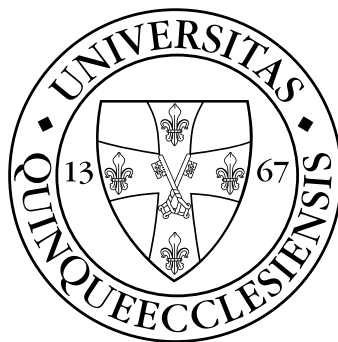


RNS alapú módszerek alkalmazása
az igazságügyi orvostanban

Doktori (PhD) – értekezés

Poór Viktor Soma



Témavezető: Dr. Sipos Katalin
Programvezető: Dr. Miseta Attila
Doktori Iskola vezetője: Dr. Kovács L. Gábor

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Pécs

2018.

Tartalomjegyzék:

Tartalomjegyzék:.....	2
Rövidítések jegyzéke:	4
Bevezetés.....	5
Posztmortem intervallum (PMI) becslésére irányuló hagyományos módszerek	5
Livores mortuales - süllyedéssel hullafoltok, Livores ex imbibitione - beivódásos hullafoltok	5
Rigor mortis - hullamerevség.....	6
Algor mortis - a holttest kihülése	7
Putrifikáció, bomlás	9
Igazságügyi entomológia	9
RNS degradáció és posztmortem intervallum összefüggése.....	11
Igazságügyi fogorvostan	14
Fogak alkalmazása DNS alapú személyazonosításban	15
PMI becslése fogak alapján.....	15
Összefoglalás.....	16
Célkitűzés.....	17
Anyagok és módszerek	18
Vérminták gyűjtése, tárolása	18
Fogminták gyűjtése, tárolása.....	18
Patológiai fogminták gyűjtése	18
Fogfeltárás.....	19
RNS izolálás vérből és fogból.....	19
RNS integritás mérése.....	20
Az izolált RNS minták genomiális DNS kontaminációjának ellenőrzése	21
Reverz transzkripció.....	22
PCR primerek tervezése	23
Polimeráz lánreakció (RT-PCR)	24
Amplikonok detektálása.....	25
Kvantitatív Real-Time PCR (RT-qPCR)	25
Statisztikai kiértékelés.....	26
Eredmények.....	27
Vércsepp korának meghatározása	27

RNS integritás mérése Agilent Bioanalyzerrel	30
Fogból RNS RT-PCR.....	34
A fogpulpából kapott eredmények validálása	37
Patológias fogak vizsgálata	39
Összefoglalás.....	42
Megbeszélés	43
Vércsepp korának meghatározása RNS degradáció alapján	43
PMI meghatározása fogból RNS degradációjának mérésével.....	44
RNS integritás mérése.....	44
PCR alapú vizsgálat	44
Fogból vizsgálatok limitációi	45
RNS alapú vizsgálatok a gyakorlatban	47
Összefoglalás.....	48
Köszönetnyilvánítás	49
Hivatkozások listája	50
Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemény	55
További tudományos közlemények.....	55
Konferencia előadások	56

Rövidítések jegyzéke:

ADP: adenzin-difoszfát

ATP: adenzin-trifoszfát

cDNS: komplementer DNS

EDNAP: European DNA profiling group

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

gDNS: genomiális DNS

miRNS: mikroRNS

mRNS: messenger (hírvivő) RNS

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: polimeráz láncreakció

PMI: posztmortem intervallum

RIN: RNA integrity number

rRNS: riboszómális RNS

RT-PCR: reverz transzkripció polimeráz láncreakció

STR: short tandem repeat

VNTR: variable number tandem repeat

Bevezetés

Posztmortem intervallum (PMI) becslésére irányuló hagyományos módszerek

A posztmortem intervallumon (PMI) egy adott személy halála és a holttestének feltalálását követő halottvizsgálata között eltelt időt értjük. Ezen időszak tartamának lehető legpontosabb becslése az igazságügyi orvostan intenzíven kutatott területe.

A holttest kihülését és a beálló hullamerevséget vizsgálva, már az ókori egyiptomiak és görögök is kidolgoztak egy egyszerű becslési módszert a halál beállta időpontjának megállapítására (Sachs, 2001). A késő középkori Kínából fennmaradt „A bűnök elsőprérének összegyűjtött jegyzetei” című művében Szung Ce hosszan ismerteti az emberi test lebomlásának eltérő sebességét az egyes évszakokban (Song, 2013).

Az igazságügyi orvosszakértői gyakorlatban a halál beállta időpontjának meghatározására a korai hullajelenségek adnak elsődleges támpontot. Ezek közé tartoznak a süllyedésszerű hullafoltok, a hullamerevség és a holttest kihülése.

Livores mortuales - süllyedésszerű hullafoltok, Livores ex imbibitione - beivódásos hullafoltok

A szív működés végső, visszafordíthatatlan leállításával megszűnik a vérkeringést fenntartó nyomáskülönbség a szervezet ereiben. A vér a gravitáció hatására a test legmélyebben fekvő részeibe áramlik. Ez a süllyedés leginkább a vörösvértesteket érinti, amelyek végül a bőr alatt, a holttest legmélyebben fekvő részein jellegzetes, szederjes vörös foltokat hoznak létre. Bizonyos ideig azonban ezen bőrfelületekre nyomást kifejtve (hüvelykujjbegy-nyomás- „thumb-pressure”) a vér még kipréselhető az erekből, ami a foltok elhalványodásával jár. Ezen időszakban, a holttest pozíciójának megváltoztatásával, a hullafoltok vándorolhatnak. (Livores mortuales seu post mortem hypostasis).

A bomlás előrehaladtával a vörösvértestek membránja károsodik, az erek falának permeabilitása nő, a kiszabadult hemoglobin kijut az ereket körülvevő szövetekbe. Ezt

követően a hullafoltok mechanikus nyomás hatására nem halványodnak el, illetve a holttest pozícióját megváltoztatva sem vándorolnak tovább. Ezek az ún. beivódásos hullafoltok (Livores ex imbibitione). A mindennapi gyakorlatban a hullafoltok kialakulása és azok mobilizálhatósága gyakran szolgál a PMI becslésére.

Állapot	Átlag	Szórás (SD)	Minimum	Maximum
Kialakulás	0,75	0,5	0,25	3
Maximum	9,50	4,5	3,00	16
Ujjbegy nyomásra halványulás	5,50	6,0	1,00	20
Teljes vándorlás	3,75	1,0	2,0	6
Részleges vándorlás	11,00	4,5	4,00	24

1. táblázat. *Hullafoltok kialakulása és változása a halál után eltelt idő függvényében (óra)*
(Mallach, Laudahn, 1964)

A szakirodalomban található adatok összehasonlítása (Mallach, Laudahn, 1964) alapján látható, hogy a hullafoltok kialakulása, beivódása nagyon nagy varianciát mutat (1. táblázat). Ez a variancia feltételezhetően számos külső és belső tényező következtében alakul ki (például: halál oka, módja, a néhai alapbetegsége(i), a halál előtti maghőmérséklet, időjárási körülmények). Azonban ezeknek a faktoroknak a PMI hosszára való pontos hatása(i) nem ismert(ek). Ez alapján kizárólag a hullafoltok vizsgálata, értékelése a PMI-re csak nagyon durva becslést adhat.

Rigor mortis - hullamerevség

Közvetlenül a halál beálltát követően az izomtónus lecsökken, az izmok elernyednek, mivel a működésükben alapvető idegi stimulusok megszűnnek. Bizonyos idő elteltével egyre inkább az izmok merevedése lesz megfigyelhető. A hullamerevség kialakulásának sorrendjét a Nysten szabály írja le: először (a látható izmok közül) az állkapocs izmai és a mimikai izmok merevednek meg, majd ezt követik a nyak izmai, a felső végtagok, a törzs és az alsó végtagok izmai, izomcsoportjai. A hullamerevség fő oka

az izomszövetben csökkenő adenozin-trifoszfát (ATP) koncentráció. Az ATP szükséges az aktomiozin molekulakomplex destabilizálásához. Adenozin-difoszfátot (ADP) kötve a miozin molekula permanensen kapcsolódik az aktinhoz. A később bekövetkező autolitikus folyamatok okozta fehérjebomlás előrehaladtával az aktomiozin molekulakomplex elbomlik, az izmok merevsége oldódik.

A hullamerevség kialakulását, tartós fennállását és oldódását számos tényező befolyásolja: pl.: a halál előtti testhőmérséklet, az izmok glikogén raktárának töltöttsége, életkor, alapbetegségek, gyógyszerek, ruházat, halál előtti aktivitás. Ennek ellenére a rigor mortis jellegének vizsgálata rutinszerűen alkalmazott a PMI becslésére. Az irodalmat áttekintve (2. táblázat) azt láthatjuk, hogy megközelítő becslésre alkalmas, azonban az egyes esetekben nagy varianciával kell számolni.

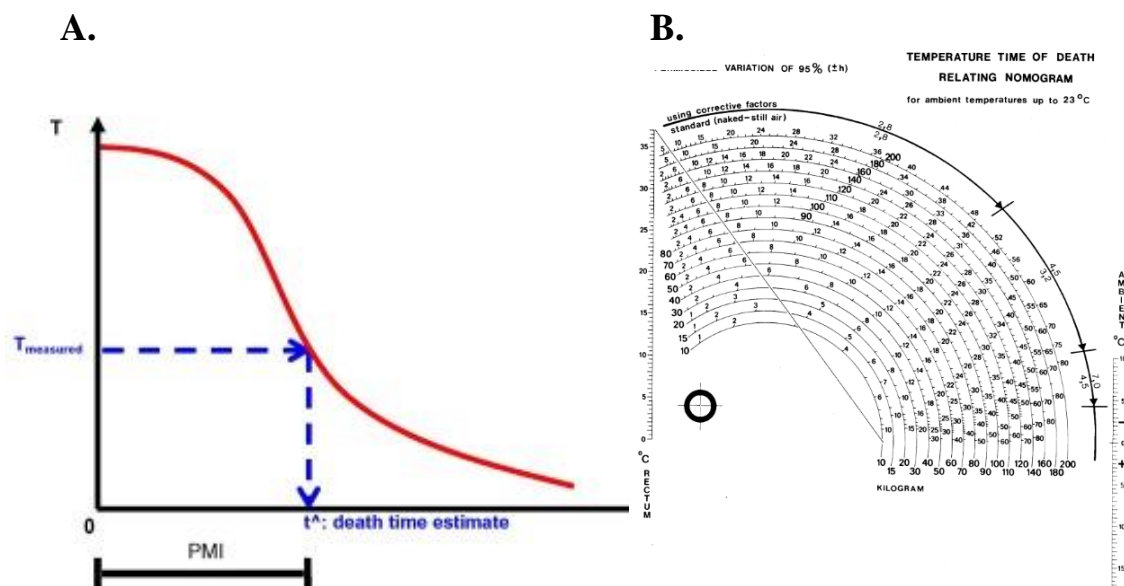
Hullamerevség fázisa	Átlag	Szórás (SD)	95%-os konfidencia intervallum
Kialakulás kezdete	3	2	0-7
Teljes kialakulás	8	6	6-10
Fennállás	57	29	29-85
Feloldódás	76	12	12-140

2. táblázat. *A hullamerevség egyes fázisainak időbeli lefolyása.* (Mallach, Laudahn, 1964) táblázatának átdolgozása. *Az egyes értékek a halál beállta utáni időt mutatják órában.*

Algor mortis - a holttest kihülése

A hőháztartás szabályozásának elvesztésével a holttest hőmérséklete és a környezet hőmérséklete között egyfajta fizikai kiegyenlítődés indul meg, ami az égövünkön tapasztalható klimatikus viszonyok esetében alapvetően a holttest kihülését jelenti. Ez a kihülési folyamat egy szigmoid görbével jellemezhető az idő függvényében (1./A ábra). A maghőmérséklet (melyet az agyban, a májban vagy a végbélben lehet pontosan mérni) a halál beálltát követő egy-két órában jelentősen nem csökken, bizonyos esetekben nőhet is (pl.: nyáron tartós 37 °C feletti nappali környezeti hőmérséklet). Ezt követi egy közel lineáris szakasz, ahol a kihülés folyamata közelítően egyenesen arányos az eltelt idővel.

Mikor a holttest hőmérséklete már csak ~ 4 °C-kal különbözik a környezetétől, a kihülés sebessége lecsökken.



1. ábra. **A.** A holttest hőmérsékletének változása szigmoid görbével írható le. (Hubig, Muggenthaler, Sinicina, Mall, 2015) **B.** A Henssge nomogram alapján grafikai úton adható becslés a halál beállta óta eltelt időintervallumra.

A kihülés mértékét és folyamatát számos faktor befolyásolja: a test maghőmérséklete a halál beálltakor, a testtömeg, a test szöveti összetétele (zsírszövet-izomszövet aránya), testtartás, ruházat, a környezet hőmérséklete, légmozgás, páratartalom. A kihülés gyakorlati alkalmazását a PMI becslésében megkönnyíti a Henssge nomogram (2/B. ábra) (Henssge, 1988). A rektális hőmérséklet, külső hőmérséklet és a befolyásoló faktorok ismeretében a grafikus lapon elvégezhető a PMI becslése. Az ábrán leolvasható, hogy korrekciós faktorok alkalmazása esetén a 95%-os konfidencia intervallum akár ± 7 óra is lehet. A becslés bizonytalanságát növelheti továbbá például a környezeti hőmérséklet ingadozása is.

Putrifikáció, bomlás

A szövetek lebomlása autolitikus és bakteriális folyamatok összessége. A különböző szövetek eltérő sebességgel bomlanak, ami felhasználható a halál beálltának durva becslésére (Naewe, 1978). Az autolitikus folyamatok az emésztőrendszer szerveiben az emésztőenzimek aktivitása révén a leggyorsabbak. Harminchat órával a halál beállta után a hasnyálmirigy bomlása még hűtött holttest esetében is előrehaladott, a Langerhans szigetek sejtjei jelentősen károsodnak (Cocariu et al., 2016).

A pontos meghatározást lehetetlenné teszi, hogy a bomlás számos külső és belső tényezőtől függ, többek között: hőmérséklet, testalkat, a holttest öltözöttsége, a holttest környezete, ragadozók és dögevő élőlények jelenléte (Zhou, Byard, 2011). A pontos becslés másik objektív korlátja, hogy a bomlási folyamatok nehezen vagy egyáltalán nem kvantifikálhatók mérésekkel, a vizsgálatban nagy hangsúlyt kap az eljáró szakértő személyes tapasztalata.

A bomlási folyamatokban jelentős szerepet játszanak a mikroorganizmusok, melyek forrása lehet mind a saját flóra (emésztőtraktus, bőr), mind a környezet (Tumer et al., 2013). A baktériumpopulációk összetétele, mennyisége a bomlás előrehaladtával változik. A bakteriális szukcesszió nyomon követésével szintén becsülhető a PMI hossza (J. L. Metcalf et al., 2016; Jessica L. Metcalf et al., 2013).

Igazságügyi entomológia

Egy, szabadban található holttest a halál beállta után röviddel számos, nekrofágiára specializált, illetve opportunistá rovar vonz. Elsőként a fémeslégyfélék (*Calliphoridae*) (Grassberger, Reiter, 2001) és a húslégyfélék (*Sarcophagidae*) családjába tartozó fajok érkeznek, azonnal petét vagy lárvát rakva a kültakarón, vagy a testnyílásokon bejutva a testüregei szervekbe. A bomló szövetből táplálkozó lárvák fejlődését tanulmányozva következtetni lehet a peterakás időpontjára, ezzel áttételesen a halál beálltának idejére (Amendt, Richards, Campobasso, Zehner, Hall, 2011; Harvey, Gasz, Voss, 2016).

A kezdeti kolonizációt több hullámban további fajok követik. Többek között a púposlégyfélék (*Phoridae*) és porvafélék (*Dermestes*) családokba tartozó fajok. Ezen

szukcessziós sor alapján hónapos időintervallumban lehetséges a PMI becslése (Kulshrestha, Satpathy, 2001).

A fajok azonosításához, különösen lárva állapotukban, speciális rendszertani, taxonómiai szaktudás szükséges. Az utóbbi évek kutatásai ezen szakismeret kiváltására vagy kiegészítésére törekcszenek a fajok DNS alapú azonosításával (GilArriortua, Saloña Bordas, Köhnemann, Pfeiffer, de Pancorbo, 2014; Malewski, Draber-Mońko, Pomorski, Łoś, Bogdanowicz, 2010).

RNS degradáció és posztmortem intervallum összefüggése

A DNS az RNS-nél jóval nagyobb stabilitást mutat, ami részben a szerkezetbeli különbséggel (Fordyce, Kampmann, van Doorn, Gilbert, 2013), részben pedig a környezetben megtalálható RNáz enzimek aktivitásával magyarázható. A bőrünk felszínén megtalálható ribonukleázok a leváló, elhalt hámsejtekkel együtt eljuthatnak a vizsgált mintához (Probst et al., 2006; Tabachnick, Freed, 1961). Ennek ellenére számos adat bizonyítja, hogy az RNS kimutatása a humán szövetekben hosszú idő elteltével is lehetséges a halál beállta után.

Klinikai kutatások elővizsgálataiként több kutatócsoport vizsgálta az RNS stabilitását. A fenti vizsgálatokban *ex-vivo* szövetekből történt RNS izolálás, majd cDNS konverzió reverz transzkriptáz segítségével. Az így előállított mintákból PCR-rel sokszorozítottak fel housekeeping géneket. A pozitív amplifikáció alapján tekintettek egy-egy mintát további molekuláris diagnosztikára alkalmasnak. Magzati és újszülött tüdőszövet esetében 41 óra (De Paepe et al., 2002), emberi csont (Kuliwaba, Fazzalari, Findlay, 2005) esetében pedig 48 óra PMI után is alkalmasnak bizonyult az izolált RNS a további molekuláris biológiai analízisre. Ezek az eredmények közvetlen igazságügyi relevanciával nem rendelkeznek, de rávilágítottak a RNS hosszabb idejű stabilitására, ami megnyitotta az utat az igazságügyi kutatások számára.

Setzer és munkatársai (Setzer, Juusola, Ballantyne, 2008) vér, nyál és ondó foltokban, illetve hüvelyi törletekben vizsgálták az RNS detektálhatóságát. A mintából izolált RNS-ből reverz transzkripciót követően kiválasztott szakaszokat PCR segítségével amplifikálták fel. A termékek agaróz gélelektroforézis segítségével detektálhatók. Tapasztalataik szerint szobahőmérsékleten, fénytől és nedvességtől elzártan tartott minták némelyikéből akár 547 nap elteltével is lehetséges volt a pozitív PCR reakcióhoz elegendő mennyiségű RNS-t izolálni. Azonban a környezeti hatásoknak kitett mintákban az RNS stabilitása drasztikusan lecsökkent, az esőnek közvetlenül kitett vér, nyál és ondó foltok esetében az RNS 1-7 nap után már nem volt kimutatható.

Harminc holttestből vett szívizomszövet, perikardiális folyadék és vér vizsgálatát követően nem volt összefüggés az RNS integritás érték és a posztmortem intervallum között (González-Herrera, Valenzuela, Marchal, Lorente, Villanueva, 2013). Ez

magyarázható a rövid posztmortem intervallummal, ami öt és huszonnégy óra közé esett mindegyik, 4 °C-on tárolt holttestnél. A rövid, 95 – 150 bázispár hosszúságú PCR termékek amplifikációja sikeres volt minden szövetmintából.

Hosszabb posztmortem intervallumban (maximum 168 óra) vizsgált patkányszívekben a miR-1 mikroRNS és 18S riboszómális RNS mennyiségét mérték real-time PCR-ral. A delta Ct értékek változása parabolával volt jellemezhető, ami a jó illeszkedés ellenére nem alkalmazható PMI kalkulációjára (Li et al., 2014).

Sampaio-Silva és munkatársai (Sampaio-Silva, Magalhães, Carvalho, Dinis-Oliveira, Silvestre, 2013) egér harántcsíkt izom modellben vizsgálták a PMI hatását az RNS degradációjára. Általánosan kifejeződő, ún. housekeeping génekről (*Actb*, *Gapdh*) és harántcsíkt izomszövetre specifikus génekről átíródó mRNS molekulák mennyiségének változását mérték kvantitatív real-time PCR segítségével. A legstabilabb *Rps29* mRNS (riboszómális fehérjét kódoló) Ct értékével normalizálva a többi géntermék Ct értéke a PMI növekedésével egyenesen arányosan növekedett. A felállított matematikai modell nagy pontossággal becsülhetővé tette a PMI-t, azonban csak a halál beállta után kilenc óráig. Gyakorlati alkalmazás szempontjából az ennyire rövid időintervallum használhatósága limitált (Hunter, Pozhitkov, Noble, 2017).

Alaputatási adatok mutattak rá arra, hogy a biológiai halál beálltával a sejt szintű jelenségek, így a transzkripció nem szűnik meg azonnal (Pozhitkov et al., 2017). Ezen túlmenően a posztmortem szövetekben bizonyos gének expressziójának emelkedését tapasztalták. (Itt további kísérletekkel bizonyítandó, hogy valós génexpresszió változásról van szó, vagy a különböző mRNS molekulák eltérő stabilitásáról.) Zebradánió és egér kísérleti modelleken Hunter és munkatársai (Hunter et al., 2017) DNS microarray módszerrel vizsgálták a posztmortem génexpresszió változását. Az egyes DNS microarray chipek ~37 000 próbát tartalmaztak, amiből gépi tanulási algoritmusok segítségével kiválasztottak körülbelül 500 gént, melyeknek változása becslést adhat a PMI-re. Az eredményeik alapján a zebradánió esetében PMI 100 óráig, az egér máj esetében pedig PMI 50 óráig lehetséges nagy pontosságú becslés elkészítéséhez. A vizsgált egér agyak esetében nem sikerült ilyen korrelációt felállítani, ami a szerzők szerint a nagyobb biológiai variabilitás következménye. Gyakorlati alkalmazás előtt mindenképp további kísérletekre van szükség azonosítani a humán szövetekben történő génexpresszió változást.

A PMI meghatározásával párhuzamosan több RNS alapú igazságügyi kutatási terület is nyílt az elmúlt évtizedben. A legtöbb eredményt a különböző szövetek, biológiai minták azonosításában publikálták. Egy szervezeten belül a különböző szövetek sejtjei azonos genommal rendelkeznek, de a transzkriptomjuk jelentősen különbözik. Az mRNS profil felállítása általában reverz transzkripciót követően PCR vagy real-time PCR segítségével történik (Haas, Klessner, Maake, Bär, Kratzer, 2009; Vennemann, Koppelkamm, 2010).

A kriminalisztikai gyakorlatban a biológiai nyomok azonosítására rutinszerűen alkalmazott fehérje kimutatási módszerekkel szemben az új eljárás előnye, hogy kis mennyiségű mintát igényel, a reakció multiplexelhető, azaz ugyanabból a mintából egyetlen mérésrel több különböző termék is detektálható. RNS-DNS együttes izolálása esetén pedig minimalizálható a mintaveszteség (Grabmüller, Madea, Courts, 2015; Haas et al., 2015). Hátrányként tekinthető viszont az eljárások munka-, eszköz- és időigénye, továbbá az RNS limitált stabilitása (Hansen, Lesnikova, Funder, Banner, 2014).

Igazságügyi gyakorlati alkalmazás szempontjából ígéretesnek tűnnek azok a kutatások, melyek az mRNS profil alapján a menstruációs és az orrvérzésből származó vér azonosítására irányulnak (Bauer, Patzelt, 2008; Jakubowska, Maciejewska, Bielawski, Pawłowski, 2014; Sakurada, Akutsu, Watanabe, Yoshino, 2012). Ezen módszerek RT-PCR segítségével detektálják az adott szöveti váladéokra specifikus mRNS molekulákat. Ezek hüvelyváladék esetében mátrix metalloproteázok (MMP7 és MMP11), mucin 4 (MUC4) és human β -defensin (HBD1). Orrvérzés esetén a vérrel keveredett orrváladékból kimutatható a statherin (STATH).

Az mRNS alapú testnedv meghatározási módszerek egyik legnagyobb problémája az RNS alacsony stabilitása. Amennyiben egy nyálgyanús foltból a statherin génterméke nem mutatható ki, az jelentheti azt, hogy a vizsgált folt nyál, vagy a kimutatni kívánt mRNS mennyisége már nem éri el a kimutatási küszöböt. Sirker és munkatársai ezért egy 17 hónapos időintervallumban vizsgálták a specifikus mRNS markerek kimutathatóságát vér, nyál és ondó foltokból (Sirker, Schneider, Gomes, 2016). Eredményeik alapján a száraz, fénytől elzárt körülmények között tartott mintákból real-time PCR-rel akár 17 hónap elteltével is detektálni lehetett a specifikus transzkriptumokat. A nedves körülmények között tárolt nyál és ondó mintákból viszont jóval rövidebb ideig (maximum nyolc hétig) lehetett kimutatni a vizsgált termékeket.

Igazságügyi fogorvostan

A fogak, a fogászati ismeretek alkalmazása az igazságügyi orvostanban régi múltra tekint vissza. Bírósági eljárásban elsőként 1814-ben működött közre fogorvos szakértőként (Priyadharsini, Masthan, Balachander, Babu, Jimson, 2015), egy olyan esetben, amelyben Dr. Granville Sheep Pattison anatómia oktatót és két orvostanhallgatót vádoltak meg sírbrablással, Mrs. Janet Mc Alister holttestének eltulajdonításával. Bizonyítékként szolgált egy, a boncteremben talált koponya, melyet fogsora alapján Mrs. Mc Alister koponyájaként azonosított korábbi fogorvosa.

Fogászati leletek alapján, morfológiai alapon lehetséges ismeretlen személyek azonosítása különösen, ha jellegzetes elváltozások, beavatkozások nyomai vannak jelen, például protézis, implantátum (Mansour, Fuhrmann, Paradowski, van Well, Püschel, 2017). Különleges jelentősége van a fogak alapján történő személyazonosításnak tömegkatasztrófák esetében, ahol megfelelő körülmények között a DNS alapú módszereknél gyorsabb és költséghatékonyabb lehet (Nathan, Sakthi, 2014). A fogászati leleten alapuló személyazonosítás az antemortem fogstátusszal való összehasonlítással történik. Ennek elengedhetetlen feltétele a megfelelő minőségű dokumentáció, ideális esetben fogászati röntgen megléte (Hinchliffe, 2011).

A fogak fejlettségi állapota alapján lehetséges a biológiai életkorra való becslés (Gustafson, 1950). Ez egyrészt ismeretlen személyazonosságú holttestek esetén segíthet, kiegészítve további antropológiai vizsgálatokkal. Másrészt élő személyek esetén is szükségessé válhat a biológiai kor meghatározása (például bevándorlási esetekben a gyermek, fiatakorúnak mondott személyek életkorának meghatározása) (Koh et al., 2017; Mansour et al., 2017; Marroquin et al., 2017).

Harapasos sérüléseknél az elkövető azonosítása megkísérélhető a fognyomok alapján mind emberi (Naru, 1997; Verma, Kumar, Bhattacharya, 2013), mind állati (Bernitz, Bernitz, Steenkamp, Blumenthal, Stols, 2012; Santoro, Smaldone, Lozito, Smaldone, Introna, 2011) támadó esetében. A pusztán morfológiai hasonlóság alapján történő azonosítást vagy kizárást számos szakmai kritika érte az utóbbi években (Reesu, Brown, 2016), ezért ideális esetben kiegészíthető a támadó nyálából történt DNS analízissel (Reesu, Brown, 2016).

Fogak alkalmazása DNS alapú személyazonosításban

Ismeretlen holttest DNS alapú személyazonosításában is szerepet kaphatnak a fogak. Előrehaladott bomlás esetén a lágyszöveti DNS degradációja lehetetlenné teheti a teljes genetikai profil felállítását. Teljes szkeletonizáció esetén szintén lehetetlen a lágyszöveti DNS extrakciója. Ezekben az esetekben alkalmazható a dentin, mint DNS forrás (Higgins, Austin, 2013; Malaver, Yunis, 2003; Xavier et al., 2011). A dentin állomány *in vivo* jóval kevesebb DNS-t tartalmaz, mint a hagyományos esetekben alkalmazott szövetek (pl. vér, izom), azonban az *intrinsic* DNS bomlás is jelentősen elhúzódik (Dobberstein, Huppertz, von Wurmb-Schwark, Ritz-Timme, 2008). A fogzománc fizikai védelmet biztosít a dentinnek egyes káros fizikai behatások ellen, mint az UV sugárzás vagy a nedvesség, ezzel is késleltetve a DNS lebomlását (Manjunath, Chandrashekar, Mahesh, Vatchala Rani, 2011). Régi, jellemzően antropológiai minták esetében a fogzománc megakadályozhatja a modern, jelenkorból származó, külső DNS-sel való kontaminációt (Adler, Haak, Donlon, Cooper, 2011; Kaestle, Horsburgh, 2002).

PMI becslése fogak alapján

A fogakban posztmortem lejátszódó folyamatokról kevés irodalmi adat található. Holttestekből eltávolított fogak mikroszkópos vizsgálata alapján elmondható, hogy a vitális odontoblastok száma nullára csökkent 5 nap elteltével (Vavpotič, Turk, Martinčič, Balažic, 2009).

Élő személyekből eltávolított, egészséges fogak esetében vizsgálták a rövid távú tárolás hatását a fogpulpa RNS degradációjára. A vizsgált fogakból vagy azonnal, vagy 6 óra (4 °C-on való tárolás), vagy 24 óra (-20 °C, illetve -80 °C-on történő tárolás) elteltével eltávolították a pulpát, és izoláltak RNS-t. Az RNS integritást agaróz gélelektroforézissel vizsgálva a fenti körülmények mellett nem volt degradáció detektálható (Conde et al., 2012).

Young és munkacsoportja sertés fogakon végeztek PMI becslésére irányuló vizsgálatokat (Young, Wells, Hobbs, Bishop, 2013). Kvantitatív real-time PCR-ral

hasonlították össze a β -aktin mRNA molekula 70 és 300 bp hosszúságú szakaszainak arányát az idő függvényében. Eredményeik alapján a hosszabb mRNA szakasz degradációja gyorsabb volt a rövidebb szakaszénál. A két termék arányának változása nem volt lineáris. A 300 bp termék a 84. napig volt kimutatható. A PMI becslés pontosságát a pulpaszövet degradációjának kolorimetriás mérésével javították.

Összefoglalás

- Az igazságügyi orvostan egyik legfontosabb feladata a halál beállta óta eltelt idő meghatározása.
- Az ókortól kezdve számos módszert dolgoztak ki erre a célra. Ezek a módszerek:
 - Csak becslést tudnak adni a PMI-re.
 - Csak egy bizonyos időintervallumon belül használhatóak (órák – napok: klasszikus hullajelenségek, napok – hónapok: entomológia, hónapok – évtizedek: antropológia).
- Számos vizsgálat irányult az RNS degradáció kvantifikációjára és abból PMI becslésére.
- A fogak igazságügyi alkalmazása széleskörű.
- A fogak nagyfokú fizikai, mechanikai ellenálló képességgel rendelkeznek, ami bizonyos mértékig függetlenítheti őket a környezeti körülményektől.
- A fogak széleskörű igazságügyi felhasználását bizonyítják a fent ismertetett módszerek. Tehát egy, a fogak vizsgálatán alapuló PMI becslési módszer kifejlesztése esetén az igazságügyi szakértők építhetnek már használatban lévő metodikákra.

Célkitűzés

Munkám során az RNS potenciális igazságügyi alkalmazásait vizsgáltam. Célul tűztem ki egy, az RNS degradációján alapuló eljárás kidolgozását a posztmortem intervallum becslésére. Az alábbi részproblémákat vizsgáltam:

- Metodológia kidolgozása, mely alkalmazható igazságügyi mintákban RNS degradációjának mérésére.
- Különböző eredetű minták vizsgálata révén kiválasztani a fenti kérdésnek megfelelő mintákat.
- Mintavételi protokoll kidolgozása.
- Meghatározni az RNS degradáció mérésével történő becslés által megítélhető időintervallumot, illetve a becslés pontosságát.

Anyagok és módszerek

Ebben a fejezetben található az összes módszer és protokoll leírása, melyet kísérletes munkám során alkalmaztam. A leírásokban az egyes komponenseknél és reagenseknél az eredeti, angol megnevezést tüntettük fel az egyértelmű azonosíthatóság érdekében.

Vérminták gyűjtése, tárolása

Egészséges önkéntesektől teljes körű tájékoztatás után vénás vért vettünk BD natív vérvételi csövekbe. A vérvétel után azonnal cellulóz szűrőpapírra 50 mikroliternyi teljes vért pipettáztam. Száradás után a mintákat az RNS izolálásig fénytől elzárva, szobahőmérsékleten tárolva.

Fogminták gyűjtése, tárolása

Az ép őrlő és előőrlő fogakat egészséges önkéntesek ajánlották fel tudományos vizsgálatokhoz, akiknél a fogak fogszabályozás céljából lettek eltávolítva. A szúvas vagy bármilyen más fogbetegségben érintett fogakat kizártuk az előzetes vizsgálatokból. A mintákat pseudo-anonimizálva azonosítottam. Az eltávolított, de még nem feltárt fogak szobahőmérsékleten (20 °C – 25 °C-on), fénytől védett helyen, egyedi műanyag tárolóedényben voltak tárolva, ezzel modellezve a fekvési idő alatt lejátszódó folyamatokat. Az inkubációs idő 0 és 121 nap közötti volt. Az inkubációt követően a feltárássig a fogak -80 °C-on tárolva.

Patológiás fogminták gyűjtése

Az eltávolított, patológiás fogakat a fogorvosi páciensek önkéntesen ajánlották fel tudományos vizsgálatokhoz. A fogak parodontológiai, protetikai vagy konzerváló fogászati okok miatt kerültek eltávolításra. A betegek teljes körű tájékoztatást kaptak. A

fogak eltávolítás után azonnal -20 °C-ra voltak helyezve, majd a feltárásig -80 °C-on hűtve tárolva.

Fogfeltárás



2. ábra. Fogfeltárás fogorvosi fúróval

Az inkubációs idő letelte után a fogakat folyamatos vízhűtés mellett gyémánt vágófejű fogorvosi turbinával (15 000 rpm) tártuk fel. A feltárás során a „középső síkban” bevágást ejtettünk (2. ábra). A bevágásba egy fogorvosi vésőt illesztettünk, majd egy határozott kalapácsütéssel kettéválasztottuk a fog két felét. A fogbél állományt steril fogorvosi „szondával” távolítottuk el a pulpaüregből. Az eltávolított pulpát steril Eppendorf csőbe helyeztük és jégben szállítottuk. A további felhasználásig -70 °C-on tárolva.

A beavatkozás előtt minden eszköz RNáz mentesítve volt.

RNS izolálás vérből és fogbélből

Az RNS izoláláshoz minden esetben RNeasy Micro Plus (Qiagen) kitet használtam, a minták előkészítése különbözött:

A vércsepp minták 350 µl RLT + 3,5 µl β-merkapto-etanol lízis pufferben lettek feltárva.

A fogbél minták 350 µl RLT + 3,5 µl β-merkaptó-etanol lízis pufferben egyszer használható steril polipropilén mozsártörő (Axygen) segítségével lettek homogenizálva.

A következő lépéstől kezdve az RNS izolálás mindkét mintatípus esetében megegyezik. A lizátumot QIAshredder (Qiagen) oszlopon centrifugáltam 13200 fordulatszámon 2 percig a minta homogenizálása céljából. Az átszűrt lizátumot gDNA eliminator oszlopra vittem és 8000 g-n centrifugáltam 30 másodpercig. Ez a lépés a genomiális DNS kontaminációtól mentesíti az RNS-t. A szűrletet 350 µl 70%-os etil-alkohol oldattal elegyítettem, majd az RNeasy MinElute oszlopra vittem. A lépés során az RNS az oszlophoz kötődik. Tizenöt másodperc 8000 g-n történő centrifugálás után 350 µl RW1 mosó puffert pipettáztam az oszlopra, majd újabb centrifugálás (15 másodperc, 8000 g) következett.

Oszlopon történő DNáz kezelés: az oszlopra 80 µl DNase I inkubációs mixet (10 µl DNase I stock solution + 70 µl Buffer RDD) pipettáztam, majd 15 percig 30 °C-on inkubáltam az esetleges DNS maradványok teljes eltávolítása céljából. Emésztés után az enzimkeveréket 350 µl RW1 pufferrel mostam le az oszlopról.

500 µl RPE puffert (mosó puffer az oszlopon maradt sók eltávolításához) adtam az oszlopra, amit 15 másodperc 8000 g centrifugálás követett. 500 µl 80%-os etil-alkohol oldatot pipettáztam az oszlopra, majd 8000 g-n 2 percig centrifugáltam. Az oszlopot egy új gyűjtőcsőbe helyeztem és a membrán kiszárítása érdekében 5 percig teljes sebességgel centrifugáltam.

Az elúcióhoz az oszlopot egy 1,5 ml-es csőbe helyeztem. 16 µl RNáz mentes desztillált vízzel oldottam le az RNS mintát 1 perc centrifugálással az oszlopról.

A tisztított RNS minták -70 °C-on tárolva felhasználásig.

RNS integritás mérése

Az izolált RNS integritásának meghatározására Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) készüléket alkalmaztam RNA 6000 Pico Total Eukaryotic mikrofluidikus (Agilent) chippel.

A mérés során a gyártó leírását követtem, melynek rövid változatát az alábbiakban foglalom össze:

A munka megkezdése előtt a reagenseket legalább harminc percen keresztül szobahőmérsékleten tartottam. Az előzőektől kivétel az RNS létra, melyet fokozatosan, jégbe helyezve hagytam felolvadni.

- 550 μ l RNA gel matrix pipettázása a szűrő filterre
- a szűrő centrifugálása 1500 g-n 10 percig
- az átszűrt gél mátrix szétosztása 65 μ l-enként
- alapos vortexelés után 1 μ l RNA dye concentrate (RNS-hez specifikusan kötődő festék) hozzáadása a 65 μ l szűrt gél mátrixhoz
- az új Pico chip behelyezése a chip priming station-be
- 9 μ l gél keverék pipettázása a G-vel jelölt lyukba
- a chip priming station lezárása, majd a fecskendő akadásig történő lenyomása
- 30 másodperc után a fecskendő kiengedése
- 9-9 μ l gél keverék pipettázása a G-vel jelölt lyukakba
- 9 μ l gél keverék pipettázása a CS-sel jelölt lyukba
- 5-5 μ l RNA marker pipettázása az 1-11-ig számozott minta lyukba, illetve a létrával jelölt lyukba
- 1 μ l RNA ladder és 1-1 μ l minta pipettázása
- a chip rázatása 2400 rpm fordulatszámon 1 percig
- a chip betöltése a 2100 Bioanalyzer készülékbe és a mérés indítása

A mérések kiértékelése a 2100 Expert (Agilent) szoftverrel történt.

Az izolált RNS minták genomiális DNS kontaminációjának ellenőrzése

Az RT-PCR technika egyik legnagyobb potenciális buktatója, hogy az esetleges genomiális DNS (gDNS) szennyeződés álpozitív reakciót adhat. Ennek kiküszöbölése érdekében az RNS izolálása során a megfelelő óvintézkedéseket megtettem (gDNA

eliminator oszlop, illetve DNáz enzimmel történő hasítás, részletesen lásd az RNS izolálás fejezetet). Az esetleges gDNS kontamináció hatása azonban csökkenthető a megfelelő primerek tervezésével: A messenger RNS-re tervezett primerek esetében a primer pár legalább egyik tagja exon-exon határra esett, ezért az esetleges genomiális DNS szennyeződés nem ad terméket, a PCR reakció kizárólag cDNS templát jelenléte esetén játszódik le. Ez a specificitás olyan PCR reakcióval volt ellenőrizve, amiben kizárólag genomiális DNS volt a templát.

Reverz transzkripció

A cDNS szintézishez High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztam az alábbiaknak megfelelően:

10x RT puffer	2 µl
25x dNTP mix	0,8 µl
10x random primer mix	2 µl
Multi Scribe reverse transcriptase	1 µl
50 ng RNS minta	változó
Nukleáz mentes víz	változó
Teljes reakció térfogat:	20 µl

A reakció hőprofilja:

60 °C	10 perc
25 °C	10 perc
37 °C	120 perc
85 °C	5 perc

A cDNS minták felhasználásig -20 °C tárolva.

PCR primerek tervezése

A hatékony és megbízható polimeráz láncreakció alapköve a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező és specifikus oligonukleotidok, más néven primerek alkalmazása. Szerencsére napjainkra fejlett eszközök állnak rendelkezésünkre.

Primerek tervezéséhez az NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) által üzemeltetett primer tervező alkalmazást használtam (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Az összes tervezett oligonukleotid annealing hőmérséklete azonos, 60 °C, így az egyes reakciók párhuzamosan futtathatóak. A tervezett primerek specifikusak voltak a humán β -aktin messenger RNS-re (NM_001101.3), illetve a humán 28S riboszómális RNS-re (NR_003287.2).

Primer név	Primer iránya	Primer szekvencia	Amplikon méret	Amplikon név
Actb 11	forward	GCCGCCAGCTCACCAT	206 bp	Act 200
Actb 21	reverse	GATGCCTCTCTTGCTCTGGG		
Actb 12	forward	GCCGCCAGCTCACCAT	413 bp	Act 400
Actb 22	reverse	GTACATGGCTGGGGTGTGTA		
Actb 12	forward	GCCGCCAGCTCACCAT	816 bp	Act 800
Actb 23	reverse	CCAGGAAGGAAGGCTGGAAG		
28S 34	forward	CTCAGTACGAGAGGAACCGC	179 bp	28S 200
28S 42	reverse	GATGGTAGCTTCGCCCCATT		
28S 32	forward	CAATGGGGCGAAGCTACCAT	406 bp	28S 400
28S 41	reverse	GTGTCGAGGGCTGACTTTCA		
28S 33	forward	GAGCAGAAGGGCAAAAGCTC	793 bp	28S 800
28S 41	reverse	GTGTCGAGGGCTGACTTTCA		

3. táblázat. Az alkalmazott primerek adatai

Polimeráz lánreakció (RT-PCR)

Kísérleteimhez alkalmazott iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) egy Sso7d nevű kettős szálú DNS-kötő doménnel fuzionált, *Pyrococcus* eredetű DNS polimeráz enzim. Legfontosabb előnye ezen DNS polimeráz enzimnek a hagyományos *Taq* polimerázhoz képest a magasabb hűség (kevesebb hibásan beépített nukleotid), ami a enzim proofreading aktivitásának köszönhető.

A reakciókat a gyártó ajánlásának megfelelően az alábbiak szerint állítottam össze:

5x HF puffer	4 µl
DMSO	0,6 µl
dNTP	0,4 µl
Primer pár	0,8 µl
cDNS templát	1 µl
Phusion DNS polimeráz	0,2 µl
Desztillált víz	12 µl
Teljes reakció térfogat:	20 µl

A reakció egy Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf) PCR készülékben zajlott le az alábbi hőprofilnak megfelelően:

1.	98 °C	2 perc
2.	98 °C	10 másodperc
3.	60 °C	15 másodperc
4.	72 °C	40 másodperc
5.	2-4. lépések ismétlése	35x
6.	72 °C	2 perc

A PCR termékeket további analízisig -20 °C-on tárolva.

Amplikonok detektálása

A polimeráz láncreakcióval felszorzott DNS termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével elemeztem.

Az elválasztáshoz 2% agaróz/TAE gélt alkalmaztam. A PCR amplikonok vizualizációja a SYBR®Safe (Thermo Fisher Scientific) interkaláló, fluoreszcens festékekkel történt, mely a kettős szálú DNS láncba beépülve gerjesztés hatására zöld fényt bocsát ki. A PCR termékek méretének meghatározására HyperLadder IV (BioLine) DNS létrát használtam.

Az elektroforézis horizontális OWL (Owl) futtatókádban történt, TAE (40 mM Tris bázis, 20 mM ecetsav, 1 mM EDTA) pufferben 90 V feszültséggel.

A detektáláshoz Dark Reader (Clare Chemical Research) átvilágító transzilluminátort alkalmaztam borostyán színű színszűrővel.

Kvantitatív Real-Time PCR (RT-qPCR)

A vérminták esetében az analízist kvantitatív real-time PCR segítségével végeztem. A módszer a „hagyományos” PCR-on alapul, azzal a kiegészítéssel, hogy egy fluoreszcens jelző molekula segítségével meg tudjuk határozni a reakcióelegyben található DNS mennyiségének változását. A real-time, azaz való időben előtag arra utal, hogy a fluoreszcencia mérését minden ciklusban elvégezhetjük. A korábban bemutatott PCR esetében végpont analízist hajtottam végre, a reakció lezajlása után detektáltuk a termék meglétét agaróz gélen.

Kísérleteimhez iTaq Universal SYBR Green Master mixet (Bio-Rad) alkalmaztam. A SYBR green egy interkaláló fluoreszcens festék, mely a kettős szálú DNS két láncá közé beépülve gerjeszhető.

Primer név	Primer iránya	Primer szekvencia	Amplikon méret	Amplikon név
Actb 11	forward	GCCGCCAGCTCACCAT	206 bp	Act 200
Actb 21	reverse	GATGCCTCTCTTGCTCTGGG		
28S 34	forward	CTCAGTACGAGAGGAACCGC	179 bp	28S200
28S 42	reverse	GATGGTAGCTTCGCCCCATT		

4. táblázat. A real-time PCR-hoz alkalmazott primerek adatai

A reakciókat a gyártó ajánlásának megfelelően az alábbiak szerint állítottam össze:

2x Master Mix	10 µl
Primer pár	0,8 µl
cDNS templát	1 µl
Desztillált víz	8,2 µl

Teljes reakció térfogat: 20 µl

A reakció egy Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) PCR készülékben zajlott le az alábbi hőprofilnak megfelelően:

1. 95 °C 2 perc
2. 95 °C 10 másodperc
3. 60 °C 15 másodperc
4. 72 °C 30 másodperc
5. 2-4. lépések ismétlése 45x
6. olvadási görbe analízis

A DNS termékbe épült festék detekciójára az elongációs lépés végén került sor.

A kísérletek kiértékelését, a Ct értékek meghatározását a PCR készülékhez mellékelt CFX Manager (Bio-Rad) szoftverrel végeztem el.

Statisztikai kiértékelés

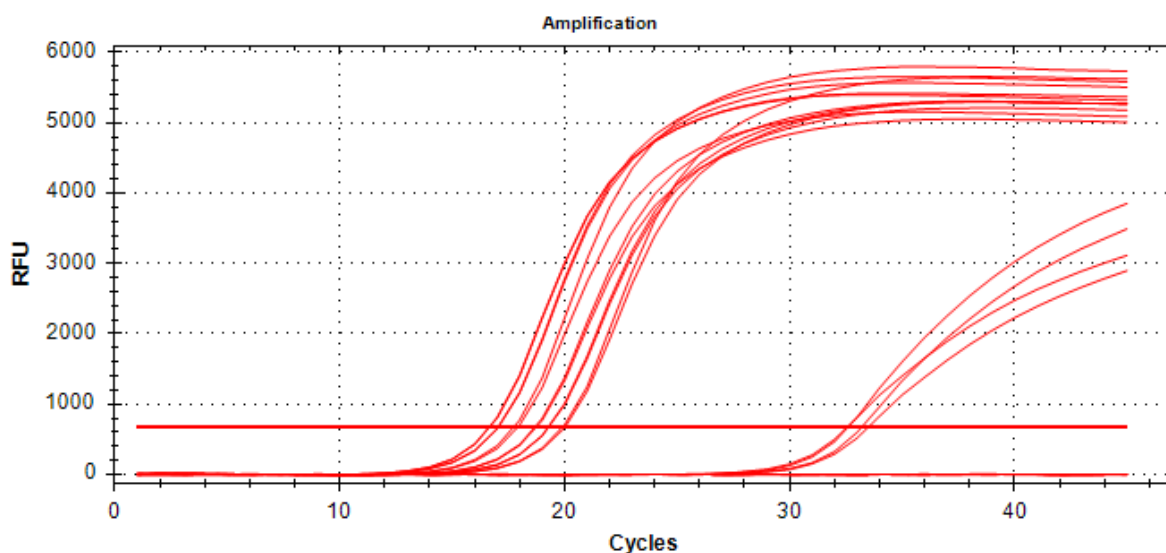
Az adatok kiértékelését IBM SPSS Statistics 21 programcsomaggal végeztem.

Eredmények

Vércsepp korának meghatározása

Az első kísérletsorozatban vércsepp korának meghatározását tűztem ki célul. Kezeletlen szűrőpapírra cseppentettem ki friss, natív, önkéntesektől származó vércseppeket. A vércseppek térfogata 50 μ l volt. A mintákat szobahőmérsékleten hagytam beszáradni.

A kicseppentés és a minta feldolgozása között eltelt inkubációs idő meghatározását kvantitatív real-time PCR segítségével végeztem.



3. ábra. Egy reprezentatív real-time PCR. A vékony piros görbék az egyes mintákhoz tartozó fluoreszcencia változását mutatják. A vastag vízszintes vonal az úgynevezett küszöbérték (threshold). Az a ciklusszám, ahol a minta fluoreszcens jele átlépi a küszöböt és ezáltal meghatározza a Ct értéket.

A PCR-ral humán β -aktin mRNA és 28S rRNA átíródott cDNA-ének 200 bázispár hosszúságú szakasza volt amplifikálva. Ezek a gének úgynevezett housekeeping gének, minden szövetben azonos mértékben fejeződnek ki, és expressziójuk szintjét nem befolyásolják sem belső, sem külső folyamatok. Munkahipotézisnek azt tettem fel, hogy a

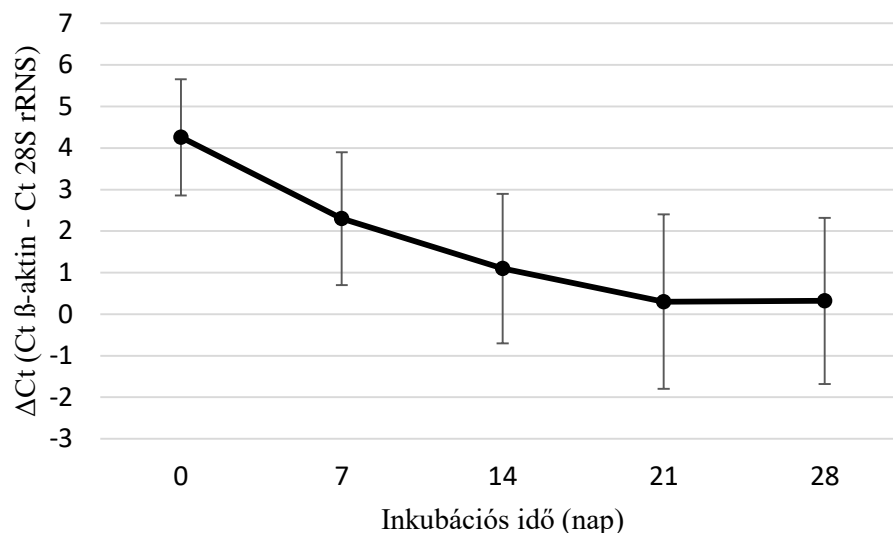
riboszómális RNS másodlagos szerkezete és nagyobb mennyisége miatt kevésbé degradálódik, mint a messenger RNS, tehát a két molekula típus arányának változása becslést adhat a vércsepp korára.

Első kísérletként több önkéntestől vett vércseppből a beszáradás után azonnal RNS-t izoláltam, majd a cDNS szintézist követően meghatároztam a β -aktin és a 28S rRNS Ct értékeit.

Ct β -aktin	Ct 28S rRNS	Δ Ct (Ct β -aktin - Ct 28S rRNS)
32.25	28.11	4.14
33.79	28.55	5.24
32.84	29.8	3.04
33.06	27.79	5.27
33.65	31.95	1.7
35.91	31.6	4.31
25.78	19.74	6.04
26.55	20.59	5.96
28.41	25.8	2.61

5. táblázat. 0 napos vércseppekből kapott eredmények

A fenti 5. táblázatban látható, hogy már az azonnal izolált minták esetében is nagyok a különbségek. A β -aktin Ct értékek 28,41 és 35,91 között, a 28S rRNS Ct értékek pedig 20,59 és 31,95 között helyezkedtek el. Az egyedi Ct értékek varianciája mellett, a két housekeeping gén aránya, a két Ct érték különbsége 1,7 és 6,04 között változott.



4. ábra. Vércseppek szobahőmérsékleten történő tárolását követő változás a β -aktin és a 28S rRNS Ct értékek különbségében. Az adatpontok a Ct értékek különbségének átlagát, a hibasávok pedig a szórást (SD) ábrázolják.

A vércseppek szobahőmérsékleten, fénytől elzárt körülmények között voltak inkubálva 1-4 hétig. Az inkubációs idő lejárta után a mintákból RNS-t izoláltam, majd reverz transzkripciót követően, meghatároztam a β -aktin és a 28S rRNS-hez tartozó Ct értékeket. A két Ct érték különbségét a fenti, 4. ábra mutatja be. Azt a trendet figyelhetjük meg, miszerint három hétig a különbség csökken, viszont a nagyon nagy szórás miatt ez a differencia nem tekinthető statisztikailag szignifikánsnak (ANOVA). Csupán a Ct értékek különbségéből ezek alapján nem határozható meg a vércseppek kora.

Mivel a vércseppekből nyerhető RNS minták varianciája túl nagy bizonyult, további vizsgálataink tárgyának egy, a környezettől teljesen izolált szövetet, a fogpulpát választottam.

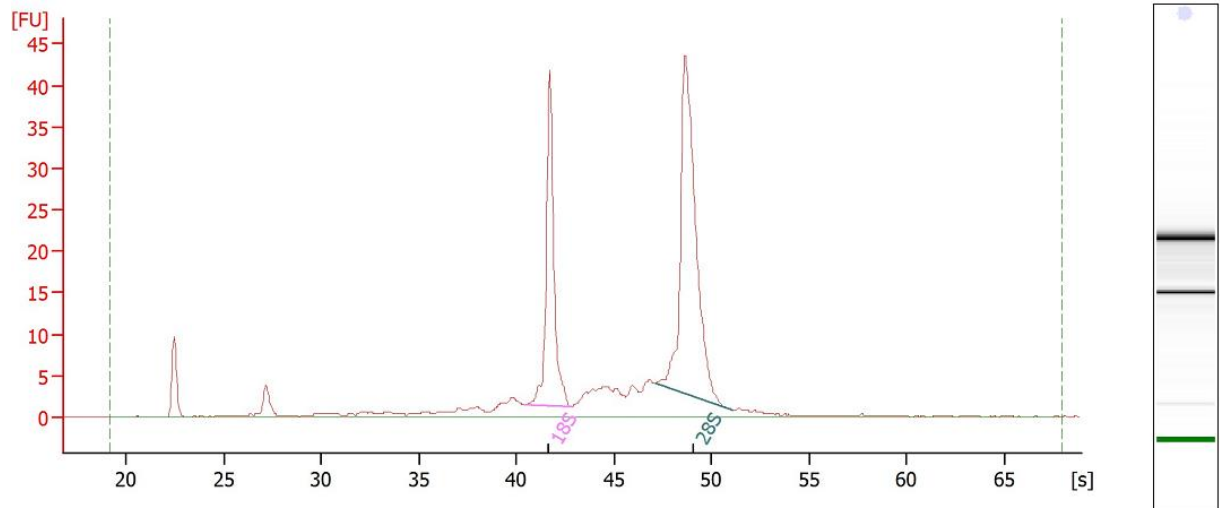
A fogbélből izolált RNS mintákat először Agilent Bioanalyzerrel vizsgáltam, majd a reverz transzkripciót követően PCR-ral elemeztem.

RNS integritás mérése Agilent Bioanalyzerrel

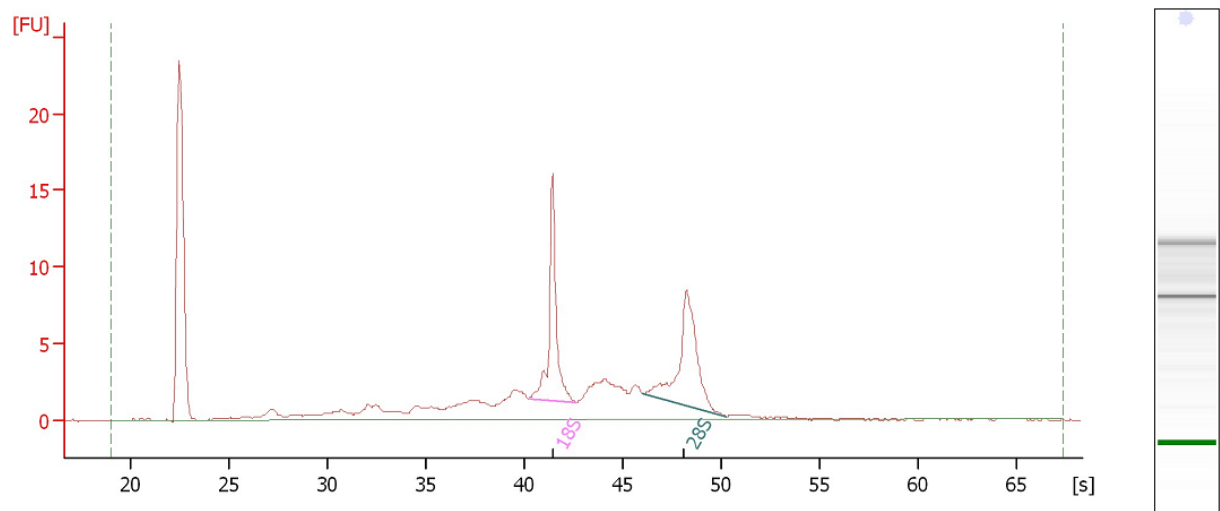
RNS integritás méréséhez az Agilent 2100 Bioanalyzer platformot használtam, a mérő készülék elektródákat és egy fluoreszcens detektort tartalmaz, maga az elválasztás egyszer használatos mikrofluidikus chipen történik.

A mérés alapelvét a klasszikus gélelektroforézis alapú elválasztás adja, miszerint a töltéssel rendelkező molekulák vizes közegben az ellenkező pólus felé vándorolnak. Megfelelő térhálós mátrix alkalmazása esetén a vándorlás sebessége a molekula méretével fordítottan arányos. Hogy az RNS molekulák másodlagos szerkezete ne befolyásolja a vándorlási sebességet, egyrészt a rendszer denaturáló poliakrilamid polimert használ, másrészt a futtatást megelőzően hővel denaturáltam a mintákat. Az RNS minták a chipben található hajszálvékony kapillárisokban futnak, melyek előzőleg poliakrilamid mátrixszal lettek feltöltve. A detektálás az RNS-t specifikusan kötő, fluoreszcens jelölő anyaggal történik. A készülék detektálja a szenzor előtt elhaladó molekulák fluoreszcenciájának intenzitását és ennek alapján elektroferogramot rögzít.

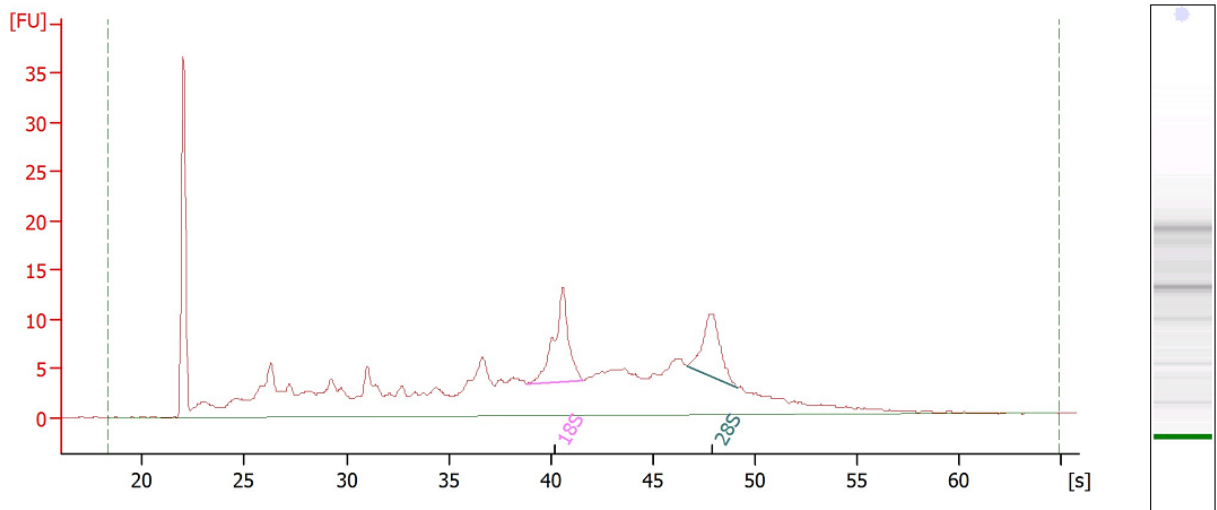
Az RNS integritásának meghatározása az elektroferogram alapján történik. Az elemző szoftver többek között figyelembe veszi a 18S rRNS és 28S rRNS-ekhez tartozó csúcsok magasságát és arányát, 18S rRNS előtti szakasz alapvonalát. Ezeket az adatokat összesítve határozza meg az úgynevezett RIN (RNS integritás szám, RNA Integrity Number) értéket. A RIN érték 1-10-es skálán mozog, ahol a 10 teljesen intakt, az 1 pedig a teljesen degradálódott, detektálhatatlan RNS-t jelöli (Schroeder et al., 2006).



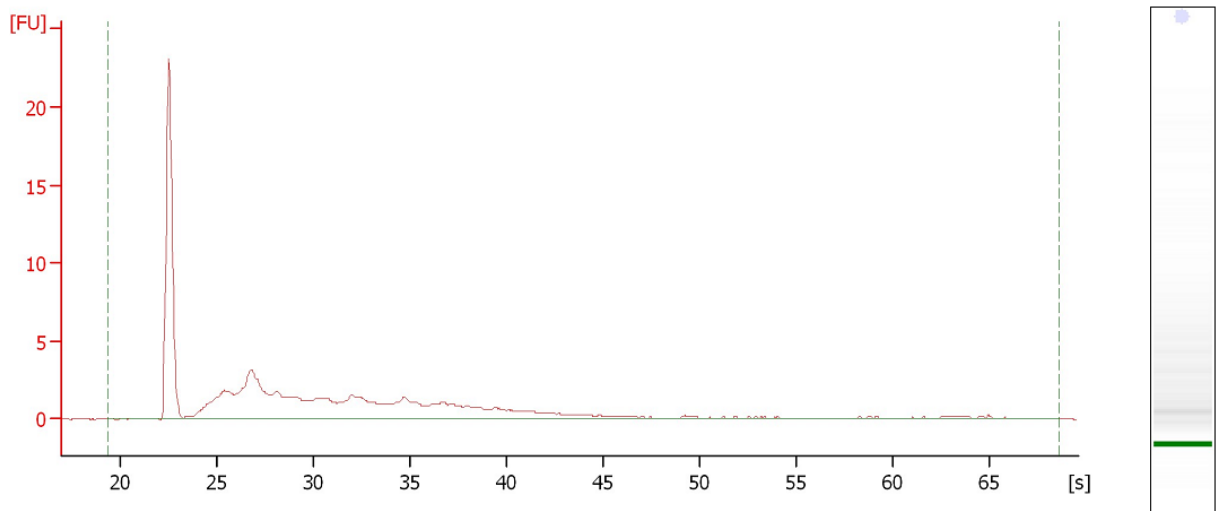
5. ábra. Intakt RNS-re jellemző reprezentatív elektroferogram és az ábra jobb oldalán látható virtuális gélkép. A 18S és 28S riboszómális RNS-ekhez tartozó csúcsok jól elválnak, a 28S rRNS csúcs alatti területe nagyobb. A fog eltávolítása után azonnal extraháltuk a fogbelet és elvégeztük az RNS izolálást. RIN = 9,5



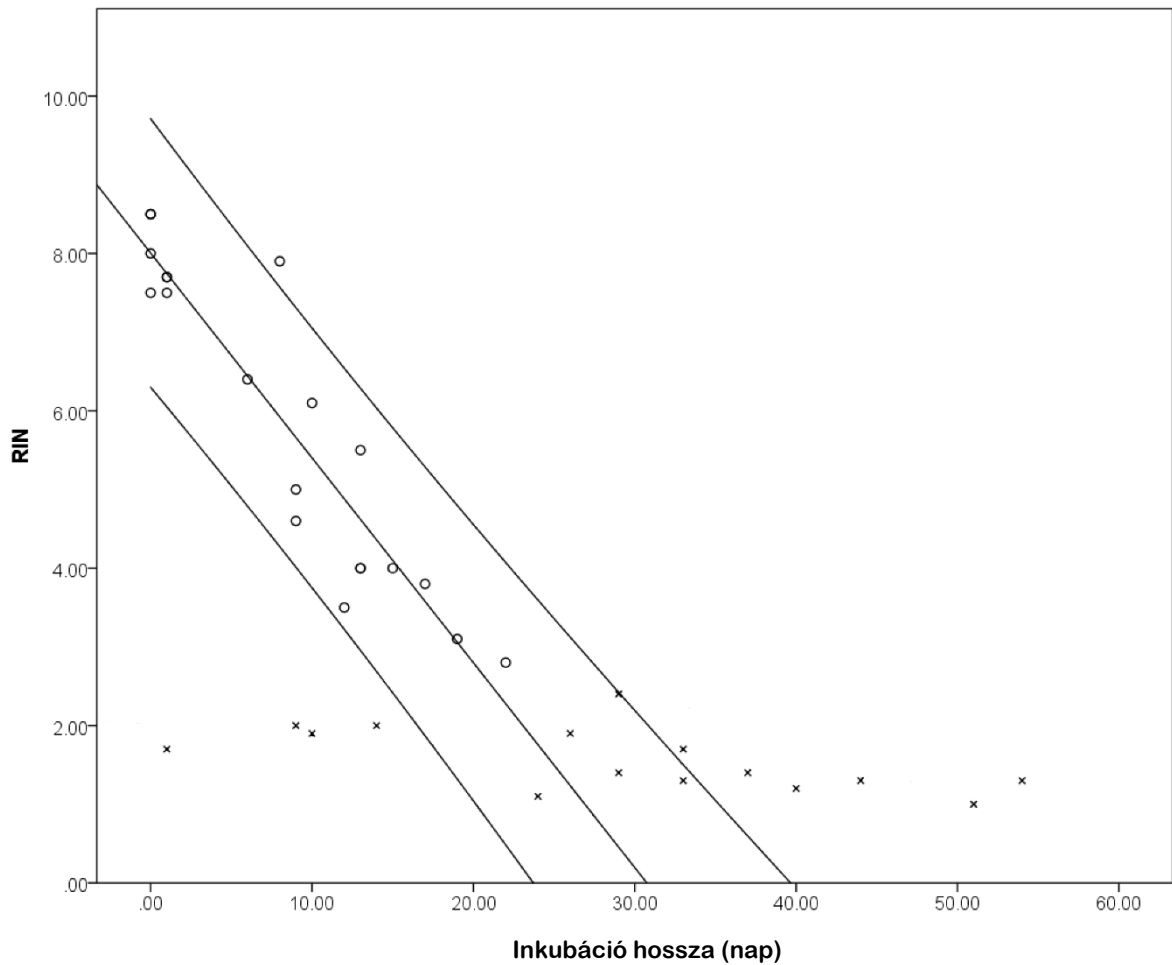
6. ábra. Alacsony mértékű degradációt mutató RNS mintára jellemző elektroferogram. Jól látható, hogy a nagyobb méretű 28S rRNS aránya lecsökkent, illetve az abszolút RNS koncentráció is alacsonyabb. A fog inkubációs ideje ebben az esetben 6 nap. RIN = 7,9



7. ábra. Közepes mértékű degradációt mutató RNS mintára jellemző elektroferogram. A riboszómális RNS-ekre jellemző csúcsok magassága tovább csökkent. A degradált RNS molekulákat jelző csúcsok feltűntek a 18S csúcs előtt. A fog inkubációs ideje: 10 nap. RIN = 6,1



8. ábra. Teljes degradációt mutató RNS mintára jellemző elektroferogram. A riboszómális RNS csúcsok nem kimutathatóak. Csupán a kis méretű, degradált RNS molekulák csúcsai látszanak. A fog inkubációs ideje: 26 nap. RIN = 1



8. ábra. RNS integritás változása az inkubációs idő függvényében. Az adatpontokra legjobban illeszkedő egyenest és a 95%-os konfidencia intervallumot ábrázoltam. A cut-off érték alatti ($RIN < 2,4$) minták a statisztikai analízisből ki lettek zárva, ezek az adatpontok *x*-szel vannak jelölve.

Az RNS integritás mérés eredményeit a 8. ábra mutatja be. Leolvasható, hogy közvetlenül a fogak eltávolítása után izolált minták esetében (Inkubációs idő: 0 – 2 nap) az RNS még intakt, a RIN értékek minden esetben 7,5-nél magasabbak. A napok számának emelkedésével a RIN értékek lineárisan csökkenek.

Valamennyi 25 vagy annál több napig inkubált minta esetében az RNS teljes degradációja volt tapasztalható. A RIN értékek vagy 2 alatt voltak, vagy a kiértékelő szoftver nem tudta azokat meghatározni, mivel a számítás alapjául szolgáló csúcsok egyáltalán nem voltak detektálhatóak. A 25 napnál hosszabb ideig inkubált minták egymástól nem különböztethetőek meg ezzel a módszerrel. Ezek alapján meghatároztam

egy úgynevezett cut off értéket ($RIN < 2,4$), ami alatti mintákat a statisztikai analízisből kizártam.

A lineáris regresszió olyan összefüggések statisztikai leírása, ahol egy paraméter befolyással van egy másik paraméterre és ez a kapcsolat lineáris. Tehát az egyik változó értékének ismeretében becslést adhatunk a másik változó értékére. A kísérletben az inkubációs idő változásán kívül igyekeztem az összes többi változót kizárni, ezért egyváltozós lineáris regressziós eljárás volt alkalmazható. Ebben az esetben a független változó az RNS integritás szám értéke, a függő vagy eredmény változó pedig az inkubáció ideje.

A következő, mérési eredményekből kiszámolt, egyenlet alapján adható becslés az inkubáció idejére $Y=8,005-0,26X$, ahol Y az inkubációs idő napokban, X pedig a RIN értéke. Az egyenlet által meghatározott egyenes illeszkedése $R^2=0,859$. A két érték közötti korreláció $P < 0,001$. A 95%-os konfidencia intervallum (CI) alsó és felső határát az alábbi képletekkel lehet meghatározni: $Y=7435-0,313X$ és $Y=8,575-0,208X$.

A 8. ábrát megnézve látható, hogy négy minta a kizárási érték alá esett annak ellenére, hogy egyik sem érte el a 21 nap inkubációs időt. Ezekben az esetekben az ismételt mérés is megegyező értéket mutatott. A PCR segítségével történő vizsgálat (lásd a következő pont) viszont a fogak korának megfelelő értéket adott.

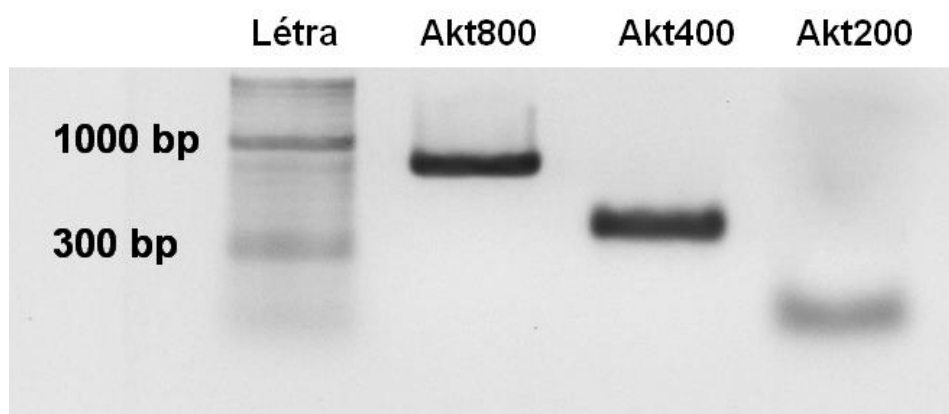
Fogból RNS RT-PCR

A fentiek illusztrálták, hogy körülbelül 25 napig a mikrofluidikus chip segítségével jó közelítéssel megbecsülhető a fogminta kora. Az ennél idősebb minták esetében a nagyfokú RNS degradáció lehetetlenné teszi ennek a módszernek az alkalmazását.

PCR segítségével viszont a kisszámú, töredezett RNS-ből származó cDNS is kimutatható. Hipotézisem szerint a rövidebb termékek akkor is amplifikálhatóak, mikor a hosszabb szakaszok már nem.

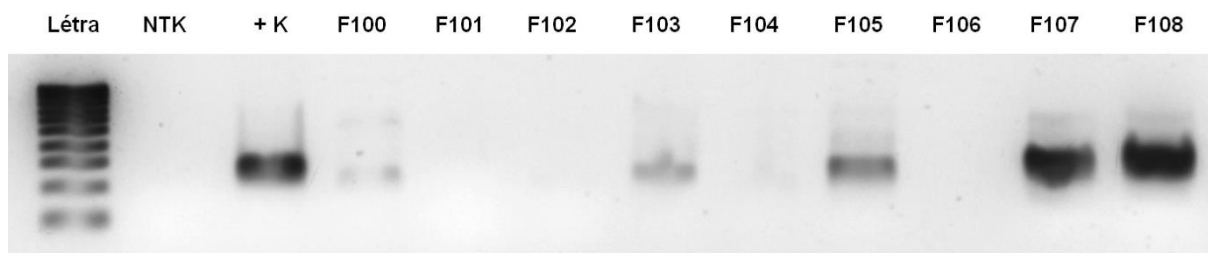
Célpontként a humán β -aktin messenger RNS és a 28S riboszómális RNS 800, 400 és 200 bázispár hosszúságú szakaszát választottam. Mivel ezek a gének housekeeping gének, a kísérletben kimutathatóságuk változása csak a degradációval magyarázható.

A vércseppel végzett kísérletek esetében kvantitatív real-time PCR-t alkalmaztam, míg a fogbéllel végzett vizsgálatok esetében csak végpont analízist végeztem. Ennek legfőbb oka a megváltozott vizsgálati stratégia, miszerint a leghosszabb, még kimutatható fragmens detektálása alkalmasabb lehet a degradáció mérésére. Az ehhez szükséges 800 és 400 bázispár hosszúságú termékek esetében viszont a PCR reakció hatékonyságát a hosszas optimalizációs törekvések ellenére sem volt lehetséges az ideális 90-100%-ra beállítani.



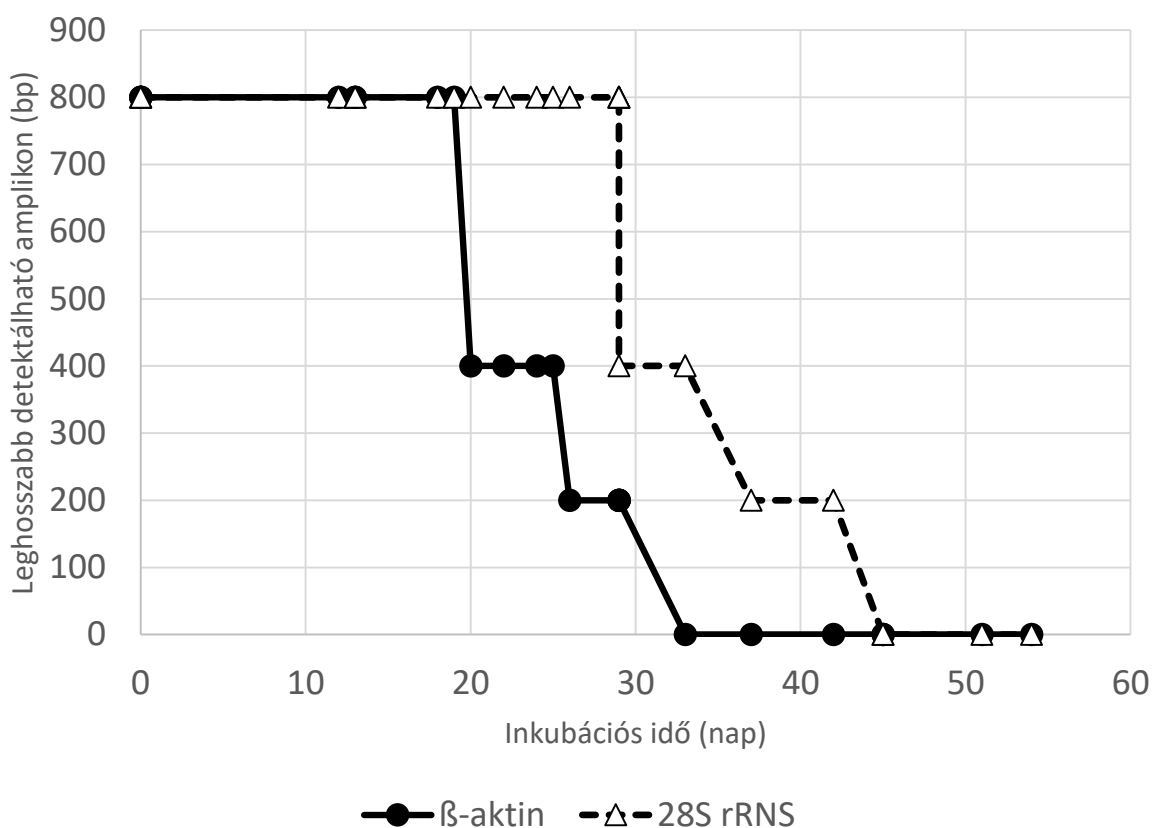
9. ábra. 800, 400 és 200 bázispár hosszúságú PCR amplikonok gélképe

A 9. ábrán látható, hogy a három különböző hosszúságú termék egyértelműen megkülönböztethető egymástól.



10. ábra. Reprezentatív gélfotó a β -aktin 200 bázispár hosszúságú amplikonjáról. Az F100, F103, F105, F107 és F108-as minták esetében a termék detektálható, az eredményt pozitívként értékeltük. A kontroll minták esetében a várt termékek voltak detektálhatóak. NTK: negatív kontroll (no templát kontroll), +K: pozitív kontroll

A 10. ábrán látható gélképek alapján értékeltem ki a kísérleteket. Az így kapott eredményeket az áttekinthetőség és könnyebb kiértékelhetőség érdekében diagramon is ábrázoltam.



11. ábra. A megfelelő RNS-ek cDNS-éből detektálható PCR amplikonok ábrázolása az inkubációs idő arányában. A kör alakú jel a β -aktin mRNS termékeket, a háromszög alakú jel a 28S rRNA termékeket mutatja.

A 11. ábra foglalja össze a különböző hosszúságú PCR termékek detektálhatóságát az inkubációs idő függvényében. Leolvasható, hogy a 19. napig mind a β -aktin, mind a 28S rRNS 800 bázispár hosszúságú terméke együttesen kimutatható. Az inkubációs idő előrehaladtával azonban a két termék detektálhatósága elválik egymástól. A 28S rRNS 800 bázispár hosszú amplikonja egészen a 29. napig jól látható. Ugyanezen RNS-ből a 29. és a 33. nap között már csak a 400 bp hosszúságú terméket sikerült kimutatni, a legrövidebb, 200 bázispár hosszú amplikon pedig egészen a 42. napig volt detektálható. Ezzel szemben a β -aktin mRNS kimutathatósága hamarabb megszűnik. A 20. és 25. nap között csak a 400 bázispár hosszúságú amplikon detektálható, a 200 bázispár hosszú terméket pedig a 29. napig sikerült felsokszorozni.

A fogpulpából kapott eredmények validálása

A fent taglalt, ígéretes és biztató eredmények után felmerült az igény a módszer tesztelésére, validálására. Ebből a célból az anyagok és módszerek fejezetben leírtaknak megfelelően az együttműködő fogorvosok hat fogat gyűjtöttek, azzal a különbséggel, hogy a fog kihúzásának dátuma, így az inkubációs idő a vizsgálat előtt számomra ismeretlen volt. A mikrofluidikus chip alapú RNS integritás meghatározás, illetve a PCR alapú vizsgálatok elvégzése után összevettem a becsült inkubációs időket a valós időtartamokkal.

A 12. ábrán a korábban bemutatott, 11. ábrát egészítettem ki az ismeretlen inkubációs idejű fogak adataival. Az ábrán jól látható, hogy a minták adatpontjai jól illeszkednek a trendvonalhoz. A hat fogból egy esetben nem kaptam mérhető RIN értéket, egy másik fog esetében pedig, bár a fog RIN értéke mérhető volt (2,1), ez a szám a korábban meghatározott alsó limitnél alacsonyabb, ezért az analízisből ez az érték ki lett zárva.

A vizsgálatok eredményeit összefoglalva elvégeztem a fogak inkubációs idejére a becsléseket. A RIN értékek alapján kiszámítottam a becsült inkubációs időt, illetve annak 95%-os konfidencia intervallumát. A PCR termékek hosszának alapján szintén megadtam egy-egy intervallumot. Két minta esetében, ahol a RIN értékek (2,1 illetve nem detektálható) a kizárási határ alatt helyezkedtek el, a kalkulációban csupán a PCR alapján meghatározott adatokra támaszkodhattam. Azon mintáknál, ahol rendelkezésünkre álltak a RIN alapú becslések, azt a PCR minden esetben megerősítette. A kalkulált inkubációs időket a valós inkubációs időkkel egybevetve az mind a négy esetben a 95%-os konfidencia intervallumon belül esett.

Fogminta	RIN	Detektált PCR termék		Inkubációs idő becslése napokban (95%-os konfidencia intervallum)	Inkubációs idő (nap)
		β -aktin mRNS	28S rRNS		
1. minta	3.1	800 bp	800 bp	18.8 (14-26)	17
2. minta	7.5	800 bp	800 bp	1.9 (0-5)	5
3. minta	2.1	200 bp	800 bp	26-29	26
4. minta	6.4	800 bp	800 bp	6.2 (3-10)	7
5. minta	3.4	800 bp	800 bp	17.7 (13-25)	15
6. minta	n.d.	n.d.	200 bp	33-42	38

5. táblázat. A becsült és a valós fog inkubációs idők összehasonlítása. n.d.: nem detektálható

Patológiás fogak vizsgálata

Az előző kísérletek eredményei bizonyították, hogy a fogbél RNS tartalmának degradációja alkalmas lehet a posztmortem intervallum becslésére. Ezekben a kísérletekben kizárólag egészséges fogak szerepeltek. Felmerült a kérdés, hogy a fogakat érintő különböző betegségek és elváltozások mennyire befolyásolják a pulpa RNS tartalmának mennyiségét és minőségét.

A kísérletek során 20 db patológiás fogat vizsgáltam. A fogak parodontológiai, protetikai vagy konzerváló fogászati okok miatt kerültek eltávolításra. A fogak az eltávolítás után -80 °C-on voltak tárolva az RNS izolálás elvégzéséig, ezzel biztosítva az RNS degradációjának megakadályozását.

Tíz fog esetében a feltárás során nem volt lehetséges elegendő mennyiségű fogból eltávolítása. Ezen fogak közül 2 db akut periodontitis, 3 db krónikus parodontitis miatt lett eltávolítva. Öt fog esetében pedig a szuvasodás elérte a pulpakamrát.

Tíz fogból viszont sikerült megfelelő mennyiségű fogból mintát nyerni. Az RNS izolálást követően a minták Agilent Bioanalyzerrel lettek kielemezve. Az eredményeket az alábbi táblázat foglalja össze:

Kihúzás indikációja	RIN ÉRTÉK
akut periodontitis	1,3
protetikai	1
periostitis, cysta radikuláris,	1
akut periodontitis	n.d.
akut periodontitis	2,4
protetikai	3,2
protetikai	n.d.
akut parodontitis	n.d.
akut periodontitis	n.d.
protetikai	n.d.

6. táblázat. Patológiás fogak RNS integritásának értékei. *n.d.*: nem detektálható

A 6. táblázatból leolvasható, hogy a 10 fogból 5 esetben a készülék nem volt képes elvégezni a mérést, RNS egyáltalán nem volt detektálható a mintákban. A másik 5 minta esetében is nagyon alacsony RIN értékeket figyelhettünk meg, ami teljesen degradálódott RNS-re utal. A fog eltávolításának oka és a RIN értékek között nem találtam összefüggést.

Kihúzás indikációja	200 bp amplikon	400 bp amplikon	800 bp amplikon
akut periodontitis	Pozitív	Pozitív	Negatív
protetikai	Negatív	n.a.	n.a.
periostitis, cysta radikuláris,	Negatív	n.a.	n.a.
akut periodontitis	Negatív	n.a.	n.a.
akut periodontitis	Pozitív	Pozitív	Negatív
protetikai	Pozitív	Pozitív	Negatív
protetikai	Negatív	n.a.	n.a.
akut parodontitis	Negatív	n.a.	n.a.
akut periodontitis	Negatív	n.a.	n.a.
protetikai	Negatív	n.a.	n.a.

7. táblázat. A patológiás fogakból kapott PCR eredmények összefoglalása. A leghosszabb, még detektálható β -aktin mRNS fragmensek az egyes mintákban. n.a.: nincs adat, a mérést nem végeztük el

A 7. táblázatban látható, hogy a tíz vizsgált fogból mindössze három esetben sikerült RT-PCR-ral a β -aktin mRNS-t kimutatni. Ez egyrészt egyezik a RIN eredményekkel, ugyanis azokból a mintákból, melyek RIN értéke egy volt vagy egyáltalán nem volt mérhető, nem sikerült PCR amplikont detektálni. A három PCR pozitív minta esetében a RIN érték egy fölött volt. A fogeltávolítás indikációja és a PCR-ral kapott eredmények között nem találtam összefüggést.

Összefoglalás

- vércseppek esetében a PCR eredmények és a PMI között nem találtam szignifikáns korrelációt
- az RNS integritás csökkenés szoros lineáris korrelációt mutatott a fogminták inkubációs idejével az inkubáció 25. napjáig
- különböző hosszúságú PCR termékek detektálása alapján becslés adható az inkubáció 42. napjáig
- az eljárás belső validációja megtörtént hat fogminta vizsgálatával
- patológiás elváltozást mutató fogak esetében a vizsgálat nem adott értékelhető eredményt, vagy előrehaladott degradációt mutatott

Megbeszélés

Vércsepp korának meghatározása RNS degradáció alapján

Az eredmények fejezetben láthattuk, hogy a vércseppek korának meghatározása az általunk alkalmazott módszerekkel nagyon nagy szórást mutatott.

A vérből izolált RNS mennyisége ideális körülmények között is alacsony. Azokban a mintákban is, melyekből kicseppentést követő beszáradás után azonnal megtörtént az RNS izolálás, a kinyert RNS koncentrációja 3 ng/μl alatt volt. Már ezekben a mintákban is a β-aktinhoz tartozó Ct értékek jellemzően 33 – 35 között voltak, az inkubált mintákban ezek az értékek emelkedtek. Nagyon alacsony templát koncentrációnál a PCR sztochasztikája megnő. Kvantitatív real-time PCR-nál a 30 fölötti Ct értékeknél már tapasztalható a variabilitás emelkedése. A 35 feletti értékeket a legtöbb analizáló szoftver kizárja az értékelésből, a fenti okok miatt. A legtöbb inkubált vércseppben, a β-aktinhoz tartozó Ct értékek meghaladták ezt a cut-off értéket.

A vér látszólag egyszerű és homogén szövet, ismert, hogy a fehérvérsejtek összetétele, sejten belüli folyamataik kifejezetten dinamikusan változnak, ezzel válaszolva a fertőzésekre, gyulladási állapotokra. Ennek megfelelően donor és donor között is nagy különbségeket találhatunk a vérből izolálható RNS mennyiségét és minőségét tekintve. Másrészt ezek a különbségek akár az ugyanattól a személytől, de más és más időben levett vérminták között is fennállhatnak.

Annak ellenére, hogy a kísérleteket kontrollált körülmények között végeztem (a vércseppeket homogén szűrőpapírra vittem fel, majd fénytől elzárva, szobahőmérsékleten voltak tárolva) számos tényezőben történhetett kismértékű változás, például a hőmérsékletben, páratartalomban.

Valószínűleg a fenti okokra visszavezethetően a kísérleti eredmények nagy fluktuációt mutattak. Ha figyelembe vesszük, hogy a valós körülmények esetén a külső behatások miatt a variabilitás még jelentősebb, akkor azt a konklúziót vonhatjuk le, hogy jelenleg ez a módszer nem alkalmas vércseppek korának meghatározására.

PMI meghatározása fogbél RNS degradációjának mérésével

RNS integritás mérése

Szervezetünk legellenállóbb szövetei közé tartozik a fogakat alkotó dentin és az azt borító zománc. Mivel ez a két réteg nagyfokú izolációt biztosít a külső környezeti tényezőktől és mechanikus behatásoktól, ezért a fogbél ígéretes kísérleti anyagnak tűnt a posztmortem intervallum meghatározásához.

Az RNS degradáció meghatározásának egyik leggyorsabb módszere a mikrofluidikus chip alkalmazásán alapuló Agilent Bioanalyzer. A kapilláris elektroforézis rendszer egy elektroferogramot generál, amely alapját képezi az RNS integritás meghatározásának. A módszer előnyei a könnyű végrehajthatóság és a gyors kiértékelés. Az előkészítéssel együtt tizenegy minta lefuttatása kevesebb, mint hatvan percet igényel. A mérések közötti szórás 10% alatt van saját, ismételt mérési eredmények alapján. Az RNS minősége és mennyisége „hagyományos” módszerekkel (pl. UV spektrum felvétele, RNS agaróz gélelektroforézis) is meghatározható, azonban ezek az eredmények nem konzisztensek. Real-time PCR mérésekkel a mikrofluidikus platformok mutatták a legjobb korrelációt (Imbeaud et al., 2005).

Az RNS integritás szám szoros korrelációt mutatott a fogak inkubációs idejével. A következő egyenlet alapján adható becslés az inkubáció idejére: $Y=8,005-0,26X$, ahol Y az inkubációs idő napokban, X pedig a RIN értéke. Az egyenlet által meghatározott egyenes illeszkedése $R^2=0,859$. A 25 napnál hosszabb ideig inkubált minták esetében a RIN nem változott lineárisan az inkubációs idővel.

PCR alapú vizsgálat

A fentiek illusztrálták, hogy körülbelül 25 napig a mikrofluidikus chip segítségével jó közelítéssel megbecsülhető a fogminta kora. A PCR alapú módszerrel viszont a posztmortem intervallum becslése lehetséges a 42. napig.

A riboszómális és a messenger RNS típus kimutathatósága 19 nap inkubáció után egymástól eltérően alakul, ami javítja a PMI becslés pontosságát. A különbség háttérben

két mechanizmus állhat. Egyrészt a riboszómális RNS-ekre jellemző, hogy bonyolult másodlagos szerkezetet alkotnak, ami csökkenti az RNáz enzimek hatékonyságát (Fordyce et al., 2013; Petrov et al., 2014). Másrészt hosszú távú detektálásukat elősegíti a riboszómális RNS-ek nagy mennyisége is. Johnson és kollégái összehasonlították a riboszómális és messenger RNS-ek mennyiségét. Eredményeik azt mutatják, hogy a sejt teljes mRNS mennyisége mindössze 1,1-2,7%-a az rRNS mennyiségének (Johnson, Abelson, Penman, Green, 1977).

A PCR alapú vizsgálatok elvégzése a RIN meghatározása mellett mindenképpen ajánlott egyrészt a becslés időlimitjének kitolása érdekében, másrészt a Bioanalyzerrel kapott eredmények ellenőrzése végett. Ez utóbbi fontosságát jelzi, hogy négy minta esetében az ismert, rövid inkubációs idő ellenére is nagyon alacsony RIN értékeket kaptunk. Ennek okát nem sikerült kideríteni. A mérés megismétlése után az eredmény nem változott. Viszont PCR segítségével mind a négy mintából sikerült kimutatni a leghosszabb vizsgált, 800 bp hosszúságú termékeket, ami megfelelt az inkubációs idő által elvárt eredménynek. Tehát egy eredményt akkor tekinthetünk technikailag hibamentesnek, ha mind a két módszerrel egyező becslés adható.

Fogbél vizsgálatok limitációi

Nem mehetünk el szó nélkül amellett, hogy bár a fogbél RNS degradációjának mérése ígéretes módszernek tűnik, amit a kísérlet validációja is alátámaszt, mégis számos bizonytalan faktort kell számításba venni.

A modellkísérletekben kihúzott fogakat használtunk, amelyek nem feltétlenül mutatják a holttestben lejátszódó valamennyi folyamat jellegzetességeit. A fogbél nagymértékű izolációja reményt ad a mindennapi gyakorlatban történő alkalmazhatóságra, de ennek alátámasztására további kísérletek elvégzése szükséges.

A modellkísérletekben nem volt lehetőség figyelembe venni a hőmérséklet hatását az RNS degradációra, pedig ismert, hogy az alacsony hőmérséklet lelassítja a biológiai bomlást. Ennek vizsgálata nagyon megnehezítette volna az eredmények statisztikai kiértékelését, mivel a limitált számú fogmintát alcsoportokba kellett volna sorolni az inkubációs hőmérséklet alapján. Az ilyen, kisszámú mérésen alapuló adatsor viszont nem

tette volna lehetővé a megfelelő statisztikai analízist. Nagyobb mintaszámmal viszont lehetséges és kívánatos a hőmérséklet hatásának vizsgálata.

A szobahőmérsékleten elvégzett vizsgálatok azonban gyakorlati szempontból is felhasználhatóak lehetnek. A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Igazságügyi Orvostani Intézetében végzett boncolásokat összesítve látható, hogy az esetek jelentős százalékában az ismeretlen fekvési idejű holttest feltalálására zárt térben, lakásban került sor. Ezekben az esetekben alkalmazható lehet a fent részletezett módszer a posztmortem intervallum becslésére.

Az egyik objektív faktor, amely akadályozhatja a módszer elterjedését az a lakosság nagyon rossz foghigiéniai állapota. A magyar társadalom DMFT indexe nagyon magas: 16,04. A DMFT index a szúvas (decayed), hiányzó (missing), tömött (filled) fogak (teeth) átlagos számát jelzi a populációban. Az idősebb, 75 év fölötti lakosok 38,7%-a elvesztette valamennyi természetes fogát (Madléna, Hermann, Jáhn, Fejérdy, 2008). Ezek a számok nem mutatnak eltérést a világszerte (WHO, 2012). Foghiányos esetekben felmerül a csontvelő alkalmazásának lehetősége, de ehhez további kísérletek elvégzése szükséges.

Patológiás fogakkal végzett előkísérletekből az a következtetés vonható le, hogy a fogakat érintő elváltozások jelentősen befolyásolják a fogbél állapotát is. A vizsgált 20 fogból, mindössze 10 esetben sikerült a pulpa szövetet elegendő mennyiségben kinyerni, az ebből izolált RNS minták mindegyike jelentős degradációt mutatott. A degradáció mértéke és a kóros elváltozás típusa között nem találtam összefüggést, kivéve az olyan előrehaladott cariesnél, ahol a pulpakamra megnyílt a szájüreg felé.

Ez utóbbi eredmények alapján, amennyiben felmerül a gyanú, hogy a vizsgált fog kóros elváltozásban szenved és a vizsgált személy fogászati kórtörténete nem ismert, mindenképpen érdemes lehet fogorvos szakértőt felkérni konzultációra.

Annak ellenére, hogy patológiás elváltozásokban szenvedő fogak nem alkalmazhatóak posztmortem intervallum becslésére, a kidolgozott RNS izolálási protokoll hasznosítható lehet fogászati alap kutatásokban.

RNS alapú vizsgálatok a gyakorlatban

Az RNS alapú igazságügyi kutatások száma az utóbbi években dinamikusan emelkedik. Több módszer akár a közeljövőben beépülhet a rutin eljárások közé.

Az RNS alkalmazásának gyakorlati elterjedését több kutatás és fejlesztés segítheti. A mintabiztosítás ebben az esetben különös figyelmet érdemel, mivel számolnunk kell az RNS további bomlásával. Az optimális megoldás a minta biztosítása és az RNS feldolgozása közti idő minimalizálása. Amennyiben ez nem lehetséges, a minta hűtésével lassítható a degradáció mértéke. Ha a minta azonnali fagyasztására nincs mód, a szövetet RNA later oldatba célszerű helyezni, így annak RNS tartalma szobahőmérsékleten is stabilizálható (Mutter et al., 2004). A vizsgálatok során a minták bomlása hűtéssel lett megakadályozva, mert korábbi tapasztalataink alapján az RNA later kezelés növeli az izolálás során a DNS kontamináció valószínűségét.

Kis mennyiségű, nyomokban előforduló minták esetében az elvégzendő vizsgálatok megfelelő sorrendjét szükséges meghatározni. Jellemzően előnyt élvez az autoszómális genetikai profil vagy férfiági haplotípus meghatározásához szükséges DNS izolálás. Az RNS alapú vizsgálatok elterjedésével felmerült az igény új metodikák kidolgozására, ami lehetővé teszi a DNS és az RNS együttes izolálását. A fenol és guanidinium-tiocianát tartalmú, TriZol, Tri Reagent néven forgalomba kerülő reagenssel is lehetséges volt a DNS, RNS és fehérje együttes izolálása (Chomczynski, 1993). Kis mennyiségű minták esetében azonban nem elég hatékony az izolálás, továbbá az RNS fázis fenol vagy DNS kontaminációja negatívan befolyásolhatja az eredményeket. A kereskedelmi forgalomban kapható kitek összehasonlításából (Grabmüller et al., 2015; Schweighardt, Tate, Scott, Harper, Robertson, 2015) a következő konklúziók vonhatóak le: együttes izolációt követően lehetséges a DNS alapú STR tipizálás és az RNS kimutatása is, a céltól függően kell kiválasztani a használt kitet. Viszont magasabb volt az izolátum koncentrációja abban az esetben, ha csak RNS vagy csak DNS extrakció történt.

Az eredményeket áttekintve azt mondhatjuk, hogy az RNS alapú technikáknak kiegészítő vizsgálatokként létjogosultsága van az igazságügyi orvostanban.

A posztmortem intervallum becslésére a fogpulpában található RNS tartalom degradációjának mérése, a limitációkat is figyelembe véve, a kifejlesztett módszer alapján alkalmas lehet. Természetesen nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy egy módszer sem képes abszolút pontossággal megállapítani posztmortem intervallumot, viszont ha több vizsgálattal kapott eredmény együttesen használható fel, az jelentősen növelheti a PMI becslés precizitását, megbízhatóságát.

Összefoglalás

- Vércsepp korának becslésére a tesztelt módszer nem alkalmas. Ennek okai lehetnek:
 - Alacsony RNS koncentrációból adódó szórás
 - Minták közötti variabilitás
 - Inkubálás körülményei
- Fogpulpából izolált RNS integritásának mérése alapján nagy pontossággal lehetséges az inkubációs időtartam becslése.
- PCR alapú módszerrel:
 - Az inkubációs időre történő becslés kiterjeszhető a 42. napig
 - Ellenőrizhető a mikrofluidikus módszerrel kapott eredmény
- A módszer belső validációja hat, számunkra ismeretlen inkubációs idejű foggal megtörtént. Mind a hat esetben a valós inkubációs idő belül esett a becslés 95%-os konfidencia intervallumán.
- A patológiás elváltozással érintett fogak esetében a módszer nem vezetett eredményre.
 - Amennyiben lehetséges, célszerű fogorvos szakértő bevonása a vizsgálatba.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek dr. Sipos Katalinnak.

A mintagyűjtésben és feltárásban végzett munkájáért Dr. Lukács Dénesnek.

Dömse Angélának a vérvételben nyújtott segítségével.

Volt és jelenlegi kollégáimnak: Nagy Juditnak, Pandur Edinának, Dudás Rékának, Varga Editnek, Rácz Evelinnek és Tamási Kittinek.

TDK hallgatóimnak: Rapp Juditnak, Takács Amandának és Varga Rékának.

Hivatkozások listája

- Adler, C. ., Haak, W., Donlon, D., & Cooper, A. (2011). Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones. *Journal of Archaeological Science*, 38(5), 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.11.010>
- Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., & Hall, M. J. R. (2011). Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7, 379–392. <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2>
- Bauer, M., & Patzelt, D. (2008). Identification of menstrual blood by real time RT-PCR: technical improvements and the practical value of negative test results. *Forensic Science International*, 174(1), 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.03.016>
- Bernitz, H., Bernitz, Z., Steenkamp, G., Blumenthal, R., & Stols, G. (2012). The individualisation of a dog bite mark: a case study highlighting the bite mark analysis, with emphasis on differences between dog and human bite marks. *International Journal of Legal Medicine*, 126(3), 441–446. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0575-4>
- Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 15(3), 532–534, 536–537. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692896>
- Cocariu, E. A., Mageriu, V., Stăniceanu, F., Bastian, A., Socoliuc, C., & Zurac, S. (2016). Correlations Between the Autolytic Changes and Postmortem Interval in Refrigerated Cadavers. *Romanian Journal Of Internal Medicine*, 54(2), 105–112. <https://doi.org/10.1515/rjim-2016-0012>
- Conde, M. C. M., Nedel, F., Campos, V. F., Smith, a J., Nör, J. E., Demarco, F. F., & Tarquinio, S. B. C. (2012). Odontoblast RNA stability in different temperature-based protocols for tooth storage. *International Endodontic Journal*, 45(3), 266–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01971.x>
- De Paepe, M. E., Mao, Q., Huang, C., Zhu, D., Jackson, C. L., & Hansen, K. (2002). Postmortem RNA and protein stability in perinatal human lungs. *Diagnostic Molecular Pathology : The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 11(3), 170–176.
- Dobberstein, R. C., Huppertz, J., von Wurmb-Schwark, N., & Ritz-Timme, S. (2008). Degradation of biomolecules in artificially and naturally aged teeth: implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. *Forensic Science International*, 179(2–3), 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.05.017>
- Fordyce, S. L., Kampmann, M.-L., van Doorn, N. L., & Gilbert, M. T. P. (2013). Long-term RNA persistence in postmortem contexts. *Investigative Genetics*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-4-7>
- GilArriortua, M., Saloña Bordas, M. I., Köhnemann, S., Pfeiffer, H., & de Pancorbo, M. M. (2014). Molecular differentiation of Central European blowfly species (Diptera, Calliphoridae) using mitochondrial and nuclear genetic markers. *Forensic Science International*, 242, 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.07.018>

- González-Herrera, L., Valenzuela, A., Marchal, J. a, Lorente, J. a, & Villanueva, E. (2013). Studies on RNA integrity and gene expression in human myocardial tissue, pericardial fluid and blood, and its postmortem stability. *Forensic Science International*, 232(1–3), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.08.001>
- Grabmüller, M., Madea, B., & Courts, C. (2015). Comparative evaluation of different extraction and quantification methods for forensic RNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.01.006>
- Grassberger, M., & Reiter, C. (2001). Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Science International*, 120(1–2), 32–36. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00413-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00413-3)
- Gustafson, G. (1950). Age determination on teeth. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 41(1), 45–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15428197>
- Haas, C., Hanson, E., Banemann, R., Bento, A. M., Berti, A., Carracedo, Á., ... Ballantyne, J. (2015). RNA/DNA co-analysis from human skin and contact traces – results of a sixth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.01.002>
- Haas, C., Klessner, B., Maake, C., Bär, W., & Kratzer, A. (2009). mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Science International. Genetics*, 3(2), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.11.003>
- Hansen, J., Lesnikova, I., Funder, A. M. D., & Banner, J. (2014). DNA and RNA analysis of blood and muscle from bodies with variable postmortem intervals. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 10, 322–328. <https://doi.org/10.1007/s12024-014-9567-2>
- Harvey, M., Gasz, N., & Voss, S. (2016). Entomology-based methods for estimation of postmortem interval. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 6, 1–9. <https://doi.org/10.2147/RRFMS.S68867>
- Henssge, C. (1988). Death time estimation in case work. I. The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Science International*, 38(3–4), 209–236.
- Higgins, D., & Austin, J. J. (2013). Teeth as a source of DNA for forensic identification of human remains: a review. *Science & Justice : Journal of the Forensic Science Society*, 53(4), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.06.001>
- Hinchliffe, J. (2011). Forensic odontology, Part 1. Dental identification. *British Dental Journal*, 210(5), 219–224. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2011.146>
- Hubig, M., Muggenthaler, H., Sinicina, I., & Mall, G. (2015). Temperature based forensic death time estimation: The standard model in experimental test. *Legal Medicine*, 17(5), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2015.05.005>
- Hunter, M. C., Pozhitkov, A. E., & Noble, P. A. (2017). Accurate predictions of postmortem interval using linear regression analyses of gene meter expression data. *Forensic Science International*, 275, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.027>
- Imbeaud, S., Graudens, E., Boulanger, V., Barlet, X., Zaborski, P., Eveno, E., ... Auffray,

- C. (2005). Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research*, 33(6), 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gni054>
- Jakubowska, J., Maciejewska, A., Bielawski, K. P., & Pawłowski, R. (2014). mRNA heptaplex protocol for distinguishing between menstrual and peripheral blood. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.07.006>
- Johnson, L., Abelson, H., Penman, S., & Green, H. (1977). The relative amounts of the cytoplasmic RNA species in normal, transformed and senescent cultured cell lines. *Journal of Cellular Physiology*, 90(3), 465–470. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040900310>
- Kaestle, F. A., & Horsburgh, K. A. (2002). Ancient DNA in anthropology: Methods, applications, and ethics. *Yearbook of Physical Anthropology*, 45, 92–130. <https://doi.org/10.1002/ajpa.10179>
- Koh, K. K., Tan, J. S., Nambiar, P., Ibrahim, N., Mutalik, S., & Khan Asif, M. (2017). Age estimation from structural changes of teeth and buccal alveolar bone level. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 48, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2017.03.004>
- Kuliwaba, J. S., Fazzalari, N. L., & Findlay, D. M. (2005). Stability of RNA isolated from human trabecular bone at post-mortem and surgery. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.03.005>
- Kulshrestha, P., & Satpathy, D. K. (2001). Use of beetles in forensic entomology. *Forensic Science International*, 120(1–2), 15–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457603>
- Li, W. C., Ma, K. J., Lv, Y. H., Zhang, P., Pan, H., Zhang, H., ... Chen, L. (2014). Postmortem interval determination using 18S-rRNA and microRNA. *Science and Justice*, 54(4), 307–310. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2014.03.001>
- Madléna, M., Hermann, P., Jáhn, M., & Fejérdy, P. (2008). Caries prevalence and tooth loss in Hungarian adult population: results of a national survey. *BMC Public Health*, 8, 364. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-8-364>
- Malaver, P. C., & Yunis, J. J. (2003). Different dental tissues as source of DNA for human identification in forensic cases. *Croatian Medical Journal*, 44(3), 306–309. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808723>
- Malewski, T., Draber-Mońko, A., Pomorski, J., Łoś, M., & Bogdanowicz, W. (2010). Identification of forensically important blowfly species (Diptera: Calliphoridae) by high-resolution melting PCR analysis. *International Journal of Legal Medicine*, 124(4), 277–285. <https://doi.org/10.1007/s00414-009-0396-x>
- Mallach, H. J., & Laudahn, G. (1964). [COMPARATIVE STUDIES WITH ENZYMATIC METHODS ON VITAL AND CADAVERIC BLOOD WITH REGARD TO THE TIME OF DEATH]. *Klinische Wochenschrift*, 42, 693–699. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14250911>
- Manjunath, B. C., Chandrashekar, B. R., Mahesh, M., & Vatchala Rani, R. M. (2011). DNA profiling and forensic dentistry--a review of the recent concepts and trends. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 18(5), 191–197.

<https://doi.org/10.1016/j.jflm.2011.02.005>

- Mansour, H., Fuhrmann, A., Paradowski, I., van Well, E. J., & Püschel, K. (2017). The role of forensic medicine and forensic dentistry in estimating the chronological age of living individuals in Hamburg, Germany. *International Journal of Legal Medicine*, 131(2), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1517-y>
- Marroquin, T. Y., Karkhanis, S., Kvaal, S. I., Vasudavan, S., Kruger, E., & Tennant, M. (2017). Age estimation in adults by dental imaging assessment systematic review. *Forensic Science International*, 275, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.03.007>
- Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., Gonzalez, A., Lauber, C. L., Knights, D., Ackermann, G., ... Knight, R. (2013). A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLife*, 2013(2), 1–19. <https://doi.org/10.7554/eLife.01104.001>
- Metcalf, J. L., Xu, Z. Z., Weiss, S., Lax, S., Van Treuren, W., Hyde, E. R., ... Knight, R. (2016). Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science*, 351(6269), 158–162. <https://doi.org/10.1126/science.aad2646>
- Mutter, G. L., Zahrieh, D., Liu, C., Neuberg, D., Finkelstein, D., Baker, H. E., & Warrington, J. A. (2004). Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*, 5(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-88>
- Naewe, W. (1978). *Gerichtliche Medizin für Polizeibeamte: mit 8 Tabellen*. Kriminalistik-Verlag.
- Naru, A. S. (1997). Methods for the Analysis of Human Bite Marks. *Forensic Science Review*, 9(2), 123–139. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26269944>
- Nathan, M. D. E., & Sakthi, D. S. (2014). Dentistry and mass disaster - a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8(7), ZE01-3. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7282.4573>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Gulen, B., Waterbury, C. C., Hershkovits, E., Hsiao, C., ... Williams, L. D. (2014). Secondary structures of rRNAs from all three domains of life. *PLoS ONE*, 9(2), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088222>
- Pozhitkov, A. E., Neme, R., Domazet-Lošo, T., Leroux, B. G., Soni, S., Tautz, D., & Noble, P. A. (2017). Tracing the dynamics of gene transcripts after organismal death. *Open Biology*, 7(1). <https://doi.org/10.1098/rsob.160267>
- Priyadharsini, C., Masthan, K. M. K., Balachander, N., Babu, Na., & Jimson, S. (2015). Evolution of forensic odontology: An overview. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(5), 178. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.155894>
- Probst, J., Brechtel, S., Scheel, B., Hoerr, I., Jung, G., Rammensee, H.-G., & Pascolo, S. (2006). Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genetic Vaccines and Therapy*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-4-4>
- Reesu, G. V., & Brown, N. L. (2016). Inconsistency in opinions of forensic odontologists when considering bite mark evidence. *Forensic Science International*, 266, 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.06.002>

- Sachs, J. S. (2001). *CORPSE - Nature, Forensics, and the Struggle to Pinpoint Time of Death*. PERSEUS PUBLISHING.
- Sakurada, K., Akutsu, T., Watanabe, K., & Yoshino, M. (2012). Identification of nasal blood by real-time RT-PCR. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, *14*(4), 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.01.014>
- Sampaio-Silva, F., Magalhães, T., Carvalho, F., Dinis-Oliveira, R. J., & Silvestre, R. (2013). Profiling of RNA degradation for estimation of post mortem interval. *PloS One*, *8*(2), e56507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056507>
- Santoro, V., Smaldone, G., Lozito, P., Smaldone, M., & Introna, F. (2011). A forensic approach to fatal dog attacks. A case study and review of the literature. *Forensic Science International*, *206*(1–3), e37–42. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.026>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, *7*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Schweighardt, A. J., Tate, C. M., Scott, K. A., Harper, K. A., & Robertson, J. M. (2015). Evaluation of Commercial Kits for Dual Extraction of DNA and RNA from Human Body Fluids. *Journal of Forensic Sciences*, *60*(1), 157–165. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12586>
- Setzer, M., Juusola, J., & Ballantyne, J. (2008). Recovery and stability of RNA in vaginal swabs and blood, semen, and saliva stains. *Journal of Forensic Sciences*, *53*(2), 296–305. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00652.x>
- Sirker, M., Schneider, P. M., & Gomes, I. (2016). A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *International Journal of Legal Medicine*, *130*(6), 1431–1438. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1373-9>
- Song, C. (2013). *Egy kínai halottkém feljegyzései - A bűnök elsöprésének összegyűjtött jegyzetei*. Quattrocento Kiadó.
- Tabachnick, J., & Freed, R. (1961). Demonstration of nucleases on mammalian skin surface and in saline extracts of hair. *Nature*, *190*, 921–922. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13774723>
- Tumer, A. R., Karacaoglu, E., Namli, A., Keten, A., Farasat, S., Akcan, R., ... Odabaşı, A. B. (2013). Effects of different types of soil on decomposition: an experimental study. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, *15*(3), 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.11.003>
- Vavpotič, M., Turk, T., Martinčič, D. Š., & Balažic, J. (2009). Characteristics of the number of odontoblasts in human dental pulp post-mortem. *Forensic Science International*, *193*, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.09.023>
- Vennemann, M., & Koppelkamm, A. (2010). mRNA profiling in forensic genetics I: Possibilities and limitations. *Forensic Science International*, *203*(1–3), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.006>
- Verma, A. K., Kumar, S., & Bhattacharya, S. (2013). Identification of a person with the help of bite mark analysis. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *3*(2),

88–91. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2013.05.002>

WHO. (2012). Fact sheet N°318: Oral health. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>

Xavier, M., Bento, A., Costa, A., Corte-Real, A., Veloso, C., Sampaio, L., ... Corte-Real, F. (2011). Primary teeth as DNA reference sample in disaster victim identification (DVI). *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 3(1), e381–e382. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2011.09.052>

Young, S. T., Wells, J. D., Hobbs, G. R., & Bishop, C. P. (2013). Estimating postmortem interval using RNA degradation and morphological changes in tooth pulp. *Forensic Science International*, 229(1–3), 163.e1-6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.035>

Zhou, C., & Byard, R. W. (2011). Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers - An overview. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 18(1), 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2010.10.003>

Tudományos közlemények és kongresszusi összefoglalók jegyzéke

Összesített impakt faktor: 21,379

Összes hivatkozás: 34

Független hivatkozás: 29

Az értekezés alapjául szolgáló tudományos közlemény

V.S. Poór, D. Lukács, T. Nagy, E. Rácz, K. Sipos: The rate of RNA degradation in human dental pulp reveals post-mortem interval

International Journal of Legal Medicine. 130(3):615-619. 2016 IF: 2,714

További tudományos közlemények

E. Rácz, F. Könczöl, D. Tóth, Z. Patonai, Z. Porpáczy, Z. Kozma, **V.S. Poór**, K. Sipos.: PCR-based identification of drowning: four case reports

International Journal of Legal Medicine. 130(5):1303-1307. 2016 IF: 2,714

E. Rácz, F. Könczöl, H. Mészáros, Z. Kozma, M. Mayer, Z. Porpáczy, **V.S. Poór**, K. Sipos: Drowning-related fatalities during a 5-year period (2008-2012) in South-West Hungary - A retrospective study

Journal of Forensic and Legal Medicine 31():7-11 2015 IF: 0,76

A. Miseta, J. Nagy, T. Nagy, **V.S. Poór**, Z. Fekete, K. Sipos: Hepcidin and its potential clinical utility

Cell Biology International 39(11):1191-1202 2015 IF: 1,933

T. Nagy, D. Frank, E. Kátai, R.K.K. Yahiro, **V.S. Poór**, G. Montskó, Z. Zrínyi, G.L. Kovács, A. Miseta: Lithium induces ER stress and N-glycan modification in galactose-grown Jurkat cells

PLoS ONE 8(7):e70410. 2013 IF: 3,354

E. Pandur, K. Sipos, L. Grama. J. Nagy, **V.S. Poór**, G. Sétáló, A. Miseta, Z. Fekete: Prohepcidin binds to the HAMP promoter and autoregulates its own expression

The Biochemical Journal 451(2):301–311 2013 IF: 4,779

J. Nagy, L. Lakner, **V. S. Poór**, E. Pandur, G. Mózsik, A. Miseta, K. Sipos: Serum prohepcidin levels in chronic inflammatory bowel diseases

Journal of Crohn's and Colitis 4(6):649-653 2010 IF: 1,729

E. Pandur, J. Nagy, **V. S. Poór**, Á. Sarnyai, A. Huszár, A. Miseta, K. Sipos: Alpha-1 antitrypsin binds preprohepcidin intracellularly and prohepcidin in the serum

FEBS Journal 276(7):2012-2021 2009 IF: 3,396

Konferencia előadások

Pediastrum (Chlorophyceae) in the diagnosis of drowning - case report

Viktor S. Poór, Katalin Sipos, Zsolt Kozma

2017.09.11-15. 10th International Symposium Advances in Legal Medicine (Düsseldorf)

Nukleinsav izolálás igazságügyi mintákból: nehézségek és lehetőségek

Sipos Katalin, **Poór Viktor Soma**

2016.04.23. Igazságügyi szakértői kötelezően szinten tartó továbbképző tanfolyam (Pécs)

Új generációs szekvenálás az igazságügyben

Sipos Katalin, **Poór Viktor Soma**

2016.04.21. Igazságügyi szakértői kötelezően szinten tartó továbbképző tanfolyam (Pécs)

In vino cocto veritas

Poór Viktor Soma, Mayer Mátyás

2016.05.26-28. Fiatal Igazságügyi Orvosszakértők Fóruma (Szeged)

Vízbefulladás? - Új diagnosztikai módszerek bemutatása egy eseten keresztül

Poór Viktor Soma, Rácz Evelin, Simon Gábor, Heckmann Veronika, Sipos Katalin, Kozma Zsolt

2016.01.15. Magyar Igazságügyi Orvosok Társasága (MIOT) kazuisztikai tudományos nap (Budapest)

RNS igazságügyi alkalmazásai

Poór Viktor Soma, Lukács Dénes, Sipos Katalin

2015.09.04 Magyar Igazságügyi Orvosok Társasága (MIOT) XV. kongresszusa (Debrecen)

Posztmortem intervallum becslése RNS degradáció alapján fogból

Poór Viktor Soma, Lukács Dénes, Sipos Katalin

2014.10.03. Ifjúsági MIOT gyűlés (Hosszúhetény)

Bort iszik és vizet aspirál

Poór Viktor Soma, Sipos Katalin

2012.10.16. PTE Orvostudományi Szakosztály ülése (Pécs)