

EUGENIUSZ GAJOS

Zagadnienia immunologiczne tkanek zwierzęcych w badaniach lekarsko – sądowych

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

Kierownik: prof. dr S. SLOPEK

Zakład Immunochemii

Kierownik: doc. J. LISOWSKI

W postępowaniu dowodowym zarówno w sprawach karnych jak i cywilnych ma miejsce lekarsko-sądowe badanie materiału biologicznego. Jako eksperci bywają powoływani lekarze weterynarii, jeżeli sprawy dotyczą zagadnień zwierzęcych tak w sprawach administracyjnych jak i laboratoryjnych analiz rozpoznawczych. Znaczna część takich badań laboratoryjnych jest wykonywana metodami serologicznymi, które obecnie są jedynymi próbami pozwalającymi ustalić w sposób niewątpliwy przynależność gatunkową rozpoznawanego materiału dowodowego takiego jak: krew, surowice krwi, mięso itp. Rozpoznawcze badania dokonywane przez biegłych mają udzielić miarodajnych odpowiedzi na dwa zasadnicze pytania, stawiane im przez Sądy lub przez organa ścigania karnego:

— jakie jest pochodzenie gatunkowe danego materiału dowodowego,

— czy może on pochodzić od określonego osobnika.

Uzyskiwane wyniki wykonywanych badań laboratoryjnych zależne są w znacznej mierze od stanu w jakim znajdują się dane dowody rzeczowe, od ilości materiału otrzymanego do wykonania badań rozpoznawczych, od aktualnych możliwości technicznych, wyboru metod i odczynników jakimi dysponują biegli przy dokonywaniu ekspertyz.

Problemy immunologii zwierzęcej mają kilka specyficznych aspektów lekarsko-sądowych. Są one mniej poznane aniżeli zagadnienia immunologii ludzkiej, istnieje w nich znaczny stopień skomplikowania wynikający z istnienia dużej ilości gatunków i ras zwierzęcych, ich krzyżówek, różnego stopnia pokrewieństwa powstającego z chowu wsobnego, obecności hybrydów itp. Z wymienionych powodów istnieje wielka różnorodność mozaik antygenowych w zakresie krwinek i białek ustrojowych. Nie ułatwia też zagadnienia fakt traktowania produktów zwierzęcych (będących niekiedy dowodami rzeczowymi) działaniem wysokiej temperatury lub przypraw jak to ma miejsce w przypadkach: potraw, wędlin, konserw itp., z tym jednak, że postępowanie takie jest normalnym i przyjętym powszechnie dla tego rodzaju przetworów mięsnych.

Uogólniając zatem można stwierdzić, że materiał dowodowy pochodzenia zwierzęcego jest znacznie skromniejszy aniżeli materiał pochodzenia ludzkiego, jeśli chodzi o jego różnorodność

oraz sytuację w jakich zostaje pobierany. Wynika to z faktu, że zwierzę (zwierzęta) są zawsze przedmiotem nigdy natomiast nie występują jako sprawcy przestępstw.

Oznaczenie przynależności gatunkowej białek zwierzęcych

Oznaczenie przynależności gatunkowej krwi świeżej lub w postaci plam na dowodach rzeczowych (po uprzednim stwierdzeniu obecności barwika krwi metodami spektralnymi) oraz mięsa i innych tkanek (bez wykonywania wstępnych badań spektralnych) wykonuje się najczęściej metodą precypitacji, jakkolwiek znane są także inne metody badań serologicznych. Należy jednak podkreślić, że trudne do wykonania i nie zawsze udające się próby wiązania dopełniacza oraz anafilaksji nie znalazły szerszego zastosowania w praktyce lekarsko-sądowej do wykrywania białka ludzkiego podobnie jak i do białek zwierzęcych.

W obecnym czasie, po około 70-cio letnim doświadczeniu, zarówno wytwarzanie surowic precypitujących jak też interpretacja wyników odczynu precypitacji jest już zagadnieniem rutynowym, tak że biegli sądowi bez większych trudności potrafią ustalić pochodzenie gatunkowe materiału ludzkiego czy zwierzęcego. W przypadkach białek zwierzęcych możliwym jest stwierdzenie lub wykluczenie przynależności gatunkowej w odniesieniu do głównych gatunków zwierząt żyjących na terenie naszego kraju, stanowiących najczęstszy przedmiot analiz rozpoznawczych. Stosowanie odpowiednich surowic diagnostycznych produkowanych bądź przez Wytwórnice Surowic i Szczepionek bądź przez poszczególne Zakłady Naukowe umożliwia rozpoznawanie pochodzenia gatunkowego białek w sposób niewątpliwy. Aktualne możliwości techniczne są w zupełności wystarczające kiedy chodzi o stwierdzenie lub wykluczenie określonego gatunku zwierząt: koń, bydło, świnia, drób. Swoiciele reagujące surowice precypitujące pozwalają bowiem rozpoznawanie takie wykonać w zasadzie bezbłędnie z dużym procentem prawidłowych wyników dodatnich.

Jak dotąd stosunkowo proste zagadnienie przynależności gatunkowej białek zaczyna się komplikować od momentu kiedy dobro sprawy wymaga dokładnego identyfikowania białek

zwierzęcych w obrębie pokrewnych gatunków np: krowa-owca-koza, świnia-dzik, kura-indyk, kaczka-gęś. W naszych warunkach serologiczne różnicowanie białek konia-osła-muła-osłomuła-zebry, ma raczej znaczenie teoretyczne, niemniej jednak jest ono istotnym problemem immunologicznym.

W wymienionych przypadkach białek pokrewnych gatunków zwierząt uzyskuje się zwykle dodatnie wyniki odczynu precypitacji na zasadzie reakcji krzyżowych, których nasilenie wzrasta ze stopniem serologicznego pokrewieństwa zwierząt. Z uwagi na to, że trudno jest wyprodukować surowice precypitujące swoiste wyłącznie dla białek jednego tylko gatunku pokrewnych zwierząt dokonywano próby stosowania w badaniach różnicujących surowice diagnostyczne swoiste np. tylko dla zwierząt przeżuwiających lub tylko dla zwierząt jednokopytnych. W badaniach tych czynnikiem różnicującym pokrewne białka były różnice ilościowe w zakresie przeciwciał oraz nieco odmienny sposób reagowania pokrewnych antygenów białkowych. Wykonywano zatem odczyn próbówkowej precypitacji ilościowej w której na podstawie dokonywanych pomiarów wykreśla się krzywe, charakterystyczne dla danej surowicy precypitującej i dla badanych, pokrewnych antygenów. Należy jednak podkreślić że metoda ta jest dogodna w badaniach teoretycznych, w których dysponuje się preparatami oczyszczonych antygenów, daje ona wyniki znacznie trudniejsze do interpretowania w przypadkach mieszanin antygenowych a tym bardziej jeżeli materiał ten jest przypadkowy, niewiadomego pochodzenia, ulegający wpływom środowiska jak to ma często miejsce w przypadkach sądowych dowodów rzeczowych.

Duże możliwości w zakresie różnicowania pokrewnych białek stworzyła metoda precypitacji dyfuzyjnej wg Ouchterlony'a. Autor ten opisał zjawisko, które zależy od sposobu precypitowania dwóch antygenów w reakcji z tą samą surowicą precypitującą nazwał fenomenem identyczności zupełnej, częściowej lub niezależności antygenów. Zastosowanie tej metody badań do identyfikacji białek pokrewnych gatunków zwierząt pozwala dostrzegać pewne różnice w sposobie precypitacji zależnie od ich gatunkowej przynależności.

Osobny rozdział w serologii weterynaryjnej stanowi badanie materiału zwierzęcego poddanego działaniu podwyższonej temperatury. Uzyskiwanie dodatnich wyników serologicznego badania ogrzewanego materiału dowodowego zależy od obecności oraz ilości białek mających pewną oporność na działanie podwyższonej temperatury. Wiadomo, że poszczególne frakcje białkowe surowicy krwi ludzkiej cechują się określoną wrażliwością na działanie temperatury w zakresie 60—100°. Cecha ta jest niezależna od ilościowego występowania danego białka w surowicy w stanie rodzimym.

Jak stwierdzono doświadczalnie np. fibrynogen (2,5—5,0% zawartości w surowicy) nie był wykrywany odczynem precypitacji po ogrzaniu próbek surowicy w 65° w ciągu 15 minut. Prealbumina natomiast (0,5% zawartości w surowicy) była wykrywana w próbkach surowic ogrzewanych do 90—95° w ciągu 15 minut. Przedstawione przykładowo badania odnośnie ciepłostołości białek surowicy krwi ludzkiej należałoby sprawdzić także na materiale zwierzęcym, mogłoby to bowiem mieć zasadnicze znaczenie tak w badaniach teoretycznych jak i usługowych.

Oznaczanie grup krwi u zwierząt

Oznaczanie grup krwi u zwierząt nabiera obecnie coraz większego znaczenia, szczególnie zaś w sprawach natury zootechniczno-hodowlanej. Pozwala to na wykluczenie ojcostwa (macierzyństwa), identyfikację zwierząt, określanie pokrewieństwa przy chowie wsobnym, różnicowanie bliźniąt, jest ono także nieodzownym warunkiem wpisu do ksiąg rodowodowych a nawet dokonuje się prób łączenia cech grupowych krwi z cechami produktywności zwierząt.

Pewna ilość ogłoszonych prac dotyczyła zagadnień różnicowania gatunków zwierząt na podstawie różnic w cechach krwinkowych, co możnaby uważać za uzupełnienie odczynu precypitacji. Tak więc Landsteiner i Van der Scheer w 1934 roku badając surowice królicze anty-krwinki konia i anty-krwinki osła stwierdzili, że surowice te posiadają jednakowe miana wyjściowe dla obydwu tych zwierząt. Stosując jednak odpowiednią absorbcję autorzy ci wykazali, że u muła istnieją antygeny krwinkowe pochodzące od obydwu rodzicielskich gatunków oraz, że pokrewieństwo serologiczne muła jest bliższe koniowi niż osłu. Van Schieren w 1947 r., ogłosił badania podkreślające wagę dla identyfikacji bydła takich momentów jak oznaczanie grup krwi oraz odcisków śluzawicy na wzór badania linii papilarnych u ludzi.

O ile oznaczanie własności grupowych w próbkach świeżej krwi zwierzęcej jest wykonywane często a badań naukowo-teoretycznych wyjaśniających te zagadnienia ogłoszono wiele, to w przypadku lekarsko-sądowego badania krwi zwierzęcej w plamach na dowodach rzeczowych istnieje szereg przeszkód utrudniających lub wręcz uniemożliwiających wykonanie takich analiz, a mianowicie:

— dotychczas nie były wykonywane prace doświadczalne na temat badania grup krwi zwierzęcej w śladach krwawych, w mięsie lub w innych tkankach;

— na ogół znana jest mała oporność krwinek (antygenów krwinkowych) oraz hemaglutynin na denaturujące wpływy środowiska.

Z wymienionych powodów oznaczanie grup krwi zwierzęcych w plamach na dowodach rzeczowych napotyka na następujące główne trudności:

— w trakcie sporządzania wyciągów z plam krwawych z reguły nie uzyskuje się w nich całych krwinek, bowiem ulegają one niszczeniu działaniu warunków zewnętrznych (wysychanie, sposób przechowywania, rodzaj podłoża itp.), zatem niemożliwe jest wykonanie odczynu hemaglutynacji;

— podatność hemaglutynin na zniszczenie, częsta ich nieobecność już w świeżych surowicach zwierzęcych czyni niemożliwym dopełnienie zasadniczego warunku przestrzeganego w medycynie sądowej ludzkiej, gdzie aby oznaczenie grupowej przynależności krwi miało wartość dowodową musi opierać się zarówno na stwierdzeniu izo-antygenów jak też odpowiadających im izo-aglutynin grupowych, w tym samym materiale (z wyłączeniem wpływu podłoża na przebieg badania). Stwierdzenie tych dwóch elementów, wzajemnie się uzupełniających, określa przynależność grupową krwi w sposób niewątpliwy. Natomiast oznaczenie jednego tylko czynnika (izoantygenu lub izoaglutynin) nie może być wynikiem miarodajnym w tak poważnych badaniach.

Przedstawione trudności oznaczania cech grupowych krwi w zwierzęcym materiale dowodowym dla celów lekarsko-sądowych nie wykluczają potrzeby takich analiz, a wręcz przeciwnie sugerują konieczność podjęcia odpowiednich badań.

Oznaczanie grupowych cech białek surowic zwierzęcych

W obecnym stanie nauki o białkach istnieje możliwość różnicowania osobników zwierzęcych (a także ludzkich) na podstawie grupowych cech białek surowicznych. Cechy te istnieją niezależnie od właściwości grupowych krwinek, występują w określonych układach, dziedziczą się w odpowiedni sposób stanowiąc charakterystyczne właściwości osobnicze. Dotychczas wykonywane i opisywane były badania dotyczące świeżych surowic i plazmy krwi zwierzęcej. Wielu autorów uzyskało charakterystyczne i powtarzające się wyniki w których określone frakcje białkowe surowic krwi posiadają cechy różnicowane genetycznie, co umożliwia podział osobników i zaszeregowanie do określonych grup surowicznych. U ludzi jeden z takich podziałów odnosi się do haptoglobiny znanej w trzech ugrupowaniach. U bydła natomiast większe znaczenie w tym względzie posiadają białka transferyn, wykazujące polimorfizm genetyczny przejawiający się trzema grupami tych białek — transferyna A, D, E (Milot). Wykazano też istnienie dwóch typów hemoglobiny wołowej tzn. hemoglobinę A i B. Opisano także 6 typów beta-globuliny w surowicy krwi oraz stwierdzono, że białka te posia-

dają swe odpowiedniki we frakcjach białkowych mleka tych samych krów (Ashton). W surowicy krwi kozy znaleziono trzy typy beta-globuliny a w surowicy owcy aż cztery.

Podobnie też u koni w surowicy krwi Braend stwierdził obecność 16 typów beta-globuliny. Ashton u tych zwierząt wykazał ponadto istnienie trzech typów prealbumin oraz trzech typów alfa-globulin.

Stosując metodę elektroforezy dwukierunkowej w środowisku agar/skrobia, Ashton wykazał obecność trzech typów beta-globuliny u świń. Kristjansson opisał dwa typy prealbumin u tych zwierząt.

Czy oznaczanie grupowych cech białek surowicznych krwi zwierząt domowych znajdzie praktyczne zastosowanie w rozpoznawczych badaniach materiału dowodowego?

Oznaczanie systemów enzymatycznych w materiale zwierzęcym

Układy systematyczne niektórych enzymów zwierzęcych także wykazują istnienie odmian cechujących gatunki a nawet poszczególne osobniki. Badania takie były wykonywane na materiale surowic krwi lub lizatów krwinek zwierzęcych. Tak więc np.: elektroforetycznym badaniem surowic krwi zwierząt jednokopytnych stwierdzono, że dla surowic krwi konia, muła oraz osła-muła jest cechą charakterystyczną występowanie dwóch stref czynnościowych esterazy nieswoistej. W surowicy krwi osła obserwowano natomiast jedną tylko strefę czynności tego fermentu. Według tych badań, układ esteraz w surowicach krwi mułów jest taki, jaki istnieje u koni (Kaminski, Gajos). Wyniki te byłyby zgodne z wynikami Lasteinera i Van der Scheera, uzyskanymi na podstawie badania antygenów krwinkowych zwierząt jednokopytnych.

U bydła w surowicach krwi wykazano sześć fenotypów enzymu amylazy (Ashton), trzy typy fosfataz (Cahne). W lizacie krwinek czerwonych królika Grunder wykazał istnienie indywidualnych cech różnicujących w postaci trzech stref czynności esteraz.

Poza wymienionymi, badano inne jeszcze układy enzymów zwierzęcych. W pracach doświadczalnych posługiwano się materiałem świeżym. Czy, oraz w jakim stopniu badania takie możliwe będą do zastosowania w materiale nieświeżym jak dotychczas nie zostało jeszcze stwierdzone.

Omawiając zagadnienia sero-hematologii zwierzęcej należy stwierdzić, że aktualnie umożliwia ona wyjaśnienie szeregu problemów takich jak:

— oznaczanie przynależności gatunkowej białek zwierzęcych odległych gatunków,

— odróżnianie białek zwierzęcych od ludzkich,

— w pewnych przypadkach udaje się różnicować białka pokrewnych gatunków zwierząt lub ich hybrydów,

— oznaczanie przynależności gatunkowej mięsa surowego, w pewnych przypadkach także mięsa ogrzewanego oraz przetworów mięsnych.

— badanie ilościowe mieszanin mięs surowych,

— oznaczanie cech grupowych krwi świeżej,

— oznaczanie grupowych cech świeżych surowic krwi zwierzęcych,

— oznaczanie niektórych układów enzymatycznych.

Dla celów lekarsko-sądowych niewyjaśnione

zupełnie lub niedostatecznie jeszcze zbadane pozostają takie zagadnienia jak:

— możliwości i sposoby oznaczania cech grupowych w próbkach krwi zwierzęcej nieświeżej, zhemolizowanej lub zasuszonej w plamach,

— oznaczanie cech grupowych białek surowiczych w nieświeżej krwi, mięsie itp.,

— ustalanie przynależności gatunkowej materiału biologicznego ogrzewanego w temperaturze 95—100° i powyżej 100°.

P i s m i e n n i c t w o

Gajos E.: Badanie dowodów rzeczowych w weterynarii sądowej (w książce: Zakrzewski A., Zuliński T., Gajos E.: „Weterynaria sądowa”, w druku).

Adres autora: dr wet. Eugeniusz Gajos, Wrocław, ul. Koliątaja 34/5.

HODOWLA I ZOOHIGIENA

WIESŁAW PODGÓRSKI, TADEUSZ MAJEWSKI

Zachowanie się poziomu glutationu (GSH) we krwi zwierząt w okresie pastwiskowym i alkierzowym

Katedra Zoohigieny Wydziału Zootechnicznego WSR w Lublinie

Kierownik: prof. dr A. CHODKOWSKI

Glutation jest trójpeptydem składającym się z trzech aminokwasów: glicyny, cysteiny i kwasu glutaminowego. Występuje w organizmie w dwu formach, zredukowanej i utlenionej. Odgrywa dużą rolę w metabolizmie tkankowym (25), tym samym bierze udział w procesach wzrostu. Pośrednio wpływa na niektóre procesy czynnościowe komórek jak formowanie struktury mechanicznej poprzedzającej proces podziału (16), aktywność hormonów i inne funkcje biologiczne (26). Jako koenzym dehydrogenazy gliceraldehydo 3-fosforanowej (3, 22) bierze udział w cyklu glikolitycznym, w którym jest wytwarzana energia potrzebna do syntezy białek niezbędnych w procesach wzrostu.

Lazarow (12, 13) wykazał, że istnieje związek pomiędzy czynnością gruczołu tarczycowego a poziomem GSH we krwi. Wzmocniony poziom glutationu we krwi obserwowano po thyreoctomii lub po poddaniu preparatów hamujących czynność tarczycy — metyloвого tiouracylu i propylotiouracylu. Niekiedy wysoka sekrecja innych hormonów ustrojowych np. adrenokortikotropin lub adrenokortikoidów może spowodować zwiększony poziom GSH we krwi. Na podstawie przeprowadzonych badań Philipsa i Longdona (18) oraz Balla i Coopera (1) można wytłumaczyć wpływ sekrecji gruczołu tarczycowego na poziom GSH we krwi. Autorzy ci wykazali, że tyroksyna pobudza NADP nukleotyd trójfosforopirydynowy reduktazy cytochromowej C i dehydrogenazy glukozo 6-fosforanowej, tym samym oznacza to zmniejszenie zapotrzebowania na grupy SH i w związku z tym poziom GSH we krwi ulega zwiększeniu. Z liczo-

nych doniesień (2, 6, 13, 20) wynika, że na aktywność thyreoidalną wywiera wpływ temperatura środowisk. Ragsdale i wsp. (5, 21) stwierdzili, że istnieje zależność pomiędzy temperaturą środowiskową a przyrostem wagi ciała. W związku z powyższym wydawało się celowe prześledzenie poziomu GSH we krwi u krów i cieląt w zależności od warunków utrzymania zwierząt.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone w oborze Rolniczego Zakładu Doświadczalnego WSR w Lublinie w okresie 12 miesięcznym. Doświadczeniem objęto 4 szt. krów rasy n.c.b. w wieku około 6 lat będące w jednakowym okresie fizjologicznym oraz 3 szt. cieląt rasy n.c.b. w wieku ok. 1 roku. Roczny cykl badań podzielono na dwa okresy:

I — alkierzowy — zwierzęta przebywały stale w oborze,

II — pastwiskowy — zwierzęta tylko w nocy znajdowały się w pomieszczeniu zaś w dzień na pastwisku lub wybiegach.

W celu określenia poziomu glutationu we krwi u zwierząt, regularnie jeden raz w miesiącu od wspomnianych grup pobierano do badania krew z żyły jarzmowej.

Poziom glutationu we krwi określano metodą nitroprusydkową przy pomocy metodyki opisaną przez Gruner't'a i Philips'a (4). Pomiar kolorymetryczny wykonywano przy pomocy fotometru Pulfricha przy użyciu filtru S = 53 i kuwet 2 cm szerokości. Każda analizowana próba krwi była badana w 6 krotnych powtórzeniach.

W y n i k i

Poziom glutationu we krwi zwierząt w zależności od okresu utrzymania, określony w wyniku przeprowadzonych analiz chemicznych w