

PRACE MATERIAŁOWE, DYSKUSYJNE, KAZUISTYCZNE

BRONISŁAW MŁODZIEJOWSKI, ROMANA MŁODZIEJOWSKA

METODY PALEOSEROLOGICZNE W BADANIACH SZCZĄTKÓW KOSTNYCH

Z Akademii Spraw Wewnętrznych w Warszawie
Komendant: doc. dr habil. M. Lipka

Metody i techniki badawcze stosowane dotychczas w antropologii, w odniesieniu do szczątków kostnych wymarłych populacji, prowadziły zazwyczaj do odtworzenia obrazu człowieka w czasach prehistorycznych w aspekcie jego stanu fizycznego. Ustalenia te w zasadzie doprowadziły już do tego, że wszystko co można było powiedzieć o wartościach metrycznych, ciężarze, proporcjach szkieletów, płci, wieku i innych cechach fizycznych — zostało już powiedziane i prawdopodobnie dalsze prace nie przyniosą nowych rezultatów.

Tymczasem już w 1919 roku L. i H. Hirszfelldowie stwierdzili różną częstość fenotypów układu *ABO* w poszczególnych populacjach. Stwierdzenie to umożliwiło wykorzystanie metod serologicznych w badaniach współczesnych populacji, doprowadzając do powstania nowej metody analitycznej w antropologii — seroantropologii. Dalsze badania w tym zakresie wyodrębniły więcej układów grupowych, niezależnych od układu *ABO*, zarówno w czerwonych ciałkach krwi, jak i w surowicy. Ostatnie lata przyniosły jeszcze wyniki prac nad zróżnicowaniem grupowym białych ciałek krwi (system *HL-A*). Wszystkie te ustalenia zostały już wykorzystane do badań nad rozmieszczeniem grup krwi i częstością genów na różnych populacjach współcześnie żyjących.

Własności grupowe krwi są w zasadzie niezienne (z wyjątkiem bardzo rzadkich przypadków patologicznych) przez całe życie, a zatem tworzą one pewną charakterystykę biologiczną osobnika, która może być porównywana do takiej własności jaką jest np. jego płeć. Zrozumiałe jest zatem dążenie antropologów do podjęcia prac w tym zakresie również na materiałach szkieletowych, co umożliwiłoby porównywanie występowania grup krwi i częstości genów w populacjach współczesnych

i wymarłych. Należy przypuszczać, że badania tego typu pogłębią naszą wiedzę dostarczając wielu nowych informacji o populacjach przeszłych.

Pierwsze próby wypracowania nowych metod badawczych wynikały z zainteresowań medycznych i biochemicznych, dotyczących występowania substancji grupowych krwi układu *ABO* w płynach i tkankach ciała ludzkiego. Jako pierwsi zastosowali te metody William i Lyle Boydowie, którzy w 1933 roku opublikowali pracę o grupach krwi określonych na podstawie badania świeżej tkanki mięśniowej. W następnej z kolei pracy tych autorów materiałem badanym były już wysuszone, zmumifikowane mięśnie (specjalnie przygotowane), wreszcie podjęli badania zmumifikowanych tkanek zwłok mumii egipskich i amerykańskich (1937). Metodą, którą posługiwali się W. i L. Boydowie była technika podana przez Lattesę (1916), przy czym można ją było wykorzystać tylko w odniesieniu do tkanki mięśniowej. Próba zastosowania tej metody do badań tkanki kostnej nie powiodła się i dopiero P. B. Candela (1940) zmodyfikował ją wykazując jednocześnie jej przydatność przez uzyskanie porównywalnych rezultatów. Dalsze prace nad możliwością ustalania grup krwi układu *ABO* z tkanki kostnej doprowadziły do powstania szeregu nowych metod, które zresztą były i zapewne będą ciągle modyfikowane.

W niniejszej pracy przedstawimy jedynie trzy metody, a to dlatego, że są one najlepiej dotychczas poznane; wykonano przy ich użyciu wiele rutynowanych oznaczeń, poznano w dostatecznym stopniu ich wydolność pod względem czułości i swoistości, a także dlatego, że nie narażają zbyt wielu trudności materiałowych i technicznych (aparatura i odczynniki). Wspomniane metody to:

- absorpcyjna (dalsza modyfikacja metody „A” opisywanej przez M. Kouta i wsp., 1965)
- absorpcyjno-elucyjna (modyfikacja A. Fiori’ego i wsp. oraz innych autorów)
- fluorescencji przeciwciał (modyfikacja I. Lengyela, 1975).

Badania serologiczne tkanki kostnej obejmują, poza wskazanymi już ustaleniami grupowymi krwi w zakresie układu *ABO*, także ustalenia zmierzające do wykrycia pochodzenia gatunkowego. Sytuacje takie mogą mieć miejsce wówczas, gdy zachodzi konieczność ustalenia pochodzenia gatunkowego drobnych fragmentów kostnych, a nie można tego przeprowadzić metodą anatomiczno-morfologiczną, z powodu braku jakichkolwiek cech diagnostycznych. Z pewnością takich przypadków nie obserwuje się w praktyce zbyt wiele, niemniej w razie konieczności można stosować odpowiednie metody serologiczne.

Z wielu metod ustalania pochodzenia gatunkowego białka, do określeń na tkance kostnej nadają się metody:

- unieczynniania surowicy antyglobulinowej (wg R. Coombsa w modyfikacji J. Vacher’a i wsp.),

- elektroimmunoprecypitacji w zbuforowanym żelu agarowym (wg Z. Marka i wsp.),
- immunodyszfuzji (wg O. Ouchterlony'ego w modyfikacji B. Knighta i wsp.).

OKREŚLANIE PRZYNALEŻNOŚCI GATUNKOWEJ

Niezależnie od zastosowanej metody, czynnością wstępną jest zawsze sporządzanie ekstraktów z badanych kości, dlatego też wydaje się celowe podanie tej metodyki już na wstępie.

Dokładna analiza chemiczna kości wykazała, że większa część masy kości utworzona jest z warstw zwapniałej substancji międzykomórkowej, a pozostała, mała część stanowią komórki kostne (osteoblasty, osteocyty, osteoklasty), które liczniejsze są podczas rozwoju i wzrostu kośćca. Część organiczna, szczególnie nas interesująca, stanowi około 35% całej masy kości. Należy zatem dążyć do tego, aby z badanej próbki kości wyekstrahować jak najwięcej białek. Cel ten można osiągnąć wtedy, gdy stosunkowo duża powierzchnia kości poddana jest obróbce. Dlatego też kość rozdrabnia się na mączkę kostną, której sporządzenie nie jest trudne — polega ono na kruszeniu kości, mieleniu w młynku agatowym lub też rozdrabnianiu za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego.

B. Knight, E. Beattie i T. J. Muckle (1969), w celu uzyskania najlepszego wymywania próbek tkanki kostnej, opracowali następujący tok postępowania: mączkę kostną ekstrahuje się za pomocą roztworu soli fizjologicznej, buforu weronalowego i słabego roztworu amoniaku (0,01% o pH 9,0). Rozpuszczalniki te dają najwyższe stężenie, gdy około 300 mg mączki kostnej wytrząsa się z 3 ml mieszaniny rozpuszczalników. Probówki zamyka się, układa poziomo i pozostawia na 24 godziny w temperaturze pokojowej. Zawartość probówek następnie odwirowuje się i górną warstwę przenosi do małych, płaskodennych probówek. Umieszcza się je nad świeżo wysuszonym żelem krzemionkowym w eksykatorze próżniowym. W ciągu 24 godzin ekstrakty odparowują do 0,5 ml lub jeszcze mniejszej objętości i wówczas dopiero można je poddać badaniom.

1. Metoda unieczynniania surowicy antyglobulinowej wg R. Coombsa

Klasyczny odczyn antyglobulinowy Coombsa jest swoistym odczynem serologicznym wykrywającym w ludzkiej surowicy niekompletne przeciwciała odpornościowe. Podstawowym reagentem w tym odczynie jest swoista surowica otrzymana z krwi królików uczulonych frakcją globulinową białka ludzkiego, dająca reakcję tylko z globulinami ludzkimi. Powstające w organizmie królika przeciwciała antyglobulinowe mają charakter precypityny tzn. powodują wytrącanie się białka w roztworze wodnym. Precypityny te łączą się z niekompletnymi przeciwciałami pokrywającymi nadtrawione krwinki, powodując ich aglutynację.

Dla potrzeb serohematologii sądowej klasyczny odczyn Coombsa został zmodyfikowany. Stwierdzono, że ekstrakty (wyciągi) z płam krwi, tkanek miękkich i sproszkowanych kości ludzkich hamują działanie surowicy przecioglobulinowej, zaś wyciągi z tkanek zwierzęcych tego działania nie wykazują. Powyższe stwierdzenie umożliwiło określanie przynależności gatunkowej tkanek nową metodą, która okazała się bardzo czuła i swoista.

Podstawowymi odczynnikami są odpowiednie surowice przecioglobulinowe oraz krwinki grupy *ORhD(+)*, uczulone niekompletnymi przeciwciałami *anty-RhD*. Zarówno surowice jak i krwinki przechowuje się w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, przy czym krwinki powinny być zawsze świeże (do 3 dni). Tok postępowania podzielić można na kilka etapów:

- przygotowanie i uczulenie krwinek,
- przygotowanie i sprawdzenie surowicy,
- inkubowanie badanego wyciągu z surowicą,
- dodanie uczulonych krwinek i odczyt,
- kontrole dodatnie, ujemne i prawidłowości uczulenia krwinek.

Przebieg reakcji w metodzie unieczynniania surowicy przecioglobulinowej przedstawia następujący schemat.

1. Globulina ludzka + surowica przecioglobulinowa (— unieczynnienie surowicy) + krwinki *ORhD (+)* uczulone surowicą (*anty-Rh*) niekompletną = brak aglutynacji

2. Globulina zwierzęca + surowica przecioglobulinowa + krwinki *ORhD (+)* uczulone surowicą (*anty-Rh*) niekompletną = aglutynacja.

Kontrolę wykonuje się na mieszaninach uczulonych krwinek *ORhD(+)* z roztworem fizjologicznym soli, płynem koloidowym i surowicą przecioglobulinową oraz nieuczulonych krwinek z tymi samymi odczynnikami. Płyn koloidowy z zawiesiną uczulonych krwinek może dać słabą aglutynację. Wszystkie pozostałe kontrole powinny dać wynik ujemny.

Interpretacja wyników. Wynik ujemny tego odczynu jest wtedy, gdy na powierzchni badanych krwinek nie ma opłaszczających je przeciwciał niekompletnych lub też jeżeli surowica przecioglobulinowa została uprzednio związana z globulinami surowicy ludzkiej.

Na przedstawionym zjawisku unieczynniania surowicy przecioglobulinowej przez białko ludzkie oparta jest zasada zastosowania odczynu antyglobulinowego w celu ustalania przynależności gatunkowej kości i innych tkanek. Wielu autorów podaje różne modyfikacje tego odczynu oraz jego czułości: od 1 : 4000 do 1 : 800 000.

2. Metoda immunodyszfuzji w żelu agarowym

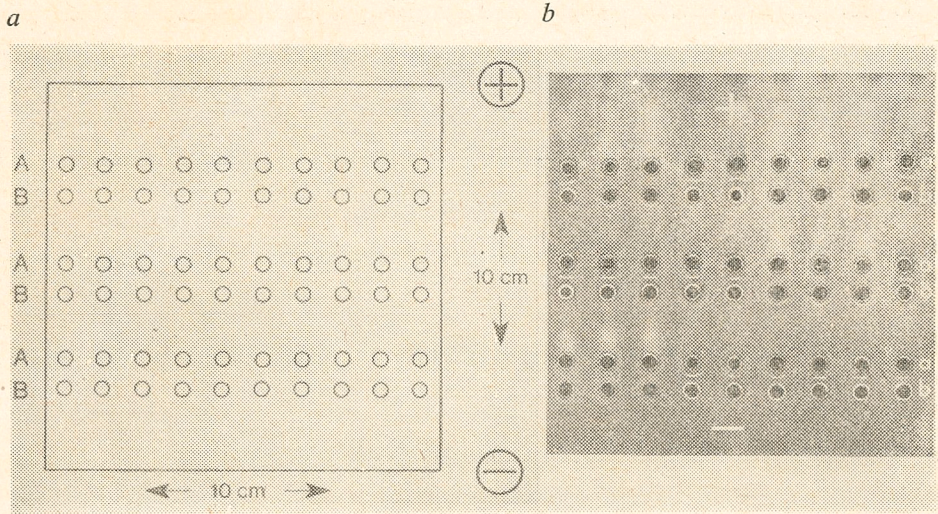
Precypitacja w żelu agarowym stanowi modyfikację klasycznej metody precypitacyjnej Uhlenhutha (1901). Reakcję surowicy odpornościowej (przeciwciała) z białkiem ludzkim (antygen) zawartym w badanym wyciągu przeprowadza się nie w środowisku płynnym lecz w stałym — jakim jest żel agarowy.

Ö. Ouchterlony (1949) w żelu agarowym, grubości 3 mm, wycinał otwory: jeden pośrodku (centralny), a pozostałe wokół niego w jednakowej odległości od centralnego i od siebie. W otwór centralny wkraplał surowicę odpornościową, pozostałe natomiast były napełniane badanymi wyciągami i, dla kontroli, jeden rozcieńczoną surowicą ludzką. Po upływie pewnego czasu pomiędzy wgłębieniami — centralnym i zawierającym białko ludzkie — powstawało pasmo precypitatu. M. Muller i wsp. (1958) zaproponowali modyfikację opisaną metody. Ponieważ proces dyfuzji w modyfikacji M. Mullera i wsp. trwa 2-4 dni, a ponadto zużywa się dużo surowic, wielu autorów, między innymi L. Hartmann i M. Toilliez (1957) i B. Knight (1969) dokonało dalszych modyfikacji (tzw. mikrometody).

Dla ustalania aktywności immunologicznej badanych kości modyfikację zaproponował B. Knight i wsp. (1969). W warstwie 1% żelu agarowego wycina się sześć zagłębień o średnicy 5 mm, wokół środkowego o średnicy 3 mm. Odległość między środkowym a zewnętrznymi zagłębieniami wynosić powinna 4 mm. Wzorcową surowicę anty-ludzką umieszcza się w środkowym zagłębieniu, a badane ekstrakty w zewnętrznych zagłębieniach. Równolegle z ekstraktami badanymi, przeprowadza się także dodatnie i ujemne próby kontrolne. Tak przygotowaną płytkę umieszcza się w komorze wilgotnej (aby zapobiec wysychaniu żelu agarowego) na 24 godziny i w tym czasie zachodzi dyfuzja. Barwienie przeprowadza się w mieszaninie Pąs-Nigrozyna. Wystąpienie prążka lub pasma precypitatu pomiędzy zagłębieniem z surowicą precypitującą białko ludzkie a zagłębieniem z badanym ekstraktem, przy równoczesnych kontrolach ujemnych i dodatnich świadczy o tym, że badana kość pochodzi od człowieka. Czułość tej metody zależna jest od wielu czynników, jak: ilość materiału badanego, czas zalegania kości w ziemi, miano surowicy precypitującej i wynosi, w zależności od zastosowanej modyfikacji, od 1 : 2048 do 1 : 100 000.

3. Metoda elektroimmunoprecypitacji w zbuforowanym żelu agarowym wg Z. Marka i wsp. (1964)

Metoda ta polega na przyspieszeniu, poprzez elektroforezę, zetknięcia się gamma-globulin surowicy precypitującej z alfa-globulinami badanych antygenów zawartych w ekstraktach. Stosuje się w tym celu 1% żel agarowy, zbuforowany buforem weronalowym o pH 8,6. W żelu tym wykonuje się otwory, w podwójnych rzędach, o średnicy około 1,5 mm, w odległości 1 cm od siebie. Do jednego z rzędów wkrapla się badane ekstrakty — roztwór antygeny, a do drugiego surowicę precypitującą. Stronę badanych ekstraktów łączy się mostkiem bibułowym z katodą, a stronę surowic — z anodą. Jako bufor elektrodowy stosuje się również bufor weronalowy, jednak o nieco innym składzie. Na żel działa się napięciem stałym, stabilizowanym elektronicznie ($U=200$ V), przy natęże-



Rys. 1. Ustalenie przynależności gatunkowej metodą elektroimmunoprecypitacji w zbuforowanym żelu agarowym

- a — matryca do wycinania otworów w żelu; do rzędu A wkrapla się surowice precypitujące, a do rzędu B — badane ekstrakty,
 b — wygląd płytki z żelem po wyłączeniu przepływu prądu. Widoczne są prążki precipitacyjne między niektórymi otworami rzędów A i B (wg Z. Marka i wsp. 1964)

niu $i=10$ mA. Po upływie 50 - 60 minut przepływ prądu przerywa się i w silnym strumieniu światła odczytuje wyniki (rys. 1). Wynik dodatni swoisty — to powstanie między badanym ekstraktem, a surowicą precypitującą wyraźnego, ostrego prążka precipitatu, z równoczesnymi kontrolami dodatnimi i ujemnymi. Wielu autorów zaleca badanie wyciągów podłoża, w którym znaleziono kości. Dla lepszego uwidocznienia prążków precipitacyjnych można wybarwić żel czernią amidową B, a następnie nadmiar barwnika usunąć w mieszaninie alkoholu metylowego i kwasu octowego lodowatego w stosunku 3 : 1. Po odbarwieniu powinny pozostać jedynie ciemne prążki precipitacyjne.

Czułość tej metody zależy, podobnie jak w innych metodach immunologicznych, między innymi od miana surowicy precypitującej i jej swoistości. Zaleca się stosowanie surowic o mianie co najmniej 1 : 10 000.

OKREŚLANIE PRZYNALEŻNOŚCI GRUPOWEJ W ZAKRESIE UKŁADU ABO

W 1947 roku K. Landsteiner zastosował metodę inhibicji do badań nad istotą materiałów aktywnych serologicznie, odpowiedzialnych za specyfikę grup krwi. Substancje te okazały się glikoproteinami i glikolipidami, które w dodatku można wyizolować z tkanek i erytrocytów. Masa cząsteczkowa tych substancji wynosi około 500 000, przy czym

makrocząsteczki zawierają: kwasy tłuszczowe, sfingozyny, węglowodany i aminokwasy. Każda makrocząsteczka składa się z 300 łańcuchów węglowodanowych zbudowanych z kombinacji 7 lub 8 jednostek cukru, sfingozyn lub 15 aminokwasów oraz z układu długich łańcuchów kwasów tłuszczowych. Zanim jednak Landsteiner wyjaśnił tak szczegółowo budowę specyficznych substancji grupowych, V. Friedenreich i G. Hartmann (1927) wykazali swoistość grupową wielu tkanek ciała ludzkiego i to w dodatku utrwalonych w formalinie.

Do badań grupowych tkanki kostnej większość autorów zaleca wykorzystywanie próbek istoty gąbczastej. Wynika to z większej zawartości materii organicznej w istocie gąbczastej niż w istocie zbitej. Serologicznie wyższą aktywność istoty gąbczastej tłumaczy także fakt obecności w niej (za życia) czerwonego szpiku kostnego.

Zagadnieniem wymagającym wyjaśnienia jest wpływ warunków zewnętrznych na stabilność antygenów grupowych. Zależy ona od kilku czynników, a mianowicie: przebiegu rozkładu tkanki kostnej w ziemi, typu gleby i jej pH, temperatury i wilgotności, czasu zalegania kości oraz działania pewnych enzymów pochodzenia bakteryjnego (S. Isekii i S. Okada, 1951 oraz S. Isekii i T. Ikeda, 1956).

Rozkład tkanki kostnej, zdaniem I. Lengyela (1975) przebiega w trzech fazach. Faza pierwsza — od śmierci do pogrzebania zwłok — nie narusza, co prawda, struktury chemicznej i histologicznej, decyduje jednak o przebiegu dalszego rozkładu. Faza druga — w ziemi — obejmuje utratę lub przebudowę niektórych substancji chemicznych, przy czym trwa ona tak długo, aż powstanie stan równowagi fizyko-chemicznej między kością a glebą. Dodatkowo w czasie tej fazy pewne bakterie z rodziny *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* i *Treponema* mogą oddziaływać enzymatycznie na antygeny powodując ich uszkodzenie lub przebudowę, tworząc nowe własności antygenowe. Wreszcie faza trzecia — od wydobycia z ziemi do rozpoczęcia badań — charakteryzuje się utratą wilgotności i zmianami utleniającymi, co prowadzi do zaniku aktywności serologicznej starej tkanki kostnej wystawianej na działanie powietrza. O ile zatem nie mamy wpływu na warunki rozkładu tkanki kostnej w trakcie dwóch pierwszych faz, to przed zmianami trzeciej fazy można się odpowiednio zabezpieczyć (przez konserwację).

Przed przystąpieniem do opisu metodyki wymienionych już we wstępie do artykułu trzech metod serologicznych, należy podkreślić, że wszystkie trzy są nadal stosowane przez różnych autorów, mimo swej różnej wydolności.

1. Metoda absorpcyjna

Dzięki stwierdzeniu, że substancje grupowe krwi znajdują się nie tylko w czerwonych ciałkach krwi, lecz także i w innych tkankach i organach (niekiedy w większej nawet koncentracji) możliwe było zasto-

sowanie metody absorpcyjnej do określania przynależności grupowej również w tkance kostnej.

Boydowie wykazali, że czas absorpcji mączki kostnej w surowicach anty-A i anty-B może wynosić 1 godzinę w temperaturze pokojowej — w ciągu tego czasu następuje zahamowanie reakcji. Dalsze badania umożliwiły ustalenie jeszcze bardziej optymalnych warunków absorpcji — czas 24 godziny w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$. Ilość zastosowanych surowic jest proporcjonalna do ilości posiadanego materiału, co umożliwia dobranie optymalnych warunków absorpcji. Bardzo ważnym zagadnieniem jest dobór odpowiednich surowic diagnostycznych.

W. T. J. Morgan (1958) zwraca uwagę na obecność makromolekuł u osobników należących do tej samej grupy układu AB0, różniących się między sobą: np. grupa A genetycznie zależy od podgrupy i od indywidualnego genotypu układu Lewis. W związku z tym zalecane jest stosowanie surowicy od tych samych, znanych dawców; surowica zmieszana, pochodząca od kilku dawców nie powinna być stosowana.

Początkowo niektórzy badacze stosowali absorpcję w surowicy grupy 0 lecz później sposób ten został zaniechany, ponieważ aglutyniny alfa i beta mają zazwyczaj nierówną siłę aglutynacji. B. E. Dodd (1952) wykazała, że istnieje ponadto tzw. „przeciek” między dwiema aglutyninami, co powoduje obniżenie miana u obydwu, podczas gdy prawdziwe zahamowanie oddziaływało tylko na jedną aglutyninę.

Przygotowanie i obróbka tkanki kostnej w tej metodzie jest bardzo prosta. Wybraną próbkę kości czyści się mechanicznie z zanieczyszczeń i podaje zmieleniu do bardzo drobnych ziarenek. Tak przygotowaną mączkę kostną, w ilości 10,0 g, umieszcza się w probówkach i zalewa 2,2 ml surowicy diagnostycznej anty-A; oddzielnie, tą samą ilością surowicy anty-B zalewa się drugą próbkę mączki (obie o mianie 1 : 256). Układ ten, złożony ze sproszkowanej kości i surowicy diagnostycznej anty-A lub anty-B umieszcza się w termostacie, przy następujących warunkach czasowych i temperaturowych: na 3 godziny w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$, następnie na 2 godziny w temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$; wreszcie na 1 godzinę w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$.

Po absorpcji oddziela się surowicę diagnostyczną od sproszkowanej kości przez wirowanie w czasie 3 - 5 minut, przy 2500 obrotach/min. Następnie sporządza się dwa rzędy rozcieńczeń obu surowic, stosując roztwór soli fizjologicznej. Do każdego rozcieńczenia dodaje się identyczną ilość przemytych krwinek testowych grupy A_1 oraz B i układ ten umieszcza się w komorze wilgotnej, w czasie 20 minut, w temperaturze $+20^{\circ}\text{C}$. Obecność lub brak aglutynacji odczytuje się w 4-stopniowej, subiektywnej skali, za pomocą stereoskopowego mikroskopu o 20-krotnym powiększeniu.

2. Metoda absorpcyjno-elucyjna

Możliwość zastosowania metody absorpcyjno-elucyjnej do badań serologicznych tkanek różnych narządów ciała ludzkiego wykazali między innymi: A. Fiori i P. Benciolini (1966), T. Marcinkowski (1968) oraz Y. Miki, H. Iki, T. Inove i M. Hara (1970). Na tkance kostnej (zęby) ustalenia takie przeprowadzili S. Loyka i S. Mackené (1974).

Poszczególne etapy tej metody są następujące:

- utrwalanie sproszkowanej próbki kostnej (w metanolu lub acetonie przez 12 - 24 godzin);
- absorpcja w surowicach diagnostycznych *anty-A*, *anty-B* i *anty-H* przez 48 godzin w temperaturze $+ 4^{\circ}\text{C}$;
- wypłukiwanie niezwiązanych przeciwciał wychłodzonym roztworem soli fizjologicznej o temperaturze $- 2^{\circ}\text{C}$;
- kontrola wypłukania z materiału wzorcowego;
- elucja związanych przeciwciał z badanej próbki w temperaturze $+ 56^{\circ}\text{C}$;
- odczytywanie wyników.

Przebieg niektórych etapów jest szczególnie ważny, ponieważ warunkuje uzyskanie swoistych i czułych wyników. Bardzo ważnym czynnikiem w tej metodzie jest dobór odpowiednich surowic, których miano powinno wynosić najmniej 1:512 (lepiej jednak 1:1024 — 1:2048). Płukanie odbywa się w próbkach za pomocą roztworu soli fizjologicznej wychłodzonego do temperatury $- 2^{\circ}\text{C}$, następnie próbki poddaje się wirowaniu przez około 30 sekund, przy 2500 - 3000 obrotów/min.; odciąga się popłuczyny znad mączki kostnej i ponownie dodaje się wychłodzonej soli fizjologicznej. Proces ten powtarza się aż do momentu usunięcia niezwiązanych przeciwciał z materiału kontrolnego. Kontrole wypłukania niezwiązanych przeciwciał trzeba prowadzić na znanej tkance kostnej pochodzącej od osobnika grupy 0, która absorbowana była w surowicach *anty-A* i *anty-B*. Po usunięciu ostatnich popłuczyn dodaje się kilka kropli roztworu soli fizjologicznej, umieszcza się próbki w termostacie ($+56^{\circ}\text{C}$) na 20 - 30 minut, a następnie eluaty przenosi się do innych próbek zawierających krwinki testowe i wiruje się przez 5 minut przy 2000 obr/min. Krwinki testowe powinny być bardzo świeże (kilkugodzinne), trypsynowane i dodatkowo zawieszane w 0,5% albuminie wołowej. Zawartość próbek przenosi się po wirowaniu na zagłębienia szkiełek podstawowych i odczytuje wyniki pod mikroskopem stereoskopowym. Równoległe z materiałem badanym trzeba prowadzić kontrole na znanej tkance kostnej grupy *A*, *B*, i *0*.

3. Metoda fluorescencji przeciwciał

Metoda ta oparta jest na zasadzie znaczenia przeciwciał barwnikiem fluoryzującym i doprowadzania tego kompleksu do zetknięcia się z an-

tygenami zawartymi w tkance kostnej. W efekcie barwnik fluoryzujący znajdzie się w miejscach połączeń antygen-przeciwciała i pod wpływem promieni lampy UV zaczyna emitować widzialne światło, które wykrywa się pod mikroskopem.

Ponieważ klasyczna metoda fluorescencji przeciwciał, w swej pierwotnej wersji (P e a r s e 1960), nie nadawała się do badań tkanki kostnej, I. L e n g y e l (1975) zmodyfikował ją, przy czym modyfikacja ta poszła w dwóch zasadniczych kierunkach: odpowiedniego przygotowania badanej próbki tkanki kostnej oraz kontrolowania w trakcie badania proporcji łączenia się surowicy diagnostycznej z barwnikiem fluoryzującym. Pierwsza z modyfikacji umożliwiła podjęcie badań kości tą metodą, a druga zwiększyła jej czułość i swoistość.

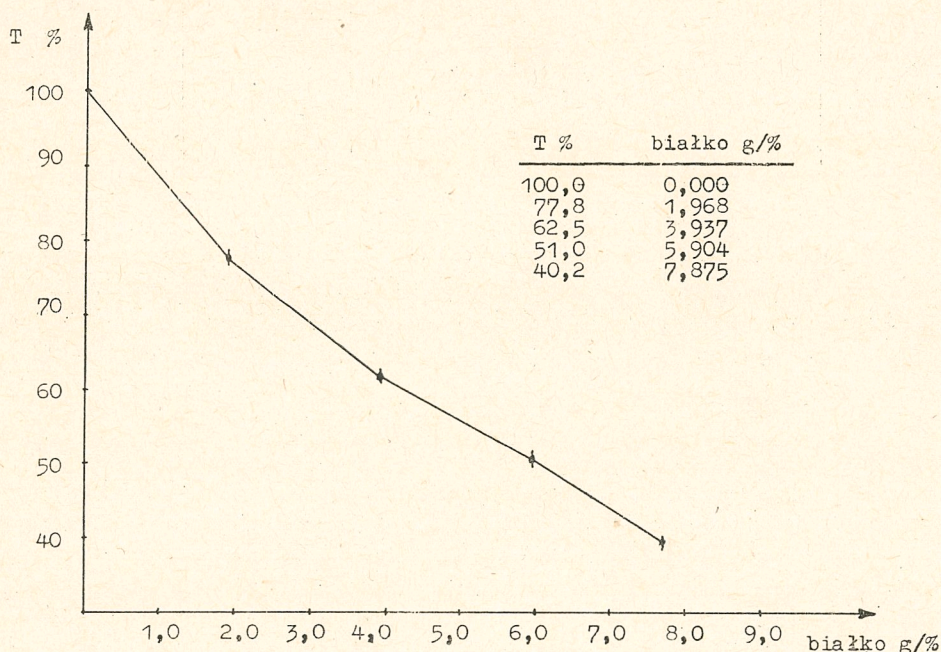
Przygotowanie próbki tkanki kostnej polega na pobraniu wycinka istoty gąbczastej (najlepiej z trzonu kręgu) o grubości 5 mm i o powierzchni podstawy około 1 cm², po czym należy wycinek oczyścić za pomocą szczoteczki. Następnie próbkę trzeba zakonserwować w roztworze alkoholu etylowego i obojętnego roztworu formaldehydu. Proces konserwacji powinno się przeprowadzać możliwie szybko po wydobyciu kości z ziemi, ze względu na wspomniany już fakt zatracania aktywności serologicznej tkanki kostnej w zetknięciu z powietrzem atmosferycznym (T h i e m e i C. M. O t t e n, 1957; M. S m i t h, 1963; I. L e n g y e l, 1975). Skład utrwalacza jest następujący: 625 ml 96% C₂H₅OH, 250 ml 40% HCOH i 125 ml H₂O dest. Czas utrwalania powinien wynosić 12 - 24 godzin, nie dłużej jednak niż 1 tydzień. Po utrwaleniu próbkę poddaje się płukaniu, celem usunięcia resztek utrwalacza; najpierw przez 6 godzin w wodzie bieżącej, a później przez 2 godziny w wodzie destylowanej.

Kolejnym etapem jest proces odwapniania tkanki kostnej, który przeprowadza się przy użyciu wodnego roztworu syntetycznego kwasu poliamidowego — C₁₀H₁₂N₂Na₄O₈ (EDTA). W celu sporządzenia roztworu odwapniającego należy na 1 gram próbki użyć 100 ml buforu Mc Ilwaina, nasyconego EDTA o pH 7,4 oraz, jako detergentu — 1,0 ml pochodnej eteru polietylenoglikolowego (BRI J-35). Czas odwapniania zależy od czasu zalegania kości w ziemi i waha się w granicach 72 - 160 godzin. Roztwór EDTA powinien być zmieniany co 24 godziny na świeży. Należy pamiętać o sprawdzaniu stopnia odwapniania materiału badanego (metodą V o i g t a, 1960), ponieważ sole wapnia pozostające po niedokładnym odwapnieniu zwiększają autofluorescencję utrudniającą wykrywanie słabej immunofluorescencji. Po odwapnieniu usuwa się resztki roztworu, płuczac próbkę przez 12 godz. w H₂O dest. W efekcie próbka tkanki kostnej staje się elastyczna i umożliwia sporządzanie skrawków, szybko mrożonych, grubości 10 - 15 mikrometrów.

Barwnikiem fluoryzującym jest izotiocyanian (FITC), a jako przeciwciała używa się surowic diagnostycznych anty-A i anty-B, o mianie

1 : 256 oraz anty-*H* (ekstrakt z nasion *Ulex europeus*), również o mianie 1 : 256. Sposób sporządzania ekstraktu anty-*H* jest dość prosty — polega na zmieleniu 25 mg wysuszonych nasion *Ulex europeus*, wymieszaniu sproszkowanych nasion z 500 ml wody destylowanej i umieszczeniu tej zawiesiny na 2 godziny w temperaturze + 30°C (na łaźni wodnej). Po upływie 2 godzin zawiesinę wytrząsa się przez 12 godzin w temperaturze pokojowej, po czym odwirowuje i do każdych 100 ml klarownej cieczy dodaje się 0,2 ml *BRI J-35*.

Jak już wspomniano poprzednio, czułość i swoistość metody zależy od optymalnych warunków połączenia ilościowego przeciwciał z barwnikiem fluoryzującym, dlatego też określa się zawartość protein w surowicach anty-*A* i anty-*B* zmodyfikowaną metodą biuretową (Cornall i wsp. 1949); dokonuje się kontroli wiązania *FITC* z proteinami surowic (Mc Kinney i wsp. 1964) oraz określa się zawartość protein w związku, metodą analizy krzywej absorpcji. Na rysunku 2 przedstawiono przykład takiej krzywej wzorcowej zawartości protein.



Rys. 2. Przykład krzywej wzorcowej dla określenia zawartości białka przy pomocy zmodyfikowanej reakcji biuretowej (wg Cornall'a i wsp. 1949)

Przygotowane poprzednio skrawki tkanki kostnej umieszcza się w komorach zawierających przeciwciała anty-*A*, anty-*B* i anty-*H* (wszystkie znaczone *FITC*), a następnie usuwa się nadmiar barwnika przez spłukiwanie skrawków roztworem buforowym Mc Ilwaina o pH 6,6 (tem-

peratura roztworu $+20^{\circ}\text{C}$, czas — 1 godzina). Przemyte skrawki umieszcza się na kwarcowych szkiełkach podstawowych, w roztworze soli fizjologicznej i poddaje badaniom pod mikroskopem w świetle ultrafioletowym. Wynik uznajemy za dodatni, gdy zaobserwujemy *in loco* intensywną, centkowaną, zielonkawą fluorescencję w substancji otaczającej jamy komórek kostnych (torebki Neumana). Reakcja negatywna charakteryzuje się słabą, jednorodnie brązową fluorescencją.

Ustalenie grupy krwi każdej próbki tkanki kostnej polega na odczy-

Tab. 1. Możliwe odmiany reakcji w metodzie fluorescencji przeciwciał (wg I. Lengyela 1975).

Nr	Fenotypy grup krwi	Surowice diagnostyczne		
		anty-A	anty-B	anty-H
1	A	+	-	-
2	B	-	+	-
3	O	-	-	+
4	AB	+	+	-
5	?	+	+	+
6	?	-	-	-

cie reakcji poszczególnych wycinków z surowicami anty-A, anty-B i anty-H. Możliwe do uzyskania wyniki jednostkowe zestawiono w tabeli 1. Wynika z niej, że pierwsze 4 sytuacje prowadzą do określenia grupy krwi, natomiast dwie pozostałe (wszystkie reakcje dodatnie lub wszystkie ujemne) nie dają podstaw do wypowiedzania się o grupie krwi.

PIŚMIENNICTWO

1. Boyd W. C., Boyd L. G., *Science* 1933, 78, 578. ★ 2. Boyd W. C., Boyd L. G., *J. Immunology*, 1937, 32, 307. ★ 3. Candela P. B., *Am. J. Phys. Anthropol.* 1940, 27, 3. ★ 4. Cornall A. G., Bordawill C. J., David M. M., *J. biol. Chem.* 1949, 177, 751. ★ 5. Dodd B. E., *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 1952, 33, 1. ★ 6. Ducos J., *Annales de medicine legale*, 1956, 36, 280. ★ 7. Fiori A., Margio M. Benciolini P., *J. of Forensic Sciences*, 1963, 8, 3 i 4. ★ 8. Hartmann L., Toilliez M., *Revue francaise d'etudes oliniques et biologiques*, 1957, 2, 197. ★ 9. Iseki S., Ikeda T., *Proc. Japan Acad.* 1956, 29, 460. ★ 10. Iseki S., Okada S., *Proc. Japan Acad.*, 1951, 27, 455. ★ 11. Knight B., *Medicine, Science and the Law*, 1969, 9, 247. ★ 12. Kout M., Vacikova A., Stloukal M., *Anthropologie* 1965, II/3, 49. ★ 13. Lattes L., *Arch. anthropol. criminale, psychiat. e med. legale*, 1916, 37, 3. ★ 14. Landsteiner K., *Harvard Univ. Press, Cambridge*, 1947. ★ 15. Lengyel I., *Palaeoserology. Blood Typing with the Fluores-*

cent Antibody Method, Budapest, 1975. ★ 16. Loyka S., Macken  S.,  sko-slovensk  Kriminalistika, 1974, 2. ★ 17. Marek Z., Jaegermann K., Turowska B., *Folia Medica Cracoviensia*, 1960, VI, 1, 83. ★ 18. Mc Kinney R. M., Spillane T. M., Reace G. W., *J. Immunol.* 1964, 93, 232. ★ 19. Miki Y., Iki H., Incuve T., Hara M., *Kurume med. J.*, 1970, 17, 33. ★ 20. Morgan W. T. J., *Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides*, Churchill, London, 1958. ★ 21. Muller M., Fontaine, G., Muller, P., *Annales de médicine légale*, 1959, 39, 337. ★ 22. Ouchterlony,  ., *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 1949, 26, 507. ★ 23. Pearse, E. G. A., *Histochemistry; Theoretical and Applied*. 2nd ed. Churchill, London, 1960. ★ 24. Smith, M., *Science*, 1960, 131, 3402. ★ 25. Thieme, F. P., Otten, C. M., *Amer. J. Phys. Anthropol.*, 1957, 15, 387. ★ 26. Voigt, G. E., *Beitr. path. Anat.*, 1960, 124, 351.

LES MÉTHODES PAL OS ROLOGIQUES DANS L'ÉTUDE DES OSSEMENTS

par BRONIS AW M ODZIEJOWSKI et ROMANA M ODZIEJOWSKA

On y passe en revue quelques unes des méthodes sérologiques du point de vue de leur application   l'analyse de fragments osseux de populations éteintes. Ces méthodes permettent d'établir le groupe sanguin dans le système *ABO* et,   un moindre degré (vu la disparition graduelle de l'activité d'albumines propres   l'espece) la détermination de l'appartenance g n rique de petits fragments d'ossements.

PALEOSEROLOGICAL METHODS IN EXAMINATION OF SKELETAL REMAINS

by BRONIS AW M ODZIEJOWSKI and ROMANA M ODZIEJOWSKA

The authors have reviewed several serological methods from the viewpoint of investigators of extinct populations. There are presented methods for *ABO* system examination, and to a slightly smaller extent (because of gradual extinction of activity in species-specific proteins), assessment of species characteristics from tiny bone fragments.

G. Česnys, S. Pavilionis, *Lietuvos antropologijos bibliografija (1470 - 1970)*, Vilnius 1974

W ostatnich latach notuje się dynamiczny rozwój problematyki antropologicznej w ZSRR. Obok tradycyjnie znanych prężnych ośrodków Moskwy i Leningradu ożywioną działalność przejawiają antropologowie białoruscy, ukraińscy, a w republikach nadbałtyckich zwłaszcza litewscy. Mimo że tradycje litewskiej antropologii w dużym stopniu były wspólne z polskimi, w latach międzywojennych związki antropologii polskiej i litewskiej były niezbyt duże i dorobek antropologii litewskiej był właściwie aż do ostatnich lat mało znany. Z okresu międzywojennego znana była tylko niektórym działalność ucznia R. Martina, J. Žilinskasa, ostatnio zaś G. Česnysa, W. Derumsa, J. Nainysa, S. Pavilionisa.

Bliższe zaznajomienie się z dorobkiem litewskiej antropologii umożliwia w dużym stopniu „Bibliografia litewskiej antropologii”, wydana nakładem Ministerstwa Zdrowia Litewskiej SSR i Państwowej Naukowo-Medycznej Biblioteki w Wilnie. Dzieło Česnysa i Pavilionisa jest wybitnym osiągnięciem bibliograficznym antropologii litewskiej.

Omawiana praca liczy 236 stron druku i została przez autorów podzielona na 11 rozdziałów, które poprzedza krótki wstęp w językach: litewskim, rosyjskim, angielskim.

Pozycje bibliograficzne w liczbie 2297 ułożono w kolejnych rozdziałach w porządku alfabetycznym według autorów, nie zawsze jednak z zachowaniem układu chronologicznego.

Rozdział pierwszy dotyczy ogólnych zagadnień antropologii, drugi poświęcony jest historii antropologii, trzeci pracom biograficznym, czwarty zaś przyczynkom bibliograficznym. Rozdział piąty jest poświęcony metodyce badań antropologicznych. Szósty rozdział, nieco obszerniejszy, dotyczący paleoantropologii podzielony został na dwie części: teoria i metodologia antropogenezy oraz popularyzacja antropogenezy. Najlichniesze pozycje zebrane zostały w kolejnych rozdziałach. W siódmym zestawiono prace z antropologii fizycznej. Podzielono go na kilka podrozdziałów:

1. Wzrastanie i rozwój; 2. osteologia; 3. neurologia; 4. myologia; 5. teratologia; 6. typologia człowieka.

Kolejny, obszerny rozdział ósmy dotyczy antropologii fizjologicznej i ekologii. Rozdział dziewiąty poświęcony jest pracom z antropologii stosowanej, jak antropologia medyczna, sądowa z identyfikacją, sportowa, przemysłowa, antropogeografia i demografia antropologiczna. Ostatni duży rozdział dziesiąty zawiera prace z antropologii etnicznej. W rozdziale jedenastym zamykającym bibliografię zawarto skróty nazwisk, nazw geograficznych oraz objaśnienia używanych skrótów.

Porównyując omawianą pozycję z polskimi bibliografiami antropologii A. Wrzoska i M. Ćwirko-Godyckiego, które ułożone są w porządku alfabetycznym wg autorów i z zachowaniem układu chronologicznego uważam polskie ujęcie za wygodniejsze dla korzystających tym bardziej, że na końcu bibliografii dodana jest bibliografia przedmiotowa z zaznaczeniem pozycji bibliograficznych autorskich. Ta uwaga nie umniejsza wartości omawianej pracy autorów litewskich, która w niejednym przypadku stanowi również cenne uzupełnienie bibliografii A. Wrzoska i trzech kolejnych bibliografii M. Ćwirko-Godyckiego.