, 5:e10285.

Adres do korespondencji:

prof. dr. hab. n. med. Tomasz Grzybowski

Katedra Medycyny Sądowej

Zakład Genetyki Molekularnej i Sądowej

Collegium Medicum UMK

ul. M. Skłodowskiej-Curie 9

85-094 Bydgoszcz

e-mail: tgrzyb@cm.umk.pl

Ryszard Pawłowski

Co każdy lekarz o sądowym badaniu DNA wiedzieć powinien

What every physician should know about forensic DNA testing

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

W 2011 roku minęło dokładnie 25 lat od opracowania przez Kary Mullisa techniki PCR z użyciem termostabilnej polimerazy DNA. Ta niezmiernie czuła technika namnażania kwasów nukleinowych zrewolucjonizowała genetykę sądową dzieląc ją, tak samo jak i całą diagnostykę z zakresu biologii molekularnej, na epokę przed PCR i po PCR. Największą zaletą tej techniki jest bez wątpienia jej czułość pozwalająca na uzyskanie profilu DNA nawet z pojedynczej komórki zawierającej ok. 6,2 pg jądrowego DNA. Jak się wkrótce okazało niewłaściwe stosowanie metody PCR może prowadzić do sytuacji, w których ogromna czułość PCR staje się jej największą wadą. Przy teoretycznej 100% wydajności techniki PCR z jednej kopii DNA po 30. cyklach namnażania można otrzymać ponad miliard (10^9) kopii DNA. Tym samym nawet znikoma ilość obcego DNA kontaminującego badaną próbkę może prowadzić do zafałszowania profilu DNA. Problem gwałtownie narasta w sytuacjach kiedy badany DNA jest w stanie silnej degradacji, np. biologicznej (stare ekshumowane kości), a kontaminujący DNA jest świeży, niezdegradowany, a tym samym łatwo poddający się amplifikacji. Wymagany jest więc ogromny reżim postępowania zarówno z dowodami rzeczowymi, podczas badania osób żywych, czy podczas autopsji, aby nie doszło do zafałszowania wyników badań DNA poprzez niewłaściwe postępowanie podczas ujawniania, zabezpieczania oraz badania śladów biologicznych.

Jedną z podstawowych zasad kryminalistyki, „Zasada wzajemnej wymiany“, opracowana przez wybitnego kryminalistykę francuskiego Edmonda Locarda w 1928 roku [1] mówi, że każdy nawet najmniejszy kontakt dwóch obiektów prowadzi do wzajemnej wymiany substancji pomiędzy nimi. Ciało ludzkie, a w szczególności ofiar zbrodni jest miejscem nagromadzenia wielu śladów biologicznych pochodzących od różnych osób. Ślady te mogą mieć

związek z przestępstwem, mogą jednak być też efektem niewłaściwego postępowania lekarza sądowego i osób mających kontakt z ofiarą przed, jak i po zaistnieniu przestępstwa. Tak więc nawet najmniejsze ślady kontaktowe, pozostawione przez jakąkolwiek osobę mającą kontakt z osobą pokrzywdzoną przed, w trakcie oraz po zaistnieniu przestępstwa, mogą być źródłem zafałszowań materiału dowodowego w tym głównie śladów biologicznych oraz prowadzić do wydania błędnej opinii. Należy pamiętać, że żyjemy w świecie pełnym śladów DNA, który jest obecny wszędzie tam, gdzie przebywa człowiek. Należy też zdawać sobie sprawę z tego, że DNA można bardzo łatwo przenieść z obiektu na obiekt w mniejszych lub większych ilościach. Jak już wspomniano wcześniej, DNA obecny na finalnie badanych dowodach rzeczowych (w tym również śladach zabezpieczanych z ludzkiego ciała) może pochodzić z trzech różnych etapów naniesienia. Pierwszy to DNA obecny na dowodzie rzeczowym przed zaistnieniem przestępstwa. Będą to wszelkiego rodzaju ślady DNA pochodzące najczęściej od pokrzywdzonego, a obecne na jego ciele, odzieży czy przedmiotach osobistych. Drugi rodzaj DNA to ten, który zostaje naniesiony podczas zdarzenia przestępczego. Trzeci to DNA, który pojawia się na dowodzie rzeczowym po jego ujawnieniu i jest efektem błędnego postępowania różnych osób, od technika kryminalistyki pracującego na miejscu zdarzenia, po sędziego okazującego dowód rzeczowy w sądzie. Ten rodzaj DNA nazywany jest DNA kontaminującym. Jego obecność może prowadzić do zupełnego zafałszowania wyniku i rozlicznych niepożądanych i błędnych konsekwencji prawnych. Temu DNA poświęcone są dalsze rozważania.

Kontaminacja obcym DNA – miejsce zdarzenia

De facto każda osoba, która pojawia się na miejscu zdarzenia powinna być traktowana jako intruz.

Oczywiście obecność prokuratora, techników kryminalistyków czy lekarza sądowego jest konieczna do przeprowadzenia wymaganych prawem czynności, jednak jak uczy życie nie zawsze są to tylko niezbędne osoby. Szeroko praktykowaną na zachodzie Europy zasadą jest poddanie profilowaniu DNA wszystkich osób przebywających na miejscu zdarzenia. Aby uniknąć lub drastycznie ograniczyć kontaminację obcym DNA, każda osoba tam obecna powinna być ubrana w jednorazowy kombinezon i rękawice oraz maski chroniące całe ciało przed pozostawieniem różnorodnych śladów (najczęściej śliny, włosów, naskórka, wydzieliny z nosa itp.). O ile kombinezon może być używany przez cały czas pracy na miejscu zdarzenia bez zmiany, to jednorazowe rękawice winny być zmieniane po kontakcie z każdym nowym dowodem rzeczowym. Jak wykazano, właśnie rękawice oraz inny sprzęt używany podczas pobierania i badania dowodów rzeczowych może być poważnym źródłem zanieczyszczenia ich obcym DNA [2]. Dotknięcie jakiegokolwiek przedmiotu zanieczyszczoną rękawicą nanosi na ten przedmiot obcy DNA. Ślady te mogą być łatwo zauważalne, jak np. mokre jeszcze plamy krwi, czy zupełnie niewidoczne, jak np. ślady naskórka, śliny czy nabłonków na powierzchni ciała. Zgodnie z zasadą Locarda, stroje ochronne też mogą nagromadzać na sobie ślady znajdujące się na miejscu przestępstwa, dlatego też w niektórych krajach, jak np. w Wielkiej Brytanii praktykuje się zebranie i zabezpieczenie kombinezonów, rękawic, fartuchów i butów należących do policjantów i pierwszej pomocy medycznej, jako potencjalnych źródeł istotnych śladów kryminalistycznych.

Oględziny ciała na miejscu zbrodni na przykładzie zabójstwa na tle seksualnym

Zabójstwo na tle seksualnym wymaga ujawnienia i zebrania całej gamy różnego rodzaju śladów, dlatego też ten typ zbrodni wybrałem jako przykład do omówienia potencjalnych błędów. Są to nie tylko ślady obecne na odzieży czy powierzchni ciała, ale również ślady zawarte w różnych otworach naturalnych ciała.

Ciało ofiary zabójstwa na tle seksualnym powinno być poddane szczegółowym oględzinom już na miejscu znalezienia zgodnie z art. 209 § 3 KPK, który mówi, że „Oględzin zwłok dokonuje się na miejscu ich znalezienia”. Ślady luźno związane z cia-

tem (np. włosy, świeże plamy krwi czy nasienia) powinny być bezwzględnie zabezpieczone przed transportem ciała do chłodni.

Również pierwsze wymazy z otworów naturalnych ciała muszą być pobrane już na miejscu ujawnienia. Znane są nam przypadki pobrania wymazów z dróg rodnych na miejscu zdarzenia, dla których możliwe było uzyskanie pełnego profilu DNA sprawcy zabójstwa na tle seksualnym oraz uzyskanie szczątkowego profilu lub jego zupełny brak w wymazie pobranym podczas sekcji zwłok od 15-23 godzin od pierwszego pobrania. Niestety do rzadkości należy pobieranie wymazów z otworów naturalnych ciała przez lekarza sądowego jeszcze na miejscu ujawnienia zwłok.

Pobranie powinno dotyczyć nie tylko śladów potencjalnie obecnych w otworach naturalnych ciała, ale również tych, które mogą łatwo zostać oddzielone od ciała, starte lub zubożone podczas transportu zwłok z miejsca zdarzenia do prosektoriów. Dotyczy to np. włosów, plam krwi na powierzchni ciała czy śladów kontaktowych. Pomocnym podczas ujawniania śladów sprawcy na powierzchni ciała może być przenośne źródło światła, głównie UV do wizualizacji plam nasienia, śliny, moczu, krwi oraz miejsc otarć naskórka zazwyczaj powstających w wyniku forsownego działania sprawcy i tym samym zawierających ślady DNA z substancji potowo-tłuszczowej.

Z powodu *de facto* braku kontroli nad ciałem ofiary, od momentu wydania polecenia jego transportu, do momentu dostarczenia do zakładów medycyny sądowej, tym bardziej koniecznym jest ujawnienie i zabezpieczenie na miejscu zdarzenia tych wszystkich śladów, które podczas transportu mogą ulec pełnemu utraceniu lub zafałszowaniu. Wśród wielu możliwych przyczyn zakontaminowania zwłok obcym DNA na miejscu zdarzenia można zaliczyć choćby wszelkiego rodzaju koce czy płachty używane do przykrycia zwłok przed niepożądanymi osobami (gapie, media, dzieci). Tego rodzaju tkaniny zazwyczaj zawierają liczne ślady DNA i łatwo mogą zostać przeniesione na powierzchnię ciała. Błąd tego rodzaju popełniono między innymi podczas wykonywania oględzin miejsca podwójnego zabójstwa do sprawy O. J. Simpsona okrzykniętej mianem procesu ubiegłego stulecia [3].

Wskazaniem byłoby również zabezpieczenie dla celów eliminacyjnych materiału porównawczego od

osób transportujących zwłoki do chłodni. Takie postępowanie stosowane jest w szeregu krajów, gdzie praktyka medyczno-sądowa stoi na wyższym poziomie, a źródła potencjalnych błędów są bezwzględnie piętnowane przez wysoce wyedukowanych obrońców oskarżonych (vide wspomniana już uprzednio sprawa O. J. Simpsona z 1995 roku w USA) [4].

Do najczęstszych błędów popełnianych przez osoby przebywające na miejscu przestępstwa należą:

- brak jednorazowych kombinezonów chroniących od stóp do głów osoby aktywnie uczestniczące przy ujawnianiu i zabezpieczaniu śladów biologicznych oraz innych dowodów;

- zbyt rzadkie zmienianie jednorazowych rękawic, które po każdym kontakcie z jakimkolwiek źródłem DNA nagromadzają ślady i tym samym są źródłem kontaminującym inne później dotykane dowody rzeczowe;

- używanie narzędzi zanieczyszczonych obcym DNA – np. termometry, pęsety itp., które po każdym użyciu powinny być poddane procesowi zupełnego usuwania DNA z użyciem np. podchlorynu sodowego;

- używanie noszy czy worków na zwłoki zanieczyszczonych obcym materiałem biologicznym bez odizolowania zwłok od ich powierzchni (czyste jednorazowe prześcieradła, jednorazowe worki itp.)

- brak zabezpieczenia rąk, głowy i/lub ciała ofiary w czyste jednorazowe worki lub torby papierowe.

Potencjalne błędy proceduralne popełniane na sali sekcyjnej

Działania obducenta na sali sekcyjnej to nie tylko jego podstawowe czynności, ale również różnego rodzaju działania pomocnicze wykonywane przez laborantów sekcyjnych. Potencjalne błędy powstałe podczas pracy personelu pomocniczego będą obciążały nie tylko ich, ale również biegłych, od których wymaga się nadzoru nad personelem pomocniczym. Ugruntowane od dawna złe nawyki personelu pomocniczego powinny być eliminowane, a specyfika problemu kontaminacji obcym DNA szczegółowo wyjaśniana.

Do najczęstszych błędów popełnianych podczas oględzin i pobierania śladów biologicznych od ofiar zabójstw na tle seksualnym należy ograniczenie pobrania wymazów z otworów naturalnych ciała do

wymazów z pochwy. Prawidłowo, wymazy powinny być pobrane na jałowe wymazówki z trzech okolic dróg rodnych: przedsionka pochwy, sklepienia pochwy (zazwyczaj tylnego) oraz okolic szyjki macicy (po dwie wymazówki na jeden wymaz). Ciało powinno być poddane kompleksowemu pobraniu śladów z całej powierzchni zwłok w tym szczególnie wymazów okolic erogennych (piersi, usta, zewnętrzne narządy płciowe itp.). Niestety w wielu przypadkach, z różnych powodów, w tym również z powodu ograniczeń finansowych ze strony organów zlecających badania, nie dochodzi do pobrania potencjalnych śladów kontaktowych obecnych na powierzchni ciała powstałych w wyniku forsownego kontaktu z ofiarą. Do tych miejsc należą ślady na dłoniach, twarzy, siłą rozwieranych udach, ślady powstałe w wyniku ucisku na narządy szyi itp. Dodatkowo, jeżeli dochodzi do pobrania tych śladów to są one pobierane niewłaściwie, bez uwzględnienia ograniczeń możliwości zidentyfikowania komponenty mniejszościowej w mieszaninach DNA. Wskazane jest również pobieranie śladów biologicznych, które wydają się, ze względu na warunki przebywania ciała, nie zawierać już śladów DNA (zakopanie w ziemi, wrzucenie do wody). Ilustracją niech będzie przypadek 16. letniej dziewczyny w Kanadzie, której ciało po zabójstwie wrzuciono do wolno płynącej wody. Kiedy wyłowiono je po upływie 5,5 godziny od wrzucenia, na lewej piersi ujawniono ślad ugryzienia, który poddano procedurze pobrania śladów DNA. Profilowanie wykazało mieszany profil DNA zawierający cechy podejrzanego o zabójstwo mężczyzny [5]. Podobnie jak w przypadku oględzin zwłok na miejscu ich ujawnienia nie zawsze, a zaryzykowałbym stwierdzenie wręcz nagminnie, pewne ślady pobierane są narzędziami zanieczyszczonymi obcym DNA. Dotyczy to np. nożyczek używanych do ścinania paznokci czy innego sprzętu wielokrotnego użycia, jak piły, pęsety, noże itp. Źródłem powstawania mieszanin DNA mogą być również naczynia używane do maceracji kości. Znane są nam z praktyki identyfikacji genetycznej NN osób, badania macerowanych kości wykazujące mieszaninę DNA [6]. Dzieje się tak dlatego, bo DNA okazuje się być bardzo stabilnym termicznie, a używane naczynia nie są dekontaminowane z użyciem np. podchlorynu sodowego. Nieoczyszczone powierzchnie tnące pił używanych do cięcia kości NN osób mogą być źródłem

bardzo poważnych zanieczyszczeń prowadzących do zupełnego zafałszowania lub zniekształcenia profilu DNA. Problem staje się tym poważniejszy im starszy i bardziej zdegradowany biologicznie materiał poddawany jest pobraniu próbek do celów identyfikacyjnych. Jak pokazują badania Brytyjczyków przeprowadzone na 20 salach sekcyjnych, co najmniej 50% narzędzi sekcyjnych zakontaminowanych było DNA w mierzalnych ilościach [7], co jak podkreślają stanowi poważny problem związany z prawidłową identyfikacją materiału biologicznego. Również materiał biologiczny po pobraniu nie może być przenoszony do naczyń wielorazowego użycia, a jedynie do jałowych i jednorazowych pojemników, dodatkowo prawidłowo i natychmiast oznakowanych. Materiał kostny uzyskany poprzez wydobywanie z ziemi (ekshumacje, miejsca ukrycia zwłok przez zakopanie) powinien być maksymalnie szybko poddany głębokiemu zamrożeniu (-80°C lub przynajmniej -20°C), gdyż wydobywanie materiału na powierzchnię powoduje gwałtowne przyśpieszenie procesów rozkładu gnilnego.

Następnym poważnym problemem jest właściwe pobieranie i przechowywanie odzieży ze zwłok. Nie tylko powinna być ona zabezpieczana osobno do czystych papierowych kopert lub z braku takich wyjątkowo do worków foliowych (a później przepakowana), ale również z zachowaniem zasad dotyczących często zmienianych jednorazowych rękawic. Rozebrane ciało pod żadnym pozorem nie powinno spocząć na powierzchni noszącej ślady DNA. Wskazane byłoby używanie jednorazowych, wolnych od DNA płacht, prześcieradeł czy plastikowych folii o dużych powierzchniach uniemożliwiających kontakt ciała z powierzchniami zabrudzonymi obcym DNA.

Jak zapobiegać kontaminacji?

Od momentu dostarczenia ciała do zakładów medycyny sądowej, do momentu zakończenia pobierania śladów z ciała należy bezwzględnie używać narzędzi wolnych od obcego DNA. Powinny to być narzędzia jednorazowego użytku, lub wielorazowe jednak przemyte w celu usunięcia DNA podchlorynem sodowym (NaOCl). Autoklawowanie narzędzi w ogóle nie rozwiązuje problemu, gdyż prowadzi do zabicia mikroorganizmów, nie niszcząc prawie zupełnie DNA, gdyż jak wspomniano wcześniej jest on wysoce stabilny nawet w wysokich temperaturach [8].

Aby uniknąć tego rodzaju problemów wiele krajów scentralizowało wykonywanie sekcji sądowych w regionalnych ośrodkach o najwyższych standardach czystości, sterylizacji i dekontaminacji instrumentów i powierzchni roboczych. Dodatkowo, jak już wspomniano wcześniej profile DNA wszystkich policjantów, którzy przebywali na miejscu zdarzenia jak i osób mających kontakt z dowodami rzeczowymi powinny być znane i używane do ewentualnych czynności eliminacyjnych w uzasadnionych sytuacjach.

Oględziny ciała osób żywych ofiar przestępstw na tle seksualnym

Każdy kontakt seksualny w postaci wprowadzenia członka do pochwy bez wytrysku pozostawia ślady w postaci nabłonków oraz wydzieliny z dróg rodnych na prąciu czy worku mosznowym, jak również nabłonków i naskórka mężczyzny w drogach rodnych (pochwie, wargach sromowych). W wielu przypadkach jest to ilość wystarczająca do przeprowadzenia identyfikacji napastnika.

Niektóre, z wielu rodzajów śladów wymieniających pomiędzy ofiarą i napastnikiem, można bardzo łatwo ujawnić i zlokalizować (plamy krwi, nasienia, włosy), inne jak ślady naskórka (substancja potowotłuszczowa), śliny, wydzieliny z dróg rodnych są zazwyczaj niewidoczne i wymagają albo metod specjalnych, albo szczegółowego wywiadu wskazującego te miejsca podczas badania pokrzywdzonej osoby przez lekarza sądowego. Ograniczenie się wyłącznie do pobrania wymazów z otworów naturalnych, z pominięciem innych obszarów ciała należy uznać za błąd w sztuce lekarskiej. Otwory te mogą w ogóle nie zawierać śladów nasienia, a jedyny materiał kontaktowy pochodzący od napastnika może znajdować się na powierzchniach forsownie przez niego dotykanych, jak np. wewnętrzne powierzchnie ud, piersi, zewnętrzne narządy płciowe, nadgarstki dłoni, ślady po uderzeniach, ucisku na usta czy narządy szyi. W przypadku tych właśnie śladów szczególnie ważna jest rola lekarza sądowego. Szczegółowy wywiad lekarski powinien doprowadzić do ustalenia tych wszystkich powierzchni ciała, które mogą nosić tego rodzaju ślady.

W ogólnym zarysie wywiad lekarski powinien zawierać następujące informacje:

1. szczegółowy przebieg i okoliczności zgwałcenia,

2. szczegóły kontaktu seksualnego (penetracja członkiem, palcem lub przedmiotem oraz drogi wprowadzenia jak pochwa, usta, odbył),

3. informacja o miejscach, na których mogą znaleźć się ślady sprawcy w postaci nasienia, krwi, śliny, moczu, naskórka, włosów i kału,

4. informacja o użyciu środków do obezwładnienia ofiary, jak broń, alkohol, narkotyki itp. (konieczność pobrania krwi i moczu na badania toksykologiczne),

5. informacje o krępowaniu ofiary, jeżeli tak, to czym, oraz o miejscach na ciele i odzieży napastnika intensywnie dotykanych przez napastnika,

6. czynności dokonane po gwałcie jak:

- zmiana odzieży,
- kąpiel w wannie lub pod prysznicem,
- mycie zębów i płukanie jamy ustnej,
- oddawanie moczu oraz kału,

7. wywiad ginekologiczny:

- ostatnia miesiączka (test ciążowy),
- użycie środków antykoncepcyjnych w tym np. substancji plemnikobójczych,
- dobrowolni partnerzy seksualni w ciągu co najmniej ostatniego tygodnia !!!
- stany zapalne dróg rodnych i niedawne zabiegi chirurgiczne w obszarze miednicy małej.

Ślady biologiczne zabezpieczane w przypadku zaistnienia przestępstwa zgwałcenia

Oględziny i pobranie śladów biologicznych powinno dotyczyć zarówno tych, które mogą być obecne w otworach naturalnych ciała (wewnętrzne narządy płciowe, usta, odbył), jak i tych, które występują na powierzchni ciała (owłosiona i nieowłosiona powierzchnia ciała). Wartość dowodowa jednych i drugich zazwyczaj jest równocenna, choć zazwyczaj dużo większą wartość dowodową ma obecność nasienia np. w drogach rodnych pokrzywdzonej niż włosów napastnika na ciele ofiary. Ta ostatnia może być tłumaczona przypadkowym przeniesieniem, w przeciwieństwie do intencjonalnego pozostawienia nasienia w drogach rodnych.

Poniższe zestawienie przedstawia podstawowe rodzaje śladów zabezpieczanych w przypadku przestępstwa zgwałcenia:

1. wymazy z miejsc, na których może być obecne nasienie (np. brzuch, nogi, pośladki, okolice owłosione, piersi),

2. wymazy z miejsc, na których może być

obecna ślina (miejsca całowane, lizane lub gryzione),

3. wymazy z plam krwi na powierzchni ciała,

4. popłuczyny z ust 15-18% etanolem lub wymazy na jednorazowych jałowych wymazówkach,

5. wymazy z przedsionka i sklepienia pochwy, oraz z szyjki macicy na jałowych wymazówkach (co najmniej po dwie wymazówki),

6. wymazy z okolic odbytu oraz odbytnicy (2 wymazy),

7. wymazy z miejsc otarć naskórka wskazanych przez ofiarę lub ujawnionych przez obducenta,

8. ścięcie włosów zabrudzonych substancjami biologicznymi (nasienie, krew, ślina itp.),

9. wyczesanie włosów, w tym łonowych w celu ujawnienia włosów napastnika,

10. ścięcie paznokci lub w przypadku gdy są zbyt krótkie sporządzenie wymazów na dwie jednorazowe wymazówki lekko zwilżone jałową wodą.

Generalnie zgodnie z dobrymi zasadami sztuki lekarskiej należy starać się zabezpieczyć maksymalnie dużo śladów biologicznych, bo zazwyczaj im więcej czasu upływa od zdarzenia tym więcej pojawia się wątpliwości. W momencie badania nie zawsze mamy pewność obecności nasienia czy innych śladów biologicznych, tym samym ograniczenie się wyłącznie do pobrania wymazów z dróg rodnych, może być traktowane jako błąd w sztuce lekarskiej i narażenie się na potencjalne konsekwencje prawne. Inne ślady, jak ślady kontaktowe (kontakt powierzchni ciała uczestników zdarzenia, w tym penetrującego członka przy braku wytrysku) pozwalają na poziomie rozwoju współczesnej genetyki sądowej na uzyskanie wiarygodnego profilu z nawet tak małej ilości DNA. Zasadnym jest również pobranie wymazów z dróg rodnych po upływie dłuższego czasu od zgwałcenia. Jak pokazuje praktyka wykrycie pojedynczych plemników możliwe jest w przypadku wymazów pobieranych z okolic szyjki macicy nawet po dwóch tygodniach od stosunku. W przypadku wymazów pobieranych ze sklepienia pochwy, największa szansa na wykazanie plemników i określenie profilu DNA to 3 doby od stosunku, co jednak oczywiście nie oznacza, że nie można ich wykazać po upływie 7 dni od zdarzenia. Przypadki te dotyczą szczególnie normozoospermii oraz braku dokonywania intensywnych zabiegów higienicznych czy stosowania substancji plemnikobójczych.

Obok oględzin ciała osoby pokrzywdzonej koniecznym jest dokonanie szczegółowych oględzin ciała osoby podejrzewanej o dokonanie przestępstwa na tle seksualnym. Rutynowo podczas takiego badania pobierane są ślady wydzieliny z dróg rodnych z powierzchni członka, żołądki, rowka zażołądowego oraz worka mosznowego. Dzięki nowoczesnym metodom identyfikacji rodzaju substancji biologicznej, w tym głównie mRNA, możliwe jest od niedawna zidentyfikowanie wydzieliny z dróg rodnych, a tym samym określenie nie tylko profilu DNA, ale również wskazanie źródła pochodzenia materiału biologicznego [9].

Rutynowo poszukuje się też na powierzchni ciała obecności plam krwi, głównie na dłoniach i na członku, śliny poszukując śladów ugryzień, substancji potowo-tłuszczowej w typowych miejscach jak dłoń, twarz szczególnie zwracając uwagę na miejsca ze śladami mikrowybroczyn. Ponadto wyczesywane są włosy łonowe w celu poszukiwania ewentualnych włosów łonowych ofiary oraz pobierany jest materiał biologiczny z paznokci.

Do stosunkowo często spotykanych błędów należy zaliczyć sytuacje interpretowania bezpośrednich lub barwionych wymazów z dróg rodnych jako nie zawierających nasienia, wyłącznie po analizie mikroskopowej nie wykazującej obecności plemników. Brak plemników nie oznacza przecież braku nasienia (azoospermia), a badanie innych markerów pozwala bez najmniejszych wątpliwości potwierdzić jego obecność. Inny błąd to pobieranie wymazów bezpośrednio na szkiełka mikroskopowe, lub do wymazówek zawierających mikrobiologiczne podłoża transportowe. Zadaniem tych podłoży jest zachowanie w stanie żywym bakterii obecnych w wymazach przed wykonaniem posiewów mikrobiologicznych, a żywe, a do tego szybko namnażające się bakterie, będą w konsekwencji powodowały

przyśpieszony rozkład składników biologicznych w tym nasienia, które jak wiadomo zawiera znaczne ilości fruktozy substratu potrzebnego dla rozwoju wielu mikroorganizmów. Produkowane przez mikroorganizmy peptydazy i nukleazy zniszczą w bardzo szybkim tempie materiał biologiczny i w bardzo wielu przypadkach, nawet szybkie pobranie wymazu (do kilku godzin po zdarzeniu) nie gwarantuje uzyskania pozytywnego wyniku profilowania DNA. Użycie szkiełek mikroskopowych, zamiast jałowych wymazówek, w żaden sposób nie gwarantuje braku obcego DNA. Zazwyczaj dotykaniem ich rękawicami przenosi na nie DNA pochodzący z ciała czy różnego rodzaju sprzętu, jak np. wzierniki, kolposkopy, ultrasonografy, sondy usg itp. [2].

Należy również zdawać sobie sprawę, że do głównych czynników sprzyjających degradacji DNA należą temperatura, wilgotność oraz czas. Podwyższona wilgotność i temperatura wybitnie zwiększają rozkład substancji biologicznych poprzez przyśpieszenie rozwoju mikroorganizmów. Wydłużenie czasu przechowywania próbki przed dostarczeniem jej do badania to zwiększenie działania niekorzystnych czynników na materiał biologiczny. Stąd główna zasada postępowania z materiałem biologicznym, to przechowywanie go w niskiej temperaturze i wilgotności i jak najszybsze dostarczenie go do badania.

WNIOSEK

Oględziny na miejscu zdarzenia, czynności na salach sekcyjnych, w gabinetach lekarskich i laboratoriach kryminalistycznych muszą być przeprowadzane z ogromnym reżimem czystości pracy chroniącym materiał dowodowy przed obcym DNA, a tym samym przed zniekształceniem wyników badań molekularnych i potencjalnym skazaniem niewinnej osoby!

PIŚMIENNICTWO

1. Locard E.: Dochodzenie przestępstw według metod naukowych, Księgarnia Powszechna, Łódź 1937.
2. Poy A., van Oorschot R. A. H.: Beware; gloves and equipment used during the examination of exhibits are potential vectors for transfer of DNA-

containing material. International Congress Series, 2006, 1288: 556-558.

3. http://www.trutv.com/library/crime/notorious_murders/famous/simpson/index_1.html

4. Thompson W. C.: DNA Evidence in the O. J. Simpson Trial. University of Colorado Law Review, 1996, 67 (4): 827-857.

5. Sweet D., Shutler G. G.: Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. *J Forensic Sci.* 1999, 44 (5): 1069-1072.

6. Pawłowski R., Dettlaff-Kąkol A., Paszkowska R., Jankowski Z.: Błąd przedlaboratoryjny w genetyce sądowej. Kontaminacja materiału biologicznego na sali sekcyjnej, *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* 2001, 51: 369-376.

7. Ruty G. N., Watson S., Davidson J.: DNA contamination of mortuary instruments and work surfaces a significant problem of forensic practice?

Int J of Legal Medicine 2000, 114: 56-60.

8. Włodarczyk R., Maciejewska A., Pawłowski R.: The influence of high temperature on the possibility of identification of STR, miniSTR and mtDNA polymorphic loci in different human tissues. XXI Congress of the International Academy of Legal Medicine 28-30 Maj 2009 rok, Lizbona.

9. Jakubowska J., Maciejewska A., Pawłowski R.: mRNA profiling in identification of biological fluids in forensic genetics. *Problems of Forensic Sciences* 2011, LXXXVII: 204-215.

Barbara Sumińska-Ziemann, Tomasz Gos, Zbigniew Jankowski

Fenomen hyperostosis frontalis interna – aktualny stan wiedzy

The phenomenon of hyperostosis frontalis interna – state of the art knowledge

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Kierownik: dr hab. med. Z. Jankowski

Hyperostosis frontalis interna (HFI) jest ciekawym, jednak wciąż słabo poznanym zjawiskiem patologicznym, które można stwierdzić podczas sekcji zwłok. W pracy przedstawiono poglądy na temat etiologii, patogenezy i symptomatologii HFI. Podkreślono także potencjalną przydatność HFI w identyfikacji płci i wieku.

Hyperostosis frontalis interna (HFI) is an interesting but still a poor-known phenomenon, which may be found post-mortem. The authors have presented views on the aetiology, pathogenesis and symptomatology of HFI. The usefulness of this abnormality in the identification of sex and age has been pointed out.

Słowa kluczowe:

hyperostosis frontalis interna,
hipogonadyzm,
zespół Morgagniego-Stewart-Morela

Key words:

hyperostosis frontalis interna,
hypogonadism,
Morgagni-Stewart-Morel syndrome

WPROWADZENIE

Ciekawym zjawiskiem odkrywanym najczęściej przypadkowo przyżyciowo w trakcie wykonywania badań obrazowych wykorzystujących promieniowanie rentgenowskie (zdjęcia przeglądowe czaszki, tomografia komputerowa) bądź pośmiertnie w czasie sekcji zwłok jest nieregularne, guzkowe, symetryczne pogrubienie warstwy wewnętrznej kości czaszki, którego zakres obejmować może kość czołową (nebula frontalis; hyperostosis frontalis interna –

HFI), kości ciemieniowe (hyperostosis parietalis interna) bądź, wyjątkowo rzadko, całą wewnętrzną powierzchnię sklepienia czaszki (hyperostosis cranii diffusa) [1, 2, 3]. Najczęściej przebudowie ulega kość czołowa, której grubość w opisywanych w literaturze naukowej przypadkach wynosi od 15 do 28 mm, natomiast co jest typowe dla tego zjawiska, okolica przyczepu sierpa mózgu pozostaje niezmienną lub ulega jedynie nieznacznemu pogrubieniu [4, 5, 6, 7].

Pogrubienie warstwy wewnętrznej kości czołowej jest jednym z elementów zespołu, w skład którego wchodzi również takie objawy jak wirylizm i otyłość, opisanego po raz pierwszy w 1719 roku w oparciu o materiał sekcyjny przez pochodzącego z Padwy anatoma Giovanniego Battistę Morgagniego (1682-1771), jednego z twórców podwalin współczesnej anatomii patologicznej [4]. Kolejnymi badaczami, którzy zaobserwowali i opisali u osób żywych zespół powyższych objawów, a także udokumentowali przypadki współwystępowania z nimi schorzeń neuropsychiatrycznych, byli Douglas Hunt Stewart (1928) i Ferdinand Morel (1930). Od nazwisk tych uczonych pochodzi nazwa zespołu chorobowego, na którego klasyczny obraz składa się podana triada objawów (otyłość, wirylizm i HFI), czyli zespół Morgagniego-Stewart-Morela (MSM) [3, 8]. W 1936 roku Morel po raz pierwszy użył powszechnie dziś używanej nazwy „hyperostosis frontalis interna“, która w języku polskim do tej pory nie znalazła odpowiednika [9].

Model amerykański (Moore 1955) zakłada, iż przyczyną zjawiska HFI jest zwiększona objętość łuski kości czołowej spowodowana nadmierną proliferacją kości gąbczastej w obrębie śródkościa przy niezmienną kości zbitej w obrębie blaszki zewnętrznej. Według założeń modelu europejskiego

(Thevoz 1966) przyczyną występowania zmian w kości czołowej jest zwiększone unaczynienie opony twardej oraz zainicjowany przez nią proces tworzenia nieregularnych nawarstwień kostnych. Model uniwersalny (Hershkovitz 1999) uwzględnia czteroetapowy proces powstawania HFI: w początkowej fazie osteoblasty tworzą nowe warstwy tkanki kostnej, które następnie są deponowane na powierzchni zewnętrznej opony twardej czemu towarzyszy nasilona angiogeneza i konsolidacja tkanki kostnej (mineralizacja) z powstawaniem na skutek tych procesów nieregularnych jamek kostnych [4]. W badaniach obrazowych stwierdza się nieregularne poszerzenie modelującej blaszkę wewnętrzną warstwy śródkościa, z rozproszonymi w jego obrębie jamistymi przestrzeniami [11, 20]. W obrazie mikroskopowym cechą typową dla HFI jest pogrubienie warstwy śródkościa i jej przebudowa z wytworzeniem jamek szpikowych różnego kształtu i wielkości [4].

KLASYFIKACJA HFI

W celu opisania i usystematyzowania zjawiska jakim jest HFI opracowano dwa systemy klasyfikacyjne: trójstopniową klasyfikację radiologiczną, która pozwala ocenić stopień zaawansowania zmian w kościach czaszki przyżyciowo w oparciu o charakter zmian widocznych na zdjęciach rentgenowskich oraz klasyfikację czterostopniową (A-D wg Hershkovitza) uwzględniającą stopień zaawansowania zmian morfologicznych w obrębie kości czołowej stwierdzanych w trakcie badania pośmiertnego. W stopniu A obserwuje się występowanie nielicznych, niewielkich guzków o średnicy mniejszej niż 10 mm zlokalizowanych w obrębie blaszki wewnętrznej łuski kości czołowej, natomiast w stopniu B guzowate wyniosłości mają większe wymiary i zajmują nie więcej niż 25% jej powierzchni. Zmiany w blaszce wewnętrznej o cechach HFI zajmujące 25-50% jej powierzchni określa się jako stopień C, natomiast przypadki zaawansowane, w których stwierdza się rozległe zmiany w kości czołowej, obejmujące co najmniej 50% jej powierzchni zalicza się do stopnia D [4, 6, 14].

Zarówno w badaniach przyżyciowych, jak i pośmiertnych najczęściej obserwuje się występowanie zmian kostnych o znacznym stopniu zaawansowania (typ C i D wg Hershkovitza) [6].

ETIOLOGIA I PATOGENEZA HFI

Na przestrzeni wieków formułowano wiele hipotez, które miały wyjaśnić genezę HFI. Przyczyn upatrywano m.in. w toczących się w organizmie procesach zapalnych, następstwach godzących w głowę urazów mechanicznych, zaburzeniach metabolizmu wapnia. Sugerowano również, że HFI może być zjawiskiem kompensacyjnym względem zachodzących u osób w podeszłym wieku zmian zanikowych lub jednym z wariantów choroby Pageta [22]. Żadnej z tych hipotez nie udało się potwierdzić obiektywnymi badaniami naukowymi, tak więc mimo wielu lat badań HFI jest do dziś słabo poznanym zjawiskiem o wciąż niewyjaśnionej etiologii.

Częstość występowania zjawiska HFI w populacji ogólnej wynosi od kilku do kilkunastu procent [6, 10]. Co znamienne, występuje ono około 4-5 razy częściej u kobiet niż u mężczyzn [4, 10]. Jest ponadto ściśle zależne od wieku, częściej bowiem występuje u osób w wieku podeszłym (60-70 r. ż.) i starszym (> 75 r. ż.) niż u osób młodych. U kobiet w okresie pomenopauzalnym jego częstość wynosi nawet do 40-60% [10, 11]. W przypadku mężczyzn, u których obserwuje się zmiany anatomiczne w kościach sklepienia czaszki o cechach HFI niemal zawsze stwierdza się niedobór androgenów, związany z hipogonadyzmem pierwotnym (niedoczynność hormonalna gonad męskich) lub wtórnym (zaburzenie wydzielania gonadoliberyny i gonadotropiny). Współcześnie przypadki HFI odnotowuje się również u mężczyzn chorych na zaawansowanego, hormonozależnego raka prostaty, u których w celach leczniczych dokonano zabiegu orchidektomii bądź wdrożono leczenie obniżające poziom endogennych androgenów (analogi luliberyny) lub hamującego odpowiedź tkankową na ich obecność w organizmie (blokery receptorów androgenowych) [12, 13].

W związku z faktem, że HFI spotyka się najczęściej u kobiet w wieku pomenopauzalnym oraz u mężczyzn cierpiących na niedobór androgenów zaczęto poszukiwać związku pomiędzy występowaniem zmian kostnych w czaszce a zaburzeniem wydzielania hormonów płciowych. Jednak jak pokazują najbardziej aktualne badania naukowe, przyczyn pojawiania się powyższych zmian należałoby dopatrywać się nie tyle w samym niedoborze hor-

monów płciowych, ale raczej w złożonych zaburzeniach metabolicznych i wydzielania wewnętrznego oraz związanej z nimi dysregulacji hormonalnej na wielu poziomach.

Zaburzenia te wynikają ze wzajemnych zależności pomiędzy poziomem estrogenów, progesteronu, testosteronu jak również w zakresie hormonów osi podwzgórze-przysadka mózgowa, prolaktyny, hormonów tarczycy, a nawet jak wskazują badania najnowsze – poziomu leptyny [7, 16]. Z tej przyczyny HFI bywa nazywana kraniopatią metaboliczną [2, 3, 8].

Do hormonów o istotnym wpływie na tempo metabolizmu i procesów przebudowy kości należą hormon wzrostu, glikokortykoidy, kalcytonina, parathormon oraz hormony tarczycy, jednak to hormony płciowe mają największy wpływ na tworzenie i przebudowę tkanki kostnej oraz są najważniejszymi czynnikami odpowiedzialnymi za powstanie dymorfizmu kostnego. Estrogeny powodują zwiększenie gęstości i masy kostnej, spadek obrotu kostnego oraz mają istotny wpływ na równowagę procesów tworzenia i resorpcji tkanki kostnej, potęgując jednocześnie wchłanianie wapnia w przewodzie pokarmowym i sekrecję parathormonu. Pomenopauzalny spadek stężenia estrogenów powoduje zwiększenie obrotu kostnego, spadek mineralizacji kości oraz dysregulację procesów ich przebudowy z przewagą procesu resorpcji, prowadząc w rezultacie do osteoporozy. Główną funkcją testosteronu jest hamowanie resorpcji tkanki kostnej i intensyfikacja kościotworzenia. Spadek jego stężenia powoduje obniżenie gęstości kości [10].

Jakkolwiek podkreśla się silny związek pomiędzy pogrubieniem kości czołowej a wahaniami poziomów hormonów płciowych, to HFI łączy się także z otyłością, nadciśnieniem tętniczym, zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (w tym z cukrzycą), chorobami tarczycy oraz czynnymi hormonalnie gruczolakami przysadki mózgowej, zwłaszcza tymi wydzielającymi hormon wzrostu i prolaktynę [17, 18]. U części chorych z zaburzeniami funkcji hormonalnej przysadki mózgowej spowodowanych obecnością jej gruczolaków oraz potwierdzonymi badaniami radiologicznymi pogrubieniem kości czołowej stwierdza się także zmiany w obrazie siodła tureckiego np. w postaci nadmiernego uwapnienia tego regionu czaszki [18].

Leptyna nazywana „hormonem sytości“ powodu-

je również zwiększenie objętości i gęstości kości w okresie szczytowej masy kostnej. Obserwuje się ujemną korelację jej poziomu z markerami resorpcji. Wyższy poziom leptyny występuje w populacji kobiet oraz osób otyłych (stwierdzono dodatnią korelację poziomu leptyny w organizmie z wartością wskaźnika masy ciała). Receptory dla leptyny znajdują się w licznych narządach wewnętrznych, m.in. w mózgu, gonadach, łożysku i komórkach śródbłonna. Według najnowszych hipotez wysoki poziom leptyny może predysponować do przerostu tkanki kostnej, skutkującego powstaniem zmian o charakterze HFI [16].

Dieta bogata w węglowodany, złożona z wysoko przetworzonych składników oraz będące konsekwencjami niezdrowego stylu życia zaburzenia metaboliczne i ich następstwa w postaci otyłości, zaburzeń gospodarki hormonalnej (m.in. wzmożonej produkcji jednego z estrogenów – estronu przez tkankę tłuszczową) i wzrostu poziomu leptyny mogą być także czynnikami indukującymi powstanie zmian kostnych o charakterze HFI [10]. W badaniach przeprowadzonych na myszach stwierdzono, że iniekcje estrogenów mogą indukować powstawanie zmian kostnych czaszki. Na podstawie m.in. tych badań zasugerowano, że przemiany metaboliczne żeńskich hormonów płciowych zachodzące w komórkach tkanki tłuszczowej mogą być ogniwem łączącym HFI i otyłość [20]. Na powstanie HFI mogą mieć również wpływ zachowania seksualne i rozrodcze, w tym postępujący spadek liczby urodzeń (mniejsza liczba ciąż), skrócenie długości okresu karmienia piersią, wydłużony okres reprodukcyjny – wczesna menarche i późna menopauza oraz stosowanie zastępczej terapii hormonalnej w jej przebiegu, a także spożywanie fitoestrogenów zawartych w preparatach farmaceutycznych lub pokarmach pochodzenia roślinnego, m.in. w soi, nasionach lnu, ziarnach kukurydzy [4].

Jakkolwiek nie udało się dowieść genetycznych uwarunkowań anomalii kostnej jaką jest HFI, to obserwuje się niekiedy skłonność rodzinną do jej występowania [4, 6]. Opisano przypadki występowania HFI w zespołach uwarunkowanych genetycznie, do których należą m.in. dystrofia miotoniczna (choroba Steinerta), zespół Klinefeltera, zespół Kallmana, zespół Wernera, zespół Cockayne, zespół Alströma, zespół Saethre-Chotzen. Do obrazu klinicznego większości z tych schorzeń należą współ-

występujące często z HFI zaburzenia wydzielania hormonów płciowych i hipogonadyzm, a także inne endokrynopatie oraz zaburzenia metaboliczne, w tym m.in. cukrzyca i otyłość [13, 26, 27, 28, 29, 30].

HFI A SCHORZENIA NEUROPSYCHIATRYCZNE

Niewielkie zmiany kostne w czaszce pozostają najczęściej bez wpływu na stan zdrowia. Jednakże w zaawansowanych przypadkach, gdy pogrubienie kości czołowej osiąga znaczne rozmiary, powstałe w jej obrębie wypukłości kostne mogą powodować ucisk mechaniczny na oponę twardą i półkule mózgu, prowadząc do zaniku kory płatów czołowych. Może to skutkować pojawieniem się objawów neurologicznych i zaburzeń psychicznych. Opisano związek HFI z występowaniem zespołu płatów czołowych, manifestującego się: zaburzeniami afektywnymi i schizoafektywnymi, zespołem otępiennym, zaburzeniami lękowymi, zaburzeniami snu i łaknienia, zachowaniami agresywnymi, zaburzeniami węchu. Ponadto obserwowano różnorodne zaburzenia motoryczne i somatosensoryczne (w tym migrenę) [18, 21, 22, 23]. W części przypadków odnotowano współwystępowanie HFI z chorobami: Picka, Parkinsona i Alzheimera [6, 22]. Opisano przypadek występowania zmian w kościach czaszki o cechach HFI u osoby z rozpoznaniem tzw. zespołu Diogenesa, czyli obserwowanego zwykle u osób w wieku podeszłym zaburzenia zachowania przejawiającego się skrajnym zaniedbaniem higieny osobistej, wycofaniem się z życia społecznego i towarzyszącym mu niekiedy kompulsywnym zbieractwem, będącego najprawdopodobniej jedną z manifestacji klinicznych zespołu płatów czołowych [24].

Tak więc nie dziwi fakt, że w badaniach populacji brytyjskiej HFI obserwowano około dwa razy częściej u pacjentów oddziałów psychiatrycznych (10,7%) niż w oddziałach o innym profilu (5,85%). Zmiany w kości czołowej spotykano u osób z rozpoznaniem: schizofrenii i psychoz o innym podłożu, zaburzeń afektywnych i otępiennych oraz u pacjentów w wieku starszym. Jednak schorzenia te występowały w grupie pacjentów z HFI tak samo często jak u pacjentów z grupy kontrolnej, tak więc nie udało się wykazać występowania istotnego sta-

tystycznie związku pomiędzy zaburzeniem budowy kości czołowej a określoną jednostką chorobową w myśl klasyfikacji ICD-10 lub DSM-IV [25].

HFI A IDENTYFIKACJA

Silna korelacja pomiędzy występowaniem HFI a płcią żeńską i zaawansowanym wiekiem spowodowała, iż zmiany w obrębie sklepienia czaszki spróbowano wykorzystać jako marker płci i wieku w przypadku identyfikacji nieznanymi szczątków kostnych. Ocena procesu patologicznego jakim jest HFI może znaleźć zastosowanie w praktyce sądowo-lekarskiej. W przypadku, gdy w obrębie kości czołowej stwierdza się cechy zaawansowanego HFI prawdopodobieństwo, że badane szczątki należały do kobiety wynosi około 88%, zaś kobiety w wieku co najmniej 70 lat powyżej 32%. W sytuacji, gdy wiek biologiczny badanych szczątków ocenia się na co najmniej 70 lat, prawdopodobieństwo, że czaszka wykazująca cechy HFI należała do kobiety wynosi niemal 87%. Jeśli zmiany odpowiadające HFI stwierdzono w szczątkach kobiety, prawdopodobieństwo, że w chwili śmierci miała ona co najmniej 70 lat sięga ponad 42% [5].

HFI W ASPEKTCIE HISTORYCZNYM

Prace archeologiczne i badania szczątków kostnych dawnych społeczności pozwoliły na ustalenie, że HFI występuje u współcześnie żyjących kobiet ok. 2,5 razy częściej niż u ich kobiet żyjących 100 lat temu. Ponadto u kobiet, które żyły w XVIII wieku i dawniej HFI była zjawiskiem wyjątkowo rzadkim, a w przypadku starożytnych społeczeństw praktycznie niespotykanym [10]. Jedynie w wysoko rozwiniętych, bogatych społecznościach (Pueblo Bonito, Nowy Meksyk, USA oraz Quatna, Syria) odnotowano tego typu przypadki. W przeszłości tak jak i współcześnie HFI dotyczyło najczęściej kobiet w wieku pomenopauzalnym. Częstość zmian w obrębie kości czołowej dawnych mieszkańców Pueblo Bonito wynosiła około 32% populacji ogólnej, u kobiet 44%, natomiast u mężczyzn 8,3% i przewyższała nawet tę odnotowywaną obecnie [4, 11, 19].

Dzięki badaniom archeologicznym zaobserwowano również statystycznie istotny wzrost częstości występowania HFI nie tylko u starszych, ale i u młodych osób na przestrzeni wieków. Pozwoliło to na

wysunięcie hipotezy, że być może wzrost ten należałoby wiązać z postępującym procesem rozwoju cywilizacji i związanymi z nim niekorzystnymi zmianami stylu życia i nawyków żywieniowych.

Najstojniejszą osobą, u której udokumentowano występowanie HFI był Carlo Broschi, włoski śpiewak operowy bardziej znany jako Farinelli. Farinelli przed wkroczeniem w okres dojrzewania został poddany kastracji, co pozwoliło zachować jego wyjątkowy, niepowtarzalny głos o niespotykanej trzy- i pół-octawowej skali, określanej przez wielu mianem „nadludzkiego”. Był on nadwornym śpiewakiem króla Hiszpanii Filipa V. To prawdopodobnie na skutek zmian w kościach czaszki Farinelli cierpiał z powodu uporczywych, migrenowych bólów głowy. Zmarł w wieku 78 lat i został pochowany w klasztorze kapucynów w Bolonii. Po zniszczeniu klasztoru w 1810 roku przez wojska napoleońskie szczątki wybitnego śpiewaka przeniesiono na główny cmentarz Bolonii – La Certosa.



Ryc. 1. Carlo Broschi zwany Farinelli (1705-1782) (rycina Wagnera z 1735 roku wg Jacopo Amigoniego; Narodowa Galeria Portretu, Londyn).

Fig. 1. Carlo Broschi called Farinelli (1705-1782) (by Wagner, after Jacopo Amigoni, line engraving, 1735; National Portrait Gallery, London).

W 2006 roku włoski antropolog Maria Giovanni Belcastro wraz z grupą współpracowników dokonał ekshumacji szczątków Farinello. Z powodu upływu czasu i sprzyjających szybkemu niszczeniu materiału kostnego warunków pochówku, do czasów współczesnych zachowało się niewiele nadających się do oceny morfologicznej fragmentów kostnych, w tym jedyna kompletna kość – prawa kość łokciowa. W oparciu o ich badanie udało się zidentyfikować kilka cech szkieletu, które były najprawdopodobniej wynikiem kastracji, tj. wysoki wzrost (ok. 190 cm), niepełne skostnienie linii nasadowych oraz cechy zaawansowanej osteoporozy. Ponadto w czasie analizy zachowanych fragmentów kości czaszki stwierdzono silne i nieregularne pogrubienie blaszki wewnętrznej kości czołowej, której maksymalna grubość wynosiła 21 mm. Cechę tę łączy się dziś również m.in. z pokastracyjnym niedoborem androgenów [15].

WNIOSKI KOŃCOWE

Mimo stałego i dynamicznego rozwoju metod badawczych zjawisko jakim jest HFI pozostaje do dziś słabo poznane. Zaobserwowano silną zależność pomiędzy płcią żeńską i zaawansowanym wiekiem oraz złożonymi zaburzeniami metabolicznymi i gospodarki hormonalnej, zwłaszcza dysregulacją w zakresie poziomu hormonów płciowych, co pozwoliło w pewnym stopniu przybliżyć prawdopodobne tło powstania zmian w kości czołowej. HFI wydaje się zatem nie tylko wykazywać związek z płcią i wiekiem, co można wykorzystać w praktyce sądowo-lekarskiej i antropologicznej, ale także wiele mówić o kondycji zdrowotnej (fizycznej i psychicznej) osoby badanej pośmiertnie.

PIŚMIENICTWO

1. She R., Szakacs J.: Hyperostosis frontalis interna: case report and review of literature. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2004, 34 (2): 206-208.
2. Caughey J.: The etiology of hyperostosis crania (metabolic craniopathy) – a clinical study. *J. Bone Joint Surg. Br* 1958, 50 (4): 701-721.
3. Capraro V., Dillon W., Calabrese J.: Morgagni's Syndrome. *Metabolic craniopathy. Obstet. Gynecol.* 1970, 35 (4): 565-569.
4. Raikos A., Paraskevas G., Yusuf F., Kordali P., Meditskou S., Al-Haj A., Brand-Saberi B.: Ethio-pathogenesis of hyperostosis frontalis interna: A mystery still. *Ann. Anat.* 2011, 193 (5): 453-458.
5. May H., Peled N., Dar G., Cohen H., Abbas J., Medlej B., Hershkovitz I.: Hyperostosis frontalis interna: criteria for sexing and aging a skeleton. *Int. J. Legal Med.* 2011, 125 (5): 669-673.
6. Devriendth W., Piercecchi-Marti M., Adalian P., Sanvoisin A., Dutour O., Leonetti G.: Hyperostosis frontalis interna: forensic issues. *J. Forensic Sci.* 2005, 50 (1): 143-146.
7. Ross A., Jantz R., McCormick W.: Cranial thickness in American females and males. *J. Forensic Sci.* 1998, 43 (2): 267-272.
8. Rowlands I., Das B.: Stewart-Morel Syndrome. *Br Med J* 1967, 3 (5564): 559-560.
9. Nallegowda M., Singh U., Khanna M., Yadar S., Choudhary A., Thakar A.: Morgagni-Stewart-Morel Syndrome- additional features. *Neurol. India* 2005, 53 (1): 117-119.
10. May H., Peled N., Dar G., Abbas J., Hershkovitz I.: Hyperostosis frontalis interna: What does it tell us about our health? *Am. J. Hum. Biol.* 2011, 23: 392-397.
11. Flohr S., Witzel C.: Hyperostosis frontalis interna - A marker of social status? Evidence from the Bronze Age "high society" of Qatna, Syria. *Homo* 2011, 62 (1): 30-43.
12. May H., Peled N., Dar G., Abbas J., Medlej B., Masharawi Y., Hershkovitz I.: Hyperostosis frontalis interna and androgen suppression. *Anat. Rec.* 2010, 293: 1333-1336.
13. Yamakawa K., Mizutani K., Takahashi M., Matsui M., Mezaki T.: Hyperostosis frontalis interna associated with hypogonadism in elderly man. *Age Ageing* 2006, 35: 202-203.
14. May H., Peled N., Dar G., Hay O., Abbas J., Masharawi Y., Hershkovitz I.: Identifying and classifying hyperostosis frontalis interna via Computerized Tomography. *Anat. Rec.* 2010, 293: 2007-2011.
15. Belcastro M., Todero A., Fornaciari G., Mariotti V.: Hyperostosis frontalis interna (HFI) and castration: the case of famous singer Farinelli (1705-1782). *J. Anat.* 2011, 219 (5): 632-637.
16. Rühli F., Henneberg M.: Are hyperostosis frontalis interna and leptin linked? A hypothetical approach about hormonal influence on human microevolution. *Med. Hypotheses* 2002, 58 (5): 378-381.
17. Fulton J., Shand J., Ritchie D., McGhee J.: Hyperostosis frontalis interna, acromegaly and hyperprolactinemia. *Postgrad. Med. J.* 1990, 66: 16-19.
18. Andrews C.: Hyperostosis frontalis interna. *Br. Med. J.* 1942, 2 (4258): 185-187.
19. Mulhern D., Wilczak C., Dudar J.: Brief communication: Unusual finding at Pueblo Bonito: Multiple cases of hyperostosis frontalis interna. *Am. J. Phys. Anthropol.* 2006, 130: 480-484.
20. Rühli F., Böni T., Henneberg M.: Hyperostosis frontalis interna: archeological evidence of possible microevolution of human steroids? *Homo* 2004, 55: 91-99.
21. Zubicaray G., Chalk J., Rose S., Semple J., Smith G.: Deficits on self ordered tasks associated with hyperostosis frontalis interna. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1997, 63: 309-314.
22. Selby G., Lance J.: Observations on 500 cases of migraine and allied vascular headache. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1960, 23 (1): 23-32.
23. Smith S., Hemhill R.: Hyperostosis frontalis interna. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1956, 19 (1): 42-45.
24. Zuliani G., Soavi C., Dianese A., Gatti M.: Diogenes Syndrome associated with hyperostosis frontalis interna: A possible role for frontal dysfunction. *Eur. Geriatr. Med.* 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurger.2012.04.002>
25. Hawkins T., Martin L.: Incidence of hyperostosis frontalis interna in patients at a general hospital and at a mental hospital. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1965, 28 (2):171-174.
26. Caughey J.: Radiological changes in the skull in dystrophia myotonica. *Br. Med. J.* 1952, 1 (4750): 137-139.

27. Ellison D., Pugh D.: Werner Syndrome. *Br. Med. J.* 1955, 2 (4933): 237-239.

28. Rapin J., Weidenheim K., Lindenbaum Y., Rosenbaum P., Merchant S., Krishna S., Dickson D.: Cockayne Syndrome in adults: review with clinical pathologic study of a new case. *J. Child Neurol.* 2006, 21 (11): 991-1006.

29. Tiwari A., Awasthi D., Tayal S., Ganguly S.: Alström syndrome: A rare genetic disorder and its anaesthetic significance. *Indian J. Anaesth.* 2010, 54 (2): 154-156.

30. Reardon W., Winter R.: Saethre-Chotzen syndrome. *J. Med. Genet.* 1994, 31 (5): 393-396.

Adres do korespondencji:

lek. Barbara Sumińska-Ziemann

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ul. Dębowa 23

80-204 Gdańsk

e-mail: basia_suminska@gumed.edu.pl

ARCHIVES OF FORENSIC MEDICINE AND CRIMINOLOGY

VOLUME LXII
No. 3 (2012)
July
September

THE OFFICIAL JOURNAL of the POLISH SOCIETY of FORENSIC MEDICINE and CRIMINOLOGY

EDITOR-IN-CHIEF: **Krzysztof Woźniak MD, PhD**
DEPUTY EDITOR: **Filip Bolechała MD, PhD**
ASSISTANT TO THE EDITOR: **Artur Moskała MD**

EDITORIAL BOARD:

Prof. Jarosław Berent – Łódź, Poland
Prof. Bernd Brinkmann – Münster, Germany
Prof. Richard Dirnhofer – Berno, Switzerland
Prof. Noriaki Ikeda – Fukuoka, Japan
Prof. Jerzy Janica – Białystok, Poland
Assoc. Prof. Zbigniew Jankowski – Gdańsk, Poland
Prof. Małgorzata Kłys – Kraków, Poland
Assoc. Prof. Paweł Krajewski – Warszawa, Poland
Prof. Eduard Peter Leinzinger – Graz, Austria
Prof. Patrice Mangin – Lausanne – Geneva, Switzerland
Prof. Zdzisław Marek – Kraków, Poland
Prof. Zofia Olszowy – Sosnowiec, Poland
Prof. Derrick J. Pounder – Dundee, Scotland UK
Prof. Zygmunt Przybylski – Poznań, Poland
Prof. Stefan Raszeja – Gdańsk, Poland
Prof. Guy N. Ruttly – Leicester, England UK
Prof. Pekka Saukko – Turku, Finland
Prof. Volker Schmidt – Halle – Wittenberg, Germany
Prof. Stefan Szram – Łódź, Poland
Prof. Karol Śliwka – Bydgoszcz, Poland
Prof. Barbara Świątek – Wrocław, Poland
Prof. Akihiro Takatsu – Tokyo, Japan
Prof. Michael Thali – Zurich, Switzerland
Dr Kurt Trübner – Essen, Germany
Prof. Duarte Nuno Vieira – Coimbra, Portugal

e-mail: redakcja@amsik.pl

www.amsik.pl

Polish Society of Forensic Medicine and Criminology
ul. Sędziowska 18a
91-304 Łódź, Poland

PRACE ORYGINALNE / ORIGINAL PAPERS

Joanna Wysocka, Aneta Stasiewicz, Krzysztof Rębała, Ewa Kapińska, Lidia Cybulska, Zofia Szczerkowska Analiza częstości mutacji w parach ojciec–syn w wybranych markerach Y-STR Analysis of mutations in father-son pairs within selected Y-STR loci	147
Ewa Kapińska, Joanna Wysocka, Lidia Cybulska, Krzysztof Rębała, Patrycja Juchniewicz, Zofia Szczerkowska Przykłady zastosowania markerów chromosomu X w badaniach rodzinnych i identyfikacyjnych Examples of application of X chromosomal markers in familial investigations and personal identification	152
Monika Reichert, Agnieszka Maciejewska, Krzysztof Talarczyk, Regina Paszkowska, Joanna Jakubowska, Anita Dettlaff-Kąkol, Izabela Maciejewska, Ryszard Pawłowski Polimorfizm locus SE33 w populacji polskiej Polymorphism in the SE33 locus in the Polish population	160
Krzysztof Rębała, Iosif S. Tsybovsky, Alexei I. Mikulich, Zofia Szczerkowska Identyfikacja polimorfizmu typu Y-SNP w genie USP9Y i jego znaczenie w genotypowaniu alleli locus M46 Identification of a novel Y-SNP in the USP9Y gene and its impact on genotyping alleles of the M46 locus	165
Tomasz Gos, Zbigniew Jankowski Samobójstwo a depresja w świetle pośmiertnej oceny zaburzeń aktywności neuronalnej Suicide and depression in the postmortem evaluation of disturbed neuronal activity	171
Marek Wiergowski Propozycja interpretacji wyników analitycznych uzyskanych w pobliżu prawnej granicy stężeń dla stanu po użyciu alkoholu lub stanu nietrzeźwości Proposal of interpreting analytical results indicating borderline-legal alcohol concentration values in individuals after alcohol consumption or being alcohol-intoxicated	178
Marek Wiergowski, Zbigniew Jankowski, Ewa Tomczak, Jacek Sein Anand, Rafał Ziółkowski, Janusz Staniszewski Propozycja testów oceniających zdolności psychomotoryczne kierowcy oraz protokołu do zastosowania w trakcie pobrania i badania śliny, krwi oraz moczu w przypadku podejrzenia przyjęcia środków działających podobnie do alkoholu Proposal of psychomotor skill assessment tests for drivers and a protocol for sampling and testing of saliva, blood and urine when there is reason to suspect involvement of substances with alcohol-like effect	186

Projekt znaku graficznego PTMSiK – Wiktor Ostrzotek

Wydawca: Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii

Wpłaty za prenumeratę należy dokonywać na konto: Zarząd Główny Pol. Tow. Med. Sąd. i Krym.
Kredyt Bank S.A. III Oddział w Poznaniu ul. Garbary 71, 61-758 Poznań
nr konta: 21 1500 1621 12136001 1805 0000

Copyright © by Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii, Kraków 2012

Realizacja wydawnicza i druk:
Agencja Reklamowa Po Godzinach
ul. Podedworze 10/54, 30-686 Kraków
tel. +48 12 623 77 74, +48 609 633 948
e-mail: biuro@pogodzinach.com.pl
www.pogodzinach.com.pl

Nakład: 550 egz.

www.amsik.pl