

ARCHIWUM MEDYCyny SĄDOWEJ I KRYMINOLOGII

TOM XLIX
Nr 2(1999)
kwiecień
czerwiec

ORGAN POLSKIEGO TOWARZYSTWA MEDYCyny SĄDOWEJ I KRYMINOLOGII

REDAKTOR NACZELNY: Dr med. *Erazm Baran*

ZASTĘPCA REDAKTORA NACZELNEGO: Dr med. *Jerzy Kunz*

SEKRETARZ REDAKCJI: Lek. med. *Krzysztof Woźniak*

KOLEGIUM REDAKCYJNE:

Dr hab. *Krzysztof Krajewski*, Prof. dr hab. *Władysław Nasiłowski*,

Prof. dr hab. *Stefan Rąszejka*, Prof. dr hab. *Karol Sliwka*,

Prof. dr hab. *Barbara Świętek*, Prof. dr hab. *Bożena Turowska*.

Adres Redakcji: 31-531 Kraków, ul. Grzegórzecka 16

E-mail: mpwoznia@cyf-kr.edu.pl

SPIS TREŚCI

PRACE ORYGINALNE

B.Bujak-Giżycka, R. Korona, M. Kłys: Badania nad przydatnością metod ekstrakcji
wybranych ksenobiotyków z materiału biologicznego 67

R.Pawłowski, S.Boluk-Sobolewska: Polimorfizm glikoproteiny α -2-HS w populacji
Polski północnej badany metodą izoelektroogniskowania (IEF) 79

PRACE POGLĄDOWE.

Z.Jankowski, R.Hauser, T.Gos, K. Wiśniewski: Padaczka: patogeneza, przyczyny
śmierci 87

PRACE KAZUISTYCZNE

A. Gross: Uduszenie gwałtowne w trakcie czynności autoerotycznych 95

G.Teresiński, R.Mądro: Odtworzenie okoliczności potrącenia przez samochód oso-
bowy na podstawie zdjęć radiologicznych stawów kolanowych ofiary wypadku . . . 103

M.Albert, A.Soja, J.Kulikowska, H.Sybirska: Problemy analityczno-diagnostyczne
w przypadku samobójczego zatrucia pochodną fenotiazyny i 1,4-benzodiazepiny 109

BIBLIOGRAFIA

E. Baran: Bibliografia polskich prac naukowych z zakresu medycyny sądowej i dzia-
łów pokrewnych za rok 1998 115

LISTY DO REDAKCJI 129

OD REDAKCJI 133

KOMUNIKATY 78, 134

Beata Bujak-Giżycka*, Rafał Korona, Małgorzata Kłys***

Badania nad przydatnością metod ekstrakcji wybranych ksenobiotyków z materiału biologicznego

Studies on the usefulness of several extraction methods for sampled xenobiotics from biological matrix

* Z Katedry Medycyny Sądowej CM UJ

Kierownik: prof. dr hab. B. Turowska

** Z Katedry Toksykologii CM UJ

Kierownik: prof. dr hab. J. Brandys

W pracy podjęto próbę porównania różnych metod ekstrakcji, w tym ekstrakcję w układzie ciecz–ciecz bez i ze wstępnym odbiałczeniem próbki oraz ekstrakcję na fazach stałych (SPE) związków z grupy opiatów (morfina, kodeina i tebaina) oraz trójcyklicznych leków przeciwdepresyjnych (amitryptylina i doksepina – TCA). W wyniku badania stwierdzono, że wszystkie rodzaje ekstrakcji dają dobre wyniki w przypadku amitryptyliny i doksepiny, zaś dla opiatów najlepsze rezultaty uzyskano stosując zmodyfikowaną ekstrakcję w układzie ciecz–ciecz.

The pretreatment of biological samples is a very important process before identification in toxicological analysis. In this paper the authors try to compare several extraction methods for two groups of xenobiotics: opiates (morphine, codeine, thebaine) and tricyclic antidepressants (amitriptyline, doxepin – TCA) from biological matrix. Three methods of isolation were tested: liquid–liquid extraction without (EN) or with peptide precipitation (EA) and solid phase extraction (SPE). It was found that all types of tested isolation methods produced positive results in group of TCA, but the modified liquid–liquid extraction was the best method for the opiate group.

Słowa kluczowe: ekstrakcja, matryca biologiczna

Key words: extraction, biological matrix

WSTĘP

Podstawową i najbardziej rozpowszechnioną metodą izolacji ksenobiotyków z tkanki biologicznej jest ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz (Liquid–Liquid Extraction – LLE). Polega ona na rozdzieleniu ksenobiotyku pomiędzy dwie nie mieszające się fazy: wodną i organiczną, zgodnie z prawem podziału Nernsta (8,10). Wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu tego typu ekstrakcji zależą zarówno od rodzaju badanego ksenobiotyku, użytego rozpuszczalnika jak i od rodzaju i stanu chemicznego tkanki biologicznej. Ze względu na to, że metoda ta, w wielu przypadkach, cechuje się stosunkowo niską wydajnością, zaś ekstrakty mogą wykazywać znaczny stopień zanieczyszczenia, dąży się do modyfikacji i poszukiwania innych metod izolacji ksenobiotyków (14).

Jedną z metod, która zyskuje sobie coraz większą popularność jest ekstrakcja w układzie ciało stałe–ciecz (Solid–Phase Extraction – SPE) (2–7,9). Zwłaszcza ostatnie lata przyniosły duży postęp w tej dziedzinie. Coraz więcej firm ma w swojej ofercie wiele rodzajów kolumn SPE z przeznaczeniem do różnych celów.

Pierwsze wzmianki o zastosowaniu SPE w procesie przygotowania próbek moczu odnotowano w 1970 roku (7). W roku 1978 firma Waters Associates wyprodukowała kolumny Sep–Pak (7), których zaletą, oprócz możliwości uzyskiwania dobrych wyników, były małe rozmiary. Od tej pory zainteresowanie SPE wśród analityków zaczęło wzrastać. W ciągu ostatnich kilkunastu lat ekstrakcja na fazach stałych stała się skuteczną techniką służącą do przygotowywania próbek biologicznych dla klinicznej i toksykologicznej analizy ksenobiotyków.

Ekstrakcja na fazach stałych jest procesem, w którym rozdział ksenobiotyku następuje pomiędzy ciekłą fazę ruchomą a stałą fazę stacjonarną, odwracalnie adsorbującą cząsteczki ksenobiotyku, pochodzące z ekstrahowanego materiału. Fazę stacjonarną stanowi związany silica–gel, w którym końcowe grupy silanolowe zostały zastąpione przez różne organiczne molekuly. Mogą one zawierać, oprócz łańcucha alkilowego, różne grupy funkcyjne, których rodzaj decyduje o adsorpcji odpowiedniego ksenobiotyku. Do ekstrakcji większości narkotyków (w tym opiatów) polecane jest użycie mieszanych wypełnień – niepolarnego C8 i silnie kationo–wymennego. Na rycinie 1 przedstawiono schemat kolejnych etapów ekstrakcji na fazach stałych.

Ekstrakcja na fazach stałych opiera się na podobnych mechanizmach jakie istnieją w chromatografii cieczowej (LC–Liquid Chromatography), jednakże stosowana bywa do rozdzielenia i izolacji istotnych związków chemicznych z próbek matrycy biologicznej oraz ich zagęszczenia w końcowym etapie.

Praca jest próbą odpowiedzi na pytanie, czy istotnie i w jakim stopniu wybrana do eksperymentu niniejszej pracy ekstrakcja na fazach stałych jest lepsza, w odniesieniu do wybranych leków z grupy opiatów oraz trójęcyklicznych antydepresantów, w porównaniu ze standardową procedurą ekstrakcji w układzie ciecz–ciecz.

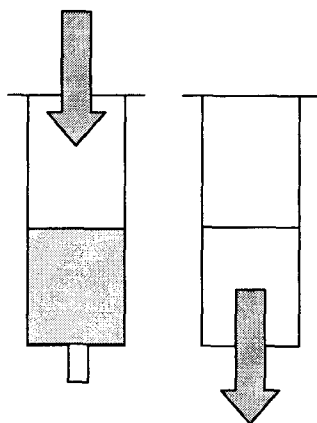
MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzono doświadczenia na materiale standardowym eksperymentalnym, tj. krwi i moczu, próbkach pobranych od osób niezatrutych, sekcjonowa-

nych w Zakładzie Medycyny Sądowej CMUJ w Krakowie. Do próbek dodano pojedynczo badane ksenobiotyki, które stanowiły: morfina, kodeina i tebaina (opiaty) oraz amitryptylina i doksepina (przeciwdepresyjne leki trójcycliczne –

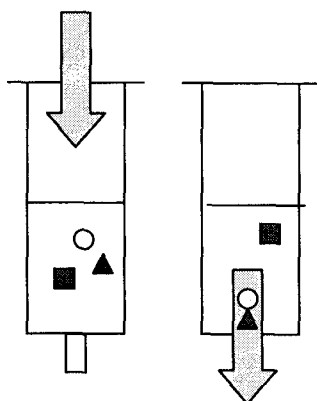
1. Aktywacja kolumny

1. Column conditioning



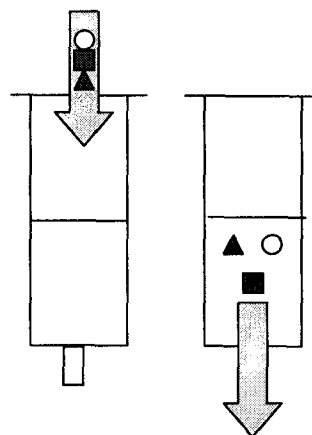
3. Przemycie kolumny

3. Column washing



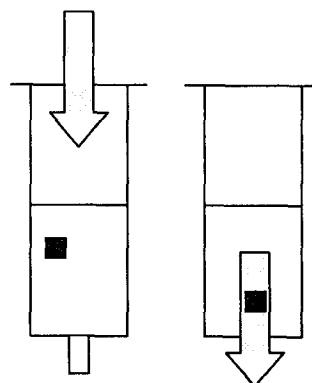
2. Naniesienie próbki

2. Applying the sample



4. Elucja ksenobiotyku

4. Elution of xenobiotic



Oczyszczony i zagęszczony
izolowany związek, gotowy do analizy
Purified and concentrated
isolate ready for analysis

○ ▲ -niepożądane składniki matrycy
undesired matrix components

■ -zaadsorbowany ksenobiotyk
adsorbed isolated

Ryc. 1. Etapy procesu ekstrakcji na fazach stałych.

Fig. 1. Following stages of Solid-Phase Extraction.

TCA) w stężeniach 5 i 10mg/g tkanki każdy. Następnie tak przygotowane próbki poddano izolacji według następujących procedur analitycznych:

1. ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz (EN), bez wstępnego odbiałczania próbki
2. ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz ze wstępnym odbiałczaniem próbki (EA)
3. ekstrakcja na fazach stałych (SPE), kolumny z wypełnieniem firmy Baker (Bakerbond, C18)

Na wstępie, dla każdego stężenia przygotowano cztery próbki po 2ml krwi i moczu. Materiał przeznaczony do ekstrakcji na fazach stałych i zmodyfikowanej ciecz–ciecz odbiałczano, dodając 3 ml acetonitrylu. Po wytrząśnięciu i odwirowaniu supernatant zadano 2ml buforu TRIS pH=9, a następnie przeprowadzono dalszą analizę według poniższego schematu:.

1. Ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz

Nieodbiałzone próbki zadano po 2ml buforu TRIS i 6ml mieszaniny ekstrahującej: chloroform–izopropanol–heptan (50:17:33) (opiaty) lub aceton–chloroform (1:1) (TCA). Wytrząsano 15 minut, rozdzielono fazy organiczną i wodną na sączkach Whatmann.

2. Ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz z odbiałczaniem próbki

Próbki po odbiałczeniu zadano 2 ml mieszaniny ekstrahującej (jak w p.1), wytrząsano 15 minut, po czym rozdzielono fazy na sączkach Whatmann.

3. Ekstrakcja na fazach stałych

Przygotowano kolumny w ten sposób, że odważano po 500 mg fazy do szklanej tuby, zabezpieczonej po obu stronach fazy spiekem (firmy Baker), a następnie kolumny z wypełnieniem zaktywowano, przepuszczając pod działaniem próżni kolejno 2ml metanolu i 2ml buforu TRIS. Na tak przygotowane kolumny naniesiono badane próbki, przepuszczono przez kolumnę z szybkością przepływu 1,5–2ml/min. Kolumny przemyto 2ml wody dejonizowanej, 1ml buforu TRIS i 2ml metanolu, suszono pod działaniem próżni ok.15 minut. Wyekstrahowano badane ksenobiotyki za pomocą 2ml mieszaniny i postępowano jak w p.1

Otrzymane według wybranych procedur eluaty odparowano do sucha na łaźni wodnej w temp. 37°C. Suche pozostałości przeniesiono do 150 µl metanolu.

Identyfikacji i oznaczenia ilościowego badanych ksenobiotyków w materiale biologicznym dokonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej za pomocą chromatografu cieczowego Merck–Hitachi, wyposażonego w kolumnę chromatograficzną Lichrosphere 60, 125–4 select B (5µm), przedkolumnę Lichrosphere 60 RP select B 4–4 (5µm), detektor diodowy UV (DAD) pracujący w zakresie 200–400 nm, pompę tłokową typ L–6200A, komputer IBM z oprogramowaniem D–6000 DAD/Menager, oraz autosampler 2000A.

Zastosowano fazę ruchomą w systemie gradientowego przepływu fazy o składzie: bufor trietyloamonowy TEA pH=3 – acetonitryl, szybkość przepływu 1ml/min.

WYNIKI I DYKUSJA

Na otrzymanych chromatogramach zidentyfikowano badane ksenobiotyki na

podstawie ich indeksów retencji oraz widm UV w zakresie 200–400 nm w przekrojowej długości fali $\lambda=215\text{nm}$. Konfrontując otrzymane wysokości pików oraz pola powierzchni dla poszczególnych stężeń ksenobiotyków w próbkach wyznaczono krzywe regresji oraz współczynniki korelacji w zakresie badanych wielkości. Próbowano wyznaczyć różnice w wartościach opisujących krzywe regresji dla leków wzorcowych i ekstrahowanych (Tabela I), poszukując wymiernego efektu opisującego wpływ matrycy biologicznej na wartości parametrów analitycznych.

Obliczono na podstawie wielkości pola powierzchni pików wydajność ekstrakcji (odzysk) poszczególnych ksenobiotyków względem czystych wzorców (Tabela II). Sprawdzono również, czy istnieje korelacja pomiędzy poszczególnymi metodami ekstrakcji (Tabela III) dla poszczególnych ksenobiotyków.

W celu zilustrowania rezultatów zamieszczono także histogramy przedstawiające wydajność poszczególnych rodzajów ekstrakcji w zależności od stężenia ksenobiotyku (ryc. 2–4).

Tabela I. Wartości współczynników korelacji (r) pomiędzy wielkością pola powierzchni i wysokości pików a stężeniem badanych ksenobiotyków bez obciążenia i w materiale biologicznym dla różnych metod ekstrakcji.

Table I. Comparison of correlation rates (r) between peak area or peak height and concentration of examined xenobiotics with and without biological balast for different extraction methods.

Material biologiczny Biological matrix	Rodzaj ekstrakcji Type of extraction								Ksenobiotyk Xenobiotic
	CIECZ–CIECZ bez odbiałczania (EN) LIQUID– LIQUID (EN)		CIECZ–CIECZ z odbiałczaniem (EA) Modified LIQUID–LIQUID (EA)		SPE – Baker SPE – Baker		Czysty wzorzec Pure compound		
	Wartość współczynnika korelacji (r) Correlation rates (r)								
	Pole pow. piku Peak area	Wysokość piku Peak height	Pole pow. piku Peak area	Wysokość piku Peak height	Pole pow. piku Peak area	Wysokość piku Peak height	Pole pow. piku Peak area	Wysokość piku Peak height	
Krew Blood	0.0320	0.3664	0.1171	0.7193	—	—	0.9755	0.9404	MORFINA
Mocz Urine	0.0969	0.2275	0.2146	0.1782	—	—			MORPHINE
Krew Blood	0.0782	0.0034	0.5107	0.6194	0.3891	0.3820	0.9757	0.8439	KODEINA
Mocz Urine	0.1615	0.2608	0.1871	0.0840	0.1663	0.5137			CODEINE
Krew Blood	0.0193	0.0337	0.4062	0.4570	0.2955	0.4187	0.9757	0.9141	TEBAINA
Mocz Urine	0.0582	0.2083	0.0318	0.0419	0.2323	0.478			THEBAINE
Krew Blood	0.9195	0.8561	0.8635	0.8414	0.6852	0.9357	0.9894	0.8892	AMITRYPTYLINA
Mocz Urine	0.9788	0.9487	0.8862	0.9502	0.8398	0.0679			AMITRIPTYLINE
Krew Blood	0.8900	0.8313	0.8753	0.9363	0.6175	0.8313	0.9871	0.9908	DOKSEPINA
Mocz Urine	0.9907	0.9781	0.9097	0.9516	0.8619	0.9781			DOXEPIN

Tabela II. Zestawienie wydajności różnych metod ekstrakcji dla badanych ksenobiotyków.

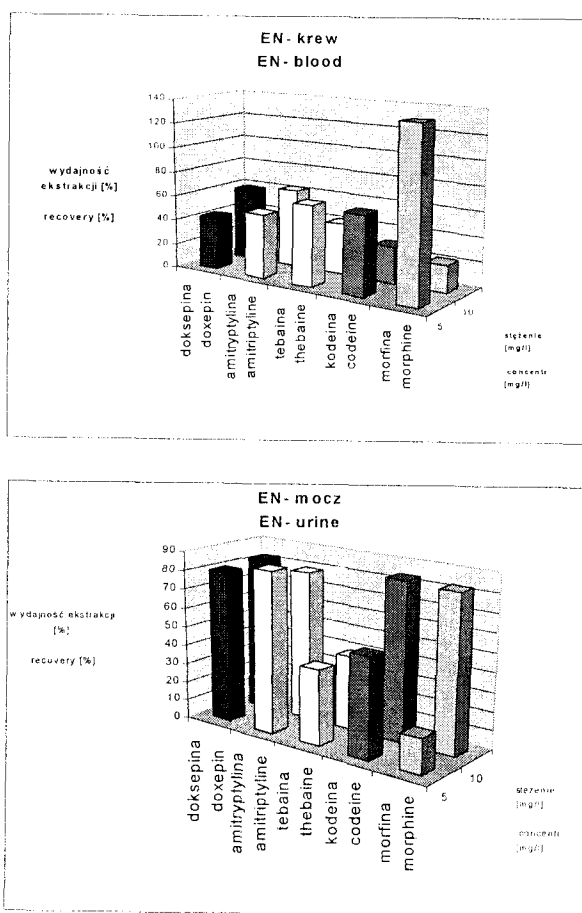
Table II. Recovery for different extraction – procedures of xenobiotics examined.

Stężenie (mg/l) Concentration (mg/l)	WYDAJNOŚĆ EKSTRAKCJI (%) n=4 RECOVERY (%) n=4						Ksenobiotyk
	Krew Blood			Mocz Urine			Xenobiotic
	Ekstrakcja ciecz–ciecz (EN) Liquid–liquid extraction (EN)	Ciecz–ciecz z odbiactza- niem (EA) Modified liquid–liquid extraction (EA)	Ekstrakcja na fazach stałych (SPE) Solid– phase extraction (SPE)	Ekstrakcja ciecz–ciecz (EN) Liquid–liquid extraction (EN)	Ciecz–ciecz z odbiactzaniem (EA) Modified liquid– liquid extraction (EA)	Ekstrakcja na fazach stałych (SPE) Solid– phase extraction (SPE)	
5.0	135.8 ± 16.8	35.3 ± 12.9	—	18.7 ± 1.9	11.6 ± 0.7	—	MORFINA
10.0	21.9 ± 5.2	30.1 ± 5.5	5.8 ± 2.0	82.5 ± 4.4	16.1 ± 0.8	9.6 ± 3.5	MORPHINE
5.0	63.9 ± 5.0	23.0 ± 11.0	24.5 ± 6.8	52.2 ± 11.1	23.5 ± 7.2	20.1 ± 1.6	KODEINA
10.0	29.9 ± 3.6	44.2 ± 9.7	10.4 ± 1.0	86.6 ± 29.3	35.5 ± 4.1	38.5 ± 12.4	CODEINE
5.0	65.0 ± 12.0	36.1 ± 9.8	38.8 ± 2.0	36.9 ± 4.4	37.5 ± 2.6	43.6 ± 0.5	TEBAINA
10.0	41.6 ± 14.2	49.4 ± 4.5	34.2 ± 2.1	39.1 ± 30.1	49.4 ± 8.9	44.8 ± 10.3	THEBAINE
5.0	51.9 ± 5.3	59.4 ± 2.0	51.2 ± 10.6	84.7 ± 2.9	56.9 ± 0.2	51.1 ± 6.4	AMITRYPT.
10.0	63.6 ± 3.7	66.6 ± 0.7	63.6 ± 11.0	79.0 ± 4.0	52.7 ± 10.3	74.3 ± 2.4	AMITRIPT
5.0	43.1 ± 4.6	51.9 ± 8.7	46.1 ± 3.3	80.0 ± 1.7	43.8 ± 0.4	44.0 ± 2.4	DOKSEPINA
10.0	58.9 ± 5.3	62.0 ± 1.4	70.2 ± 7.1	82.3 ± 1.9	65.4 ± 2.4	52.5 ± 5.9	DOXEPIN

Tabela III. Korelacja pomiędzy odzyskami dla poszczególnych rodzajów ekstrakcji.

Table III. Correlation between recovery for different types of extraction.

Ksenobiotyk Xenobiotic	KORELACJA CORRELATION					
	KREW BLOOD			MOCZ URINE		
	SPE–EA	SPE–EN	EA–EN	SPE–EA	SPE–EN	EA–EN
MORFINA MORPHINE	—	—	0.67	—	—	0.99
KODEINA CODEINE	0.14	0.99	0.18	0.99	0.90	0.86
TEBAINA THEBAINE	0.36	0.99	0.44	0.70	0.89	0.30
AMITRYPTYLINA AMITRIPTYLIN	0.82	0.40	0.20	0.86	0.94	0.63
DOKSEPINA DOXEPIN	0.94	0.22	0.11	0.42	0.61	0.98



a

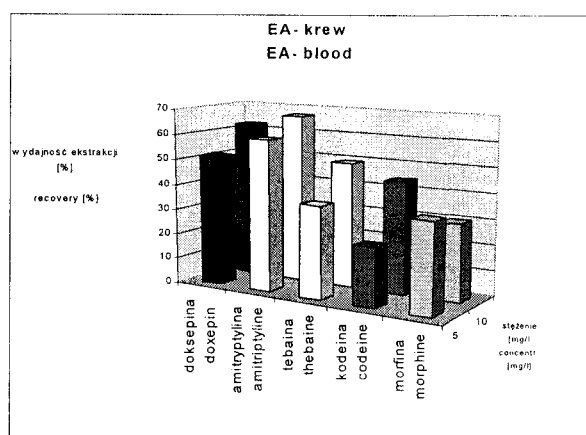
b

Ryc. 2. Odzysk w ekstrakcji ciecz–ciecz (EN) dla krwi (a) i moczu (b).

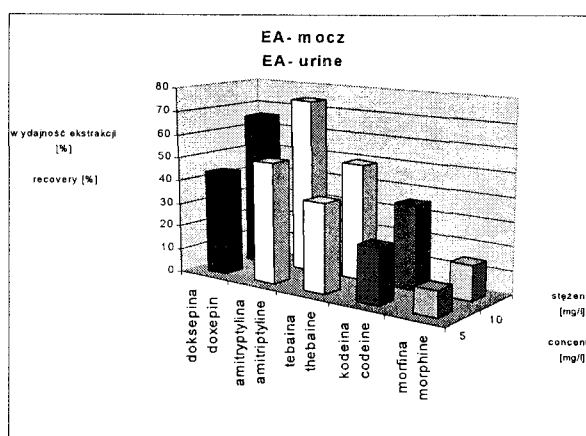
Fig. 2. Recovery of five tested xenobiotics isolated from blood (a) and urine (b)–liquid–liquid extraction (EN).

Analizując wpływ matrycy biologicznej na wartości parametrów analitycznych wzorców leków – wysokości i pola powierzchni w zależności od ich stężenia – obserwowano widoczne różnice liczbowe w wartościach tych parametrów wyrażonych poprzez współczynniki korelacji dla czystych wzorców i obciążonych tłem biologicznym (Tab. I). Punkty tworzące krzywe regresji dla leków obciążonych matrycą biologiczną na podstawie wysokości pików amitryptyliny i doksepiny przedstawiają dość duży rozrzut a w konsekwencji, współczynniki korelacji mieszczą się w większym przedziale wartości w porównaniu z czystymi wzorcami. Wpływ matrycy biologicznej zatem w sposób istotny modeluje precyzję, obniżając ją znacząco. Jeszcze większy rozrzut uzyskano dla opiatów, a współczynniki korelacji dla tych ksenobiotyków ujmujące zależności pomiędzy rozważanymi parametrami analitycznymi przyjmują znacząco mniejsze wartości

w porównaniu z TCA. Przeprowadzone badania potwierdzają znane z innych doświadczeń wyniki o możliwościach obniżania się precyzji różnych parametrów analitycznych pod wpływem tła biologicznego (11,12,13).



a

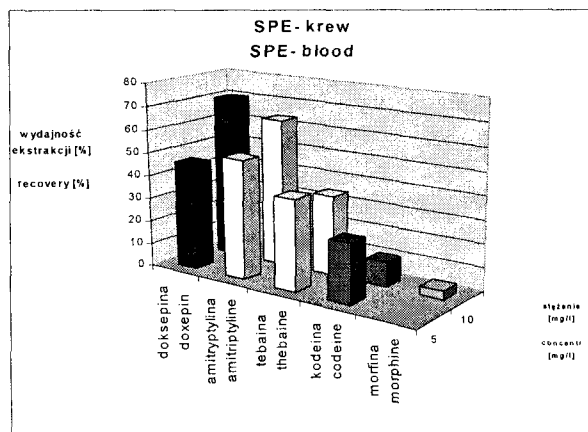


b

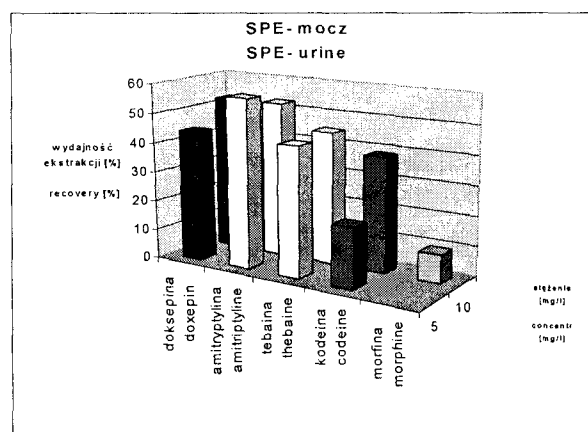
Ryc. 3. Odzysk w ekstrakcji ciecz–ciecz z odbiałczaniem (EA) dla krwi (a) i moczu (b).

Fig. 3. Recovery of five tested xenobiotics isolated from blood (a) and urine (b)–modified liquid–liquid extraction (EA).

Biorąc pod uwagę fakt, że kolumny były przygotowywane do analizy przez analityka, nie można wykluczyć negatywnego wpływu na precyzję oznaczeń innych czynników związanych ze sposobem przygotowania kolumny, jak chociażby niejednakowe zapewne upakowanie fazy w każdej kolumnie.



a



b

Ryc. 4. Odzysk w ekstrakcji na fazach stałych (SPE) dla krwi (a) i moczu (b).

Fig. 4. Recovery of five tested xenobiotics isolated from blood (a) and urine (b)–solid-phase extraction (SPE).

Wydajności ekstrakcji dla opiatów, zwłaszcza morfiny, były niższe niż w przypadku trójcyclicznych antydepresantów. Analizując wartości liczbowe wydajności ekstrakcji (Tab.II), stwierdza się, że najbardziej korzystne odzyski uzyskano w ekstrakcji z odbiałczaniem (SPE, EA). Ekstrakty otrzymane tymi metodami wykazują większy stopień czystości w porównaniu z metodą ekstrakcji ciecz–ciecz bez odbiałczania.

Porównując poszczególne metody izolacji dla wybranych ksenobiotyków między sobą należy zwrócić uwagę na zbliżone wartości odzysku, otrzymane metodami SPE i EA, zarówno dla krwi jak i moczu, oraz stosunkowo dużą zgodność pomiędzy SPE i EN oraz EA i EN dla moczu, w odniesieniu do grupy trójcyclicznych antydepresantów. W grupie opiatów stwierdzono najwyższe

zgodności pomiędzy metodami SPE i EN dla krwi oraz pomiędzy wszystkimi metodami dla moczu.

Analizując tak szczegółowo wyniki uzyskane różnymi metodami ekstrakcyjnymi trzeba sobie postawić pytanie o faktyczną ocenę przydatności faz SPE użytych w przedstawionych eksperymentach.

Według wielu autorów (2–7, 9), SPE wykazuje przewagę w porównaniu z ekstrakcją w układzie ciecz–ciecz, pod względem takich cech, jak: selektywność, czystość ekstraktów, brak tworzenia emulsji, zmniejszone zużycie rozpuszczalników, uzyskanie większej powtarzalności wyników, krótszy czas przygotowania i możliwość zastosowania większej automatyzacji. Ten rodzaj ekstrakcji jednakże wymaga znacznego nakładu kosztów, związanego z zakupem odpowiednich urządzeń oraz kolumnienek do ekstrakcji.

W naszych doświadczeniach, pomimo zastosowania kolumnienek z wypełnieniem najbardziej uniwersalnej, niepolarnej fazy C_{18} , którą można wykorzystywać do ekstrakcji związków niepolarnych i polarnych, wydaje się ona być bardziej przydatna do ekstrakcji leków z grupy TCA niż opiatów. Uwzględniając ponadto koszt aparatury oraz czasochłonność w posługiwaniu się metodą ekstrakcji na fazach stałych, zdecydowano stosować w analizach rutynowych ekstrakcję ciecz–ciecz z odbiałczaniem, głównie ze względu na wystarczającą czystość ekstraktów, szybkość, prostotę i niski koszt.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że dobrane procedury okazały się najmniej korzystne w stosunku do morfiny. Metodyka w odniesieniu do tego związku wymaga więc dopracowania. Należałoby się zastanowić nad doбором innych warunków prowadzenia analizy. Wyniki uzyskane dla pozostałych ksenobiotyków są zadowalające, wskazując wręcz na fakt, że do izolacji amitriptyliny czy doksepiny można zastosować wszystkie trzy rodzaje ekstrakcji z dobrym rezultatem.

Komentując rodzaj użytych ekstrakcji, nie potwierdzono tezy o szczególnej przydatności ekstrakcji na fazach stałych w naszych analizach. Wydaje się, że może być ona metodą alternatywną, a biorąc pod uwagę czynnik ekonomiczny, może być mniej przydatna niż np. ekstrakcja w układzie ciecz–ciecz z odbiałczaniem, która pozwala otrzymać stosunkowo czyste ekstrakty i wysoki odzysk. Otrzymane wyniki i wnioski z nich wypływające są przydatne w praktyce rutynowych analiz toksykologicznych materiału biologicznego.

Ekstrakcja z materiału biologicznego stanowi bardzo wrażliwe ogniwo w procedurze chemiczno-toksykologicznej. Badania nad przydatnością różnych metod ekstrakcji ciągle wzbudzają zainteresowanie, bowiem nie opracowano dotychczas doskonałej metody izolacji ksenobiotyków z materiału biologicznego. Wiele stosowanych szeroko procedur ma swoje zalety i wady, najważniejsze jest to, aby je znać dokładnie i umieć sobie radzić z pojawiającymi się stale problemami.

PIŚMIENNICTWO

1. Bogusz M.: Correction of retention index values in high-performance liquid

chromatography as a tool for comparison of results obtained with different octadecyl silica phases. *J. Chromatogr.* 1987, 387, 404–409. –2. Chen X.–H., Franke J.P., Ensing K., Wijsbeek J., de Zeeuw R.A.: Pitfalls and Solution in the Development of a Fully Automated Solid–Phase Extraction Method for Drug Screening Purposes in Plasma and Whole Blood. *J. Anal. Toxicol.* 1993, 17, 421–426. –3. Chen X.–H., Franke J.P., Wijsbeek J., de Zeeuw R.A.: Isolation of acidic, neutral and basic drugs from whole blood using a single mixed–mode solid–phase extraction column. *J. Anal. Toxicol.* 1992, 16, 351–355. –4. Chen X.–H., Franke J.P., de Zeeuw R.A.: Solid–phase Extraction for Systematic Toxicological Analysis. *For. Sci. Rev.* 1992, 4, 147–159. –5. Chen X.–H., Hommerson A.L.C., Zweipfenning P.G.M., Franke J.P., Harmen–Boverhof C.W., Ensing K., de Zeeuw R.A.: Solid–Phase Extraction of morphine from whole blood by means of Bond Elut Certify columns. *J. For. Sci.* 1993, 38, 668–676. –6. Chen X.–H., Wijsbeek J., Franke J.P., de Zeeuw R.A.: A Single–Column Procedure on Bond Elut Certify for Systematic Toxicological Analysis of Drugs in Plasma and Urine. *J. For. Sci.* 1992, 37, 61–71. –7. Chen X.–H., Wijsbeek J., van Veen J., Franke J.P., de Zeeuw R.A.: Solid–Phase Extraction for the screening of acidic, neutral and basic drugs in plasma using a single–column procedure on Bond Elut Certify. *J. Chromatogr.* 1990, 529, 161–166. –8. Danzer K., Than E., Molch D., Kuechler L.: *Analitika. Przegląd systematyczny.* WNT Warszawa 1993. –9. Degel F.: Comparison of New Solid–Phase Extraction Methods for Chromatographic Identification of Drugs in Clinical Toxicological Analysis. *Clinical Biochemistry.* 1996, 29, 529–540. –10. Hartstra J., Franke J.P., Bosman J., Kłys M., Bogusz M., de Zeeuw R.A.: Development of a Database of Standardized Retention Indices of Toxicologically Relevant Substances on an RP–HPLC System. *J. Anal. Toxicol.* (w druku)

11. Kłys M.: Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową DAD w ekspertyzie toksykologicznej. *Acta Poloniae Toxicologica.* 1994, 2, 41–54. –12. Kłys M.: Z badań nad tłem biologicznym w aspekcie analizy toksykologicznej. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1996, 26, 21–26. –13. Kłys M., Białka J., Klementowicz W.: HPLC z detekcją diodową w rutynowej analizie chemiczno–toksykologicznej. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1995, 25, 17–25. –14. Kłys M., Brandys J., Białka J., Kurowska W.: Postępy w opiniowaniu zatruc lekami. Złożone zatrucia lekowe w materiale krakowskiego Zakładu Medycyny Sądowej. *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1988, 38, 103–110.

Adres pierwszego autora:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej CM UJ

31–531 Kraków

ul. Grzegórzecka 16.

K O M U N I K A T

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM we Wrocławiu oraz Oddział Wrocławski PTMSiK organizują Seminarium Szkoleniowe na temat: „Opiniowanie sądowo lekarskie w przypadkach odszkodowań i uszczerbku na zdrowiu związanych z zawałem mięśnia sercowego i wirusowym zapaleniem wątroby”.

Seminarium odbędzie się w dniach 9–10 czerwca 1999 r. w Ośrodku Wczasowym AM „Fregata” w Zagórzcu Śląskim. Organizatorzy planują wykłady specjalistów – konsultantów z zakresu kardiologii i chorób zakaźnych.

Celem Seminarium jest dokonanie wymiany doświadczeń poszczególnych Zakładów Medycyny Sądowej i stosowanych w nich zasad orzekania oraz ujednolicenie zasad opiniowania w zakresie będącym przedmiotem tego spotkania.

Adres organizatorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM we Wrocławiu
50-368 Wrocław
ul. J. Mikulicza Radeckiego 4

Ryszard Pawłowski, Sylwia Boluk-Sobolewska

Polimorfizm glikoproteiny α -2-HS w populacji Polski północnej badany metodą izoelektroogniskowania (IEF)

Polymorphism of α -2-HS glycoprotein in Polish population analysed using isoelectricfocusing (IEF)

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

Praca przedstawia badania nad polimorfizmem białka α -2-HS w populacji Polski północnej. W próbie populacyjnej 225 niespokrewnionych osób stwierdzono występowanie 3 alleli i 4 fenotypów. Allel α -2-HS*1 występuje z częstością 0.680 a allel α -2-HS*2 z częstością 0.318. Badana próbka populacyjna znajduje się w stanie równowagi opisanej równaniem Hardy'ego-Weinberga. Układ charakteryzuje się stosunkowo niską heterozygotycznością (0.422) oraz niskim współczynnikiem PIC (0.34). Przydatność systemu α -2-HS do badań w genetyce sądowej jest nieduża.

This paper presents polymorphism analysis of the α -2-HS protein in the North Polish population. In a population sample of 225 unrelated individuals 3 alleles and 4 phenotypes were found. Frequencies of allele α -2-HS*1 and α -2-HS*2 are 0.680 and 0.318 respectively. The analysed population sample is in a Hardy-Weinberg equilibrium. System characterises low heterozygosity (0.422) and PIC index (0.34). Usefulness of the system in forensic genetics is low.

Słowa kluczowe: glikoproteina α -2-HS, genetyka populacyjna, genetyka sądowa, izoelektroogniskowanie

Key words: α -2-HS glycoprotein, population genetics, forensic genetics, isoelectricfocusing

WSTĘP

Glikoproteina α -2-HS (AHSG) należy do frakcji alfa białek surowicy krwi ludzkiej. Po raz pierwszy została opisana jako α -2-Z-globulina przez Heremans'a w 1960 roku (7). Dokładniejszą analizę właściwości fizykochemicznych AHSG

przewodzą w latach sześćdziesiątych Schmidt i wsp.(13), Heimbürger i wsp.(6) i Schultze i wsp. (14). Syntetyzowana jest jak większość białek surowicy w wątrobie, a jej stężenie w surowicy wynosi 40–85 mg/dL. Locus AHSG znajduje się na trzecim chromosomie obok locus transferyny (20).

Pośród nielicznych dotychczas opisanych funkcji biologicznych tego białka najważniejszą wydają się być: udział w formowaniu kości (20) i w rozwoju embrionalnym (5). Pomimo, że funkcja tego białka nie jest dobrze poznana, to jego wysokie stężenie w tkance kostnej i wysokie powinowactwo do jonów wapnia sugeruje, że AHSG bierze udział w jej syntezie, a konkretnie w procesie mineralizacji kości. Należy do grupy mniejszych glikoprotein (49 kDa). Zbudowana jest z 2 łańcuchów polipeptydowych A (288 aminokwasów) i B (27 aminokwasów) połączonych mostkiem siarczkowym. Oba łańcuchy są glikozylowane. Łańcuch A w czterech miejscach a łańcuch B w jednym miejscu. Łańcuchy ulegają translacji z pojedynczego transkryptu mRNA razem z łączącym je fragmentem, który następnie ulega proteolizie w trakcie obróbki potranslacyjnej. Punkt izoelektryczny (pI) w formie natywnej białka mieści się w zakresie pH od 4,5 do 5,0. Desialilacja glikoproteiny α 2-HS, poprzez działanie neuraminidazy, zmieniając ładunek białka, podwyższa punkt izoelektryczny białka do pH 5,5 (8).

Genetyczny polimorfizm α 2-HS został odkryty w 1977 roku przez Anderson'a i Anderson'a (1) przy użyciu elektroforezy dwukierunkowej łączącej IEF w pierwszym kierunku z SDS-PAGE w drugim kierunku. Zidentyfikowane w tym czasie dwa „typy” białka (L i N) odpowiadają produktom: AHSG*1 i AHSG*2. W 1983 roku Cox i wsp. (4) wykorzystali izoelektroogniskowanie i immunofiksację do badania polimorfizmu AHSG. Wykorzystując ww. technikę zidentyfikowali trzy allele w tym dwa powszechnie występujące: AHSG*1 i AHSG*2. Częstości ich występowania w populacjach europejskich dla AHSG*1 wynoszą od 0,6 do 0,7 a dla AHSG*2 od 0,25 do 0,4 (4). Dalsze badania prowadzone w różnych grupach etnicznych pozwoliły na wyróżnienie, biorąc pod uwagę masę i punkt izoelektryczny, trzech podstawowych fenotypów AHSG: 1–1, 2–1, 2–2 i rzadkich wariantów charakterystycznych dla niektórych populacji. Najlepsze jak dotychczas możliwości rozdzielenia alleli AHSG daje metoda opracowana przez Yuasa i Umetsu (20) wykorzystująca izoelektroogniskowanie w żelu poliakryloamidowym połączone z immunoblottingiem. Wykazali, że polimorfizm AHSG jest związany ze strukturalnymi wariantami łańcuchów polipeptydowych, a konkretnie z pojedynczymi podstawieniami w obydwu łańcuchach polipeptydowych. Największą ilość wariantów AHSG opisano w populacji japońskiej, w której dotychczas zidentyfikowano siedem wariantów: AHSG*5, AHSG*6, AHSG*7, AHSG*8, AHSG*9, AHSG*12, AHSG*15 (19,20). W populacjach europejskich warianty AHSG pojawiają się bardzo rzadko (5).

Celem niniejszej pracy było: 1/ opracowanie warunków rozdzielenia oraz detekcji izobiałek glikoproteiny α 2-HS, 2/ określenie częstości rozkładu alleli w próbce populacyjnej z obszaru Polski północnej oraz 3/ porównanie homogenności rozkładu częstości alleli w badanej populacji z innymi populacjami.

MATERIAŁY I METODY

Oznaczanie fenotypów AHSG w surowicy niespokrewnionych osób.

Do badań użyto 225 próbek surowicy od niespokrewnionych zdrowych osób obu płci, zamieszkujących teren Gdańska. Świeże próbki surowicy ogniskowano bezpośrednio po pobraniu lub przechowywano w temp. -20°C do momentu badania.

Izoelektoogniskowanie (IEF) glikoproteiny α -2-HS: Próbki rozdzielano w 450 μm żelu poliakryloamidowym (5% T, 3% C) zawierającym 5% amfolinę (Pharmalyt pH 4,2–4,9 i Pharmalyt pH 4,5–5,4 zmieszane w proporcji 1:1), 17% (w/v) sacharozę oraz 8% (w/v) ACES jako separator. Jako anolitu i katolitu używano odpowiednio 0,1 M H_3PO_4 i 0,2 M NaOH. Żel preogniskowano (Ultraphor LKB) przez ok. 45 min. rozpoczynając od 150 V do momentu osiągnięcia 550 V (przy parametrze stałej mocy). Próbki nanoszono w odległości ok. 2 cm od anody. Po 25 min. rozdziału prowadzonego przy stałym napięciu (550 V), ogniskowano przy stałej mocy przez 75 min. począwszy od 1200 V. Przez cały czas elektroforezy układ chłodzono cieczą o temp. 5°C .

Detekcja fenotypów glikoproteiny α -2-HS przy użyciu techniki immunoblottingu.

Po IEF w żelu poliakryloamidowym białka przenoszono na membranę nitrocelulozową drogą pasywnego transferu. Detekcję białka prowadzono z przeciwciałem króliczym przeciwko α 2-HS (Boehringer) postępując analogicznie jak opisano uprzednio (10).

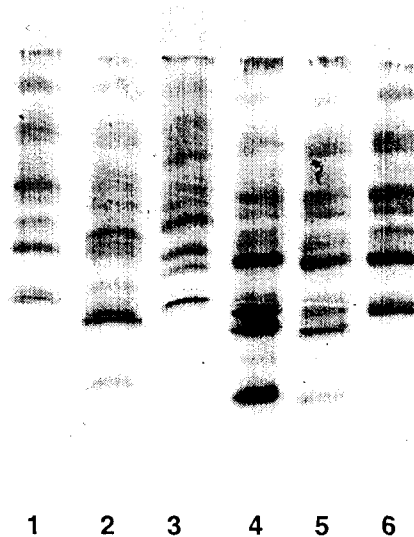
Obliczenia statystyczne prowadzono wg wzorów opisanych wcześniej (11).

WYNIKI I DYSKUSJA

Identyfikacja fenotypów AHSG w próbkach surowicy krwi metodą IEF.

W badanej populacji stwierdzono trzy powszechnie występujące fenotypy AHSG: AHSG 1–1, AHSG 2–1 i AHSG 2–2 oraz rzadko występujący fenotyp AHSG 3–1 (Ryc.1 ścieżka 3). Obrazy fenotypów AHSG są złożone i składają się z wielu elektroforetycznych frakcji. Najniższy punkt izoelektryczny w stanie natywnym posiadają izobiałka kodowane przez allel AHSG*3 (ścieżka 3), znacznie wyższy punkt izoelektryczny charakteryzuje izobiałka kodowane przez najczęstszy allel AHSG*1, (ścieżki 1,6) natomiast zdecydowanie najwyższy punkt izoelektryczny posiadają izobiałka kodowane przez AHSG*2 (ścieżka 2) wędrujące w stronę anody najwolniej.

Znaczne uproszczenie obrazu fenotypów AHSG uzyskuje się poprzez zastosowanie drogiej desjalilacji próbek surowicy krwi za pomocą neuraminidazy (8). Obraz staje się prosty na tyle, że możliwe jest uzyskanie pojedynczego prążka dla każdego z występujących alleli. W zastosowanych warunkach rozdziału i detekcji otrzymane wyniki nie budziły jednak wątpliwości interpretacyjnych.



Ryc. 1. Fenotypy AHSG obserwowane po IEF w 5% żelu poliakryloamidowym i immunoblottingu.

Fig. 1. Phenotypes of AHSG obtained after IEF on 5% polyacrylamide gel and immunoblotting.

Ścieżki 1–6 przedstawiają kolejno fenotypy: 1=1–1, 2=2–2, 3=3–1, 4=2–1, 5=2–1, 6=1–1.

Lanes 1–6 present the following phenotypes: : 1=1–1, 2=2–2, 3=3–1, 4=2–1, 5=2–1, 6=1–1.

Genetyka populacyjna AHSG

W grupie 225 niespokrewnionych osób z obszaru Polski Północnej stwierdzono obecność trzech alleli AHSG: AHSG*1, AHSG*2, AHSG*3 oraz czterech fenotypów AHSG: AHSG 1–1, AHSG 2–1, AHSG 2–2, AHSG 3–1 z sześciu teoretycznie możliwych.

Tabela 1 przedstawia rozkład częstości obserwowanych i oczekiwanych fenotypów AHSG oraz rozkład częstości genowych dla badanej populacji. W badanej populacji stwierdzono obecność trzech alleli, z których najbardziej powszechnym jest allel AHSG*1 stanowiący 68% badanej populacji. Allel AHSG*2 występuje z częstością 31,8%, natomiast AHSG*3 z częstością poniżej 0,5%.

Badanie zgodności rozkładu fenotypów obserwowanych i oczekiwanych z równaniem Hardy'ego-Weinberga (HW) przy zastosowaniu testu χ^2 nie wykazało odstępstwa od reguły dając wartość sumy $\chi^2 = 0,1545$ i $0,6 < P < 0,7$, dla 1 stopnia swobody.

Przedstawione w niniejszej pracy częstości alleli AHSG są zbliżone do częstości obserwowanych dla innych populacji europejskich, m.in.: niemieckiej (9,20), brytyjskiej (18), francuskiej (12), włoskiej (3). Tabela 2 pokazuje, że najczęściej występującymi allelami w wyżej wymienionych populacjach, tak jak w badanej populacji są allele AHSG*1 AHSG*2, które pojawiają się z częstością odpowiednio 0,625–0,7472 i 0,2507–0,375. W populacji Polski północnej został zidentyfikowany rzadko występujący wariant AHSG*3 (0,002) występujący również w innych populacjach europejskich (20). Porównanie częstości alleli AHSG*1 i AHSG*2 występujących w badanej populacji z częstościami obserwowanymi w populacji Niemiec, Wielkiej Brytanii, Francji nie wykazało znamienych statystycznie różnic dla alleli AHSG*1 i AHSG*2 (Tab. 2). Inny rozkład częstości alleli AHSG obserwuje się dla populacji Włoch (3). Allelem najczęściej występującym w tej populacji jest również AHSG*1 (0,7472). Częstość występowania AHSG*1 w populacji włoskiej znacznie przewyższa częstości występowania tego allela w innych populacjach europejskich szczególnie północno-europejskich. Wydaje się, że w miarę przesuwania się na południe Europy obserwuje się wzrost częstości występowania allela AHSG*1 przy jednoczesnym obniżeniu częstości występowania allela AHSG*2. Obok dwu powszechnie występujących alleli AHSG*1 i AHSG*2 w populacji włoskiej zidentyfikowano allel AHSG*10 typowy dla populacji afrykańskich, charakteryzujący się punktem izoelektrycznym znajdującym się pomiędzy produktami AHSG*1 i AHSG*2 (16).

Tabela 3 przedstawia statystyczne porównanie homogenności rozkładu częstości alleli pomiędzy populacją polską a innymi krajami. Porównanie rozkładu częstości alleli AHSG pomiędzy różnymi populacjami nie wykazało znamienych statystycznie różnic porównując populację polską z niemiecką, brytyjską i francuską. Natomiast znamienne statystycznie różnice w rozkładzie alleli AHSG zaobserwowano porównując populację polską i włoską (prawdopodobieństwo równe $P=0,0080$).

Obliczone wartości heterozygotyczności obserwowanej i oczekiwanej $\pm$ błąd standardowy są zbliżone (Tab. 1) i wynoszą odpowiednio 0.4222 i 0.43460 ± 0.0314 . Wartość PIC dla badanej próbki populacyjnej jest niska (0.34) świadcząc o niskim stopniu polimorfizmu, a tym samym o małej przydatności badanego białka do celów identyfikacyjnych. Jednak w przypadku braku możliwości wyizolowania DNA badanie polimorfizmu białka AHSG mogłoby niewątpliwie dostarczyć chociaż części informacji potrzebnej do identyfikacji osobniczej.

Tabela I. Rozkład obserwowanych i oczekiwanych częstości fenotypów AHSG oraz częstości genowych dla populacji Polski północnej.
Table I. Observed and expected frequencies distribution of AHSG phenotypes and allele frequency for population of Northern Poland.

Fenotyp Phenotype	Wartość obserwowana Observed number		Wartość oczekiwana Expected number		Częstość genowa Allele frequencies
	N	%	N	%	
1-1	105	46,7	104,2	46,3	AHSG*1=0,680 AHSG*2=0,318 AHSG*3=0,002
2-1	95	42,2	97,5	43,4	
2-2	24	10,7	22,7	10,1	
1-3	1	0,4	0,6	0,2	
Suma	225	100	225	100	1

H_{obs} =0.4222, Observed heterozygosity=0.4222; H_{oczek.}= 0.4346, Expected heterozygosity = 0.4346; błąd statystyczny dla h=0.0314, standard error h=0.0314; PIC=0.34

Tabela II. Porównanie częstości genowych alleli AHSG dla różnych populacji europejskich.
Table II. Comparison of AHSG allele frequencies for different European populations.

Kraj Country	N	Częstość (Frequency) AHSG*1	Częstość (Frequency) AHSG*2	Inne Others	Piśmiennictwo Bibliography
Niemcy (Germany, Münster)	168	0,625	0,375	–	(20)
Niemcy (Germany, Hessen)	197	0,655	0,340	0,005 a)	(9)
W. Brytania (UK)	382	0,6466	0,3469	0,0052 b) 0,0013 c)	(18)
Francja (France)	240	0,7167	0,2750	0,0083 b)	(12)
Włochy (Italy)	700	0,7472	0,2507	0,021 c)	(3)
Japonia (Japan)	400	0,7450	0,2475	0,0075 d)	(19)
USA (Biali Amerykanie)	150	0,6533	0,3467	–	(2)
Polska Płn. (North Poland)	225	0,680	0,318	0,002 b)	

a) niezidentyfikowany wariant (unidentified variant) b) AHSG*3 c) AHSG*10 d) AHSG*7 i AHSG*8

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

Table III. Comparison of homogeneity distribution of AHSG alleles among Polish and other European populations

Populacja (Population)	χ^2	P
PL x N 1 (20)	0,5493	0,4690±0,0158
PL x W.B. (18)	1,1062	0,3210±0,0148
PL x F (12)	2,0408	0,1470±0,0112
PL x N 2 (9)	2,7981	0,0950±0,0093
PL x W (3)	7,8252	0,0080±0,0028

Legenda: PL – Polska (Poland), N1 – Niemcy (Germany, Münster), W.B. – W. Brytania (UK), F – Francja (France), N2 – Niemcy (Germany, Hessen), W – Włochy (Italy).

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson N.L., Anderson N.G.: High resolution two dimensional electrophoresis of human plasma protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, 74, 5421–5425. –2. Boutin B., Feng S.H., Arnaud P.: The Genetic Polymorphism of Alpha-2-HS-Glycoprotein: Study by ultrathin-layer isoelectric focusing and immunoblot. *Am. J. Hum. Genet.* 1985, 37, 1098–1105. –3. Cerri N., De Ferrari F.: Genetic polymorphism of Alpha-2-HS-Glycoprotein in Lombardy (Italy), *Int. J. Legal Med.* 1991, 104, 77–79. –4. Cox D.W., Andrews B.J.: Silver stain immunofixation of Alpha-2-HS-Glycoprotein: a new method for detection of protein heterogeneity. *Electrophoresis* 1983,82, 243–247. –5. Hausmann R.: Genetic polymorphism of Alpha-2-HS-Glycoprotein in Northern Bavaria (Germany). *Simplified AHSG-Phenotyping by Isoelectric Focusing Using Dry Gels. J. Forensic Sci.* 1995, 40, 1068–71. –6. Heimburger N., Heide K., Haupt H., Schultze H.: Bausteinanalysen von Humanserumproteinen. *Clin. Chim. Acta* 1964,10,293–307. –7. Heremans J.F.: Les Globulines Seriques du Systemme gamma. Brussels, Arscia 1960, 103–105. –8. Lopez-Abadia I., Ruiz de la Cuesta J.M.: A simplified method for phenotyping alpha-2-HS-glycoprotein. *J. Forensic Sci.* 1993,38,1183–1186. –9. Mendner T.T., Kühnl P.: Alpha-2-HS-Glycoprotein polymorphisms. *Adv.Forensic Haemogenetics.* 1986, 1, 167–174. –10. Pawłowski R.: Polimorfizm podtypów białka GC surowicy ludzkiej w populacji Polski Północnej (obszar Gdańska). *Arch. Med. Sąd. Krym.* 1992, 42, 6–12.

11. Pawłowski R.: HUMFIBRA allele distribution in the Northern Poland using capillary electrophoresis. *Int J Legal Med.* 1999,112,139–141. –12. Robinet-Levy M., Yuasa I., Umetsu K., Ikebuchi J. Genetic polymorphism of Alpha-2HS-Glycoprotein in a French population. Description of two rare variants. *Hum.*

protein in a French population. Description of two rare variants. *Hum. Hered.* 1988, 38, 174–177. –3. Schmid K., Burgi W.: Preparation and properties of the human plasma Ba2-Alpha-2-Glycoproteins, *Bioch Bioph. Acta.* 1961, 47, 440–453. –14. Schultze H., Heide K., Haupt H.: Die mit Perchlorsäure nicht fällbaren Proteine des Humanserums. *Clin. Chim. Acta* 1962, 7, 854–868. –15. Thomas A.: Phenotyping of α -2-HS glycoprotein in bloodstains by isoelectric focusing and immunoblotting. *J. Forensic Sci. Soc.* 1989, 29, 325–330. –16. Umetsu K., Kashimura S., Ikeda N., Suzuki T.: Classification of alpha-2-HS-Glycoprotein (Alpha-2-HS) Types by Isoelectric Focusing. *Z. Rechtsmed.* 1983, 91, 33–35. –17. Weber K., Osborne M.: The reliability of molecular determinations by dodecyl sulfate– polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969, 244: 4406–4412. –18. Westwood S.A., Seaman P.J., O'Brian C., Thorogood L.J.: The phenotypic frequencies of Group-specific Component and Alpha-2-HS-Glycoprotein in three ethnic groups. The use of these protein as racial markers in forensic biology. *Forensic Sci. Int* 1987, 35, 197–207. –19. Yuasa I., Taira T., Suenaga K., Itok K., Okada K.: Determination of Alpha-2-HS Glycoprotein Phenotypes by Isoelectric Focusing and Immunoblotting: Polymorphic Occurrence of HSGA*5 in Okinawa. *Hum. Genet.* 1985, 70, 32–34. –20. Yuasa I., Umetsu K.: Genetic polymorphism of human alpha-2-HS-glycoprotein: Characterisation and application to forensic hemogenetics. *Electrophoresis* 1988, 9, 404–410.

Adres autorów:

Katedra i Zakład Medycyny Sądowej AM
80-210 Gdańsk
ul. Skłodowskiej-Curie 3a