

Bożena Turowska, Marek Sanak, Ewa Raczek

Przeciwstawne homozygoty w układzie GLOI u pozwanego i dziecka. Wykluczenie czy “potwierdzenie” ojcostwa. Opis przypadków

Contrary homozygoty of the GLOI system in putative father and child. Exclusion or “confirmation” the paternity. Case report

Z Pracowni Serogenetyki Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. Kierownik: Prof. dr hab. B. Turowska

Z Pracowni Serologicznej Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. Kierownik: Prof. zw. dr hab. med. W. Nasiłowski

Opisano dwie sprawy spornego ojcostwa z ujawnieniem przeciwstawnych homozygot w układzie GLOI u pozwanych i dzieci. Dodatkowe badania ilościowe enzymu GLOI a także w zakresie polimorfizmu DNA umożliwiły prawidłowe rozstrzygnięcie problemu.

During the determination of blood groups in forensic cases of disputed paternity in two cases an incompatibility between a putative father and a child in GLOI system was observed. Determination of enzyme activity and the analysis of DNA polymorphisms helped clear up the paternity.

W czasie przeprowadzania badań o dochodzenie spornego ojcostwa stwierdzono w dwóch przypadkach przeciwstawne homozygoty u pozwanego i u dziecka w układzie glikosalazy I (GLOI). W pozostałych układach grupowych dziedziczenie cech było zgodne z prawami genetyki. W celu rozstrzygnięcia czy w opisanych przypadkach należy wykluczyć ojcostwa pozwanych w stosunku do badanych dzieci, czy też występują “nieme” geny w układzie GLOI, przeprowadzono dodatkowe badania ilościowe enzymu GLOI a także w zakresie polimorfizmu DNA.

MATERIAŁ I METODY

W dwóch sprawach oznaczonych symbolami Se 209/94 oraz Se 38/95 o dochodzenie spornego ojcostwa przeprowadzono ekspertyzę I i II stopnia w

zakresie: ABO, MNSs, Rh (C^WCcDee), Kell, HP, Gm1, ACP, ESD, PGM1, PGP, GLOI oraz HLA–ABC. Uzyskane wyniki były następujące:

Sprawa Se 209/94

- Pozwany – O, MNSs, Rh ccddee, K–, HP 2–2, GM (–1), ACP CB, PGM1 2, ESD 1, PGP 1, GLOI 2, HLA–A2, A3; B8, B62(15), Bw6; Cw7, –
 Dziecko – A₁, Mss, Rh CcDee, K–, HP 2–2, Gm(–1), ACP CB, PGM1 2–1, ESD 1, PGP 1, GLOI 1, HLA–A2, A26(10); B39(16), B62(15), Bw6; Cw7 –
 Matka – A₁, MNss, Rh CcDee, K–, HP 2–1, GM(–1), ACP B, PGM1 2–1, ESD 1, PGP 1, GLOI 1, HLA–A2, A26(10); B7, B39(16), Bw6; Cw7, –

Sprawa: Se 38/95

- Pozwany – B, MNss, Rh CCDee, K–, HP 2–1, GM(–1), ACP BA, PGM1 1, ESD 1, PGP 1, GLOI 2 HLA–A2, –; B18, B57(17), Bw4, Bw6; Cw6, Cw7, –
 Dziecko – O, MNSs, Rh CCDee, K–, HP 2–2, GM(–1), ACP CB, PGM1 1, ESD 1, PGP 1, GLOI 1 HLA–A2, A3; B7, B18, Bw6; Cw7, –
 Matka – B, MSs, Rh CcDee, K–, Hp 2–1, GM(–1), ACP CA, PGM1 1, ESD 2–1, PGP 1, GLOI 1 HLA–A3, A32(19); B7, B8, Bw6; Cw7.

W dodatkowych badaniach ilościowych enzymu GLOI stosowano metodę opisaną przez E. Raczek a przy określeniu polimorfizmu DNA zastosowano metodę RFLP z sondą wielolokusową MZ1.3, metodę PCR, oznaczając allele locus D1S80, układu TC 11, Se 33 oraz HLA–DQalfa metodą odwróconego dot blot (1, 3, 4).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki aktywności gliksalazy I w obu badanych przypadkach porównano ze średnimi wartościami kontrolnych fenotypów GLOI. Aktywność GLOI dla kontrolnego fenotypu GLOI 1–1 wynosiła: 6,33 IU/g Hb; dla GLOI 2–2 7,25 IU/g Hb i dla fenotypu heterozygotycznego GLOI 2–1 7,05 IU/g Hb.

W sprawie oznaczonej symbolem Se 209/94 wykazano obecność genu “niemego” u pozwanego i u badanego dziecka. Stwierdzono bowiem ~50% niższą aktywność gliksalazy I w porównaniu do aktywności enzymu w kontrolnych, homozygotycznych fenotypach. Wynosiły one: u pozwanego GLOI 2–0 2,88 IU/g Hb oraz u dziecka GLOI 1–0 3,33 IU/g Hb. U matki natomiast aktywność enzymu GLOI 1–1 była następująca: 5,19 IU/g Hb.

Uzyskane wyniki badań polimorfizmu DNA nie dały podstaw do wykluczenia ojcostwa pozwanego, a na podstawie badań za pomocą sondy MZ 1.3 można było przyjąć, że pozwany mężczyzna w sprawie oznaczonej symbolem Se 209/94 jest biologicznym ojcem badanego dziecka.

W sprawie Se 38/95 u pozwanego i u dziecka aktywności gliksalazy I były zbliżone do wartości kontrolnych fenotypów i wynosiły: pozwany GLOI 2–2 5,59 IU/g Hb; dziecko GLOI 1–1 5,98 IU/g Hb. U matki aktywność enzymu wynosiła 5,57 IU/g Hb. Uzyskane wyniki wykluczyły obecność “niemego” genu w stwierdzanych przeciwstawnych homozygotach pozwanego i badanego dziecka. Ojcostwo biologiczne pozwanego należało zatem wykluczyć.

Wyniki badań polimorfizmu DNA za pomocą sondy MZ 1.3 potwierdziły wykluczenie ojcostwa pozwanego w tym sporze. U dziecka pojawiły się 4 allele nieobecne u matki, jak i pozwanego. Na podstawie badań układu TC 11 i SE 33 należało również wyłączyć ojcostwo pozwanego mężczyzny.

Uzyskane wyniki badań dotyczące aktywności GLOI de facto pozwoliły na prawidłowe rozstrzygnięcie problemu wydania poprawnej opinii w sprawach o dochodzenie spornego ojcostwa. Jednakże, zdaniem autorów, dla stworzenia pełnego "komfortu" biegłemu wydającemu opinie dla Wymiaru Sprawiedliwości konieczne jest, w przypadkach wątpliwych i trudnych do rozstrzygnięcia, poszerzenie badań o oznaczanie polimorfizmu DNA.

Przytoczone powyżej opisy przypadków jednoznacznie wskazują na celowość, w trudnych interpretacyjnie sprawach, określania markerów grupowych krwi oraz polimorfizmu DNA, z zastosowaniem metod serologicznych i biologii molekularnej.

PIŚMIENNICTWO:

1. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J.: *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1982. – 2. Raczek E.: *Gen niemy w układzie enzymatycznym glioksalazy I (EC.4.4.1.5) w populacji górnośląskiej. Metoda oznaczania aktywności enzymatycznej glioksalazy I.*, Arch. Med. Sąd. Krym., 1988, 38, 189–194. – 3. Turowska B.: *Systemy grupowe krwi i polimorfizm DNA (MLP–MZ1.3 i D1S80) w sprawach spornego ojcostwa*, Arch. Med. Sąd. Krym., 1994, 44, 453–457. – 4. Turowska B., Sanak M.: *D1S80 VNTR locus genotypes in population of South Poland; metaanalysis pointer to genetic disequilibrium of human populations*, Forensic Sci. Int., 1995, 75, 207–216.

Adres autora: Katedra i Zakład Medycyny Sądowej CM UJ

31–531 Kraków, ul. Grzegórzecka 16

Wpłynęło do Redakcji: 1.07.1995.

Zakwalifikowano do druku: 3.10.1995.

Malwina Czarny (1), Hanna Janiszewska (1), Jolanta Kwiatkowska (2), Hanna Chlebowska (2), Barbara Siemieniako (3), Ryszard Słomski (1,2,3)

Czy analiza DNA jest zawsze skuteczna: Problemy w dochodzeniu spornego ojcostwa w przypadku bliskiego pokrewieństwa domniemanych ojców.

Is DNA analysis always useful: Problems in paternity testing in case of closely related alleged fathers.

1. Laboratorium Genetyki Molekularnej.
2. Zakład Genetyki Człowieka PAN.
3. Katedra Biochemii i Biotechnologii AR.

Przedstawiono wyniki badań nad dochodzeniem spornego ojcostwa w sprawie, w której domniemanymi ojcami byli bracia. Występowanie identycznych markerów genetycznych u braci uniemożliwiło przez kilka lat wskazanie biologicznego ojca pomimo wykonania analiz serologicznych I^o i II^o, badań antropologicznych i rutynowych badań DNA. Po wykonaniu łącznie 32 analiz serologicznych, antropologicznych i DNA nadal nie można było wykluczyć ojcostwa jednego z braci. Jednoznaczny wynik uzyskano dopiero po zastosowaniu w badaniach DNA 3 analiz multilocus i 8 analiz pojedynczego locus przeprowadzonych z zastosowaniem sond molekularnych oraz markerów oznaczanych metodą PCR.

We report paternity case in which two brothers served as alleged fathers. To solve the case several analyses were performed including I^o and II^o serology, anthropology and extended studies of DNA. Due to the presence of identical genetic markers in both brothers, for several years there was no possibility to indicate biological father. Surprisingly, also routine analysis of DNA did not bring solution. After 32 tests including serology, anthropology and DNA it was still impossible to exclude one of brothers and confirm the other. The case was resolved after extended DNA studies with 3 multilocus probes and 8 analyses of single locus by hybridisation and PCR.

WSTĘP

Ostatnie lata przyniosły gwałtowny rozwój technik umożliwiających w precyzyjny sposób, a zarazem w stosunkowo krótkim czasie określenie stopnia pokrewieństwa. Opisane przez Jeffreys'a w 1985 r. wielopunktowych sond molekularnych i

33.15 i 33.6 rozpoczęło nowy kierunek w dziedzinie nauk medyczno-sądowych, a metody klasyczne – analizy serologiczne I^o i II^o oraz badania antropologiczne zostały wsparte analizą DNA z zastosowaniem technik RFLP i PCR. Analiza wielopunktowa minisatelitarnego DNA (ang. MLS, multilocus system) i analiza jednopunktowa (ang. SLS, single locus system) stały się najbardziej informatywnymi metodami wykorzystywanymi w badaniach pokrewieństwa. Coraz częściej stosowane jest również określanie antygenów HLA przez amplifikację DNA metodą PCR w miejsce stosowania swoistych surowic. W badaniach macierzyństwa bardzo informatywną metodą jest analiza mitochondrialnego DNA, który dziedziczony jest wyłącznie od matki.

Obecnie można przyjąć, że szeroki zakres metod umożliwia szybką i bezbłędną ocenę stopnia pokrewieństwa, a trudności mogą wystąpić jedynie przy zanieczyszczeniu DNA obcym materiałem genetycznym (np. w wyniku transfuzji krwi) i ewentualnym występowaniem inhibitorów enzymatycznych reakcji, wykonywanych w trakcie badań.

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad dochodzeniem spornego ojcostwa w sprawie, w której domniemanymi ojcami byli bracia. Celem wydania opinii wykonano cały szereg badań, od analizy serologicznej I^o i II^o poprzez badania antropologiczne do poszerzonych badań DNA. Przez kilka lat bezskutecznie starano się wykluczyć ojcostwo jednego z braci. Jednoznaczny wynik uzyskano dopiero po wprowadzeniu dodatkowych, poza stosowanymi rutynowo sond molekularnych oraz markerów oznaczanych metodą PCR.

MATERIAŁY I METODY

Materiałem do badań był DNA czterech osób: matki, dziecka płci męskiej oraz dwóch braci – domniemanego ojca I i domniemanego ojca II. Badanie DNA wykonano na zlecenie sądu, w ramach rutynowej działalności Laboratorium Genetyki Molekularnej (LGM). W chwili badania matka miała 36 lat, dziecko 7 lat, domniemany ojciec I 37 lat, domniemany ojciec II 41 lat. Izolację DNA przeprowadzono standardową metodą z proteinazą K. Analiza wielopunktowa obejmowała trawienie 5 µg DNA enzymem restrykcyjnym *Hinf*I lub *Hae*III, a następnie hybrydyzację z sondami molekularnymi (GTG)₅ (1), F10 (10), 33.6 (5). Fenotypowanie autoradiogramów z analizy wielopunktowej przeprowadzono metodą *Evitt*'a (41). Obliczenia statystyczne wykonywano programami *PATERN* (9) i *PATER2* (10). Analiza jednopunktowa obejmowała trawienie 5 µg DNA enzymem *Hinf*I oraz hybrydyzację z sondami molekularnymi MS43A, MS31 i Ms1. Elektroforezę prowadzono w 0,85% żelu agarozowym z dodatkiem 0,05% hydroksy-etylocelulozy, w buforze Tris–boran–EDTA (1 x TBE) przez 40 godz. przy napięciu 2V/cm. Sondy molekularne znakowano 32–P– γ ATP (Amersham) na końcu 5' z zastosowaniem kinazy polinukleotydomowej (Amersham).

Analiza jednopunktowa metodą PCR została wykonana dla locus D1S80 (7), ApoB (8), D17S30 (13) i COL2A1 (14) z zastosowaniem 0,5 µg DNA i 2,5 jedn. polimerazy Taq (Perkin–Elmer i Amersham). Ocena produktów PCR odbywała się poprzez elektroforezę w 1,5% żelach agarozowych lub 8% żelach poliakryloami-

dowych, w buforze TBE, w obecności markerów wielkości DNA (λ DNA–HindIII i KBL).

Analiza DNA dla antygenów HLA–DRB została wykonana na zestawie firmy Innogenetics i obejmowała PCR, a następnie hybrydującą z sondami specyficznymi dla poszczególnych alleli (ASO) i immunoenzymatyczną reakcją kolorymetryczną, zgodnie z zaleceniami producenta. Wyniki oceniano programem komputerowym EXPERT (Innogenetics).

WYNIKI I DYSKUSJA

Analiza serologiczna I^o została wykonana 6 lat przed badaniem DNA a analiza serologiczna II^o 4 lata przed badaniem DNA. Badania antropologiczne przeprowadzono rok po analizie serologicznej. Badane osoby nie różniły się w 5 z 16 układów grupowych oznaczonych w analizie serologicznej I^o, a domniemani ojcowie wykazywali identyczne cechy serologiczne aż w 11 układach, różniąc się jedynie w 5 układach (Tabela I). Również analiza serologiczna II^o nie doprowadziła do wykluczenia jednego z braci (Tabela I). W badaniu antropologicznym analizowano cechy A, X, (–) i O, obserwując nie tyle liczebną, a głównie wagową przewagę cech grupy A w przypadku domniemanego ojca I co dało podstawę do wnioskowania, że większe jest prawdopodobieństwo ojcostwa domniemanego ojca I niż domniemanego ojca II. Podobny wniosek wyciągnięto po analizie cech dermatoglicficznych (Tabela I). Dodatkowo obliczono wartość prawdopodobieństwa ojcostwa na podstawie cech grupowych dziecka i stron. Wartość uzyskanego wskaźnika wynosiła dla domniemanego ojca I 0,9913, natomiast dla domniemanego ojca II 0,9918.

Po upływie kolejnych trzech lat sprawę skierowano do analizy DNA. W tym czasie LGM posiadało doświadczenie wynikające z 330 analiz DNA celem dochodzenia spornego ojcostwa, przy czym rutynowa analiza obejmowała wykonanie jednego badania typu multilocus i dwóch badań pojedynczych loci metodą hybrydyzacji oraz jednego badania pojedynczego locus metodą PCR. Taki układ analiz umożliwiał w sprawach spornego ojcostwa wydanie jednoznacznej opinii i zaklasyfikowanie ich do grupy wykluczeń lub potwierżeń. Dotychczas już pierwsze badanie typu multilocus było wystarczające do określenia pokrewieństwa i pozostawało w zgodzie z wcześniejszymi obserwacjami autorów, zamieszczonymi w pracach wielośrodkowych (1, 2). Nie zaobserwowano niezgodności między wynikami badań multilocus w porównaniu z badaniami pojedynczych loci, z tą różnicą, że badanie pojedynczego locus wykonywane metodą hybrydyzacji było bardziej informatywne niż badanie pojedynczego locus metodą PCR. Również w przypadkach, w których występowało dwóch domniemanych ojców, analiza DNA okazywała się zawsze skuteczna.

W powyższej sprawie wykonano analizę multilocus z sondą molekularną (GTG)5 i fenotypowano prążki autoradiograficzne o wielkości powyżej 3,5 kpz. (Ryc. 1).

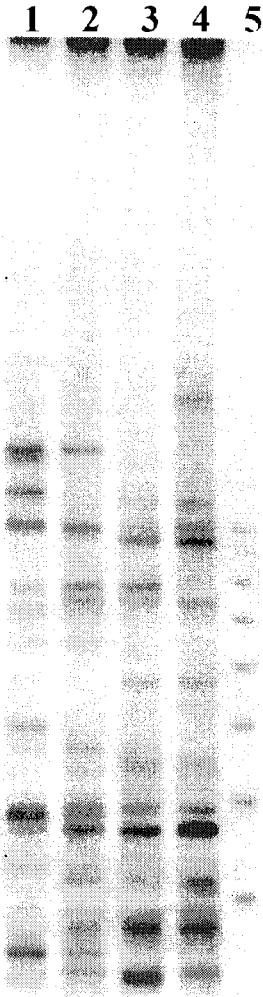
Ponieważ w analizie multilocus nie wykluczono ojcostwa żadnego z braci wykonano kolejne badania z zastosowaniem sondy F10 i 33.6. Wyniki tych badań okazały się również nieinformatywne. Wyniki fenotypowania (Tabela II) analizowano programami komputerowymi Patern i Pater2 uzyskując prawdopodobieństwo

Tabela 1.

Marker	Matka	Dziecko	Domniemany ojciec I	Domniemany ojciec II
Serologia				
ABO	A1	A1	A1	A1
MN	MN	MN	M	M
Ss	Ss	ss	Ss	Ss
P1	P1+	P1+	P1+	P1-
Rh	CcD.Ee	ccD.Ee	CcD.ee	ccddee
Kell	K-	K-	K-	K-
Hp	2-1	2-1	2-1	2-1
Gm	-1	-1	-1	-1
Gc	1-1	2-1	2-2	2-2
C3	FS	FS	SS	SS
AcP	BA	CA	CB	CA
PGM1	2-1	2-1	2-1	2-1
EsD	1	1	1	2-1
GLOI	2-1	2-1	2	2-1
GPT	2-1	2-1	2	2
ADA	1	1	1	1
Antygeny HLA				
A	A1, A2	A2, A3	A3, Aw19	A3, Aw19
B	B8, B12	B12, B35	B7, B35	B7, B35
C		Cw4	Cw4	Cw4
Antropologia				
Cechy A			49	41
Cechy X			18	23
Cechy -			41	43
Cechy O			72	73
P			59,10	26,64
DNA				
(GTG)5			100,00000	99,99969
F10			0,997332	0,991160
MS43A	1-1	1-3	3-4	2-3
MS31	2-3	3-4	1-4	1-4
D1S80	1-3	3-3	2-3	2-3
ApoB	1-3	3-3	2-3	2-3
COL2A1	1-2	2-2	2-2	2-3
D17S30	2-2	1-2	1-1	1-1
MS1	2-3	3-4	4-5	1-5
HLA-DRB	1*03-1*1	1*08-1*1	1*08-1*15	1*08-1*15

w przypadku sondy (GTG)5 dla domniemanego ojca I 100,00000%, a dla domniemanego ojca II 99,99969%. W przypadku sondy F10 wyniki wynosiły odpowiednio 0,997332 i 0,991160 (Tabela I).

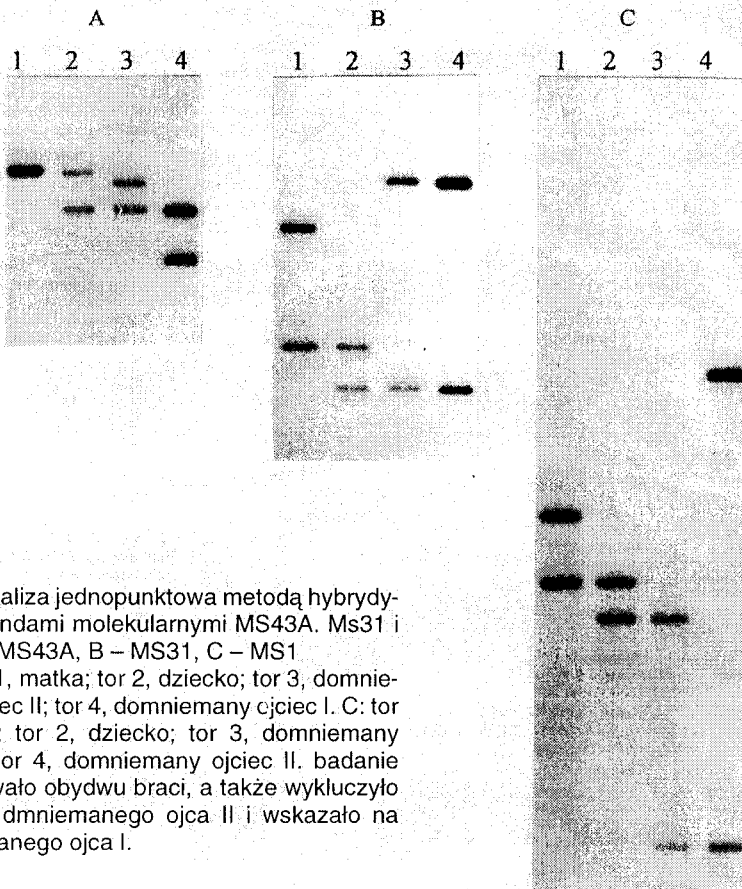
Wyniki analizy jednopunktowej metodą hybrydyzacji, obejmującej trawienie DNA enzymem restrykcyjnym *HinfI* oraz hybrydyzację z sondami molekularnymi MS43A i MS31 przedstawiono na Ryc. 2. Analiza jednopunktowa metodą PCR obejmowała markery D1S80 oraz ApoB i również nie doprowadziła do wykluczenia jednego z braci (Ryc. 3). Jako uzupełniające analizy wykonano amplifikację markerów D17S30 i COL2A1, które podobnie jak wcześniejsze analizy nie były informatywne (Ryc. 3). W czterech z sześciu rutynowych analiz jednopunktowych



Ryc. 1. Analiza multilocus z sondą molekularną (GTG)5. Tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec I; tor 4, domniemany ojciec II; tor 5, marker wielkości, KBL. Fenotypowano prążki autoradiograficznie o wielkości powyżej 3,5 kpz. Wyniki fenotypowania (TABELA II) analizowano programami komputerowymi PATERN i PATER2 uzyskując prawdopodobieństwo w przypadku sondy (GTG)5 dla domniemanego ojca I 100,00000%, a dla domniemanego ojca II 99,99969%. Identyczny rozkład prążków uzyskano dla sondy molekularnej F10. W przypadku sondy f10 wyniki wynosiły odpowiednio 0,997332 i 0,991160 (Tabela I).

Tabela 2. Fenotyp autoradiogramów uzyskanych dla sond molekularnych (GTG)5 i F10

Fenotyp			(GTG)5		F10	
M	D	O	Domniemany ojciec I	Domniemany ojciec II	Domniemany ojciec I	Domniemany ojciec II
+	+	+	6	4	6	4
+	-	+	0	0	0	0
+	+	-	5	7	5	7
+	-	-	5	5	5	5
-	+	+	5	4	5	4
-	-	+	4	8	4	8
-	+	-	0	0	0	0
-	-	-	70	62	70	62

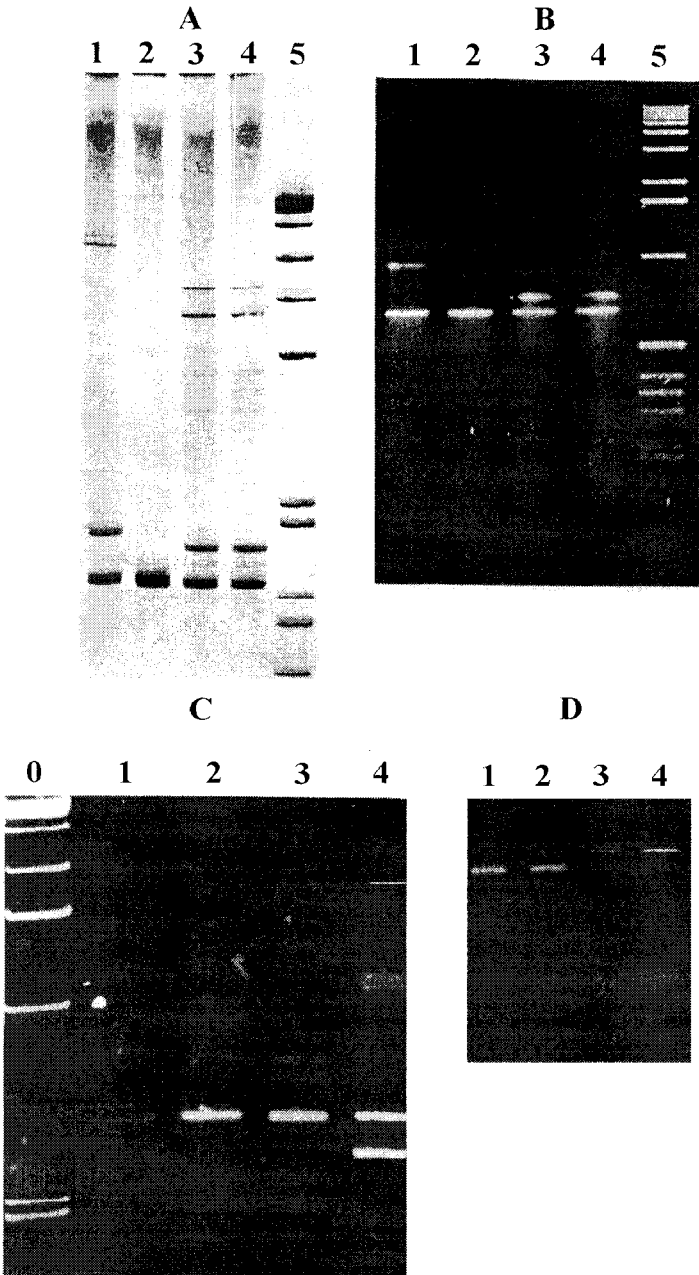


Ryc. 2 Analiza jednopunktowa metodą hybrydizacji z sondami molekularnymi MS43A, Ms31 i MS1 A – MS43A, B – MS31, C – MS1
 A i b: tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec II; tor 4, domniemany ojciec I. C: tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec I; tor 4, domniemany ojciec II. badanie różnicowało obydwu braci, a także wykluczyło ojcostwo domniemanego ojca II i wskazało na domniemanego ojca I.

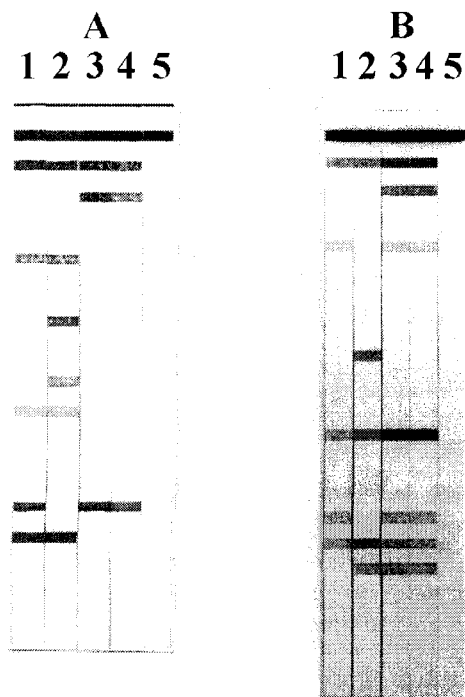
wykazano u obydwu braci obecność identycznych układów alleli (Tabela I), jedynie sonda molekularna MS43A różnicowała obydwu braci, lecz dziecko odziedziczyło w tym przypadku allel występujący wspólnie u obydwu braci (Ryc. 2, 3 i 4).

W kolejnej analizie jednopunktowej, ostatniej jaką dysponowało Laboratorium, wykonano hybrydizację z sondą molekularną MS1. Badanie różnicowało obydwu braci, a także wykluczyło ojcostwo domniemanego ojca II i wskazało na domniemanego ojca I (Ryc. 2), przy czym u braci zaobserwowano allele mieszczące się w górnym i dolnym przedziale wielkości dla locus D1S7. Poszukując dalszego potwierdzenia obserwacji dla sondy MS1 wykonano oznaczanie antygenów HLA-DRB metodą PCR. Niestety w badanej sprawie u obydwu braci oznaczono te same antygeny DRB1*08 i DRB1*15 (ryc. 4).

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazały, że analiza DNA nie zawsze od razu prowadzi do wydania jednoznacznej opinii. W zdecydowanej większości badań pojedynczych loci nie można było różnicować obydwu braci. Nieco bardziej skuteczna okazała się analiza wielopunktowa, w której zaobserwowano 10 wspólnych prążków i 9 prążków swoistych dla braci. Żaden z markerów powszechnie oznaczanych metodą PCR nie był przydatny w badanej sprawie. W związku z



Ryc. 3. Analiza jednopunktowa metodą PCR markerów D1S80, ApoB, D17S30 i COL2A1. A – D1S80, B – ApoB, C – COL2A1, D – D17S30, A i B: tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec I; tor 4, domniemany ojciec II; tor 5, marker wielkości KBL. C i D: tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec I; tor 4, domniemany ojciec II; tor 0, marker wielkości KBL.



Ryc. 4. Oznaczenie antygenów HLA-DRB metodą PCR z zastosowaniem zestawu diagnostycznego firmy Innogenetics.

A – hybrydyzacja w 55°C; B – hybrydyzacja w 63°C, Tor 1, matka; tor 2, dziecko; tor 3, domniemany ojciec I; tor 4, domniemany ojciec II; tor 5, kontrola.

powyższym sugerujemy, aby do przypadków, w których występuje dwóch domniemanych ojców (pozwany i świadek) blisko z sobą spokrewnionych podchodzić z najwyższą ostrożnością. W niniejszej sprawie wykonanie oddzielnych badań tylko dla domniemanego ojca I lub dla domniemanego ojca II mogłoby doprowadzić do wydania błędnej opinii, ponieważ łącznie po 33 testach nie można było wykluczyć ojcostwa żadnego z braci.

PIŚMIENNICTWO

1. Böhm I., Krawczak M., Nurnberg P., Hampe J., Hundrieser J., Poche H., Peters C., Słomski R., Kwiatkowska J., Nagy M., Popperl A., Epplen J.T., Schmidtko J.: *Oligonucleotide DNA fingerprinting: results of a multi-center study on reliability and validity*. W DNA Fingerprinting: State of the Science, Wyd. S.D.J. Pena, R.Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys, Birkhauser Verlag, 1993, 257–260. – 2. Böhm I., Krawczak M., Nurnberg P., Hampe J., Hundrieser J., Poche H., Peters C., Słomski R., Kwiatkowska J., Nagy M., Popperl A., Epplen J.T., Schmidtko J.: *Paternity testing with oligonucleotide probe (CAC)₅/(GTG)₅ a multi-center study*. Forensic Science International, 1993, 59, 101–107. – 3. DiRienzo A., Wilson A.C.: *Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1991, 88, 1597–1601. – 4. Evitt I.W., Werret D.J., Buckleton J.S.: *Paternity calculations from DNA multilocus profiles*. J.Forensic Sci.

- Soc., 1989, 29, 249–254. – 5. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.W.: *Hypervariable "minisatellite" region in human DNA*. Nature, 1985, 314, 67–73. – 6. Jeffreys A.J., Wilson V., Thien S.W.: *Individual-specific "fingerprints" of human DNA*. Nature, 1985, 316, 76–79. – 7. Kasai K., Nakamura Y., White R.: *Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT 118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic sciences*. J. Forensic Sci., 1990, 35, 1196–1200. – 8. Knott T.J., Wallis S.C., Pease J., Powell L.M., Scott J.: *A hypervariable region 3' to the apolipoprotein B gene*. Nucleic Acid Res., 1986, 14, 9215–9216. – 9. Krawczak M., Bockel B.: *The formal analysis of multilocus DNA fingerprints*. W DNA Fingerprinting, Ed. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys, Birkhauser Verlag, 1993, 249–255. – 10. Pena S.D.J., Santos P.C., Campos M.C.B.N., Macedo A.M.: *Paternity testing with the F10 multilocus DNA fingerprinting probe*. W DNA Fingerprinting, Ed. S.D.J. Pena, R. Chakraborty, J.T. Epplen and A.J. Jeffreys, Birkhauser Verlag, 1993, 237–247.
11. Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: *Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes*. Nature 1986, 324, 163–166. – 12. Słomski R., Janiszewska H., Kwiatkowska J., Chlebowska H.: *Jednopunktowa a wielopunktowa analiza DNA: Własne obserwacje nad dochodzeniem spornego ojcostwa z zastosowaniem wielopunktowej analizy DNA*. Arch. Med. Sąd i Krym., 1994, 44, 29–34. – 13. Smith J.C., Anwar R., Riley J., Jenner D., Markham A.F., Jeffreys A.J.: *Highly polymorphic minisatellite sequences: Allele frequency and mutation rates for five locus specific probes in Caucasian population*. J. Forensic Sci. Soc., 1990, 30, 19–32. – 14. Stoker N.G., Cheah K.S.E., Griffin J.R., Pope F.M., Solomon E.: *A highly polymorphic region 3' to the human type II collagen gene*. Nucleic Acids Res., 1985, 13, 4613–4622.

Adres pierwszego autora:

Laboratorium Genetyki Molekularnej
60–195 Poznań, ul. Szeherezady 100

Nadesłano do Redakcji: 10.07.1995

Zakwalifikowano do druku: 10.10.1995

Tomasz Gos

Nietypowe “złamanie wisielcze” jako przyczyna zgonu w następstwie wypadku przy pracy.

The atypical “hangman’s fracture” as a cause of death due to the accident at work.

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

W pracy przedstawiono opis nietypowego przypadku wieloodłamowego złamania kręgu obrotowego na tle innych złamań C2 wraz z rozważaniami na temat mechanizmu jego powstania, zwracając uwagę na fakt, iż rutynowe czynności sekcyjne absolutnie nie wystarczają do szczegółowej analizy uszkodzeń kręgosłupa szyjnego.

The unusual case of multifragmental fracture of axis was presented. The typical forms of C2 fractures were reviewed. The role of special dissection techniques in the visualization of cervical vertebral column damage was pointed out.

WSTĘP

Dwustronne złamanie łuku C2 określane w piśmiennictwie anglojęzycznym jako hangman’s fracture stanowi bardzo charakterystyczną postać wśród złamań kręgosłupa szyjnego, w związku z czym godzi się omówić je w nieco szerszym zakresie, niż jest to zwykle przewidziane dla wstępu, zwłaszcza, że szczegółowa znajomość mechanizmów powstawania uszkodzeń ciała winna być jednym z głównych celów, których realizacji medycy sądowi nie mogą pozostawić przedstawicielom innych specjalizacji.

Gehweiler w swoim fundamentalnym opracowaniu radiologicznym dotyczącym uszkodzeń kręgosłupa w odcinku szyjnym podał, że złamania C2 stanowiły 27%, które tworzyły głównie wszystkie złamania zęba obrotnika – 13% oraz stanowiące drugą najliczniejszą grupę złamania typu hangman’s fracture – 7% (1). Wyróżniał przy tym dodatkowo atypowe dwustronne złamania kręgu obrotowego, które w jego materiale, obejmującym 400 przypadków, stanowiły mniej niż 1%. Były to dane dotyczące żywych, nie odbiegające w istotny sposób od wyników badań przeprowadzonych na zwłokach przez Saternusa, który wykazał złamania C2 w 22% przypadków uszkodzeń kręgosłupa szyjnego, z czego połowa przypadała na

złamania zęba obrotnika, a połowa na wszystkie pozostałe typy złamań. Oznacza to, że złamania zęba stanowią najliczniejszą grupę złamań w obrębie C2, co potwierdzają badania innych autorów. Podobnej zgodności nie ma natomiast w odniesieniu do złamania typu hangman's fracture, określanego w rodzinnym piśmiennictwie jako "złamanie wisielcze". Podczas gdy w cytowanym wyżej opracowaniu Gehweilera stanowi ono stosunkowo licznie reprezentowaną grupę, inni autorzy uważają je za rzadko występujące.

Złamanie wisielcze, określane inaczej jako jedno- lub obustronne (w swej klasycznej postaci) złamanie łuku drugiego kręgu szyjnego w obrębie nasad, może przebiegać z przemieszczaniem lub bez przemieszczenia C2 względem C3. Złamaniu temu dodatkowo może towarzyszyć uszkodzenie krążka międzykręgowego na poziomie C2/C3 i trzonu C3. Ząb obrotnika pozostaje przy tym niezłamany, a więzadło poprzeczne kręgu szczytowego jedynie sporadycznie ulega rozerwaniu. Omawiane uszkodzenie zawdzięcza swą nazwę powstaniu podczas egzekucji przez powieszenie połączone z opadnięciem ciała i umiejscowieniem podżuchwowym węzła w pętli wisielczej. Pierwsze opisy tego złamania dotyczyły właśnie takiej sytuacji i towarzyszyły rozważaniom na temat "idealnego" uszkodzenia przejścia czaszkowo-szyjnego, zapewniającego natychmiastowy zgon podczas egzekucji. W późniejszym okresie opisywano więcej przypadków złamania wisielczego w następstwie przede wszystkim wypadków drogowych czy w mniejszej liczbie – wskutek upadków z wysokości. Należy w tym miejscu podkreślić, że w świetle statystyk pochodzących z krajów o wysokim poziomie rozwoju cywilizacji technicznej, wypadki drogowe stanowią najczęstszą przyczynę wszystkich uszkodzeń kręgosłupa szyjnego, czemu nie odpowiadają dane prezentowane do chwili obecnej przez niektórych polskich autorów. Autorowi niniejszego doniesienia nie są natomiast znane publikacje dotyczące powstania złamania wisielczego w następstwie wypadku przy pracy.

Niezależnie od okoliczności towarzyszących powstaniu tego charakterystycznego złamania, zasadniczym czynnikiem w jego mechanizmie jest gwałtowna hiperekstensja głowy ("odgięcie" ku tyłowi), połączona z działaniem siły rozciągającej (jak w klasycznej postaci podczas egzekucji), bądź powodującej kompresję górnego odcinka kręgosłupa szyjnego. Właśnie ten pierwszy, bardzo niestabilny rodzaj złamania wisielczego jest powiązany najczęściej z ciężkim, występującym natychmiastowo i prowadzącym do zgonu poprzecznym uszkodzeniem rdzenia szyjnego, a jedyną kosztą zmianą pourazową stanowi przy tym obustronne złamanie łuku C2.

Należy jednak dodać, iż z uwagi na dużą rezerwę przestrzenną kanału kręgowego górnego odcinka szyjnego w odniesieniu do rdzenia kręgowego (szerokość 2–3 razy większa niż wymiar poprzeczny rdzenia) oraz możliwość samoistnego nastawiania przemieszczeń w obrębie kręgosłupa i co za tym idzie, spontanicznej dekompresji rdzenia, opisywano przypadki, w których przedstawionym okolicznościom towarzyszyły zadziwiająco niewielkie ubytkowe objawy neurologiczne. Dotyczy to zresztą także innych, radiologicznie najcięższych złamań kręgosłupa szyjnego. Natomiast drugi z kolei rodzaj złamania wisielczego, powstający wskutek połączonego działania sił hiperekstensji i kompresji, rzadko łączy się z uszkodzeniami rdzenia, a objawy neurologiczne są lekkie (neuralgia potyliczna, sztywność karku i miejscowe dolegliwości bólowe). Oprócz obustronnego złamania łuku obrotnika można stwierdzić wówczas także złamania jego trzonu i kręgozmyk

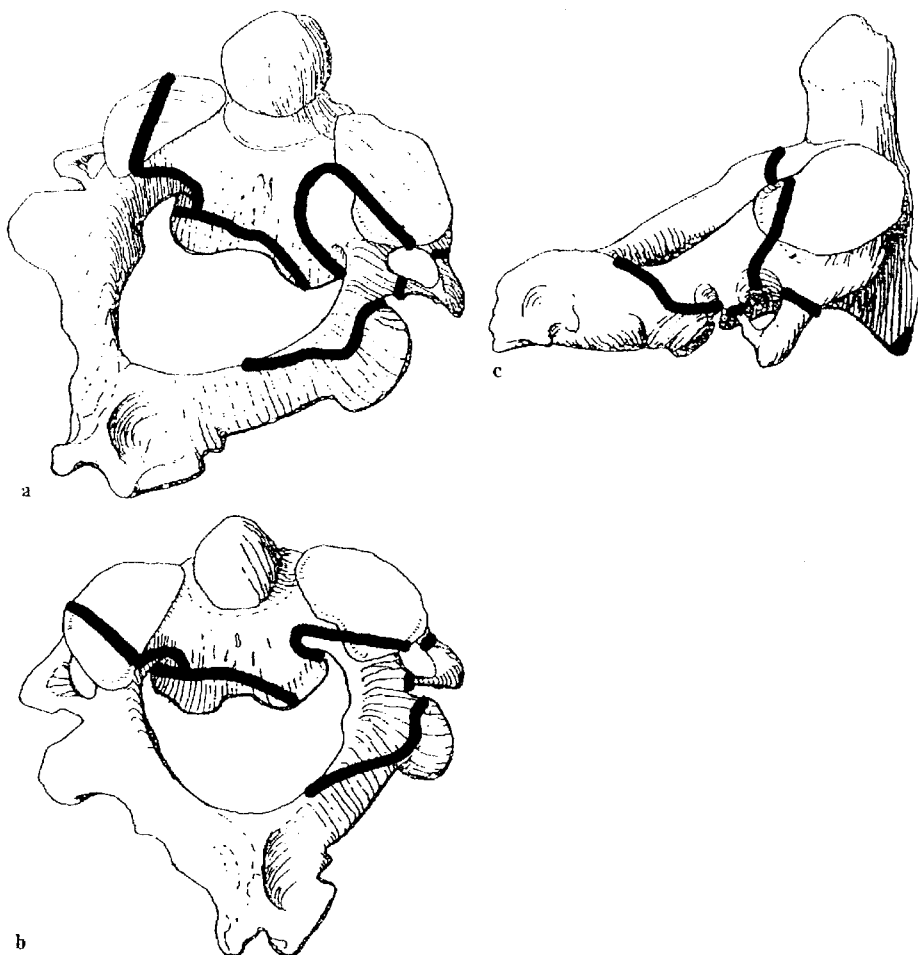
C2/C3 oraz złamanie jednego bądź więcej wyrostków kolczystych górnego odcinka kręgosłupa szyjnego.

OPIS PRZYPADKU

Wypadek miał miejsce 12 sierpnia 1994 w Stoczni Marynarki Wojennej w Gdyni na pokładzie rosyjskiej barki desantowej, poddawanej remontowi. Dokonywano awaryjnego opuszczenia platformy dziobowej, służącej do wypuszczania desantu, która to czynność została wcześniej uzgodniona z dowództwem okrętu i pracownikami stoczni. W pewnym momencie, wg zeznań świadków, utrzymująca platformę lina kabestanowa o średnicy 21 mm uległa poluzowaniu a dwóch marynarzy usiłowało ją ręcznie naprężyć. Jednakże spowodowane poluzowaniem szarpnięcie doprowadziło do wyrwania liny z rąk marynarzy i szybkiego odwijania się jej z kolumny kabestanu. W trakcie tego lina uległa pęknięciu, przy czym zerwany jej koniec uderzył z dużą siłą jednego z marynarzy. Zmarł on wkrótce po tym, podczas transportu do szpitala.

Oględziny zewnętrzne zwłok ofiary wypadku, wieku 20 lat, wykazały patologiczną ruchomość głowy a na przedniej, bocznej i tylnej powierzchni szyi po stronie prawej, na wysokości obu obojczyków i w obu okolicach nadłopatkowych liczne, brunatnoczerwone, plamiste i pasmowate otarcia naskórka tworzące pewną całość, układającą się okrężnie na przedniej i tylnej powierzchni górnej części klatki piersiowej oraz na szyi. Pasmowate otarcia w okolicach nadłopatkowych układały się w charakterystyczny wzór, przypominający “jodełkę”. Niejako w łączności z wyszczególnionymi uszkodzeniami pozostawało duże pasmowate otarcie naskórka układające się ukośnie w prawej okolicy naramiennej. Poza tym na twarzy po stronie lewej widoczne były drobne, pasmowate i nieregularnego kształtu otarcia naskórka z wyczuwalnym na ich wysokości złamaniem trzonu żuchwy. Niezależnie od tego w okolicach łędźwiowych wykazano trzy niewielkie otarcia naskórka owalnego kształtu.

Jedynym uszkodzeniem widocznym podczas sekcji zwłok była szeroka pozioma szczelina w obrębie przedniej powierzchni górnego odcinka kręgosłupa szyjnego z patologiczną ruchomością w tym miejscu. Po wypreparowaniu w całości kręgosłupa szyjnego (wraz z rdzeniem szyjnym) okazało się, że kręgi obrotowy uległ obustronnemu złamaniu, na poziomie C2/C3 nastąpiło rozerwanie krążka międzykręgowego oraz więzadła podłużnego przedniego i tylnego, a na poziomie C1/C2 obustronne rozerwanie więzadeł torebkowych. Uszkodzenia te powodowały niestabilność kręgosłupa na poziomie C2, której towarzyszyło rozerwanie opon i całkowite poprzeczne przerwanie rdzenia kręgowego. Należy przy tym podkreślić, że więzadło poprzeczne kręgu szczytowego pozostało nienaruszone. Obrotnik poddano maceracji uzyskując dokładny obraz przebiegu szczelin złamań (Ryc. 1). Po stronie lewej główna szczelina złamania biegła ukośnie przez tylną część górnej powierzchni stawowej, przechodziła na trzon do przodu od otworu wyrostka poprzecznego, powodując oddzielenie tylno–bocznego (lewego) fragmentu trzonu o klinowatym kształcie; nieco poniżej przedniego brzegu otworu wyrostka poprzecznego biegła druga, niewielka pozioma szczelina złamania oddzielając ten klinowaty fragment trzonu od złamanego łuku. Po stronie prawej nasada łuku uległa



Ryc.1. Schematyczne przedstawienie opisywanego złamania
 Fig. 1. The schematic diagram of presented fracture

złamaniu w dwóch miejscach. Jedna szczelina złamania przebiegała w płaszczyźnie czołowej, przechodząc przez tylną część górnej powierzchni stawowej i powodując oddzielenie nasady od łuku w miejscu połączenia z trzonem, natomiast druga prawie prostopadle do niej na poziomie tylnej listewki kostnej wyrostka poprzecznego, kończąc się na górnej krawędzi prawej blaszki łuku. Powstał więc odłamek pośredni prawej nasady w kształcie klina skierowanego podstawą do trzonu kręgu obrotowego, a wierzchołkiem do blaszki łuku. Maceracja uwidoczniła ponadto złamanie listewek kostnych prawego wyrostka poprzecznego oraz przedniego dolnego brzegu trzonu, bardziej zaznaczone po stronie lewej – w miejscu, gdzie kończyła się opisana uprzednio duża, lewostronna, ukośna szczelina.

lina złamania. Wymacerowano także trzeci kręg szyjny, w którym – podobnie jak w C2 – stwierdzono złamanie prawego wyrostka poprzecznego.

OMÓWIENIE I DYSKUSJA

W przedstawionym przypadku najbardziej oczywista jest bezpośrednia przyczyna zgonu – całkowite poprzeczne przerwanie rdzenia szyjnego w jego górnym odcinku w następstwie dwustronnego złamania kręgu obrotowego. Podobnie przyczyna wyjściowa, w ogólnym oczywiście zarysie, wydaje się być jednoznaczna: uderzenie zerwanym końcem znajdującej się pod dużym naprężeniem liny okrętowej. Być może w konkretnym przypadku stwierdzenia te zadowalały polskie organa ścigania w takim stopniu, że skutkowało to umorzeniem śledztwa, co w żadnym razie nie powinno jednak oznaczać “umorzenia” dalszych rozważań medyka sądowego dotyczących szczegółowego mechanizmu powstania śmiertelnych uszkodzeń ciała.

Z przytoczonego opisu wynika, że nie jest to klasyczne, “czyste” złamanie wisielcze kręgu obrotowego, polegające jedynie na dwustronnym złamaniu nasad łuku. Wskazuje na to zwłaszcza obecność złamania trzonu i prawego wyrostka poprzecznego obrotnika. Poza tym szczeliny złamań nasad łuku nie przebiegają w sposób typowy przedstawiony np. przez Wood–Jonesa, tzn. do tyłu od górnych powierzchni stawowych. Obejmują bowiem obustronnie górne powierzchnie stawowe z towarzyszącym temu rozerwaniem więzadeł torebkowych, nadto po stronie lewej szczelina złamana dodatkowo przechodzi na trzon, zaś po stronie prawej obejmuje blaszkę łuku.

Na mechanizm hiperekstensyjno–dystrakcyjny powstania tego złamania wskazuje bardzo duża niestabilność oprócz oczywiście takich podstawowych cech, jak obustronność zmian przy nienaruszonym zębie obrotnika i więzadło poprzecznym atlasu.

Przed wszystkim ta niestabilność i związane z nią całkowite poprzeczne przerwanie rdzenia szyjnego a dodatkowo brak złamań wyrostków kolczystych C2 i C3 wykluczają natomiast współudział czynnika kompresyjnego.

Reasumując, w oparciu o stwierdzone uszkodzenia należy przyjąć, że w powstaniu przedstawionego nietypowego złamania wisielczego zasadniczą rolę odegrała komponenta hipetekstensyjno–dystrakcyjna, przy czym lokalizacja szczelin złamań nasad łuku C2 w najbliższym sąsiedztwie trzonu wraz z rozległymi uszkodzeniami aparatu więzadłowego i krążka międzykręgowego C2/C3 wskazuje na bardzo duży udział sił rozciągających. Ukośny przebieg szczeliny złamania po stronie lewej z zajęciem trzonu C2, wyłamanie klinowatego odłamu pośredniego w obrębie nasady prawej, złamanie wyrostków poprzecznych C2 i C3 przemawia za współistnieniem komponenty hiperfleksyjnej i/lub hiperrotacyjnej (zgięcie i/lub obrót w prawo). Tezę tę dodatkowo może potwierdzić obecność złamania trzonu żuchwy po stronie lewej, gdzie mogło znajdować się jedno z miejsc przyłożenia sił. W świetle uszkodzenia oraz innych obrażeń stwierdzonych podczas oględzin zewnętrznych (zwłaszcza otarć naskórka układających się na tylnej powierzchni klatki piersiowej we wzór mogący odpowiadać splotom owiniętej wokół tułowia liny), omawiane złamanie powstało wskutek działania mechanizmu pośredniego,

a więc w sposób typowy dla uszkodzeń kręgosłupa szyjnego. Czynnikiem wyjściowym było uderzenie z bardzo dużą siłą końcem zerwanej stalowej liny okrętowej. Pozostaje jednak kwestią otwartą, czy jedynie to uderzenie i spowodowane nim silne, gwałtowne szarpnięcie górnej części klatki piersiowej oraz szyi do przodu i w lewą stronę (na co wskazują otarcia naskórka) było wystarczające do powstania tak rozległych uszkodzeń kręgosłupa szyjnego. Wyraźnie zaznaczone uszkodzenia dystrykcyjne wymagały także działania siły skierowanej od dołu na żuchwę – jak w klasycznym złamaniu wisielczym, co wiąże występujące w konkretnym przypadku lewostronne złamanie trzonu żuchwy z mechanizmem powstania złamania kręgosłupa. Przyjmując, że uszkodzenie żuchwy zostało spowodowane przez to samo uderzenie liny, musiałaby ona owinąć się wokół górnej części klatki piersiowej i szyi z wywarcieniem na dolną część kręgosłupa szyjnego i żuchwę sił o przeciwnych kierunkach a co więcej – szarpnąć żuchwę ku górze. Wydaje się to jednak mało prawdopodobne i tym samym działanie sił rozciągających oraz zginających i/lub rotujących w stronę prawą mogło być następstwem upadku (wskutek pociągnięcia przez linę) i uderzenia lewą stroną żuchwy w przedmiot znajdujący się na pokładzie okrętu. Z uwagi na fakt zaniechania przez Prokuraturę badania śladów biologicznych, próba weryfikacji tej hipotezy jest niemożliwa.

WNIOSKI

Pierwszy wniosek płynący z rozważań nad tym pouczającym przypadkiem posiada naturę ogólną: rutynowo stosowane metody badawcze i utarte stwierdzenia zawodzą w wyjątkowych sytuacjach, z jakimi przychodzi spotykać się medykowi sądowemu. Drugi natomiast dotyczy konkretnego zagadnienia uszkodzeń kręgosłupa szyjnego w praktyce sądowo–lekarskiej i wypływa z pierwszego: ogólna wiedza traumatologiczna jest całkowicie niewystarczająca, a ograniczanie się jedynie do tradycyjnej techniki sekcyjnej jest błędem sztuki w takich jak przedstawiony przypadkach. W związku z tym analizując je należy korzystać ze szczegółowych opracowań monograficznych a dokonując sekcji – postęgiwać się specjalnymi technikami, takimi jak np. opisana przez Hinza.

PIŚMIENICTWO

1. Gehweiler JA, Osborne RL, Becker RF. *The radiology of vertebral trauma*, Saunders, Philadelphia, 1980; – 2. Hinz P. *Vielschichtige Untersuchungsmethoden zur Erfassung pathomorphologischer Sektionsbefunde nach Schleudertraumen der Halswirbelsäule*, Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 1968, 64, 204–216; – 3. Kiwerski J. *Urazy kręgosłupa odcinka szyjnego i ich następstwa*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1993; – 4. Roda JM, Castro A, Blazquez MG. *Hangman's fracture with complete dislocation of C2 on C3*, J. Neurosurg. 1984, 60, 633–635; – 5. Saternus KS. *Die Verletzungen von Halswirbelsäule und von Halsweichteilen*. W: Junghanns H, *Die Wirbelsäule in Forschung und Praxis* Bd 84, Hippokrates, Stuttgart, 1979; – 6. Schneider RC, Livingston KE, Cave AJE, Hamilton G.

"*Hangman's fracture*" of the cervical spine, J.Neurosurg. 1965, 22, 141–154; – 7. Unterharnscheidt F. *Patologie des Nervensystems Bd VII* (red. Doerr W, Seifert G.), *Traumatologie von Hirn und Rückenmark, Traumatische Schaden von Rückenmark und Wirbelsaule (forensische patologie)*, Springer–Verlag, Berlin Heidelberg, 1992; – 8. Vermooten V. *A study of the fracture of the epistropheus due to hanging with a note on the possible causes of death*, Anat. Rec. 1921, 20, 305–311; – 9. Williams TG. *Hangman's fracture*, J.Bone Joint Surg. 1975, 57B, 82–88; – 10. Wood–Jones F. *The ideal lesion produced by judicial hanging*, Lancet, 1913, I, 53; 11. Zouche Marschall JJ de. *Reply to the paper of Wood–Jones F (1913) The ideal lesion produced by hanging*, Lancet, 1913, I, 94;

Adrès autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Gdańsku

ul. Skłodowskiej–Curie 3a, 80–210 Gdańsk

Nadesłano do Redakcji: 12.07.1995

Zakwalifikowano do druku: 9.10.1995

Janusz Smoliński, Roman Hauser

Zgon w następstwie użądlenia przez pszczoły

Death as a result of bee stings

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

Przedstawiono przypadek śmierci 30-letniego mężczyzny, zmarłego w miejscu zdarzenia wskutek użądlenia przez stosunkowo niewielką liczbę pszczoł. Główną rolę w mechanizmie śmierci odegrała reakcja anafilaktyczna.

A case of a 30-years old man, deceased after a relatively small number of bee stings, is presented.

Śmierć spowodowana ukąszeniem przez jadowite owady należy do rzadkości. Jakkolwiek użądlenia przez pszczoły czy osy zdarzają się w naszym kraju często, to przypadek zgonu spowodowanego przez zaledwie jedenaście pszczoł jest nietypowy.

OPIS PRZYPADKU

30-letni mężczyzna (protokół sekcji 560/93), będąc pod dość znacznym działaniem alkoholu (w chwili śmierci 1,6 promilla we krwi i 2,3 promilla w moczu met. ADH), podczas pracy przy ulach na własnej działce został zaatakowany przez pszczoły. Według towarzyszącego mu świadka wzywał pomocy odganiając przy tym owady koszulą. Po kilku minutach zaczął wymiotować a następnie stracił przytomność. Kolega podjął próbę reanimacji wykonując sztuczne oddychanie oraz uciskając klatkę piersiową. Wezwany lekarz pogotowia stwierdził zgon. Zgodnie z zeznaniami matki zmarłego, był on uczulony na jad pszczeli, po użądleniu wymiotował i tracił przytomność.

Badaniem pośmiertnym stwierdzono na ciele denata jedenaście okrągłych, sinych przebarwień średnicy po około 0.7 cm. W centrum pięciu z nich tkwiły żądła z woreczkami jadowymi (Ryc. 1). Z ogólnej liczby jedenastu trzy użądlenia dotyczyły głowy i szyi. Jedno z przebarwień z tkwiącym w nim żądłem, na lewej powierzchni szyi (Ryc. 2), otoczone było dość silnie wysyconym, sinogranatowym,



Ryc. 1. Żądło z woreczkiem jadowym tkwiące w skórze ofiary.
 Fig. 1. Bee venom sac with stinger stuck in the victim's skin.



Ryc. 2. Boczna powierzchnia szyi z żądłem tkwiącym w centrum wylewu, na przebiegu żyły szyjnej zewnętrznej.
 Fig. 2. Side of the victim's neck with bee stinger in the centre of haemorrhage.

soczewkowato uwypykającym się wylewem średnicy około 2 cm. Na wysokości środka opisanej zmiany przebiegała żyła szyjna zewnętrzna, którą w tym miejscu obejmował lity, wiśniowy krwiak. Żądło tkwiło również w obrzękniętej, bladej wardze górnej po stronie lewej. Widoczny był ponadto obrzęk podniebienia miękkiego, łuków pobniebiennych, nagłośni, fałdów głosowych i zachyłków gruszkowatych z następowym zwężeniem wejścia do krtani. Drogi oddechowe zawierały treść przypominającą zawartość żołądka. W płucach były zaznaczone cechy ostrego rozdęcia. Narządy wewnętrzne wykazywały wyraźne przekrwienie.

Badaniem mikroskopowym stwierdzono: ośrodkowy układ nerwowy – mierny obrzęk i drobne przynaczyniowe wczesne wylewy krwi; płuca – obrzęk i świeże wylewy śródpecherzykowe oraz wielogniskowe rozdęcie; mięsień serca – małego stopnia obrzęk podścieliska; nadnercza – średnio nasilone przekrwienie warstwy pasmowatej kory; skóra – pokryta prawidłowym naskórkiem, z siatkowato rozszerzoną siecią naczyń włosowatych na pograniczu warstwy brodawkowatej otoczoną niewielką ilością komórek jednojądrowych, z widocznym w tym miejscu w tkance podskórnej świeżym wylewem krwi; nagłośnia – tuż pod prawidłowym nabłonkiem paraepidermalnym obfity naciek z komórek limfoidalnych, blaszka własna śluzówki z szeroką siecią zatokowatych naczyń krwionośnych o ścianach typu włosowatego; języczek podniebienny – blaszka własna śluzówki bardzo silnie obrzęknięta, pod nabłonkiem szeroka sieć naczyń włosowatych; migdałek – świeży duży wylew krwi na pograniczu tkanki limfatycznej i łoża, w łożu migdałka bardzo szeroka sieć naczyń limfatycznych. Pozostałe narządy: wątroba, nerki, śledziona, trzustka – poza uogólnionym przekrwieniem nie wykazywały zmian.

OMÓWIENE

Dwoma głównymi składnikami patogennymi jadu pszczelego są: melityna i apamina [8]. Melityna działa silnie drażniąco w miejscu użądlenia, aktywizuje hemolizę, zwiększa przepuszczalność naczyń krwionośnych, powoduje skurcz mięśni szkieletowych, blokuje przewodnictwo nerwowo-mięśniowe [2, 4, 5, 6, 9, 16, 17, 19, 21]. Apamina działa głównie na ośrodkowy układ nerwowy [10, 20]. Ponadto jad pszczeli zawiera MCD-peptyd, fosfolipazę A₁ i A₂, hialuronidazę, histaminę, kwaśną fosfatazę, serotoninę. Tak więc, poza wspomnianym działaniem hemolitycznym, wpływa on hamująco na krzepnięcie krwi i powoduje obniżenie jej ciśnienia tętniczego. Uważa się, że głównym antygenem odpowiedzialnym za odczyny alergiczne wywołane jadem pszczelim jest kompleks proteinowy melityny, stanowiący około 50% jego suchej masy. Znaczną rolę alergizującą przypisuje się także fosfolipazie A₂ [15].

Użądlenia przez pszczoły, osy, trzmiele powodują najczęściej przemijające odczyny miejscowe. Natomiast u osób nadwrażliwych (2% populacji) mogą powodować, nawet przy niewielkiej liczbie użądleń, zwłaszcza w szyję i głowę, ciężki odczyn anafilaktyczny kończący się niekiedy śmiercią [12]. Pierwszy opis tego zjawiska dotyczy władcy egipskiego Menesa zmarłego 2641 lat p.n.e. po użądleniu przez owada. We Francji, w następstwie reakcji anafilaktycznych, umiera rocznie kilkadziesiąt osób [11].

Anafilaksja, podobnie jak i atopia, należą do jednego z czterech znanych typów reakcji nadwrażliwości: reakcji typu I, uważanej obecnie za synonim wprowadzonego w 1906 r. przez Pirquet'a pojęcia "alergia" [18].

Koniecznym warunkiem powstania reakcji anafilaktycznej jest pierwotne uczulenie zaczynające się od kontaktu alergenu z limfocytami B oraz degradacji alergenu przez makrofagi prezentujące następnie za pośrednictwem molekuł HLA klasy II jego fragmenty limfocytom T₄, które z kolei poprzez produkcję interleukin 4 i 13 aktywują transformację limfocytów B w plazmocyty wydzielające IgE specyficzne dla działającego alergenu [11, 3, 14, 7]. Powstałe IgE, których obecność według ostatnich doniesień może nie być warunkiem nieodzownym do wywołania anafilaksji [1], łączą się w następnej kolejności fragmentami Fc swych łańcuchów ε z receptorami silnego i słabego powinowactwa głównie komórek tłuszcznych, a ponadto z receptorami granulocytów zasadochłonnych i kwasochłonnych, komórek Langerhansa i części monocytów [13].

Powtórny kontakt z alergenem powoduje, w przypadku istnienia uczulenia, natychmiastową aktywację mastocytów z wystąpieniem klasycznych objawów reakcji anafilaktycznej z możliwością wstrząsu czy uduszenia związanego z obrzękiem krtani. Objawy te są wynikiem uwolnienia przez komórki tłuszczne dwóch grup mediatorów:

- histaminy, heparyny, enzymów proteolitycznych i czynników chemotaktycznych – jako następstwa katalizowanej kaskadowo przez kinazę tyrozyny, fosfolipazę C oraz kinazę proteinową C degranulacji mastocytów;
- prostaglandyn, leukotrienów i tromboksanu – syntetyzowanych bezpośrednio po aktywacji mastocytów z kwasu arachidonowego w reakcji katalizowanej przez fosfolipazę A₂.

W znacznej części przypadków reakcji alergicznej w ślad za fazą ostrą pojawia się trzecie jej stadium tzn. reakcja zapalna związana z aktywowaniem przez mediatory uwolnione z mastocytów molekuł adhezji (selektyn, integryn) tak krwinek białych jak i śródbłonna naczyniowego. W konsekwencji tego dochodzi do przechodzenia leukocytów przez barierę śródbłonkową i produkcji przez nie szeregu cytokin, które poprzez wywołanie bogatej w liczne sprzężenia kaskady reakcji i aktywację miejscowych procesów immunologicznych, prowadzą ostatecznie do uszkodzenia tkanek [11].

W przedstawionym przypadku nastąpił zbieg kilku niekorzystnych okoliczności:

- wcześniejsze uczulenie zmarłego na jad pszczelel;
- użądlenie w głowę i szyję z uszkodzeniem żyły szyjnej zewnętrznej;
- pojawienie się w przebiegu reakcji uczuleniowej wymiotów z przypuszczalnym zachłystywaniem się treścią pokarmową.

Ich zestawienie z danymi z wywiadu oraz z wynikami przeprowadzonych badań pozwoliło na przyjęcie głównej roli następstw reakcji anafilaktycznej w mechanizmie zejścia śmiertelnego.

PIŚMIENICTWO

1. *Anaphylaxie en absence d'IgE*. Médecine/Sciences, 1994, 10, 10, 1055; –
2. Dempsey C.E.: *The actions of melittin on membranes*. Biochim–Biophys–Acta, 1990 May 7, 1031(2), 143–161; –
3. Di Santo J.P., Saint–Basile G.: *Une anomalie du gene codant pour le ligand du CD 40 est responsable du deficit immunitaire caracterise par une hyper–IgM liée a l'X chez l'homme*. Médecine/Sciences, 1993,

9, 4, 456–9; – 4. Dunn J.D., Killion J.J.: *Effect of melittin on pituitary–adrenal responsiveness to stress*. Acta–Endocrinol–Copenh. 1988 November, 119(3), 339–44; – 5. Fletcher J.E., Jang M.S., Gong Q.H., Smith L.A.: *Snake venom cardiotoxins and bee venom melittin activate phospholipase C activity in primary cultures of skeletal muscle*. Biochem–Cell–Biol. 1991 April, 69(4), 274–81; – 6. Garcia–Sainz J.A., Hernandez–Sotomayor S.M., Macias–Silva M.: *Melittin stimulates liver glycogenolysis and the release of prostaglandin D2 and thromboxane B2*. Biochem–J. 1990 July, 269(1), 273–5; – 7. Grey H., Sette A., Buus S.: *Comment les lymphocytes T reconnaissent les antigenes*. Pour la Science, 1990, 147, 52–61; – 8. Gross A., Wojdyła Z.: *Przypadek śmierci wskutek użądlenia przez pszczoły*. Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii, 1986, 36(3), 183–6; – 9. Kataoka M., Head J.F., Seaton B.A., Engelman D.M.: *Melittin binding causes a large calcium–dependent conformational change in calmodulin*. Proc–Natl–Acad–Sci–U–S–A. 1989 September, 86(18), 6944–8; – 10. Kondo T., Ikenaka K., Fujimoto I., Aimoto S., Kato H., Ito K., Taguchi T., Morita T., Kasai M., Mikoshiba K.: *K+ channel involvement in induction of synaptic enhancement by mast cell degranulating (MCD) peptide*. Neurosci–Res–N–Y. 1992 April, 13(3), 207–16.

11. Lichtenstein L.: *Les allergies et le système immunitaire*. Pour la Science, 1993, 193, 112–121; – 12. Lockey R.F., Turkeltaub P.C., Baird–Warren I.A., Olive C.A., Olive E.S., Peppe B.C., Bukantz S.C.: *The Hymenoptera venom study I, 1979–1982: demographics and history–sting data*. J–Allergy–Clin–Immunol. 1988 Sep., 82(3 Pt 1), 370–81; – 13. Lotteau V.: *Anaphylaxie et récepteur de forte affinité des IgE*. Médecine/Sciences, 1994, 10, 3, 356; – 14. Minty A.: *L'interleukine–13: une nouvelle pièce dans le puzzle immunitaire*. Médecine/Sciences, 1994, 10, 8–9, 884–8; – 15. Nordvall S.L., Uhlin T., Einarsson R., Johansson S.G., Ohman S.: *Bee keepers' IgG and IgE antibody responses to bee venom studied by means of crossed radioimmuno-electrophoresis*. Clin–Allergy, 1984 July, 14(4), 341–50; – 16. Rapport R.M., Ashraf M., Murad F.: *Effects of melittin on endothelium–dependent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta*. Circ–Res. 1989 March, 64(3), 463–73; – 17. Raulf M., Alouf J.E., Konig W.: *Effect of staphylococcal delta–toxin and bee venom peptide melittin on leukotriene induction and metabolism of human polymorphonuclear granulocytes*. Infect–Immun. 1990 August, 58(8), 2678–82; – 18. Roitt I.M., Brostoff J., Male D.K.: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1987; – 19. Schumacher M.J., Schmidt J.O., Egen N.B., Dillon K.A.: *Biochemical variability of venoms from individual European and Africanized honeybees (Apis mellifera)*. J–Allergy–Clin–immunol. 1992 July, 90(1), 59–65; – 20. Steketee J.D., Kalivas P.W.: *Effect of microinjections of apamin into the A10 dopamine region of rats: a behavioral and neurochemical analysis*. J–Pharmacol–Exp–ther. 1990 August, 254(2), 711–9.

21. Yang X.P., Carretero O.A., Jacobsen G., Scicli A.G.: *Role of endogenous brain kinins in the cardiovascular response to intracerebroventricular melittin*. Hypertension. 1989 December, 14(6), 629–35.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Gdańsku,
80–210 Gdańsk, ul. Skłodowskiej–Curie 3A, tel. 32–34–43

Nadesłano do Redakcji: 31.07.1995

Zakwalifikowano do druku: 3.10.1995

Roman Mądro, Grzegorz Buszewicz, Marianna Kiszka

Oznaczanie cykloheksanonu i acetaldehydu w materiale sekcyjnym w skojarzonym zatruciu cykloheksanonem i alkoholem etylowym.

Determination of cyclohexanone and acetaldehyde in the autopsy material in the case of poisoning by cyclohexanone and ethyl alcohol.

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Lublinie

Kierownik: dr hab. Roman Mądro – profesor

W złożonym zatruciu cykloheksanonem i alkoholem etylowym dochodzi do przyśpieszenia metabolizmu alkoholu etylowego wskutek zwiększenia szybkości formowania kompleksów dehydrogenaza – NADH i dehydrogenaza – NAD. Na przykładzie śmiertelnego przypadku zatrucia cykloheksanonem i etanolem, przeprowadzono ocenę przydatności ilościowego oznaczania cykloheksanolu i acetaldehydu w materiale sekcyjnym dla potrzeb orzecznictwa sądowo–lekarskiego.

Poisoning by cyclohexanone and ethyl alcohol demonstrated an acceleration in the metabolism of both cyclohexanone and ethanol, which may be due to an increase concentrations of the complex: dehydrogenase–NADH and dehydrogenase–NAD. The case of fatal cyclohexanone and ethyl alcohol poisoning is discussed. Quantitative determination of cyclohexanone, cyclohexanol, ethanol and acetaldehyde in the autopsy material was done using the gas chromatography method.

WSTĘP

Cykloheksanon jest rozpuszczalnikiem organicznym stosowanym w produkcji farb i lakierów oraz utwardzaczy do wyrobów chemoutwardzalnych. Jest to bezbarwna ciecz o charakterystycznym, ostrym zapachu i lekko oleistej konsystencji. Dobrze rozpuszcza się w metanolu i etanolu, w wodzie rozpuszcza się tylko w niewielkim stopniu.

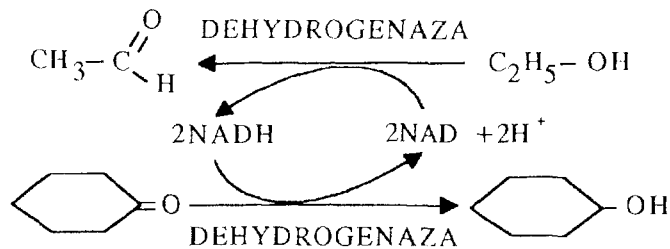
Ostre zatrucia po doustnym przyjęciu cykloheksanonu zdarzają się głównie z powodu przypadkowego spożycia. Zatrucia przewlekłe notowane są wśród pracowników lakierni wskutek wdychania oparów [6, 3].

Cykloheksanon należy do substancji o średniej toksyczności – $LD_{50} = 1000$ mg/kg [1]. Działa drażniąco na skórę i błony śluzowe oraz depresyjnie na OUN. U królików po podaniu dożołądkowym najwyższe stężenie we krwi cykloheksanon osiąga po ok. 15, natomiast cykloheksanol – po ok. 120 minutach, przy czym maksymalne stężenie cykloheksanolu jest 6 – 8 razy wyższe niż cykloheksanonu [5]. Tylko około 5% dawki (350–40 mg/kg) wydalone jest wraz z powietrzem wydechowym (w postaci niezmienionej oraz w postaci dwutlenku węgla). Pozostałe 90% eliminowane jest z moczem. Z moczem usuwane są metabolity sprzężone z kwasem glukuronowym, przede wszystkim cykloheksanol oraz trans-cykloheksan-1,2-diol [2, 3, 4].

W złożonym zatruciu cykloheksanonem i alkoholem etylowym dochodzi do wzajemnej interakcji [5]. Etanol przyspiesza powstawanie cykloheksanolu, a tym samym obniża stężenie cykloheksanonu we krwi. Jednocześnie dochodzi do przyspieszenia metabolizmu alkoholu etylowego wskutek zwiększenia szybkości kompleksów dehydrogenaza–NADH i dehydrogenaza–NAD.

Aldehyd octowy

Etanol



Cykloheksanon

Cykloheksanol

Ryc. 1. Formowanie się kompleksów dehydrogenaza–NADH i dehydrogenaza–NAD w trakcie równoczesnego metabolizmu cykloheksanonu i etanolu.

Fig. 1. The formation of the complexes dehydrogenase–NADH and dehydrogenase–NAD in the coadministration of cyclohexanone and ethanol.

CEL PRACY

Ocena przydatności ilościowego oznaczania cykloheksanolu w materiale sekcyjnym (dla potrzeb orzecznictwa sądowo-lekarskiego) na przykładzie śmiertelnego przypadku zatrucia cykloheksanonem i etanolem.

OPIS PRZYPADKU

49-letni mężczyzna zmarł nagle 29-04-94 r. po wypiciu alkoholu niewiadomego pochodzenia. Na miejscu zabezpieczono firmową butelkę o pojemności 0,5 l z etykietką "Russkaja wodka" z zawartością ok. 200 ml bezbarwnego, przezroczystego płynu o bardzo silnym zapachu.

Ogłędziny zewnętrzne i sekcja zwłok nie wykazały żadnych zmian pourazowych ani uchwytnych makroskopowo zmian chorobowych. Stwierdzono obfite plamy opadowe i przekrwienie narządów wewnętrznych. Z treści żołądkowej a także z krwi wyczuwalny był ostry zapach.

MATERIAŁY I METODY

Analizie poddano: krew, treść żołądkową, wycinki wątroby i nerki, które pobrano podczas sekcji zwłok oraz dostarczony w późniejszym terminie dowód rzeczowy – około 200ml bezbarwnego płynu.

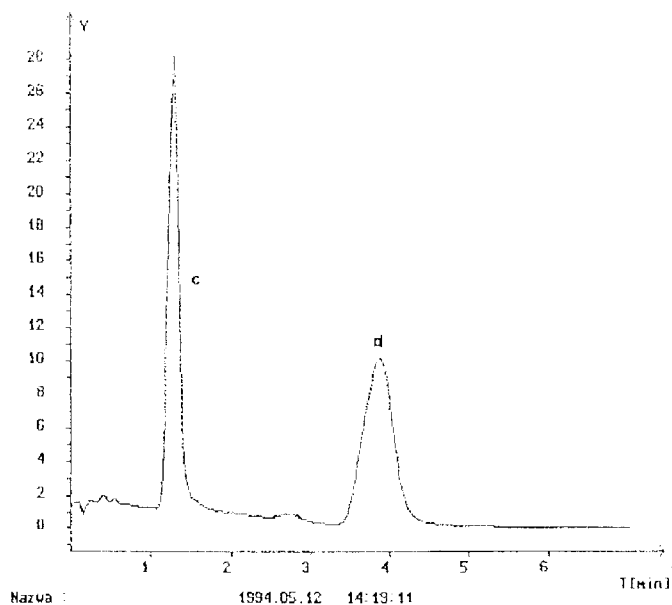
Materiał sekcyjny (z wyjątkiem krwi) homogenizowano z dodatkiem wody destylowanej, stosując rozcieńczenia: 3–krotne dla wątroby i nerki oraz 30–krotne dla treści żołądkowej. Próbkę płynu rozcieńczono 1000–krotnie wodą destylowaną. Tak przygotowany materiał badawczy w ilości 0,5 ml przenoszono do szklanych gilz head–space o pojemności 20ml, dodawano standard wewnętrzny – 2ml 0,2% roztworu izobutanolu, a następnie poddawano inkubacji na łaźni wodnej w temperaturze 60°C przez 30 minut.

Do analizy chromatograficznej termostatowaną strzykawką pobierano 1ml parznad poszczególnych próbek. Cykloheksanon, cykloheksanol oraz alkohol etylowy i acetaldehyd oznaczano przy użyciu chromatografu gazowego CHROM–5 z komputerową obróbką sygnału detekcji, za pomocą programu CHROMED. Warunki analityczne: kolumna – Carbowax 20M/Carbopak B (Supelco) dł. 1,25m, średnica – 2mm, temperatura kolumny – 120°C gaz nośny – azot 25ml/min., detektor – FID.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

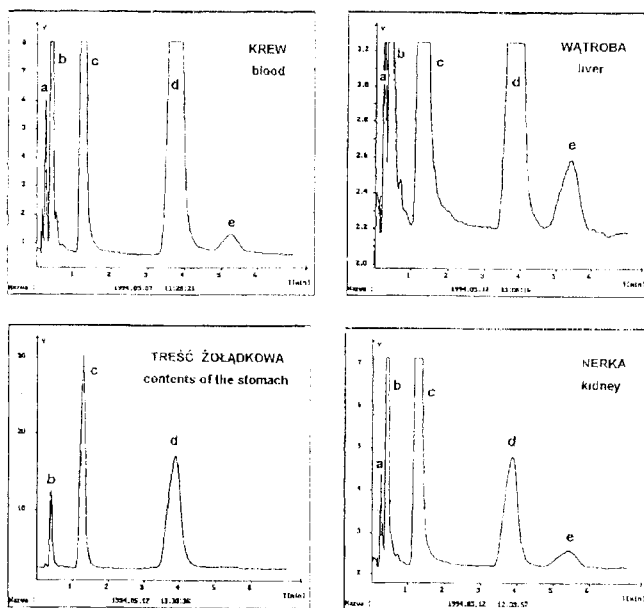
Dowód rzeczowy zidentyfikowano jako czysty cykloheksanon. Chromatogram analizy dowodu rzeczowego przedstawia rycina 2. W materiale sekcyjnym wykazano obecność cykloheksanonu i jego metabolitu – cykloheksanolu oraz obecność etanolu i jego metabolitu – acetaldehydu. Chromatogramy dla materiału sekcyjnego zamieszczono na rycinie 3. Rycina 4 przedstawia chromatogram mieszaniny wzorcowych roztworów: cykloheksanonu, cykloheksanolu i etanolu o stężeniu 1000 µg/ml oraz acetaldehydu o stężeniu 250 µg/ml.

Przez porównanie powierzchni pików na chromatogramach materiału sekcyjnego i na chromatogramach roztworów wzorcowych określono stężenie związków chemicznych wykrytych w materiale biologicznym. Wyniki oznaczeń ilościowych przedstawiono w tabeli I.



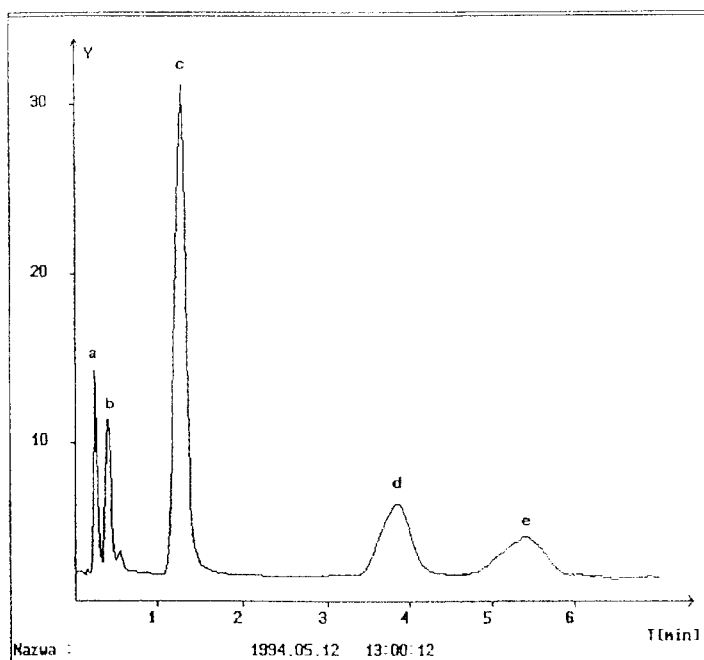
Ryc. 2. Chromatogram dla dowodu rzeczowego: c – standard wewnętrzny (izobutanol), b – cykloheksanon

Fig. 2. Chromatogram of the liquid from the bottle: c – internal standard (isobutanol), b – cyclohexanone



Ryc. 3. Chromatogramy dla materiału sekcyjnego: a – acetaldehyd, b – etanol, c – standard wewnętrzny (izobutanol), d – cykloheksanon, e – cykloheksanol.

Fig. 3. Chromatograms of the autopsy material: a – acetaldehyde, b – ethanol, c – internal standard (isobutanol), d – cyclohexanone, e – cyclohexanol.



Ryc. 4. Chromatogram wzorców: a – acetaldehyd, b – etanol, c – standard wewnętrzny (izobutanol), d – cykloheksanon, e – cykloheksanol.

Fig. 4. Chromatogram of the standards: a – acetaldehyde, b – ethanol, c – internal standard (isobutanol), d – cyclohexanone, e – cyclohexanol.

Tabela 1. Wyniki ilościowej analizy materiału sekcyjnego

Table. 1. The results of study of the autopsy material

	Cykloheksanon Cyclohexanone µg/ml	Cykloheksanol Cyclohexanol µg/ml	Etanol Ethanol µg/ml	Acetaldehyd Acetaldehyde µg/ml
Krew Blood	3370	120	2700	80
Treść żołądkowa Contents of the stomach	33900	0	13600	0
Nerka Kidney	510	180	1710	80
Wątroba Liver	900	150	1140	490

DYSKUSJA

Stosunek stężenia cykloheksanonu do cykloheksanilu we krwi (28:1) wskazuje na to, że do śmierci doszło wkrótce po wypiciu cykloheksanonu. Gdyby od chwili wypicia tej trucizny do zgonu minęły 2 godziny należałoby oczekiwać, że stosunek stężeń cykloheksanonu do cykloheksanolu będzie wynosił 1:6, 1:8.

Ze względu na to, że u zmarłego mężczyzny nie stwierdzono żadnych zmian chorobowych, oraz ze względu na to, że zarówno cykloheksanon jak i etanol w ostrym zatruciu działają bezpośrednio na OUN – przyjęliśmy “mózgowy” mechanizm śmierci w wyniku skojarzonego działania obu trucizn (cykloheksanonu i etanolu).

WNIOSKI

1. Zastosowane w pracy warunki analityczne równoczesnego oznaczania cykloheksanonu, etanolu, cykloheksanolu i acetaldehydu metodą chromatografii gazowej nadają się do analizy jakościowej oraz ilościowej tych związków w materiale sekcyjnym.

2. Porównanie stężeń substancji wyjściowych i metabolitów (we krwi, różnych narządach i w żołądku), a także w przypadku cykloheksanonu pozwala na określenie fazy zatrucia w której nastąpił zgon.

PIŚMIENNICTWO

1. Dreisbach R.H.: *Vademecum zatruc*, Warszawa 1982, 167. – 2. Elliot T.H., Parke D.V., Williams R.T.: *Metabolism of Cyclo(14C) Hexane and its Derivatives*. *Biochemical Journal*, 1959, 72, 193–200. – 3. Ong C.N., Chia S.E., Phoon W.H., Tan K.T., Kok P.W.: *Monitoring of exposure to cyclohexanone through the analysis of breath and urine*. *Scand–J–Work–Environ–Health*. 1991, 17(6), 430–435. – 4. Parmar D., Burka L.T.: *Metabolism and disposition of cyclohexanone oxime in male F–344 rats*. *Drug–Metab–Dispos–Biol–Fate–Chem.*, 1991, 19(6), 1101–1107. – 5. Sakata M., Take J., Watanabe T., Sakata K., Wada K., Haga M.: *Metabolic interaction of ethanol and cyclohexanone in rabbits*. *J–Toxicol–Environ–Health* 1993, 38(1), 33–42. – 6. Waszkowska M., Bazylewicz–Walczak B.: *Psychologiczna ocena skutków przewlekłego narażenia zawodowego lakierników pracujących w styczności z mieszaniną rozpuszczalników organicznych*. *Med–Pr*, 1992, 43(1), 35–39.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Lublinie

ul. Jaczewskiego 8, 20–090 Lublin

Nadesłano do Redakcji: 15.09.1995

Zakwalifikowano do druku: 26.10.1995