

Antropológiai életkorbecslő módszerek kontrollvizsgálata és a koponyavarratok záródásának genetikai vizsgálata

Doktori tézisek

Wolff Katalin

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sótonyi Péter egyetemi tanár, az MTA tagja

Hivatalos bírálók: Dr. Pap Ildikó tárigazgató, Ph.D.
Dr. Kiss András egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Schaff Zsuzsa egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Susa Éva főigazgató, Cs.C.
Dr. Szalai Csaba egyetemi tanár, Ph.D.

Budapest

2013

1. Bevezetés

Az emberi csontmaradványok vizsgálatában alapvető az elhunytak életkorának minél pontosabb meghatározása. Erre az évtizedek során számos morfológiai életkorbecslő módszert dolgoztak ki ismert nemű és életkorú mintákon. A jelentős interpopulációs különbségek miatt azonban ajánlatos elvégezni a gyakorlatban használt metódusok kontrollvizsgálatát a helyi népességek körében, annak felderítésére, hogy azok milyen hatékonysággal alkalmazhatók a mindennapi gyakorlatban. A leggyakrabban alkalmazott technikák közé tartoznak a medencetájékon és a bordák szegycsonti végén megfigyelhető morfológiai változásokra kidolgozottak. Ezek mellett az egyik legrégebbi és legjobban vitatott módszerek, a koponyavarratok záródása és a kronológiai kor közötti összefüggések alapján becslik az életkort. Ezek a metódusok igencsak megosztják a kutatókat az alkalmazhatóság kérdéséről. Számos esetben bizonyították, hogy nincs szoros összefüggés a koponyavarratok záródása és az életkor között, azonban igazán meggyőző magyarázattal a jelenség okára még senki nem szolgált. Az életkor, mint befolyásoló faktor mellett számos egyéb tényező lehet hatással a felnőttkori varratzáródásra. A koponya felszínét ért mechanikai erők és különböző anyagcsere-betegségek mellett a koponyafejlődést befolyásoló gének és az általuk kódolt fehérjék expressziója is meghatározó a varratok szempontjából. A genetikai háttér erős befolyását legjobban a szindrómás gyermekkori varratzáródásos (craniosynostosis) esetek bizonyítják, ahol eseteként egyetlen gén egy egy pontos nukleotid polimorfizmusa okoz súlyos fejlődési rendelleniséget.

2. Célkitűzések

1. A Meindl és Lovejoy (1985) külső felszíni koponyavarratok záródására kidolgozott „vault” módszer alkalmazhatóságának vizsgálata recens, magyar mintán, a váci múmiák leletegyüttesen és az amerikai Terry gyűjteményen.
2. A Nemeskéri és mtsai (1960) által kidolgozott komplex életkorbecslő módszer egyik elemének, a koponya belső felszíni varratzáródásának vizsgálata recens, magyar mintán és az amerikai Terry gyűjteményen.
3. Az Iscan és mtsai (1984, 1985) által a negyedik borda szegycsonti végének morfológiai változásaira kidolgozott életkorbecslő módszer alkalmazhatóságának vizsgálata recens magyar mintán, a váci múmiák leletegyüttesen és az amerikai Terry gyűjteményen.
4. Az Iscan és mtsai (1984, 1985) által a negyedik borda szegycsonti végének morfológiai változásaira kidolgozott életkorbecslő módszer alkalmazhatóságának vizsgálata a harmadik és ötödik borda esetén recens magyar mintán.
5. A módszerek alkalmazhatóságának összevetése a nemek, a különböző népségek illetve a különböző korokban élt népségek között.
6. A kidolgozott módszerek alkalmazásának korrigálása a jobb hatékonyság érdekében a magyar népesség körében.
7. Koponyavarratokat befolyásoló gének gēnpolimorfizmusainak vizsgálata a felnőttkori varratzáródás hátterében.

3. Anyag és módszer

Munkám során három, a gyakorlatban általánosan alkalmazott életkorbecslő módszer vizsgálatát több, egymástól független mintán végeztem el. A Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet bonctermében, recens magyar népesség körében végeztem biológiai kormeghatározást a Meindl és Lovejoy (1985) „vault” szisztéma, a Nemeskéri és mtsai (1960) komplex életkorbecslő módszer egyik eleme, a koponya belső felszíni varratzáródása és az Iscan és mtsai (1984, 1985) által, a negyedik borda szegycsonti végének morfológiai változásaira kidolgozott módszer alapján.

A helyi etikai bizottság engedélyével a bonctermi munkába bekapcsolódva, a koponya feltárása és megtisztítása után fotódokumentációt készítettem, majd értékeltem a külső és belső felszín varratzáródási állapotát. A harmadik, negyedik és ötödik bordák szegycsonti végét lehetőség szerint a bal oldali mellkasfélből távolítottam el, majd azokat megjelölve és feliratozva hetekig vízben áztattam. A preparálási időszak során többször kicsomagoltam és folyó víz alatt tisztítottam a csontmaradványokat, végül fertőtlenítésre hidrogén-peroxidos fürdőt alkalmaztam. A folyamat végére a bordavégeket sikerült teljesen megtisztítani a lágy szövetektől és az esetek többségében az ízületi porctól is, amely könnyedén levált az ízületi felszínről. Főleg idősebb egyéneknél volt jellemző, hogy az ízületi porc olyan mértékben elmeszesedett, hogy az megnehezítette a további vizsgálatokat. A koponya külső felszíni varratzáródását összesen 239, míg a belső, koponyaüri varratfelszín obliterációját 238 egyén esetében tudtam vizsgálni. A bordák szegycsonti végének vizsgálata során 118 egyént sikerült kiértékelnem.

A váci múmiák leletegyüttesen a külső varratobliteráció és a bordák szegycsonti végének morfológiai változásai alapján végeztem életkorbecslést a Magyar Természettudományi Múzeum Embertani Tárában. A leletegyüttes jó megtartása miatt a koponyaüri varratobliterációt nem tudtam teljes bizonyossággal értékelni, így itt ettől eltekintettem. A váci Fehérek templomának kriptájában több mint 150 évig nyugvó, természetes körülmények között mumifikálódott tetemek és csontmaradványok közül, összesen 83 felnőtt egyén esetén végeztem el valamelyik életkorbecslő módszer kontrollvizsgálatát. A vizsgált csontmaradványok közül csak 47 esetben rendelkeztem

információval a valódi életkort illetően, így a Meindl és Lovejoy módszert (1985) 23, az Iscan és mtsai féle módszert (1984, 1985) 46 egyén esetében tudtam kiértékelni.

Az amerikai Terry kollekciónál közel 2000 egyént számláló anatómiai gyűjteményének egy részét a Smithsonian Institution's Természettudományi Múzeumában vizsgáltam. A boncolások alkalmával preparált csontmaradványok teljességének és jó megtartásának köszönhetően mindhárom módszer kontrollvizsgálatát elvégeztem a munka során. A Meindl és Lovejoy (1985) által leírt módszert 383, a Nemeskéri és mtsai (1960) komplex életkorbecslő módszerből a belső varratobliterációt 275, míg az Iscan és mtsai (1984, 1985) féle módszert 369 egyén esetében vizsgáltam. A különböző technikák életkorbecslésben való alkalmazhatóságát itt nemcsak a nemekre, hanem az európai és negrid rasszokra különválasztva is ki tudtam értékelni.

Bonctermi munkám során 106 egyéntől vettem vérmintát, amelyből Chelex módszerrel (Bio-Rad Laboratories, Munich, Germany) DNS izolálást végeztünk. A Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében alkoholos tisztítás után, kompetitív allél-specifikus PCR-rel és KASPar (kompetitív allélspecifikus PCR) technológiával (KBiosciences Ltd, Hertfordshire, UK) 6 génből kiválasztott 12 SNP genotipizálását végeztem el a gyártó útmutatásai szerint. Öt minta végül nem került be az értékelésbe.

Az eredmények kiértékeléséhez R statisztikai szoftvert alkalmaztam (2005). Az életkorbecslések során a valós kor és a korjelzők közötti összefüggés kimutatására Kendall-féle korrelációs együtthatót, a nemek és rasszok közötti eltérés felderítésére lineáris modellt és kétmintás t-tesztet alkalmaztam. A különböző életkor-intervallumok (fázisok) közötti szignifikáns különbségek vizsgálatát ANOVA modellel és Tukey-teszttel végeztem. A modellek megfelelő alkalmazhatóságát minden esetben grafikus modell diagnosztikával ellenőriztem. Az egy egyénhez tartozó különböző bordák által mutatott különbségeket Wilcoxon teszttel számítottam ki, az intra-observer hibát páros t-teszttel ellenőriztem. Az allélfrekvenciákat az allélvariációk leszámolásával határoztam meg, multivariáns, lineáris modellt (ANCOVA) használtam annak vizsgálatára, hogy a vizsgált génpolimorfizmusoknak lehetett-e hatása a koponyavarratok záródására.

4. Eredmények

Munkám során nem tapasztaltam határozott szignifikáns összefüggést a koponya külső varratfelszínének záródása és az életkor között. A legjobb eredményt az életkorbecslés során, 52%-os hatékonyságot, a legrégebbi és legkisebb mintán, a váci múmiáknál tapasztaltam. Ezt kronológiailag és hatékonyságban is a Terry gyűjtemény követte, ahol 41%-ban sikerült megállapítani egy helyes korintervallumot az életkorbecslés során a Meindl és Lovejoy (1985) módszerrel. A legrosszabb eredményt, 31%-os hatékonyságot, a recens bonctermi mintán tapasztaltam. A nemek között szignifikáns különbséget nem tapasztaltam a külső koponyafelszíni varratok záródásának tekintetében. Azonban az azonos népességbe tartozó afrikai eredetű egyének nagyobb hatékonyságot mutattak az életkorbecslésben, mint európai eredetű kortársaik.

A koponyaüri felszín varratobliterációja alapján becsült életkortartományokba nagyobb arányban esett bele az egyének valódi kora, bár itt egy-egy fázishoz szélesebb korintervallumok is tartoztak. Mindkét mintánál, ahol a Nemeskéri és mtsai (1960) módszert vizsgáltam, egy 70%-nál magasabb hatékonyságot tapasztaltam. A mai magyar népességben 72%-os, az amerikai minta esetében 74%-os hatékonyságot mutatott a technika az életkorbecslés során. A kutatás során felfigyeltem arra a jelenségre, hogy a belső varratfelszín sokkal egységesebben, a külső felszíni záródási mintázatokat nem követve csontosodik össze. A nemek között szignifikáns különbséget nem tapasztaltam az adatok összevetése során.

Az életkorbecslésben a legjobb eredményt Iscan és mtsai módszer (1984; 1985), a bordák szegycsonti végének vizsgálata során értem el, amennyiben figyelembe vesszük azt is, hogy ez a módszer dolgozik a legszűkebb és legkevésbé átfedő korintervallumokkal. Ha a módszerleírásban ajánlott értékeket vettem figyelembe, összességében majdnem 58%-os hatékonyságot kaptam a bonctermi vizsgálat során, illetve 55%-osat a Terry gyűjteményben és egy közel 59%-osat a váci múmiák esetében. Ezeket az eredményeket jelentősen meg lehetett javítani, amennyiben néhány évvel kibővíttem az eredeti korintervallumokat.

Általánosságban megállapítható a magyar minták alapján is, hogy a morfológiai jelegek alapján dolgozó technikák általában túlbecsülik a fiatalabb korú egyéneket és

alulbecslik az idősebbeket. A legnagyobb variabilitást a legidősebb egyének mutatják, ezáltal ők jelentik a legnagyobb kihívást is a biológiai korbecslés során.

A genetikai vizsgálatba beválogatott egyének esetében külön is elvégeztem a Meindl és Lovejoy (1985) módszer alapján az életkorbecslést, és mindösszesen 24%-os hatékonyságot tapasztaltam. A genotipizálás, majd a statisztikai kiértékelés során szignifikáns összefüggést kaptam az MSX1 gén rs3821947 polimorfizmusa és a koponya külső felszíni varratobliterációja között. A vizsgálat során mind az életkor, mind a genotípusok szignifikánsan befolyásolták a külső varratzáródás mértékét. Fontos megállapítani, hogy ezeket az összefüggéseket nem a mintavétel okozta, miszerint azért kaphattunk szignifikáns eredményt az adott allélvariáció esetében, mert abban a mintában az idősebbek is túlsúlyban voltak és így akár az életkor is hatással lehetett volna a varratzáródásra. Ezzel ellenkezőleg, a legmagasabb külső varratzáródási pontértékeket az rs3821947AA genotípus esetében tapasztaltam, míg a legmagasabb átlagos kort az rs3821947GG genotípus esetén figyeltem meg.

Egy kevésbé szignifikáns összefüggést tapasztaltam a BMP4 gén rs2761887 polimorfizmusa és a koponyavarratok záródása között. Tekintve, hogy a BMP4 gén azonos szignalizációs útvonalon található az MSX1 génnel és mindkét fehérje expresszálódik a születést követő időszakban is, ez az összefüggés megerősíti azt az elképzelést, miszerint ezek a gének szerepet játszhatnak a felnőttkori varratzáródás folyamatában is.

5. Következtetések

1. A koponya külső felszíni varratzáródásának szempontjából a népeségek nagyfokú variabilitást mutatnak. A recens magyar népeséget tekintve, a varratobliteráció nem mutatott szoros korrelációt az életkorral.
2. Minél idősebb volt kronológiailag a minta, annál jobb eredményt értem el a külső varratfelszín obliterációja alapján az életkorbecslésben, illetve a fekete népeség körében nagyobb volt a hatékonyság, mint az azonos korban élt fehér lakosság esetében.
3. 3. A belső varratfelszín obliterációja szorosabb összefüggésben volt a korrallal, bár itt az extrém tág korintervallumokkal dolgozó módszer az életkor egy durva becslésére volt csupán alkalmazható. Az életkorral kapcsolatos komolyabb következtetések levonására a módszer nem alkalmas, kiváltképp igazságügyi vonatkozásban.
4. A belső felszíni varratvonal elcsontosodása egy nemtől és rassztól független, általános, jellegzetes záródási mintázatok nélküli folyamat.
5. A bordák szegycsonti végének morfológiai változásai nagyobb korrelációt mutattak az életkorral, azonban a hatékonyság százalékos értékei az eredeti korkategóriákat alkalmazva nem voltak kielégítőek. Ezeket az intervallumokat kissé kibővítve már egy sokkal elfogadhatóbb eredményt kaphatunk.
6. Esetenként a szomszédos bordák más-más képet mutattak az életkorbecslésre alkalmazható jellegekben, és nem feltétlenül a negyedik bordavég mutatta a legszorosabb összefüggést a valódi korrallal. Ezért érdemes ennél a módszernél is több rendelkezésre álló bordavéget vizsgálni, mielőtt következtetünk egy életkor intervallumra.

7. Az igazságügyi gyakorlat során mindig érdemes a morfológiai életkorbecslő módszerekkel megállapított hozzávetőleges kort kibővíteni. Ennek mértékére vonatkozóan ajánlott kontrollvizsgálatokat elvégezni a helyi népességen.
8. Ahogy erre már számos kutató felhívta a figyelmet, a lehetőségekhez mérten minél több életkorbecslő módszert érdemes alkalmazni, főleg igazságügyi vonatkozásban.
9. A morfológiai módszerek a jelenlegi lehetőségeknél univerzálisabban nem lesznek alkalmazhatók és nem alkalmazhatók pontosabb életkorbecslésre. Ez az egyének nagyfokú heterogenitásának és a számos befolyásoló tényezőnek köszönhető. Előfordulnak egyes népességeknél jellemző mintázatok, így a különböző populációkon végzett kontrollvizsgálatok és a módszerek kisebb korrigálása mindenképp ajánlott.
10. Történeti antropológiai szempontból a morfológiai változásokon alapuló metódusok kielégítőek az életkorbecsléshez, hiszen a demográfiai elemzésekben többnyire nagyobb korcsoportokkal dolgoznak a kutatók.
11. Igazságügyi szempontból, főleg ha kevés képlet áll rendelkezésünkre, amennyiben szükséges, mindenképp érdemes megfontolni a jóval pontosabb molekuláris életkorbecslő módszerek használatát a mindennapi gyakorlatban.
12. A genetikai háttérnek meghatározó szerepe van a felnőttkori varratzáródásban. Ezt mindenképp érdemes lenne további vizsgálatokkal is megerősíteni, a varratok kialakításában, fejlődésében és záródásában szerepet játszó szignalizációs útvonalak résztvevőire koncentrálni.

6. Saját publikációk jegyzéke

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Wolff K, Vas Z, Sotonyi P, Magyar LG. 2012. Skeletal age estimation in Hungarian population of known age and sex. *Forensic Sci Int* 223(1-3):374 e371-378. **IF: 2,335**

Wolff K, Hadadi É, Vas Z. 2013. A novel multidisciplinary approach toward a better understanding of cranial suture closure: the first evidence of genetic effects in adulthood. *Am J Hum Biol* 25(6):835-843. **IF: 2,307**

II. Egyéb — Nem az értekezés témájában megjelent — eredeti közlemények:

Wolff K, Évinger S, Hajdu T, Gyenis G. 2012. Anthropological examination of the chronologically separated groups of the 11th–13th century Zalavár-Chapel (Zalavár-Kápolna) cemetery from Hungary. *Anthrop Anz* 69(4):473-490. **IF: 0,676**

Évinger S, Bernert Zs, Fóthi E, Wolff K, Kővári I, Marcsik A, Donoghue HD, O’Grady J, Kiss KK, Hajdu T. 2011. New skeletal tuberculosis cases in past populations from Western Hungary (Transdanubia). *Homo* 62(3):165-183. **IF: 0,542**