

**Analitikai kémiai módszerek alkalmazása humán  
csontmaradványok vizsgálatában**

Doktori (PhD) értekezés

Dr. Patonai Zoltán



Témavezetők: Dr. Márk László, Dr. Wiegand Norbert

Programvezető: Dr. Kovács L. Gábor

Doktori Iskola vezetője: Dr. Bódis József

Pécsi Tudományegyetem

Egészségtudományi Kar

PÉCS

2019.

## **Bevezetés**

Az igazságügyi orvostan kutatásainak napjainkban is témája az élő és az elhunyt személyek azonosítása. A történeti antropológia az ásatag csontokkal foglalkozik, míg Magyarországon a recens csontmaradványok vizsgálatát igazságügyi orvosszakértők végzik.

Az elválasztástudományok a XX. század második felétől rohamosan fejlődtek, így az igazságügyi orvostan is új módszerek birtokába jutott. A fejlődés hatására számos változásnak lehettünk tanúi.

Napjainkban a genetikai nemek, az életkor, a fekvési idő meghatározására és az egyes betegségek kimutatására alkalmas, kis mintaigényű kémiai módszerek birtokában a csontmaradványok komplex elemzése vált lehetővé.

## **Előzmények**

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémia és Orvosi Kémia Intézetének Analitikai Biokémiai Tanszékén munkacsoportunk 2003-ban kezdte meg csontkémiai vizsgálatait. Munkánk során a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Karának

Embentani Tanszékéről származó történeti csontminták kémiai elemzését végeztük.

Kutatásunkkal egy időben az Igazságügyi Orvostani Intézetbe néhány hónapon belül több emberi testmaradvány személyazonosítására vonatkozó kirendelés érkezett.

A személyazonosság megállapításához az elhalt nemét is meg kellett határozni. A kérdés: használható-e a történeti mintákon már biztonsággal alkalmazott csontkémiai módszer az igazságügyi orvosszakértői gyakorlatban?

Ásatásokról származó, különböző fertőző betegségek jeleit mutató csontokat és morfológiai eltérés nélküli (egészséges) csontokat vizsgáltunk infravörös spektroszkópiával. A mérési eredmények ígéretesnek mutatkoztak egy fekvési idő meghatározására is alkalmas módszer kidolgozásához. Gyakorlati szempontból fontos az emberi maradványok fekvési idejének meghatározása.

## **Célkitűzések**

Munkám során az alábbi kérdésekre kerestem megoldást:

- *Nemzetközi szakmai igényeknek megfelelő vizsgálati és dokumentációs eljárásrend kidolgozása.*
- *A kémiai nemmeghatározási módszer gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata, és integrálása az igazságügyi személyazonosítási protokollba.*
- *Fekvési idő meghatározására alkalmas kémiai módszer keresése, kidolgozása, és gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata.*
- *Optimális mintavételi eljárás kidolgozása.*

## **Az alkalmazott módszerek elmélete**

### **Antropometria**

A csontmaradványok elemzését napjainkban is az antropológiai vizsgálatokkal kezdjük. A metrikus módszerek csak az optimális körülmények mellett eredményesek. Egy közel teljes csontváz esetében az elhunyt neméről, életkoráról, testmagasságáról, csontsérüléseiről és a fekvési időről is tudunk nyilatkozni.

## **MALDI-TOF tömegspektrometria**

A MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) segítségével hatékonyan mérhetők a nagy tömegű, bomlékony molekulák (fehérjék, szénhidrátok, oligonukleotidok, polimerek). A MALDI ideális analizátora a repülési idő analizátor (time of flight, TOF), mivel alkalmazásával nagy felbontás és nagy érzékenység érhető el. A módszer elterjedt a biológiai és az orvos-biológiai kutatásokban.

## **Infravörös spektroszkópia**

Az infravörös spektroszkópia előnye a különböző szilárd, folyékony vagy gáz halmazállapotú minta szerkezetváltozás nélküli vizsgálata. Az analitikai méréseket a közepes infravörös tartományban végezzük. Megfelelő mérési beállítás mellett az eredményünk az adott vegyület „kémiai ujjlenyomatának” tekinthető.

## **Krisztallizációs index és a karbonát–foszfát arány**

A halál után a csontokban a hidroxipatit kristályok szerkezete lassan változik, rendezettebbé válik, így nagyobb kristályok jönnek létre. A kristályok szerkezetét és rendezettségét a krisztallizációs indexszel

jellemezhetjük. A karbonát–foszfát arány a halál után eltelt idő múlásával a bomlási folyamatok eredményeként csökken. A krisztallizációs index és a C/P arány időfüggő változásának mérése alkalmas lehet a fekvési idő meghatározására.

## **Anyagok és módszerek**

### **Antropológiai vizsgálatok anyaga**

Az antropológiai vizsgálatokat a PTE Igazságügyi Orvostani Intézetében egy-egy személyazonosítási ügryhöz készítettem.

### **A MALDI-TOF/TOF tömegspektrométerrel végzett vizsgálatok anyaga**

A recens csontminták az antropológiai vizsgálataim anyagából származnak. Azoknál az eseteknél, amelyeknél a csontok állapota lehetővé tette, elvégeztem az összes antropometriai mérést. A kémiai vizsgálatok eredményeit összehasonlítottam a metrikus nemmeghatározás, és a DNS vizsgálat (amelogenin) eredményeivel.

A csontkémiai vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémia és Orvosi

Kémia Intézetének Analitikai Biokémiai Tanszékén végeztem.

### **FT-IR spektroszkópiával végzett vizsgálatok anyaga**

A *történeti csontmintákat* a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi Karának Embertani Tanszékéről kaptam. A *recens csontminták* a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Igazságügyi Orvostani Intézetében végzett antropológiai vizsgálataimból és a DNS vizsgálatra érkezett csontmintákból származnak.

A kutatásom során fogászati kezelés céljából eltávolított egészséges *fogak* mérését is elvégeztem.

A fogakat a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Fogászati és Szájsebészeti Klinikáról és a Kaposi Mór Oktató Kórház Szájsebészeti Osztályáról kaptam.

A méréseket a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémia és Orvosi Kémia Intézetének Analitikai Biokémiai Tanszékén végeztem.

## **A minták előkészítése**

### **MALDI-TOF/TOF tömegspektrometriához**

A csontot achát mozsárban őröltem, a csontporból 0,50 g-ot mértem ki. Ehhez 1,00 cm<sup>3</sup> víz-acetonitril elegyét adtam. Az extrahálást ultrahangos fürdőben végeztem. A kivonatból 1 µl-t rozsdamentes acél mintatartó tálcára (Mtp 384 ground steel plate) cseppentettem, és beszáradás után elvégeztem a mérést. A vizsgálatok során mátrixként α-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA), valamint C<sub>60</sub> és C<sub>70</sub> fullerén telített toluolos oldatát alkalmaztam.

### **FT-IR spektroszkópiához**

A minták előkészítése lágyszorbítottaságától függően változott. A *történeti minták* esetében a csontok felszínéről a földszennyeződést mosással (desztillált víz, metanol) távolítottam el. A csontokból 0,3-0,5 g mennyiségű, átlagosan 2 µm szemcseméretű csontport nyertem. A *recens mintákról* eltávolítottam a lágyszorúkat (csonthártya, izomszövet). A csontokat porítottam, az átlagos szemcseméret 2 µm volt. Ezt követően a mintákat zsírtalanítottam és csíramentesítettem. A *fogakról* a szennyeződéseket (lágyszorú, vér) mechanikus tisztítással



távolítottam el. A foggyökerek felszínéről 0,2  $\mu\text{m}$  szemcseméretű csontport nyertem. A mintákat csíra- és fehérjementesítettem. A *régészeti, az igazságügyi és a fogászati mintákat* 3-4 hétig exszikátorban szárítottam. A kiszárított csontporhoz kálium-bromidot adtam, és 80-90 atm nyomáson pasztillát készítettem.

## **Eredmények**

### **Az antropológiai vizsgálatok eredményei**

Munkám során 12 csontmaradvány és 10 ismeretlen holttest azonosítását végeztem. A csontok vizsgálatánál elsősorban, a Rudolf Martin egységesítette antropometriai módszereket alkalmaztam. A maradványokat részletesen megvizsgáltam, a bizonyítottan emberi és a kétséges eredetű csontokat is feljegyeztem. Az antropológiai metódusoknál észlelt problémákra fókuszáltam. A genetikai nemek elkülönítését és az életkor meghatározását több módszerrel végeztem, ideális esetben megbízható eredményekhez jutottam.

## **A genetikai nemek elkülönítése MALDI TOF tömegspektrometriával**

A vizsgálatokat Bruker Autoflex II. típusú mátrix segített lézerdeszorpciós ionizációs technikát alkalmazó tandem repülési idő analízátoros (MALDI TOF/TOF) tömegspektrométerrel végeztem, átlagosan 1100-1200 lövés tömegspektrumát összesítettem. A tömegspektrumokat 50 és 1200 m/z tartományban regisztráltam. Az első fázisában nemi hormonok (ösztron, ösztradiol, ösztriol progeszteron, tesztoszteron) standard oldatának vizsgálatát, a második fázisban pedig a recens csontminták feldolgozását végeztem. Vizsgálataim az igazságügyi genetikai vizsgálatokkal párhuzamosan zajlottak. Az eredményeket összehasonlítottam.

## **A fekvési idő meghatározása FT-IR spektrometriával**

A méréseket Impact 400 (Nicolet) FT-IR spektrométerrel analitikai tartományban végeztem. A mért értékeket az irodalmi adatokkal hasonlítottam össze.

A régészeti minták száma 39. A nem és életkor meghatározását a régészek és az antropológusok metrikus módszerekkel végezték. A csontok felnőtt, idős és aggkorú

elhunytaktól származtak. A maradványok nemek szerinti megoszlása: 20 férfi, 19 nő. A radiokarbon kormeghatározás alapján a csontok fekvési ideje: i.e. 4900 – i.u. 1500. A *krisztallizációs index* átlaga: 3,25. A *karbonát-foszfát arány* átlaga: 0,24.

A recens csontok száma 36. A nemek szerinti megoszlás: 22 férfi, 14 nő. A vizsgált csontmaradványok életkora serdülő és aggkor közötti volt. A nyomozati adatok alapján a fekvési idő: 1-35 év közötti. A *krisztallizációs index* átlaga: 2,82. A *karbonát-foszfát arány* átlaga: 0,48.

Összesen 52 *foggyökeret* vizsgáltam. A fogcsoportok szerinti megoszlás: molaris 5, premolaris 5, metszőfog 5, bölcsességfog 36; a nemek szerint megoszlás 31 nő és 21 férfi. A fogak eltávolítása és a vizsgálatok között eltelt rövid idő miatt a “fekvési idő” nem releváns.

A kristályosodási indexek értéke közel azonos, a legalacsonyabb 2,52, a legmagasabb 2,99. A karbonát/foszfát arányok értékei enyhe fluktuációt mutattak. A legalacsonyabb mért érték 0,26, a legmagasabb 0,48.

A foggyökerek, a recens és régészeti csontminták C.I. és C/P értékeit egy diagrammon ábrázoltam. A fogak és a recens minták a régészeti mintáktól külön halmazt képeztek.

### **Megbeszélés**

A morfológiai elemzések alapja a megfelelő mennyiségű és minőségű csont. A csontmaradványok komplex elemzése feltétele a sikeres személyazonosításnak.

Eredménytelen esetben az egységes dokumentáció a későbbiekben – új nyomozati adatok birtokában – sikeres személyazonosításhoz vezethet.

A vizsgálataim során többnyire nem állt rendelkezésemre megfelelő mennyiségű és minőségű csont, ezért az antropológiai vizsgálataim is korlátozott értékűek voltak.

A *MALDI TOF tömegspektrometriás* elemzések úgynevezett „ujjlenyomat technikával” készülnek, tehát a standardok tömegspektrumát hasonlítjuk össze különféle csontleletekből készült tömegspektrumokkal. Hátránya, hogy mennyiségi meghatározásra nem alkalmas. Előnye, hogy segítségével rövid idő alatt megbízható eredményhez juthatunk.

A kontrollvizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy az analitikai kémiai vizsgálati módszer kiválóan alkalmas igazságügyi csontmaradványok nemének elkülönítésére. A kémiai vizsgálattal a csontméréstani módszerből adódó pontatlanság kiküszöbölhető.

Az *FT-IR spektroszkópia* alacsony mintaigényű, gyorsan elvégezhető vizsgálat. A minta előkészítése (szárítása) azonban hosszabb időt igényel.

A vizsgált történeti minták C.I. és C/P aránya nem mutatott életkorfüggő, vagy genetikai nemek közötti szignifikáns különbséget. Hasonlót tapasztaltam a recens mintáknál is.

A kristallizációs indexet a C/P arány függvényében ábrázolva a recens és a régészeti minták elkülönülnek. Az FT-IR spektroszkópiával végzett vizsgálat alapján csupán valószínűségi véleményt adhatunk: azaz a vizsgált minta valószínűbben a recens vagy a történeti mintákhoz tartozik.

A fogak vizsgálatakor az irodalmi adatoknak megfelelő értékeket kaptam. A fogcement és a csontok C.I. és C/P aránya között szignifikáns különbséget nem találtam. A

fogak mért értékei, hasonlóan a csontokhoz, elkülönülnek a régészeti mintáktól. Összegezve a fogak mérése a csöves csontokhoz hasonlóan alkalmazható.

Az FT-IR spektroszkópiával végzett C.I. és C/P megfelel a modern analitikai kémiai módszerek elvárásainak, azaz rutinszerűen alkalmazható, reprodukálható, és használható nagyszámú minta feldolgozására.

### **Új eredmények összefoglalása**

- Egységes dokumentációt (antropológiai jegyzőkönyv) és mintavételi eljárást dolgoztam ki.
- A csontmaradványok elemzését komplex módon (antropometria, analitikai kémia, genetika) végeztem.
- A régészeti minták előkészítést módosítottam, és alkalmaztam a recens csontok vizsgálatánál.
- Különböző analitikai kémiai módszereket (HPLC, MALDI-TOF, FT-IR) próbáltam ki, és elvégeztem a gyakorlati alkalmazásukhoz szükséges módosításokat.
- Vizsgáltam, hogy felhasználhatók-e az egyes kémiai módszerek a személyazonosság megállapításánál.
- Elsőként alkalmaztam MALDI-TOF tömegspektrometriát személyazonosítási ügyekben.

- Az FT-IR spektrometriával végzett csontszerkezeti méréseket adaptáltam a recens minták vizsgálatához.
- Kidolgoztam a fogászati és a recens csontminták előkészítését.
- Elsőként alkalmaztam FT-IR spektrometriát igazságügyi személyazonosításnál.

### **Köszönetnyilvánítás**

Hálával tartozom feleségemnek és fiamnak a támogatásukért. Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek Dr. Márk Lászlónak és Dr. Wiegand Norbertnek. Szemléletem formázásért és a vizsgálataimhoz nyújtott segítségért Dr. Lóránd Tamásnak. A nyelvhelyesség ellenőrzésért Dr. Fogarasi-Nuber Katalinnak. Köszönet illeti meg tanáromat Prof. Dr. Bajnóczky Istvánt. Volt és jelenlegi kollegáimnak.

### **Tudományos közlemények jegyzéke**

*Összesített impakt faktor: 8,939*

*Független hivatkozások száma: 94*

#### ***A témában megjelent közlemények***

**Patonai Z.:** Az analitikai kémia szerepe az emberi csontmaradványok vizsgálatában, *Revista de medicina*

*siFarmacie- Orvosi és Gyógyszerészeti Szemle*, vol. **51**: 10, Supliment 1–1. (2005)

Montskó G., Németh V., Pandur E., Nagy J., **Patonai Z.**, Márk L. Paleoproteomics: determination of proteins and pathological biomarkers from bone remains, using MALDI TOF/TOF mass spectrometry XVI Semmelweis Symposium & VI. Conference on Cell Analysis, Budapest, Hungary, 2006.05.04-06, pp. 112 (2006)

Tucsek Zs.; **Patonai Z.**; Bajnóczky I. Modern analitikai módszerek alkalmazása az antropológiában, *Folia Anthropologica* (2007)

Nagy G.; Lóránd T.; **Patonai Z.**; Montskó G.; Bajnóczky I.; Maresik A.; Márk L.: Analysis of pathological and non-pathological human skeletal remains by FT-IR spectroscopy, *Forensic Science International* **175**: 55–60 (2008)

Montskó G., Patonai Z., Kovács G.L., Márk L. Mass spectrometric analysis of non-derivatized steroids in biological matrices, 6th International medical Postgraduate Conference, Hradec Kralove, Czech Republic, 2009.11.19-21, pp. 89 (2009)

Márk L.; **Patonai Z.**; Váczy A.; Lóránd T.; Maresik A.: High-throughput mass spectrometric analysis of 1400-year-old mycolic acids as biomarkers for ancient tuberculosis infection, *Journal of Archaeological Science* **37**: 302-305 (2010)



Márk L.; **Patonai Z.**; Váczy A.; Kajsza N.; Marcsik A.:  
Hormone Mass Fingerprinting: novel molecular sex  
determination of ancient human skeletal remains In: Turbanti-  
Memmi I. (ed.) *Advances in Archaeometry*, Springer (2011)  
isbn: 978-3-642-14677-0

**Patonai Z.**, Maasz G., Avar P., Schmidt J., Lorand T.,  
Bajnoczky I., Mark L.: Novel dating method for distinguish  
forensic and archaeological human skeletal remains by using  
bone mineralization indexes, *International Journal of Legal  
Medicine* **127(2)**:529-33. (2013)

#### **Egyéb témában megjelent közlemények**

Rácz E, Könczöl F, Tóth D, **Patonai Z**, Porpáczy Z, Kozma Z,  
Poór VS, Sipos K.: PCR-based identification of drowning: four  
case reports, *International Journal of Legal Medicine*  
**130(5)**:1303-7 (2016)

Kőhalmi L., Fogarasi K., Schneider P., **Patonai Z.**: A pontos  
orvosi szakkifejezések használatának fontossága a  
büntetőeljárásban, *Magyar Jog* 65:2 pp. 86-93. (2018)

Bán Á., **Patonai Z.**, Fogarasi K., Schneider P., Boda R.,  
Gergely P.: Fogászati sérülésekről készült látletelek komplex  
terminológiai, fogászati és igazságügyi orvosszakértői  
elemzése, *Orvosi Hetilap* 159(51) pp. 2154-2161. (2018)

Schneider P., **Patonai Z.**, Gergely P., Fogarasi K.: Könnyű testi sértés vagy emberölési kísérlet?: Pontatlan orvosi szakkifejezések használatának hatása a büntetőeljárás kimenetelére, *Belügyi Szemle*, 9 pp. 147-163. (2018)

Fogarasi K., Schneider P., **Patonai Z.**: Die Rolle von Diagnosen im medizinischen Fachsprachenunterricht, In: Vičič P., Gajšt N., Plos A. (ed) 10th International Language Conference on The Importance of Learning Professional Foreign Languages for Communication between Cultures, 20 and 21 September 2018, Celje, Slovenia, Conference Proceedings, University of Maribor Press, 1 pp. 107-120, isbn 978-961-286-252-7 (2019)

Halász R., **Patonai Z.**, Fogarasi K.: Arzbriefe: Die Beschreibung Gegenwärtiger Beschwerden Analyse deutschsprachiger Formulierungsvorschläge in Musterarzbriefen, In: Vičič P., Gajšt N., Plos A. (ed) 10th International Language Conference on The Importance of Learning Professional Foreign Languages for Communication between Cultures, 20 and 21 September 2018, Celje, Slovenia, Conference Proceedings, University of Maribor Press, 1 pp. 129-146, isbn 978-961-286-252-7 (2019)