

A VÍZBEFÜLLADÁST IGAZOLÓ IGAZSÁGÜGYI LABORATÓRIUMI MÓDSZEREK FEJLESZTÉSE

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Rácz Evelin

Témavezető: **dr. Sipos Katalin**, M.D., Ph.D.

Programvezető: **dr. Miseta Attila**, M.D., Ph.D., D.Sc.

Doktori Iskola vezetője: **dr. Kovács L. Gábor**, M.D., Ph.D., D.Sc.



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Igazságügyi Orvostani Intézet
Pécs, 2016

BEVEZETÉS

A vízbefulladás, mint diagnózis felállításának problémái

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2016-os adatai szerint a vízbefulladás a harmadik leggyakoribb, nem természetes módon bekövetkező erőszakos halálok a világon. A vízbefulladás definíció szerint (*World Congress of Drowning, 2002*) részleges vagy teljes folyadékba merülés miatti légzőkárosodás eredményeképpen kialakuló halálok. Nem kritériuma, hogy az egész test vízbe merüljön, a halál olyan módon is bekövetkezhet, amikor csak az arc (csak az orr és a szájnyílás) merül folyadékba.

A vízből előkerült holttestek vizsgálatakor az igazságügyi orvostan gyakorlatában számos kérdés vetődik fel. A legfontosabb annak eldöntése, hogy élő állapotban vízbe kerülésről, tehát vízbefulladásról van-e szó, vagy a holttest utólag került a vízbe, és a halál közvetlen oka a vízbefulladásától eltérő volt-e (pl. vízbe merülést megelőzően bekövetkezett halál más okból, vagy bűncselekmény leplezése).

Megnehezíti a holttest vizsgálatát és a halál okának megállapítását, hogy esetenként az előrehaladott bomlás miatt, a vízben talált holttesten lévő sérülések időbeli elkülönítése nem könnyű vagy egyáltalán nem is lehetséges: keletkezhetnek élőben, közvetlenül a halál bekövetkezése előtt (pl. vízbeugráskor kemény tárgyakhoz ütdés során szerzett sérülés), vagy a holttest vízben való sodródásakor (pl. vízben úszó tárgyakhoz, vízi járművekhez ütdés, a mederben lévő kavicsok, sziklák okozta sérülések, vízi élőlények és járművek okozta sérülések) és a holttest partra juttatása során is (pl.: csákyázás).

Mivel a vízbefulladás diagnózisának felállítása kizárólag a bonclelet alapján sok esetben nehéz, ezért a boncleleten kívül más technikával is meg kell erősíteni a vízbefulladás tényét. Az utóbbi évszázadban számos új módszer megalkotásával próbálkoztak, ezek némelyike specifikus az adott vízközeg típusára, ezért a legtöbbjük a gyakorlatban nem terjedt el. A diatóma teszt a legrégebbi, és általánosan a mindennapi gyakorlatban alkalmazott módszer a bonclelet megerősítésére, ám ahogyan később látni fogjuk, számos korláttal rendelkezik.

Az algák és a vízbefulladás kapcsolata

Az algák az élővilág heterogén, polifiletikus, ubikvista csoportját alkotják. A legrégebben leírt cianobaktériumok korát 3,3-3,5 milliárd évre becsülik, míg az eddig leírt legkorábbi fonalas alga fosszília kora 1,6 milliárd év, így joggal nevezhetjük őket a Föld ősi szervezeteinek.

Általánosan kijelenthető, hogy minden természetes, és a legtöbb mesterséges vízben előfordulnak algák – legyen szó csapvízről, talajvízről, sós- és édesvízről, álló- és folyóvízről. Léteznek olyan fajok, melyek az álló-, míg mások a folyóvizet preferálják inkább, illetve néhány algafaj a szennyeződésekre mutatott érzékenysége miatt ún. indikátorszervezete a speciális környezeti körülményeknek.

Már a 20. század elején felismerték, hogy ezek a vízben élő egy- és többsejtű szervezetek méretükből és élőhely-specifitásukból adódóan alkalmasak lehetnek a vízbefulladás diagnózisának támogatására. A vízbefulladás bizonyításának egyik legfontosabb része az algák poszt mortem szervezetben való jelenlétének igazolása, ezért célszerű inkább tágabb algacsoportok kimutatását megcélozni ahelyett, hogy egyes fajokra koncentrálnánk (akár mikroszkópos, akár molekuláris biológiai módszerrel). A diatómák ellenálló szilícium vázuk miatt megfelelő szervezetek erre a célra. Vannak olyan esetek azonban, amikor a vízközeg kevés diatómát tartalmaz, vagy nem tartalmaz diatómát, ekkor célszerű más baktérium- és algacsoportok (cianobaktériumok, zöldalgák stb.) kimutatására fókuszálni.

A vízbefulladás tényének bizonyítása: Diatóma teszt

A vízbefulladás igazolására már a 20. század eleje óta alkalmazzák a diatóma tesztet. *Revenstorf* volt az első kutató, aki a vízbefulladás bizonyítására diatómák kimutatását alkalmazta, 1904-ben publikálta ezzel kapcsolatos tanulmányát.

A diatómák (másnéven kovamoszatok) unicelluláris, eukarióta mikroorganizmusok. A kovamoszatok (*Bacillariophyceae*) a sárgásmoszatok (*Heterokontophyta*) törzsének egy osztálya, a fajok számát 30 és 100.000 közé teszik. Ubikvista csoport, azaz édes- és tengervízben is élnek, ám nem csak vízben, hanem a levegőben, növényeken és a talajban is előfordulnak (diatómaföld). Egyaránt ismertek lebegő életmódot folytató, valamint az aljzathoz, növényekhez tapadó fajaik is, ez utóbbiak leginkább a folyókban fordulnak elő. Az aljzaton élő diatómák robusztusabb, nagyobb mérettartományba eső fajok, ezek az ún. bentikus diatómák. Azonosításukat és elkülönítésüket (nem csak más algafajoktól, hanem egymástól is) a jól differenciált, szilícium-dioxidot tartalmazó sejtfaluk teszi lehetővé. Ez a sejtfal több részből áll: állandó alkotója két, bonyolult formát, egymásba illő héj, amelyet valvának nevezünk.

A diatóma teszt azon alapul, hogy vízbefulladáskor a fuldokló tüdejébe jutó, diatómákat és más baktériumokat, algákat tartalmazó víz a vérkeringésbe kerülve elszállítódik a szervekhez. Mivel a fuldoklás általában percekig tartó folyamat (sós vízben hosszabb ideig tart, mint édes vízben), az algáknak elég idejük van a vérárammal eljutni a szervekig, és ezáltal kimutathatók az agyban, vesében, májban, lépben és/vagy csontvelőben is.



A diatóma teszt szerepe a vízbefulladás orvosszakértői igazolására.

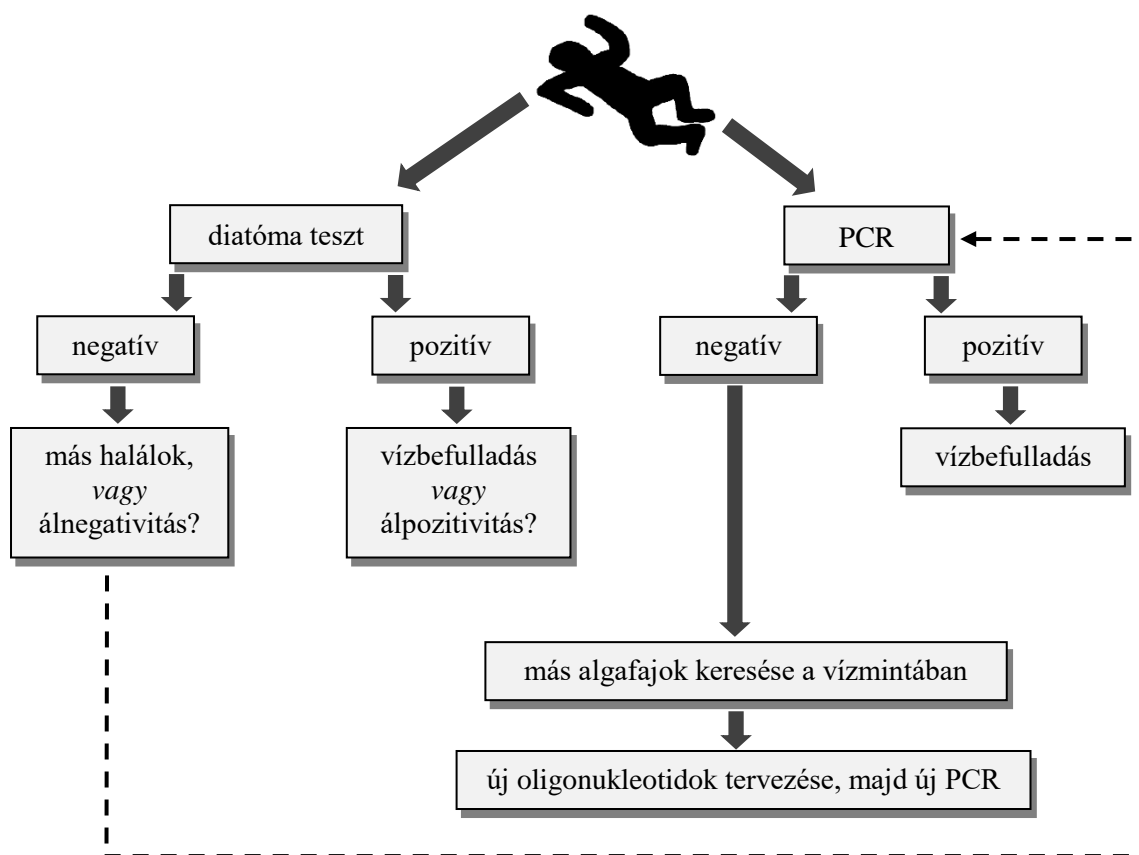
Ha az adott személy nem élő állapotában kerül a vízbe (nem fuldoklik), úgy keringés hiányában a fentnevezett, vízben élő szervezetek a nagyvérköri keringésbe kapcsolt szervekhez nem jutnak el. Ebben az esetben negatív diatóma teszt eredmény várható. Fentieket kiegészítve, a diatómák (és más algák) jelenléte a tüdőben nem bizonyító erejű a vízbefulladás szempontjából, hiszen ezek az élőlények passzívan is bekerülhetnek a tüdőbe, azonban a vérkeringés hiányában a célszervekig eljutni nem tudnak (kivéve abban az esetben, ha a testüregek valamilyen ok miatt megnyílnak, pl. a holttest bomlása vagy sérülés miatt, ilyenkor

a vízi organizmusok jelenléte nem bizonyítja a vízbefulladásást). A tudomány jelenlegi állása szerint ép kültakaró esetén sem a diatómák, sem a méretben baktériumokhoz hasonló cianobaktériumok és más pikoalgák nem jutnak el passzívan a célszervekhez (pl. agy, lép, máj, vese, csontvelő), amennyiben a holttest vízben ázik.

A diatóma teszt során a savas vagy enzimatis módszerrel elemézik a szövet minél nagyobb részét, ezáltal csak a kovamoszatok szilícium-dioxid (SiO₂) vázai maradnak vissza, melyek fénymikroszkóppal detektálhatók és akár fajszintű azonosításra is alkalmasak. Amennyiben ismert az adott földrajzi hely – egyéb környezeti tényezőket is figyelembe vett – kovamoszat populációja, nem csak a vízközeg, hanem a vízbefulladás pontos helyszíne is meghatározható, illetve megadhatjuk, hogy a feltalálási hely és a vízbefulladás helye milyen viszonyban van egymással.

Amennyiben a vizsgálat pozitív eredménnyel jár, azaz a vízben és meghatározott poszt mortem szövetekben is kovavázakat lehet látni, az elhunyt nagy valószínűséggel vízbefulladt. Minél több diatómát tartalmazott a holttest feltalálásának helyszínét képező víz, illetve minél hosszabb ideig húzódott el a fuldoklás, annál nagyobb a valószínűsége az algák bekerülésének a szervezetbe.

A diatóma teszt alkalmazhatóságáról és értékelhetőségéről az igazságügyi orvostani gyakorlatban a kutatóknak eltérő a véleménye. Egyes szakértők már a '60-es évek végén megkérdőjelezték a teszt hatékonyságát és alkalmazhatóságát a vízbefulladás tényének megerősítésére. Irodalmi adatok alapján valóban előfordulhatnak olyan kivételes esetek, amikor a diatóma teszt álnegatív vagy álpozitív eredményt adhat.



Vízben talált holttest esetén alkalmazandó diagnosztikus döntési lehetőségek laboratóriumi vizsgálathoz. Amennyiben a diatóma teszt negatív, érdemes megfontolni a PCR alapú vizsgálat lehetőségét.

Álnegatív esetek előfordulhatnak, ha (1) a vízbefulladás közege kevés diatómát tartalmazott, (2) a fuldoklás rövid ideig tartott, és a diatómáknak nem volt ideje a keringés segítségével elszállítani a szervekig, vagy (3) a szövetekben lévő kevés diatóma váz az emésztés következtében elveszett.

Az irodalomban számos eshetőséget leírtak az álpozitivitás lehetőségére is. Mivel kovamoszatok előfordulnak a levegőben és a talajban is, utólag nehéz kizárni, hogy a diatómák jelenléte a szövetekben nem inhaláció eredménye-e. *Langer és munkatársai* 1971-ben felvetették, hogy dohányzás közben a dohánylevelek felületén élő kovamoszatok belégzése is lehetséges. *Peabody* 1977-ben publikált tanulmányában leírja, hogy nem csak a gyufák fejében láthatóak diatóma vázak (amelyek az égés után is épek maradnak), hanem egyes festékek és lakkok is tartalmazzák őket, ez pedig felveti a kontamináció lehetőségét. *Otto* 1961-ben 28 szilikózisos beteg tüdejét vizsgálta meg, és 23 esetben írta le diatómák jelenlétét a mintákban, ezekben a kutatásokban azonban nem vizsgálták a vér vagy a további szervek esetleges pozitivitását. A szilícium tartalmú kozmetikumok és táplálékkiegészítők kovaföldet tartalmaznak porított formában, amely bejutva a szervezetbe szintén torzíthatja a vizsgálat eredményességét.

CÉLKITŰZÉSEK

A vízbefulladás bizonyítása jelenleg is nehéz feladat. E halálok tényének igazolására jelenleg világszerte alkalmazott módszer a diatóma teszt. A PCR (polimeráz láncreakció) 20. század végi felfedezésével azonban új távlatok nyíltak meg az igazságügyi orvostani módszerek kiterjesztésében. A fentiekből kiindulva, kutatásunk céljai a következők voltak:

1. a dél-dunántúli régióban történt vízbefulladások körülményeinek és helyszíneinek felmérése, a rizikófaktorok vizsgálata;
2. a dél-dunántúli régió vizeiben élő legjellemzőbb algacsoportok meghatározása, és az ezeknek az algacsoportoknak megfelelő PCR primerek alkalmazása a vízbefulladás bizonyítására;
3. a korábbi, törvényszéki gyakorlatban alkalmazott mikroszkópos módszer (diatóma teszt) érzékenységének és specifikusságának növelése, és a módszer diatómáktól eltérő algafajokra és cianobaktériumokra való kiterjesztése; valamint
4. egy olyan, a mindennapi igazságügyi orvostani gyakorlatba egyszerűen átültethető, DNS alapú módszer kifejlesztése, amely széleskörűen alkalmazható természetes és mesterséges vizekben történő vízbefulladás esetén a vízbefulladás megerősítésére.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kísérleteink során az alábbi módszereket alkalmaztuk:

- 2008. január 1. és 2012. december 31. között, a dél-dunántúli régió természetes és mesterséges vizeiben elhunyt személyek retrospektív vizsgálata a következő rizikófaktorok figyelembevételével: *nem, életkor, alkohol-, gyógyszer- és kábítószerfogyasztás, vízbefulladás ideje, helyszíne és az azt megelőző körülmények*
- statisztikai analízis GraphPad Prism programmal
- a környékbeli természetes vizekből minták gyűjtése és azok vizsgálata célszervezetek keresésének szempontjából
- klasszikus diatóma teszt (savassal emésztés)
- proteinase K emésztés alapú diatóma teszt

- a diatóma tesztek értékelése fénymikroszkóppal
- algák vizsgálata vízben és szövetmintákban fordított plankton mikroszkóppal
- cianobaktériumok azonosítása fluoreszcens mikroszkóppal
- fitoplankton DNS izolálása vízből, algatenyészetből és poszt mortem szövetből
- PCR cianobaktérium, zöldalga és diatóma specifikus primerekkel
- agaróz gélelektroforézis

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A vízbefulladásokhoz köthető rizikófaktorok vizsgálata Magyarország dél-dunántúli régiójában

Amikor a vízbefulladások vizsgálatának kérdésköre, mint kutatási téma felmerült, első lépésként felmértem a magyarországi, és elsősorban a környékbeli vízbefulladások éves számát és azok körülményeit (ok, helyszín, élvezeti szerekek fogyasztása stb.). A felmérés szükségességét több szempontból is elengedhetetlennek tartottam: ennek egyik oka az volt, hogy a vízbefulladás, mint halálok, nem szerepel kiemelt helyen a köztudatban, azaz, az igazságügyi orvostanban kívülállónak tekinthető laikusok nehezen hiszik el, hogy a vízbefulladás valóban olyan problémakör, amellyel érdemes foglalkozni. Szerettem volna ehhez számszerű adatokkal hozzájárulni.

Összesen 114 vízbefulladás miatt elhunyt személy retrospektív vizsgálata történt a 2008-2012-ben elhunytak körében. Az elhunytak száma a vizsgált időszak alatt összességében állandó volt.

A 2008 és 2012 között vízbefulladás miatt elhunytak életkorának nemenkénti megoszlását vizsgáltuk azon célból, hogy megismerjük, mely korcsoport a leginkább veszélyeztetett a vízbefulladás tekintetében ebben a régióban. A legmagasabb rizikófaktorú csoport az életkort tekintve az 51 és 60 év közöttiek korcsoportja (31 a vizsgált 114 esetből; 27,19%), sőt, mind a férfiakat, mind a nőket tekintve az 51 és 70 év közöttiek fulladtak vízbe leggyakrabban. Ez a korcsoport az összes vízbefulladásos haláleset közel felét (44,73%) tette ki a vizsgált öt éves periódusban. A WHO szerint az 14 év alatti gyermekek között a legmagasabb a vízbefulladási ráta Afrikában, Ázsiában és Amerikában, ám Magyarország vizsgált környékén meglepően alacsony volt az ebbe a korcsoportba tartozó elhunytak száma. Vizsgálatunk alapján Magyarországon az 50 év feletti férfiak nagyobb gyakorisággal fulladnak vízbe, mint az 50 év alatti középkorúak és az ennél fiatalabbak. Nem találtam adatot arról, hogy más országokban a dél-dunántúli vízbefulladásos esetekhez hasonlóan magas lett volna az idősebbek körében a vízbefulladások száma.

Kevés tanulmány vizsgálja az alkoholfogyasztás és a vízbefulladás kapcsolatát, ám a WHO szerint szoros összefüggés lehet közöttük. 68 (n=81 fő (83,95%)) férfi és 29 nő (n=33 (87,89%)) véralkoholszintje volt mérhető (összesen 97 a 114 vizsgált esetből), közülük 58 férfi (a mérhető véralkoholszinttel rendelkező férfiak 85,29%-a) és 15 nő (a mérhető véralkoholszinttel rendelkező nők 51,72%-a) fogyasztott alkoholt. Összesen az esetek közel kétharmadában (n=73; 64,04%) volt a véralkoholszint 0,21‰ felett. 17 esetben nem lehetett megmérni a véralkoholszintet az előrehaladott bomlás vagy a vér hiánya miatt. A férfiak véralkoholszintje átlagosan magasabb volt, mint az alkoholt fogyasztó nőké. Nyolc férfi elhunyt véralkoholszintje az igen súlyos fokú alkoholos befolyásoltság tartományába esett, azaz közel toxikus mennyiségben volt jelen az alkohol a szervezetükben (3,51‰ feletti véralkoholszint). A halál oka ezekben az esetekben is vízbefulladás volt. Férfiak esetében minden életkorban egyenlő mértékben volt jellemző az alkoholfogyasztás, a nők kevesebb alkohol fogyasztottak, és az is inkább az idősebb korosztályra volt jellemző. Az elhunytak pozitív (n=73) és a negatív (n=24) véralkoholszint eredményeinek száma között szignifikáns különbség mutatkozott.

Az alkoholfogyasztás mellett a kábítószer- és gyógyszerfogyasztás is befolyásolhatja az áldozatok veszély-felismerési és önmentési képességét, ezért megvizsgáltam, hogy a dél-dunántúli régióban elhunytak esetében van-e kapcsolat a kábítószer- és gyógyszerfogyasztás és a vízbefulladás között, valamint, hogy milyen gyógyszereket fogyasztottak az elhunytak. 74 esetben találtam adatot a kábítószer- és gyógyszerfogyasztásról. 11 esetben azonosítottak valamilyen gyógyszerhatóanyagot a vérben, 5 esetben nőknél, míg 6 esetben férfiaknál. A leggyakrabban benzodiazepin csoportba tartozó szerek jelenlétét írták le a vérben (5 eset), ezt követte a citalopram (2 eset), további egy-egy esetben carbamazepine, noraminophenazon, ibuprofen és venlafaxine került leírásra. Ezeket a gyógyszerhatóanyagokat 54 és 75 év közötti elhunytak véréből mutatták ki. Ezzel szemben amfetaminszármazékot három esetben írtak le (17, 20 és 52 évesek, mindannyian férfiak). Más országok statisztikai adataival összehasonlítva a gyógyszeres, illetve kábítószeres befolyásoltság vízbefulladásokor kifejezetten ritka hazánkban.

A vízbefulladásos halálesetek bekövetkezéni időszakát vizsgálva a várt eredményt kaptuk. A Dél-Dunántúlon történő vízbefulladások nagy része a melegebb hónapokban, márciustól augusztus végéig történt (74,56%). A vízbefulladások közel fele (49,12%) nyáron történt. A téli időszakban bekövetkezett vízbefulladások nagy része öngyilkosság miatt következett be, míg a többi évszakban inkább a véletlenszerű balesetek száma volt a jellemző. A vízbefulladások szezonális mintázata más országokéhoz (pl. USA, Banglades, Irán) hasonlóan alakult.

A vízbefulladások helyszíneit országoként leginkább a földrajzi és éghajlati viszonyok határozzák meg. Vizsgálatom célja volt, hogy felmérjem, mely helyszíneken történik vízbefulladás környékünkön. A legtöbb vízbefulladás természetes vizekben (folyókban, tavakban) történt Magyarország dél-dunántúli régiójában. A holttestek legnagyobb számban a Dunában (n=30; 26,32%), illetve a Balatonban (n=22; 19,30%) kerültek feltalálásra. A beltéri vízbefulladások ritkák voltak, mindössze négy esetben írtak le hasonlót. 13 esetben találták meg az elhunytat az ingatlanja közvetlen környezetében (telekhez tartozó borospince, kút, árok, kerti tó). A kútba ugrás, mint öngyilkosság elkövetésének módja, gyakori Magyarországon az idősebbek körében, ezen a környéken nyolc esetben jegyezték fel a vizsgált öt éves periódusban.

Országoként (földrajzi és társadalmi összetétel-különbség miatt) igen eltérő okokra vezethető vissza az elhunytak vízbe kerülése. A szemtanúk hasznos adatokat szolgáltathatnak a vízbefulladásos esetek háttéréről a rendőrség számára, ezzel megkönnyítve a nyomozás előrehaladását, azonban inkább kevés esetben volt jellemző, hogy az eseménynek szemtanúja lett volna valaki. 29 esetben semmilyen adat nem volt ismert a vízbefulladások háttéréről, a boncolás során azonban kizárták az erőszakos elkövetési módot, így a kérdéses halálesetek baleset vagy öngyilkosság miatt következhetnek be. A vízbe kerülés oka legnagyobb részben baleset volt (59,65%), ezekben közrejátszhatott a magas véralkoholszint vagy krónikus betegség (cukorbetegség, magas vérnyomás betegség stb.). Más országok statisztikáival összehasonlítva az adatainkat kitűnik, hogy nálunk kevesen fulladtak vízbe sportolás közben. Minden, vízi sporttevékenység végzése közben elhunyt áldozat férfi volt, és alkoholt fogyasztott. Két esetben (1,75%) írtak le emberölés miatt bekövetkezett vízbefulladásról. 15 esetben (13,16%) jegyezték fel öngyilkosságra utaló nyomokat a vizsgált 114 esetből. Az öngyilkossági szándék bizonyítása szemtanúk vagy búcsúlevél hiányában nehéz, de egyes nyomok utalhatnak az elkövetési módra: jellegzetes külsérelmi nyomok, elrendezett személyes tárgyak a vízbeesés közelében. Az öngyilkosságok az idősebb korosztályra voltak jellemzőek (61 és 90 év közöttiek) és ezen elhunytak nem fogyasztottak alkoholt, vagy csak kis mennyiségben, tehát nem voltak alkoholos befolyásoltság alatt. A nők a férfiaknál gyakrabban választották a vízbefulladás, mint öngyilkossági elkövetési módot (11 nő és 4 férfi). Az öngyilkosságot elkövető férfiak 50 és 75 év közöttiek voltak, míg a nők 38 és 82 év közöttiek. Az öngyilkosságok elkövetési módja kútba ugrás vagy hídról leugrás volt.

Mindent összegezve kijelenthetjük, hogy a fő vízbefulladásokhoz köthető kockázati tényezők a következők: **(1)** férfi nem (71,05%), **(2)** 51 és 70 év közötti életkor (44,73%) és **(3)** alkoholfogyasztás (64,04%). Reményeim szerint ezek az eredmények felhívják a figyelmet prevenció szempontból a veszélyeztetett középkorú és idősödő csoportra, hiszen köztük volt a legmagasabb a vízbefulladások száma. Fontos, hogy kerüljük az alkoholfogyasztást víz közelében végzett sportolási és szabadidő tevékenység idején, mert emellett, hogy az alkohol növeli az önbizalmat, csökkenti a potenciális áldozatok veszély-felismerési és önmentési képességét.

A vízbefulladás tényének alátámasztására alkalmazott mikroszkópos módszer, a diatóma teszt fejlesztése

A vízbefulladás tényének megállapítása jelenleg is nehéz: nincsenek specifikus boncjellei, ugyanis azok a legtöbb fulladásos halálnál megfigyelhetők. Mi több, egyes boncleletek (pl. habgomba jelenléte) megjelennek a vízbefulladások egy részében, máskor azonban az előrehaladott bomlás miatt hiányozhatnak is. Habár a diatóma teszt a leginkább elterjedt módszer a boncolás során prediktált diagnózis támogatására, számos hátránya ismert, ezért e mikroszkópos módszer hatékonyságának és érzékenységének növelését tűztem ki a dolgozat egyik céljává.

Különösen érdekes volt megvizsgálni a régió vízbefulladásainak helyszíneit, hiszen a dél-dunántúli régió (elsősorban Baranya-megye) a többi megyéhez viszonyítva természetes vizekben szegény. A régió vizeinek vizsgálata más szempontból is fontos volt: a vizek felmérése után adatainkkal felkerestem a tihanyi Balatoni Limnológiai Kutatóintézet Hidrobotanikai Osztályát (Magyar Tudományos Akadémia, Ökológiai Kutatóközpont), és az ott dolgozó algológusok segítségével meghatároztuk, hogy melyek a régióbeli vizek leggyakoribb algacsoportjai, amelyeket érdemes a DNS alapú kutatás célorganizmusainak választani. Azaz, melyek azok a vízben élő, egysejtű organizmus csoportok, amelyek méretükből és előfordulásukból adódóan megfelelően nagy eséllyel jutnak el a fuldokló áldozat szerveihez és jelenlétük kimutatható.

2011 és 2015 között 69 magyarországi vízmintát gyűjtöttünk, amelyeket natívan fénymikroszkópos, illetve némelyeket Lugol-oldattal hígítva, fordított plankton mikroszkópos vizsgálatnak vetettünk alá. A fordított plankton mikroszkóppal meghatározhatjuk, hogy térfogategységnyi vízmintában mennyi alga található, így kis alga tartalmú vizek esetében célszerű ezzel a mikroszkóppal értékelni a diatóma tesztet. Ennek az eszköznek az alkalmazásával tehát növelhetjük annak a lehetőségét, hogy a mintában diatómákat találunk.

A saját intézetünkben és a Balatoni Limnológiai Intézetben végzett kutatások alapján a leggyakrabban megfigyelt diatóma nemzetségek az általunk gyűjtött magyarországi vizekben a következők voltak: *Cyclotella sp.*, *Cymbella sp.*, *Diatoma sp.*, *Navicula sp.*, *Nitzschia sp.* A diatómákon kívül a zöldalgák képviseltették magukat nagy számban a fénymikroszkópos vizsgálatok során (*Nostoc sp.*, *Pediastrum sp.*, *Scenedesmus sp.*, *Volvox sp.*).

Általánosan kijelenthető, hogy a vízmintákban nagy számban voltak leírhatóak baktériumok, amelyek közül leginkább a cianobaktériumokat érdemes kiemelni. A pikocianobaktériumok fénymikroszkóp segítségével nem elkülöníthetők más pikoeukarióta kokkuszoaktól, ezért azonosításukhoz fluoreszcens mikroszkópra van szükség. A hazai vizek egyik, évszaktól függetlenül gyakori pikocianobaktérium faja a *Synechococcus sp.*, ezért ezt a csoportot választottam alapul a molekuláris vizsgálati protokoll kidolgozásához.

A pikocianobaktériumok zöld fényel megvilágítva válnak láthatóvá autofluoreszcenciájuknak köszönhetően. Az eukarióták nem gerjeszthetők zöld fényel, fluoreszcenciájuk csökken. A cianobaktériumok autofluoreszcenciáját csak friss, 24 órán belül vizsgált minta esetében érzékeltük erőteljesnek, 2-3 nap után egyre kevesebb cianobaktérium látható a mintában (amennyiben nincs volt lehetőségünk azonnal megvizsgálni a vízmintát rövid időn belül, a megfelelő, sötétben és hűtve tárolt minta vízmintától függően valamivel

hosszabb ideig vizsgálható). Kékesibolya fénnel gerjesztve a mintát, mindkét csoport láthatóvá válik.

A vízminták vizsgálatakor a fajszintű meghatározás nem volt cél, sokkal inkább a hazai vizek algaösszetételének megismerésére fókuszáltam, illetve a protokoll érzékenységének meghatározására. Tapasztalataim alapján a vízminták több, mint 90%-a közepes vagy nagy mennyiségben tartalmazott algákat, a minták 10%-ában nagyon kevés töredék algát láttunk, vagy egyáltalán nem láttunk algát. Megfigyeléseim alapján a tavak többségét egymáshoz viszonyítva ugyanolyan mennyiségben fordultak elő zöldalgák és diatómák, ám egyes esetekben ettől eltérő módon az egyik vagy a másik csoport dominált.

Tapasztalataim alapján a poszt mortem szövetminták vizsgálatának legnagyobb nehézségét a háttér, azaz a humán szövettörmelék jelenléte okozza. Minél nagyobb mértékben sikerül elrontcsolni a poszt mortem szövetet, annál nagyobb az esély arra, hogy a kovavázak is eltűnnek vagy eltörnek, ezzel megnehezítve azok felismerését. Avatatlan szem számára a diatóma vázak a csonttörmeléken kívül (pl. csontvelő vizsgálatok) növényi szőrökkel is összetéveszthetőek.

A vizsgálatokhoz vízbefulladás során elhunyt személyekből származó poszt mortem lép és csontvelő mintát használtam, valamint lehetőség szerint tüdőszövetet (egyes esetekben vér, máj, vese és agy is felhasználásra került). Amennyiben tüdőminta volt biztosított a vizsgálandó szövetminta mellett, ám vízminta nem, a tüdőminta is megfelelő kontrollként szolgált a vizsgálatokhoz, hiszen ennek a szövetmintának a pozitivitása várható el a legnagyobb valószínűséggel. Összehasonlítva a magyarországi igazságügyi orvostani és igazságügyi szakértői intézetek gyakorlatában alkalmazott kombinált savas emésztéssel, a proteinase K enzimmal emésztett poszt mortem szövetmintákban a háttér kevésbé zavaró, kevesebb töredezett, ám több ép vázzal rendelkező diatómát tudtam kimutatni.

Megjegyzendő, hogy a vízbefulladás helyszínéről származó víz és/vagy a tüdőminta pozitivitása nem jelenti azt, hogy a poszt mortem szövetmintán elvégzett diatóma teszt is pozitív lesz. Amikor pl. a víz kevés diatómát tartalmaz vagy egyáltalán nem is tartalmaz, illetve a fuldoklás rövid ideig tart (gyakorlatilag a halál reflex szerűen következett be), a szövetminta nagy valószínűséggel negatív lesz, míg a vízminta pozitív lehet.

A vízbefulladás tényének alátámasztására alkalmazott molekuláris biológiai módszer

33 vízbefulladásos esetben izoláltunk DNS-t a hatóság által biztosított vízmintákból és poszt mortem szövetekből. Ezekben az esetekben a boncolás során megállapított halálok vízbefulladás volt, és eredményeink a vízbefulladásos bonclelettel és a vízbefulladás igazolásra alkalmazott diatóma teszt pozitivitásával egyezően alátámasztották a vízbefulladás tényét (azaz mind a vízminta, mind valamely poszt mortem szövetminta pozitív eredményt adott valamely algaspecifikus oligonukleotiddal). Nyolc esetben alkalmaztunk a vízbefulladásától eltérő ok (önakasztás illetve gyógyszermérgezés) miatt elhunyt holttestekből származó poszt mortem szövetmintákat (lép és májszövet), amely esetekben negatív PCR eredményt kaptunk a kísérletek során alkalmazott primerpárokkal.

Jelen dolgozatban a pozitív diatóma tesztek megerősítése mellett négy olyan esetben is pozitív PCR eredményt kaptam, amikor a diatóma teszt negatív volt. Ezekben az esetekben a vízbefulladás tényét a boncolás és a szövettan is megerősítette, a toxikológiai vizsgálat kizárta a mérgezés lehetőségét, valamint a vízbe kerülés körülményeinek feltárását a szemtanúk leírásai is alátámasztották. E négy, negatív diatóma teszt eredményt adó eset mutatja, hogy amennyiben a vízbefulladás helyszínét képező víz kevés diatómát tartalmaz, vagy egyáltalán nem tartalmaz diatómát, más fitoplankton fajok (cianobaktériumok, zöld pikoalgák) kimutatását érdemes megcélozni. E fajok a diatómákhoz viszonyítva kisebb méretűek, ezért rövidebb ideig tartó fuldoklás esetén is nagy valószínűséggel jutnak el a véráramba és annak segítségével a szervekhez. Az általam vizsgált esetekben több primer párral végeztem el a PCR-t, egyes esetekben a diatóma specifikus primerekkel, máskor a zöldalgákra vagy a

cianobaktériumokra specifikus primerekkel kaptam negatív eredményt. Már valamely primerrel kapott pozitív eredmény is támogatja a vízbefulladás diagnózisát, hiszen a pozitív eredmény, azaz a poszt mortem szövet DNS pozitivitása azt a tényt valószínűsíti, hogy az áldozat vízbefulladás miatt hunyt el. Fontos, hogy vizsgálatainkhoz olyan oligonukleotidokat válasszunk, amelyek a humán DNS szekvencián nem ismernek fel szakaszokat, csak az általunk keresett algacsoportokra specifikusak.

Ahogy a diatóma teszt esetében, úgy az általam alkalmazott módszer esetében is igaz, hogy a DNS alapú tesztek érzékenyek a kontaminációra. Ezért a PCR vizsgálat során számos negatív kontroll alkalmazására van szükség. A poszt mortem szövetminták fitoplanktonnal való szennyeződésnek két forrása lehetséges: a fitoplankton forrása lehet maga a bőrfelszín (a holttest vízben állása miatt), másrészt a boncolás során alkalmazott csapvíz. Ezen okok miatt különösen fontos a körültekintő mintavétel, valamint, hogy a holttest lemosásakor ügyeljünk arra, hogy a szervek ne érintkezzenek a bőrfelszínnel, és a lemosásra lehetőség szerint algamentes (szűrt, steril) vizet alkalmazzunk.

A kísérletek során mind a laboratóriumi, mind a bonctermi vízből izoláltam DNS-t, ezek a vizsgálatok negatív eredménnyel jártak. A kontamináció lehetősége aprólékos mintaelőkészítés és steril eszközök használatával jelentősen csökkenthető, a negatív kontrollok alkalmazása és a PCR eredmények együttes értelmezése elengedhetetlen.

TÉZISEK: EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Jelen dolgozatban összefoglaltam a Dél-Dunántúlon 2008 és 2012 között történt vízbefulladások jellemzőit és meghatároztam a főbb rizikócsoportokat. Az eredmények közül kiemelendő, hogy a közép-koraidős korcsoportba eső, alkoholos befolyásoltság alatt álló férfiak a leginkább veszélyeztetett csoport a vízbefulladás lehetőségének szempontjából.

A dolgozat legfőbb céljával a vízbefulladás bizonyítási eljárása során alkalmazott módszer, a diatóma teszt hatékonyságának növelését, specifikusságának kiterjesztését tűztem ki. Ehhez egy, a magyarországi rutinban még nem alkalmazott, proteináz K alapú módszer specifikusságát hasonlítottam össze a rutin szerűen alkalmazott diatóma teszttel és más, az algológusok által alkalmazott mikroszkópos technikáknak az igazságügyi orvostani gyakorlatba való átültethetőségének lehetőségét vizsgáltam meg. Javaslatot tettem a klasszikus diatóma teszt módosításának lehetőségeire a speciális körülmények (pl. kevés diatómát tartalmazó víz) esetén történő vízbefulladások helyszínéről származó víz vizsgálatokor.

A klasszikus, mikroszkópos diatóma teszt megerősítése mellett bemutattam négy olyan esetet, amikor a vízbefulladás diagnózisának bizonyítására az igazságügyi orvostani gyakorlatban alkalmazott módszer, a diatóma teszt valamilyen okból negatív eredménnyel járt, amely a bonclelettel összehasonlítva ellentmondásos volt. Az általunk alkalmazott DNS alapú módszerrel azonban egy vagy több algaspecifikus PCR primerrel kapott pozitív eredménnyel támasztottam alá a vízbefulladás tényét.

Javaslatot tettem egy olyan, a rutinba átültethető, DNS alapú módszer gyakorlati alkalmazására, amely széleskörűen alkalmazható a megfelelő oligonukleotidok kiválasztása és megtalálása után a vízbefulladás igazolására.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Jelen munkámat a PTE ÁOK Igazságügyi Orvostani Intézetben végeztem. Ez alatt az idő alatt témavezetőm, dr. Sipos Katalin és állandó munkatársam, Poór Viktor Soma segítettek a munkámat, és lehetővé tették számomra a megfelelő kutatási téma megtalálását és elvégzését, valamint iránymutatásukkal és szakmai tanácsaikkal támogatták a munka előrehaladását. Emiatt köszönettel tartozom nekik.

Hálával tartozom dr. Könczöl Franciska docens asszonynak, aki ez idő alatt az intézet vezetője volt, és aki lehetővé tette számomra, hogy az intézetben végezhessem kutatómunkámat. Köszönöm továbbá dr. Kozma Zsolt intézetvezető úrnak és az Igazságügyi Orvostani Intézet minden jelenlegi és volt munkatársának a segítségüket és a baráti légkört, amelyet az évek alatt teremtettek.

Köszönetet szeretnék mondani a Balatoni Limnológiai Kutatóintézet minden munkatársának, akik többek között a kísérletek elindításához szükséges algtörzseket biztosították számomra. Kiemelt hálával tartozom Vörös Lajos professzor úrnak, aki két rövid tanulmányutam alatt számos értékes szakmai tanáccsal látott el és ezzel számos ponton előrelendítette a kutatás előrehaladását. Köszönöm Tugyi Nórának, hogy eligazított az algamikroszkopizálás világában, segített meghatározni a fajokat és elkészíteni a mikroszkópos fotókat a dolgozatomhoz. Köszönettel tartozom Pohner Zsuzsannának (ELTE, Mikrobiológiai Tanszék), amiért megosztotta velem tapasztalatait a diatóma DNS izolálás rejtelmeivel kapcsolatban.

Nem utolsó sorban hálával tartozom Mirkónak és a Családomnak; megértő türelmük, támogatásuk, odaadó szeretetük nélkül nem jutottam volna idáig.

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

Összesített impakt faktor: 7,916

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk impakt faktora: 3,732

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia posztterek száma: 2

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások száma: 8

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

1. **Rácz, E.**, Könczöl, F., Mészáros, H., Kozma, Z., Mayer, M., Porpáczy, Z., Poór, V.S., Sipos, K. (2015). *Drowning-related fatalities during a 5-year period (2008–2012) in South-West Hungary – A retrospective study*. J Forensic Legal Med, 31, 7–11. **IF:** 0,870
2. **Rácz, E.**, Könczöl, F., Tóth, D., Patonai, Z., Porpáczy, Z., Kozma, Z., Poór, V.S., Sipos, K. (2016). *PCR-based identification of drowning: four case reports*, Int J Legal Med. **IF:** 2,862

Egyéb közlemények

1. Poór, V.S., Lukács, D., Nagy, T., **Rácz, E.**, Sipos, K. *The rate of RNA degradation in human dental pulp reveals post-mortem interval*, Int J Legal Med. 130 (2016) 615–619. **IF:** 2,862
2. Simon, G., **Rácz E.**, Mayer, M., Heckmann, V., Tóth, D., Kozma Zs. (2016) *Suicide by Intentional Air embolism*, J For Sci. doi:10.1111/1556-4029.13320 **IF:** 1,322

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia poszterek

1. **Rácz E.**, Poór V. S., Pandur E., Patonai Z., Könczöl F., Porpáczy Z., Sipos K.: *Egy különleges vízbefulladásos eset diagnózisának igazolása PCR alapú módszerrel*. 43. Membrán-Transzport Konferencia, 2013, Sümeg
2. **Rácz E.**, Pandur E., Varga E., Poór V.S., Könczöl F., Simon G., Tóth D., Sipos K.: *A diatóma teszt csapdái és egy lehetséges megoldás*. 44. Membrán-Transzport Konferencia, 2014, Sümeg

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások

1. Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Tudományos Diákköri Konferencia, 2010, Pécs
2. Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Tudományos Diákköri Konferencia, 2010, Pécs
3. Sipos K., Poór V. S., **Rácz E.**, Porpáczy Z., Huszár A.: *Molekuláris biológiai módszer vízbefulladás bizonyítására*. Magyar Igazságügyi Orvosok Társaságának XIV. Konferenciája, 2010, Kecskemét
4. Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Tudományos Diákköri Konferencia, 2011, Pécs
5. Pécsi Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Tudományos Diákköri Konferencia, 2012, Pécs
6. **Rácz E.**, Könczöl, F., Mészáros, H., Kozma, Zs., Tóth, D., Simon, G., Sipos, K.: *Drowning-related fatalities during a 5-year period (2008–2012) in South-West Hungary*. 7th International Student Medical Congress, 2015, Košice, Szlovákia
7. Tóth D. (társszerző: **Rácz E.**): *A vízbefulladás bizonyítása molekuláris biológiai módszerekkel* MIOT Konferencia, 2015, Debrecen
8. Poór V. S., **Rácz E.**, Simon G., Heckmann V., Sipos K., Kozma Zs.: *Vízbefulladás? - Új diagnosztikai módszerek bemutatása egy eseten keresztül*. Magyar Igazságügyi Orvosok Társasága (MIOT) kazuisztikai tudományos nap, 2016, Budapest