

Jarosław A. Berent

Zmiana modelu opiniowania przy badaniach osób pokrzywdzonych po wprowadzeniu nowego kodeksu karnego

The change in the pattern of forensic opinion used for the bodily harmed persons, after introduction of the new penal code

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Wprowadzony w życie od dnia 1 września 1998 roku nowy kodeks karny zmienił sformułowania artykułów dotyczących przestępstw przeciwko życiu i zdrowiu, co pociągnęło za sobą zmiany modelu opiniowania sądowo-lekarskiego. Celem pracy było przeanalizowanie tych zmian w odniesieniu do badania osób pokrzywdzonych. Stwierdzono, że odsetki opinii, w których przyjmowano kwalifikacje z art. 156 2 starego kk, zmienił się znacząco w stosunku do odsetka opinii, w których przyjmuje się kwalifikacje z art. 157 2 nowego kk, a także, że aktualne sformułowania kodeksowe ułatwiają opiniowanie dając jednoznaczny podstawę prawną do usankcjonowanego przez lata orzecznictwa.

The new penal code that was introduced on 1st September 1998 has changed the definitions of articles dealing with crimes against life and health, which in turn has resulted in changing the pattern of forensic opinion. The aim of this paper was to analyze those changes in reference to examination of bodily harmed persons. It has been stated that the percentage of opinions, in which the evaluation according to § 2 of 156 article of the old penal code has been applied, has significantly changed, in relation to the percentage of opinion in which the evaluation according to § 2 of 157 article of the new penal code has been made. What's more, the current definitions simplify the case giving an opinion which supplies the explicit sanctioning this over many years of iurisdiction.

Słowa kluczowe: opiniowanie sądowo-lekarskie, nowy kodeks karny
Key words: forensic opinion, new penal code

WPROWADZENIE

Jednym z zadań lekarza występującego jako biegły w postępowaniu karnym jest badanie osób pokrzywdzonych, składające się z badania podmiotowego (wywiadu) oraz badania przedmiotowego (fizykalnego) ze zwróceniem szczególnej uwagi na istniejące obrażenia ciała. Ponadto niekiedy zachodzi konieczność zapoznania się z dokumentacją lekarską lub aktami sprawy. Po badaniu takim należy sporządzić opinię zawierającą w swej końcowej części wnioszek, na podstawie którego organ procesowy ustalić może kwalifikację prawną czynu.

Wprowadzony w życie od dnia 1 września 1998 roku nowy kodeks karny zmienił sformułowania artykułów dotyczących przestępstw przeciwko życiu i zdrowiu, co pociągnęło za sobą zmiany modelu opiniowania sądowno-lekarskiego (9, 10). Zmiany te były, jeszcze przed rozpoczęciem obowiązywania nowego kodeksu, przedmiotem rozważań Barana oraz Berenta i Śliwki (2, 3, 4). Również później analizowali je Baran, Marcinkowski, Mądro i wsp., Polakowski i wsp., Świątek oraz Wośko i wsp. (1, 5, 6, 7, 8, 11).

CEL PRACY

Celem pracy było przeanalizowanie skutków zmian modelu opiniowania sądowno-lekarskiego dotyczącego osób pokrzywdzonych zgodnie z zapisami nowego kodeksu karnego.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano 100 kolejnych opinii wydanych po zbadaniu osób pokrzywdzonych sporządzonych przez autora niniejszej pracy w roku 1995 (w czasie obowiązywania kodeksu karnego z 1969 roku), oraz taka sama ilość kolejnych opinii sporządzonych przez tego samego biegłego na przełomie 1998 i 1999 roku (w czasie obowiązywania nowego kodeksu karnego). Wszystkie opinie zostały sporządzone w ramach działalności Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy. Powyższe dwie grupy opinii przeanalizowano ex post. W pierwszym etapie porównano obie grupy pod względem rozkładu ich zleceńodawców, płci osób badanych, ich wieku oraz konieczności przeprowadzenia badań kontrolnych, a następnie zwrócono uwagę na sformułowania wniosków końcowych. Porównania rozkładów w obu grupach zweryfikowano statystycznie testem Z (porównanie średniego wieku) oraz testami χ^2 Pearsona oraz testem dokładnym Fishera dla tablic 2x2, 2x3 i 2x4 (pozostałe porównania). Obliczenia prowadzono przy pomocy pakietu statystycznego SPSS 7.0.

WYNIKI

A. Opinie pochodzące z roku 1995

W pierwszej grupie badanej 60 opinii sporządzono na podstawie postanowienia wydanego przez policję, 2 na podstawie postanowienia wydanego przez prokuraturę, a pozostałe 38 opinii było opiniami „prywatnymi”, tj. wydanymi na bezpośrednią prośbę osób pokrzywdzonych zgłaszających się do tutejszego Zakładu. Wśród 100 osób badanych było 39 kobiet i 61 mężczyzn. Wiek badanych rozciągał się od 6 do 92 lat (średnia 37.25 lat, SD=19.62).

W 93 przypadkach opinię wydano po jednorazowym badaniu pokrzywdzonej / pokrzywdzonego, a w pozostałych 7 niezbędne było przeprowadzenie badania kontrolnego (każdorazowo po upływie 7 dni od przedmiotowego zajścia). W 62 sprawach zleczanych przez Policję i Prokuraturę w postanowieniu o powołaniu biegłego występowały 3 podobnie sformułowane pytania. Pierwsze z nich zazwyczaj miało postać: „jakich obrażeń ciała doznał pokrzywdzony / doznała pokrzywdzona”, drugie: „czy mogły one powstać w czasie i okolicznościach przez nią / niego podanych” i trzecie „czy powodują one naruszenie czynności narządu ciała na okres powyżej dni siedmiu” lub ogólniejsze: „jak należy je kwalifikować”. Jedynie w 4 przypadkach na 62 pojawiło się dodatkowe czwarte pytanie dotyczące narzędzia, które mogło spowodować takie właśnie obrażenia ciała, ze wskazaniem jakiegoś szczególnego narzędzia lub też bez takiego wskazania. W opinii odnoszono się każdorazowo do pytań z postanowienia, również w przypadku badań prywatnych (bez postanowienia), gdzie zakładano, że takie same kwestie będą interesować odbiorcę opinii. Na pierwsze pytanie dotyczące obrażeń ciała wymieniano je po kolei, stosując w miarę możliwości uogólnienia (dla przejrzystości wniosków, bowiem szczegółowy ich opis zawarty był już we wstępnej części opinii). Na drugie pytanie dotyczące możliwości powstania takich obrażeń ciała w czasie i okolicznościach podawanych przez osobę badaną odpowiadano krótkim stwierdzeniem, iż: „obrażenia powyższe mogły powstać w czasie i okolicznościach podawanych przez pokrzywdzoną / pokrzywdzonego” bez jakiegokolwiek szerszego wyjaśnienia (w 95 przypadkach), a w pozostałych 5, gdzie istniały jakiegokolwiek wątpliwości co do okoliczności powstania obrażeń, omawiano to szczegółowo. Analogicznie odpowiadano na pojawiające się sporadycznie pytanie dotyczące narzędzia. I wreszcie na ostatnie rutynowe pytanie dotyczące kwalifikacji doznanych obrażeń z użyciem pojęć występujących w kodeksie karnym odpowiedziano w 7 przypadkach (gdzie nie stwierdzano w ogóle żadnych obrażeń ciała): „Brak śladów obrażeń podczas aktualnego badania nie przeczy wiarygodności wyjaśnień pokrzywdzonej / pokrzywdzonego, bowiem urazy zadane z nieznaczną siłą mogą nie pozostawiać żadnych śladów, lub co najwyżej takie ślady, które ustępują w krótkim okresie czasu po zajściu. W tym stanie rzeczy skutki przedmiotowego zajścia można kwalifikować z sądowno-lekarskiego punktu widzenia co najwyżej jako naruszenie nietykalności cielesnej bez pozostawienia śladów na ciele w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego.”. W dalszych 68 przypadkach odpowiedziano, że: „stwierdzone obrażenia wyczerpują znamiona

naruszenia czynności narządu ciała na czas poniżej dni siedmiu w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego”, w 24, że: „stwierdzone obrażenia wyczerpują znamiona naruszenia czynności narządu ciała na czas powyżej dni siedmiu w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego”, a w 1 przypadku, podejrzewając wystąpienie „choroby zazwyczaj zagrażającej życiu” ostatecznej opinii na tym etapie nie wydano i poproszono o nadesłanie całości akt sprawy.

B. Opinie pochodzące z roku 1998/1999

W drugiej grupie badanej 51 opinii sporządzono na podstawie postanowienia wydanego przez policję, a pozostałe 49 opinii było opiniami „prywatnymi”. Wśród 100 osób badanych było 40 kobiet i 60 mężczyzn. Wiek badanych rozciągał się od 10 do 71 lat (średnia 33.25 lat, SD=15.10).

W 88 przypadkach opinię wydano po jednorazowym badaniu pokrzywdzonej / pokrzywdzonego, a w pozostałych 12 niezbędne było przeprowadzenie badania kontrolnego. W 51 sprawach zleczanych przez policję występowały 3 pytania sformułowane podobnie jak w grupie pochodzącej z 1995 roku. Tylko w 1 przypadku pojawiło się dodatkowe pytanie dotyczące narzędzia, które mogło spowodować takie właśnie obrażenia ciała. W opinii również odnoszono się każdorazowo do pytań z postanowienia, a w przypadku badań prywatnych analogicznie zakładano, że podobne kwestie będą interesować odbiorcę. Na pierwsze pytanie dotyczące obrażeń ciała oraz na drugie pytanie dotyczące możliwości powstania takich obrażeń ciała w czasie i okolicznościach podawanych przez osobę badaną odpowiadało podobnie jak w opiniach analizowanych w grupie pierwszej. Analogicznie odpowiedziano też na pojawiające się raz pytanie dotyczące narzędzia. I wreszcie na ostatnie rutynowe pytanie dotyczące kwalifikacji doznanych obrażeń z użyciem pojęć występujących w nowym kodeksie karnym odpowiedziano w 61 przypadkach, że: „stwierdzone obrażenia nie wyczerpują znamion naruszenia czynności narządu ciała ani też rozstroju zdrowia w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego”, w 14, że: „stwierdzone obrażenia wyczerpują znamiona naruszenia czynności narządu ciała na czas poniżej dni siedmiu w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego”, w 22, że: „stwierdzone obrażenia wyczerpują znamiona naruszenia czynności narządu ciała na czas powyżej dni siedmiu w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego”, a w pozostałych 3 przypadkach wydano opinie tymczasowe. W pierwszym z tych przypadków pomiędzy przedmiotowym zdarzeniem a badaniem upłynęło półtora miesiąca i podczas badania nie stwierdzono już żadnych obrażeń ciała. We wniosku stwierdzono, że udzielenie odpowiedzi na pytanie dotyczące kwalifikacji „być może będzie możliwe po zapoznaniu się z całością akt sprawy”. W drugim z nich podejrzewając wystąpienie choroby realnie zagrażającej życiu poproszono o nadesłanie całości akt sprawy, w a ostatnim przypadku wysunięto przypuszczenie, że wystąpi trwała niezdolność do pracy w zawodzie, ale wydanie ostatecznej opinii odsunięto na okres sześciu miesięcy, do czasu przeprowadzenia badania kontrolnego.

C. Porównanie opinii

Porównanie statystyczne rozkładów analizowanych cech w poszczególnych grupach dało niższe rezultaty. Rozkład zleceniodawców opinii: $\chi^2=4.121$, $df=2$, $p=0.127$, exact $p=0.101$, a więc nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Rozkład płci osób badanych: $\chi^2=0.021$, $df=1$, $p=0.885$, exact $p=1.000$, a więc nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Rozkład wieku osób badanych: $Z=1.616$, $p=0.106$, a więc nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Rozkład konieczności przeprowadzenia badań kontrolnych: $\chi^2=1.454$, $df=1$, $p=0.228$, exact $p=0.335$, a więc nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Rozkład poszczególnych wniosków końcowych opinii przy czterech kategoriach: 1) „Brak śladów obrażeń...” albo „Stwierdzone obrażenia nie wyczerpują...”, 2) „Naruszenie na okres poniżej dni 7...”, 3) „Naruszenie na okres powyżej dni 7...” i 4) inne: $\chi^2=79.530$, $df=3$, $p=0.000$, exact $p=0.000$, a więc stwierdzono statystycznie istotną różnicę. Rozkład poszczególnych wniosków końcowych opinii przy trzech kategoriach, tzn. jak wyżej, ale przy zgrupowaniu kategorii 1 i 2: $\chi^2=1.087$, $df=2$, $p=0.581$, exact $p=0.702$, a więc nie stwierdzono już statystycznie istotnej różnicy.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

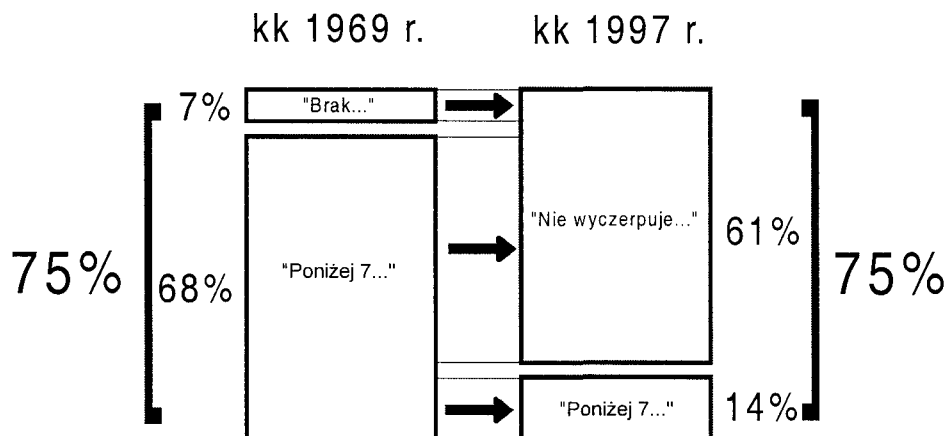
Przeprowadzona analiza statystyczna zleceniodawców opinii, płci i wieku osób badanych oraz konieczności przeprowadzenia badań kontrolnych wykazała, że pomiędzy grupami badawczymi pochodzącymi z roku 1995 i 1998/1999 nie występują statystycznie znamienne różnice. W tym stanie rzeczy można je było porównać pod kątem sformułowań kodeksowych podawanych we wnioskach opinii.

Porównanie takie wykazało istnienie istotnych różnic pomiędzy modelami opiniowania pochodzącymi z obu kodeksów karnych. Dalsza analiza pozwoliła na znalezienie przyczyny tych różnic. Okazało się, że odsetek opinii, w których użyto sformułowań o „naruszeniu czynności narządu ciała na okres powyżej dni siedmiu” nie zmienił się istotnie (24% vs 22%), podobnie jak odsetek opinii, w których wydano opinie tymczasowe (1% vs 3%).

Natomiast w pozostałych 75% opinii (przypadkowo podgrupy pozostałych opinii w obu grupach badanych były równoliczne), zaszły znaczne zmiany w rozkładzie wniosków (ryc. 1). W roku 1995 aż 68% opinii kończyło się określeniem o „naruszeniu czynności narządu ciała na okres poniżej dni siedmiu”, podczas gdy w roku 1998/1999 już tylko 14%. Różnica ta była skompensowana przez wzrost ilości opinii, w których nie stwierdzono o ogóle „naruszenia czynności narządu ciała”. W roku 1995 było to 7%, a obecnie aż 61%.

Powyższe zmiany są prostym skutkiem zmiany redakcji art. 157 kk w stosunku do art. 156 dawnego kk. Poprzednio do przyjęcia kwalifikacji z art. 156 § 2 wystarczające było istnienie „uszkodzenia ciała” bez konieczności występowania „naruszenia czynności narządu ciała”. Obecnie zaś do przyjęcia kwalifikacji z art. 157 § 2 kk warunkiem sine qua non jest obecność właśnie „naruszenia

czynności narządu ciała” (lub „rozstroju zdrowia”), a samo określenie „uszkodzenia ciała” zniknęło w ogóle z kodeksu karnego.



Ryc. 1. Porównanie ilości poszczególnych opinii.

Fig. 1. Comparison of number of the respective expertises.

Szczegółowe rozwinięcie tego zagadnienia zostało opublikowane w jednej z poprzednich prac z naszego Zakładu w roku 1997 (4). Poglądy tam zawarte, oceniające pozytywnie wprowadzone zmiany, zostały przez niektórych przyjęte z rezerwą (1, 6).

Jednak w opublikowanym w 1999 roku komentarzu do kodeksu karnego Zoll stwierdza: „Nowy k.k. inaczej określa znamiona typu czynu zabronionego polegającego na naruszenia nietykalności cielesnej, niż czynił to k.k. z 1969 r. Różnica polega na tym, że art. 217 § 1 mówi jedynie o naruszeniu nietykalność cielesnej, podczas gdy w art. 182 § 1 k.k. z 1969 roku stwierdzano, że typ ten odnosi się też do przypadków, gdy takie naruszenie nietykalności pozostawiało na ciele pokrzywdzonego „nieznaczne ślady”. Należy stanąć na stanowisku, że nie ma w tym przypadku różnicy merytorycznej. Artykuł 157 § 2 wymaga naruszenia czynności narządu ciała lub rozstroju zdrowia. Pozostawienie na ciele nieznacznych śladów, będących wynikiem np. uderzenia, nie będzie spełniało warunków koniecznych do stwierdzenia skutku, o którym jest mowa w tym przepisie.” (12).

Pogląd Zolla jest zbliżony z poglądem wyrażonym w tamtej publikacji z naszego Zakładu, w której autorzy stwierdzili: „Nie pojawia się w nim (w art. 157 kk – uzup. autora) w ogóle budzące dotąd tak duże kontrowersje pojęcie „uszkodzenie ciała”, natomiast następuje bezpośrednie odniesienie się do naruszenia czynności narządu ciała lub rozstroju zdrowia. (...) Czyli uszkodzenie ciała czy też nieznaczne ślady na ciele – co już nie ma żadnego znaczenia – bez naruszenia czynności narządu lub rozstroju zdrowia automatycznie stają się naruszeniem nietykalności cielesnej.” (4).

Podsumowując należy stwierdzić, że wyniki niniejszej pracy potwierdzają, że

zaszły zmiany modelu opiniowania sądowo-lekarskiego dotyczącego osób pokrzywdzonych, który teraz jest zgodny zarówno z duchem dotychczasowego orzecznictwa, jak i z nowym prawem karnym. Moim zdaniem obecne rozwiązania kodeksowe są bardziej optymalne w porównaniu do obydwu poprzednich kodeksów (z roku 1932 i 1969), bowiem – jak to wynika z poprzednich opracowań naszego Zakładu – dają one: „jednoznaczną podstawę prawną do usankcjonowanego przez lata orzecznictwa, które jednak z braku dobrego zakotwiczenia w obowiązującym prawie wzbudzało niejednokrotnie wątpliwości.”, chociaż na wyciąganie szerszych wniosków jest jednak jeszcze za wcześnie, gdyż podobne analizy muszą zostać sporządzone przez inne ośrodki, a ponadto muszą one zostać odniesione do orzecznictwa sądów, jako ostatecznych weryfikatorów sporządzanych opinii (4).

WNIOSKI

1. Nowy kodeks karny spowodował zmianę modelu opiniowania w zakresie przestępstw przeciwko życiu i zdrowiu. Odsetki opinii, w których przyjmowano kwalifikacje z art. 156 § 2 starego kk, zmienił się znacząco w stosunku do odsetka opinii, w których przyjmuje się kwalifikacje z art. 157 § 2 nowego kk.

2. Aktualne sformułowania kodeksowe ułatwiają opiniowanie dając jednoznaczną podstawę prawną do usankcjonowanego przez lata orzecznictwa.

PIŚMIENNICTWO

1. Baran E.: Konsekwencje eliminacji pojęcia „uszkodzenie ciała” w nowym Kodeksie Karnym dla praktyki opiniodawczej. *Post. Med. Sąd. Krym.* 1999, 5, 85–88. –2. Baran E.: Uwagi biegłego medyka sądowego do projektu Kodeksu Karnego w sprawach dotyczących przestępstw przeciwko zdrowiu. *Palestra* 1996, 40, 74–79. –3. Berent J.A., Śliwka K.: Ewolucja pojęcia „choroby zagrażającej życiu” w kolejnych kodeksach karnych. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1997, 47, 283–292. –4. Berent J.A., Śliwka K.: Ewolucja pojęcia „naruszenia nietykalności cielesnej” w kolejnych kodeksach karnych. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1997, 47, 209–216. –5. Marcinkowski T.: Uwagi o artykule 217 nowego kodeksu karnego – odpowiedniku dotychczasowego artykułu 182. *Post. Med. Sąd. Krym.* 1999, 5, 95–96. –6. Mądro R., Teresiński G., Wróblewski K.: Zakres skutków objętych ściganiem art. 157 nowego Kodeksu Karnego w porównaniu z art. 156 Kodeksu Karnego z 1969 r. *Post. Med. Sąd. Krym.* 1999, 5, 71–84. –7. Polakowski M., Berent J.A., Śliwka K.: Opiniowanie o „naruszeniu czynności narządu ciała” lub „rozstroju zdrowia” wobec rezygnacji w nowym kodeksie karnym z pojęcia „uszkodzenia ciała”. *Arch. Med. Sąd. Krym.*, 1999, 49, 191–194. –8. Świątek B.: Przestępstwa przeciwko życiu i zdrowiu w świetle nowego kodeksu karnego. *Post. Med. Sąd. Krym.* 1999, 5, 63–70. –9. Ustawa

z dnia 6 czerwca 1997 roku – Kodeks karny. Dz. U. nr 88/97, poz. 553 z późniejszymi zmianami. –10. Ustawa z dnia 19 kwietnia 1969 roku – Kodeks karny. Dz. U. nr 13/69, poz. 94 z późniejszymi zmianami.

11. Woško G., Kolański B.: Artykuły 156 i 157 w nowym kodeksie karnym. Post. Med. Sąd. Krym. 1999, 5, 89–93. –12. Zoll A.: Komentarz do art. 156, 157 i 217 kk. w: Zoll A. (red.): Kodeks karny. Część szczególna. Komentarz do art. 117–277 Kodeksu karnego. Wyd. I poprawione, dodruk I. Kantor Wydawniczy Zakamycze, Kraków 1999, pp. 274–293 i 670–675.

adres autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9,
85–094 Bydgoszcz

Elżbieta Bloch-Bogusławska

Przemoc w rodzinie w materiałach Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Bydgoszczy

Domestic violence in the materials of the Department of Forensic Medicine of the Medical Academy in Bydgoszcz

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Analizie poddano przypadki osób pokrzywdzonych przez członków rodziny w latach 1994 i 1997. Stwierdzono, że wzrost liczby pokrzywdzonych dotyczy głównie żon i dzieci.

The cases of domestic violence in the years 1994 and 1997 were analysed. The analysis showed that the increase in the number of abused patients concerned mainly wives and children.

Słowa kluczowe: przemoc, rodzina

Key words: violence, family

WSTĘP

Przemoc w domu, znęcanie się, jest sytuacją nadużycia siły fizycznej pomiędzy ludźmi, którzy pozostają w związku rodzinnym.

Obejmuje ona ogół przypadków szkód na zdrowiu, obniżania poziomu moralnego, pogarszania samopoczucia i strat materialnych, spowodowanych naruszeniem reguł prakseologicznych, moralnych i prawnych (10).

Formy przemocy domowej są różne: bicie, duszenie, zadawanie ran za pomocą ostrych narzędzi, przymuszanie do aktywności seksualnej bądź groźby użycia siły, które brzmią wiarygodnie. Wszystko to może prowadzić do poważnych obrażeń fizycznych lub do śmierci. Emocjonalne skutki znęcania się mogą być nieraz groźniejsze niż fizyczny atak. Pokrzywdzeni tracą kontakt z przyjaciółmi i dalszą rodziną ze względu na celowe izolowanie się. Mogą oddalać się od innych z lęku przed przypisywaniem im winy za zaistniałą sytuację (5). Jednocześnie z osłabieniem kontaktu z najbliższymi przyjaciółmi obniża się także

poczucie ich własnej wartości. Stałe zniewagi ze strony partnera prowadzą do przekonania, że nie zasługują na szacunek. Pokrzywdzeni w dalszej perspektywie mogą też stracić nadzieję na szansę wyjścia z trudnej sytuacji.

Pomimo fizycznych i psychicznych urazów, jakie przychodzi im znieść, pokrzywdzeni coraz częściej podejmują próby walki o godne życie, starają się przełamywać bierność i bezsilność służb publicznych i obojętność sąsiadów, traktujących patologiczną sytuację jako wyłącznie prywatną sprawę, w którą nie należy ingerować. Mroczne strony życia rodzinnego coraz częściej wypływają na światło dzienne. Również w świadomości obywateli rodzi się przekonanie, że przemoc domowa jest problemem każdego z nas (8, 9). Przemoc na terenie domu zwiększa przestępczość na ulicy. Większość kryminalistów atakujących ludzi na ulicy pochodzi z domów gdzie stosowano przemoc, dramatycznie wzrasta przestępczość i agresja wśród nieletnich. Efektem tego było m.in. przyjęcie „Deklaracji w sprawie przeciwdziałania przemocy w rodzinie” (7). W dokumencie tym podkreślono m.in., że każdy człowiek ma prawo do życia w środowisku rodzinnym wolnym od przemocy, doświadczający przemocy nie może być za nią obwiniany, dzieci i młodzież mają prawo do wzrastania w bezpiecznym środowisku a obowiązkiem dorosłych jest im to zapewnić, każdy człowiek doświadczający przemocy ma prawo do pomocy prawnej i wiedzy potrzebnej do radzenia sobie z przemocą a każdy człowiek ma obowiązek udzielania pomocy ofiarom przemocy w rodzinie.

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy była próba prześledzenia charakteru zjawiska przemocy w rodzinie w oparciu o wyniki badań sądowo-lekarskich, prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy.

MATERIAŁ I METODA

Analizie podano protokoły badań sądowo-lekarskich, wykonywanych w celu kwalifikacji karnej obrażeń ciała osób, które doświadczyły przemocy ze strony członków swojej rodziny w roku 1994 – początkowy okres wzrostu liczby badań karnych oraz 1997 – ostatnim, zakończonym roku kalendarzowym przed opracowaniem tematu.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Z danych prezentowanych w tabeli I wynika, że znacząco wzrosła liczba osób pokrzywdzonych w rodzinie w 1997 roku w stosunku do roku 1994. Odsetek osób doświadczających przemocy w 1994 roku stanowił około 11,1% ogólnej liczby badanych a w 1997 roku już około 21,5%. Wśród pokrzywdzonych zdecydowaną większość stanowiły kobiety. Niepokojący wydaje się wzrost liczby

dzieci doświadczających przemocy. W odniesieniu do nieletnich poniżej 16 roku życia z jednego przypadku w 1994 roku do 16 przypadków w 1997 roku.

Tabela I. Zestawienie ilościowe i jakościowe przypadków przemocy w rodzinie w materiałach Zakładu Medycyny Sądowej w Bydgoszczy w roku 1994 i 1997

Table I. Qualitative and quantitative characteristics of domestic violence cases according to data collected by Forensic Medicine Institute in Bydgoszcz in 1994 and 1997.

Rok Year		1994	1997
Liczba przypadków Number of cases Ogółem Total		314	644
Liczba przypadków rodzinnych Number of family cases		45	138
Płeć pokrzywdzonych Sex of injured	mężczyźni men	5	13
	kobiety women	39	109
	dzieci children	1	16
Stosunek pokrewieństwa sprawców do ofiar Family relationships between perpetrators and injured	mąż husband	34	87
	żona wife	2	9
	rodzice parents	1	20
	inni others	8	22
wiek w latach age in years	0 – 10	–	8
	10 – 20	1	15
	20 – 30	6	34
	30 – 40	15	30
	40 – 50	12	28
	powyżej 50 above	11	23
kwalifikacja karna qualification according to penal code	art. 156 § 1 KK	42	124
	art. 156 § 2 KK	3	14

Procentowo w stosunku do ogólnej ilości przeprowadzonych badań odsetek pokrzywdzonych dzieci w 1994 roku wynosił 0,3% a w 1997 roku 2,4%. Ogółem rodzice byli sprawcami przemocy wobec swoich dzieci w 20 przypadkach w 1997

roku a tylko w jednym w 1994 roku. Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic w przedziałach wiekowych osób pokrzywdzonych. W odniesieniu do skutków stosowanej przemocy należy podkreślić, że zdecydowanie przeważają zmiany upośledzające funkcje narządu ciała na czas poniżej dni 7 w rozumieniu odpowiedniego artykułu kodeksu karnego, jakkolwiek wzrost liczby skutków cięższych, powodujących naruszenie funkcji narządu ciała na czas powyżej 7 dni daje się zauważyć. W 1994 roku przypadki te stanowiły około 7% a w 1997 roku 12% ogółu badań.

Zdecydowaną większość obrażeń stanowiły zasinienia i otarcia naskórka. W przypadkach skutkujących naruszeniem czynności narządu ciała na okres powyżej 7 dni stwierdzano głównie naruszenie funkcji narządu ruchu – 9 przypadków, 2 przypadki naruszenia czynności narządu żucia i 3 przypadki naruszenia funkcji narządu oddechowego.

Spośród analizowanych przypadków oddzielnego omówienia wymaga przypadek E.W., lat 19. Pokrzywdzona podała, że jej mąż od 1,5 roku znęca się nad nią fizycznie i moralnie. Działania te polegały m.in. na tym, że położył jej prawe przedramię na rozgrzanej płycie pieca węglowego; obciął jej scyzorykiem palec lewej stopy, po czym sam zszył ranę żyłką wędkarską. Wyrwał kombinerkami wszystkie paznokcie palców rąk i stóp. Wielokrotnie bił ją pięściami po całym ciele, w wyniku czego doznała m.in. uszkodzenia wargi dolnej z oddzieleniem luźnego fragmentu tkanki, który mąż obciął jej skalpelem po uprzednim sprawdzeniu, poprzez nakłucie igłą czy odczuwa ból w obrębie fragmentu tej tkanki.

Prypadkiem innego rodzaju jest sprawa M.R – K., która wielokrotnie, pobita przez męża, zgłaszała się prywatnie do tut. Zakładu, celem dokonania obdukcji lekarskich. Mimo, że w analizowanych obrażeniach ciała były zmiany powodujące naruszenie funkcji narządu ciała na okres powyżej 7 dni pokrzywdzona w dalszym ciągu zgłaszała się celem dokonania obdukcji, nie wnosząc sprawy do Prokuratury.

DYSKUSJA

W niniejszej pracy analizowano jedynie zjawisko przemocy w rodzinie w oparciu o wyniki badań sądowo-lekarskich, prowadzonych w Zakładzie Medycyny Sądowej. Zaobserwowano wzrost liczby przypadków stosowania przemocy w rodzinie w 1997 roku w stosunku do 1994 roku, co pokrywa się z obserwacjami o narastającej fali przemocy, będącej przedmiotem opracowań naukowych w kraju i poza jego granicami (8, 9).

W naszych materiałach, w analizowanym okresie nie stwierdzono przypadków zgonów osób pokrzywdzonych, wobec których wcześniej stosowano przemoc w domu, w rodzinie. Wskazuje to, że stosowana przemoc nie miała aż tak drastycznego charakteru jak to zaobserwował Hicks i Gaughan, którzy odnotowali 14 śmiertelnych przypadków krzywdzonych dzieci (4).

Przyczyną śmierci prawie wszystkich dzieci były urazy głowy zadane narzędziem tępym, w 1 przypadku stwierdzano obrażenia narządów jamy brzusznej (7).

W analizowanych wynikach naszych badań stwierdzono zaledwie 1 przypadek molestowania seksualnego dziecka. Seksualne molestowanie pokrzywdzonych Brown i wsp. (8) odnotowali w 42% analizowanych przypadków a Aleksander (10) w 11% przypadków.

Wyniki przeprowadzonych badań nie dają podstaw do szerszej analizy tego zjawiska w aspekcie społecznym. Próba ustalenia źródła patologii wymaga znacznie szerszej analizy czynników ekonomicznych, egzystencjalnych i ustrojowych (2), wykraczających poza możliwości badawcze w ramach rutynowych badań sądowo-lekarskich.

Niewątpliwie alkohol czy wręcz alkoholizm odgrywają tu znaczną rolę. Negatywny wpływ alkoholu na dysfunkcję rodziny podkreślali w swoich opracowaniach Mena i wsp. (9).

Przemoc w rodzinie stanowi z pewnością olbrzymi problem i określenie go mianem patologii społecznej bynajmniej nie jest przesadnym. Fakt, że liczba przypadków przemocy w rodzinie nie przekroczyła liczby przypadków uszkodzeń ciała w rozbojach i wypadkach drogowych (6) z uwagi na tendencje wzrostowe tego zjawiska nie napawa optymizmem.

PIŚMIENNICTWO

1. RC Aleksander: Current and emerging concepts in child abuse. *Compr Ther* 1995, 21 (12), 726–730.
- 2. A. Brown, SS Bassuk: Intimate Vidence in the live of homeless and poor housed women: prevalence and patterns in an ethnically oliverse sample. *Am J Orthopsychiatry* 1997, 67 (2), 261–278.
- 3. A. Hankała: Przemoc w życiu codziennym. Agencja Wydawnicza CB, Warszawa, 1997, 55–71.
- 4. RA. Hicks i DC Gaughan: Understanding fatal child abuse, *Chid Abuse Negl* 1995, 19 (7), 855–863.
- 5. B. Karolczak-Biernacka: Percepcja przyczyn przestępczości i wizje ośrodków zapobiegawczych. Przemoc w życiu codziennym. Agencja Wydawnicza CB, Warszawa, 1997, 21–38.
- 6. M. Mena, ML Alcazar, H. Hurrialde, R. Frits, E. Ripoll, P. Bedregal: Alcohol consumption and family: a descriptive study in adolerscents. *Rev Med Chil* 1996, 124 (6), 749–755.
- 7. Polska Deklaracja w sprawie przeciwdziałania przemocy w rodzinie – Materiały II Ogólnopolskiej Konferencji na temat Przeciwdziałania Przemocy w Rodzinie – grudzień 1995.
- 8. Przemoc dzieci i młodzieży wobec innych jako wymiar polskiej transformacji ustrojowej – Konferencja Naukowa UG – listopad 1997.
- 9. Przemoc w domu – przybliżenie problemu społecznego, Zrzeszenie Amerykańsko-Polskie cyt. za National Women Abuse Project, Washington, D. C.
- 10. T. Szymanowski: Patologia społeczna. Wybrane problemy. Wydawnictwo WSPS, Warszawa 1991, 19–23.

Adres autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
85–094 Bydgoszcz

KOMUNIKAT O KONFERENCJI

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach oraz Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii Oddział Katowice uprzejmie zapraszają do wzięcia udziału w V Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej na temat „Sądowo-lekarskie problemy narkomanii”, która odbędzie się w dniach 17–19 maja 2000 roku w Ośrodku Szkoleniowym w Bielsku Białej.

W programie przewiduje się przedstawienie krótkich doniesień z opracowań własnych, jak również kazuistyki. Planuje się sesje plenarne a także wyodrębnione sesje specjalistyczne (w razie potrzeby) na których zostaną wygłoszone referaty i doniesienia naukowe.

Referaty wprowadzające (zamówione) dotyczyć będą następujących zagadnień.

1. Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty narkomanii.
2. Psychopatologiczne i socjologiczne uwarunkowania uzależnień.
3. Regulacje prawne dotyczące zjawiska narkomanii.
4. Opiniowanie sądowo lekarskie w sprawach narkomanii i narkotyków.

Koszt uczestnictwa w Konferencji wyniesie 120 PLN.

Przewiduje się wydanie drukiem streszczeń referatów programowych i doniesień naukowych. Pełne teksty prac, po ich zakwalifikowaniu, mogą być drukowane w Archiwum Medycyny Sądowej i Kryminologii.

Zakwaterowanie i wyżywienie w miejscu obrad Konferencji.

Dalsze szczegóły przyniesie II Komunikat do tych osób, które nadeślą zgłoszenia uczestnictwa wraz z tematem doniesienia do dnia 15.12.1999 na adres:

Prof. dr hab. n. med. dr n. chem. Halina Sybirska
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej ŚIAM
ul. Medyków 18
40–752 Katowice

**Jakub Czarny, Danuta Miścicka-Śliwka, Jarosław A. Berent,
Tomasz Grzybowski, Marcin Woźniak**

Ocena praktycznej przydatności multipleksowej analizy 12 loci STR zawartych w systemach „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System” i „GenePrint FFFL Fluorescent STR System” w dochodzeniu ojcostwa*

Validation of 12 STR loci analysed using the „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System” and „GenePrint FFFL Fluorescent STR System” multiplex systems in paternity testing

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Oznaczono genotypy w zakresie 12 loci STR w 65 sprawach dochodzenia spornego ojcostwa. W 13 przypadkach na podstawie uzyskanych wyników ojcostwo wykluczono. W pozostałych 52 przypadkach potwierdzenia ojcostwa obliczono szansę ojcostwa PI (Paternity Index) i prawdopodobieństwo ojcostwa P (Paternity Probability). W oparciu o analizę polimorfizmu ilości powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych w 12 loci potwierdzenie ojcostwa z wartością $P > 0.999$ uzyskano w 90.2% analizowanych przypadków. Na podstawie badań populacyjnych obliczono też teoretyczną szansę wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny (MEC) dla badanych loci STR.

We tested the paternity in 65 cases by analysis of 12 STR loci. Paternity was excluded in 13 cases. In the remaining 52 cases of questioned paternity we calculated the Paternity Index (PI) and Paternity Probability (P). We confirmed paternity in 90.2% of analysed cases with $P > 0.999$. On the basis of this population study we determined the value of MEC for the analysed STR loci.

Słowa kluczowe: PCR, STR, analiza multipleksowa, prawdopodobieństwo ojcostwa, szansa ojcostwa,

Key words: PCR, STR, multiplex analysis, paternity probability, paternity index.

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 4 PO 5A 09816 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 1999–2000.

WSTĘP

Opracowanie metod analizy polimorfizmu DNA dało możliwość rozstrzygnięcia spraw w dochodzeniu ojcostwa. Metody analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) (5 – 7) i polimorfizmu liczby powtórzeń sekwencji w loci minisatelitarnych (VNTR) (1, 2, 10, 12, 13, 15) są obecnie doskonale scharakteryzowane i stały się podstawowymi narzędziami w dochodzeniu ojcostwa.

Rozstrzygnięcie ojcostwa w oparciu o badanie polimorfizmu liczby powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych STR (4, 8, 11, 14), na której opiera się identyfikacja osobnicza w analizie śladów biologicznych, ma stosunkowo krótką historię. W pracy przedstawiono analizę spraw dochodzenia ojcostwa, w których wykonano oznaczenia DNA w obrębie loci STR w zakresie układów: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 F13A01, FESFPS, F13B, i LPL, jako przykład praktycznej przydatności badań układów STR w sprawach dochodzenia ojcostwa.

Przeprowadzone wcześniejsze badania populacyjne (9) pozwoliły teoretycznie scharakteryzować przydatność 12 analizowanych loci STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 F13A01, FESFPS, F13B i LPL w rozstrzygnięciu spornego ojcostwa. Wyliczono, że łączna przydatność (teoretyczna szansa wykluczenia niesłusznie pozwanego mężczyzny MEC) dla analizowanych loci wynosi 0.99986.

MATERIAŁY I METODY

Badaniami objęto 195 osób z 65 tzw. „trójek”: matka – dziecko – domniemany ojciec, badanych w Katedrze i Zakładzie Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Bydgoszczy w sprawach dochodzenia spornego ojcostwa. W 51 przypadkach ojcostwo potwierdzono w analizach wielopunktowych z użyciem sond molekularnych MZ 1.3 lub 33.15 z użyciem trawienia DNA enzymami Hinf I i Hae III oraz analizach loci VNTR z wykorzystaniem sond MS43A, MS31, MS1 lub g3 a także w analizie locus D1S80. W 13 przypadkach w oparciu o tę metodykę ojcostwo wykluczono. W jednym przypadku domniemany ojciec nie żył i do badań wykorzystano zasuszoną krew pobraną w trakcie sekcji zwłok, która miała miejsce 2 lata przed wykonaniem badań, które przeprowadzono w oparciu o analizę loci STR.

DNA z krwi obwodowej i suszonej izolowano tzw. metodą organiczną a stężenie DNA określono metodą spektrofotometryczną. Amplifikację i typowanie DNA wykonano z użyciem multipleksowych systemów: „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”, pozwalającego na koamplifikację i dwukolorową detekcję ośmiu loci STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 i genu amelogeniny (płeć) oraz „GenePrint FFFL Fluorescent STR System” umożliwiającego jednoczesną analizę czterech loci STR: F13A01, FESFPS, F13B, LPL, firmy Promega, zgodnie z zaleceniami producenta, podając do reakcji 1.25–2 ng matrycy genomowego DNA. Po

amplifikacji fragmenty DNA rozdzielano w 5% denaturującym żelu poliakrylamidowym na sekwenatorze ABI Prism 377. Pomiar długości produktów amplifikacji przeprowadzono w odniesieniu do wewnętrzny standardu długości Fluorescent Ladder CXR 60–400 Bases (Promega) przy pomocy programu komputerowego ABI Prism GeneScan Analysis 2.1. Genotypowanie przeprowadzono w oparciu o wyniki pomiarów długości produktów amplifikacji w odniesieniu do drabin allelicznych przy użyciu programu komputerowego ABI Prism Genotyper 2.0. Obliczenia szansy ojcostwa PI (Paternity Index) oraz prawdopodobieństwa ojcostwa (Paternity Probability) wykonano w oparciu o częstości alleliczne w poszczególnych loci oznaczone dla populacji polskiej regionu pomorsko-kujawskiego (9) przy pomocy programu komputerowego „Serolog” (3).

WYNIKI

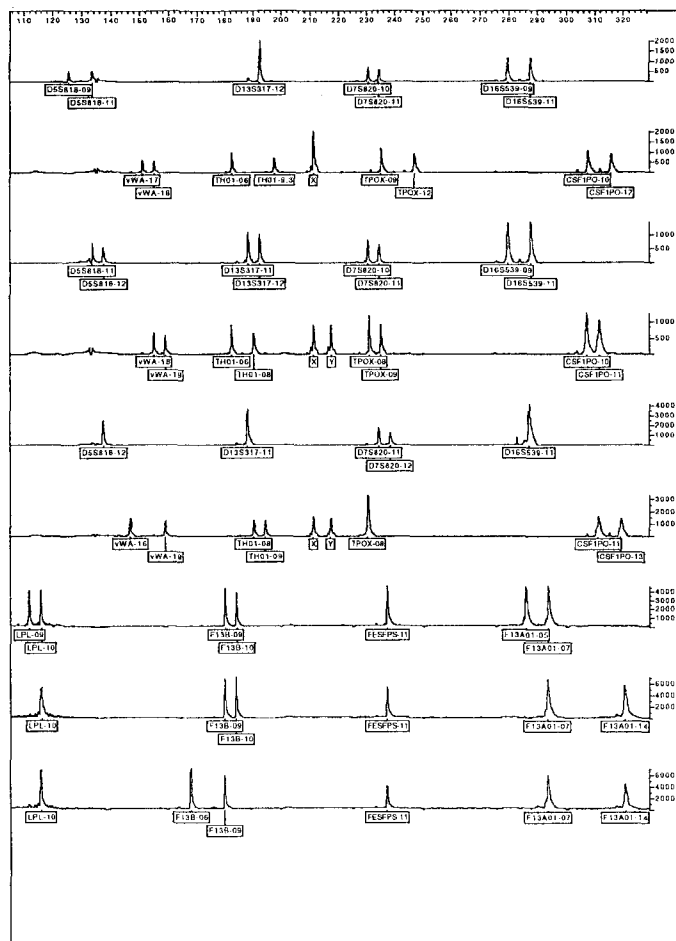
Przykładowy profil analizy 12 loci STR matki, dziecka i domniemanego ojca przedstawia rycina 1.

We wszystkich 51 przypadkach, w których ojcostwo potwierdzono w analizie wielopunktowej oraz w analizie loci VNTR uzyskano również potwierdzenie ojcostwa w analizie loci STR. Najniższa obserwowana wartość szansy ojcostwa PI – wynosiła 421.5, prawdopodobieństwo ojcostwa P wynosiło w tym przypadku 0.99763313. Najwyższa uzyskana szansa ojcostwa PI miała wartość 6587623.78 a prawdopodobieństwo ojcostwa odpowiednio $P = 0.99999985$. Średnia wartość PI oraz P w przypadkach potwierżeń ojcostwa w analizie polimorfizmu liczby powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych wynosiła dla analizowanej grupy $PI = 354763.32$, $P = 0.999842$. W 40 przypadkach (78.4%) uzyskano wartość prawdopodobieństwa ojcostwa P wyższą od 0.9999, w 6 przypadkach (11.8%) prawdopodobieństwo ojcostwa wahała się w granicach 0.999 – 0.9999, zaś w 5 przypadkach (9.8%) było niższe od 0.999. W przypadku analizy spornego ojcostwa wykonywanym po śmierci domniemanego ojca uzyskano potwierdzenie ojcostwa z wartościami $PI = 5744,71$ i $P = 0,99982596$.

We wszystkich 13 przypadkach, w których ojcostwo wykluczono na podstawie analizy wielopunktowej oraz analizy loci VNTR, również w analizie badanych loci STR uzyskano wykluczenie ojcostwa. W 2 przypadkach ojcostwo wykluczono na podstawie niezgodności genotypów w badanej trójce w 3 loci, w 2 przypadkach podstawą wykluczenia była niezgodność w 5 loci, w 5 przypadkach – w 6 loci, w 3 przypadkach w 7 loci i w jednym przypadku – w 9 loci STR.

DYSKUSJA

Przedstawione wyniki wskazują, że analiza polimorfizmu liczby powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych może znaleźć szerokie zastosowanie w badaniach genetycznych przeprowadzanych dla celów rozstrzygnięcia spornego ojcostwa. Za



Ryc. 1. Przykład analizy 12 loci DNA – STR w trójce matka – dziecko – domniemany ojciec. Analiza 8 loci STR: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 oraz genu AMG (płeć) z wykorzystaniem multipleksu „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”, 1 – matka, 2 – dziecko, 3 – domniemany ojciec. Analiza 4 loci STR: F13A01, FESFPS, F13B, i LPL z wykorzystaniem multipleksu „GenePrint FFFL Fluorescent STR System” w tej samej trójce: 4 – matka, 5 – dziecko, 6 – domniemany ojciec.

Fig. 1. Sample of analysis of 12 STR loci in trio mother, children and putative father. Analysis of 8 STR loci: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 and amelogenin gene was done using „GenePrint PowerPlex 1.2 Fluorescent STR System”, 1 – mother, 2 – children, 3 – putative father. Analysis of 4 STR loci: F13A01, FESFPS, F13B and LPL gene was done using „GenePrint FFFL Fluorescent STR System”: 4 – mother, 5 – children, 6 – putative father.

wprowadzeniem tego typu analiz do praktyki laboratoryjnej przemawiają następujące przesłanki:

- typowanie genetyczne polimorfizmu loci STR oparte o enzymatyczną amplifikację metodą PCR wymaga niewielkiej ilości DNA (nawet 1–2 ng na reakcję), dlatego możliwe jest pobieranie minimalnych ilości krwi obwodowej lub wymazów polikowych czy innych wydzielin np. śliny,
- odpowiednia optymalizacja stosowanych procedur badawczych zapewnia bardzo wysoką wierność i powtarzalność otrzymywanych wyników a także możliwość ich porównywania międzylaboratoryjnego,
- analiza loci STR umożliwia znaczną, w porównaniu do obecnie stosowanych metod, redukcję kosztów i skrócenie procesu analizy i opiniowania,

Analiza polimorfizmu loci STR w niektórych przypadkach może być jedyną dostępną metodą badań, pozwalającą na rozstrzygnięcie kwestii spornego ojcostwa, jak to ma miejsce w przypadku, gdy któraś ze stron nie żyje a do dyspozycji pozostają fragmenty tkanek zabezpieczonych w toku badań histopatologicznych lub krew zasuszona z sekcji zwłok.

Na kanwie uzyskanych wyników warto zauważyć, że jakkolwiek średnia wartość szansy ojcostwa PI obliczanej na podstawie analizy 12 loci STR wynosi 354763.32 a prawdopodobieństwo ojcostwa P wynosi 0.999842, to jednak najmniejsze PI i P, uzyskane w opisywanych badaniach wyniosły odpowiednio 421.5 i 0.99763313. Wskazuje to na konieczność arbitralnego przyjęcia pewnej minimalnej wartości współczynników P i PI, które byłyby wystarczające dla rozstrzygnięcia spornego ojcostwa. Ustalenia Komisji Hemogenetyki Sądowej z grudnia 1998 w sprawie zakresu badań DNA określające, że o ile wykonuje się je w zakresie układów jednolocusowych DNA, należy oznaczyć co najmniej 11 układów DNA a minimalne prawdopodobieństwo powinno osiągnąć poziom 99.999 wydają się rozstrzygać ten problem. Tak wysoki stopień prawdopodobieństwa jak powyżej, który upoważniałby do stosowania słownej interpretacji prawdopodobieństwa „graniczącego z pewnością powinien też dotyczyć nie tylko stosunkowo nowych metod badań polimorfizmu loci STR ale również rozstrzygnięcia spornego ojcostwa w toku badań polimorfizmu loci VNTR, tak metodami hybrydizacyjnymi jak i za pomocą techniki PCR. Następnym logicznym wnioskiem wydaje się konieczność indywidualizacji zakresu badań. Jak wskazują przedstawione powyżej wyniki analiza 12 loci STR w znakomitej większości przypadków pozwala na uzyskanie prawdopodobieństwa ojcostwa P powyżej 0,9999. W pozostałych przypadkach zwiększenie wartości prawdopodobieństwa ojcostwa P można osiągnąć analizując dodatkowo 2–3 loci STR, co ułatwiają nowo wprowadzone zestawy multipleksowe, pozwalające na rozszerzenie badań o analizę loci D21S11, D18S51, D8S1179, D3S1358, FGA i Penta E („GenePrint PowerPlex 2.1 Fluorescent STR System”, Promega Co.) czy D21S11, D18S51, D8S1179, D3S1358, FGA, D2S1338 i D19S433 („AmpF/STR SGM Plus” Perkin Elmer). Powyższe konkluzje należy rozszerzyć na inne badania genetyczne wykonywane w sprawach dochodzenia ojcostwa i poczynić pewne spostrzeżenia natury metodologicznej. Można bowiem zwiększać zakres prowadzonych badań, zbliżając się do wartości prawdopodobieństwa 1. Jednak prawdopodobieństwo ojcostwa równe 1 wynikające z badań genetycznych jest platońską ideą,

nieosiągalną i nierealną, bowiem nawet określenie całej sekwencji genomów matki, dziecka i domniemanego ojca, ze względu na procesy rekombinacji genetycznej oraz spontanicznych mutacji nie pozwoli na określenie prawdopodobieństwa ojcostwa równego 1 (będzie ono nieskończenie bliskie 1). Osobnego podejścia wymagałyby jednak nietypowe sprawy dochodzenia ojcostwa w przypadkach gdy matka i domniemany ojciec są ze sobą blisko spokrewnieni.

Rozstrzygnięcie spornego ojcostwa w oparciu o analizę polimorfizmu ilości powtórzeń sekwencji mikrosatelitarnych wymaga jeszcze intensywnych badań, lecz może w niedalekiej przyszłości zmienić oblicze tej dziedziny badawczej.

PIŚMIENICTWO

1. Armour J.A., Povey S., Jeremiah S., Jeffreys A.J., „Systematic cloning of human minisatellites from ordered array charomid libraries”, *Genomics*, 1990, 8, 19 – 32;
2. Armour J.A., Wong Z., Wilson V., Royle N.J., Jeffreys A.J., „Sequences flanking the repeat arrays of human minisatellites: association with tandem and dispersed repeat elements”, *Nucleic Acids Res.*, 1989, 17, 4925 – 4935;
3. Berent J.A., Miścicka-Śliwka D., „Algorytm do obliczeń prawdopodobieństwa ojcostwa dla układów dyskretnych i jego praktyczna realizacja”, *Postępy Medycyny Sądowej i Kryminologii*, 1997, 3, 301 – 314;
4. Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T., „DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats”, *Am. J. Hum. Genet.*, 1991, 49, 746 – 756;
5. Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J., „Forensic application of DNA „fingerprints”, *Nature*, 1985, 318, 577 – 579;
6. Jeffreys A.J., MacLeod A., Neumann R., Povey S., Royle N.J., „Major minisatellite loci” detected by minisatellite clones 33.6 and 33.15 correspond to the cognate loci D1S111 and D7S437”, *Genomics*, 1990, 7, 449 – 452;
7. Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L., „Hypervariable „minisatellite” regions in human DNA”, *Nature*, 1985, 314, 67 – 73;
8. Lins A.M., Sprecher C.J., Puers C., Schumm J.W., „Multiplex sets for the amplification of polymorphic short tandem repeat loci – silver stain and fluorescence detection”, *BioTechniques*, 1996, 20, 882 – 889;
9. Miścicka-Śliwka D., Czarny J., Grzybowski T., Woźniak M., „Population genetics of 14 STR-s: vWA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, F13A01, FESFPS, F13B, LPL, D3S1358 and FGA in the Pomerania-Kujawy region of Poland”, *Progress in Forensic Genetics* 7, 1998, 261 – 263;
10. Nakamura Y., Gillian S., O’Connell P., Leppert M., Lathrop G.M., Lalouel J.M., White R., „Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence pYNH24 on chromosome 2 (D2S44)”, *Nucleic Acids Res.*, 1987, 15, 10073.
11. Ricciardone M.D., Lins A.M., Schumm J.W., Holland M.M., „Multiplex systems for the amplification of short tandem repeat loci: evaluation of laser fluorescence detection”, *BioTechniques*, 1997, 23, 742–747;
12. Royle N.J., Armour J.A., Webb M., Thomas A., Jeffreys A.J., „A hypervariable locus D16S309 located at the distal end of 16p.”, *Nucleic Acids Res.*, 1992, 20, 1164;
13. Royle N.J., Clarkson R.E., Wong Z., Jeffreys A.J., „Clustering of hypervariable minisatellites in the proterminal regions of human autosomes”, *Genomics*,

1988, 3, 352 – 360; 14. Sprecher C.J., Puers C., Lins A.M., Schumm J.W., „General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci”, *BioTechniques*, 1996, 20, 266 – 276; 15. Wong Z., Wilson V., Patel I., Povey S., Jeffreys A.J., „Charecterization of a panel of highly variable minisatellites cloned from human DNA”, *Ann. Hum. Genet.*, 1987, 51, 269 – 288.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz

IV OGOLNOPOLSKIE SYMOZJUM NAUKOWE

„Przestępstwa przeciwko życiu i zdrowiu”

7–8 września 2000 r. – Łódź

Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii – Oddział w Łodzi.
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej w Łodzi
Zakład Medycyny Sądowej WAM w Łodzi

Program Sympozjum

Sesja I

Przestępstwa przeciwko życiu – aspekty prawno-medyczne

Sesja II

Postęp w serohematologii w dochodzeniu przestępstw przeciwko życiu

Sesja III

Uszczerbek na zdrowiu – problemy w sprawach karnych

Sesja IV

Uszczerbek na zdrowiu – problemy w sprawach cywilnych i ubezpieczeniowych

Zgłoszenie uczestnictwa do 15 marca 2000 r.

Adres Biura Organizacyjnego
Izba Międzynarodowej Współpracy Gospodarczej i Naukowej
Łódź ul. Piotrowska 272 B
Tel. +(42) 681 66 21, tel/fax 681 96 66, fax + (42) 684 87 22

Marcin Woźniak, Tomasz Grzybowski, Danuta Miścicka-Śliwka, Jakub Czarny

Ocena dokładności i powtarzalności pomiarów długości fragmentów DNA na sekwenatorze A.L.F.*

Analysis of accuracy and repetitiveness of DNA fragment length determination on the A.L.F. DNA sequencer

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Niniejsza praca ma na celu omówienie systemu detekcji i analizy produktów PCR z wykorzystaniem sekwenatora A.L.F. Badanie polimorfizmu DNA z użyciem markerów mikrosatelitarnych i reakcji PCR wymaga precyzyjnego określenia wielkości produktów amplifikacji. Najdokładniejszymi systemami określania długości fragmentów DNA są te, które opierają się na detekcji laserowej i automatycznej analizie produktów (sekwenatory DNA). Przeprowadzono szereg porównań powtarzalności pomiarów długości na sekwenatorze A.L.F. dla zestawu fragmentów DNA zarówno w obrębie jednego żelu jak i między żelami. Analizie poddano produkty PCR układów D1S103, HUMTH01, D21S11, D18S51 i FGA. Największa różnica między dwoma oznaczeniami wielkości tego samego fragmentu na różnych żelach wynosiła 1,9 pz.

This report describes the A.L.F. hardware platform for detection and analysis of PCR products. The development of STR based DNA profiling systems requires precise measurement of product length amplification. Of the equipment available automated DNA sequencers have been proven to provide the most accurate data on DNA fragment length. We have performed a set of experiments to examine the reproducibility of DNA fragments sizing using the A.L.F. sequencer both on one gel and between gels. The fragments analyzed were PCR products of the D1S103, HUMTH01, D21S11, D18S51 and FGA loci. The largest difference in estimated size of the same fragment on separate gels did not exceeded 1,9 bp for the longest fragments analyzed.

Słowa kluczowe: pomiar długości fragmentów DNA, elektroforeza, produkty PCR

Key words: DNA length fragment measurement, electrophoresis, PCR products

* Pracę wykonano w ramach projektu badawczego Nr 4 PO 5A 09816 finansowanego przez Komitet Badań Naukowych w latach 1999–2000.

WSTĘP

Analiza polimorfizmu układów mikrosatelitarnych (STR) jest obecnie w centrum zainteresowania wielu specjalistów zajmujących się genetyczną identyfikacją materiału biologicznego (1–3). Zamplifikowane metodą PCR fragmenty genomowego DNA zawierające sekwencje mikrosatelitarne są zwykle poddawane elektroforezie i uwidaczniane przy pomocy metod manualnych (4–6). Coraz większą popularność zdobywają jednakże metody automatycznej analizy wielkości fragmentów DNA (7–9). Dokładne poznanie wad i zalet tych metod leży u podstaw ich zastosowania w hemogenetyce sądowej.

W niniejszym artykule omówiono wyniki eksperymentów mających na celu ustalenie powtarzalności pomiarów wielkości fragmentów DNA na jednym z używanych w naszym Zakładzie sekwenatorów – A.L.F. (Pharmacia). Do pomiarów użyto fragmenty otrzymane w reakcji heksapleksowej amplifikacji loci STR i fragment genu amelogeniny (10), który posłużył jako wewnętrzny marker długości.

MATERIAŁY I METODY

Do amplifikacji użyto DNA wyizolowany ze świeżej krwi obwodowej standardową metodą ekstrakcji fenolowej. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 1x PCR buffer (Promega), 1.5 mM MgCl₂ (Promega), 200 μM dNTPs (Promega), 1.25 U polimerazy Taq (Promega) na 50 μL reakcji, startery amplifikujące następujące układy STR: D1S103 (stężenie starterów 0.4 μM), HUMTH01 (0.2 μM), D21S11 (0.25 μM), D18S51 (0.14 μM), FGA (0.2 μM) startery amplifikujące fragment genu amelogeniny (0.14 μM) oraz 10 ng genomowego DNA. Amplifikację prowadzono na termocyklerze GenAmp 9600 (Perkin Elmer) przy następujących warunkach termicznych: wstępna denaturacja 93°C 1 min, 30 cykli 93°C 15 sek., 58°C 75 sek., 72°C 30 sek, końcowa elongacja 72°C 10 min. 0.5 μL produktu PCR mieszano z barwnikiem obciążającym i nakładano do kieszonek 5.7 % denaturującego żelu poliakrylamidowego (8M mocznik). Elektroforezę prowadzono na aparacie A.L.F. (Pharmacia) przy napięciu 1500V, mocy 45 W, mocy lasera 3 mW. Temperaturę żelu ustalono na 40°C. Dane zbierano przy użyciu oprogramowania A.L.F. Manager pracującego na platformie OS/2 v 2.1.

Każdą zamplifikowaną próbkę poddano elektroforezie w trzech niezależnych żelach poliakrylamidowych. Pomiarów długości fragmentów dokonywano przy pomocy zewnętrznego (Sizer 50–500, Pharmacia) i wewnętrznego standardu. Standardem wewnętrznym był krótszy produkt amplifikacji genu amelogeniny (106 p.z.). Wykorzystano oprogramowanie Fragment Manager™ ver. 1.1 (Pharmacia) (Tabela II).

Ogółem przeprowadzono elektroforezę produktów 16 amplifikacji multipleksowych i zmierzono długość 145 fragmentów DNA. Pomiarów powtarzalności oznaczania długości fragmentów DNA przeprowadzono porównując wyniki oznaczania długości na jednym z żeli z wynikami z dwóch pozostałych. Ponieważ

produkty jednej amplifikacji były nakładane do różnych kieszonek każdego żelu, możliwe było również określenie powtarzalności oznaczania długości fragmentów w obrębie tego samego żelu.

Porównania międzyżelowe przeprowadzono w ten sposób, że pomiary długości dla fragmentów DNA z danej próbki porównywano z pomiarami dla tej samej próbki otrzymanymi z dwóch pozostałych żeli, obliczano średnią różnicę pomiaru i określano maksymalną różnicę pomiarów. Następnie tę samą procedurę przeprowadzono kolejno dla próbek z kolejnych żeli. Dokładność pomiarów dla próbek poddawanych analizie na jednym żelu prowadzono analogicznie, wykorzystując pomiary fragmentów z określonej próbki poddanej elektroforezie w różnych liniach jednego żelu.

WYNIKI I OMÓWIENIE

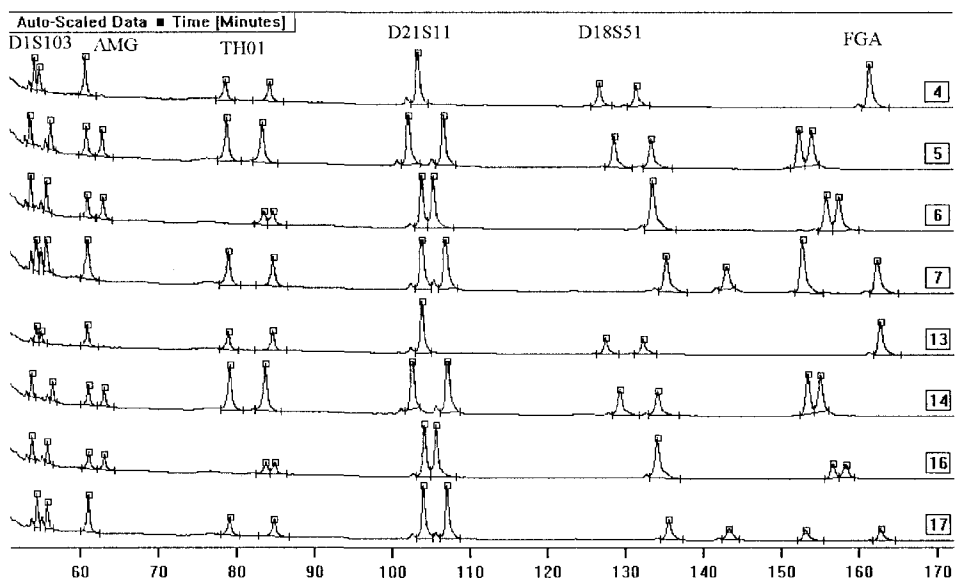
Badanie każdej próbki na trzech niezależnych żelach pozwoliło na obliczenie wielkości fragmentów DNA dla każdego locus. Przykładowy elektroforegram przedstawiono na Ryc. 1 a w Tabeli I zaprezentowano wyniki pomiarów fragmentów DNA w jednej z badanych próbek.

Tabela I. Przykładowe wyniki pomiaru długości fragmentów w p.z. DNA 5 loci mikrosatelitarnych i fragmentu genu amelogeniny dla jednej z badanych próbek

Table I. An example of DNA fragment length measurements in bp. in 5 STR loci and amelogenin locus for one of the analyzed samples.

Locus	pierwsza elektroforeza	Druga elektroforeza	trzecia elektroforeza
D1S103	86.2	86.3	86.3
	89.8	89.8	89.8
AMG	106	106	106
	112,1	112,1	112,2
TH01	157.9	157.9	158.3
	173.6	173.6	174.1
D21S11	220.0	220.0	221.0
	230.0	229.8	231.0
D18S51	290.7	290.9	292.0
	307.0	307.2	308.3
FGA	351,9	352,5	352,9
	355,9	356,5	357,0

Na podstawie wyników cząstkowych, uzyskanych dla każdej z badanych próbek, obliczono szereg parametrów, charakteryzujących powtarzalność wyników, takich jak średnia i największa różnica w obliczeniach wielkości fragmentów pomiędzy próbkami analizowanymi na tym samym żelu oraz na różnych żelach. Szczegółowe dane zawarto w Tabeli II.



Ryc 1. Przykładowy elektroforegram produktów multipleksowego PCR użytych do określenia powtarzalności pomiarów długości na sekwenatorze A.L.F. Linie 4 i 13 zawierają produkty różnych reakcji PCR z jednej próbki DNA (fragmenty o jednakowej długości), podobnie jak linie 5 i 14, 6 i 16 oraz 7 i 17

Fig. 1. An electrophoregram of multiplex PCR products used for the assessment of fragment length measuring accuracy on A.L.F. sequencer. Lanes 4 and 13 contain the products of different amplification reactions from one DNA sample (fragments of the same length) similarly as lanes 5 and 14, 6 and 16 or 7 and 17.

Przeprowadzona analiza wykazała, że powtarzalność oznaczania wielkości fragmentów DNA na sekwenatorze A.L.F. zależy od ich wielkości i wynosi dla poszczególnych loci od 0.1 p.z. dla locus D1S103 do 1.3 p.z. dla locus FGA z maksymalną różnicą wynoszącą odpowiednio 0.4 i 1.9 p.z. W większości przypadków jest to powtarzalność dostateczna dla niedwuznacznej identyfikacji fragmentów różniących się długością o co najmniej 2 p.z., nawet, jeśli pomiary pochodzą z dwóch niezależnych elektroforez. W obrębie tego samego żelu powtarzalność oznaczania długości fragmentów wynosiła zależnie od badanego locus 0.1 do 0.5 p.z przy maksymalnym odchyleniu sięgającym 1.1 p.z dla najdłuższych alleli genu FGA. Należy zwrócić uwagę na fakt, że na powtarzalność pomiarów długości fragmentów DNA ma wpływ wiele czynników takich jak jednakowa temperatura polimeryzacji żeli poliakrylamidowych czy bliskość linii badanej próbki i zewnętrznego markera wielkości. Powtarzalność pomiarów może być obniżona, gdy badane próbki migrują blisko skraju żelu (nałożone są do skrajnych kieszonek). Wyniki powyższe sugerują, że zastosowanie automatycznej analizy wielkości fragmentów DNA umożliwi porównywanie między sobą

próbek, które były analizowane w różnym czasie, nawet bez konieczności stosowania drabin allelicznych, pod warunkiem zachowania możliwie jednakowych warunków procesu przygotowania i przebiegu elektroforezy. Warunkiem poprawności wyników otrzymanych w procesie takiej analizy jest jednak zastosowanie loci STR, których allele różnią się długością o co najmniej 4 p.z., oraz przeprowadzenie co najmniej dwóch niezależnych elektroforez każdej zamplifikowanej próbki. Szczególną ostrożność przy interpretacji wyników należy zachować, gdy pomiar długości fragmentów sugeruje występowanie interalleli. Często konieczne jest wówczas porównanie długości fragmentów DNA występujących w badanych próbkach przez przeprowadzenie elektroforezy w sąsiadujących liniach jednego żelu.

Tabela II. Zestawienie parametrów charakteryzujących powtarzalność pomiarów badanych fragmentów DNA. Oznaczenia kolumn: A – badane locus, B – ilość zmierzonych fragmentów, C – zakres długości fragmentów w danym locus, D – średnia różnica pomiarów długości tego samego fragmentu na niezależnych żelach, E – największa zmierzona różnica pomiaru długości tego samego fragmentu na niezależnych żelach, F – średnia różnica pomiarów długości tego samego fragmentu na jednym żelu, G – największa różnica określenia długości tego samego fragmentu na jednym żelu.

Table II. The parameters describing repetitiveness of size measurements for DNA fragments investigated. Consecutive columns contain: A – the name of the locus, B – the number of fragments measured, C – size range of fragments, D – mean difference of size measurements of one fragment between gels, E – the greatest difference of size measurements of one fragment between gels, F – mean difference of size measurements of one fragment in one gel, G – the greatest difference of size measurements of one fragment in one gel.

A	B	C	D	E	F	G
HUMD1S103	29	81–103	0.12	0.4	0.10	0.21
HUMTH01	27	154–178	0.35	1.1	0.25	0.43
HUMD21S11	31	205–249	0.59	1.5	0.34	0.55
HUMD18S51	30	275–323	1.09	1.7	0.41	0.58
FGA	28	340–376	1.3	1.9	0.53	0.71

Wyniki badań wskazują także jednoznacznie, że dla krótkich fragmentów DNA powtarzalność oznaczania długości jest znacznie większa niż dla fragmentów dłuższych. Pozwala to na zastosowanie w automatycznej analizie długości fragmentów loci STR o powtórzeniach 2 lub 3 p.z. pod warunkiem, że produkty PCR z takiego loci są stosunkowo krótkie (do 200 p.z.). Możliwość taką wykazano na podstawie analizy powtarzalności pomiarów długości cząstek DNA otrzymanych z amplifikacji locus D1S103 posiadającego jednostkę repetytywną 2 p.z.

PODSUMOWANIE

Powtarzalność oznaczania długości fragmentów DNA przy pomocy automatycznego sekwenatora DNA A.L.F. firmy Pharmacia jest wystarczająca dla analizy loci STR zawierających powtórzenia o jednostce wielkości co najmniej 2 p.z. Wykazano również że powtarzalność oznaczania długości fragmentów DNA jest funkcją ich długości i jest największa dla fragmentów liczących poniżej 200 p.z.

PIŚMIENNICTWO

1. Claes R, *Mini- and Microsatellites.*, *Env. Health Prespect.*, 1997, 105, 781–789. – 2. Benecke M., *DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey.*, *Naturwissenschaften*, 1997, 84, 181–188. – 3. Pena S., Chakraborty R., *Paternity testing in the DNA era.*, *Trends in Genomics*, 1994, 10, 204–209. – 4. Hammond H. A., Jin L., Zhong Y., Caskey T., Chakraborty R., *Evaluation of 13 Short Tandem Repeat Loci for Use in Personal Identification Applications.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, 55, 175 – 189. – 5. Jeffreys A., Allen M. J., Hagelberg E., Sonnberg A., *Identification of the Skeletal Remains of Josef Mengele by DNA Analysis.*, *Forensic Science International*, 1992, 56, 65 – 76. – 6. Lins A. M., Sprecher C. J., Puers C., Schumm J., *Multiplex Sets for the Amplification of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci – Silver Stain and Fluorescence Detection.*, *BioTechniques*, 1996, 20, 882 – 889. – 7. Oetting W. S., Lee H. K., Flanders D. J., Wiesner G. L., Sellers T. A., King R. A., *Linkage Analysis with Multiplexed Short Tandem Repeat Polymorphisms Using Infrared Fluorescence and M13 Tailed Primers.*, *Genomics*, 1995, 30, 450 – 458. – 8. Ziegler J. S., Su Y., Corcoran K. P., Nie L., Mayrand P. E., Hoff L. B., McBride L. J., Kronick M. N., Diehl S., *Application of Automated DNA Sizing Technology for Genotyping Microsatellite Loci.*, *Genomics*, 1992, 14, 1026 – 1031. – 9. Sullivan K. M., Pope S., Gill P., Robertson J. M., *Automated DNA Profiling by Fluorescent Labeling of PCR Products.*, *PCR methods and applications*, 1992, 2, 34–40. – 10. Miścicka-Śliwka D., Grzybowski T., Woźniak M., *Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci.*, *Electrophoresis*, 1997, 9, 1627 – 1632

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85–094 Bydgoszcz

**Tomasz Grzybowski, Danuta Miścicka-Śliwka,
Marcin Woźniak, Jakub Czarny**

Ograniczenia reakcji PCR i ich konsekwencje dla automatycznej analizy loci mikrosatelitarnych

Limitations of the PCR reaction: implications for automated analysis of microsatellites

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Praca niniejsza koncentruje się na najczęściej występujących błędach reakcji PCR mogących wpływać na wyniki automatycznej analizy fragmentów DNA. Omówiono i zinterpretowano efekty charakterystyczne dla „poślizgu” enzymu, włączenia dodatkowych nukleotydów na końcu 3' produktu PCR oraz degradacji wyjściowej matrycy. Na podstawie własnych doświadczeń z automatyczną analizą produktów heksapleksowej reakcji PCR loci mikrosatelitarnych zaproponowano uniwersalne reguły interpretacji pozwalające na szybkie wyeliminowanie obserwowanych błędów.

This paper presents the most frequent errors introduced during PCR amplifications which may influence automated DNA fragment analysis. We will discuss and interpret the effects characteristic for enzyme slippage, non-template nucleotide additions and template degradation. On the basis of our experience with hexaplex STR PCR reactions, we will propose some principles which can be universally applied to interpretation of errors and help to solve amplification problems.

Słowa kluczowe: reakcja PCR, loci STR, analiza multipleksowa
Key words: PCR reaction, STR loci, multiplex analysis

WSTĘP

Odkąd reakcja PCR stała się rutynowo stosowaną techniką badania polimorfizmu DNA w hemogenetyce sądowej, wzrosło również zainteresowanie możliwymi ograniczeniami reakcji amplifikacji oraz ich konsekwencjami dla opiniowania w sprawach sądowo-lekarskich. Błąd w reakcji PCR jest pojęciem dość szerokim, toteż konieczne jest poczynienie w tym zakresie kilku istotnych rozróżnień, opartych w głównej mierze na źródłach obserwowanych błędów.

Pierwsza grupa błędów obejmuje wszystkie niepożądane efekty wynikające z niedostatecznej optymalizacji zarówno samej reakcji PCR (niewłaściwy dobór stężeń substratów, parametrów temperaturowych, ilości cykli itd.), jak i analizy jej produktów (niewłaściwy system elektroforetyczny i system detekcji). Wspomniana grupa błędów zawinionych przez badacza nie jest przedmiotem niniejszego studium. Następna grupa obejmuje błędy będące wynikiem konstytutywnych właściwości enzymu stosowanego w reakcji PCR. Ten typ błędów („poślizg” – ang. *slippage* polimerazy prowadzący do powstawania dodatkowych produktów oraz włączanie dodatkowej zasady na końcu 3') stanowi właściwe ograniczenie techniki i jako taki jest przedmiotem niniejszej pracy. Właściwości matryc DNA leżą u podstaw ostatniej grupy omawianych błędów. Niezawiniona przez badacza silna degradacja genomowego DNA ze śladów biologicznych mogąca prowadzić do preferencyjnej amplifikacji mniejszych fragmentów i związanego z tym „wypadania” alleli (ang. *allelic drop-out*) stanowi z pewnością istotne ograniczenie techniki PCR, z istotnym wpływem na opiniowanie w sprawach sądowo-lekarskich.

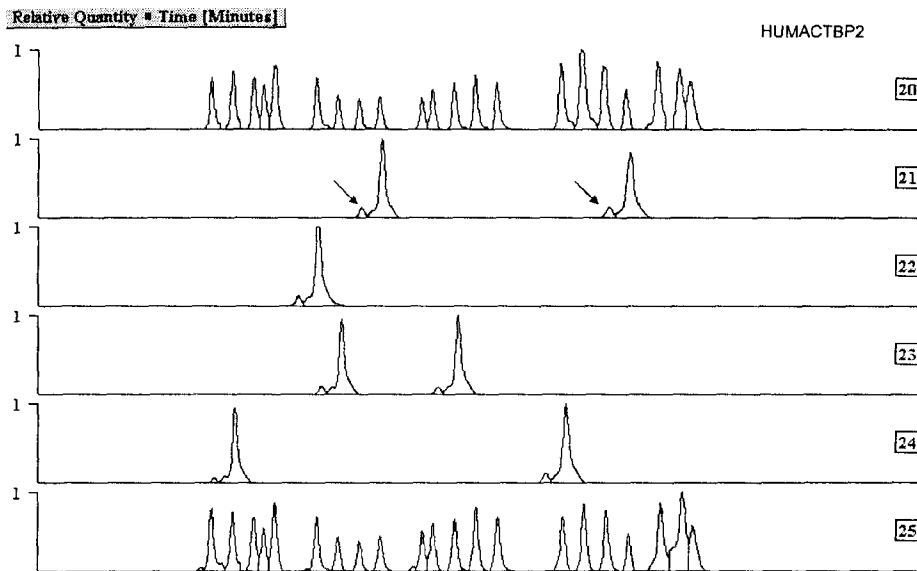
MATERIAŁY I METODY

Pracę zilustrowano przykładami pochodzącymi z przeprowadzanych w naszym Zakładzie rutynowych badań polimorfizmu DNA z wykorzystaniem heksapleksowej reakcji PCR obejmującej układy: D1S103; AMG X/Y; HUMTHO1; D21S11; D18S51; HUMFIBRA, oraz reakcji amplifikacji DNA locus HUMACTBP2. Amplifikację oraz rozdział elektroforetyczny produktów PCR przeprowadzono zgodnie z procedurą przedstawioną w pracach Miścickiej-Śliwki i wsp. (6) oraz Miścickiej-Śliwki i Grzybowskiego (5).

WYNIKI I DYSKUSJA

„Poślizg” enzymu

Najczęściej obserwowanym błędem reakcji PCR wynikającym z konstytutywnych właściwości enzymu był tzw. „poślizg” (ang. *slippage*) termostabilnej polimerazy prowadzący do powstawania produktu krótszego od właściwego o wielokrotność 2 p.z. (ang. *stutter peak*). Zjawisko to jest dobrze zauważalne przy zastosowaniu automatycznych strategii detekcji produktów (2). Wysokość artefaktowych pików była zależna przede wszystkim od ilości matrycy użytej w reakcji PCR. W przypadku produktów locus HUMACTBP2 wysokość dodatkowego pliku dochodziła do ok. 10 % wysokości pliku właściwego przy zastosowaniu w reakcji PCR 20 ng wyjściowej matrycy (Ryc. 1). Stopniowe zmniejszanie stężenia matrycy (do ok. 5 ng) doprowadziło do całkowitego wyeliminowania niepożądanych produktów.

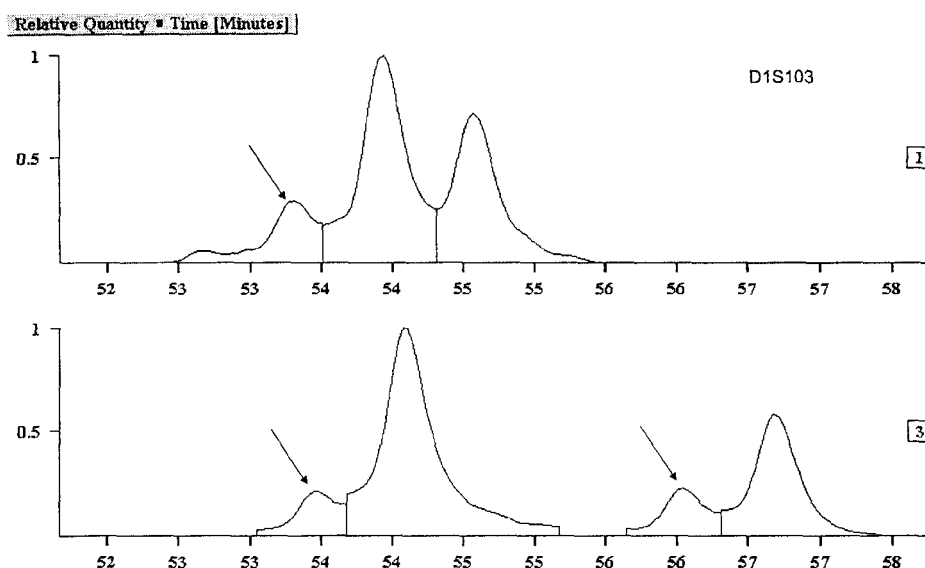


Ryc. 1. Analiza ilościowa dodatkowych produktów będących wynikiem „poślizgu” polimerazy (wskazanych strzałkami w linii 21), które towarzyszyły amplifikacji locus HUMACTBP2. Wysokość dodatkowych pików rzadko przekraczała 10% wysokości pików pochodzących od właściwych alleli.

Fig. 1. Quantitative analysis of the ACTBP2 stutter peaks (indicated by arrows in lane 21). Under standard amplification conditions, stutter bands were rarely greater than 10% of the peak height of the allele peak.

Wszystkie dodatkowe piki wspomnianego locus HUMACTBP2 powstające dzięki poślizgowi enzymu różniły się od pików właściwych liczbą par zasad stanowiącą podstawową jednostkę repetytywną, tj. 4 p.z. Identyczne zjawisko obserwowano podczas analizy produktów układów reakcji multipleksowej (HUMTHO1, D21S11, D18S51, HUMFIBRA). Zarówno wielkość produktu, jak i intensywność dodatkowego sygnału nie wydają się zatem być istotnym ograniczeniem reakcji PCR w przypadku zastosowania markerów mikrosatelitarnych o powtórzeniach czteronukleotydowych. W reakcji heksapleksowej występuje jednakże układ D1S103 o powtórzeniach dwunukleotydowych (CA) (9). W tym przypadku analiza dodatkowych pików następuje nieco więcej trudności. Po pierwsze, wysokość omawianych pików dochodzi w niektórych przypadkach do 30–40 % wysokości pików pochodzących od właściwych alleli (Ryc. 2). Po drugie, chociaż dodatkowe produkty różnią się od właściwych o 2 p.z., to wąski zakres wielkości wszystkich 11 alleli D15103 (82–102 p.z.) może w niektórych przypadkach utrudniać przypisanie właściwych alleli badanej osobie – zwłaszcza, kiedy różnią się one o 2 p.z. Wspomniane problemy są z pewnością istotnym ograniczeniem zastosowania markerów dwunukleotydowych gdy dysponuje się jedynie manualnymi metodami detekcji produktów, jednakże wcale

nie muszą przesądzać o ostatecznej eliminacji tych układów STR – zakładając wykorzystanie automatycznej analizy wielkości alleli. Jeśli rozdział produktów reakcji multipleksowych przeprowadza się w żelu denaturującym na automatycznym sekwenatorze DNA i analizuje przy użyciu programu Fragment Manager, to system ten pozwala na określenie wielkości produktu PCR (przy zastosowaniu zewnętrznego i wewnętrznych standardów wielkości) ze średnią dokładnością do 0.7 p.z. Z naszych eksperymentów wynika, że w konkretnym przypadku markera D1S103 możliwe jest dokładne rozróżnienie pików dodatkowych od właściwych alleli zarówno na podstawie wspomnianej precyzji pomiaru, jak i dostępnej opcji ilościowej analizy produktów. Znajduje to potwierdzenie w obserwacjach Ziegler i wsp. (10), którzy wykazali użyteczność markerów dwunukleotydowych przy zastosowaniu laserowej strategii detekcji i automatycznej analizy produktów reakcji amplifikacji.



Ryc. 2. Analiza dodatkowych produktów (oznaczone strzałkami) towarzyszących amplifikacji locus D1S103. Zjawisko „poślizgu” enzymu jest tu bardziej zauważalne, gdyż sekwencja mikrosatelitarna w locus D1S103 charakteryzuje się powtórzeniami dwunukleotydowymi.

Fig. 2. Analysis of the D1S103 stutter bands (indicated by arrows). D1S103 was more prone to stuttering as a microsatellite locus of dinucleotide repeats.

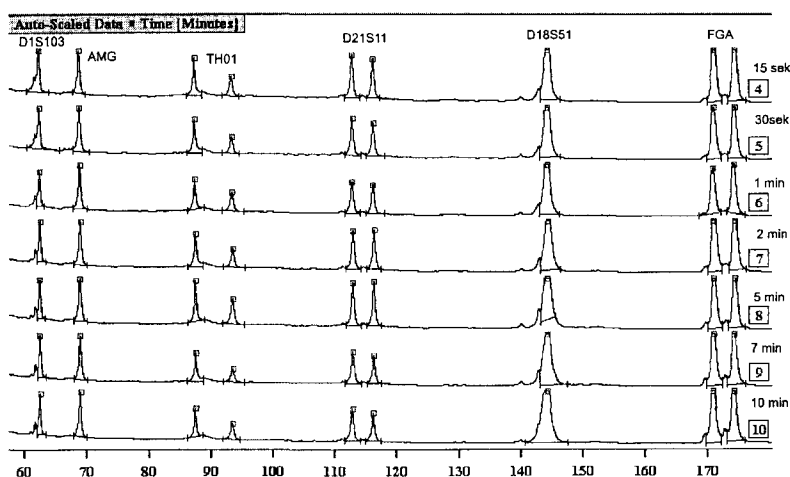
Włączanie dodatkowej zasady na końcu 3'

Włączanie dodatkowej zasady na końcu 3' produktu (zwykle A) jest właściwością niemalże wszystkich reakcji PCR (1). Błąd tego rodzaju jest niewykrywalny przy zastosowaniu manualnych metod rozdziału elektroforetycznego (zwłaszcza w żelach natywnych), często obserwuje się natomiast jego konsekwencje

podczas analizy produktów na automatycznych sekwenatorach DNA (2,4,7). Efektem wspomnianego błędu jest występowanie na elektroforegramach charakterystycznych podwójnych pików (ang. *splitting*). W piśmiennictwie traktującym na temat optymalizacji reakcji PCR dostosowanych do laserowych systemów detekcji produktów, powszechnie stosuje się dla tego zjawiska konwencję zapisu $n/n+1$ (gdzie n jest ilością par zasad właściwego produktu bez dodatkowej zasady na końcu 3') (2,4,7). W przypadku amplifikacji locus HUMACTBP2 wysokość pików $n+1$ może stanowić ok. 120 % wysokości pików n . Stosunek ilościowy produktów $n+1/n$ zależy w głównej mierze od stężenia wolnych kationów Mg^{2+} w reakcji PCR (4). Tak więc zwiększenie stężenia trójfosforanów dezoksyrybonukleozydów prowadzące do obniżenia stężenia wolnych jonów Mg^{2+} prowadzi najczęściej do znaczącej redukcji efektywności włączania dodatkowej zasady na końcu 3'. Z drugiej jednak strony, zastosowanie dNTP w stężeniach powyżej optymalnego poziomu (w tym przypadku 200 μ M) prowadzi do spadku efektywności reakcji PCR jako takiej. Opisany błąd jest specyficzny dla danego locus, a co więcej, z niewyjaśnionych dotąd powodów zależy również od tego, który ze starterów wyznakowany jest barwnikiem fluorescencyjnym. (8). Istnieją co najmniej dwie metody pozwalające na wyeliminowanie produktów $n+1$: wprowadzenie miejsca restrykcyjnego do sekwencji niewyznakowanego startera i wytrawienie krótkiego fragmentu wraz z dodatkową zasadą z jednego końca produktu PCR, lub usunięcie dodatkowej zasady przez strawienie polimerazą T4 (dzięki 3–5' egzonukleazowej aktywności tego enzymu na jednoniciowym DNA) (3). Prostą alternatywą dla tych strategii jest także zaprojektowanie warunków reakcji PCR, aby faworyzowały one włączanie dodatkowej zasady do wszystkich produktów. Metodę wspomnianą zastosowano podczas projektowania reakcji multipleksowej poprzez dodanie po 30 cyklach reakcji piętnastosekundowego okresu elongacji w 72°C. Pozwoliło to na uzyskanie znaczącej przewagi produktów $n+1$ wszystkich loci i uniknięcie podwójnych pików (Ryc. 3).

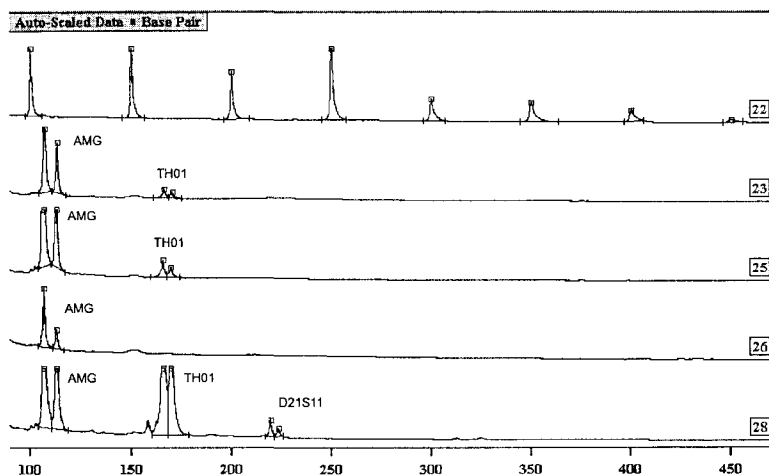
Degradacja matrycy

Silna degradacja wyjściowej matrycy (poniżej 500 pz.) stanowi z pewnością istotny problem przy zastosowaniu reakcji PCR do badania polimorfizmu DNA ze śladów biologicznych. Jest ponadto szczególnie ważnym ograniczeniem przy przeprowadzaniu multipleksowych reakcji PCR. Degradacja matrycy prowadzi najczęściej do znacznego spadku efektywności reakcji jako takiej, lecz przede wszystkim do preferencyjnej amplifikacji mniejszych fragmentów i związanego z tym „wypadania” alleli (ang. *allelic drop-out*). Typowy przykład preferencyjnej amplifikacji pokazuje Ryc. 4, gdzie można zaobserwować spadek efektywności reakcji heksapleksowej wraz ze zwiększaniem się masy cząsteczkowej produktów amplifikowanych loci. W celu uzyskania wyraźnego sygnału pochodzącego od wszystkich oczekiwanych produktów, zwiększano stężenia matrycy w reakcjach multipleksowych do 100–300% (50–150 ng) wraz ze zwiększeniem stężenia odpowiednich par starterów do 50–100%. Zwiększenie



Ryc. 3. Elektroforegram przedstawiający wpływ końcowego okresu elongacji na włączanie dodatkowej zasady na 3' końcu produktów heksapleksowej reakcji PCR. Piętnastosekundowy czas elongacji okazał się zupełnie wystarczający jeśli chodzi o faworyzowanie włączania dodatkowej zasady.

Fig. 3. Effect of a variation in final extension periods (15s – 10 min) on the extra base addition to the blunt ends of the hexaplex PCR products. Extension time of 15s turned out to be completely sufficient to favor the addition of an extra base.



Ryc. 4. Wpływ degradacji matrycy DNA na wydajność heksapleksowej amplifikacji loci STR – amplifikacja loci D21S11, D18S51 i FGA może dawać wynik negatywny.

Fig. 4. Effect of the template DNA degradation on the efficiency of the hexaplex STR amplification. Due to the severe DNA degradation, partial profiles were obtained (D21S11, D18S51 and FGA sometimes fail to amplify).

ilości cykli PCR prowadziło najczęściej do wzrostu poziomu tła oraz pojawiania się produktów niespecyficznych. Silna degradacja matrycy jest jednak problemem towarzyszącym wszystkim rodzajom badań polimorfizmu DNA, nie tylko przy zastosowaniu techniki PCR. Trudno zaprzeczyć, że reakcja PCR wymagająca nanogramowych ilości DNA daje w podobnych okolicznościach większe szanse powodzenia, niż wymagające mikrogramowych ilości wysokocząsteczkowego materiału techniki hybrydyzacyjne.

PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy było omówienie najbardziej charakterystycznych błędów techniki PCR podnoszonych często jako ograniczenia metody w badaniach polimorfizmu DNA. Większość omówionych błędów może pozostać bez znaczącego wpływu na opiniowanie w sprawach sądowo-lekarskich pod warunkiem zastosowania precyzyjnych strategii detekcji i analizy produktów. Automatyczna analiza wielkości fragmentów DNA pozwala na szybkie wykrycie i interpretację ewentualnych błędów reakcji PCR mając w tym względzie znaczącą przewagę nad metodami manualnymi. Wykorzystanie multipleksowych reakcji obejmujących wiele loci mikrosatelitarnych, przystosowanych do detekcji laserowej na sekwenatorach DNA jest już w tej chwili poważną alternatywą dla tradycyjnych metod badania polimorfizmu DNA w oparciu o reakcje amplifikacji pojedynczych loci i manualne techniki rozdziału elektroforetycznego i analizy produktów.

PIŚMIENNICTWO

1. Clark J.M.: *Novel non – template nucleotide addition reaction catalysed by procarvotic and eucaryotic DNA polymerase*. *Nucleic Acids Res* 1988, 16, 9677–9686.
2. Gill P., Kimpton C.P., Urquhart A., Oldroyd N., Millican E.S., Watson S.K., Dowries T.J.: *Automated short tandem repeat (STR) analysis in forensic casework – a strategy for the future*. *Electrophoresis* 1995, 16, 1543–1552.
3. Kimpton C.P., Gill P., Walton A., Urquhart A., Millican E.S., Adams M.: *Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci*. *PCR Methods Applic* 1993, 13–22.
4. Kimpton C., Fisher D., Watson S., Adams M., Urquhart A., Lygo J., Gill P.: *Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci*. *Int J Legal Med* 1994, 106, 302–311.
5. Miścicka-Śliwka D., Grzybowski T.: *High microvariation sequence polymorphism at short tandem repeat loci: human beta-actin related pseudogene as an example*. *Electrophoresis* 1997, 18, 1613–1619.
6. Miścicka-Śliwka D., Grzybowski T., Woźniak M.: *Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci*. *Electrophoresis* 1997, 18, 1627–1632.
7. Robertson J.M., Sgueglia J.B., Badger CA., Juston A.C., Ballantyne J.: *Forensic applications of a rapid,*

sensitive, and precise multiplex analysis of the four short tandem repeat loci HUMVWF31/A, HUMTHO1, HUMF13A1, and HUMFES/FPS. Electrophoresis 1995, 16, 1568–1576. – 8. Urquhart A., Oldroyd N.J., Kimpton C.P., Gill P.: *Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification.* BioTechniques 1995, 18, 116–121. – 9. Weber J.L., Kwitek A.E., May P.E.: *Dinucleotide repeat polymorphism at the DJS103 locus.* Nucleic Acids Res 1990, 18, 2199. – 10. Ziegler J.S., Ying S., Corcoran K.P., Nie L., Mayrand P.E., Hoff L.B., McBride L.J., Kronick M.N., Diehl S.R.: *Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci.* Genomics 1992, 14, 1026–1031.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85–094 Bydgoszcz

**Tomasz Grzybowski, Danuta Miścicka-Śliwka,
Marcin Woźniak, Jakub Czarny**

Polimorfizm sekwencji mitochondrialnego DNA w identyfikacji osobniczej

Mitochondrial DNA sequence polymorphism in human individual identification

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

Chociaż analiza polimorfizmu DNA jądrowego jest zwykle skutecznym narzędziem w badaniach identyfikacyjnych, bywają przypadki w których nie zdaje ona egzaminu, a alternatywą jest analiza sekwencji mitochondrialnego DNA. Praca przedstawia jeden z takich przypadków, w którym amplifikacja i automatyczne sekwencjonowanie mitochondrialnego DNA pozwoliły na ustalenie pochodzenia pojedynczych włosów pozabawionych cebulek włosowych, odnalezionych na miejscu przestępstwa.

Although nuclear markers are always very accurate for determining human identity, there are certain cases for which they can not be applied and thus mitochondrial DNA (mt DNA) testing can serve as an alternative. This paper describes a case in which mitochondrial DNA amplification and automated sequencing was used to identify single hair shafts found at a crime scene.

Słowa kluczowe: mitochondrialny DNA, pojedyncze włosy,
sekwencjonowanie DNA, identyfikacja osobnicza

**Key words: mitochondrial DNA, single hairs, DNA sequencing,
human identification**

WSTĘP

Analiza polimorfizmu sekwencji mitochondrialnego DNA jest w ostatnich latach coraz częściej stosowanym narzędziem w badaniach identyfikacyjnych, zwłaszcza w sytuacjach, gdy zawodzą tradycyjne metody badania zmienności DNA jądrowego (3,6). Decydują o tym przede wszystkim takie cechy genomu mitochondrialnego jak odporność na degradację, duża ilość kopii w komórce, matczyzna linia dziedziczenia oraz znaczny polimorfizm regionu niekodującego

(tzw. pętli D). Celem niniejszej pracy jest przedstawienie przypadku identyfikacyjnego, w którym sekwencjonowanie mitochondrialnego DNA okazało się być techniką pomocną w ustaleniu pochodzenia włosów pozbawionych cebulek włosowych – jedynych śladów biologicznych zabezpieczonych na miejscu zabójstwa młodej kobiety dokonanego na terenie Polski północno – zachodniej.

MATERIAŁ I METODA

Materiał do badań stanowiło pięć włosów dowodowych. Spośród badanych, trzy były całkowicie pozbawione cebulki włosowej. Materiał porównawczy stanowiły cztery włosy zabezpieczone od denatki podczas sekcji zwłok oraz po cztery włosy zabezpieczone odpowiednio od matki i ojca denatki (podejrzanych w sprawie).

Genomowy DNA z pojedynczego włosa izolowano w buforze zawierającym 10 mM TRIS; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 39 mM DTT; 2% SDS i 0.1 mg proteinazy K. Po dwudziestogodzinnej inkubacji w 56°C, DNA dwukrotnie ekstrahowano mieszaniną fenol – chloroform – alkohol izoamylowy (25:24:1) oraz jednokrotnie przy użyciu chloroformu. Próbkę DNA oczyszczano i zatężano przez ultrafiltrację za pomocą kolumny *Microcon 100* (Amicon). Stężenie wyizolowanego DNA jądrowego oraz jego specyficzność gatunkową określano metodą hybrydizacyjną z wykorzystaniem sondy D17Z1 i zestawu QuantiBlot (PerkinElmer) przy zastosowaniu detekcji kolorymetrycznej.

Amplifikację pięciu loci mikrosatelitarnych (D1S103, TH01, D21S11, D18S51, FGA) oraz genu amelogeniny oraz rozdział elektroforetyczny i analizę produktów PCR przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w pracy Miścickiej-Śliwki i wsp. (8).

Amplifikację regionu niekodującego mitochondrialnego DNA przeprowadzono w objętości 25 µl. Mieszanina reakcyjna zawierała 8 µl genomowego DNA, 1 x bufor PCR (Promega), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM każdego dNTP, 1.5 jednostki Taq polimerazy (Promega) oraz 1 µM starterów L15926 i H00580. Profil termiczny PCR był następujący: 94°C – 20 s; 50°C – 30 s; 72°C – 2.5 min; 30cykli. 4 µl rozcieńczonego 1000-krotnie produktu PCR pętli D dodawano do reakcji amplifikacji polimorficznego regionu HV1. Reakcję przeprowadzano w analogicznych warunkach, z tą różnicą, że jej objętość wynosiła 50 µl, czas elongacji wynosił 1.5 min, podawano 1 jednostkę enzymu, a stężenie starterów wynosiło 0.1µM. W celu przygotowania matrycy do sekwencjonowania obu nici regionu HV1, przeprowadzano dwie odrębne serie reakcji, odpowiednio z wykorzystaniem starterów L15997/M13(-21)H16401 oraz M13(-21)L15997/H16401. Nomenklaturę oraz sekwencje wszystkich oligonukleotydów starterowych zaczerpnięto z pracy Sullivan'a i wsp. (10).

Produkty PCR oczyszczano z wykorzystaniem kolumny *Microcon 100* (Amicon) i sekwencjonowano przy użyciu zestawu Dye Primer Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty sekwencjonowania rozdzielano w 4% denaturującym żelu poliakrylamidowym na automatycznym sekwenatorze DNA ABI Prism™ 377 (Perkin Elmer). Uzyskane sekwencje

porównywano między sobą oraz z sekwencją referencyjną uzyskaną przez Andersona i wsp. (1) z wykorzystaniem oprogramowania Sequence Navigator (Perkin Elmer).

WYNIKI

Wstępne badania morfologiczne wykazały, że wszystkie włosy były włosami wyrwanymi z szarpnięcia, przy czym włosy oznaczone jako nr 1 i 2 posiadały resztki cebulki i otoczki, natomiast w przypadku trzech pozostałych nie stwierdzono obecności cebulki i otoczki. Przeprowadzono badania identyfikacyjne w oparciu o pięć loci mikrosatelitarnych i gen amelogeniny DNA jądrowego w reakcji multipleksowej oraz analizę sekwencji regionu HV1 mitochondrialnego DNA.

Wyniki badań polimorfizmu DNA jądrowego

We włosach nr 1 i 2 dzięki badaniom hybrydizacyjnym z zastosowaniem sondy D17Z1 stwierdzono śladowe ilości genomowego DNA. Amplifikacja multipleksowa wykazała, że DNA wspomnianych włosów pochodzi od osoby płci żeńskiej o genotypie zgodnym we wszystkich badanych loci z genotypem denatki, a odmiennym w loci D21S11, D18S51 i FGA od genotypu matki ofiary.

We włosach nr 3, 4 i 5 nie stwierdzono obecności genomowego DNA w wyniku badań hybrydizacyjnych. Podjęta mimo to próba amplifikacji multipleksowej dała wynik negatywny.

Wyniki badań polimorfizmu DNA mitochondrialnego w materiale porównawczym

Sekwencje regionu HV1 mitochondrialnego DNA uzyskanego z włosów denatki oraz jej matki wykazywały pełną komplementarność. W czterech pozycjach zanotowano obecność heteroplazmii T/C.

Pełną komplementarność stwierdzono również między sekwencjami uzyskanymi z włosów ojca denatki. W jednej pozycji stwierdzono obecność heteroplazmii A/G, w dwóch pozycjach zanotowano heteroplazmię T/C.

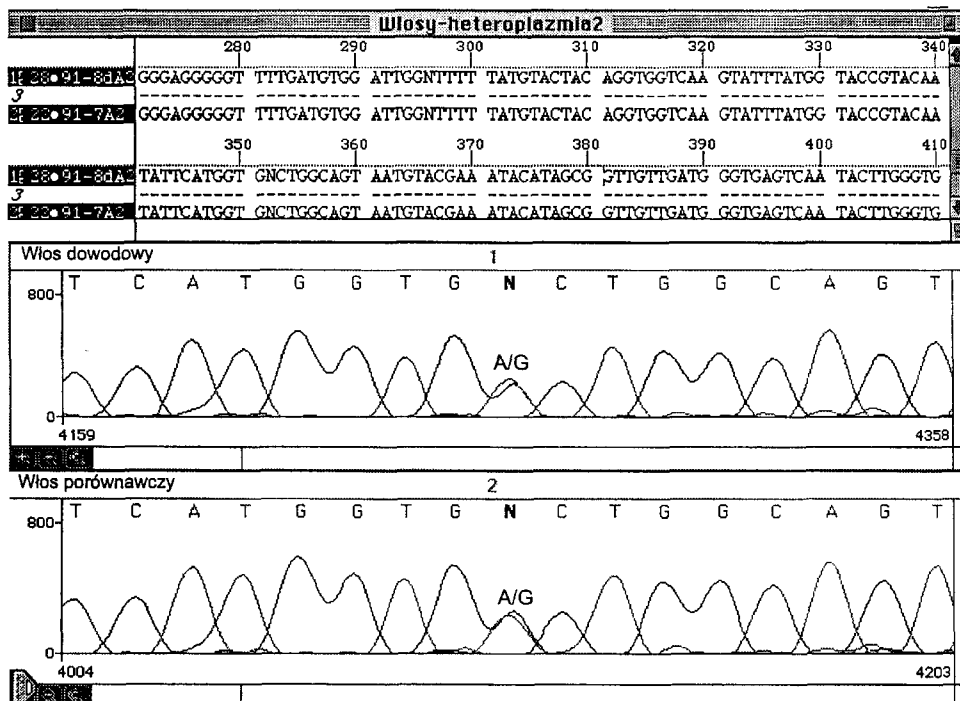
Sekwencje regionu HV1 mitochondrialnego DNA uzyskanego z włosów denatki oraz matki denatki różniły się od sekwencji uzyskanej z włosów ojca denatki w ośmiu pozycjach; odpowiednio 16111, 16126, 16163, 16167, 16186, 16189, 16288 oraz 16362.

Wyniki badań polimorfizmu DNA mitochondrialnego we włosach dowodowych

Sekwencja mitochondrialnego DNA regionu HV1 ustalona z włosów 1, 2 i 3 wykazywała pełną komplementarność z sekwencjami uzyskanymi z włosów odpowiednio denatki oraz matki denatki (Ryc. 1), natomiast różniła się w ośmiu pozycjach (16111, 16126, 16163, 16167, 16186, 16189, 16288 oraz 16362) od

sekwencji uzyskanej z włosów ojca denatki.

Sekwencja regionu HV1 ustalona z włosów 4 i 5 wykazywała pełną komplementarność z sekwencją uzyskaną z włosów ojca denatki, natomiast różniła się we wspomnianych ośmiu pozycjach od sekwencji uzyskanych z włosów denatki oraz matki denatki (Ryc. 2). Powyższe wyniki badań zebrano w Tabeli I.



Ryc. 1. Elektroforegram przedstawiający fragment sekwencji nici H (ciężkiej) regionu HV1 mtDNA uzyskanej z włosa dowodowego nr 3 (górne okno) oraz włosa porównawczego pochodzącego od denatki (dolne okno). Obie sekwencje wykazywały pełną komplementarność, charakteryzując się występowaniem heteroplazmii w tych samych pozycjach.

Fig. 1. Electroforegram illustrating fragment of mtDNA sequence (HV1 region, H– heavy strand) determined from evidentiary hair no. 3 (upper window) and reference hair obtained from the victim (lower window). Both sequences were identical, sharing heteroplasmies at the same nucleotide positions.

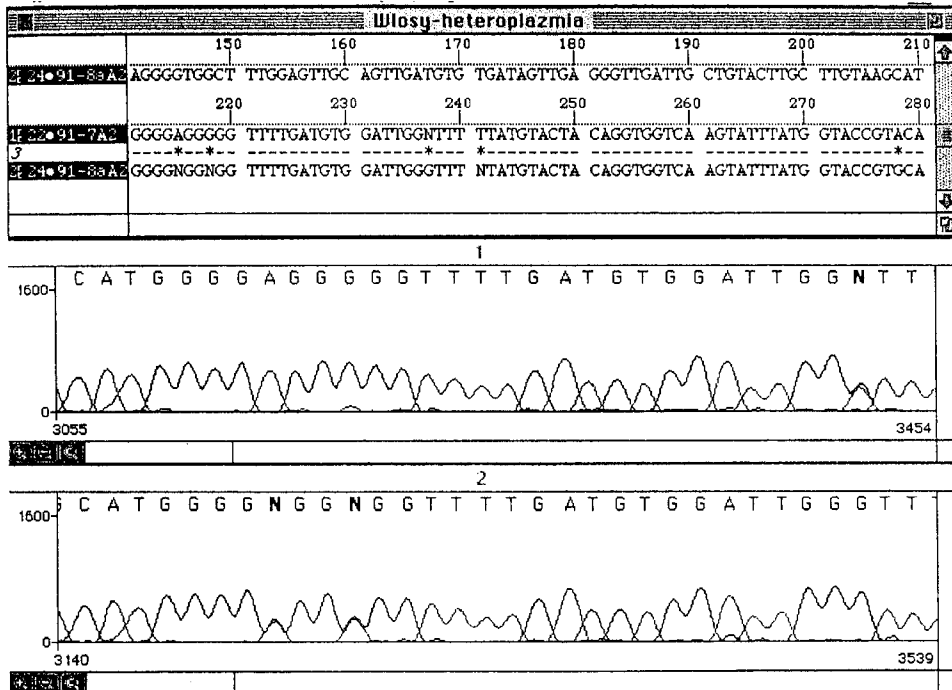
IDENTYFIKACJA WŁOSÓW DOWODOWYCH

Włosy nr 1 i 2 zidentyfikowano jako włosy denatki na podstawie badań polimorfizmu DNA jądrowego, a sekwencjonowanie mitochondrialnego DNA

potwierdziło wyniki uzyskane w oparciu o analizę loci mikrosatelitarnych. Brak cebulki włosowej we włosach nr 3, 4 i 5 nie pozwolił na uzyskanie wyników w oparciu o polimorfizm DNA jądrowego, tym niemniej ustalenie sekwencji regionu HV1 DNA mitochondrialnego okazało się możliwe.

Włos nr 3 zidentyfikowano na podstawie analizy sekwencji HV1 mitochondrialnego DNA jako mogący pochodzić od denatki lub matki denatki (względnie od innej osoby spokrewnionej z nimi w linii matczynej).

Włosy nr 4 i 5 zidentyfikowano jako mogące pochodzić od ojca denatki, względnie od innej osoby spokrewnionej z nim w linii matczynej.



Ryc. 2. Sekwencje mtDNA (region HV1, nić H – ciężka) uzyskane z włosa porównawczego pochodzącego od denatki (górne okno) oraz z włosa dowodowego nr 4 (dolne okno). Sekwencje różniły się w ośmiu pozycjach, z których trzy widać na elektroforegramie.

Fig. 2. MtDNA sequences (HV1 region, H- heavy strand) determined from reference hair obtained from the victim (upper window) and evidentiary hair no. 4 (lower window). The sequences varied at eight positions; with three of them shown at the electroforegram.

Tabela I. Wyniki badań polimorfizmu sekwencji regionu HV1 mitochondrialnego DNA włosów dowodowych i porównawczych. Numerację polimorficznych pozycji nukleotydów nici L (lekkiej) podano zgodnie z sekwencją ustaloną przez Andersona i wsp. (1).

Table I. Results of mitochondrial sequence analysis (HV1 region) of both evidentiary and reference hairs. Nomenclature of polymorphic nucleotide positions of the light (L) strand was used according to the sequence determined by Anderson et al. (1).

Analizowane włosy	Pozycje nukleotydów sekwencji regionu HV1 mtDNA							
	16111	16126	16163	16167	16186	16189	16288	16362
Włos denatki	T/C	T	A	T/C	C	T	T/C	T/C
Włos matki denatki	T/C	T	A	T/C	C	T	T/C	T/C
Włos ojca denatki	C	C	A/G	C	T/C	T/C	T	T
Włos dowodowy nr 1	T/C	T	A	T/C	C	T	T/C	T/C
Włos dowodowy nr 2	T/C	T	A	T/C	C	T	T/C	T/C
Włos dowodowy nr 3	T/C	T	A	T/C	C	T	T/C	T/C
Włos dowodowy nr 4	C	C	A/G	C	T/C	T/C	T	T
Włos dowodowy nr 5	C	C	A/G	C	T/C	T/C	T	T
Sekwencja Andersona	C	T	A	C	C	T	T	T

DYSKUSJA

Powyższy przypadek wydaje się być dobrą ilustracją przydatności analizy sekwencji mitochondrialnego DNA w badaniach takich śladów biologicznych, które zawierają bardzo niewielkie ilości DNA. Zgodnie z wcześniej przeprowadzonymi badaniami wiadomo, że włos pozbawiony cebulki włosowej zawiera nie więcej niż 100 pg – 1ng DNA (4,9), co uwzględniając degradację materiału genetycznego, obserwowaną często w przypadku włosów dowodowych, jest niejednokrotnie ilością niewystarczającą do przeprowadzenia badań polimorfizmu DNA jądrowego. Jak pokazują wyniki sekwencjonowania zaprezentowane w niniejszej pracy dla włosów całkowicie pozbawionych cebulki włosowej, analiza polimorfizmu mitochondrialnego DNA jest w podobnych przypadkach jedyną skuteczną techniką, która pozwala na ustalenie pochodzenia badanego materiału.

Tym, co zwraca szczególną uwagę podczas analizy sekwencji mitochondrialnego DNA uzyskanego z pojedynczych włosów jest stosunkowo częste zjawisko heteroplazmii, które może niejednokrotnie utrudniać identyfikację – np. w przypadku, kiedy heteroplazmia występuje w różnych pozycjach sekwencji mitochondrialnego DNA dla różnych włosów pochodzących od tej samej osoby. Z drugiej strony, jak to pokazuje opisany powyżej przypadek, heteroplazmia może stanowić kapitalny dowód w sprawie, będąc unikalnym narzędziem identyfikacyjnym – pełna komplementarność sekwencji w jednej lub wielu „heteroplazmatycznych” pozycjach między włosem porównawczym a dowodo-

wym znacznie podnosi wartość statystyczną uzyskanego wyniku. Mechanizm (lub mechanizmy) powstawania heteroplazmii są jak dotąd słabo poznane – przypuszcza się, że u podstaw tego zjawiska mogą tkwić np. mutacje w żeńskiej linii zarodkowej (5), a proporcje obserwowanych haplotypów mogą być odzwierciedleniem działania mechanizmu tzw. szyjki od butelki (ang. bottleneck), kiedy to podczas oogenezy mała liczba cząsteczek mitochondrialnego DNA ulega replikacji dając początek ostatecznej puli cząsteczek mtDNA organizmu. Ponadto, jak pokazuje głośny przypadek identyfikacji rodziny carskiej na podstawie analizy sekwencji mitochondrialnego DNA, muszą istnieć jakieś mechanizmy umożliwiające konwersję heteroplazmii do homoplazmii (2). Obserwowana w niniejszej pracy znaczna przewaga heteroplazmii T/C znajduje swoje dokładne odzwierciedlenie w badaniach innych autorów, którzy zwracali uwagę, że trancycje są dominującym typem mutacji w obrębie regionu niekodującego mitochondrialnego DNA (7).

Z technicznego punktu widzenia potwierdzenie wystąpienia heteroplazmii wymaga przeprowadzenia analizy sekwencji obu nici badanego fragmentu DNA oraz zastosowania takiej strategii sekwencjonowania, która umożliwi uzyskanie jak najbardziej zrównoważonego sygnału pochodzącego od różnych zasad. Jak pokazują wyniki niniejszego opracowania, sekwencjonowanie cykliczne polimerazą *Taq FS* z zastosowaniem znakowanych starterów zdaje się dobrze wypełniać ten ostatni postulat.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G.: *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. Nature 1981, 290, 457–465. – 2. Debenham, P.G.: *Heteroplasmy and the Tsar*. Nature 1996, 380, 484–485. – 3. Handt O., Richards M., Trommsdorf M., Kilger C., Simanainen J., Georgiew O., Bauer K., Stone A., Hedges R., Schaffner W., Utermann G., Sykes B., Paabo S.: *Molecular Genetic Analyses of the Tyrolean Ice Man*. Science 1994, 264, 1775–1778. – 4. Higuchi R., Beroldigen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A.: *DNA typing from single hairs*. Nature 1988, 332, 543–546. – 5. Ivanov P.L., Parsons T.J., Wadhams M.J., Holland M.M., Rhoby R.K., Weedn V. W.: *Hessian family lineage mitochondrial DNA heteroplasmy – a unique tool for identification of Tsar Nicolas II*. 1996, 1–6. W: Proceedings from the First European Symposium on Human Identification, Promega Corporation. – 6. Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S.: *MtDNA as a tool for identification of human remains*. Int J Leg Med 1996, 109, 205–209. – 7. Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S.: *Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany*. Int J Leg Med. 1998, 111, 67–77. – 8. Miścicka-Śliwka D., Grzybowski T., Woźniak M.: *Optimization of a hexaplex DNA amplification from short tandem repeat and amelogenin loci*. Electrophoresis 1997, 18, 1627–1632. – 9. Miścicka-

Śliwka D., Grzybowski T., Woźniak M., Czarny J.: *Forensic DNA typing of a single hair: mitochondrial DNA sequencing and highly discriminating STR multiplexes developed for various detection platforms*. 1997, 132–142. W: *Proceedings from the Eight International Symposium on Human Identification*, Promega Corporation. – 10. Sullivan K.M., Hopgood R., Gill P.: *Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA*. *Int J Leg Med* 1992, 105, 83–86.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85–094 Bydgoszcz

Ewa Pufal, Grzegorz Lis, Marzena Sykutera

Oznaczanie leków z grupy blokerów kanałów wapniowych w materiale sekcyjnym

Calcium channel blockers determination in postmortem specimens

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Wykorzystując przypadek zgonu 17-letniej dziewczyny w wyniku samobójczego zatrucia diltiazemem i nifedypiną przedstawiono warunki identyfikacji i ilościowego oznaczenia tych leków w materiale biologicznym. Badania chemiczno-toksykologiczne materiału pobranego ze zwłok przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej, spektrofotometrii w UV, chromatografii cieczowej i chromatografii gazowej z detektorem masowym.

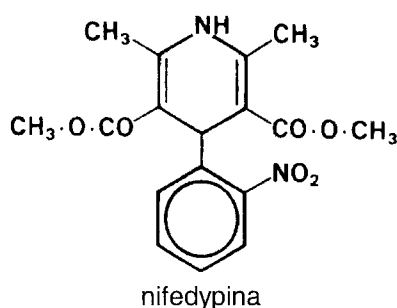
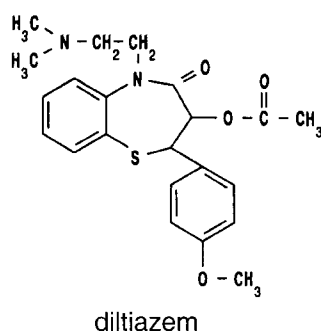
Conditions were presented for identification and quantitative determination of the drugs in biological material based on a fatal case of diltiazem and nifedipine poisoning of a 17 year old girl. The usefulness of routine methods, such as thin-layer chromatography (TLC), ultraviolet spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography with mass detector (GC/MS) was estimated.

Słowa kluczowe: zatrucie śmiertelne, diltiazem, nifedypina, materiał sekcyjny, oznaczanie

Key words: lethal poisoning, diltiazem, nifedipine, postmortem material, determination

Diltiazem (Dilzem, Oxycardil, Zildem) – pochodna 1,5-benzotiazepiny [1,5-Benzotiazepin-4(5H)-one,3-(acetyloxy)-5[2-(dimetyloamino)etyl]-2,-3-dihydro-2(4-metoxy-fenyl)-, chlorowodorek, (+)-cis] należy do III grupy blokerów kanałów wapniowych. Ze względu na swoje właściwości, lek ten jest stosowany w leczeniu wszystkich postaci choroby niedokrwiennej serca, nadciśnieniu tętniczym i w nadkomorowych zaburzeniach rytmu serca. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego (>90%), ma małą dostępność biologiczną (<20%) ze względu na znaczny efekt "pierwszego przejścia" przez krążenie wątrobowe; dostępność biologiczna wzrasta do 90% przy podawaniu przewlekłym. W 80% wiąże się z białkami osocza. Diltiazem jest metabolizowany w wątrobie do ok. 20 metabolitów z których najważniejsze to desacetyldiltiazem i desmetyldiltiazem. Jest

wydalany w 35% przez nerki i 65% z żółcią. $T_{0,5}$ wynosi 3–4 h. Stężenie terapeutyczne diltiazemu we krwi waha się w granicach 50–200 ng/ml (12). W przypadkach zatruc śmiertelnych tym lekiem stwierdzano poziom diltiazemu we krwi powyżej 6 µg/ml. W literaturze opisano przypadki ostrych zatruc diltiazemem (5, 6, 14), odnotowano również kilka przypadków zatruc śmiertelnych diltiazemem. Kaliciak i wsp. (8) omówił w swojej pracy przypadek zgonu mężczyzny, w którym w wyniku analizy toksykologicznej stwierdzono we krwi obecność diltiazemu w ilości 6,7 µg/ml. Roper i wsp. (17) w swojej pracy przedstawił z kolei 4 przypadki zatrucia tym lekiem, a stężenie diltiazemu w badanych próbach krwi było nieco wyższe niż 6,0 µg/ml. Ponadto w piśmiennictwie znaleźć można opisy przypadków zatruc złożonych, gdzie wykazano oprócz diltiazemu obecność pentoksyfiliny (4), propranololu i alkoholu etylowego (9).



Ryc. 1 Wzory strukturalne.
Fig. 1. Structural formulas.

Nifedypina (Adalat, Cordafen, Corinfar) – pochodna 1,4-dihydropirydy (Dimetylo 1,4-dihydro-2,6-dimetylo-4-(2-nitrofenylo)pirydyno-3,5-dikarboksylowa) jest zaliczana do II typu blokerów kanału wapniowego. Wykazuje silne działanie rozszerzające naczynia krwionośne, działanie antyarytmiczne (słabsze od werapamilu). Jest najsilniejszym lekiem hipotensyjnym z grupy blokerów kanału wapniowego. Dobrze wchłania się z przewodu pokarmowego i z błon śluzowych jamy ustnej. W 95% wiąże się z białkami osocza. Nifedypina jest szybko metabolizowana do nieczynnych metabolitów; 80% metabolitów wydalane jest z moczem, około 15% z żółcią. $T_{0,5}$ wynosi 3–5 h. Diltiazem zwiększa klirens nifedypiny. Stężenie terapeutyczne nifedypiny we krwi waha się w granicach 0,025–0,15 µg/ml. W literaturze odnotowano kilka przypadków, gdzie przyjęcie tego leku spowodowało bardzo silne objawy uboczne (10, 14, 20), natomiast opisano tylko 1 przypadek zgonu wskutek zatrucia mieszaniną leków nasercowych, w tym między innymi nifedypiną (3).

Najczęściej opisywaną w piśmiennictwie metodą oznaczania diltiazemu oraz nifedypiny jest chromatografia cieczowa (3, 7, 11, 13, 15, 16, 18), a materiałem biologicznym, w którym oznaczano poziom leków tą metodą była surowica, krew i mocz. Znane są również inne metody analizy tych leków w tym między innymi chromatografia gazowa z detektorem ECD (19), detektorem NPD (1, 4) i detektorem MS (4).

W dostępnej literaturze nie znaleziono publikacji przedstawiającej warunki analizy mieszaniny diltiazemu i nifedypiny w materiale sekcyjnym. Wykorzystując przypadek śmiertelnego zatrucia diltiazemem i nifedypiną prześledzono możliwość identyfikacji obu tych leków w materiale biologicznym pobranym w czasie sekcji zwłok (krew, wycinki narządów wewnętrznych) z wykorzystaniem różnych metod analitycznych: chromatografii cienkowarstwowej (TLC), spektrofotometrii UV, chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC/MS).

OPIS PRZYPADKU

17-letnią dziewczynę przywieziono do szpitala o godz. 00.15. Przytomna, błada, tętno na tętnicy obwodowej niewyczuwalne, akcja serca zwolniona. Po 20 minutach pobytu w szpitalu dziewczyna przyznała się, że po kłótni z chłopakiem zażyła tabletki swojej matki, która leczyła się na nadciśnienie – prawdopodobnie Cordafen i jeszcze inny lek, którego nazwy nie podała. Wyplukano żołądek, nie uzyskując masy tabletkowej. Około godz. 00.50 dziewczyna straciła przytomność, o godz. 4.25 stwierdzono zgon.

MATERIAŁ I METODY

Do badań chemiczno-toksykologicznych pobrano próbę krwi, treść żołądka (pH=7), wycinki wątroby, nerki, mózgu. Nie pobrano próby moczu (pęcherz moczowy był pusty).

Próbę krwi analizowano techniką chromatografii gazowej i metodą enzymatyczną (ADH) w kierunku obecności alkoholu etylowego.

W treści żołądka (pH=7) stwierdzono obecność tabletek (8 sztuk). Tabletki rozpuszczono w alkoholu etylowym i analizowano łącznie z materiałem biologicznym.

Próby materiału biologicznego po zhomogenizowaniu odbiałczono metodą siarczanowo-amonową wg Borkowskiego (2), a następnie ekstrahowano eterem dietylowym ze środowiska kwaśnego a chloroformem ze środowiska zasadowego. Po odparowaniu rozpuszczalników, próby rozpuszczono w alkoholu etylowym i poddano dalszej analizie.

Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono: techniką chromatografii cienkowarstwowej (TLC), techniką spektrofotometrii w UV, techniką chromatografii cieczowej (HPLC), techniką chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC/MS).

Analizę ekstraktów biologicznych oraz tabletek metodą chromatografii cienkowarstwowej przeprowadzono na płytkach pokrytych żelazem krzemionkowym GF₂₅₄ firmy Merck. W analizie chromatograficznej zastosowano 3 układy rozwijające: metanol:amoniak (100:1,5), cyklohexan:toluen:dietylamina (75:15:10), chloroform : metanol (90:10) i 6 odczynników wybarwiających: Dragendorffa, Mandelina, Marquisa, H₂SO₄, KMnO₄, jodoplatynian potasu.

Dla nifedypiny i diltiazemu określono również limity detekcji wymienionymi

powyżej odczynnikami wybarwiającyymi.

Analizę techniką spektrofotometrii w nadfiolecie przeprowadzono wykorzystując do badań ekstrakt materialu biologicznego po uprzednim rozdzieleniu techniką chromatografii cienkowarstwowej na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym GF₂₅₄ firmy Merck. Strefy badanych ekstraktów eluowano z chromatogramu cienkowarstwowego za pomocą 0,1M HCl, 0,1M NaOH oraz metanolem. Tak uzyskane roztwory poddawano pomiarom spektrofotometrycznym w zakresie długości fali 200–400 nm przy użyciu spektrofotometru Ultrospec III firmy Pharmacia LKB.

Kolejnym etapem badań materialu biologicznego była analiza jakościowa i ilościowa nifedypiny i diltiazemu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizę przeprowadzono na aparacie firmy Pharmacia LKB VWM 2141, pompa HPLC Pump 2248 w następujących warunkach: kolumna: Supelcosil ABZ⁺plus (15 cm x 4,6 mm ID, 5 µm), faza ruchoma: A=acetonitryl, B=25 mM KH₂PO₄ (pH 3.0) w gradiencie: 0 min (90%B), 10 min (50%B), 12 min (50 %B), 12,1 min (90 %B), przepływ: 2 ml/min, detekcja UV= 220 nm, standard wewnętrzny (IS) – pindolol.

Drugą z zastosowanych metod identyfikacji leków i ich metabolitów przeprowadzono na aparacie firmy Perkin–Elmer AutoSystem XL 4.3 z detektorem masowym TurboMass w następujących warunkach: kolumna PE–5ms (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm), przepływ He (5.5) 50cm/s. Nastrzyk splitless 1µl, temperatura źródła 200^o, temperatura linii transmisyjnej 275^oC, temperatura komory nastrzykowej 250^o, program temperaturowy: 150^oC (3 min), 40^o/min do 200^oC, 15^oC/min do 300^oC, 300^oC (5 min).

WYNIKI

Badanie próby krwi nie wykazało obecności alkoholu etylowego.

W wyniku analizy toksykologicznej materialu biologicznego metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz spektrofotometrii w UV w ekstraktach chloroformowo-zasadowych stwierdzono obecność nifedypiny i diltiazemu. Tabletki z żołądka zidentyfikowano jako diltiazem. Wyniki badań przedstawiono w tabeli I. Najlepszym układem rozwijającym, który umożliwił dostateczny rozdział mieszaniny obu leków okazał się układ chloroform:metanol (90:10). Odczynnik Mandelina pozwolił na jednoznaczna identyfikację nifedypiny i diltiazemu w materiale sekcyjnym.

Limity detekcji dla nifedypiny i diltiazemu w warunkach w chromatografii cienkowarstwowej przedstawiono w tabeli II. Najbardziej czułym odczynnikiem wywołującym dla nifedypiny okazał się odczynnik Mandelina a dla diltiazemu odczynnik Dragendorffa i jodoplatynian potasu.

Maksyma absorpcji dla nifedypiny i diltiazemu uzyskane w wyniku analizy spektrofotometrycznej w UV zamieszczono w tabeli III.

Analizę jakościową i ilościową diltiazemu i nifedypiny w materiale biologicznym przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografii cieczowej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli IV. Na rycinie 2 przedstawiono chromatogram

Tabela I. Wyniki analizy metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC).
Table I. The results of study by means of TLC method.

Material badany Examined material	Układ rozwijający Mobile phase			Odczynnik wywołujący Colour reagent					
	Metanol: Amoniak (100:1,5) Methanol: Ammonia	Cykloheksan: toluen: dietyloamina (75:15:10) Cyklohexa- ne:Toluene: Diethylamine	Chloro- form: metanol (90:10) Chloro- form: Methanol	Dragendorff	Jodoplaty- nian Acidified Iodoplatinate solution	Mandelin	Marquis	H ₂ SO ₄	KMNO ₄
R _f x 100			Barwa Colour						
Diltiazem	63	15	37	Pomarańcz. Orange	Granatowa Navy-blue	Niebieska blue	Brak barwy Negative	Brak barwy negative	Piaskowa Beige
Nifedipina	68	01	65	Brak barwy negative	Niebieska blue	Czerwona Red	Pomarańcz. orange	Pomarańcz. orange	Brak barwy Negative
Treść żołądka Gastric contents	62	14	37	Pomarańcz. Orange	Granatowa Navy-blue	Niebieska Blue	Brak barwy Negative	Brak barwy Negative	Piaskowa Beige
	67	01	66	Brak barwy Negative	Niebieska Blue	Czerwona Red	Pomarańcz. Orange	Pomarańcz. Orange	Brak barwy Negative
Wątroba Liver	61	16	36	Pomarańcz. Orange	Granatowa Navy-blue	Niebieska Blue	Brak barwy Negative	Brak barwy Negative	Piaskowa Beige
	68	02	66	Brak barwy Negative	Niebieska Blue	Czerwona Red	Pomarańcz. Orange	Pomarańcz. Orange	Brak barwy Negative
Krew Blood	64	15	35	Pomarańcz. Orange	Granatowa Navy-blue	Niebieska Blue	Brak barwy Negative	Brak barwy Negative	Piaskowa Beige
	67	00	65	Brak barwy Negative	Niebieska Blue	Czerwona Red	Pomarańcz. Orange	Pomarańcz. Orange	Brak barwy Negative
Tabletki z żołądka Tablets from gastric contents	63	15	37	Pomarańcz. Orange	Granatowa Navy-blue	Niebieska blue	Brak barwy Negative	Brak barwy Negative	Piaskowa Beige

analizy metodą HPLC ekstraktu z próby krwi. Na chromatogramie oprócz pików odpowiadających pikom diltiazemu i nifedypiny (oraz IS – standardu wewnętrznego) stwierdzono również obecność dwóch innych pików nie charakterystycznych dla wymienionych leków.

Przeprowadzając analizę metodą GC/MS z wykorzystaniem biblioteki widm masowych (Wiley'a) obok niezmiennych form nifedypiny i diltiazemu w badanych próbach wykazano także obecność desmetyldiltiazemu (metabolit diltiazemu) i dehydronifedypiny (metabolit nifedypiny), jednakże analizy ilościowej tych związków nie można było przeprowadzić ze względu na brak wzorców. Chromatogram analizy ekstraktu z próby krwi metodą GC/MS przedstawiono na rycinie 3.

Tabela II. Granice oznaczalności diltiazemu i nifedypiny w metodzie TLC.

Table II. Limit of detection of diltiazem and nifedipine in TLC method.

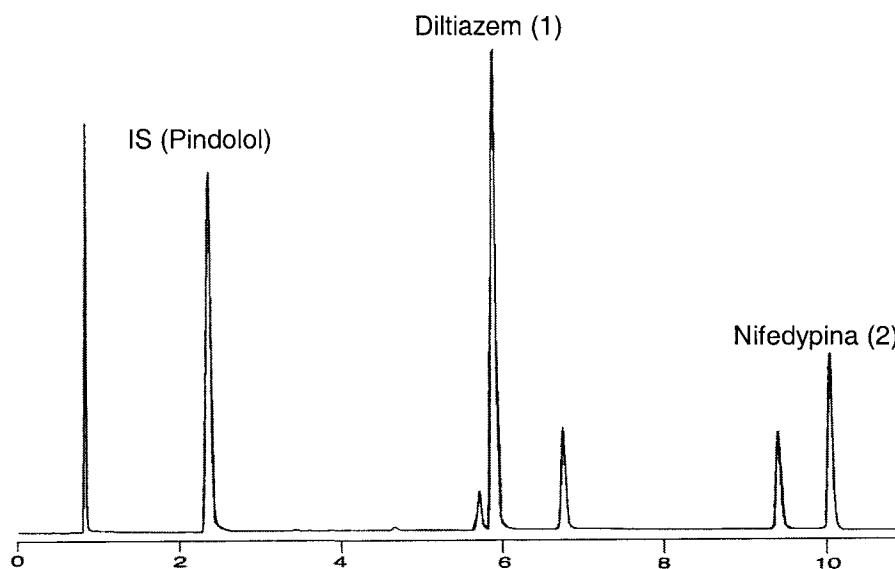
Nazwa leku Drug	Odczynnik wybarwiający Location reagent						
	H ₂ SO ₄	1% wanilina w HClO ₄ 1% vanilline in HClO ₄	Dragendorff	Jodoplatynian Acidified Iodoplatinate solution	Mandelin	KMNO ₄	UV
Granica oznaczalności Limit of detection							
Nifedypina	300 ng	300 ng	-	180 ng	60 ng	-	30 ng
Diltiazem	-	-	100 ng	100 ng	200 ng	300 ng	100 ng

Tabela III. Wyniki analizy metodą spektrofotometrii w nadfiolecie.
Table III. The results of study by means of ultraviolet spectrophotometry.

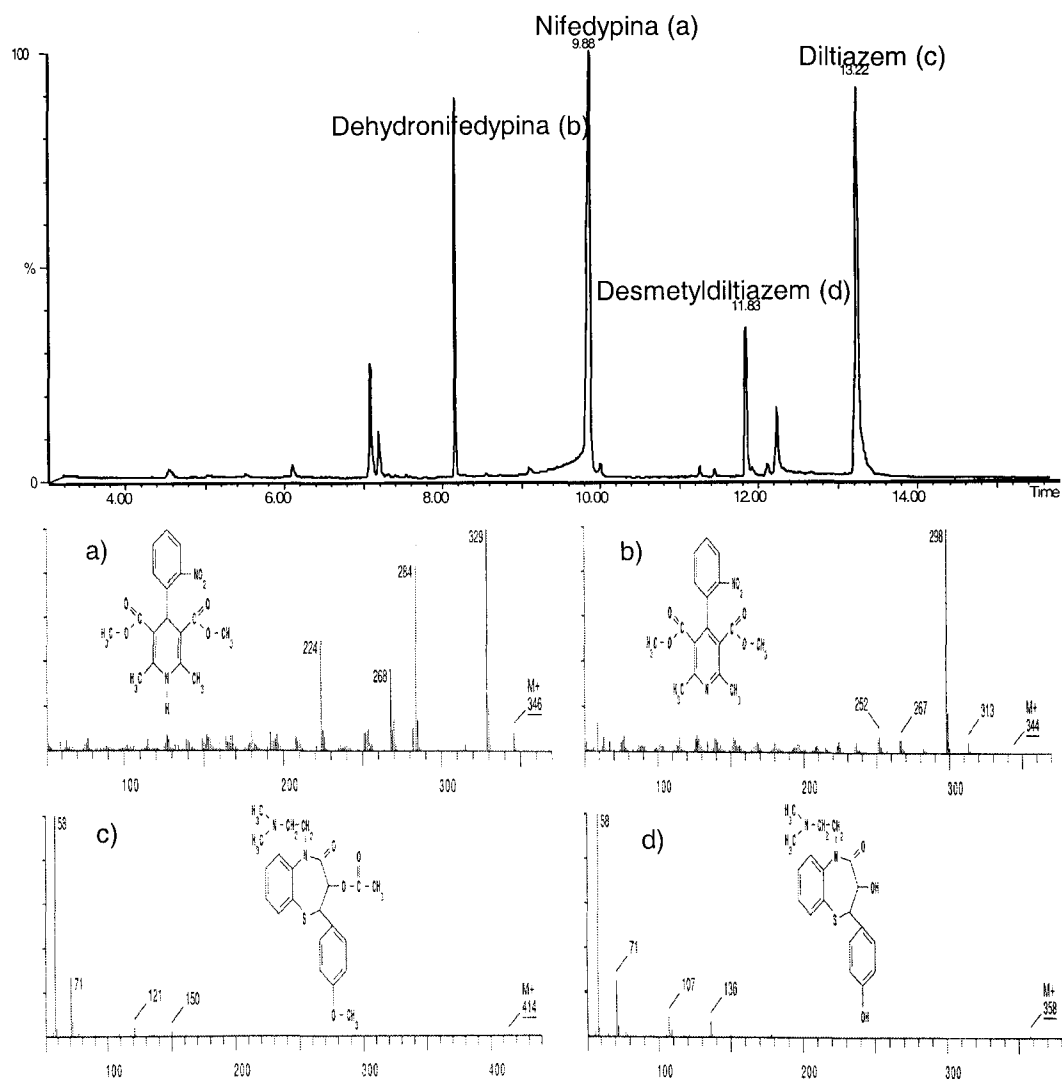
Nazwa leku Drug	Maximum absorpcji Absorption		
	0,1 M HCl	0,1 M NaOH	Metanol
Nifedypina	238 nm, 338 nm	237 nm, 340 nm	235 nm, 329 nm
Diltiazem	234 nm	240 nm	234 nm

Tabela IV. Wyniki badań ilościowych diltiazemu i nifedypiny.
Table IV. Results of diltiazem and nifedipine quantitative examinations.

Materiał badany Examined material	Nazwa leku / Drug	
	Nifedypina	Diltiazem
Krew Blood	0,91 µg/ml	11,0 µg/ml
Wątroba Liver	0,62 µg/g	12,0 µg/g
Nerka Kidney	0,62 µg/g	21,0 µg/g
Mózg Brain	0,70 µg/g	4,8 µg/g
Treść żołądka (108g) Gastric contents	33,48 mg	513,2 mg



Ryc.2. Identyfikacja metodą HPLC – ekstrakt biologiczny (krew)
Fig. 2. Identification by the HPLC method – biological extract (blood)



Ryc. 3. Wyniki analizy ekstraktu próby krwi metodą GC/MS. a/widmo masowe nifedypiny, b/ widmo masowe dehydronifedypiny, c/ widmo masowe diltiazemu, d/ widmo masowe desmetyldiltiazemu

Fig. 3. Gas chromatogram of an extracted blood specimen. a/ mass spectrum of nifedipine, b/ mass spectrum of dehydronifedipine, c/ mass spectrum of diltiazem, d/ mass spectrum of desmetyldiltiazem

OMÓWIENIE

W analizowanym w toku niniejszych badań materiale biologicznym wykazano obecność diltiazemu i nifedypiny.

Stężenie diltiazemu w próbie krwi wynosiło 11.0 µg/ml a więc było wyższe niż stężenia jakie zazwyczaj notowano w opisanych przypadkach śmiertelnych zatruc tym lekiem (4, 9, 8, 17). Wykazanie w organizmie denatki występowania drugiego leku – nifedypiny (w ilościach przekraczających poziomy terapeutyczne) wskazuje, że ostry efekt toksyczny był następstwem wzajemnego oddziaływania obu leków. Diltiazem i nifedypina należą bowiem do grupy leków blokujących kanały wapniowe, które wywierają znaczny wpływ na stan czynnościowy układu krążenia. Spożyte równocześnie, nawet w dawce terapeutycznej, mogą poprzez spotęgowane działanie spowodować ostre zaburzenia w układzie sercowo-naczyniowym, a nawet być przyczyną zgonu.

Metodą skryningową powszechnie stosowaną w analizie toksykologicznej jest chromatografia cienkowarstwowa. W dostępnej literaturze nie znaleziono jednak informacji na temat metod identyfikacji diltiazemu we krwi i wycinkach narządów wewnętrznych z wykorzystaniem tej metody. Zastosowane w niniejszej pracy warunki w analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej pozwoliły na wykazanie obecności diltiazemu i nifedypiny w materiale biologicznym pobranym ze zwłok. Układem rozwijającym, który umożliwił najlepszy rozdział obu tych związków okazał się układ chloroform:metanol (90:10) (R_f dla diltiazemu = 37, R_f dla nifedypiny = 65). Należy zwrócić uwagę, że użyty do uwidaczniania na chromatogramie stref substancji rozdzielonych odczynnik Mandelina pozwolił na jednoznaczne rozróżnienie obu tych leków. Przy zastosowaniu tego odczynnika otrzymano charakterystyczne barwy: dla diltiazemu – niebieską, dla nifedypiny – czerwoną. Dla identyfikacji nifedypiny korzystnym odczynnikiem wywołującym okazał się również odczynnik Marquisa (barwa pomarańczowa) oraz stężony kwas siarkowy (barwa pomarańczowa). Diltiazem z powyższymi reagentami nie dał bowiem zabarwienia. Najbardziej czułym odczynnikiem w przypadku identyfikacji diltiazemu okazał się odczynnik Dragendorffa i jodoplatynian potasu (100 ng), natomiast w przypadku analizy nifedypiny – odczynnik Mandelina (60 ng).

W omawianym przypadku zatrucia powyższymi lekami bezpośrednia analiza spektrofotometryczna otrzymanych ekstraktów prób biologicznych nie dała zadowalających rezultatów, ze względu na to, iż otrzymane widma spektrofotometryczne nie pozwoliły na jednoznaczną identyfikację związków (charakterystyczne maksima absorpcji nifedypiny i diltiazemu różniły się nieznacznie). Dopiero wstępny rozdział ekstraktów materiału biologicznego metodą TLC i analiza spektrofotometryczna odpowiednich stref eluowanych z chromatogramu cienkowarstwowego umożliwiła pełną identyfikację leków.

Najczęściej stosowaną metodą analizy diltiazemu i nifedypiny jest chromatografia cieczowa z detektorem UV (7, 11, 13, 15, 16, 18). Autorzy tych prac przeprowadzali analizę przy użyciu różnych kolumn chromatograficznych (CN, Si60, C18) oraz stosowali detekcję przy różnych długościach fali (240 nm, 238 nm, 237 nm, 215 nm). Jednakże żadne z tych opracowań nie podaje warunków

analizy mieszaniny tych leków.

Zastosowane w niniejszej pracy warunki analizy metodą HPLC z detektorem UV (kolumna ABZ⁺, detekcja przy długości fali 220 nm) inne niż proponowane przez autorów (7, 11, 13, 15, 16, 18) pozwoliły na jednoczesną analizę jakościową i ilościową diltiazemu i nifedypiny w materiale biologicznym zawierającym mieszaninę tych leków.

Jako technikę potwierdzającą obecność wykazanych w materiale biologicznym ksenobiotyków zastosowano chromatografię gazową z detektorem masowym (GC/MS). Tylko w jednej publikacji z 1997 roku, której autorem jest Engelhart i wsp. (4) przedstawiono warunki analizy diltiazemu tą metodą. Natomiast nie opisano warunków identyfikacji nifedypiny metodą GC/MS. Dla oznaczenia diltiazemu w materiale biologicznym Engelhart i wsp. (4) zastosował kolumnę DB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) oraz program temperaturowy: 150°C (3 min), 50°C/min do 200°C, 10°C/min do 290°C, 290°C (2 min). W niniejszej pracy zastosowano kolumnę PE-5ms (30 m x 0,32 mm, 0,25 µm) oraz program temperaturowy: 150°C (3 min), 40°C/min do 200°C, 15°C/min do 300°C, 300°C (5 min). Powyższe warunki okazały się korzystne ze względu na skrócenie czasu analizy przy jednoczesnym dobrym rozdziale analitów. Wykorzystanie biblioteki widm masowych (Willey'a) umożliwiło jednoczesne (jeden nastrzyk na kolumnę w ilości 1 µl ekstraktu) zidentyfikowanie nifedypiny i diltiazemu oraz ich metabolitów (desmetyldiltiazemu i dehydronifedypiny) w materiale sekcyjnym. Należy zwrócić uwagę, że odpowiedni dobór warunków analizy (umożliwiający w jednym toku analitycznym identyfikację nawet kilku leków) jest szczególnie ważny w przypadku, gdy mamy do czynienia z zatruciem złożonym oraz gdy dysponujemy małą ilością materiału badanego.

Porównując wyniki badań metodami HPLC i GC/MS można przypuszczać, że niezidentyfikowane na chromatogramie HPLC piki mogą odpowiadać metabolitom nifedypiny i diltiazemu, których obecność stwierdzono analizując próby techniką GC/MS z wykorzystaniem biblioteki widm masowych.

WNIOSKI

Zastosowane w niniejszej pracy metody oznaczania w materiale biologicznym pobranym w czasie sekcji zwłok mieszaniny leków – diltiazemu i nifedypiny wykazały, że bez wątplenia najlepszą, najbardziej czułą i selektywną metodą jest chromatografia gazowa z detektorem masowym.

Zastosowane w pracy warunki analityczne techniką chromatografii cieczowej, spektrofotometrii w UV oraz techniką chromatografii cienkowarstwowej nadają się do analizy jakościowej i ilościowej diltiazemu i nifedypiny w materiale sekcyjnym.

Ponieważ wysoki koszt zestawu GC/MS powoduje, że nie każde laboratorium dysponuje takim aparatem dlatego wydaje się, że przedstawione warunki analizy metodami chromatografii cienkowarstwowej, spektrofotometrii UV oraz chromatografii cieczowej są też godne polecenia.

PIŚMIENICTWO

1. Beno JM, Nemeth DR: Diltiazem and metoclopramide overdose. *J. Anal. Toxicol.* 1991, 15, 285–287.
- 2. Borkowski T: Metoda wyosabniania trucizn organicznych z materiału biologicznego. *Arch. Med. Sąd. i Krym.* 1968, 18, 95–100.
- 3. Chacia T: Complex poisoning with drugs applied in heart disease treatment. *Z Zagadnień Nauk Sądowych.* 1998, 37, 149–157.
- 4. Engelhart DA, Lavins ES, Seligman SS, Sutheimer CA: Diltiazem and pentoxifylline determination in postmortem material. *J. Anal. Toxicol.* 1997, 21, 576–579.
- 5. Erickson FC, Ling LJ, Grande GA, Anderson DL: Diltiazem overdose: case report and review. *J. Emerg. Med.* 1991, 9, 357–366.
- 6. Fauville JP, Hantson P, Honore P, Belpaire F, Rossel MT, Mahieu P: Severe diltiazem poisoning with intestinal pseudo-obstruktion: case report and toxicological data. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1995, 33, 273–277.
- 7. Hubert P, Chiap P, Crommen J: Automatic determination of diltiazem and desacetyldiltiazem in human plasma using liquid–solid extraction on disposable cartridges coupled to HPLC. I. Optimization of the HPLC system and method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1991, 9, 877–882.
- 8. Kaliciak HA, Huckin SN, Cave WS: A death attributed solely to diltiazem. *J. Anal. Toxicol.* 1992, 16, 102–103.
- 9. Kalin JR, Wood KM, Lee AJ: A possible suicide by diltiazem overdose. *J. Anal. Toxicol.* 1994, 18, 180–182.
- 10. Mehd US, Nanavati PR, Ravichandran P: Nifedipine overdose in a 70 year old man. *J. Assoc. Physicians. India* 1993, 41, 609–610.
11. Morris RG, Saccoia NC, Jones TE: Modified liquid–chromatographic assay for diltiazem and metabolites in human plasma. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1996, 19, 2385–2394.
- 12. Pączkowski D, Dąbrowski R, Łuczak D, Rewerski W: Farmakologia kliniczna diltiazemu. *Polski Tygodnik Lekarski*, 1993, 48, 828–833.
- 13. Pączkowski D, Dąbrowski D, Sitkiewicz D, Sadowski Z: Analysis of diltiazem and desacetyldiltiazem in serum by high–performance liquid chromatography. *Pol. J. Pharmacol.* 1995, 47, 429–434.
- 14. Pearigen PD, Benowitz NL: Poisoning due to calcium antagonists. Experience with verapamil, diltiazem and nifedipine. *Drug. Saf.* 1991, 6, 408–430.
- 15. Poetter H, Huelm M: Assay of nifedipine and its by– and degradation products in the drug substance and dragees by liquid chromatography on formamide–saturated silica gel columns. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, 6, 115–119.
- 16. Roosemalen MC, Soons PA, Funaki T, Breimer DD: High–performance liquid chromatographic determination of the polar metabolites of nifedipine in plasma, blood and urine. *J. Chromatogr.* 1991, 565, 516–522.
- 17. Roper TA, Sykes R, Gray C: Fatal diltiazem overdose: report of four cases and review of the literature. *Postgrad. Med.* 1993, 69, 474–476.
- 18. Sheridan ME, Clarke GS, Robinson ML: Analysis of nifedipine in serum using solid–phase extraction and liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1989, 7, 519–522.
- 19. Schmid BJ, Perry HE, Idle JR: Determination of nifedipine and its three principal metabolites in plasma and urine by automated electron–capture capillary gas chromatography. *J. Chroma*

togr. 1998, 425, 107–119. –20. Wells TG, Graham CJ, Moss MM, Kearns GL:
Nifedipine poisoning in a child. Pediatrics. 1990, 86, 91–94

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85–094 Bydgoszcz

VI MIĘDZYNARODOWA KONFERENCJA

BŁĄD LEKARSKI I BŁĄD W GENETYCE SĄDOWEJ

16–19 październik 2000 Krzyżowa k / Świdnica

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Akademii Medycznej we Wrocławiu
Polskie Towarzystwo Medycyny Sądowej i Kryminologii Oddział Wrocław

VI INTERNATIONAL CONFERENCE MEDICAL & FORENSIC GENETICS MALPRACTICE

16–19 October 2000 Krzyżowa / Świdnica

Wroclaw Medical University, Institute of Forensic Medicine, Polish Society of
Forensic Medicine i Criminology

Konferencja odbędzie się w Zamku w Krzyżowej k/ Świdnicy
Location: The conference will take place at the Krzyżowa castle near Świdnica

Zgłoszenia uczestnictwa do 31 stycznia 2000
Przestać pocztą lub faxem / 71-3281365 / do Komitetu Organizacyjnego

Call for submission / deadline 31 January 2000 /
Send by mail or fax / 49-71-3281365 / to Organisation Comitee

Ewa Pufal, Marzena Sykutera, Grzegorz Lis

Zatrucie fluoksetyną i karbamazepiną. Oznaczanie w materiale sekcyjnym

Fluoxetine and Carbamazepine determination in postmortem specimens

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. K. Śliwka

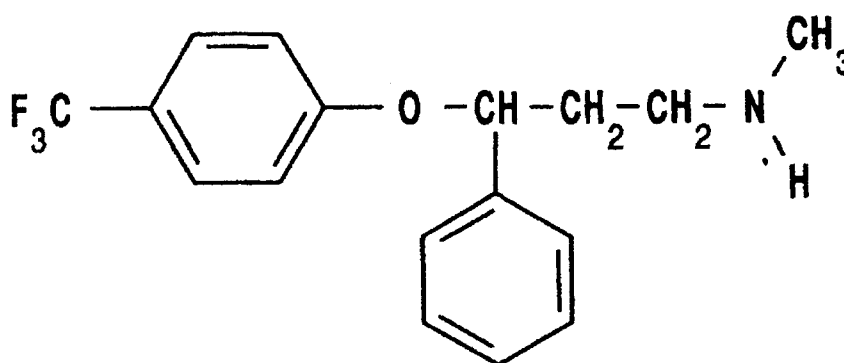
W pracy przedstawiono wyniki badań chemiczno-toksykologicznych materiału biologicznego pobranego ze zwłok kobiety, która zatrała się lekami: fluoksetyną i karbamazepiną. Przypadek tego zatrucia posłużył do prześledzenia możliwości identyfikacji tych leków w materiale sekcyjnym z zastosowaniem różnych metod analitycznych. W wyniku analizy toksykologicznej stwierdzono obecność fluoksetyny w ilości: krew 750 ng/ml, wątroba 325 ng/ml, nerka 260 ng/ml, treść żołądka 10mg/110g oraz karbamazepiny w ilości: krew 88,3 µg/ml, wątroba 229,4 µg/ml, nerka 335,9 µg/ml, treść żołądka 32,34 mg/110g. Uzyskane wyniki badań pozwoliły przyjąć, iż przyczyną śmierci mogło być synergistyczne działanie obu leków.

The authors present the analytical procedure applied in a case of suicide by drug poisoning. The analytical methods used were: thin layer-chromatography (TLC), UV-spectrophotometry, high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography with mass selective detector (GC/MSD). Identification and quantification of biological material revealed the presence of fluoxetine (blood–750 ng/ml, liver–325 ng/ml, kidney–260 ng/ml, stomach contents–10 mg/110 g) and carbamazepine (blood–88,3 µg/ml, liver–229,4 µg/g, kidney 335,9 µg/g, stomach contents–32,34 mg/110 g)

Słowa kluczowe: fluoksetyna, karbamazepina, materiał sekcyjny, oznaczanie

Key words: fluoxetine, carbamazepine, postmortem material, determination

Fluoksetyna (Prozac, Bioxetin – chemicznie chlorowodorek N–metyl–3–fenyl–3(alfa, alfa, alfa–tri–fluoro–p.–tolyloxył)–propylaminy) należy do grupy leków przeciwdepresyjnych, których mechanizm działania jest związany z selektywnym hamowaniem wychwytu zwrotnego serotoniny (5HT). Należy ona obecnie do szerzej stosowanych leków w terapii stanów depresyjnych. Po raz pierwszy została zastosowana w leczeniu depresji w roku 1986.



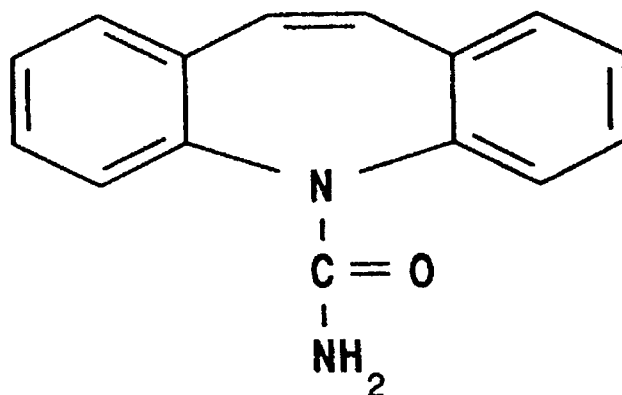
Ryc. 1. Wzór strukturalny fluoksetyny.

Fig. 1. Structure of fluoxetine.

Fluoksetyna stosowana jest w łagodnych i średnio nasilonych stanach depresyjnych z niezbyt nasilonym lękiem i niepokojem, nie może być jednak zażywana przez chorych z tendencjami samobójczymi. Fluoksetyna nasila działanie inhibitorów MAO, warfaryny, karbamazepiny, trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, soli Li i pochodnych benzodiazepiny. Wchłania się dobrze i całkowicie z przewodu pokarmowego, osiągając maksymalne stężenie we krwi po około 6 godzinach po pierwszej dawce. Podczas terapii fluoksetyną stężenie tego leku we krwi osiąga poziom w granicach 37–301 ng/ml. Fluoksetyna jest metabolizowana w organizmie między innymi do czynnego metabolitu – pochodnej demetylowej – norfluoksetyny. Okres półtrwania fluoksetyny wynosi 84h po pierwszej dawce, po następnych – 2–7 dni, a jej metabolitu – norfluoksetyny ok. 9 dni.

W przeciwieństwie do leków z grupy trójpierścieniowych antydepresantów wiedza o cechach psychotropowych SI – 5-HT i przydatności w leczeniu depresji jest wciąż niepełna, dotyczy to również objawów niepożądanych i interakcji z innymi lekami, w tym również z innymi lekami psychotropowymi. Z danych literaturowych wynika, że w porównaniu z klasycznymi lekami antydepresyjnymi (trójpierścieniowe antydepresanty) lek ten jest bezpieczniejszy w stosowaniu i istnieje znikome ryzyko śmiertelnych zatruc po przedawkowaniu. Aczkolwiek w USA, gdzie Prozac zyskał duże uznanie i jest zaliczany do podstawowych leków przeciwdepresyjnych, zanotowano kilka przypadków ostrych zatruc tym lekiem. W literaturze opisano również nieliczne przypadki zatruc śmiertelnych spowodowanych równoczesnym spożyciem fluoksetyny i leków z grupy trójklicznych antydepresantów (7).

Drugi z omawianych leków – karbamazepina (Tegretol, Amizepin, chemicznie – 5H-Dibenz[b,f]azepino-5-karboksamid) – jest lekiem o działaniu przeciwpadaczkowym i psychotropowym. Z przewodu pokarmowego karbamazepina wchłania się ulegając w 98% zmetabolizowaniu w wątrobie a pozostała część jest wydalana przez nerki w formie niezmienionej. Głównym metabolitem karbamazepiny jest 10,11-epoxykarmazepina.



Ryc. 2. Wzór strukturalny karbamazepiny.

Fig. 2. Structure of carbamazepine.

Ze względu na swą stosunkowo niewielką toksyczność karbamazepina jest szeroko stosowana w leczeniu. Jednakże przyjmowana bez kontroli lekarskiej może stanowić zagrożenie nie tylko dla zdrowia ale również dla życia. W literaturze odnotowano kilka przypadków zatruć śmiertelnych spowodowanych spożyciem karbamazepiny (5, 10). Działanie terapeutyczne leku karbamazepina obserwuje się przy stężeniach w osoczu 5–10 µg/ml a objawy niepożądane występują przy stężeniach pow. 15 µg/ml. W przypadkach zatruć śmiertelnych tym lekiem stwierdzano stężenie karbamazepiny we krwi w ilości powyżej 53 µg/ml.

Z danych literaturowych wynika, że powszechnie stosowaną metodą analizy karbamazepiny i fluoksetyny w materiale biologicznym (surowica, mocz) jest chromatografia cieczowa (1, 2, 5, 11, 13), a w ostatnich latach dużą popularność zyskuje również chromatografia gazowa z detektorem masowym (4, 7, 9, 12). Najczęściej stosowanym detektorem w chromatografii cieczowej był detektor spektrofotometryczny, a analizę karbamazepiny przeprowadzano przy dług. fali 210 nm, 214 nm, 220 nm bądź 254 nm natomiast fluoksetyny przy dług. 220 nm i 227 nm. Oznaczaniem karbamazepiny w surowicy krwi metodą GC/MS zajmowali się Halbach i wsp. (9) oraz Gerardin i wsp. (8). Rothe i wsp. (12) z wykorzystaniem tej metody oznaczali poziom karbamazepiny we włosach. Metodą analizy fluoksetyny techniką GC/MS w próbkach biologicznych (krew, wycinki narządów wewnętrznych) opisał m.in. Crifasi i wsp. (4) oraz Ferslew i wsp. (7).

Jednakże żadna z tych publikacji nie opisuje warunków analizy materiału biologicznego zawierającego mieszaninę obu leków.

Wykorzystując przypadek śmiertelnego zatrucia lekami Prozac (fluoksetyna) i Amizepin (karmamazepina) prześledzono możliwość identyfikacji tych leków w materiale sekcyjnym (krew, wycinki narządów wewnętrznych) z zastosowaniem różnych metod analitycznych: chromatografii cienkowarstwowej (TLC), spektrofotometrii w UV, chromatografii cieczowej (HPLC) oraz chromatografii

gazowej z detektorem masowym (GC/MS).

OPIS PRZYPADKU

W mieszkaniu na podłodze znaleziono zwłoki 43-letniej kobiety. Z wywiadu wynikało, że od dłuższego czasu denatka przyjmowała lek Prozac. W miejscu znalezienia zwłok zabezpieczono również leki o nazwach: Mianseryna, Lerivon (Mianseryna = Lerivon), Isoptin, Amizepin.

MATERIAŁ I METODY

Do badań chemiczno-toksykologicznych pobrano próbę krwi, treść żołądka (pH=7), wycinki wątroby, nerki, mózgu. Nie pobrano próby moczu (pęcherz moczowy był pusty).

Próbie krwi analizowano w kierunku stwierdzenia obecności alkoholu etylowego metodą chromatografii gazowej i metodą enzymatyczną (ADH).

Próby materiału biologicznego po zhomogenizowaniu odbiałczono metodą siarczanowo-amonową wg Borkowskiego (3), a następnie ekstrahowano eterem dietylowym ze środowiska kwaśnego a chloroformem ze środowiska zasadowego. Po odparowaniu rozpuszczalników, próby rozpuszczono w alkoholu etylowym i poddano dalszej analizie.

Analizę jakościową i ilościową przeprowadzono następującymi metodami: a/ metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC), b/ metodą spektrofotometrii w UV, c/ metodą chromatografii cieczowej (HPLC), d/ metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC/MS).

a) Analiza metodą chromatografii cienkowarstwowej

Ekstrakty analizowanego materiału biologicznego oraz wzorce fluoksetyny, karbamazepiny i leków: Isoptin, Mianseryna nanoszono na płytki pokryte żelem krzemionkowym GF₂₅₄ firmy Merck. W analizie chromatograficznej zastosowano 5 układów rozwijających i 3 odczynniki wybarwiające (tabela I).

b. Analiza metodą spektrofotometryczną w UV

Analizę jakościową metodą spektrofotometrii w nadfiolecie przeprowadzono wykorzystując do badań ekstrakty materiału biologicznego po uprzednim rozdzieleniu na cienkiej warstwie. Strefy badanych ekstraktów eluowano z chromatogramu cienkowarstwowego za pomocą 0,1M HCl, 0,1N NaOH oraz metanolem. Tak uzyskane roztwory poddawano pomiarom spektrofotometrycznym w zakresie długości fali 200–500 nm przy użyciu spektrofotometru Ultrospec III firmy Pharmacia LKB.

c. Analiza metodą chromatografii cieczowej (HPLC)

Kolejnym etapem badań materiału biologicznego była analiza jakościowa i ilościowa, którą przeprowadzono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy użyciu aparatu firmy Pharmacia LKB VWM 2141, pompa HPLC Pump 2248. Analizę karbamazepiny metodą HPLC przeprowadzono w warunkach analitycznych opisanych przez Bonato i wsp. (2) po nieznacznej modyfikacji w składzie fazy ruchomej. Analizę fluoksetyny przeprowadzono wg el-Yazigi (6) z jedną zmianą – w naszej pracy dwukrotnie zwiększono przepływ fazy ruchomej.

Fluoksetyna: kolumna LC-18DB (15 cm, 4.6 mm, 5 μ m), detekcja UV=220 nm, eluent – acetonitryl:metanol:0.056 M octan amonu:1M wodorotlenek amonu (100:10:4.5:2.6 v/v), przepływ 2.0 ml/min, standard wewnętrzny (IS) – doxepin (ryc. 3 A).

Karbamazepina: kolumna LC-18DB (15 cm, 4.6 mm, 5 μ m), detekcja UV=220 nm, eluent – woda: acetonitryl (50:50), przepływ: 1 ml/min, standard wewnętrzny (IS) – metakwalon (ryc. 3 B).

d. Analiza metodą chromatografii gazowej z detektorem masowym (GC/MS)

Analizę leków i identyfikację ich metabolitów przeprowadzono na aparacie firmy Perkin-Elmer w następujących warunkach: kolumna PE-5 (30 m x 0,32 mm, 0,25 μ m), przepływ liniowy helu 50cm/s utrzymany przez 5 min, wzrost 5cm/min do 55cm/s utrzymano przez 7 min. Nastrzyk bez podziału (splitless) 1 μ l, temperatura źródła 200°C, temperatura linii transmisyjnej 275°C, temperatura komory nastrzykowej 230°C, program temperaturowy: 110°C utrzymane przez 1 min, wzrost 25°/min do 212°C, zatrzymano przez 3.15 min, wzrost 40°/min do 300°C utrzymano przez 3 min. Do identyfikacji leków i ich metabolitów wykorzystano dane z biblioteki widm masowych Willey Registry of Mass Spectral Data 6th Edition.

WYNIKI

W wyniku analizy toksykologicznej materiału biologicznego metodą chromatografii cienkowarstwowej wykazano obecność leków: karbamazepina i fluoksetyna. Obecności innych leków nie stwierdzono (tab. I). Wyniki analizy jakościowej i ilościowej karbamazepiny i fluoksetyny uzyskane metodą chromatografii cieczowej, przedstawiono w tabeli II, a przykładowe chromatogramy ekstraktu z próby krwi przedstawiono na ryc. 3.

Przeprowadzając analizę jakościową techniką GC/MS potwierdzono obecność karbamazepiny i fluoksetyny w badanym materiale. Wykorzystanie danych z biblioteki widm masowych Willey'a pozwoliło na stwierdzenie obecności w badanych próbach 10,11-epoksykarbamazepiny i norfluoksetyny (głównych metabolitów karbamazepiny i fluoksetyny). Chromatogram analizy ekstraktu z próby krwi przedstawiono na ryc. 4. W badanych próbach nie stwierdzono obecności leków: mianseryna, isoptin. W badanej próbce krwi nie stwierdzono obecności alkoholu etylowego.

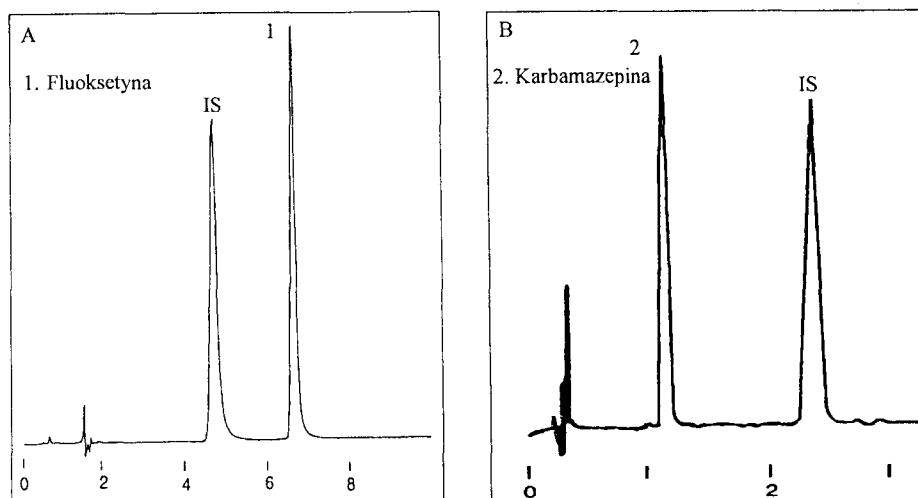
Tabela 1. Wyniki badań metodą chromatografii cienkowarstwowej. Układy rozwijające: 1– chloroform:aceton (80:20), 2– octan etylu: metanol: amoniak (85:10:5), 3– octan etylu, 4– metanol:amoniak (100:1,5), 5– chloroform:metanol (90:10). Odczynnik wywołujący: I– odczynnik Dragendorffa, II–Jodoplatynian, III– odczynnik Marquisa.

Table 1. Results of qualitative analysis by TLC method. Development systems: 1– chloroform: acetone (80:20), 2– ethyl acetate: methanol: ammonia (85:10:5), 3– ethyl acetate, 4– methanol:ammonia (100:1.5), 5– chloroform:methanol (90:10). Location reagents: I– Dragendorff reagent, II– acidified iodoplatinate solution, III– Marquis reagent.

Materiał badany Material examined	Układ rozwijający i wartości $R_F \times 100$ Development system and $R_f \times 100$ values					Odczynnik wywołujący/barwa Location reagent/colour		
	1	2	3	4	5	I	II	III
Ekstrakty eterowo-kwaśne Ether acid extracts								
Zawartość żołądka Stomach contents	0,30	0,45	0,27	0,52	0,58	Poma- rańczo- wa Orange	Fioleto- wa Violet	Żółta Yellow
Krew Blood	0,30	0,45	0,26	0,50	0,57	Poma- rańczo- wa Orange	Fioleto- wa Violet	Żółta Yellow
Ekstrakty chloroformowo-zasadowe Chloroform alkaline extracts								
Zawartość żołądka Stomach contents	0,31	0,36	0,12	0,36	0,13	Poma- rańczo- wa Orange	Grana- towa Navy- blue	Braź- czerw Brown- red
Krew Blood	0,30	0,35	0,12	0,35	0,15	Poma- rańczo- wa Orange	Grana- towa Navy- blue	Braź- czerw Brown- red
Wzorce leków Drugs								
Karbama- zepina Carbama- zepine	0,33	0,50	0,22	0,53	0,60	Poma- rańczo- wa Orange	Fioleto- wa Violet	Żółta Yellow
Fluoksety- na Fluoxetine	0,30	0,32	0,10	0,30	0,10	Poma- rańczo- wa Orange	Grana- towa Navy- blue	Braź- czerw Brown- red
Mianseryna Mianserin	0,16	0,56	0,13	0,58	0,58	Poma- rańczo- wa Orange	Grana- towa Navy- blue	Brak None
Werapamil Verapamil	0,18	0,72	0,15	0,59	0,70	Poma- rańczo- wa Orange	Grana- towa Navy- blue	Żółto-zie- lony Yellow- green

Tabela II. Stężenie leków w materiale sekcyjnym.
Table II. Drugs concentrations in autopsy material.

Materiał badany Autopsy material	Stężenie leku Concentration of drug	
	Karbamazepina Carbamazepine	Fluoksetyna Fluoxetine
Krew Blood	88,3 µg/ml	750 ng/ml
Wątroba Liver	229,4 µg/g	325 ng/ml
Nerka Kidney	335,9 µg/g	260 ng/ml
Treść żołądka (110g) Stomach contents	32,34 mg	10 mg

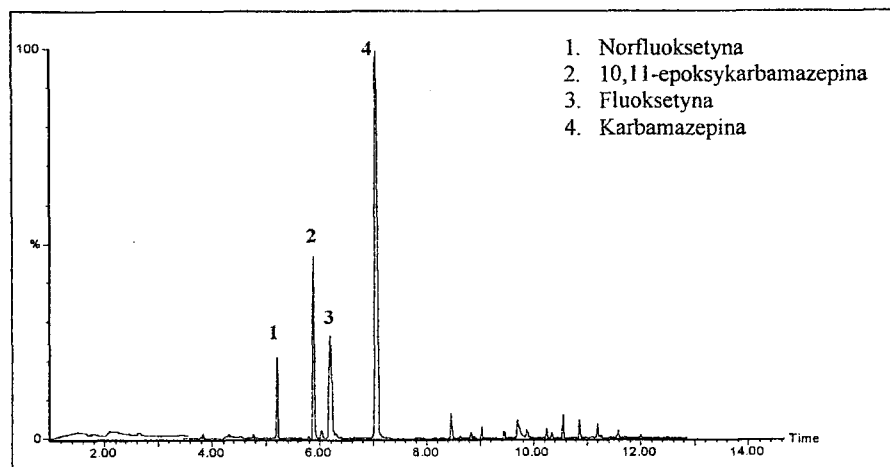


Ryc. 3A. Chromatogram HPLC fluoksetyny we krwi. Standard wewnętrzny (IS) – doxepin.

Ryc. 3B. Chromatogram HPLC karbamazepiny we krwi. Standard wewnętrzny (IS) – metakwalon.

Fig. 3A. HPLC chromatogram of fluoxetine in extract of blood. Internal standard (IS) – doxepine.

Fig. 3B. HPLC chromatogram of carbamazepine in extract of blood. Internal standard (IS) – metaqualone.



Ryc. 4. Analiza próby krwi metodą GC/MS.

Fig. 4. GC/MS analysis of an extract of blood.

OMÓWIENIE

Zastosowane warunki w analizie metodą chromatografii cienkowarstwowej umożliwiły wykazanie w materiale sekcyjnym obecności karbamazepiny i fluoksetyny. Należy zwrócić uwagę, że użyty do uwidaczniania na chromatogramie stref substancji rozdzielonych odczynnik Marquisa pozwolił na rozróżnienie obu tych leków (karbamazepina–żółta barwa, fluoksetyna–brązowo/czerwona barwa). W przypadku zastosowania odczynnika Dragendorffa i jodoplatynianu dla fluoksetyny jak i karbamazepiny otrzymano prawie identyczne zabarwienie. Najlepszym układem rozwijającym okazały się układy: metanol:amoniak (100:1,5) oraz octan etylu:metanol:amoniak (85:10:5). Układy te umożliwiły poprawne rozdzielanie wykrytych leków i zadowalające ich oczyszczenie z produktów rozkładu i tła biologicznego.

W literaturze brak danych na temat analizy fluoksetyny w materiale biologicznym metodą chromatografii cienkowarstwowej i wydaje się, że zastosowane w niniejszej pracy warunki analizy można z powodzeniem wykorzystać do identyfikacji tego leku w materiale sekcyjnym.

W omawianym przez nas przypadku zatrucia lekami analiza spektrofotometryczna nie dała zadowalających rezultatów. Uzyskane dla ekstraktów biologicznych krzywe absorpcji były przesunięte w porównaniu z krzywymi absorpcji wzorcowych leków: fluoksetyna i karbamazepina. Nawet wstępny rozdział ekstraktów materiału biologicznego metodą TLC i analiza spektrofotometryczna odpowiednich stref eluowanych z chromatogramu cienkowarstwowego nie pozwoliła na jednoznaczną identyfikację leków.

Kolejnym etapem analizy toksykologicznej była analiza metodą wysokosprawną chromatografią cieczową. Ze względu na zły rozdział mieszaniny obu leków w tych samych warunkach zdecydowano się na zastosowanie dwóch różnych, specyficznych dla analizowanych leków toków analitycznych. Proponowane przez el-Yazigi (6) i Bonato i wsp. (2) warunki analizy zmodyfikowano poprzez zmianę szybkości przepływu eluentu (fluoksetyna) oraz zmianę polarności eluentu (karbamazepina). Zastosowane warunki analizy chromatograficznej umożliwiły uzyskanie poprawnych chromatogramów, pozwalających na ilościową ocenę analizowanego materiału.

Odpowiedni dobór warunków analizy metodą GC/MS (pkt. d) umożliwił równoczesną analizę obu tych leków w badanym materiale biologicznym (1 nastrzyk na kolumnę w ilości 1 µl ekstraktu). W oparciu o dane zawarte w bibliotece widm masowych Willey'a możliwym było potwierdzenie w analizowanych próbach obecności metabolitów karbamazepiny i fluoksetyny – 10,11-epoksykarbamazepiny i norfluoksetyny. Dzięki elektronicznemu systemowi sterowania przepływem gazu nośnego, jak również kolumnie chromatograficznej (PE-5) o dużej stabilności termicznej możliwe jest uzyskanie bardzo dobrych rozdzielczości dla szerokiego spektrum związków różniących się właściwościami fizyko-chemicznymi. Należy zwrócić uwagę, że odpowiedni dobór warunków analizy, umożliwiający w jednym toku analitycznym identyfikację nawet kilku leków jest szczególnie ważny w przypadku, gdy mamy do czynienia z zatruciem złożonym oraz gdy dysponujemy małą ilością materiału do badań.

Oznaczone w próbie krwi oraz w wycinkach narządów wewnętrznych stosunkowo wysokie poziomy obu leków wskazują na przyjęcie ich w nadmiernej dawce a ostry efekt toksyczny, który w końcowym stadium doprowadził do zgonu, mógł być następstwem wzajemnego oddziaływania tych leków.

WNIOSKI

Wyniki pełnej analizy toksykologicznej materiału biologicznego pobranego w czasie sekcji zwłok, przeprowadzonej wiarygodnymi metodami analitycznymi są istotnymi elementami oceny zatrucia.

Zastosowane w pracy warunki analityczne chromatografii cienkowarstwowej i wysokosprawną chromatografią cieczową mogą być z powodzeniem wykorzystane do oceny jakościowej i ilościowej karbamazepiny i fluoksetyny w materiale biologicznym pobranym w czasie sekcji zwłok.

Zastosowane w podanym przypadku warunki analizy techniką chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem masowym wraz z możliwością korzystania z biblioteki widm masowych mogą być z powodzeniem zastosowane do oznaczania w materiale biologicznym karbamazepiny i fluoksetyny.

PIŚMIENICTWO

1. Alvarez JC, Bothua D, Collignon I, Advenier C, Spreux-Varoquaux O: Determination of Fluoxetine and its metabolit norfluoxetine in serum and brain using High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1998, 707, 175–180. –2. Bonato PS, Ache P, Carvalho D, Lanchote VL: Measurement of carbamazepine and its main biotransformation products in plasma by HPLC. *J. Anal. Toxicol.* 1992, 16, 88–92. –3. Borkowski T: Metoda wyosabniania trucizn organicznych z materiału biologicznego. *Arch. Med. Sąd. i Krym.* 1968, 18, 95–100. –4. Crifasi JA, Le NX, Long C: Simultaneous identifications and quantitation of fluoxetine and its metabolite, norfluoxetine, in biological samples by GC–MS. *J. Anal. Toxicol.* 1997, 21, 415–419. –5. Elyas AA, Goldberg VD, Lascelles PT, Ratnaraj N: Routine monitoring of carbamazepine and carbamazepine–10,11–epoxide in plasma by high-performance liquid chromatography using 10–metoxycarbamazepine as internal standard. *J. Chromatogr.* 1982, 231, 93–101. –6. el-Yazigi A, Raines DA: Concurrent liquid chromatographic measurement of fluoxetine, amitriptyline, imipramine, and their active metabolites norfluoxetine, nortriptyline, and desipramine in plasma. *Ther. Drug. Monit.* 1993, 15, 305–309. –7. Ferslew KE, Hagardorn AN, Harlan GC, Mc Cormick WF: A fatal drug interaction between clozapine and fluoxetine. *J. Forensic Sci.* 1998, 43, 1082–1085. –8. Gerardin A, Dubois JP, Moppert J, Geller L: Absolute bioavailability of carbamazepine after oral administration of a 2 % syrup. *Epilepsia.* 1990, 31, 334–338. –9. Hallbach J, Vogel H, Guder WG: Determination of lamotrigine, carbamazepine and carbamazepine epoxide in human serum by gas chromatography mass spectrometry. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997, 35, 755–759. –10. Janowska E: Wykrywanie i oznaczanie amizepiny w materiale biologicznym w przypadku śmiertelnego zatrucia tym lekiem. *Z Zagadnień Kryminalistyki* 1983, 16–17, 63–68.
11. Romanyshyn LA, Kucharczyk N, Shumaker RC, Sofia RD, Ward D, Wichmann JK: Simultaneous determination of felbamate, primidone, phenobarbital, carbamazepine, two carbamazepine metabolites, phenytoin, and one phenytoin metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Ther. Drug. Monit.* 1994, 16, 90–99. –12. Rothe M, Pragst F, Thor S, Hunger J: Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subject. *Forensic Sci. Int.* 1997, 84, 53–60. –13. Tsaprounis CK, Gorrod JW, Kajba M: Simultaneous determination of carbamazepine and its major metabolites in human plasma and urine by HPLC. *J. Clin. Pharm. Ther.* 1991, 16, 257–262

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM w Bydgoszczy
ul. M. Curie-Skłodowskiej 9
85–094 Bydgoszcz