

Západočeská univerzita v Plzni

Fakulta filozofická

Diplomová práce

**Druhové a individuální rozlišení spálených a
nеспálených kostí pomocí aplikace rentgenové
fluorescence (XRF)**

Nikola Vodičková

Plzeň 2017

Západočeská univerzita v Plzni

Fakulta filozofická

Katedra antropologie

Studijní program Antropologie

Studijní obor Antropologie populací minulosti

Diplomová práce

**Druhové a individuální rozlišení spálených a
nеспálených kostí pomocí aplikace rentgenové
fluorescence (XRF)**

Nikola Vodičková

Vedoucí práce:

Mgr. Anna Pankowská, PhD.

Katedra antropologie

Fakulta filozofická Západočeské univerzity v Plzni

Plzeň 2017

Prohlašuji, že jsem práci zpracoval(a) samostatně a použil(a) jen uvedené prameny a literatury.

Plzeň, duben 2017

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Anně Pankowské, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích a vedení této práce. Chtěla bych také poděkovat Mgr. Lukáši Šínovi, Ph.D., Mgr. Arkadiuszovi Tajerovi a Mgr. Tomáši Jelínkovi za poskytnutí zvířecího a lidského kosterního materiálu. Pracovníkům z katedry geologie Univerzity Palackého v Olomouci a Lucii Formánkové za změření kosterního materiálu pomocí pXRF. Dále děkuji Davidu Riegrovi z NTC v Plzni za pomoc s vysvětlením principu XRF a ukázkou přístroje. A v neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Patriku Galetovi, Ph.D. za pomoc při konzultaci statistické části mé práce.

Obsah

1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE	3
3 TEORETICKÁ VÝCHODISKA	4
3.1 Metody rozlišení kostí na druhové a individuální úrovni	4
3.1.1 Makroskopické metody	4
3.1.2 Histomorfometrické metody	4
3.1.3 Molekulárně biologické metody	5
3.1.3.1 Imunochemické metody	5
3.1.3.2 Analýza DNA	6
3.1.4 Rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF)	6
3.2 Stavba kostní tkáně	9
3.2.1 Rozdíly ve stavbě lidské a zvířecí kostní tkáně	11
3.2.2 Stavba spálené kostní tkáně	13
3.3 Chemismus osteologického materiálu	14
3.3.1 Základní stavební prvky osteologického materiálu	15
3.3.2 Vliv stravování na chemismus osteologického materiálu ...	18
3.3.3 Vliv absorpce prvků na chemismus osteologického materiálu	
20	
3.3.4 Vliv prostředí na chemismus osteologického materiálu	22
3.3.5 Vliv typu kosti na chemismus osteologického materiálu	24
3.2.3 Diagenese z hlediska chemické změny osteologického	
materiálu	25
3.2.4 Působení ohně na chemismus osteologického materiálu ..	28
4 MATERIÁL	30
4.1 Lidské ostatky	30

4.2 Zvířecí ostatky	33
4.3 Spálené ostatky.....	34
5 METODY	35
5.1 Příprava materiálu.....	35
5.2 Pálení kostí	38
5.3 Měření pomocí pXRF	40
5.4 Statistické metody	41
5.4.1 Chyba měření	41
5.4.2 Lineární diskriminační analýza	42
5.4.3 Použitý software	44
6 VÝSLEDKY	44
6.1 Chyba měření	44
6.2 Splnění podmínek pro lineární diskriminační analýzu	46
6.3 Rozlišení na druhové úrovni	46
6.4 Rozlišení na individuální úrovni	49
6.5 Rozlišení podle typu kosti.....	52
6.6 Rozlišení podle lokality	53
6.7 Rozlišení spálených ostatků	55
7 DISKUZE	59
8 ZÁVĚR	63
9 SEZNAM LITERATURY	65

10 RESUMÉ	77
11 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK	79
12 PŘÍLOHY	82

1 ÚVOD

Rozlišení fragmentů kostí na druhové a individuální úrovni není snadným úkolem (Adams and Byrd, 2014). Přitom nutnost rozlišení druhů a jedinců je základním požadavkem nejen ve forenzní antropologii, kde se setkáváme se smíšenými kostmi při masových katastrofách (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Zimmerman et al., 2015b), ale také ve funerální archeologii, kde jsou pohřby často reprezentovány shlukem sekundárně uložených kostí (Duday et al., 2009; Knüsel and Robb, 2016).

Ještě složitějším úkolem je pak rozlišení fragmentů spálených kostí, které se nachází jak ve forenzním, tak v archeologickém kontextu. Mnohdy je jejich rozlišení pomocí makroskopických i mikroskopických metod neproveditelné, jelikož při vystavení žáru dochází ke změně tvaru a velikosti celé kosti a na histologické úrovni dochází ke změně lamelární struktury kompaktní kosti (Absolonová, 2012; Absolonová et al., 2012; Christensen et al., 2012; Ellingham et al., 2015; Zimmerman et al., 2015b).

Vedle makroskopických a mikroskopických metod se k druhovému a individuálnímu rozlišení kostí využívají molekulárně biologické metody mezi které patří imunochemické metody, založené na detekci antigen-protilátka (Ubelaker et al., 2004; Lowenstein et al., 2006) a analýza DNA (Bataille et al., 1999; Imaizumi et al., 2002). Obě metody jsou však časově i finančně náročné a nevýhodou je destrukce vzorku (Urbanová and Novotný, 2005; Zimmerman et al., 2015b). Možným řešením jak zamezit destrukci vzorku a vysokým nákladům za analýzu je aplikace elektromagnetické spektroskopické metody rentgenové fluorescence (XRF) nebo její ruční verze (pXRF), pomocí které je možné druhově odlišit izolované kosti, a dokonce odlišit jedince jednoho druhu mezi sebou (Christensen et al., 2012; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Perrone et al., 2014). Tato metoda je založena na předpokladu, že každý jedinec má unikátní prvkové složení kostí odrážející prostředí, ve kterém žil, potrava, kterou konzumoval a individuální metabolismus, který spočívá

v jedinečné absorpci minerálů každého jedince (Darrah, 2009). Významný vliv mají i diagenetické procesy. Kostra uložená v zemi se stává součástí chemického prostředí půdy, kde dochází k intenzivnímu promíšení minerálů. Minerály jsou z kostí buď vyplavovány, nebo jsou naopak o některé minerály obohacovány. Důvodem pro akumulaci a promíšení specifických minerálů v půdě, je jejich rozličná rozpustnost, porozita kostí, stupeň krystalizace kostního minerálu, mikrobiální aktivita a vlastnosti půdy (Prokeš, 2007). Výhodou této metody je nedestruktivnost, aplikovatelnost, rychlost a také nízké náklady na provedení (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Zimmerman et al., 2015a).

Metoda rentgenové fluorescence XRF či pXRF byla aplikována v řadě výzkumů, ve kterých šlo především o rozlišení lidského a zvířecího osteologického materiálu, jiného biologického materiálu (škeble, slonovina atp.), nebiologického materiálu (sklo, kámen atp.) a tafonomicky alterovaného materiálu (Christensen et al., 2012; Zimmerman et al., 2015a; b). Ale až Gonzalez-Rodriguez and Fowler (2013) a Perrone et al. (2014) ve svých studiích aplikovali metodu XRF pouze na lidský osteologický materiál a zkoumali její potenciál pro rozlišení koster na individuální úrovni.

Ve své diplomové práci navazuji na tyto studie (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Perrone et al., 2014) a pokusím se jednak o individuální rozlišení lidských kostí a nově také o rozlišení spálených kostí.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce je druhové a individuální rozlišení koster z archeologických lokalit pomocí příruční rentgenové fluorescenční spektrometrie pXRF. Nejprve se pokusím rozlišit fragmenty kostí na úrovni druhu (tur domácí, prase domácí, kůň domácí a člověk), poté na úrovni lidských jedinců, a nakonec mne bude zajímat, zda budou druhy i jedinci rozlišitelní i po spálení. Dále mne bude zajímat, jaká je diskriminační síla jednotlivých prvků a jakou roli může hrát typ kostí a lokalita, ze které kostry pocházejí.

3 TEORETICKÁ VÝCHODISKA

3.1 Metody rozlišení kostí na druhové a individuální úrovni

3.1.1 Makroskopické metody

Pokud jsou ostatky dobře zachovány, mohou být k druhovému rozlišení použity makroskopické metody. Jedná se o komparativní metody, které jsou založeny na anatomicky charakteristických znacích, jako je velikost kosti, její tvar nebo tvar kloubního spojení. Můžeme také využít srovnání nálezu s osteologickým materiálem, u něhož známe taxonomické zařazení. Avšak mnoho druhů sdílí podobné morfologické struktury, a to společně s častou fragmentárností kostí či v případě, že se jedná o spálené kosti nebo kosti nedospělého jedince, vede k nespolehlivému odhadu (Urbanová and Novotný, 2005; Dobisíkoví and Eliášová, 2012).

3.1.2 Histomorfometrické metody

Histomorfometrické metody jsou založeny na odlišné struktuře Haversova systému mezi druhy. Měřeny jsou sekundární osteony a Haversovy kanálky (počet sekundárních osteonů na ploše 1mm², průměr osteonu, průměr Haversova kanálku, plocha Haversova kanálku atd.) Za obecně přijímaný fakt se považuje, že plexiformní kost je pokládána za zvířecí, či že Haversovy kanálky s průměrem menším než 50 μm jsou též zvířecího původu (Cattaneo et al., 1999; Urbanová and Novotný, 2005). Rozlišení by však se mělo zakládat na měřeních více parametrů, které ve své práci podrobně rozebírá Urbanová a Novotný (2005).

Histomorfometrické metody mohou být použity i k rozlišení spálených kostí na druhové úrovni (Cattaneo et al., 1999). Takovéto využití je však obtížné, jelikož při vystavení kosti žehu, dochází k deformaci tkáně, změně struktury kostního minerálu a Haversův systém může zcela zmizet (Castillo et al., 2013).

3.1.3 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody pracují nejen s biologií, ale především s biochemií a genetikou buňky. Metody jsou založeny na možnosti rozlišení pomocí proteinů, imunochemické metody, nebo pomocí analýzy DNA (Bataille et al., 1999; Cattaneo et al., 1999; Cuijpers, 2009). Molekulárně biologické metody jsou prováděny pomocí fyzikálních a chemických separačních a charakterizačních metod jako je chromatografie, elektroforéza nebo spektroskopie (Buckley, 2016; Ferraro et al., 2017).

Pro využití molekulárně biologických metod je důležité, aby byla zachována informace v podobě proteinu nebo DNA v osteologickém materiálu, jejich zachování však není při vystavení žáru pravděpodobné a mělo by se přistoupit k jiným metodám (Cuijpers, 2009).

3.1.3.1 Imunochemické metody

Rozlišení na druhové úrovni je možné pomocí imunochemických metod. Ty jsou založeny na imunologické reakci diagnostika s neznámým proteinem (Cattaneo et al., 1999; Eliášová and Šuláková, 2012). Rozlišení je možné na několika úrovních, na úrovni celé skupiny zvířat (drůbež), na úrovni přibližné příslušnosti do skupiny (muflon – ovce – koza) nebo na „individuální“ úrovni (pes) (Eliášová and Šuláková, 2012). Pro rozlišení se využívá nejčastěji kolagen a albumin (Ubelaker et al., 2004; Lowenstein et al., 2006; Cuijpers, 2009).

Imunochemická metoda byla aplikována i na materiál starý 1,9 milionu let. Ten byl správně zařazen jako lidský vzorek, avšak nacházel se na limitní hranici zařazení, právě kvůli svému stáří (Ubelaker et al., 2004).

Imunochemické metody mohou být použity i pokud chceme rozlišit spálený osteologický materiál na druhové úrovni. Albumin se v kosti zachovává při vystavení teplotě 300°C po dobu deseti minut (Cattaneo et al., 1994), při vystavení vyšším teplotám se však vytrácí, a právě vyšší

teploty jsou při pálení ostatků běžné (Lanting et al., 2001; Thompson, 2004).

3.1.3.2 Analýza DNA

Další možností rozlišení na druhové a také individuální úrovni, je analýza DNA. DNA je nositelem genetické informace a je obsažena v každé buňce. Využita může být DNA nalezená v jádře buňky (nDNA) nebo například DNA v mitochondriích (mtDNA) (Imaizumi et al., 2002; Cuijpers, 2009). Pokud není k dispozici nDNA je využita mtDNA, která se ve vzorku lépe zachovává (Bataille et al., 1999; Buckley et al., 2008).

Analýza DNA je relativně snadno aplikovatelná v kontextu forenzních případů, avšak horší aplikovatelnost nastává v případě ostatků archeologického původu, které obsahují pouze malé množství DNA a někdy dokonce žádné. Problém obsahu DNA v archeologických ostatcích, byl vyřešen, pokud se nalezne alespoň malé množství DNA, s vyvinutím polymerázové řetězové reakce (PCR) (Cuijpers, 2009). PCR slouží ke zmnožení úseků DNA, které pak mohou být sekvenovány a analyzovány (Bataille et al., 1999; Cuijpers, 2009).

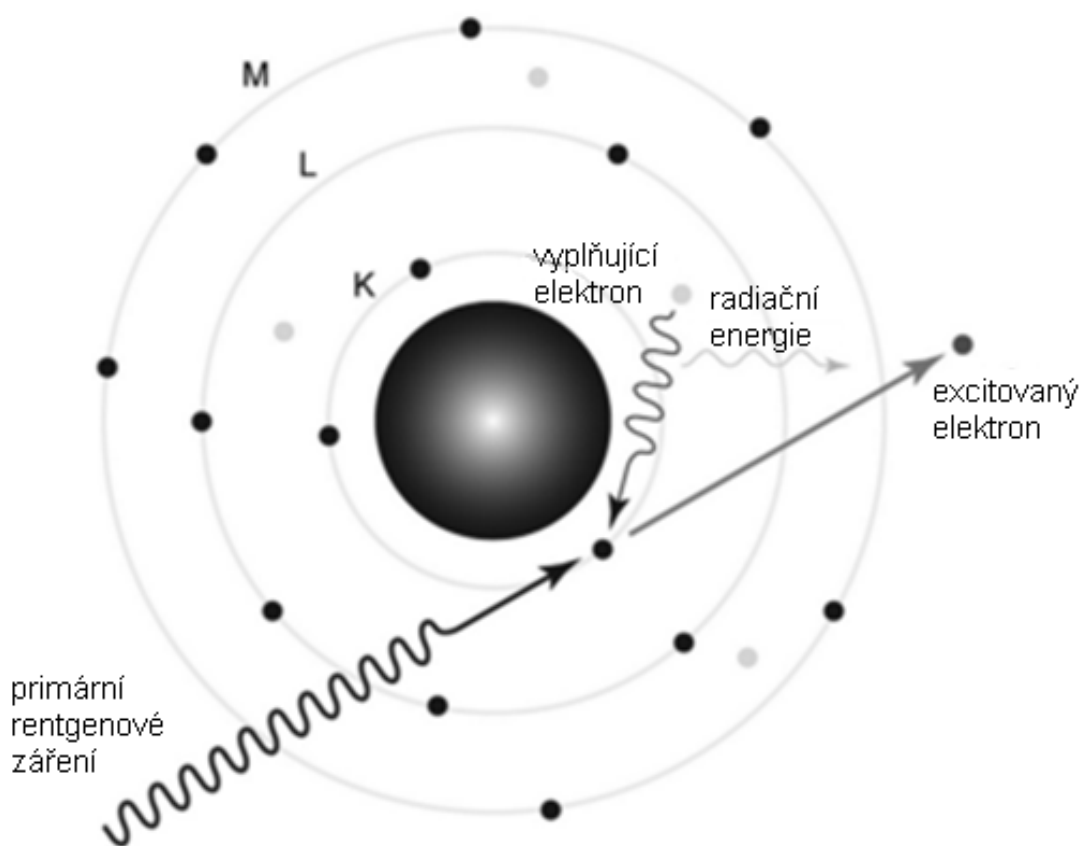
Problematika využití DNA k druhové a individuální identifikaci, spočívá v její nestabilitě a citlivosti na kontaminaci (Cuijpers, 2009; Benoit et al., 2013). Dále pak se při vystavení osteologického materiálu teplotám vyšším jak 170°C, se neočekává, že by se DNA zachovala (Cuijpers 2009).

3.1.4 Rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF)

Relativně novou metodou, alespoň v oblasti antropologie, pro druhové a individuální rozlišení osteologického materiálu, je využití elektromagnetické spektroskopické metody XRF. Pomocí té je možné nejen druhové rozlišení, ale dokonce i rozlišení jedinců jednoho druhu mezi sebou (Christensen et al., 2012; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Perrone et al., 2014). XRF je hojně využíváno také v oblasti geologie,

archeologie, umění nebo historie (Janssens et al., 2000; Rammlmair et al., 2007).

Metoda XRF je metodou chemické analýzy za pomoci rentgenového záření. Povrch vzorku je bombardován primárním rentgenovým zářením, což vede k excitaci elektronu a dochází k ionizaci atomu. Elektrony, které se nacházejí na vzdálenějších slupkách od jádra, se snaží přemístit na místo excitovaného elektronu, a tím dochází k uvolňování fotonů (Obrázek 3.1).



Obrázek 3.1. Vyražení elektronu pomocí primárního rentgenového záření [přepřacováno z (Perrone et al., 2014, p 146)].

Energie, v podobě sekundárního rentgenového záření, kterou vyšlou, je zachycena rentgenovým spektroskopem a kvantifikována. Následně dochází k porovnání se známými energiemi vyražených elektronů jednotlivých prvků, což je založeno na tom, že atomy s odlišnými protonovými čísly mají odlišné energie rentgenového záření, a poté je stanovena jejich jednotlivá koncentrace (Shackley, 2011; Perrone et al., 2014). Pomocí XRF je možné detekovat prvky od beryllia ($Z=4$) po uran ($Z=92$) (Rouessac and Rouessac, 2007). Rozsah detekovaných prvků je dán módem měření a nastavením přístroje (Nechvátal, 2017). Problematické může být měření lehkých prvků, jelikož s klesajícím protonovým číslem prvku klesá i jeho detekovatelnost [např. sodík (Na, $Z=11$)]. Sekundární rentgenové záření těchto prvků je pohlcováno přítomností vzduchu, a tedy jejich skutečná hodnota je špatně zachytitelná. Tomu se můžeme vyhnout pokud bude materiál měřen v prostředí kde je vakuum (Pollard et al., 2007; Christensen et al., 2012).

Metoda využití XRF k druhovému a také individuálnímu rozlišení osteologického materiálu je založena na hypotéze, že v každé kosti se odráží jedinečné prvkové složení kostí jedince (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Perrone et al., 2014). Odráží se v něm předsmrtné, ale i posmrtné procesy. Předsmrtné procesy představují prostředí, ve kterém jedinec žil, potravu, kterou konzumoval, a metabolické procesy, které spočívají v individuální schopnosti a variabilitě absorpce minerálů. (Prokeš, 2007; Darrah, 2009; López-Costas et al., 2016). Posmrtné procesy pak představují například obohacení kostí o fosfor (P) a olovo (Pb), které jsou obsaženy v podzemní vodě nebo železo (Fe), mangan (Mn) a měď (Cu) z prostředí ve kterém byly ostatky pohřbeny (Prokeš, 2007; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013).

Výhody této metody spočívají v její nedestruktivnosti, snadné aplikovatelnosti, rychlosti provedení analýzy a také v nízkých nákladech na její provedení. Vzhledem k existenci ručních verzí XRF spektrometrů je rovněž nespornou výhodou možnost použití této metody přímo v terénu (Shackley, 2011; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013). Pomocí této

metody se u spálených kostí zatím odlišuje pouze kost od jiného materiálu (Christensen et al., 2012).

3.2 Stavba kostní tkáně

Kost je orgán, který se skládá z pojivových tkání, kostní dřeně a který je bohatě inervován a cévně zásoben. Kostní tkáň je jedním ze tří hlavních typů pojiv. Pojiva se vyznačují tím, že se skládají z buněk a mezibuněčné hmoty, a to v různých poměrech těchto dvou složek. Kostní tkáň tvoří kostní buňky a kostní matrix. Kostní buňky jsou zastoupeny osteoblasty, které zodpovídají za vznik kostní matrix, respektive její organické složky. Ovlivňují také ukládání anorganické složky kostní matrix. Časem se osteoblasty zcela obklopí kostní matrix a stanou se z nich osteocyty. Osteocyty se nachází v lakunách, místech mezi lamelami kostní matrix. Podílí se na uvolňování minerálů, a tedy i na regulaci hladiny vápníku v tělních tekutinách. Pokud je potřeba, dokáží se změnit zpět na osteoblasty. Poslední typ kostních buněk pak představují osteoklasty, které mají opačnou funkci než osteoblasty. Jedná se o pohyblivé buňky, které prostřednictvím enzymů odbourávají kostní matrix (Komárek and Červený, 1999; Čihák, 2011; Lüllmann-Rauch, 2012).

Kostní matrix je vytvářena osteoblasty a tvoří ji organická a anorganická složka a v neposlední řadě také voda. Organická složka zajišťuje elasticitu kosti. Skládá se z vláken kolagenu I. typu (90–95%) a amorfní složky tvořené glykosaminoglykany, glykoproteiny a tuky. Anorganická složka je zodpovědná za pevnost a tvrdost kosti. Tvoří ji fosforečnan vápenatý ve formě krystalů hydroxyapatitu $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ a nekystalické formy fosforu a vápníku. Funkcí anorganické složky kostní matrix je ukládání a uvolňování minerálů (Čihák, 2011; Absolonová, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012).

Kostní tkáň se v těle vyskytuje ve dvou formách, primární (vláknitá) kostní tkáň a sekundární (lamelární) kostní tkáň. Vláknitá kostní tkáň je prvním typem kostní tkáně, která se v těle vytváří. Vzniká během embryonálního vývoje jedince. Vyznačuje se nepravidelně a náhodně

rozloženými kolagenními vlákny, chybí v ní Haversův systém. Během vývoje jedince je postupně nahrazena lamelární kostní tkání, tento proces začíná ještě před narozením jedince (Komárek and Červený, 1999; Čihák, 2011; Lüllmann-Rauch, 2012).

Lamelární kostní tkáň je organizovaná ve formě sekundárních osteonů (Haversových systémů). Haversův systém tvoří kostní matrix uspořádaná do koncentrických lamel (4–20 lamel). Haversovy lamely se organizují okolo Haversova kanálku, kterým vedou krevní cévy, lymfatické cévy a nervová vlákna, mezi nimiž jsou v lakunách usazeny osteocyty. Lamely jsou mezi sebou propojeny kolagenními vlákny, Haversovy systémy pak propojují Volkmanovy kanálky. Lamely se v kostní tkáni mohou vyskytovat ještě ve dvou dalších formách. Jedná se jednak o intersticiální (vmezeřené) lamely, které jsou zbytky po rozložených Haversových lamelách, kolem nichž se vytvořily nové sekundární osteony a dále pak o povrchové (plášťové) lamely, které tvoří plášť kosti pod endostem a periostem (Čihák, 2011; Absolonová, 2012; Lüllmann-Rauch, 2012).

Lamelární kostní tkáň se v těle vyskytuje ve dvou formách: kompaktní kostní tkáň (*substantia compacta*) a spongiózní kostní tkáň (*substantia spongiosa*). Tyto formy jsou pozorovatelné na makroskopické úrovni. Spongiózu tvoří lamelární trámečky, které vytvářejí prostorovou síť uvnitř kosti. Tato síť je vyplněna kostní dřeví. Spongiózní kostní tkáň může být nepravidelně houbovitá nebo může být uspořádána do směrů, které odrážejí zátěž a tlak vyvíjený na kost. V těle se nachází ve vnitřních částech epifýz, vnitřních částech krátkých kostí a v prostřední části diáfýz (Komárek and Červený, 1999; Čihák, 2011; Lüllmann-Rauch, 2012).

Kompaktní kostní tkáň je funkční a strukturální jednotka kosti, která tvoří její povrch. Skládá se z charakteristicky uspořádaných lamel ve trojí formě, Haversovy lamely, intersticiální lamely a povrchové lamely. Kompaktní kostní tkáň tvoří souvislý materiál, z něhož jsou diafýzy

dlouhých kostí, povrch epifýz, povrch krátkých kostí a vnitřní a vnější plochy diploe (Čihák, 2011; Lüllmann-Rauch, 2012).

Vnitřní a vnější povrchy kosti pokrývají osteogenní buňky a vazivo, endost a periost. Endost a periost vyživují kostní tkáň a jsou zodpovědné za remodelaci a tvorbu kostní tkáně (Komárek and Červený, 1999; Čihák, 2011).

3.2.1 Rozdíly ve stavbě lidské a zvířecí kostní tkáně

Stavební prvky lidské a zvířecí kostní tkáně jsou identické (Komárek and Červený, 1999; Martiniaková et al., 2006; Čihák, 2011). Nicméně se lidské a zvířecí kostní tkáně liší v uspořádání osteonů (Cuijpers, 2006; Cattaneo and Porta, 2009), v rozměrech Haversových systémů (Urbanová and Novotný, 2005; Hillier and Bell, 2007) nebo také například cirkularitě osteonů (Crescimanno and Stout, 2012; Dominguez and Crowder, 2012). Pokud mluvíme o zvířecí kostní tkáni máme na mysli kostní tkáň savců. Rozlišení lidských kostí od kostí plazů nebo ptáků nepředstavuje ve většině případů problém (Quekett, 1849).

Nejčastěji zmiňovaný rozdíl pro odlišení lidské a zvířecí kosti je přítomnost plexiformní kostní tkáně u zvířat. Osteony jsou v ní srovnány v řadě a vytvářejí strukturu připomínající cihlovou zeď. V lidských kostech jsou osteony rozprostřeny rovnoměrně v kompaktní kostní tkáni a prostor mezi nimi je vyplněn lamelami. Osteony v lidské kostní tkáni se také více překrývají. Plexiformní kostní tkáň se vyskytuje u velkých a středních zvířat. Nenajdeme ji u malých zvířat a člověka, až na výjimku kdy plexiformní kostní tkáň může být přítomna i v lidské kosti, v případě rychlého růstového spurtu jedince (Zoetis et al., 2003; Martiniaková et al., 2006). Podoba plexiformní kostní tkáně se může lišit mezi jednotlivými druhy zvířat a také v typech kosti jedince (Martiniaková et al., 2006; Cattaneo and Porta, 2009; Meizel-Lambert, 2014). Dříve byla přítomnost plexiformní kostní tkáně, považována za jasný důkaz, že se jedná o kost zvířecí. Avšak jako již bylo zmíněno může se vyskytovat i v lidské kostní tkáni (Meizel-Lambert, 2014).

Lidská a zvířecí kostní tkáň se liší také hustotou kostní tkáně. Zvířecí kostní tkáň je považována za více hustou a také méně porézní (Aerssens et al., 1998; Watson and McClelland, 2009). Aerssens a kolektiv (1998) připisují tuto rozdílnost vlivu bipedie, která se odráží v architektuře a mechanických vlastnostech kostí.

Odlišnosti lidské a zvířecí kostní tkáně byly objeveny pomocí měření histologických struktur (Urbanová and Novotný, 2005; Hillier and Bell, 2007). Lidská kompaktní kostní tkáň vykazuje vyšší naměřené hodnoty u měřených parametrů na Haversových kanálcích a osteonech (Urbanová and Novotný, 2005; Hillier and Bell, 2007). Urbanová a Novotný (2005) vytvořili histomorfometrickou metodu, pro odlišení živočišných druhů. Na základě diskriminační funkce odlišili čtyři druhy (člověk; tur domácí a kuň domácí; prase domácí a prase divoké nebo ovce domácí; pes domácí, jelen lesní a srnec obecný). Metoda spočívá v počtu osteonů na 1mm^2 , v maximálním průměru Haversova kanálku a v rozsahu plochy Haversova kanálku. Pokud k těmto proměnným přidáme i kortikální tloušťku a maximální průměr osteonu, je úspěšnost zařazení 100 %.

Avšak Hillier a Bell (2007) upozorňují také na podobnosti velikostí Haversových struktur u člověka, ostatních primátů, kozy domácí, ovce domácí, prasete domácího, krávy domácí, buvola indického a koně domácího. Poukazují na to, že struktura kompaktní kostní tkáně může být ovlivněna věkem a pohlavím jedince nebo patologií (Hillier and Bell, 2007; Crescimanno and Stout, 2012).

Crescimanno a Stout (2012) ve své studii představují způsob rozlišení lidské a zvířecí kosti podle cirkularity osteonů. Osteony jsou více kruhové u zvířecí kostní tkáně, a to v kostech, na které je vyvíjen tlak. Pomocí této metody se autorům podařilo dosáhnout správnosti zařazení 76,5 %. Pro forenzní případy je tak tato metoda nevhodná a její použití na archeologický osteologický materiál může být nahrazeno přesnějšími metodami. Vyšších výsledků dosáhli Dominguez a Crowder (2012), kteří k rozlišení lidské a zvířecí kostní tkáně využili cirkularitu

osteonů a hodnotu plochy osteonu, čímž dosáhli 98,4% úspěšnosti zařazení kosti. Zařazení kosti pouze podle cirkularity ostenu je však nespolehlivé (Cattaneo et al., 2009).

3.2.2 Stavba spálené kostní tkáně

Jedním typem změn, kterými kosti při vystavení žehu procházejí, jsou změny makroskopické. Při nich dochází ke změně velikosti, barvy a tvaru kosti. Další změny mohou být mikroskopické, které tvoří podstatu této podkapitoly. V neposlední řadě dochází i ke změnám chemickým, jimž se věnuji v jiné podkapitole (3.2.4 Působení ohně na chemismus osteologického materiálu) (Thompson, 2005; Absolonová et al., 2012; Ellingham et al., 2015).

Změnami histologických struktur kostní tkáně při vytavení kosti žehu bylo tématem již mnoha prací (Shipman et al., 1984; Nicholson, 1993; Hanson and Cain, 2007; Absolonová et al., 2012; Castillo et al., 2013). Histologické struktury kostní tkáně jsou ovlivněny žářem již při 100 °C, kdy se objevují mikrofraktury uvnitř kostní tkáně a může dojít i k deformaci Haversových kanálků. Většina struktur však zůstává nezměněna (Absolonová et al., 2012; Castillo et al., 2013). Při 300 °C dochází k formaci polyhydrátových krystalických formací. Tyto formace se zvětšují a jejich počet narůstá s teplotou mezi 600 °C a 800 °C (Nicholson, 1993; Castillo et al., 2013). Při této teplotě také dochází ke ztrátě laminárního vzhledu kostní tkáně a vytváří se krystalická struktura kostní tkáně (Castillo et al., 2013). S teplotami nad 900 °C histologické struktury mizí (Hanson and Cain, 2007; Castillo et al., 2013), Absolonová a kolektiv (2012) uvádějí, že ztráta histologických struktur nastává již při 800 °C. Struktura kostní tkáně se mění na granulární strukturu, což je pravděpodobně spojeno s rekrystalizací, která vede k roztržení Haversových kanálků (Castillo et al., 2013).

3.3 Chemismus osteologického materiálu

V těle se nachází cca 80 chemických prvků (Smrčka, 2005), z toho 26 z nich tvoří součást kostní tkáně (Brätter et al., 1977; Tortora and Derrickson, 2009). Prvky dělíme na makroelementy, mikroelementy a stopové prvky. Mezi makroelementy řadíme uhlík (C), vodík (H), kyslík (O) a dusík (N). Mezi mikroelementy patří vápník (Ca), fosfor (P), hořčík (Mg), sodík (Na), síru (S), draslík (K) a chlór (Cl) a železo (Fe). Ke stopovým prvkům pak řadíme, mangan (Mn), zinek (Zn), měď (Cu), molybden (Mo), kobalt (Co), selen (Se), jód (I), fluor (F), nikl (Ni), vanad (V), olovo (Pb), křemík (Si), cín (Sn) a chrom (Cr) (Brätter et al., 1977; Tortora and Derrickson, 2009). Množství stopových prvků se v kostní tkáni pohybuje mezi 10^{-6} – 10^{-9} mg.kg⁻¹ (Smrčka, 2005).

Hydroxyapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] je náchylný k iontovým substitucím (Wopenka and Pasteris, 2005). Mezi nejběžnější patří substituce iontů vápníku (Ca^{2+}) za baryum (Ba^{2+}), draslík (K^+), hořčík (Mg^{2+}), mangan (Mn^{2+}), měď (Cu), olovo (Pb^{2+}), sodík (Na^+), stroncium (Sr^{2+}), uran (U), zinek (Zn^{2+}) a železo (Fe^{2+}) (Hedges and Millard, 1995; Carvalho et al., 2004; Allmae et al., 2012; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Buddhachat et al., 2016). Fosfátová skupina (PO_4^{3-}) může být nahrazena tetraoxidemuhlíku (CO_4), citráty, organofosfáty, bisfosfonáty, pyrofosfáty a aminokyselinami. Hydroxid (OH^-) bývá nahrazen fluoridy (F^-) nebo chloridy (Cl⁻) (Wopenka and Pasteris, 2005; Bergslien et al., 2008).

Substituční procesy spolu s regulační a deponitní rolí kosti v udržování homeostázy těla, vedou k vytvoření sady prvků, které se v kostech vyskytují častěji než jiné (Brätter et al., 1977; Meizel-Lambert, 2014). Většina prvků může být vyloučena z kostního minerálu a přijata zpět na základě místa uložení, poměrů prvků a environmentálních podmínek (Bronner, 2008).

S těmito procesy a jejich vlivu na chemické složení kostí souvisí také potrava, kterou jedinec jedl, jeho metabolismus, prostředí ve kterém žil, ale také část kostry/kosti, věk, pohlaví a diagenetické faktory (Carvalho et al.,

2004; Smrčka, 2005; Prokeš, 2007; Allmae et al., 2012; Buddhachat et al., 2016).

Ke změně koncentrace prvků v kosti přispívají tři mechanismy. Prvním z nich je apoze, kdy je prvek zabudován do kosti během její tvorby. Druhý mechanismus představuje resorpce, odbourání, která je spjata s apoze a podílí se na remodelaci kosti. Poslední mechanismem, jak může být koncentrace prvků změněna, je výměna. Ta se skládá z povrchové výměny (rychlá výměna mezi krví a kostí) a difúze (pomalé pronikání prvků do kosti) (Marshall, 1969; Dahl et al., 2001).

3.3.1 Základní stavební prvky osteologického materiálu

Uhlík, vodík, kyslík a dusík představují základní stavební složku organismů, a tedy i kostí. Jsou nezbytné pro život (Murray, 2002; Smrčka, 2005; Jakob et al., 2010). Základními prvky kosti jsou vápník a fosfor, které jsou řízeny hormonálně (Ezzo, 1994; Takeda et al., 2012).

Vápník představuje hlavní a preferovanou komponentou kostního minerálu (Szostek et al., 2005; Ebeledike et al., 2010). Vápník je důležitý pro správný růst a vývoj kostí ale také přenos nervových vzruchů nebo činnosti svalů (Flynn, 2003) Pokud je vápníku ve stravě nedostatek, je z kosti odbouráván (Smrčka, 2005).

Fosfor hraje důležitou roli v mineralizaci kostní tkáně, v metabolismu těla a je součástí každé buňky (Darrah, 2009; Lamberg-Allardt et al., 2010). Nedostatek příjmu fosforu vede k omezení ukládání kostního minerálu (Tranquilli et al., 2014).

Dalšími prvky, které tvoří převážnou část kosti (Tortora and Derrickson, 2009) představují – hořčík, který má vliv na metabolismus a jeho nedostatek narušuje homeostázu vápníku. Snížená koncentrace hořčíku v kosti může souviset s menopauzou (Martini, 1999; Rude and Shils, 2006). Síra, která se v těle vyskytuje ve formě aminokyselin cysteinu a methioninu (Smrčka, 2005). Ty jsou důležité pro syntézu proteinů a také

pro správný růst organismu (Nimni et al., 2007). Draslík a sodík, které zodpovídají za udržování membránového potenciálu (Smrčka, 2005; Lim and Dudev, 2016). Chlór, který hraje důležitou roli v udržování homeostázy živočichů a společně se sodíkem se podílí na udržování extracelulární tekutiny (Smrčka, 2005). A také železo, které se spoluúčastní syntézy kostní tkáně a skrz vitamín D podporuje absorpci vápníku (Zofková et al., 2013).

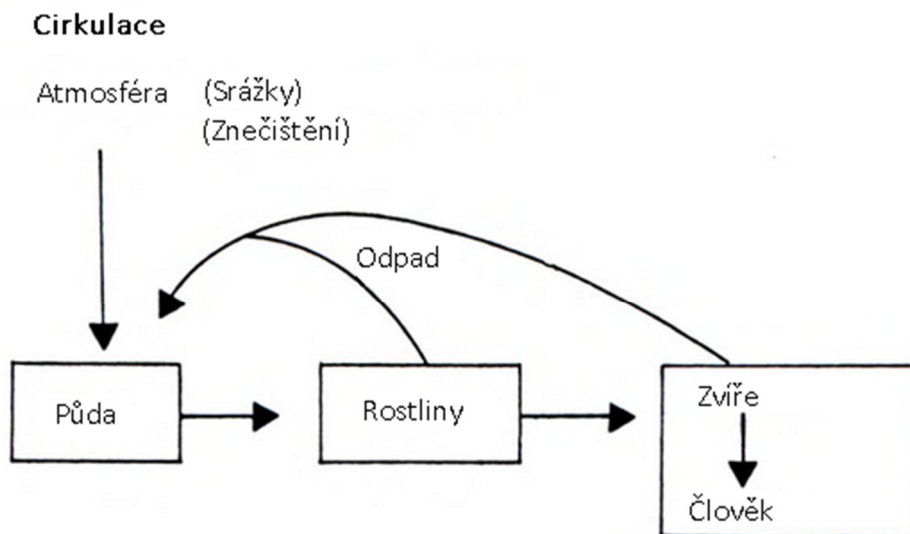
Následující prvky (Tabulka 3.1) tvoří nedílnou součást kostí, avšak jejich výskyt v kostech je omezen pouze na malé množství (Smrčka, 2005; Tortora and Derrickson, 2009).

Tabulka 3.1. Přehled stopových prvků v kostní tkáni.

Prvek	Funkce	Zdroj
Cín (Sn)	Pravděpodobně má vliv na metabolismus, vliv na vývoj a udržování kostí není zcela známa.	(Stegman and Davis, 2014)
Fluor (F)	Má vliv na hustotu kostní tkáně a podílí se na aktivaci osteoblastů.	(Mehri and Marjan, 2013; Zofková et al., 2013)
Chrom (Cr)	Má vliv na optimální využití glukózy.	(Bronner, 2008)
Jód (I)	Je hlavní složkou hormonů štítné žlázy a plní důležitou roli při růstu a vývoji jedince.	(World Health Organization, 1996; Jakob et al., 2010)
Kobalt (Co)	Je hlavní komponentou vitamínu B, má vliv na homeostázu vápníku a proliferaci osteoblastů.	(Dermience et al., 2015)
Křemík (Si)	Má vliv na správný růst a vývoj jedince.	(World Health Organization, 1996)
Mangan (Mn)	Stimuluje syntézu a kalcifikaci kostní tkáně a je součástí enzymů.	(World Health Organization, 1996; Zofková et al., 2013)
Měď (Cu)	Tvoří součást metabolických procesů a enzymů. Má vliv na udržení optimálního stavu kostní tkáně.	(World Health Organization, 1996; Zofková et al., 2013)
Molybden (Mo)	Má vliv na syntézu proteinů, růst a metabolismus.	(Mehri and Marjan, 2013)
Nikl (Ni)	Pravděpodobně má roli v metabolismu a je považován za toxický.	(Lemos et al., 2007; Táborská et al., 2010; Mehri and Marjan, 2013)
Olovo (Pb)	Řadí se mezi toxické prvky.	(Dermience et al., 2015)
Selen (Se)	Tvoří součást enzymů a je nezbytný pro funkci mnoha buněk. Při vysoké koncentraci je toxický.	(World Health Organization, 1996; Mehri and Marjan, 2013)
Vanad (V)	Povzbuzuje diferenciaci osteoblastů.	(Jakob et al., 2010)
Zinek (Zn)	Je součástí enzymů aktivujících DNA a RNA, zvyšuje aktivitu osteoblastů a zabraňuje resorpci kosti osteoklasty.	(World Health Organization, 1996; Zofková et al., 2013)

3.3.2 Vliv stravování na chemismus osteologického materiálu

V chemickém složení kosti se odráží řetězec atmosféra-půda-rostliny-živočichové (Obrázek 3.2). Tento řetězec představuje cestu prvků z půdy do rostlin (Låg, 1990), které jsou potravou živočichů, kteří pak mohou být potravou pro jiné živočichy (Smrčka, 2005). Teplota, srážky a vítr mají významný vliv na složení půdy. Chemické složení půdy je ovlivněno klimatem a také vzdáleností od oceánu. Tento jev je pozorovatelný například u koncentrace sodíku a hořčíku ve vztahu ke koncentraci vápníku v půdě. Koncentrace sodíku a hořčíku v půdě klesá směrem od oceánu do vnitrozemí. Stejný trend můžeme pozorovat u chloru, bromu (Br) a jódu. Větší inkorporace prvků do rostlinného organismu však vychází z příjmu z vody (Låg, 1990).



Obrázek 3.2. Cirkulace prvků [přepřacováno z (Låg, 1990, p 8)].

Živočichové inkorporují z vody do těla pouze malé množství prvků (Smrčka, 2005). Smrčka (2005) zmiňuje příklad vlivu tvrdé a měkké vody na koncentraci boru (B) v kostním minerálu. Vyšší koncentrace ($10,2 \pm 5 \mu\text{g/g}$) boru souvisí s pitím tvrdé vody. Koncentrace boru v kostním minerálu při pití měkké vody je $6,2 \pm 2 \mu\text{g/g}$. Výjimku tvoří fluor, kdy až 50 %

potřebného množství může být získáno z vody (Smrčka, 2005). Dalším příkladem příjmu prvků z pitných vodních zdrojů je olovo nebo měď (World Health Organization, 1996; Smrčka, 2005; Meizel-Lambert, 2014).

Vyšší koncentrace vanadu, mědi a zinku jsou spojeny s konzumací masa. Zinek je pak obsažen především v masité stravě, výjimku tvoří ořechy. Měď je získávána z jater, červeného masa, rybího masa, fazolí nebo hrášku. Býložravci budou mít naopak vyšší koncentraci manganu, barya a stroncia. Vyšší koncentrace manganu vychází z preference rostlinné stravy, v živočišných produktech se téměř nevyskytuje. Stejně tak vyšší koncentrace stroncia odkazuje na preferenci rostlinné stravy. Stroncium je obsaženo v zelené zelenině, okopaninách, fazolích nebo hrášku (Allmae et al., 2012). Avšak vyšší koncentrace stroncia je také spojena s potravinami z mořského prostředí, za čímž stojí vysoká koncentrace stroncia v moři (Connor and Slaughter, 1984; Allmae et al., 2012). Vyšší koncentrace stroncia tak je vyšší například u Inuitů, přestože jejich strava je především živočišného původu (Connor and Slaughter, 1984).

Stroncium může nahrazovat vápník v kostním minerálu a poměr Sr/Ca tak pomáhá zjistit, jakou stravu jedinec konzumoval (Szostek et al., 2005; Allmae et al., 2012; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013). K tomuto účelu může sloužit i koncentrace barya v kosti. Baryum je obsaženo v obilovinách, bramborách nebo mléku a je méně ovlivněno diagenézí než stroncium (Allmäe et al., 2012). Tyto odlišnosti ve stravování tak mohou poskytnout informace, které mohou mít vliv na individuální rozlišení mezi jedinci (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013)

Odlišné koncentrace zinku a poměr Zn/Ca v lidské a zvířecí kosti odkazují k trofické úrovni jedince, tedy diferenci ve formě stravování (Szostek et al. 2005). Darrah (2009) poukazuje na vyšší poměry Sr/Ca a Ba/Ca u kostí turu. Není však jasné, zda je to způsobeno jejich stravováním nebo je to výsledkem metabolických procesů. Toto očividně ukazuje na existující rozdíly v prvkovém složení kostí mezi druhy na různých úrovních

potravinového řetězce. Také zmiňuje vyšší koncentraci barya v kostech turu (234,23 ppm \pm 5%), na rozdíl od člověka (0,55 až 14,78 ppm \pm 5%) (Darrah, 2009).

Stravovací a metabolické rozdíly mezi lidmi a turem vedou také k rozdílům v koncentraci mikroelementů v jejich kostech. Jedná se například o stroncium, baryum, europium (Eu), terbium (Tb) nebo lanthan (La), kdy poslední tři představují prvky vzácných zemin (Darrah, 2009).

Existují předpoklady, že potraviny v současné době běžně dostupné v USA a dalších průmyslových zemích, povedou k homogenizaci koncentrace stopových prvků v různých populacích. Avšak recentní studie ukazují, že tomu tak není. Regionální geologické podmínky stále hrají významnou roli v koncentraci stopových prvků jedinců žijících v industriálních oblastech, venkovských oblastech nebo neindustriálních oblastech (Bergslien et al., 2008).

3.3.3 Vliv absorpce prvků na chemismus osteologického materiálu

Absorpce je „proniknutí prvku nebo jeho součástí do organismu skrz membrány“ (Smrčka, 2005, p 39) orgánů trávicí a dýchací soustavy. Absorpce se společně s vylučováním prvků podílí na udržování homeostázy (metabolického equilibria) (Windisch, 2002).

Absorpce vápníku, stejně jako ostatních základních prvků, je ovlivněna biologickým systémem, ve kterém se odráží rovnováha mezi koncentrací vápníku v krvi a extracelulárními tekutinami. Pokud je příjem vápníku okolo 1000 mg/den jeho absorpce se snižuje, naopak při stravování, které má nízkou koncentraci vápníku (100–200 mg/den) se absorpce zvyšuje (Ezzo, 1994).

Některé prvky jsou v těle upřednostňovány. Například vápník před stronciem a stroncium před baryem (Darrah, 2009). Tyto prvky jsou do

kostního minerálu přijaty, pokud se ve stravě vyskytují ve vysoké koncentraci (Szostek et al., 2005).

Příjem prvků se vzájemně ovlivňuje. Vysoký příjem molybdenu vede ke snížení koncentrace mědi (Mehri and Marjan, 2013). Zvýšený příjem draslíku zabraňuje vylučování vápníku a tedy demineralizaci kosti (He and MacGregor, 2001; Macdonald, 2007).

Z práce Toma Darrah (2009) vyplývá, že mezi prvky regulované metabolismem patří zinek, železo, titan (Ti), stroncium. Naopak mangan, hliník, olovo a vanad nejsou metabolicky regulovány. Prvky, které nejsou regulovány metabolickými procesy, tak mohou být spojeny s geografickým regionem nebo vysokou koncentrací ve stravě (Darrah, 2009). Přehled prvků a vliv metabolismu na ně je zobrazen v tabulce (Tabulka 3.2). Existuje také mnoho prvků, u kterých je vliv metabolismu na jejich koncentraci neznámý.

Tabulka 3.2. Vliv metabolismu na prvky (Darrah, 2009; Táborská et al., 2010; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Stegman and Davis, 2014; Dermience et al., 2015).

Regulace metabolismem	
Ano	Ne
Draslík (K)	Baryum (Ba)
Fosfor (P)	Hliník (Al)
Chrom (Cr)	Mangan (Mn)
Kobalt(Co)	Měď (Cu)
Skandium (Sc)	Olovo (Pb)
Sodík (Na)	Prvky vzácných zemin*
Stroncium (Sr)	Samarium (Sm)
Titan (Ti)	Thorium (Th)
Vápník (Ca)	Uran (U)
Zinek (Zn)	Vanad (V)
Železo (Fe)	

* kromě Skandia (Sc)

3.3.4 Vliv prostředí na chemismus osteologického materiálu

V chemickém složení kostí se odráží i prostředí, ve kterém jedinec žil. Tato geografická odlišnost se také vytváří na základě řetězce atmosféra-půda-rostlina-živočich-člověk (Låg, 1990). Chemické složení půdy je ovlivněno několika faktory. Základním faktorem je matečná hornina, dále pak reliéf, klima – teplota, složení dešťové vody (Låg, 1990; Appelo and Postma, 2004; Čurlík and Jurkovič, 2012). Při pohybu mraků přes kontinenty dochází ke kontaminaci prachem a plyny, které jsou jak přírodního, tak i antropogenního původu. Významnou složkou, která ovlivňuje složení půdy je také podzemní voda (Appelo and Postma, 2004). Dalším faktorem jsou biologické faktory – mikroorganismy, rostliny a živočichové. Dále se na rozlišeném složení půdy podílí také čas (Čurlík and Jurkovič, 2012).

Studie, které se zabývají geografickým původem jedinců, využívají především analýzy stabilních izotopů (stroncium $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$, olovo $^{206}\text{Pb}/^{204}\text{Pb}$, kyslík $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) (Grupe and Hummel, 1991; Hobson, 1999; Brody et al., 2001; Turner et al., 2009; Price and Burton, 2011). Analýz, které by využívaly koncentraci mikroelementů v kosti, není mnoho. V takovýchto případech je nutné využít prvky, které nejsou regulovány metabolismem. Dobrým ukazatelem by tak mohly být prvky vzácných zemin (Darrah, 2009).

Například zvýšená koncentrace olova v kostním minerálu ukazuje na inkorporaci z vnějšího prostředí a často souvisí s antropogenní činností (Darrah, 2009; Allmae et al., 2012). Olovo může nahradit vápník například při tvorbě kostní tkáně (Barry, 1975). Obsah olova je tedy vyšší u jedinců, kteří mají nízký příjem vápníku a mají tak nižší obsah vápníku v kostech než jedinci s vysokým příjmem vápníku (Bronner, 2008). Do těla může proniknout prostřednictvím trávicí soustavy nebo dýchacími cestami (Wittmers et al., 1988; Allmae et al., 2012). Asi 90 % obsahu olova v celém těle je obsaženo v kostech, především pak v kompaktní kostní tkáni (Barry, 1975). Inkorporace olova do kosti pozměňuje metabolismus osteoblastů a osteoklastů, které jsou odpovědné za tvorbu kostí a jejich resorpci a narušuje homeostázu vápníku (Dowd et al., 2001). Zvýšená koncentrace olova u hospodářských zvířat se nejčastěji objevuje u přežvýkavců, následně u koní, drůbeže a v nejmenší míře pak u prasat (Neathery and Miller, 1975).

Obecně platí, že koncentrace těžkých kovů bude u jedinců, kteří žili v městských oblastech vyšší. Naopak jedinci, kteří žili ve venkovských oblastech, budou mít v kostech nižší koncentraci těžkých kovů. Vliv na vyšší koncentraci těžkých kovů mají také kulky nebo kovové objekty, které se měl jedinec v těle (Bergslien et al., 2008).

Příkladem druhové odlišnosti v chemickém složení kostí, na základě obývaného prostředí, může být nedostatek hliníku, titanu a chromu v kostech delfína. Ten může být způsoben tím, že se tyto prvky vyskytují

ve slané vodě ve velmi malém množství (<0,001 ppm) (Buddhachat et al., 2016).

3.3.5 Vliv typu kosti na chemismus osteologického materiálu

Koncentrace prvků v kostním minerálu se liší mezi jednotlivými kostmi podle zastoupení spongiózní a kompaktní kosti (Brätter et al., 1977; Meizel-Lambert, 2014). Metabolicky aktivnější spongiózní kost podléhá rychlejší přestavbě a tím rychlejší změně v minerálním složení (Darrah, 2009; Allmae et al., 2012).

Například prvky jako zinek, vanad, nikl, chrom, olovo, mangan, kobalt a cín se nacházejí ve vyšších koncentracích v epifýzách kostí. Naopak vápník, stroncium, sodík a draslík jsou ve větších koncentracích ve střední části diafýz (Smrčka, 2005). Tento rozdíl tkví v hustotě kostní tkáně epifýz a diafýz, epifýzy obsahují větší množství spongiózní kostní tkáně než diafýzy (Allmae et al., 2012; Meizel-Lambert, 2014).

Darrah (2009) ve své práci uvádí, že většina metabolicky regulovaných prvků (titan, kobalt, zinek, stroncium atd.) a metabolicky neregulovaný mangan, se ve spongiózní kostní tkáni vyskytují v nižších koncentracích než v kompaktní kostní tkáni. To pravděpodobně plyne z metabolické aktivity spongiózní kostní tkáně a s tím spojené resorpce. Výjimku tvoří železo, které je metabolicky regulováno, ale ve vyšších koncentracích se nachází ve spongiózní kostní tkáni. To může být způsobeno rolí železa při transportu kyslíku. Na rozdíl od toho metabolicky neregulované prvky se ve vyšších koncentracích objevují ve spongiózní kostní tkáni. Prvky bez zjevné metabolické kontroly jako hliník, lanthan nebo samarium (Sm) se nachází ve vyšších koncentracích ve spongiózní kostní tkáni relativně ke koncentraci v kompaktní kostní tkáni (Darrah, 2009).

Buddhachat et al. (2016) uvádějí příklad druhové odlišnosti na základě odlišné koncentrace železa v dlouhých kostech. Koncentrace železa u vzorku slona byla výrazně vyšší než u jiných druhů. Dlouhé kosti

slona se liší od ostatních druhů tím, že nemají dřeňovou dutinu. Ta u ostatních druhů obsahuje buňky, které vyrábějí krvinky. Autoři tak přisuzují vyšší koncentraci železa v kosti slona nepřítomnosti kostní dřevě v jeho kosti (Buddhachat et al., 2016).

3.2.3 Diagenese z hlediska chemické změny osteologického materiálu

Dalším faktorem, který ovlivňuje chemické složení kostní tkáně, je diagenese. Diagenese, v kontextu osteologického materiálu, představuje Fyzikální, biologické a chemické změny kostí a zubů (Hedges, 2002) tedy změny, které vznikají uložením osteologického materiálu v sedimentu (Berner, 1980; López-Costas et al., 2016). Tyto změny jsou nejen nejednotné mezi jedinci a v rámci kostí jednoho jedince, ale závisí také na délce uložení kosti v sedimentu (Klepinger et al., 1986; Hedges, 2002; López-Costas et al., 2016). Roli hrají také fyzické a chemické charakteristiky půdy (pH půdy, absorpční vlastnosti půdy, koncentrace prvků atd.) (Hedges, 2002; Carvalho et al., 2004; Szostek et al., 2005). Diagenese je proces, se kterým musíme počítat na všech archeologických nalezištích. Rozpoznání toho procesu je důležité, protože diagenese má potenciál ohrozit chemické analýzy (King et al., 2011).

Rozklad kostní tkáně bývá obvykle ovlivněn kombinací dekompozičních procesů. Dekompozice kostní tkáně se děje rozrušením kolagenu, jehož úbytek zvýší porozitu kosti o 50 %. Rozklad kolagenu mikrobiologickými procesy je výrazně usnadněn předchozí fyzikální destrukcí kosti, která zahrnuje fraktury a modifikaci povrchu kosti (Hedges, 2002; Karr and Outram, 2012). Vlivným faktorem je také přítomnost pohybů vody (Hedges, 2002). Mikrobiologická dekompozice je zapříčiněna zejména bakteriemi, houbami a prvoky, jež způsobují demineralizaci kostní tkáně (Trueman and Martill, 2002).

Chemická alterace kostí pohřbených v půdě souvisí s disperzí hydroxyapatitu, ztrátou kolagenu a zvýšenou porozitou kosti (Nielsen-Marsh et al., 2000; Carvalho et al., 2004). Hydrolýza peptidových vazeb

v kolagenu ústí v rozpletení kolagenových vláken a oslabení kolagenu. Kolagen se ztrácí, což vede k degeneraci a ztrátě kostní hmoty (Nielsen-Marsh et al., 2000). Tyto procesy vedou ke snadnější kontaminaci spongiózní kostní tkáně (Carvalho et al., 2004).

Diageneze zahrnuje několik procesů – rozpouštění, srážení, adsorpci, nahrazení minerálních složek, výměnu iontů a rekrystalizaci. Prvky z půdy a podzemní vody jsou začleněny do kostní tkáně. Tento proces funguje i opačným směrem (Hedges, 2002; Carvalho et al., 2004; Byrnes and Bush, 2016). K takovýmto změnám může docházet několika způsoby, například se mohou prvky usadit do pórů, dutin nebo mikrofraktur kostní matrix (Carvalho et al., 2004).

Po smrti se hydroxyapatit stává nestabilním a je tak náchylný k subsistenci (López-Costas et al., 2016). Při substitučních procesech dochází k výměně mezi kostí a exogenními prvky, kterými je obohacena půda a podzemní vody. Nejčastěji dochází k nahrazení fosfátu (PO_4^{3-}) uhličitanem (CO_3^{2-}), arseničnanem (AsO_4^{3-}), síranem (SO_4^{2-}) nebo křemičitanem (SiO_4^{4-}). Vápník může být nahrazen stronciem, zinkem, baryem, olovem, kadmíem, cínem, mědí, manganem, niklem, hořčíkem, draslíkem nebo například sodíkem (Nielsen-Marsh and Hedges, 2000; Carvalho et al., 2004; Buddhachat et al., 2016). V kyselých prostředích s vysokou vlhkostí dochází k rekrystalizaci hydroxyapatitu na burshit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Hedges, 2002; Prokeš, 2007).

Musíme brát také v úvahu vliv podzemních vod na změnu chemického složení kostního materiálu. Obohacení o lehké prvky vzácných zemin, které jsou spojeny s půdami bohatými organickou hmotou nebo obohacení o těžké prvky vzácných zemin, kterými se vyznačují alkalické zeminy (King et al., 2011).

Diagenetické procesy jsou variabilní a je tedy nutné znát chemické složení prostředí, sedimentu a podzemních vod, v kterém byl osteologický materiál uložen (Pate and Hutton, 1988; Hedges and Millard, 1995; King et

al., 2011). Zvláště citlivé na účinky diagenetického procesu jsou železo, mangan, hliník, draslík, měď, baryum, vanad a uran (Lambert et al., 1985).

Hedges a Millard (1995) ve své práci uvádí příklad adsorpce uranu z podzemní vody do kostního minerálu. Uran a kostní minerál jsou spolu spřízněny, což vede k vysoké adsorbční kapacitě. Uran je následně uložen do celé kosti pomocí difúze (Hedges and Millard, 1995; Hedges, 2002).

Jiným příkladem kontaminace kostního minerálu je jeho kontaminace zirkoniem a titanem, které se v něm přirozeně nevyskytují. Tyto prvky mohou vytvářet rušivý element při rozlišování druhové nebo individuální příslušnosti (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013). Na kontaminaci může také poukazovat například vysoká koncentrace určitého prvku. Carvalho a kolektiv (2004) uvádí příklad vysoké koncentrace barya. Baryum se v kostní matrix nachází přirozeně, avšak v malém množství.

Carvalho a kolektiv (2004) ukazují, na příkladu vysoké koncentrace železa a manganu v kosti, vliv typu kostní tkáně na koncentraci prvků. Vyšší koncentrace těchto prvků detekovali ve spongiózní kostní tkáni (Carvalho et al., 2004), což je způsobeno její pórovitostí (Lambert et al., 1985; Carvalho et al., 2004). Více náchylné k diagenезi tak jsou kosti s větším poměrem spongiózní kostní tkáně ke kompaktní kostní tkáni, jako například žebra či ploché kosti lebky (Swift et al., 2001). Naopak kompaktní kostní tkáň je díky své struktuře méně náchylná k diagenetickým procesům (Lambert et al., 1985; Carvalho et al., 2004).

Změna chemického složení kostního minerálu může souviset i s pohřební výbavou jedince. Vyšší koncentrace mědi může být spojena s bronzovými předměty (Grupe and Hummel, 1991; Allmae et al., 2012).

Diagenetická chemická změna může postihnout i ostatky, které prošly procesem kremace. Zvýšená koncentrace mědi u ostatků po kremaci byla zaznamenána na souboru ostatků spálených v roce 1962 v Německu. Tato zvýšená koncentrace mědi byla způsobena uložením v měděné urně (Schultz et al., 2008).

3.2.4 Působení ohně na chemismus osteologického materiálu

Chemickým změnám podléhá kostní minerál i při vystavení žáru, respektive při spalování (Grupe and Hummel, 1991; Dokládál, 1999; de Becdelievre et al., 2015). Tyto změny jsou důležité pro pochopení makroskopických i mikroskopických změn kostní tkáně, jelikož chemické změny se odrážejí v mechanických a strukturálních změnách a barvě kosti (Prokeš, 2007; Snoeck et al., 2014). Změnu chemického složení kostní tkáně můžeme rozdělit do čtyř základních kategorií – dehydratace, dekompozice, inverze a fúze. Tyto kategorie se mohou navzájem prolínat a jsou obecně platné i pro makroskopické a mikroskopické změny kosti. (Thompson, 2004; de Becdelievre et al., 2015). Důležitým faktorem, který ovlivní charakter a intenzitu změny je i čas trvání po kterou je kost vystavena ohni (Snoeck et al., 2014).

Fáze dehydratace nastává při teplotách mezi 100 °C a 600 °C. V této fázi dochází k přerušení hydroxylových vazeb a ztrátě vody z kostní tkáně. Ve druhé fázi, fázi dekompozice, která nastává mezi 300 °C a 800 °C, dochází ke ztrátě organické složky vlivem pyrolýzy. Během inverzní fáze, která může nastat mezi 500 °C a 1100 °C, přichází kostní minerál o uhličitany (Thompson, 2004, 2005). Tato ztráta je spojena s přeměnou hydroxyapatitu na beta-trikalciumfosfát $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (whitlockit) (Lagier and Baud, 2003; Thompson, 2005; Prokeš, 2007). Při poslední fázi změn kostní tkáně, která nastává při teplotě nad 700 °C, dochází k tavení minerálů a rekrystalizaci (Thompson, 2004, 2005). Hranice tavení kostního minerálu je 1600 °C až 1630 °C, při této teplotě dochází k úplné ztrátě struktur. Po vychladnutí dochází k další rekrystalizaci (Holden et al., 1995; Dokládál, 1999). V kostním popelu se nachází asi 85% fosforečnanu vápenatého $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 10% uhličitanu vápenatého (CaCO_3) a jiné soli jako magnesiumfosfát nebo kalciumfluorid (Borovanský et al., 1976; Čihák, 2011).

Procesy, které se při spalování dějí, však nejsou omezeny na neměnné kategorie, ale dějí se i napříč nimi. Při teplotách 300 °C až 400

°C se zvyšuje poměr uhlíku a dusíku v kosti (Brain and Sillen, 1988; Stiner et al., 1995). V návaznosti na změnu poměru uhlíku a dusíku Taylor et al. (1995) popisují změnu poměru glycinu a kyseliny glutamové, tedy poměru mezi kolagenní a nekolagenní složkou kosti. Při této teplotě se také vytrácí organická složka kosti (Vitešníková et al., 2008). Při teplotách od 600 °C do 700 °C dochází k oxidaci uhlíku, ten vystupuje z kostního minerálu v podobě oxidu uhličitého (CO₂). Výstup CO₂ je ukončen při teplotě 800 °C (Grupe and Hummel, 1991; Dokládal, 1999). Okolo 800 °C vzniká již zmíněný whitlockit, minerál, který představuje charakteristickou součást minerálů spálených kostí. Whitlockit může vzniknout i pokud se nespálená kost nachází v prostředí s vysokým množstvím hořčíku, který nahrazuje vápník (Lagier and Baud, 2003; Prokeš, 2007).

4 MATERIÁL

Materiál je zastoupen jak lidskými, tak zvířecími kostmi. Lidské kosti pocházejí ze záchranného archeologického výzkumu v Chrástanech vedeného Martinem Paulusem z Archeologického centra v Olomouci, a ze zajišťovacího archeologického výzkumu v Opavě – Pivovar (dále jen Opava), který vedl Michal Zezula z Národního památkového ústavu v Ostravě. Ostatky nám poskytli pracovníci Archeologického centra v Olomouci. Zvířecí ostatky pocházejí z archeologických lokalit – Osek nad Bečvou, Slatinky – Močilky a Hulín 4 – Vrbičné a poskytli nám je Arkadiusz Tajer z Archeologického centra v Olomouci a Tomáš Jelínek z Národního památkového ústavu v Olomouci. Veškerý materiál sdílím s Lucií Formánkovou, studentkou přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, jejíž diplomová práce se zabývá srovnáním přesnosti měření laboratorního WD–XRF a pXRF.

Celkem bylo změřeno 136 kostí jedenácti lidských jedinců a čtyř zvířecích jedinců. Z tohoto vzorku jsme následně vybrali 19 kostí ke spálení. Vybrali jsme dlouhé, krátké a ploché kosti, aby byly zastoupeny všechny segmenty skeletu (lebka, páteř atd.).

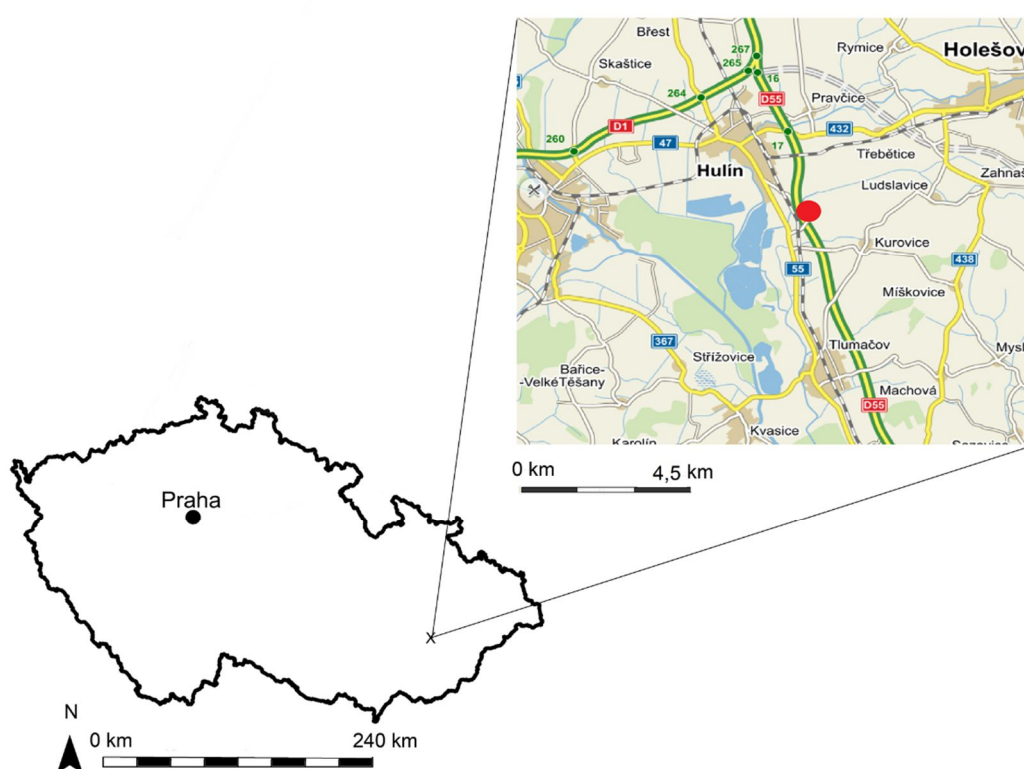
4.1 Lidské ostatky

Lidské kosti (*Homo sapiens*) pocházejí z lokality Chrástany (Paulus, 2010) a Opava (Chrámecký et al., 2009). Celkem jsme zkoumaly 119 lidských kostí. Kostry byly vybrány tak, aby se v sedimentu nacházely blízko u sebe a bylo zajištěno nehomogennější prostředí jejich uložení.

Lidské ostatky jsou zastoupeny kostmi dlouhými, krátkými, plochými a nepravidelnými (Čihák, 2011) (Tabulka 4.1).

Tabulka 4.1 Přehled počtu lidských kostí podle lokality a typu.

Typ kosti	Lokalita	
	Chrástřany	Opava
Dlouhé kosti	19	41
Krátké kosti	6	18
Ploché kosti	10	5
Nepravidelné kosti	10	10
Celkem	45	74

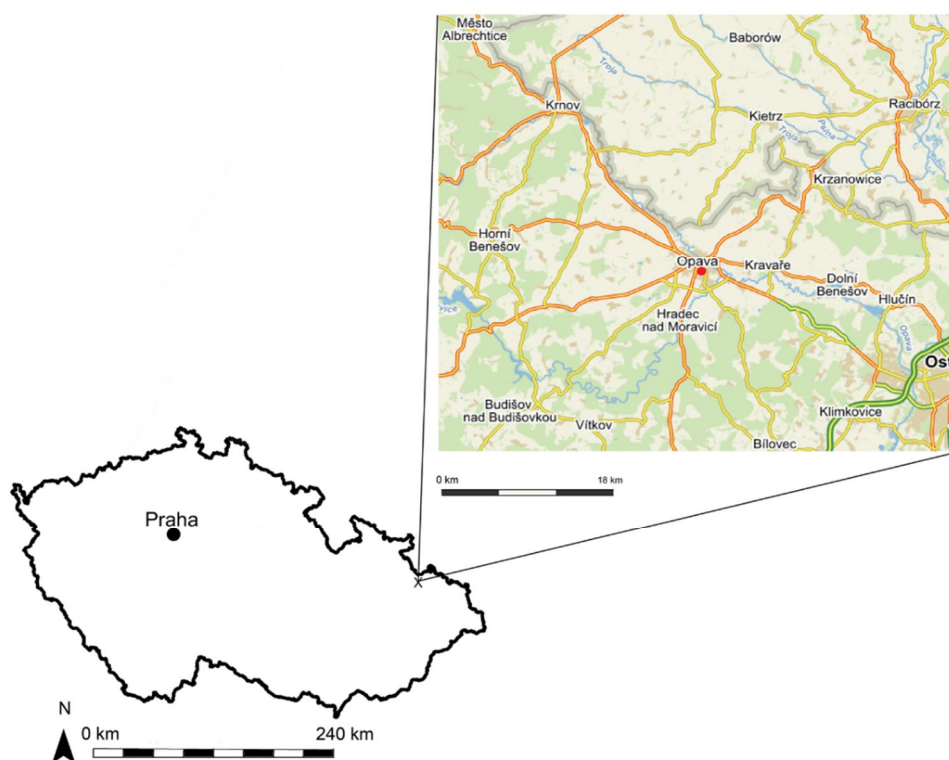


Obrázek 4.1. Lokalita Chrástřany [výřez z.Mapy.cz (© Seznam.cz a.s., 2017)].

První lokalita, ze které pocházejí lidské ostatky, se nachází na mírném návrší západně od obce Chrástřany v okrese Kroměříž (Obrázek 4.1). Ostatky byly datovány do starší a střední doby bronzové a nacházely se v sídlištních jamách (Pankowská, 2010; Paulus, 2010).

Z lokality Chrášťany jsme měřili celkem 45 kostí pěti jedinců. Jednalo se o kosti tří dospělých žen a dvou nedospělých jedinců. Ostatky každého jedince se nacházely ve vlastní jámě, až na ostatky jedné ženy a nedospělého jedince. Jejich ostatky se nacházely ve společné sídlištní jámě avšak ve dvou různých úrovních (Pankowská, 2010).

Druhou lokalitou, odkud pocházejí lidské ostatky, je horní dvůr Opavského pivovaru, který se nacházel na severozápadním okraji historického jádra Opavy (Obrázek 4.2). Jedná se o ostatky datované do raného novověku, které se nacházely ve dvou sondách v samostatných hrobových jamách bývalého hřbitova. Ten na tomto místě fungoval od 70. - 80. let 16. století až do roku 1789 (Chrámek et al., 2009; Kozák et al., 2010).

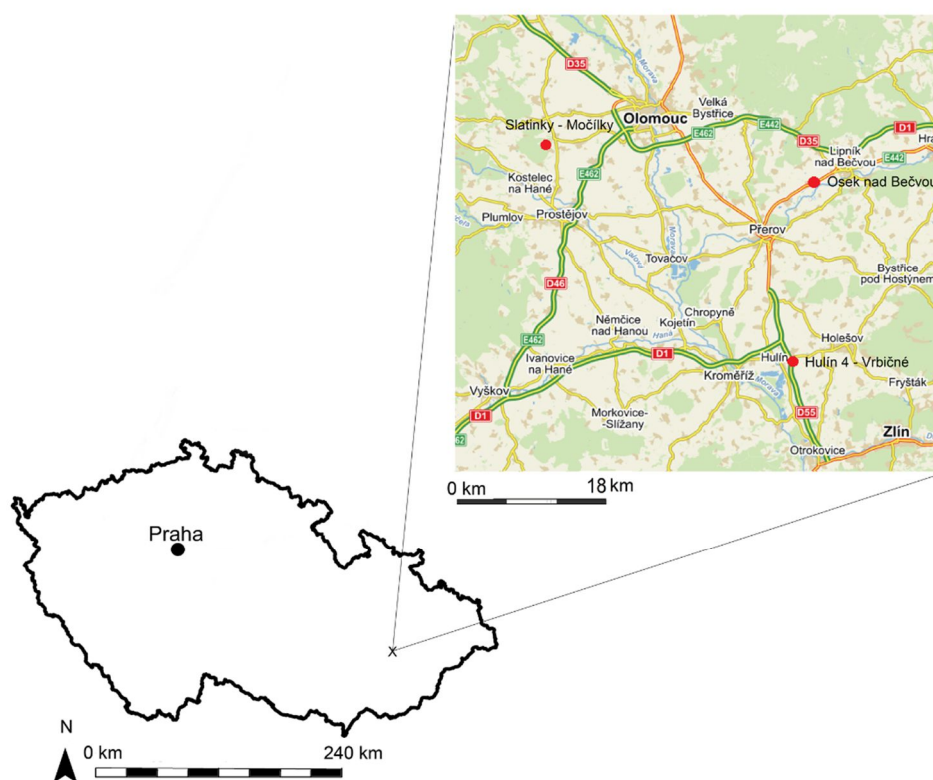


Obrázek 4.2. Lokalita Opava – Pivovar [výřez z.Mapy.cz (© Seznam.cz a.s., 2017)].

Z lokality Opava jsme měřili celkem 74 kostí šesti jedinců ze samostatných hrobových jam. Jednalo se o kosti tří dospělých žen a tří dospělých mužů (Pankowská, 2009).

4.2 Zvířecí ostatky

Zvířecí kosti pocházejí od čtyř jedinců ze tří archeologických lokalit (Obrázek 4.3). Z lokality Hulín 4 – Vrbičné pocházejí kosti z prasete domácího (*Sus scrofa domestica*) a tura domácího (*Bos taurus*) datované do Nitranské kultury (2200–1900 př.n.l.). Z lokality Slatinky – Močilky pocházejí kosti z tura domácích datované do Jordanovské kultury (3700–3400 př.n.l.). A z lokality Osek nad Bečvou pochází kosti koně domácího (*Equus caballus*), jehož ostatky se našly v porušené skrývce nadloží a nejsou datované.



Obrázek 4.3. Lokalita Hulín 4 – Vrbičné, Slatinky – Močilky a Osek nad Bečvou [výřez z.Mapy.cz (© Seznam.cz a.s., 2017)].

Celkem jsme měřili 17 kostí. Devět kostí tura domácího, čtyři kosti koně domácího a čtyři prasete domácího. Jednalo se o kosti dlouhé, nepravidelné a jednu kost plochou (Tabulka 4.2).

Tabulka 4.2. Přehled počtu zvířecích kostí podle lokality a typu.

Typ kosti	Lokalita		
	Hulín 4 – Vrbičné	Osek nad Bečvou	Slatinky – Močílky
Dlouhé kosti	4	1	3
Ploché kosti	0	0	1
Nepravidelné kosti	3	3	2
Celkem	7	4	6

4.3 Spálené ostatky

Celkem 19 kostí (12 lidských kostí a sedm zvířecích kostí) bylo experimentálně spáleno (Tabulka 4.3). Lidské kosti jsme vybrali pouze z lokality Opava a patřily šesti jedincům. Všechny kosti byly typu dlouhého. Ze zvířecích kostí jsem spálila dolní čelist koně domácího, dolní čelist a holenní kost prasete domácího, metapodium a sedací kost tura domácího z lokality Hulín 4 – Vrbičné a dolní čelist a metapodium tura domácího z lokality Slatinky – Močílky.

Tabulka 4.3. Přehled počtu spálených kostí podle lokality a typu.

Typ kosti	Lidské ostatky		Zvířecí ostatky		
	Lokalita		Lokalita		
	Opava	Hulín 4 – Vrbičné	Osek nad Bečvou	Slatinky – Močílky	
Dlouhé kosti	12	2	0	1	
Nepravidelné kosti	0	2	1	1	
Celkem	12	4	1	2	

5 METODY

5.1 Příprava materiálu

Před aplikací pXRF, jsme musely kosti laboratorně ošetřit. Osobně jsem laboratorně ošetřila kosti z lokality Chrášťany, které jsem dostala předem vybrané od vedoucí mé diplomové práce, Anny Pankowské. Kosti z lokality Opava-Pivovar a zvířecí kosti ošetřila Lucie Formánková.

Od každého jedince jsem měla k dispozici sedm a více kostí. U téměř každého z nich byly zastoupeny jak kosti dlouhé, krátké, ploché tak nepravidelné (Tabulka 5.1). Kosti byly vybrány tak, aby zastupovaly všechny segmenty skeletu (lebka, páteř, končetiny atd.). Jedním z faktorů, který nejvíce ovlivňuje prvkovou analýzu kostí, je právě typ kosti (Brätter et al., 1977).

Tabulka 5.1. Přehled počtů kostí z lokality Chrášťany.

Jedinec	Dlouhé kosti	Krátké kosti	Ploché kosti	Nepravidelné kosti	Celkem
Ch-1	4	1	3	0	8
Ch-2	3	0	3	2	8
Ch-3	5	2	1	2	10
Ch-4	3	2	2	5	12
Ch-5	4	1	1	1	7

Příprava kostí spočívala v tom, že každou kost jsem nejdříve identifikovala a zapsala do tabulky v programu Excel. Poté jsem vybrala místa, na kterých měla být kost změřena. Tato místa jsem očistila acetonem kvůli možnému nežádoucímu znečištění daného místa. Následně jsem tužkou označila vybraná místa na kostech, aby byla jasně identifikována oblast měření. Každému takovému místu bylo přiřazeno pořadové číslo měření

Pokud to velikost a zchovalost kosti dovolovala, vybrala jsem tři místa k měření (Obrázek 5.2). I tuto informaci jsem zapsala do tabulky v programu Excel (Obrázek 5.1). Jednotlivá místa jsem se snažila vybírat tak, aby zastupovala rozlišný poměr kompaktní a spongiózní kosti. Připravenou tabulku jsem odeslala na katedru geologie Univerzity Palackého v Olomouci, kde do ní doplnili naměřená data v hmotnostních procentech (*wt%*).



Obrázek 5.1. Jedno ze tří označených míst pro měření (černá šipka).

Lokalita	ID	ID DP	Číslo kosti	Číslo bodu	ID	Kost
Chrást'any	129/805	Ch-1	1	1	129/805 1 1	Os parietale
Chrást'any	129/805	Ch-1	1	2	129/805 1 2	Os parietale
Chrást'any	129/805	Ch-1	1	3	129/805 1 3	Os parietale
Chrást'any	129/805	Ch-1	2	1	129/805 2 1	Radius
Chrást'any	129/805	Ch-1	2	2	129/805 2 2	Radius
Chrást'any	129/805	Ch-1	2	3	129/805 2 3	Radius
Chrást'any	129/805	Ch-1	3	1	129/805 3 1	Costa
Chrást'any	129/805	Ch-1	3	2	129/805 3 2	Costa
Chrást'any	129/805	Ch-1	3	3	129/805 3 3	Costa
Chrást'any	129/805	Ch-1	4	1	129/805 4 1	Costa
Chrást'any	129/805	Ch-1	4	2	129/805 4 2	Costa
Chrást'any	129/805	Ch-1	5	1	129/805 5 1	Tibia
Chrást'any	129/805	Ch-1	5	2	129/805 5 2	Tibia
Chrást'any	129/805	Ch-1	5	3	129/805 5 3	Tibia
Chrást'any	129/805	Ch-1	6	1	129/805 6 1	Scapula
Chrást'any	129/805	Ch-1	6	2	129/805 6 2	Scapula
Chrást'any	129/805	Ch-1	6	3	129/805 6 3	Scapula
Chrást'any	129/805	Ch-1	7	1	129/805 7 1	Calcaneus
Chrást'any	129/805	Ch-1	7	2	129/805 7 2	Calcaneus
Chrást'any	129/805	Ch-1	8	1	129/805 8 1	Manubrium sterni
Chrást'any	129/805	Ch-1	8	2	129/805 8 2	Manubrium sterni
Chrást'any	129/805	Ch-1	8	3	129/805 8 3	Manubrium sterni

Obrázek 5.2. Ukázka sběru dat.

Celkem bylo změřeno 334 bodů na lidských kostech z obou lokalit znovu změřeno 22 bodů (Tabulka 5.2) a 45 bodů na kostech zvířecích (Tabulka 5.3). V rámci testování přesnosti pXRF byly vybrané kosti měřeny dvakrát. Konkrétně se jednalo se o osm kostí, které pocházely z jedince Ch-1 z lokality Chrást'any, na nichž bylo znovu naměřeno 22 bodů.

Tabulka 5.2. Přehled počtu naměřených bodů na lidských ostatcích.

Lokalita	Počet naměřených bodů		
	Nespálené kosti	Spálené kosti	Celkem
Chrást'any	129	0	129
Opava	205	36	241
Celkem	334	36	370

Tabulka 5.3. Přehled počtu naměřených bodů na zvířecích ostatcích.

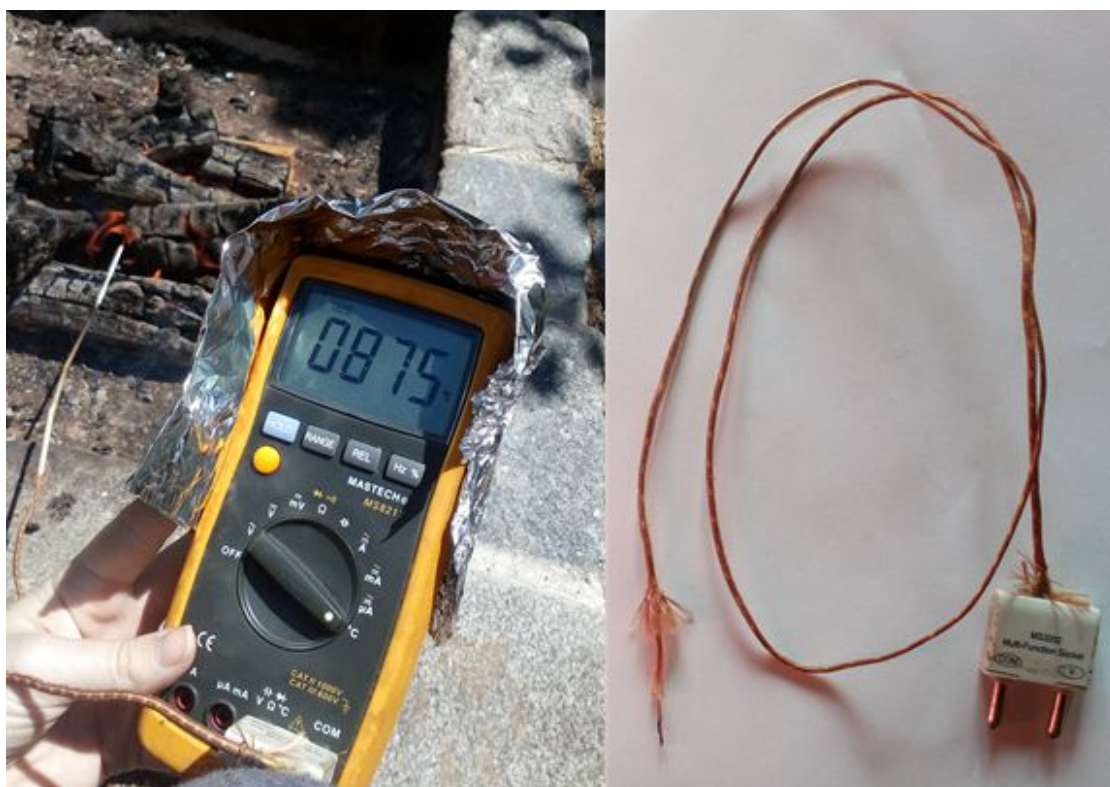
Lokalita	Druh	Počet naměřených bodů		
		Nespálené kosti	Spálené kosti	Celkem
Osek nad Bečvou	Kůň domácí	11	3	14
Hulín 4 – Vrbičné	Prase domácí	10	6	16
	Tur domácí	7	6	13
Slatinky – Močilky	Tur domácí	17	6	23
Celkem		45	21	66

5.2 Pálení kostí

Pálení kostí jsme provedla na venkovní hranici ze smrkového dřeva s přirozeným přístupem kyslíku (Obrázek 5.3). Pálení proběhlo na nízkou teplotu, jelikož při působení vyšší teploty na kost, nad 700 °C, dochází k absolutní dehydrataci, tedy ke ztrátě krystalické vody a celkové rekrytalizaci kostní tkáně (Prokeš, 2007; Castillo et al., 2013). Teplota byla kontrolována digitálním měřicím přístrojem Mastech MS8215, ke kterému byl připojen platinový drát snímající teplotu ohně (Obrázek 5.4). Průměrná teplota při pálení byla 712 °C (SD 63 °C). Spálené kosti jsem v ohništi nechala dokud nevychladly, aby nedošlo k jejich rozpadnutí (Dokládal, 1999). Kostí jednoho jedince jsem vždy páčila na samostatné hranici, aby nedošlo k případnému promíšení vzorků. Všechny kosti jsem páčila po dobu 120 minut.



Obrázek 5.3. Venkovní hranice (pálení kostí jedince Op-6).



Obrázek 5.4. Přístroj Mastech MS8215 a snímač teploty.

Spálené kosti jsme znovu poslaly na katedru geologie Univerzity Palackého v Olomouci k novému měření. Na spálených kostech bylo naměřeno 36 bodů na lidských kostech znovu naměřeno 22 bodů (Tabulka 5.2) a 21 bodů na zvířecích kostech (Tabulka 5.3).

5.3 Měření pomocí pXRF

Měření osteologického materiálu provedl Martin Moník z katedry geologie Univerzity Palackého v Olomouci společně s Lucií Formánkovou. Měření provedli pomocí ručního energiového disperzního rentgenového fluorescenčního spektrometru Olympus InnovX Delta. Přístroj vždy funguje pod určitým napětím. V našem případě to bylo 10kV. Měření probíhalo 240 s u každého vzorku.

„K buzení rentgenového záření přístroj využívá čtyřwattovou rentgenovou rheniovou lampu s napětím od 8 do 40 kV a proudem v rozmezí 5-200 μ A. K detekci specifického sekundárního rentgenového záření využívá přístroj SDD (silicon drift detector) detektor, který je opatřen chlazením a vysokým rozlišením.“ (Nechvátal, 2017, p 29).

Programové vybavení přístroje obsahuje několika analytických módů (Nechvátal, 2017). Pro práci s naším materiálem byl využit mód Geochem, který je pro měření chemického složení osteologického materiálu nejvhodnější. Jednotlivé módy mají nastaveny podmínky na RTG lampě v podobě po sobě jdoucích dvou až tří nastavení, které zohledňují excitační vlastnosti analyzovaných prvků. V první řadě jde o nastavením napětí na rentgenové lampě. V druhé řadě pak jde o sestavení prvků, které jsou v jednotlivých módech měřeny. Lampa může být nastavena na 40 kV (Beam 1). Toto nastavení je primárně určeno pro analýzu vanadu (V), chrómu (Cr), železa (Fe), kobaltu (Co), niklu (Ni), mědi (Cu), zinku (Zn), wolframu (W), rtuti (Hg), arzenu (As), selenu (Se), zlata (Au), olova (Pb), bismutu (Bi), rubidia (Rb), uranu (U), stroncia (Sr), yttria (Y), zirkonia (Zr), thoria (Th), molybdenu (Mo), stříbra (Ag), kadmia (Cd), cínu (Sn), antimonu (Sb) a podílu lehkých prvků (LE). Může být také použit ke stanovení titanu (Ti) a manganu (Mn). Lampa může být také nastavena na 10 kV (Beam2).

Toto nastavení je primárně určeno pro analýzu hořčíku (Mg), hliníku (Al), křemíku (Si), fosforu (P), síry (S), chlóru (Cl), draslíku (K), vápníku (Ca), titan (Ti) a manganu (Mn) (Nechvátal, 2017).

Používání přístroje pXRF předcházela jeho kalibrace. Přístroj byl kalibrován s výsledky více robustní metody ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) v ACME laboratoři ve Vancouveru v Kanadě. Kalibrace se skládala z porovnání prvkového složení 52 vzorků půd a hornin, které byly naměřeny pomocí ICP-MS a pomocí pXRF (Nechvátal, 2017). Nechvátal (2017) provedl regresní analýzu výsledků naměřených prvků a následně modifikoval předem definované kalibrací v pXRF. Poté vzorky znovu pomocí pXRF změřil a opět je porovnal s výsledky z ICP-MS. Kalibrace přinesla zlepšení téměř u všech naměřených prvků a hodnoty signifikantně korelovaly s hodnotami získanými z ICP-MS. Výrazné zlepšení signálu bylo dosaženo u draslíku, vápníku, niklu, kobaltu, stroncia, cínu a rubidia. Nejvýraznější odchylky byly před kalibrací u vanadu a molybdenu (Nechvátal, 2017), „u kterých může docházet ke spektrálním interferencím a chybnému určení softwarem přístroje“ (Nechvátal, 2017, p 70).

5.4 Statistické metody

5.4.1 Chyba měření

V rámci testování přesnosti měření pXRF, tedy chyby prvního a druhého měření, jsme ostatky jedince Ch-1 z lokality Chrástřany změřili dvakrát. Kostí jsme nejprve změřili společně se všemi ostatními kostmi z této lokality. Následně byly naměřeny vyznačené oblasti osmi kostí daného jedince podruhé. Znovu bylo naměřeno 22 bodů.

Chybu mezi měřeními jsme srovnávali pomocí průměrného rozdílu mezi prvním a druhým měřením (MD, *Mean Difference*), které jsou udány v hmotnostních procentech. Rozdíly mezi měřeními jsme převedli do Bland-Altmanových grafů (Bland and Altman, 1986), abychom mohli vizuálně ověřit, zda se odchylky měření vyskytují v přijatelných mezích. Za

pomoci $\pm 95\%$ limitů shody (LA, *Limits of Agreement*), které reprezentují $\pm 1,96$ směrodatné odchylky rozdílů (SD) a průměrného rozdílu, který je poměrem rozdílu mezi měřeními a průměrnou hodnotou dané proměnné (Bland and Altman, 1986).

V grafu osa x reprezentuje průměrné hodnoty měření a osa y pak rozdíly mezi prvním a druhým měřením ($M1-M2$). Uvnitř grafu jsou vyznačeny $\pm 95\%$ limity shody a průměrný rozdíl mezi prvním a druhým měřením. Pokud se hodnoty rozdílu prvního a druhého měření vyskytují v oblasti mezi $+95\%$ limitou shody a -95% limitou shody jsou rozdíly mezi prvním a druhým měřením v přijatelné mezi. Významnost těchto rozdílů jsme ověřili pomocí dvouvýběrového párového t -tesu. Pomocí t -testu jsme zjistila p -hodnotu, která ukazuje na statistickou významnost nebo nevýznamnost rozdílu měření. Jako statisticky významnou hranici jsme přijali $p < 0,05$ (Shennan, 1997).

5.4.2 Lineární diskriminační analýza

Splnění podmínek pro využití lineární diskriminační analýzy jsme ověřili pomocí Mardiaho multivariačního testu (Mardia, 1970) a Boxova M testu (Morrison, 1976).

Analýzu dat jsme provedli pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA). Lineární diskriminační analýza je jednou z metod mnohorozměrné statistické analýzy. Tato metoda slouží k rozdělení proměnných do předem stanovených kategorií, na základě závislosti proměnných z podmnožiny. Diskriminační analýza se snaží najít vektory, které jednotlivé kategorie nejlépe diskriminují. Data dělí do dvou nebo více kategorií (Silva and Stam, 1995). Proto je to vhodnou metodou pro cíle stanovené v této diplomové práci, tedy zjistit, které prvky nejlépe diskriminují jednotlivé druhy a jedince.

Diskriminační analýza je ovlivněna počtem proměnných v souboru, proto jsme přistoupili k redukci dat. Volba pro výběr proměnných, které soubory obsahují, byla založena na několika krocích. První z nich představoval počet naměřených hodnot jednotlivých prvků. Při naměření u

méně jak poloviny bodů byl prvek vynechán. Druhý krok spočíval ve vypočítání Wilksovy lambdy (Wilks' λ) pro jednotlivé prvky. Ta byla použita ke zjištění významnosti jednotlivých prvků v predikci kategorie objektů. Pokud dosahovala Wilksova lambda malých hodnot a vyřazení daného prvku nezvýšilo Wilksovu lambdu pro celý soubor nad 0,3, byl prvek z analýzy vyřazen (Galeta, 2017). Posledním krokem bylo vyřazení prvků, které se přirozeně v osteologickém materiálu nevyskytují (zirkonium, titan a uran) (Hedges and Millard, 1995; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013) ze statistické analýzy při rozlišování druhů, jedinců a také určování vlivu typu kosti na rozlišení, jelikož jejich ponechání v analyzovaných maticích by mohlo tyto analýzy narušit. I přes provedení těchto kroků obsahovaly všechny soubory nenaměřené hodnoty u některých prvků (Příloha 12.1 a Příloha 12.2). Odstranění nekompletních proměnných by silně zredukovalo všechny soubory. Proto jsme v analýze tyto prvky ponechali a statistický program je nahradil průměrnými naměřenými hodnotami daného prvku.

Každý analyzovaný soubor měl stanovenou apriorní pravděpodobnosti (AP), tedy že náhodně vybraný objekt patří do příslušné kategorie, tak aby měl každý objekt stejnou pravděpodobnost zařazení.

Pro zpřesnění výsledků diskriminační analýzy jsme využili funkci Jackknifed. Jackknifed je metoda pro odhadování chyby odhadu. Za pomoci této metody dochází k vytvoření nového výběru tak, že ze vzorku je vyjmuto i -té pozorování a vznikne tak nový výběr o velikosti $n-1$. Takto je znovu provedena analýza pro každý nový výběr a rozlišení tedy probíhá tak, že vynechané pozorování je zařazeno aniž by bylo součástí vytvořené funkce (Galeta, 2017).

Pro znázornění prvků, které jednotlivé analýzy ovlivňují, jsme zvolili možnost zobrazení biplotu v bodovém grafu. Délky jednotlivých os představují vliv daného prvku (Greenacre, 2010; Hammer, 2017).

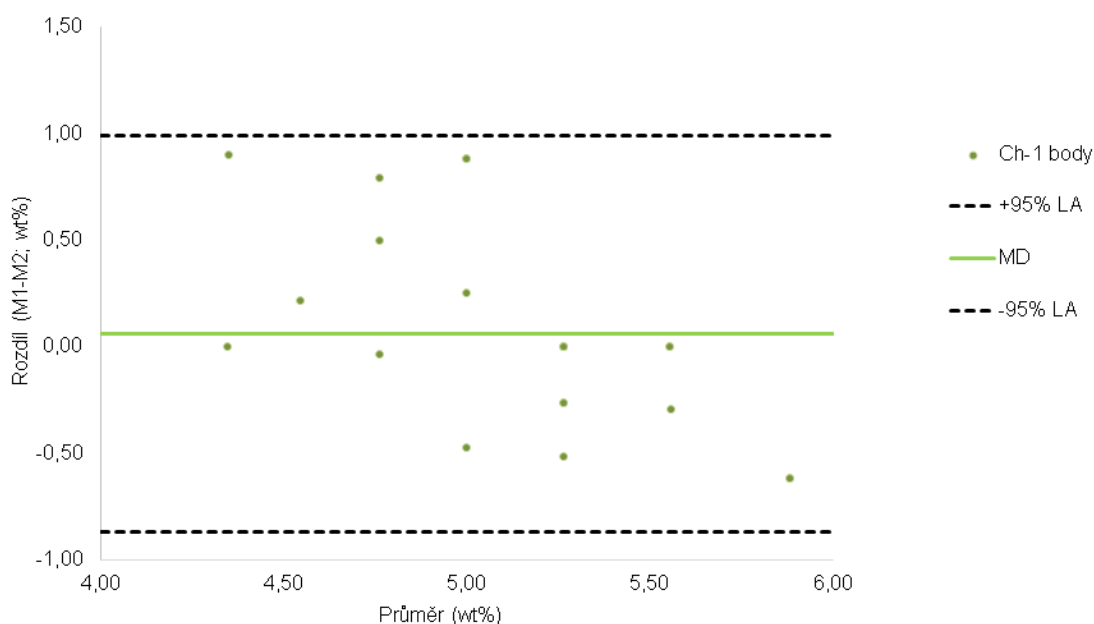
5.4.3 Použitý software

Chyba měření byla počítána v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, 2016) v doplňku vytvořeným doktorem Patrikem Galetou. Dvouvýběrový t -test, LDA a s ní spojené testy byly provedeny v programu PAST 3.11. Chybějící data v souboru program nahrazuje průměrnou naměřenou hodnotu proměnné (Hammer et al., 2001).

6 VÝSLEDKY

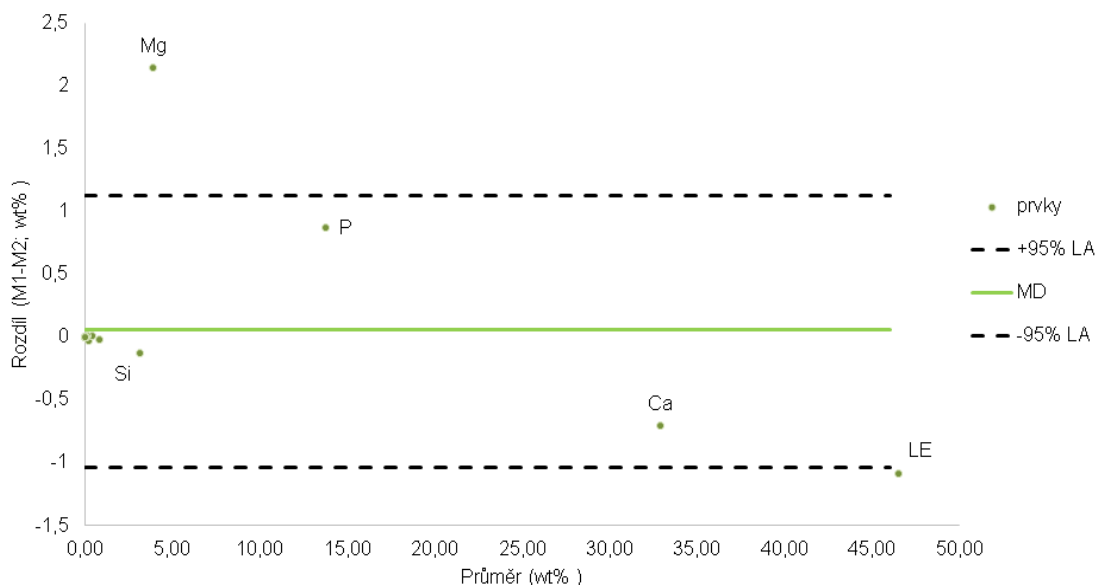
6.1 Chyba měření

Obrázek 6.1 zobrazuje chybu měření bodů na kostech jedince Ch-1. Hodnota -95% limity shody se nachází na $-0,88$ a hodnota +95% limity shody je $0,99$. Průměrný rozdíl prvního a druhého měření je pak $0,06$ wt%. Vidíme, že chybovost měření je nízká, body představující rozdíl mezi měřeními daného bodu na kostech se vyskytují mezi $\pm 95\%$ limity shody. Statistickou významnost těchto rozdílů jsme ověřili ještě pomocí t -testu, který potvrdil tvrzení, že metoda je relativně přesná, jelikož $p > 0,05$, z čehož vyplývá, že průměry prvního a druhého měření na bodech kostí se signifikantně neliší.



Obrázek 6.1. Bland-Altmanův graf zobrazující rozdíl mezi prvním a druhým měřením bodů na kostech jedince Ch-1.

Obrázek 6.2 zobrazuje chybu měření prvků na kostech jedince Ch-1. Hodnota -95% limity shody se nachází na $-1,04$ a hodnota +95% limity shody je $1,13$. Průměrný rozdíl prvního a druhého měření je pak $0,05$ wt%. Vidíme, že hodnoty většiny naměřených prvků se shodují v prvním i druhém měření a se vyskytují se mezi $\pm 95\%$ limity shody. Největší chyba při opakovaném měření se projevila u hořčíku, jehož hodnoty se nacházejí za hranicí +95% limity shody a lehkých prvků (LE), které se nacházejí na hranici -95% limity shody. Statistickou významnost těchto rozdílů jsme ověřili ještě pomocí t -testu. P -hodnota rozdílů mezi prvním a druhým měřením prvků byla větší než statisticky významná hranice ($p > 0,05$), a tedy i průměry prvního a druhého měření prvků kostí se signifikantně neliší.



Obrázek 6.2. Bland-Altmanův graf zobrazující rozdíl mezi prvním a druhým měřením prvků na kostech jedince Ch-1.

Jelikož se hodnoty hořčíku v prvním a druhém měření výrazně lišily byl z následujících analýz vyřazen. Variabilita v měření byla pravděpodobně způsobena nízkou atomovou hmotností hořčíku (24,3), který patří mezi lehké prvky (Pollard et al., 2007). K hodnotám hořčíku mohly být navíc přičteny hodnoty sodíku, který se v periodické tabulce prvků nachází hned před ním (je o jedno protonové číslo menší).

6.2 Splnění podmínek pro lineární diskriminační analýzu

Mardiaho multivariačního test a Boxův M test ukázaly, že data, ve všech maticích, nejsou normálně rozdělena ($p < 0,05$). Proto jsme přistoupili k logaritmické transformaci. Logaritmická transformace dat vytváří normálnější distribuci než silně zkreslená data a vylučuje některé z anomálních odchylek pro statistické analýzy (Galeta, 2017).

6.3 Rozlišení na druhové úrovni

Provedli jsme lineární diskriminační analýzu na základě druhové odlišnosti. V tabulce (Tabulka 6.1) vidíme výsledek lineární diskriminační analýzy ve formě matice záměn. V prvním sloupci je proměnná, kterou

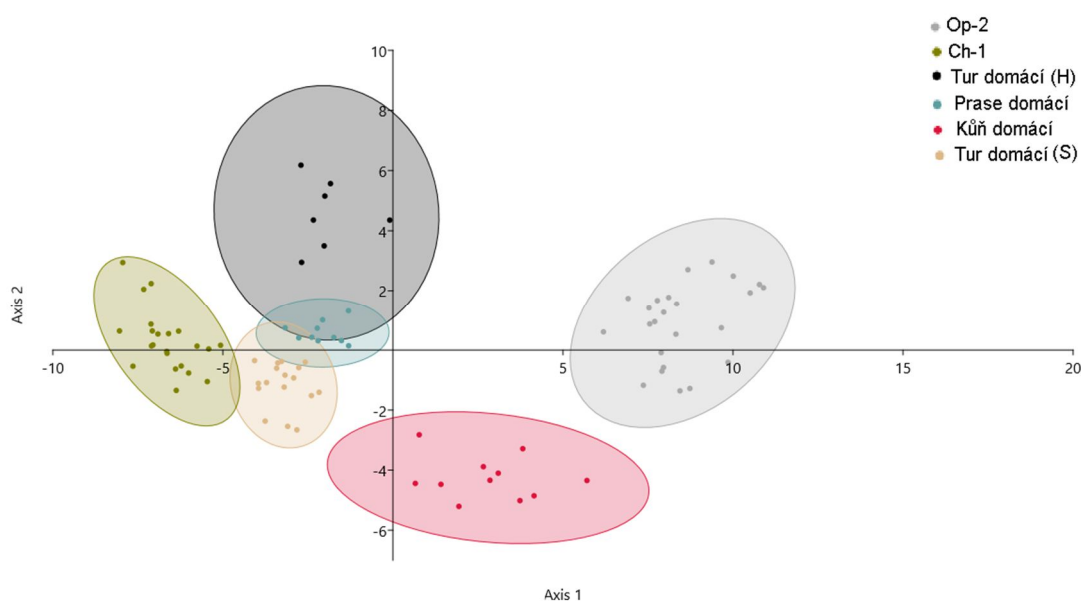
známe (dva tuři domácí, prase domácí, kůň domácí a dva lidské jedinci). Nadpisy dalších sloupců představují přiřazené proměnné, celkový počet proměnných a procentuálně vyjádřenou správnost zařazení. Výsledky lineární diskriminační analýzy jsou zobrazeny pouze pro převzorkovanou (jackknifed) analýzu. Celková správnost zařazení po převzorkování je 97,8 %, což činí z pXRF vhodný nástroj pomocí, kterého můžeme rozlišit jedince na druhové úrovni.

Tabulka 6.1. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA druhů.

Jedinec	Tur domácí (H)	Prase domácí	Kůň domácí	Tur domácí (S)	Ch-1	Op-2	Celkem	Správně (%)
Tur domácí (H)*	7	0	0	0	0	0	7	100,0
Prase domácí	0	10	0	0	0	0	10	100,0
Kůň domácí	0	0	11	0	0	0	11	100,0
Tur domácí (S)*	0	1	0	16	0	0	17	94,1
Ch-1	0	0	0	1	22	0	22	100,0
Op-2	0	0	0	0	0	24	24	100,0
Celkem	22	12	11	17	22	24	91	97,8

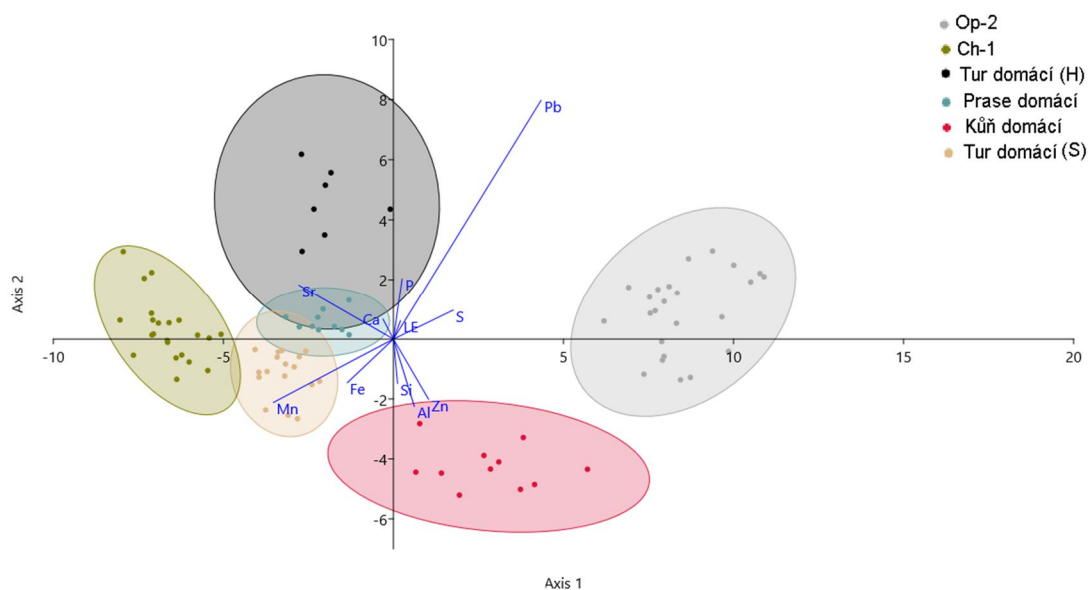
*(H) – Hulín 4 – Vrbičné; (S) - Slatinky – Močílky

V grafu (Obrázek 6.3) jsou vyznačeny elipsy, které označují oblast, kam předpokládáme, že bude zařazeno 95 % bodů z dané kategorie (Hammer, 2017). Tur domácí byl zastoupen dvěma jedinci z dvou různých lokalit. Stejně tak tomu bylo v této analýze i u lidských jedinců. Pokud tyto jedince sloučíme do obecnějších kategorií, tur domácí a člověk, diskriminace se nám sníží. Tato variabilita je s největší pravděpodobností způsobená tím, že pocházejí z odlišných lokalit.



Obrázek 6.3. Výsledný graf LDA podle rozlišení druhů (výstup PAST).

Prvky, které ovlivnily analýzu jsou zobrazeny v grafu pomocí biplotu (Obrázek 6.4). Ten zobrazuje míru vlivu proměnných na analýzu. Můžeme ta vidět, že analýza byla nejvíce ovlivněna olovem, stronciem a manganem. V menší míře se pak na analýze podílí fosfor, železo, hliník, zinek, síra a křemík. Nejmenší vliv měl vápník a lehké prvky.



Obrázek 6.4. Výsledný graf LDA podle rozlišení druhů s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).

6.4 Rozlišení na individuální úrovni

Rozlišení kostí na individuální úrovni bylo provedeno v několika kombinacích podle lokalit. Tedy pro všechny možné kombinace, které mohou být tvořeny třemi, čtyřmi a pěti jedinci pocházejících z lokality Chrášťany nebo Opava. A také pro šest jedinců pocházejících z lokality Opava.

Tabulka 6.2 zobrazuje popisné hodnoty, vyjádřené v procentech při diskriminaci všech kombinací tří jedinců. Při rozlišení tří jedinců z lokality Chrášťany bylo při převzorkování průměrně správně zařazeno 88,6 % jedinců. U jedinců z lokality Opava bylo správně rozlišeno 88,1 %.

Tabulka 6.2. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací tří jedinců z lokality Chrástřany a Opava.

Lokalita	Min	Max	Průměr	SD
Chrástřany	81,6	94,9	88,6	4,7
Opava	71,7	99,0	88,1	7,3

Tabulka 6.3 znázorňuje popisné hodnoty při diskriminaci všech kombinací čtyř jedinců. Průměrná správnost zařazení dosáhla u jedinců z lokality Chrástřany 86,1 %. U jedinců z lokality Opava bylo průměrně správně rozlišeno 82,7 %.

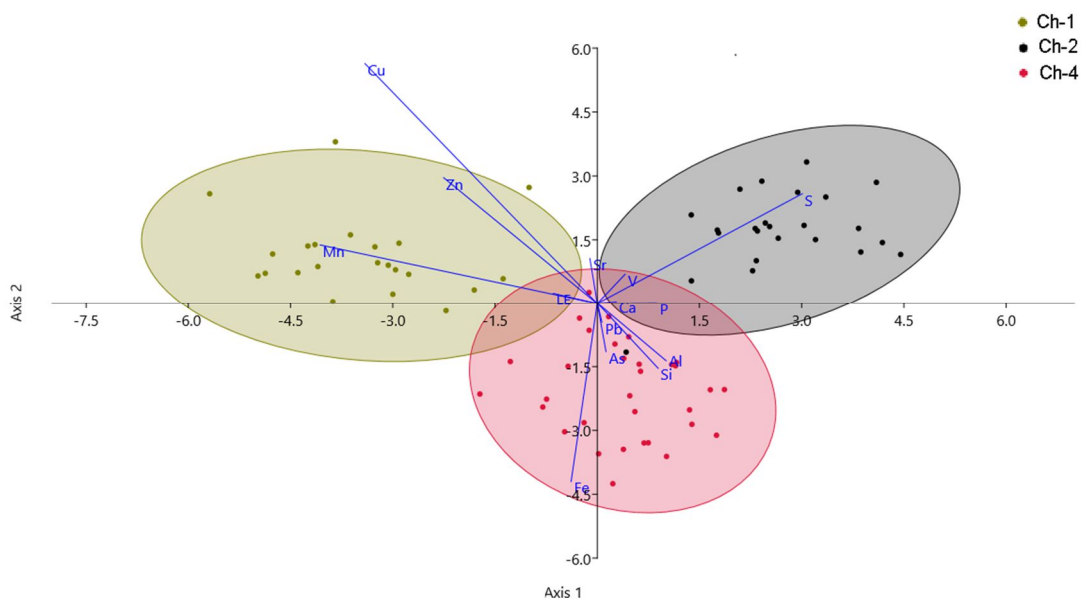
Tabulka 6.3. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací čtyř jedinců z lokality Chrástřany a Opava.

Lokalita	Min	Max	Průměr	SD
Chrástřany	83,2	88,0	86,1	1,8
Opava	68,9	92,4	82,7	6,6

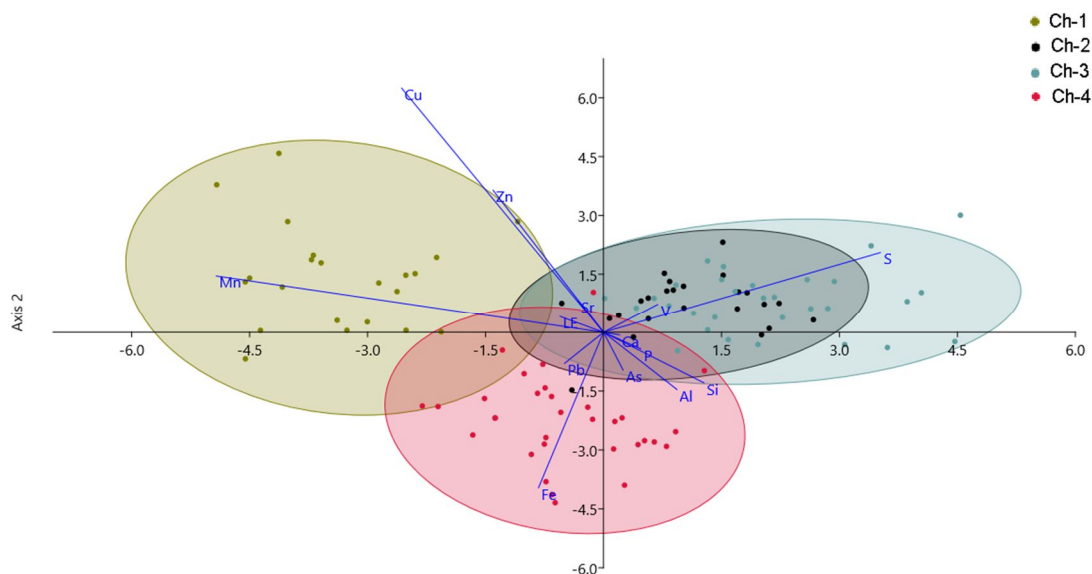
Úspěšnost rozlišení pěti jedinců z lokality Chrástřany byla 83 %. Úspěšnost rozlišení pěti jedinců z lokality Opava byla 77,2 % (Tabulka 6.4). Úspěšnost rozlišení šesti jedinců z lokality Opava byla 72,7 %. Je patrné, že s počtem jedinců diskriminace klesá, což můžeme vidět i na překrývajících se elipsách grafů (Obrázek 6.5, Obrázek 6.6 a Obrázek 6.7). Na grafech jsou také zobrazeny biploty s prvky, které analýzu ostatků z Chrástřan ovlivnily. Největší vliv měla měď, manga, železo, síra a zinek. Méně pak křemík, hliník, vanad, arsen a olovo. Diskriminaci jedinců z lokality Opava nejvíce ovlivnilo olovo, arsen, měď, stroncium a síra. Menší vliv mělo železo, zinek, křemík a hliník. Lokality se liší ve vlivu olova, arsenu, železa a zinku.

Tabulka 6.4. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací pěti jedinců z lokality Opava.

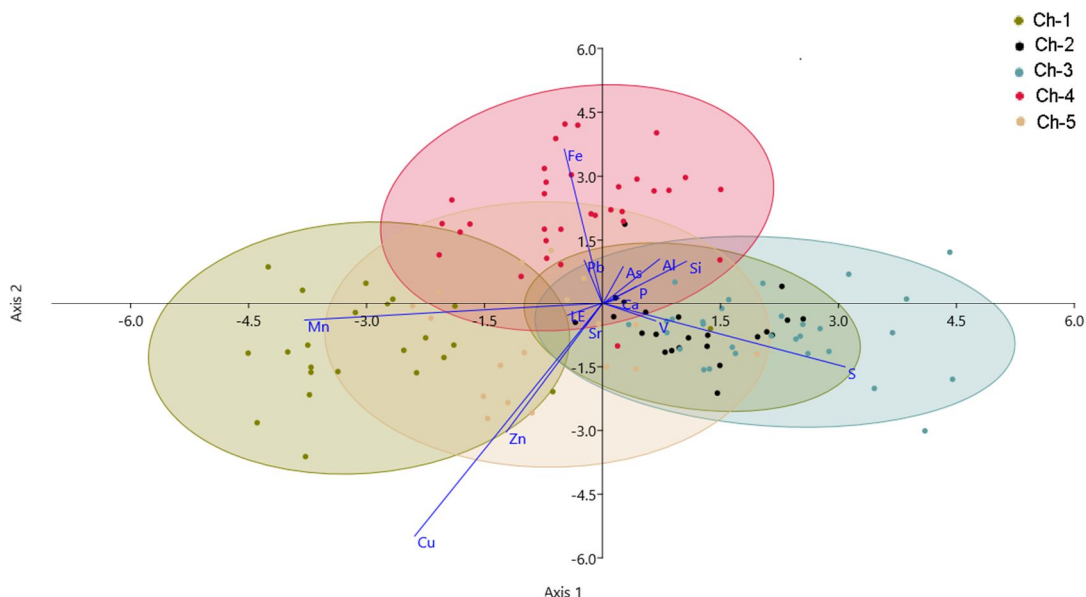
Lokalita	Min	Max	Průměr	SD
Opava	67,1	84,5	77,2	6,6



Obrázek 6.6. Výsledný graf LDA rozlišení tří jedinců z lokality Chrášťany s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).



Obrázek 6.5. Výsledný graf LDA rozlišení čtyř jedinců z lokality Chrášťany s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).



Obrázek 6.7. Výsledný graf LDA rozlišení pěti jedinců z lokality Chrášťany s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).

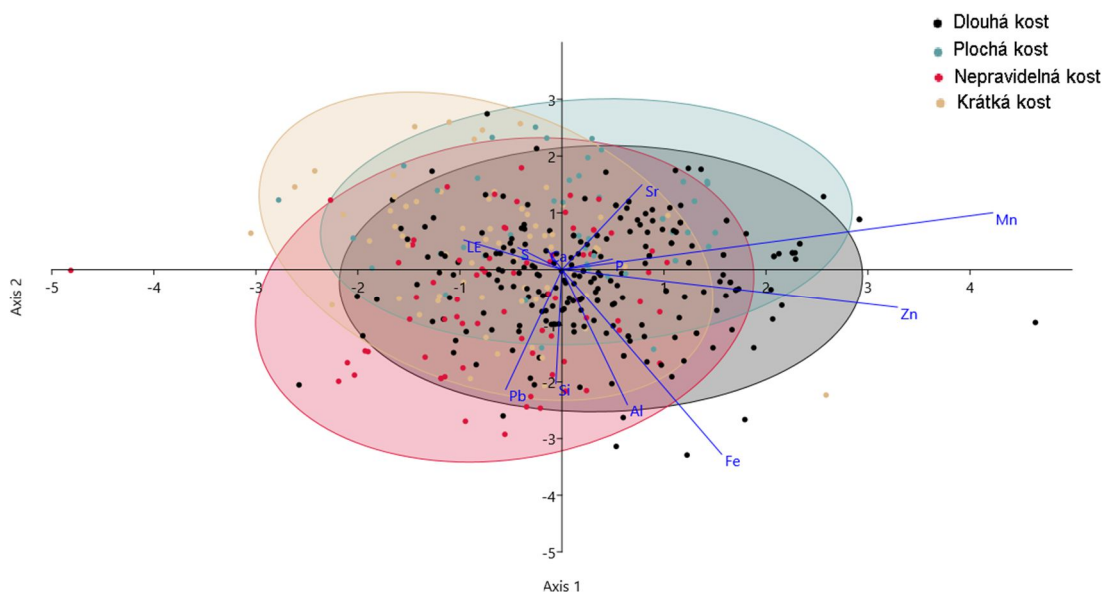
6.5 Rozlišení podle typu kosti

V tabulce (Tabulka 6.5) vidíme výsledek lineární diskriminační analýzy ve formě matice záměn. Tato analýza ukázala, že typ kosti není při diskriminaci příliš významný vzhledem k nízkému procentu úspěšnosti zařazení do patřičné kategorie. Celková úspěšnost zařazení při převzorkování byla 46,6 %.

Tabulka 6.5. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA podle typu kosti.

Proměnná	Dlouhá	Nepravidelná	Plochá	Krátká	Celkem	Správně (%)
Dlouhá	93	42	53	28	216	43,1
Nepravidelná	13	38	14	12	77	49,4
Plochá	11	9	30	10	60	50,0
Krátká	13	9	13	37	72	51,4
Celkem	130	98	110	87	425	46,6

V grafu (Obrázek 6.8) jsou vyznačeny kategorie rozlišení podle typu kosti. Z grafu je patrné, že jednotlivé kategorie se výrazně překrývají, což odpovídá nízké úspěšnosti rozlišení. Také zde vidíme zobrazené prvky, které analýzu ovlivnily. Největší vliv měl mangan, zinek a železo, v menší míře analýzu ovlivnilo stroncium, hliník, olovo a křemík.



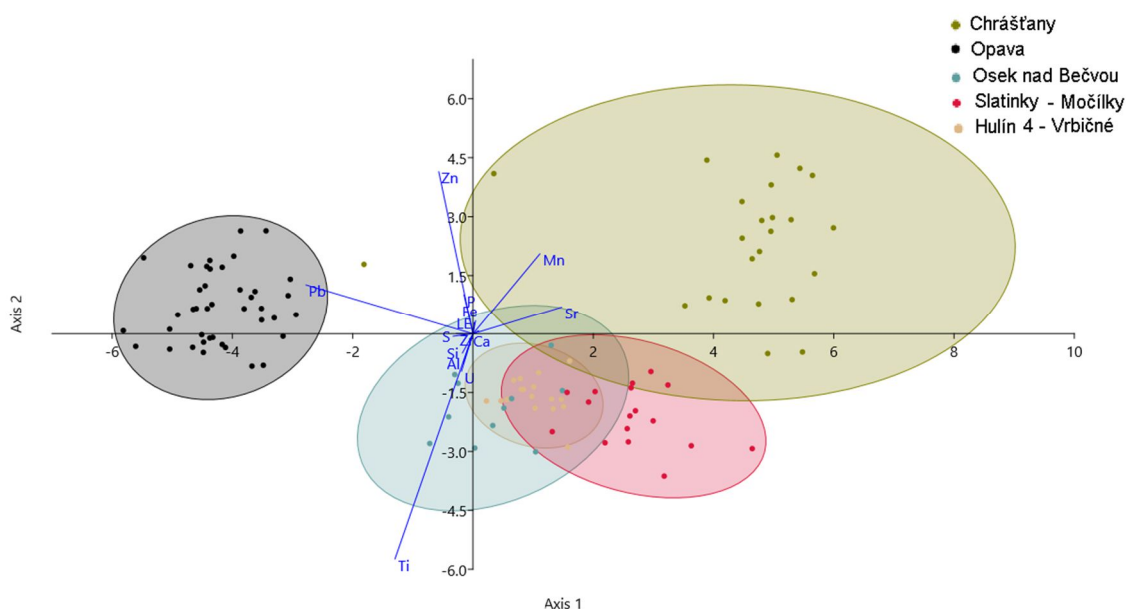
Obrázek 6.8 Výsledný graf LDA podle rozlišení kostí s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).

6.6 Rozlišení podle lokality

Významným faktorem ovlivňujícím chemické složení kostí je diagenéze. Proto jsme provedli lineární diskriminační analýzu také na základě lokalit, ve kterých byly námi zkoumané kosti uloženy. V tabulce (Tabulka 6.6) vidíme výsledek lineární diskriminační analýzy ve formě matice záměn. Úspěšnost zařazení neklesá pod 80 %. Celková správnost zařazení při převzorkování byla 94,6 %. Tato analýza ukázala, že lokalita hraje významnou roli při diskriminaci.

Tabulka 6.6. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA podle lokality.

Lokalita	Hulín 4 – Vrbičné	Osek nad Bečvou	Slatinky – Močilky	Chrástřany	Opava	Celkem	Správně (%)
Hulín 4 – Vrbičné	17	0	0	0	0	17	100
Osek nad Bečvou	0	11	0	0	0	11	100
Slatinky – Močilky	1	0	16	0	0	17	94,1
Chrástřany	0	0	2	20	2	24	83,3
Opava	0	1	0	0	40	41	97,6
Celkem	18	12	18	20	42	110	94,6



Obrázek 6.9. Výsledný graf LDA podle rozlišení podle lokality s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).

Lokality odkud pocházejí zvířecí ostatky (Hulín 4 – Vrbičné, Osek nad Bečvou a Slatinky – Močilky) a Chrástřany se na grafu překrývají (Obrázek 6.9). To je pravděpodobně způsobeno jejich blízkou geografickou polohou, a tedy i podobnějším chemickým složením než na lokalitě Opava. Ta je v grafu výrazně vzdálena. Znovu jsou zde také vyznačeny prvky, které analýzu ovlivnily. Největší vliv měl titan, zinek a

olovo, v menší míře analýzu ovlivnil mangan a stroncium. V grafu je též vidět vliv uranu na rozlišení lokalit, tento prvek byl naměřen pouze u kostí pocházejících z lokality Hulín 4 – Vrbičné.

6.7 Rozlišení spálených ostatků

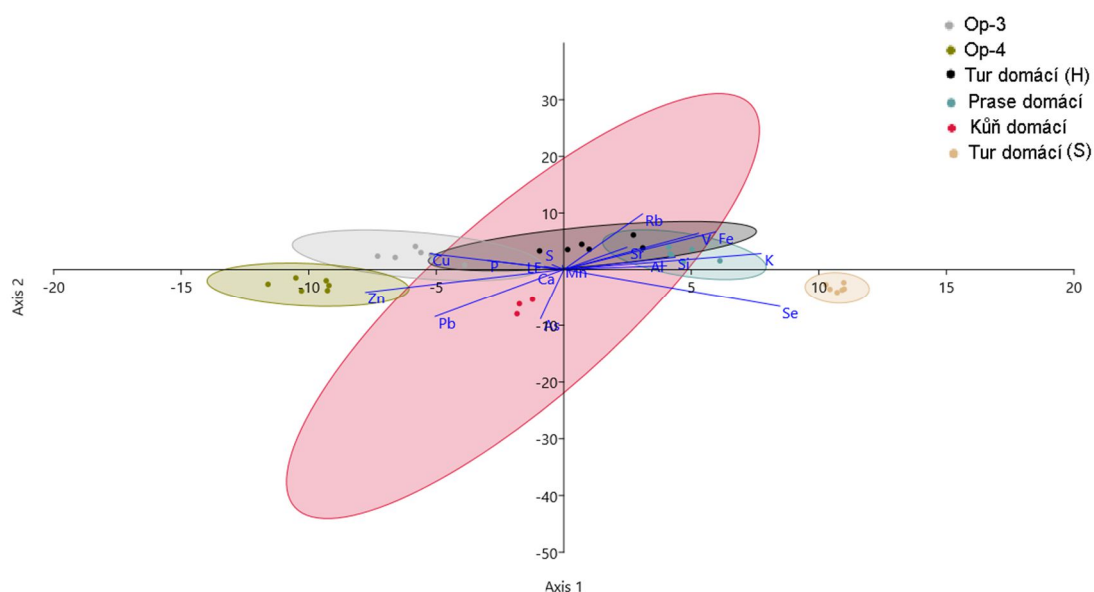
Pro rozlišení spálených ostatků jsme opět provedli lineární diskriminační analýzu na druhové úrovni, individuální úrovni a také podle typu kosti a lokality. V tabulce (Tabulka 6.7) vidíme výsledek lineární diskriminační analýzy ve formě matice záměn pro druhové rozlišení jedinců. Vidíme zde, že byl zaměněn jeden body turu domácího z lokality Hulín 4 – Vrbičné a jeden body prasete domácího, jehož kosti pocházejí ze stejné lokality. Tato záměna tak může být s velkou pravděpodobností připsána vlivu lokality na rozlišení druhů. Celková správnost zařazení při převzorkování byla 91 %. Tato analýza ukázala, že druhy mohou být rozlišeny i pokud byly kosti vystaveny žáru. Nižší úspěšnost zařazení turu domácího a prasete domácího je pravděpodobně způsobena tím, že ostatky pocházejí ze stejné lokality.

Tabulka 6.7. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA spálených kostí na druhové úrovni.

Jedinec	Tur domácí (H)	Prase domácí	Kůň domácí	Tur domácí (S)	Op-3	Op-4	Celkem	Správně (%)
Tur domácí (H)*	4	1	0	0	1	0	6	66,7
Prase domácí	1	5	0	0	0	0	6	83,3
Kůň domácí	0	0	3	0	0	0	3	100,0
Tur domácí (S)*	0	0	0	6	0	0	6	100,0
Op-3	0	0	0	0	6	0	6	100,0
Op-4	0	0	0	0	0	6	6	100,0
Celkem	5	6	3	6	7	6	33	91,0

* (H) – Hulín 4 – Vrbičné; (S) – Slatinky – Močílky

V grafu (Obrázek 6.10) jsou vyznačeny kategorie kostí podle druhu. Je zde patrný překryv elips určených turu domácího a prasete domácího z lokality Hulín 4 – Vrbičné. Je také patrná blízkost jedinců Op-3 a Op-4, která je s velkou pravděpodobností zapříčiněna uložením ve stejném sedimentu. V grafu je také patrná široká oblast zařazení kostí koně domácího. To je nejspíš způsobeno malým množstvím dat pro daného jedince.



Obrázek 6.10. Výsledný graf LDA spálených kostí podle druhu s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).

Provedli jsme také lineární diskriminační analýzu spálených lidských kostí na individuální úrovni. Výsledky analýz pro všechny kombinace rozlišení tří, čtyř a pěti jedinců jsou zobrazeny v Tabulka 6.8. Zde můžeme vidět, že rozlišení spálených kostí dosáhlo průměrné úspěšnosti více jak 60 % pro všechny kombinace čtyř a pěti jedinců. Úspěšnost zařazení při analýze dat všech šesti jedinců byla 63,9 %. Avšak při analýze kombinací tří jedinců byla průměrná diskriminace pouhých 21,7 %.

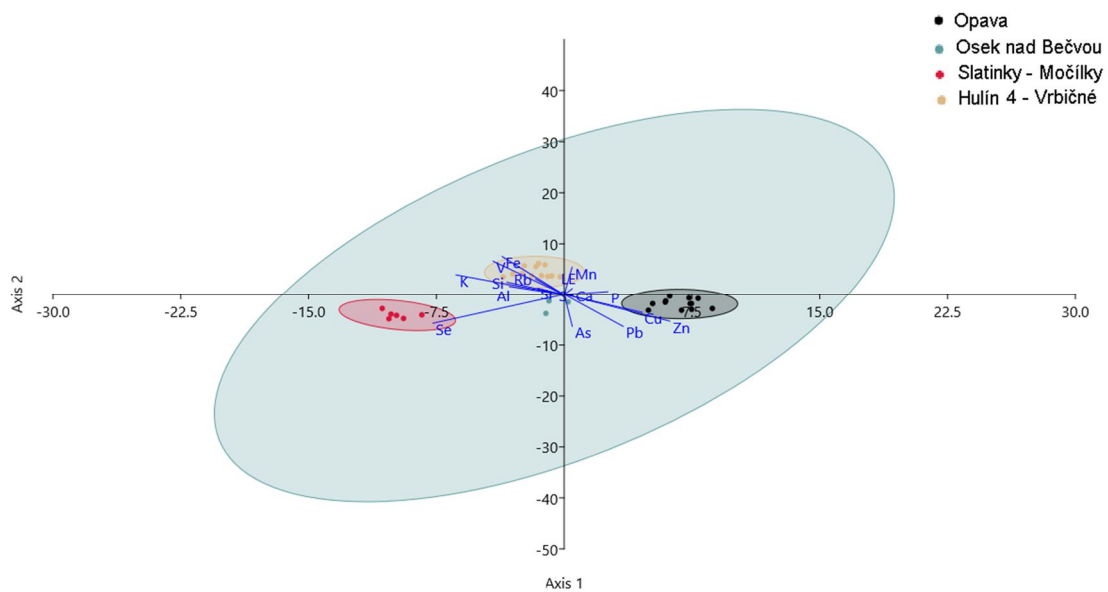
Tabulka 6.8. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací tří, čtyř a pěti jedinců z lokality Opava.

Jedinci	Min	Max	Průměr	SD
Tři	0,0	44,4	21,7	12,1
Čtyři	41,7	83,3	61,7	14,3
Pět	56,7	73,3	67,2	6,1

Provedli jsme také lineární diskriminační analýzu spálených kostí podle lokalit. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce ve formě matice záměn (Tabulka 6.), kde můžeme vidět, že rozlišení dosáhlo 100% úspěšnosti. Graf (Obrázek 6.11) nám zobrazuje oblast zařazení kostí podle lokality.

Tabulka 6.9. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA spálených kostí podle lokalit.

Lokalita	Osek nad Bečvou	Hulín 4 – Vrbičné	Slatinky – Močilky	Opava	Celkem	Správně (%)
Osek nad Bečvou	3	0	0	0	3	100
Hulín 4 – Vrbičné	0	12	0	0	12	100
Slatinky – Močilky	0	0	6	0	6	100
Opava	0	0	0	12	12	100
Celkem	3	12	6	12	33	100



Obrázek 6.11. Výsledný graf LDA spálených kostí podle lokality s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).

7 DISKUZE

Úspěšnosti rozlišení ostatků na úrovni druhů jsme u nespálených kostí jedinců dosáhli 97,8 %, u spálených kostí jedinců byla úspěšnost správného zařazení na úrovni druhů 91 %. Při rozlišování nespálených lidských ostatků na individuální úrovni se úspěšnost správného zařazení pro všechny kombinace tří, čtyř, pěti a šesti jedinců pohybovala od 88,1 % po 72,7 %. Rozlišení spálených ostatků lidských jedinců na individuální úrovni dosáhlo průměrné úspěšnosti více jak 60 % pro všechny kombinace čtyř, pěti a také šesti jedinců. Rozlišení kombinací tří jedinců však dosáhlo průměrná diskriminace pouhých 21,7 %. Rozlišení osteologického materiálu na základě typu kosti nespálených kostí dosáhlo úspěšnosti 46,6 %. Úspěšnost rozlišení na základě lokality, odkud ostatky pocházejí, dosáhla u nespálených kostí 94,6 %. U spálených kostí byla tato úspěšnost rozlišení 100 %. Prvky, které se nejvíce a nejčastěji podílely na diskriminaci, byly mangan, měď, olovo, síra, zinek a železo.

Naše zjištění ukazuje, že metoda pXRF, jejíž úspěšnost byla více jak 90 % při rozlišování na druhové úrovni, je vhodnou metodou k rozlišení živočišných druhů, a to i pokud máme k dispozici kosti, které byly vystaveny ohni. Došli jsme k závěru, že tato metoda tak tvoří vhodný nástroj pro pomoc při terénním výzkumu, pokud bychom chtěli rozlišit druhovou příslušnost kostí.

Předpokládali jsem, že analýza by měla být ovlivněna typem kosti, jelikož prvky se ukládají v jiném poměru ve spongiózní a kompaktní kostní tkáni (Brätter et al., 1977). Avšak analýza vlivu typu kosti na diskriminaci ukázala, že typ kosti není při diskriminaci příliš významný. To je však způsobeno tím, že měření sice probíhalo na různých typech kostí, avšak vždy probíhalo na kompaktní kostní tkáni dané kosti.

Významným prvkem se však ve všech analýzách ukázala lokalita, odkud byly ostatky vyzvednuty, a tedy významným faktorem, který analýzy ovlivnil byla diagenese. Ta by tak mohlo vysvětlit vliv manganu, mědi, olova

a železa na naši analýzu, jelikož koncentrace těchto prvků jsou náchylné z diagenetickým vlivům (Lambert et al., 1985)

První studie využívající metodu pXRF k antropologickým účelům se objevily teprve v nedávné době (Christensen et al., 2012; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013). Primárním předmětem zájmu těchto studií bylo rozlišení osteologického a neosteologického materiálu (Christensen et al., 2012; Zimmerman et al., 2015a; b).

Gonzalez-Rodriguez and Fowler (2013) se jako první zajímali o využití této metody při rozlišení lidských jedinců z archeologického kontextu. K tomu využili poměry vybraných prvků olova a vápníku (Pb/Ca), stroncia a olova (Sr/Pb) a zinku a železa (Zn/Fe), v závislosti na jejich roli v organismu (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013). Další studii pak představili Perrone et al. (2014), kteří využili tuto metodu k rozlišení současných kosterních ostatků. Z obou studií je patrné, že diskriminace se snižuje s vyšším počtem jedinců, na které je metoda aplikována. Stejný výsledek podporují i výsledky získané v naší práci. V té jsme metodu využili k rozlišení ostatků z archeologických lokalit a došli jsme k podobné míře rozlišení jedinců, která klesá s jejich přibývajícím počtem.

Pokud jde o rozlišení druhů, byla tato metoda použita ve dvou studiích, které spolu souvisejí a byly provedeny jedním týmem vědců (Buddhachat et al., 2016; Nganvongpanit et al., 2016). Jejich i naše výsledky ukazují, že pomocí aplikace pXRF a diskriminační analýzy je možné rozlišit jedince na druhové úrovni s více jak 95% úspěšností (pokud nezahrneme i analýzu ostatků delfína, které však představují výjimečný vzorek) (Nganvongpanit et al., 2016). Úspěšnost přes 90 %, tak činí z pXRF vhodný nástroj pomocí, kterého můžeme rozlišit nespálené i spálené kosti jedinců na druhové úrovni.

Výhodou metody pXRF je i již zmiňovaná nedestruktivnost, nenáročná příprava vzorku před měřením, nízké náklady spojené s měřením a následnou analýzou a také možnost jejího využití přímo v terénu (Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013; Zimmerman et al., 2015b).

Přesto však jsou s touto metodou spojeny i jisté nevýhody. Patří mezi ně nízká šance detekovatelnosti sekundárního záření prvků s nízkým protonovým číslem. To totiž může být absorbováno vzduchem, který se nachází v prostoru mezi vzorkem a přístrojem (pXRF). Vzorky by tedy měly být měřeny v přímém kontaktu s přístrojem, aby nedocházelo ke ztrátě dat (Pollard et al., 2007).

I přestože diskriminace na základě typu kosti dosáhla pouhých 46,6 % úspěšnosti zařazení, je nutné pracovat s daty získanými z více kostí od jednoho jedince, aby byla zachycena variabilita v chemickém složení kostní tkáně. Na potřebu získání více dat k analýze ukazují i výsledky analýzy zařazení spálených ostatků koně domácího, pro kterého jsme měli nejméně dat. Přestože byly všechny naměřené body správně zařazeny do kategorie kůň domácí, 95% oblast zařazení se překrývala i s jinými druhy. Stejně tak tomu bylo i v případě rozlišení lokalit spálených ostatků.

Již byl zmíněn vliv lokality na úspěšnost diskriminace. Diagenetická evaluace by tedy měla být zásadní pro chemickou analýzu osteologického materiálu. Z toho důvodu je při analýze ostatků nezbytné získat informace i o chemickém složení půdy, v které byly ostatky uloženy, a následně tyto poznatky zohlednit při interpretaci výsledků. Vliv lokalit na diskriminaci lze také vysvětlit tím, že jsme k analýze využili ostatky z archeologických lokalit, které byly vlivům sedimentu vystaveny po dlouhou dobu. Pro lepší pochopení vlivu lokalit na diskriminaci bychom potřebovali informace o chemickém složení sedimentu, ve kterém byly ostatky uloženy, které jsme však pro tuto práci neměli k dispozici.

Analýza spálených kostí byla pravděpodobně ovlivněna tím, že kosti byly spáleny nedokonale vzhledem k nízké teplotě provedeného spalování. Data tak mohla být získána z kostí jejich chemické složení bylo ovlivněno nerovnoměrně nebo nemuselo být ovlivněno vůbec. Prehistorické kremace dosahovaly velké variability v dosažené teplotě spalování, od 500 °C až po 1000 °C (Dokládál, 1999; Prokeš, 2007). V současné době jsou v krematoriích kosti vystaveny žáru 750 °C až 1000 °C (Dunlop, 2004;

Ubelaker, 2009; Absolonová, 2012), někdy tuto hodnotu mohou i překročit (Dunlop, 2004; Ubelaker, 2009). Teplota při domácích požárech nebo požárech aut se pohybuje od 800 °C do 1200 °C (Holden et al., 1995; Cattaneo et al., 1999; DeHaan, 2008). Dalším faktorem, který měl vliv na nedokonalé spálení kostí, bylo i to, že jednotlivé kosti a jejich části nebyly vystavovány teplotě ohně stejnoměrně (Dokládal, 1999; Prokeš, 2007).

Rozlišení lokalit spálených kostí je na grafu zobrazeno se širokou oblastí určení pro koně domácího a lokalitu z které jeho ostatky pocházejí. Vysvětlením by mohl být malý počet dat, který ke spáleným kostem toho jedince máme, ale mohlo by se také jednat o statistickou chybu při provedení analýzy či chybu programovou.

Analýza dat získaných z pXRF je dostatečná pro antropologické účely v oblasti archeologie, avšak pro forezní praxi, kdy je jako přijatelná brána spolehlivost určení 95 % (Scheuer, 2002), by tato metoda nemohla být využita. S ohledem na potenciál této metody bylo by vhodné, aby proběhly další studie, které by se zaměřili na vliv rozlišných faktorů na diskriminaci.

Vzhledem k významnosti vlivu lokality uložení ostatků by bylo vhodné se zaměřit v samostatné studii pouze na vliv lokality na diskriminaci druhů, a především lidských jedinců. Důležitý prvek by v takovéto studii měla být spolupráce s geologem a hydrologem. V rámci diskriminace lidských jedinců by se další studie mohly zaměřit na diskriminaci, pokud bychom použili kombinaci rozlišení pomocí poměrů prvků a také jejich koncentrace. Bylo by proto vhodné využít tuto metodu zároveň na archeologické i recentní ostatky a zjistit tak míru vlivu diagenese na chemické složení kostí a vliv původu ostatků na diskriminaci jedinců.

8 ZÁVĚR

Cílem práce bylo pokusit se rozlišit nespálené a spálené kosterní ostatky z archeologických lokalit, na druhové a individuální úrovni, pomocí nové metody rentgenové fluorescenční spektrometrie pXRF. A také zjistit jaká je diskriminační síla jednotlivých prvků, jakou roli může hrát typ kostí a lokalita, ze které kosti pocházejí.

Nespálené i spálené kosti se nám podařilo rozlišit na úrovni druhů a také na úrovni individuí. Analýza vlivu typu kosti na diskriminaci ukázala, že typ kosti neměl na náš soubor vliv. Významným diskriminačním faktorem se ve všech analýzách ukázala lokalita. Prvky, které se nejvíce a nejčastěji podílely na diskriminaci, byly mangan, měď, olovo, síra, zinek a železo.

S rozvojem vědy jsou spojeny nové nároky, ale zároveň i nové možnosti v oblasti forenzní antropologie a funerální archeologie. Jednou z takových možností je právě využití metody rentgenové fluorescenční spektrometrie (XRF), respektive její ruční verze (pXRF). Metoda pXRF dosáhla úspěšných výsledků v oblasti rozlišení druhů i jedinců. Můžeme tak konstatovat, že metoda dosahuje dostačujících výsledků v oblasti antropologie a archeologie, avšak pro forenzní účely, kdy mají výsledky sloužit při soudních přelíčeních, jsou takovéto výsledky nedostačující. Může však být vhodným pomocníkem v terénní praxi jako forma zjištění předběžných výsledků.

Metoda má svá pozitiva i negativa. Bylo by vhodné, aby proběhly další studie. Ty by se mohly zaměřit pouze na vliv lokality na diskriminaci druhů, a především lidských jedinců. V rámci diskriminace lidských jedinců by bylo zajímavé vyzkoušet jaká by byla diskriminace, pokud bychom použili kombinaci rozlišení pomocí poměrů prvků a k tomu využili i jejich koncentrace. Nebo se zaměřit na úspěšnost diskriminace mezi ostatky z archeologických lokalit a recentních případů a zjistit, zda tato data nejsou ovlivněna odlišnými faktory, které by musely být v následných analýzách zohledněny. Další oblastí, která by mohla být pro použití metody pXRF více

prozkoumána je stupeň spálení kostí a jeho vliv na diskriminaci. Důležitou součástí těchto výzkumů by pak měl být i spolupráce s geologem a hydrologem, kteří by poskytli data, týkající se chemického složení půdy a vod v okolí nálezu.

9 SEZNAM LITERATURY

- © Seznam.cz a.s. 2017. Mapy.cz. Available from: <https://mapy.cz/zakladni?x=15.6252330&y=49.8022514&z=8>
- Absolonová K. 2012. Histologický odhad dožitého věku jedince ze spálené a nespálené kompaktní kosti lidského žebra. (Unpublished doctoral dissertation). Charles University, Prague.
- Absolonová K, Dobisíkoví M, Beran M, Zocová J, Velemínský P. 2012. The temperature of cremation and its effect on the microstructure of the human rib compact bone. *Anthropol Anzeiger* 69:439–460.
- Adams B, Byrd J. 2014. *Commingled human remains: Methods in recovery, analysis, and identification*. San Diego, CA: Academic Press.
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. 1998. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: Potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 139:663–670.
- Allmae R, Limbo-Simovart J, Heapost L, Vers E. 2012. The content of chemical elements in archaeological human bones as a source of nutrition research. *Pap Anthropol* 21:27–50.
- Appelo AC, Postma D. 2004. *Geochemistry, Groundwater and Pollution*. 2nd ed. CRC Press.
- Barry PS. 1975. A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Br J Ind Med* 32:119–139.
- Bataille M, Crainic K, Leterreux M, Durigon M, De Mazancourt P. 1999. Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation. *Forensic Sci Int* 99:165–170.
- de Becdelievre C, Thiol S, Santos F, Rottier S. 2015. From fire-induced alterations on human bones to the original circumstances of the fire: An integrated approach of human cremains drawn from a Neolithic collective burial. *J Archaeol Sci Reports* 4:210–225.
- Benoit J-N, Quatrehomme G, F Carle G, Pognonec P. 2013. An alternative procedure for extraction of DNA from ancient and weathered bone fragments. *Med Sci Law* 53:100–6.
- Bergslien ET, Bush M, Bush PJ. 2008. Identification of cremains using X-ray diffraction spectroscopy and a comparison to trace element analysis. *Forensic Sci Int* 175:218–226.
- Berner RA. 1980. *Early diagenesis: A theoretical approach*. Princeton

University Press.

- Bland JM, Altman DG. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 327:307–310.
- Borovanský L, Hromada J, Kos J, Zrzavý J, Žlábek K. 1976. *Soustavná anatomie člověka díl I*. Prague: Avicenum.
- Brain CK, Sillen a. 1988. Evidence from the Swartkrans cave for the earliest use of fire. *Nature* 336:464–466.
- Brätter P, Gawlik D, Lausch J, Rösick U. 1977. On the distribution of trace elements in human skeletons. *J Radioanal Chem* 37:393–403.
- Brody RH, Edwards HGM, Pollard AM. 2001. Chemometric methods applied to the differentiation of Fourier-transform Raman spectra of ivories. *Anal Chim Acta* 427:223–232.
- Bronner F. 2008. Metals in bone: Aluminum, boron, cadmium, chromium, lanthanum, lead, silicon, and strontium. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. *Principles of bone biology*. Second Edi. San Diego, CA: Academic Press. p 359–370.
- Buckley M. 2016. Species identification of bovine, ovine and porcine type 1 collagen; comparing peptide mass fingerprinting and LC-based proteomics methods. *Int J Mol Sci* 17:1–17.
- Buckley M, Anderung C, Penkman K, Raney BJ, Götherström A, Thomas-Oates J, Collins MJ. 2008. Comparing the survival of osteocalcin and mtDNA in archaeological bone from four European sites. *J Archaeol Sci* 35:1756–1764.
- Buddhachat K, Klinhom S, Siengdee P, Brown JL, Nomsiri R, Kaewmong P, Thitaram C, Mahakkanukrauh P, Nganvongpanit K. 2016. Elemental analysis of bone, teeth, horn and antler in different animal species using non-invasive handheld X-ray fluorescence. *PLoS One* 11:1–21.
- Byrnes JF, Bush PJ. 2016. Practical considerations in trace element analysis of bone by portable X-ray fluorescence. *J Forensic Sci* 61:1041–1045.
- Carvalho ML, Marques AF, Lima MT, Reus U. 2004. Trace elements distribution and post-mortem intake in human bones from Middle Age by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochim Acta - Part B At Spectrosc* 59:1251–1257.
- Castillo RF, Ubelaker DH, Acosta JAL, de la Rosa RJE, Garcia IG. 2013. Effect of temperature on bone tissue: Histological changes. *J Forensic*

Sci 58:578–582.

- Cattaneo C, DiMartino S, Scali S, Craig OE, Grandi M, Sokol RJ. 1999. Determining the human origin of fragments of burnt bone: A comparative study of histological, immunological and DNA techniques. *Forensic Sci Int* 102:181–191.
- Cattaneo C, Gelsthorpe K, Sokol RJ, Phillips P. 1994. Immunological detection of albumin in ancient human cremations using ELISA and monoclonal antibodies. *J Archaeol Sci* 21:565–571.
- Cattaneo C, Porta D. 2009. Species determination of osseous remains. In: Jamieson A, Moenssens A, editors. *Wiley Encyclopedia of Forensic Sciences*. John Wiley & Sons. p 2393–2397.
- Cattaneo C, Porta D, Gibelli D, Gamba C. 2009. Histological determination of the human origin of bone fragments. *J Forensic Sci* 54:531–533.
- Connor M, Slaughter D. 1984. Diachronic study of Inuit diets utilizing trace element analysis. *Arctic Anthropol* 21:123–134.
- Crescimanno A, Stout SD. 2012. Differentiating fragmented human and nonhuman long bone using osteon circularity. *J Forensic Sci* 57:287–294.
- Cuijpers AGFM. 2006. Histological identification of bone fragments in archaeology: Telling humans apart from horses and cattle. *Int J Osteoarchaeol* 16:465–480.
- Cuijpers AGFM. 2009. The application of bone histology for species identification in archaeology; with a photo catalogue. (Unpublished doctoral dissertation). Vrije University, Amsterdam.
- Čihák R. 2011. *Anatomie, 1.díl*. Prague: Grada Publishing.
- Čurlík J, Jurkovič Ľ. 2012. *Pedogeochemia*. Bratislava: Comenius University in Bratislava.
- Dahl SG, Allain P, Marie PJ, Mauras Y, Boivin G, Ammann P, Tsouderos Y, Delmas PD, Christiansen C. 2001. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone* 28:446–453.
- Darrah TH. 2009. Inorganic trace element composition of modern human bones: Relation to bone pathology and geographical provenance. (Unpublished doctoral dissertation). University of Rochester, Rochester, New York.
- DeHaan JD. 2008. Fire and bodies. In: *The Analysis of Burned Human Remains*. Academic Press. p 1–13.

- Dermience M, Lognay G, Mathieu F, Goyens P. 2015. Effects of thirty elements on bone metabolism. *J Trace Elem Med Biol* 32:86–106.
- Dobisíková M, Eliášová H. 2012. Forenzní antropologie. In: Štefan J, Hladík J, a kol., editors. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. Prague: Grada Publishing. p 219–280.
- Dokládal M. 1999. Morfologie spálených kostí. Význam pro identifikaci osob. Brno: Faculty of Medicine Masaryk University in Brno.
- Dominguez VM, Crowder CM. 2012. The utility of osteon shape and circularity for differentiating human and non-human Haversian bone. *Am J Phys Anthropol* 149:84–91.
- Dowd TL, Rosen JF, Mints L, Gundberg CM. 2001. The effect of Pb²⁺ on the structure and hydroxyapatite binding properties of osteocalcin. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1535:153–163.
- Duday H, Ciprini AM, Pearce J. 2009. *The archaeology of the dead: Lectures in archaeoethanatology*. Oxford: Oxbow books.
- Dunlop J. 2004. Cremation of body parts and fetuses. *J Obstet Gynaecol* 24:341–342.
- Ebeledike EU, Nwokedi GIC, Ndu OO, Okoye FBC, Ochiogu IS. 2010. Calcium and phosphorus contents of body parts of some domestic animals used as meat source in Nigeria. *Asian Pac J Trop Med* 3:395–398.
- Eliášová H, Šuláková H. 2012. Forenzní biologie. In: Štefan J, Hladík J, a kol., editors. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. Prague: Grada Publishing. p 281–326.
- Ellingham STD, Thompson TJU, Islam M, Taylor G. 2015. Estimating temperature exposure of burnt bone - A methodological review. *Sci Justice* 55:181–188.
- Ezzo J a. 1994. Putting the “chemistry” back into archaeological bone chemistry analysis: Modeling potential dietary indicators. *J Anthropol Archaeol* 13:1–34.
- Ferraro V, Gaillard-Martinie B, Sayd T, Chambon C, Anton M, Santé-Lhoutellier V. 2017. Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *Int J Biol Macromol* 97:55–66.
- Flynn A. 2003. The role of dietary calcium in bone health. *Proc Nutr Soc*

62:851–858.

Galeta P. 2017. Instructor at department of anthropology. (Personal communication).

Gonzalez-Rodriguez J, Fowler G. 2013. A study on the discrimination of human skeletons using X-ray fluorescence and chemometric tools in chemical anthropology. *Forensic Sci Int* 231:407.e1-407.e6.

Greenacre MJ. 2010. Biplots in practice. Fundación BBVA.

Grupe G, Hummel S. 1991. Trace element studies on experimentally cremated bone. I. Alteration of the chemical composition at high temperatures. *J Archaeol Sci* 18:177–186.

Hammer Ø. 2017. PAST. Reference Manual. Oslo.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron* 4:9.

Hanson M, Cain CR. 2007. Examining histology to identify burned bone. *J Archaeol Sci* 34:1902–1913.

He FJ, MacGregor GA. 2001. Beneficial effects of potassium. *BMJ Br Med J* 323:497–501.

Hedges REM. 2002. Bone diagenesis: an overview of processes. *Archaeometry* 44:319–328.

Hedges REM, Millard AR. 1995. Bones and groundwater: towards the modelling of diagenetic processes. *J Archaeol Sci* 22:155–164.

Hillier ML, Bell LS. 2007. Differentiating human bone from animal bone: A review of histological methods. *J Forensic Sci* 52:249–263.

Hobson KA. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. *Oecologia* 120:314–326.

Holden JL, Phakey PP, Clement JG. 1995. Scanning electron microscope observations of heat-treated human bone. *Forensic Sci Int* 74:29–45.

Chrámecký M, Pankowská A, Průchová E. 2009. Předběžná terénní antropologická zpráva Opava - Pivovar. Olomouc.

Christensen AM, Smith MA, Thomas RM. 2012. Validation of X-Ray fluorescence spectrometry for determining osseous or dental origin of unknown material *. *J Forensic Sci* 57:47–51.

- Imaizumi K, Saitoh K, Sekiguchi K, Yoshino M. 2002. Identification of fragmented bones based on anthropological and DNA analyses: Case report. *Leg Med* 4:251–256.
- Jakob F, Seefried L, Kitz C, Stich A, Sponholz B, Raab P, Ebert R. 2010. Trace elements and bone. In: Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Weaver C, editors. *Nutritional Influences on Bone Health*. Springer. p 81–86.
- Janssens K, Vittiglio G, Deraedt I, Aerts A, Vekemans B, Vincze L, Wei F, Deryck I, Schalm O, Adams F, Rindby A, Knöchel A, Simionovici A, Snigirev A, Kn A, De Ryck I, {De Ryck} I. 2000. Use of microscopic XRF for non-destructive analysis in art and archaeometry. *X-Ray Spectrom* 29:73–91.
- Karr LP, Outram AK. 2012. Tracking changes in bone fracture morphology over time: Environment, taphonomy, and the archaeological record. *J Archaeol Sci [Internet]* 39:555–559.
- King CL, Tayles N, Gordon KC. 2011. Re-examining the chemical evaluation of diagenesis in human bone apatite. *J Archaeol Sci* 38:2222–2230.
- Klepinger LL, Kuhn JK, Williams WS. 1986. An elemental analysis of archaeological bone from Sicily as a test of predictability of diagenetic change. *Am J Phys Anthropol* 70:325–331.
- Knüsel CJ, Robb J. 2016. Funerary taphonomy: An overview of goals and methods. *J Archaeol Sci Reports*.
- Komárek V, Červený Č. 1999. Systema skeletale, osteologia - soustava kostry, osteologie. In: Červený Č, Komárek V, Štěrba O, editors. *Koldův atlas veterinární anatomie*. Prague: Grada Publishing. p 25–132.
- Kozák P, Pankowská A, Plaštiaková M, Zezula M. 2010. Opava (k. ú. Opava-Město, okr. Opava). Areál pivovaru (tzv. horní dvůr), p.č. 128/7, 128/8. Středověk, novověk. Město. Zjišťovací výzkum. In: *Přehled výzkumů* 51. . p 458–462.
- Låg J. 1990. *Geomedicine*. CRC Press.
- Lagier R, Baud C. 2003. Magnesium whitlockite, a calcium phosphate crystal of special interest in pathology. *Pathol Res Pract* 199:329–335.
- Lamberg-Allardt C, Karp H, Kemi V. 2010. Phosphorus and bone. In: Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Weaver C, editors. *Nutritional Influences on Bone Health*. London: Springer. p 87–98.

- Lambert JB, Vlasak S, Simpson, Szpunar CB, Buikstra JE. 1985. Bone diagenesis and dietary analysis. *J Hum Evol* 14:477–482.
- Lanting JN, Aerts-Bijma AT, van der Plicht J. 2001. Dating of cremated bones. *Radiocarbon* 43:249–254.
- Lemos VA, dos Passos AS, dos Santos Novaes G, de Andrade Santana D, de Carvalho AL, da Silva DG. 2007. Determination of cobalt, copper and nickel in food samples after pre-concentration on a new pyrocatechol-functionalized polyurethane foam sorbent. *React Funct Polym* 67:573–581.
- Lim C, Dudev T. 2016. Potassium versus sodium selectivity in monovalent ion channel selectivity filters. In: Siegel A, Siegel H, Siegel RKO, editors. *The Alkali Metal Ions: Their Role for Life*. Springer. p 325–348.
- López-Costas O, Lantes-Suárez Ó, Martínez Cortizas A. 2016. Chemical compositional changes in archaeological human bones due to diagenesis: Type of bone vs soil environment. *J Archaeol Sci* 67:43–51.
- Lowenstein JM, Reuther JD, Hood DG, Scheuenstuhl G, Gerlach SC, Ubelaker DH. 2006. Identification of animal species by protein radioimmunoassay of bone fragments and bloodstained stone tools. *Forensic Sci Int* 159:182–188.
- Lüllmann-Rauch R. 2012. *Histologie*. Prague: Grada Publishing.
- Macdonald HM. 2007. Influence of organic salts of potassium on bone health: Possible mechanisms of action for the role of fruit and vegetables. *Int Congr Ser* 1297:268–281.
- Mardia K V. 1970. Measures of multivariate skewness and kurtosis with principal components. *Biometrika* 57:519–530.
- Marshall JH. 1969. Measurements and models of skeletal metabolism. In: Comar CL, Bronner F, editors. *Calcium physiology: An advanced treatise Vol. 3*. New York, London: Academic Press. p 1–122.
- Martini LA. 1999. Magnesium supplementation and bone turnover. *Nutr Rev* 57:227–9.
- Martiniaková M, Grosskopf B, Omelka R, Vondráková M, Bauerová M. 2006. Differences among species in compact bone tissue microstructure of mammalian skeleton: Use of a discriminant function analysis for species identification. *J Forensic Sci* 51:1235–1239.
- Mehri A, Marjan RF. 2013. Trace elements in human nutrition: A review. *Int*

- J Med Invest 2:115–128.
- Meizel-Lambert CJ. 2014. Chemical differentiation of human osseous, non-human osseous, and non-osseous materials using scanning electron microscopy - energy dispersive x-ray spectrometry (SEM/EDX) and multivariate statistical analysis. (Unpublished doctoral dissertation). University of Central Florida Orlando, Florida.
- Microsoft. 2016. Office Excel 2016.
- Morrison DF. 1976. Multivariate statistical methods. New York: McGraw-Hill.
- Murray RK. 2002. Biomolekuly a biochemie. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, editors. Harperova biochemie. 4th ed. Jinočany: H&H. p 6–15.
- Neathery MW, Miller WJ. 1975. Metabolism and toxicity of cadmium, mercury, and lead in animals: a review. J Dairy Sci 58:1767–1781.
- Nechvátal BM. 2017. Možnosti využití příručního RTG-fluorescenčního spektrometru k analýze hornin a roztoků.
- Nganvongpanit K, Buddhachat K, Klinhom S, Kaewmong P, Thitaram C, Mahakkanukrauh P. 2016. Determining comparative elemental profile using handheld X-ray fluorescence in humans, elephants, dogs, and dolphins: Preliminary study for species identification. Forensic Sci Int 263:101–106.
- Nielsen-Marsh CM, Gernaey A, Turner-Walker G, Hedges REM, Pike A, Collins M. 2000. The chemical degradation of bone. In: Cox M, Mays S, editors. Human Osteology in Archeology and Forensic Science. Cox M, May. London: Greenwich Medical Media Ltd. p 439–454.
- Nielsen-Marsh CM, Hedges RE. 2000. Patterns of diagenesis in bone I: The effects of site environments. J Archaeol Sci 27:1139–1150.
- Nicholson RA. 1993. A morphological investigation of burnt animal bone and an evaluation of its utility in archaeology. J Archaeol Sci 20:411–428.
- Nimni ME, Han B, Cordoba F. 2007. Are we getting enough sulfur in our diet? Nutr Metab (Lond) 4:24.
- Pankowská A. 2009. Laboratorní antropologická zpráva z předstihového záchranného výzkumu OPAVA – PIVOVAR 73/08. Olomouc.
- Pankowská A. 2010. Antropologická analýza kosterních ostatků: CHRÁŠŤANY. Olomouc.

- Pate FD, Hutton JT. 1988. The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral. *J Archaeol Sci* 15:729–739.
- Paulus M. 2010. Nálezová zpráva ze záchranného archeologického výzkumu Chrášťany 1 – Záhumení. Olomouc.
- Perrone A, Finlayson JE, Bartelink EJ, Dalton KD. 2014. Application of portable X-ray fluorescence (XRF) for sorting commingled human remains. In: Adams B, Byrd J, editors. *Commingled Human Remains: Methods in Recovery, Analysis, and Identification*. San Diego, CA: Academic Press. p 145–165.
- Pollard MA, Batt CM, Stern B, Y YSY. 2007. *Analytical chemistry in archaeology*. New York: Cambridge University Press.
- Price TD, Burton JH. 2011. *An introduction to archaeological chemistry*. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer.
- Prokeš L. 2007. Posmrtné změny a jejich význam při interpretaci pohřebního ritu (ke vztahu mezi archeologií a forenzními vědami). ÚAM FF MU.
- Quekett J. 1849. On the intimate structure of bone, as composing the skeleton, in the four great classes of animals, viz., mammals, birds, reptiles, and fishes, with some remarks on the great value of the knowledge of such structure in determining the affinities of minute. *Trans Microsc Soc London* 2:46–58.
- Rammlmair D, Wilke M, Rickers K, Schwarzer RA, Möller A, A W. 2007. Geology, mining, metallurgy. In: *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence analysis*. Springer. p 640–687.
- Rouessac F, Rouessac A. 2007. *Chemical analysis: Modern instrumentation methods and techniques*. John Wiley & Sons.
- Rude RK, Shils ME. 2006. Magnesium. In: Shils M, Moshe S, editors. *Modern Nutrition in Health and Diseases*. Lippincott Williams & Wilkins. p 223–247.
- Shackley MS. 2011. An introduction to X-ray fluorescence (XRF) analysis in archaeology. In: Shackley MS, editor. *X-Ray Fluorescence Spectrometry (XRF) in Geoarchaeology*. New York, Dordrecht, Heidelberg, London: Springer. p 7–44.
- Shennan S. 1997. *Quantifying Archaeology*. Iowa City: University of Iowa Press.
- Shipman P, Foster G, Schoeninger M. 1984. Burnt bones and teeth: an

- experimental study of color, morphology, crystal structure and shrinkage. *J Archaeol Sci* 11:307–325.
- Scheuer L. 2002. Application of osteology to forensic medicine. *Clin Anat* 15:297–312.
- Schultz JJ, Warren MW, Krigbaum JS. 2008. Analysis of human cremains: Gross and chemical methods. In: *The Analysis of Burned Human Remains*. Academic Press. p 75–95.
- Silva APD, Stam A. 1995. Discriminant analysis. In: Grimm LG, Yarnold PR, editors. *Reading and understanding multivariate statistics*. Washington, DC: American Psychological Association. p 277–318.
- Smrčka V. 2005. *Trace elements in bone tissue*. Prague: The Karolinum Press.
- Snoeck C, Lee-Thorp JA, Schulting RJ. 2014. From bone to ash: Compositional and structural changes in burned modern and archaeological bone. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 416:55–68.
- Stegman CA, Davis JR. 2014. *The dental hygienist's guide to nutritional care*. Elsevier Health Sciences.
- Stiner M, Kuhn S, Weiner S, Bar-Yosef O. 1995. Differential burning, recrystallization, and fragmentation of archaeological bone. *J Archaeol ...* 22:223–237.
- Swift B, Lauder I, Black S, Norris J. 2001. An estimation of the post-mortem interval in human skeletal remains: A radionuclide and trace element approach. *Forensic Sci Int* 117:73–87.
- Szostek K, Głab H, Lorkiewicz W, Grygiel R, Bogucki P. 2005. The diet and social paleostratigraphy of Neolithic agricultural population of the Lengyel culture from Ośłonki (Poland). *Przegląd Antropol* 68:29–41.
- Táborská E, Sláma J, Bochořáková H, Dostál J, Paulová H, Slanina J, Tallová J, Tomandl J. 2010. *Lékařská chemie I. Obecná a anorganická chemie*. Brno: Masaryk University.
- Takeda E, Yamamoto H, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. 2012. Dietary phosphorus in bone health and quality of life. *Nutr Rev* 70:311–321.
- Taylor RE, Hare PE, White TD. 1995. Geochemical criteria for thermal alteration of bone. *J Archaeol Sci* 22:115–119.
- Thompson TJU. 2004. Recent advances in the study of burned bone and their implications for forensic anthropology. *Forensic Sci Int* 146:203–

205.

- Thompson TJU. 2005. Heat-induced dimensional changes in bone and their consequences for forensic anthropology. *J Forensic Sci* 50:1008–1015.
- Tortora GJ, Derrickson B. 2009. Principles of anatomy and physiology. (12th, editor.). John Wiley & Sons.
- Tranquilli AL, Lucino E, Garzetti GG, Romanini C. 2014. Calcium, phosphorus and magnesium intakes correlate with bone mineral content in postmenopausal women. 8:1–2.
- Trueman CN, Martill DM. 2002. the Long-Term Survival of Bone: the Role of Bioerosion. *Archaeometry* 44:371–382.
- Turner BL, Kamenov GD, Kingston JD, Armelagos GJ. 2009. Insights into immigration and social class at Machu Picchu, Peru based on oxygen, strontium, and lead isotopic analysis. *J Archaeol Sci* [Internet] 36:317–332.
- Ubelaker DH. 2009. The forensic evaluation of burned skeletal remains: A synthesis. *Forensic Sci Int* 183:1–5.
- Ubelaker DH, Lowenstein JM, Hood DG. 2004. Use of solid-phase double-antibody radioimmunoassay to identify species from small skeletal fragments. *J Forensic Sci* 49:924–9.
- Urbanová P, Novotný V. 2005. Distinguishing between human and non-human bones: Histometric method for forensic anthropology. *Anthropologie* 43:175–183.
- Vitešnicková A, Prokeš L, Nývltová Fišáková M, Drozdová E, Kouřil P, Stabrava P, Gryc J. 2008. Studium degradace kosterních pozůstatků pomocí infračervené spektrometrie. *Muzea, památky a Konzerv*:24–30.
- Watson J, McClelland J. 2009. Distinguishing human from animal bone. Available from: http://www.statemuseum.arizona.edu/about/news-features-archive/distinguishing-human-from-animal-bone-by-james-watson-and-john-mcclelland/view_as/grid/page/1
- Windisch W. 2002. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. *Anal Bioanal Chem* [Internet] 372:421–425.
- Wittmers LE, Aufderheide a C, Wallgren J, Rapp G, Alich A. 1988. Lead in bone. IV. Distribution of lead in the human skeleton. *Arch Environ*

Health 43:381–91.

Wopenka B, Pasteris JD. 2005. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Mater Sci Eng C* 25:131–143.

World Health Organization. 1996. Trace elements in human nutrition and health World Health Organization. *World Heal Organ*:1–360.

Zimmerman HA, Meizel-Lambert CJ, Schultz JJ, Sigman ME. 2015a. Science and justice chemical differentiation of osseous, dental, and non-skeletal materials in forensic anthropology using elemental analysis. *Sci Justice* 55:131–138.

Zimmerman HA, Schultz JJ, Sigman ME. 2015b. Preliminary validation of handheld X-ray fluorescence spectrometry: distinguishing osseous and dental tissue from nonbone material of similar chemical composition. *J Forensic Sci* 60:382–390.

Zoetis T, Tassinari MS, Bagi C, Walthall K, Hurtt ME. 2003. Species comparison of postnatal bone growth and development. *Birth Defects Res Part B - Dev Reprod Toxicol* 68:86–110.

Zofková I, Nemcikova P, Matucha P. 2013. Trace elements and bone health. *Clin Chem Lab Med* 51:1555–1561.

10 RESUMÉ

A differentiation of bone fragments at species and at an individual level is a basic requirement not only in a field of anthropology but also in a field of archaeology (Duday et al., 2009; Zimmerman et al., 2015b). Even more challenging task is to differentiate burned bone fragments. This task is often impossible via macroscopic and microscopic methods since when exposed to heat there is a change in the shape and size of the entire bone at the histological level (Absolonová et al., 2012; Christensen et al., 2012; Zimmerman et al., 2015a)

Besides macroscopic and microscopic methods there are molecular biological methods which include immunochemical methods (Ubelaker et al, 2004; Lowenstein et al, 2006) and DNA analysis (Bataille et al., 1999; Imaizumi et al., 2002) which are also used for species and individual differentiation. One option is to use an innovative approach using an X-ray fluorescence spectrometry (XRF) or its manual version (pXRF) (Christensen et al., 2012; Gonzalez-Rodriguez and Fowler, 2013).

Methods using XRF or pXRF for identification were part of several studies in which it was used to differentiate human and animal osteological material, other biological materials (shells, ivory, etc.), non-biological materials (glass., stone, etc.), and taphonomically altered material (Christensen et al., 2012; Zimmerman et al., 2015b). But Gonzalez-Rodriguez and Fowler (2013) and Perron et al. (2014) were the first who applied the XRF method to human osteological material and investigated its potential for differentiating bones at the individual level.

This method is based on the assumption that every individual has a unique elemental composition of bones, which reflects the environment in which it lived, the food it consumed and individual metabolism, which is based on a unique mineral absorption of each individual (Darrah, 2009). Post-depositional processes also play a significant role in an elemental composition of bones (Prokeš, 2007).

The aim of the thesis is to distinguish between bone fragments at the level of species (*Bos taurus*, *Sus scrofa domestica*, *Equus caballus* a *Homo sapiens*) then on the individual level of human individuals and determine whether the species and individuals can be distinguished even after burning. I also deal with what is the discriminatory power of particular elements and what role does the type of bone and location, from which skeletons come, play.

11 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obrázek 3.1. Vyražení elektronu pomocí primárního rentgenového záření [přepracováno z (Perrone et al., 2014, p 146)].	7
Obrázek 3.2. Cirkulace prvků [přepracováno z (Låg, 1990, p 8)].	18
Obrázek 4.1. Lokalita Chrášťany [výřez z.Mapy.cz (© Seznam.cz a.s., 2017)].	31
Obrázek 4.2. Lokalita Opava – Pivovar [výřez z.Mapy.cz (© Seznam.cz a.s., 2017)].	32
Obrázek 4.3. Lokalita Hulín 4 – Vrbičné, Slatinky – Močilky a Osek nad Bečvou [výřez z.Mapy.cz (© Seznam.cz a.s., 2017)].	33
Obrázek 5.1. Jedno ze tří označených míst pro měření (černá šipka). ...	37
Obrázek 5.2. Ukázka sběru dat.	36
Obrázek 5.3. Venkovní hranice (pálení kostí jedince Op-6).	39
Obrázek 5.4. Přístroj Mastech MS8215 a snímač teploty.	39
Obrázek 6.1. Bland-Altmanův graf zobrazující rozdíl mezi prvním a druhým měřením bodů na kostech jedince Ch-1.	45
Obrázek 6.2. Bland-Altmanův graf zobrazující rozdíl mezi prvním a druhým měřením prvků na kostech jedince Ch-1.	46
Obrázek 6.3. Výsledný graf LDA podle rozlišení druhů (výstup PAST)...	48
Obrázek 6.4. Výsledný graf LDA podle rozlišení druhů s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	49
Obrázek 6.5. Výsledný graf LDA rozlišení tří jedinců z lokality Chrášťany s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	51

Obrázek 6.6. Výsledný graf LDA rozlišení tří jedinců z lokality Chrástřany s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	51
Obrázek 6.7. Výsledný graf LDA rozlišení pěti jedinců z lokality Chrástřany s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	52
Obrázek 6.8 Výsledný graf LDA podle rozlišení kostí s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).....	53
Obrázek 6.9. Výsledný graf LDA podle rozlišení podle lokality s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	54
Obrázek 6.10. Výsledný graf LDA spálených kostí podle druhu s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	56
Obrázek 6.11. Výsledný graf LDA spálených kostí podle lokality s vyznačenými prvky ovlivňujícími analýzu (výstup PAST).	58
Tabulka 3.1. Přehled stopových prvků v kostní tkáni.	17
Tabulka 4.1 Přehled počtu lidských kostí podle lokality a typu.....	31
Tabulka 4.2. Přehled počtu zvířecích kostí podle lokality a typu.	34
Tabulka 4.3. Přehled počtu spálených kostí podle lokality a typu.	34
Tabulka 5.1. Přehled počtů kostí z lokality Chrástřany.....	35
Tabulka 5.2. Přehled počtu naměřených bodů na lidských ostatcích.....	37
Tabulka 5.3. Přehled počtu naměřených bodů na zvířecích ostatcích. ...	38
Tabulka 6.1. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA druhů. 47	
Tabulka 6.2. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací tří jedinců z lokality Chrástřany a Opava.	50

Tabulka 6.3. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací čtyř jedinců z lokality Chrášťany a Opava.	50
Tabulka 6.4. Hodnoty (%) jackknifed LDA při diskriminaci kombinací pěti jedinců z lokality Opava.	51
Tabulka 6.5. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA podle typu kosti.....	52
Tabulka 6.6. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA podle lokality.....	54
Tabulka 6.7. Jackknifed matice záměn ukazující výsledky z LDA spálených kostí na druhové úrovni.	55
Příloha 12.1. Přehled použitých prvků v analýze pro druhy, lokality a typy kostí.	82
Příloha 12.2 Přehled použitých prvků v analýze pro rozlišení lidských jedinců.	83

12 PŘÍLOHY

Příloha 12.1. Přehled použitých prvků v analýze pro druhy, lokality a typy kostí.

Druhy		Lokality		Typ kostí
Nespálené	Spálené	Nespálené	Spálené	Nespálené
Hliník (Al)	Hliník (Al)	Hliník (Al)	Hliník (Al)	Hliník (Al)
Křemík (Si)	Křemík (Si)	Křemík (Si)	Křemík (Si)	Křemík (Si)
Fosfor (P)	Fosfor (P)	Fosfor (P)	Fosfor (P)	Fosfor (P)
Síra (S)	Síra (S)	Síra (S)	Síra (S)	Síra (S)
Vápník (Ca)	Vápník (Ca)	Vápník (Ca)	Vápník (Ca)	Vápník (Ca)
Mangan (Mn)	Mangan (Mn)	Mangan (Mn)	Mangan (Mn)	Mangan (Mn)
Železo (Fe)	Železo (Fe)	Železo (Fe)	Železo (Fe)	Železo (Fe)
Zinek (Zn)	Zinek (Zn)	Zinek (Zn)	Zinek (Zn)	Zinek (Zn)
Stroncium (Sr)	Stroncium (Sr)	Stroncium (Sr)	Stroncium (Sr)	Stroncium (Sr)
Olovo (Pb)	Olovo (Pb)	Olovo (Pb)	Olovo (Pb)	Olovo (Pb)
Lehké prvky (LE)	Lehké prvky (LE)	Lehké prvky (LE)	Lehké prvky (LE)	Lehké prvky (LE)
	Draslík (K)	Uran (U)	Draslík (K)	
	Vanad (V)	Titian (Ti)	Vanad (V)	
	Měď (Cu)	Zirkonium (Zr)	Měď (Cu)	
	Arzen (As)		Arzen (As)	
	Selen (Se)		Selen (Se)	
	Rubidium (Rb)		Rubidium (Rb)	

Příloha 12.2 Přehled použitých prvků v analýze pro rozlišení lidských jedinců.

Chrástany		Opava	
Nespálené	Nespálené	Spálené	
Hliník (Al)	Hliník (Al)	Hliník (Al)	
Křemík (Si)	Křemík (Si)	Křemík (Si)	
Fosfor (P)	Fosfor (P)	Fosfor (P)	
Síra (S)	Síra (S)	Síra (S)	
Vápník (Ca)	Vápník (Ca)	Vápník (Ca)	
Mangan (Mn)	Mangan (Mn)	Mangan (Mn)	
Železo (Fe)	Železo (Fe)	Železo (Fe)	
Zinke (Zn)	Zinke (Zn)	Zinke (Zn)	
Stroncium (Sr)	Stroncium (Sr)	Stroncium (Sr)	
Olovo (Pb)	Olovo (Pb)	Olovo (Pb)	
Lehké prvky (LE)	Lehké prvky (LE)	Lehké prvky (LE)	
Vanad (V)	Měď (Cu)	Draslík (K)	
Měď (Cu)	Arzen (As)	Vanad (V)	
Arzen (As)	Selen (Se)	Měď (Cu)	
		Arzen (As)	
		Selen (Se)	
		Rubidium (Rb)	