Analiza uzoraka ekshumiranih iz masovnih grobnica: od uzorka do identifikacije

Jančić, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:176:037980

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

Repository of the University Department for Health Studies, University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

ANA JANČIĆ

ANALIZA UZORAKA EKSHUMIRANIH IZ MASOVNIH GROBNICA: OD UZORKA DO IDENTIFIKACIJE

Završni rad

Split, 2016.godine

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

ANA JANČIĆ

ANALIZA UZORAKA EKSHUMIRANIH IZ MASOVNIH GROBNICA: OD UZORKA DO IDENTIFIKACIJE

ANALYSIS OF SAMPLES EXHUMED FROM MASS GRAVES: FROM SAMPLE TO IDENTIFICATION

Završni rad/ Bachelor's Thesis

MENTOR:

prof. dr. sc. Davorka Sutlović, dipl.ing.

SPLIT, 2016. godine

Sadržaj

1.UVOD 2
1.1. IDENTIFIKACIJE (općenito) 2
1.2. IDENTIFIKACIJE PRIMJENOM ANALIZE DNA 4
1.3. DNA 6
1.4.1. IZDVAJANJE DNA 9
1.4.2. KVANTIFICIRANJE DNA 10
1.4.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR) 14
1.4.4. MULTIPLEKSNI STR-SUSTAVI 16
1.4.5. DETEKCIJA 17
1.5. UZORCI ZA ANALIZU 18
2. CILJ RADA 20
3. MATERIJALI I METODE 21
3.1. MATERIJALI 21
3.1.1.PRIBOR 21
3.1.2. REAGENSI 22
3.1.3. INSTRUMENTI 22
3.2. METODE 23
3.2.1. IZUZIMANJE UZORAKA 23
3.2.2. IZOLACIJA DNA 23
3.2.3. INSTRUMENTALNE TEHNIKE U DNA ANALIZI 25
4. REZULTATI 27
5. RASPRAVA 34
6. ZAKLJUČCI 36
7. LITERATURA 37
8. SAŽETCI 39
8.1. SAŽETAK 39
8.2. ABSTRACT 40
9. ŽIVOTOPIS 41

1.UVOD

1.1. IDENTIFIKACIJE (općenito)

Identifikacija označava utvrđivanje istinitosti osoba, dijelova tijela, tragova i predmeta u svrhu otkrivanja pojedinih obilježja koji omogućuju nesumnjivo i neporecivo prepoznavanje. Proces identifikacije temelji se na dva postupka: traženju i bilježenju karakterističnih osobina objekta ispitivanja, te uspoređivanju utvrđenih značajki s već prije poznatim podacima o objektu za koji se identitet pretpostavlja (1).

U istragama kršenja ljudskih prava forenzičari su često suočeni s identifikacijom skeletnih ostataka iz masovnih grobnica. Primarni cilj takve istrage je odrediti identitet žrtava i vratiti ostatke obiteljima, u skladu sa Genevskom konvencijom (2). Identifikacija ljudskih ostataka je kompleksan i iscrpljujući posao koji zahtjeva mnogo vremena i predanosti, a osobito je težak kada je prošlo mnogo vremena od pokopa. Metode identifikacije trebaju biti planirane, raznolike i komplementarne zbog podizanja broja uspješnih identifikacija (2, 3).

U ratu i nakon njega proces identifikacije složen je zbog migracija civilnog stanovništva i vojne pokretljivosti, prekida evidencije stanovništva, namjernog uništavanja osobnih dokumenata, masovnih pogibija, velikog broja mrtvih u zajedničkim grobnicama, neodgovarajućeg pokopa, dugog razdoblja od smrti do iskapanja pri čemu su mnogi identifikacijski pokazatelji nepouzdani i neupotrebljivi, postojanje samo pojedinih dijelova tijela (bez glave i zuba) ili samo fragmenata kostiju, i možda najvažnijeg, nepostojanja zaživotnih podataka (1). Zaraćene strane su koristile različite metode sakrivanja ratnih žrtava i mjesta ukopa: iskopavanje i preseljenje ostataka s jednog mjesta na drugo; daljnje preseljenje na tercijarne lokacije; rastavljanje i miješanje dijelova tijela, zbijanje i drobljenje. Sve te aktivnosti otežavaju ili čine nemogućim određivanje broja tijela, njihovo sastavljanje i identifikaciju. Posljedično, broj fragmentiranih uzoraka kostiju se vrtoglavo diže (3, 4). Uspjeh svake forenzične identifikacije ovisi, u velikoj mjeri, o opsegu i očuvanosti podataka skupljenih na terenu.

Različite metode se koriste za identifikaciju ljudskih ostataka te one ovise o okolnostima i stanju ostataka. Četiri najčešće metode koje se koriste pri identifikaciji ostataka uključuju: identifikaciju ostataka od strane osobe koja je poznavala preminulog putem direktnog facijalnog prepoznavanja, prepoznavanja nekih specifičnosti, kao što su individualni ožiljci ili oznaka (na primjer, tetovaže); sparivanje otisaka prstiju (dostupni pre-mortem otisci za usporedbu) ili status zubala (ako su dostupni reprezentativni pre-mortem dentalni podaci) i DNA analiza (5, 6). Zbog nedostatka zaživotnih podataka i raspadanja tijela, uobičajene metode identifikacije nisu dostupne, pa se poseže za DNA identifikacijom.

1.2. IDENTIFIKACIJE PRIMJENOM ANALIZE DNA

Prije same DNA analize određuje se starost uzorka koristeći se ^{14}C metodom datiranja, odnosno, uz pomoć izotopa ugljika (1). Obavlja se cjelokupan forenzični pregled svih ostataka koji uključuje opće antropološke varijable, medicinsku i dentalnu povijest i jedinstvene patološke i traumatološke osobine kostiju kao što su bolesti kostiju, deformacije i ozljede (2). Pažljivo se napravi i fotografska dokumentacija svih karakterističnih detalja kako bi se pomoglo rodbini pri potencijalnom prepoznavanju nestalih članova obitelji. U slučajevima u kojima posmrtne promjene ne rezultiraju potpunom dekompozicijom tijela obavi se i obdukcija tijela i vanjski pregled kojim se odrede spol i visina žrtve, te se posmrtni dentalni podaci usporede sa postojećim podacima u bazi podataka. Kao temelj identifikacije žrtava Domovinskog rata koristi se lista osoba koje su ubijene ili nestale na tom području u razdoblju od 1991.-1995. godine. Uzimaju se podaci o odjeći, obući i drugim osobnim stvarima koji se zatim izlažu rodbini i bliskim prijateljima i olakšavaju proces identifikacije žrtava. No, ako se identifikacija ostataka radi dugo nakon smrti, informacije o žrtvinoj odjeći, osobnim stvarima, godinama, spolu, visini i druge karakteristike se značajno smanjuju (1, 4, 5).

Određivanje spola žrtve je jednostavno ukoliko postoji cijeli kostur, no kada postoji samo jedna kost ili više fragmenata kostiju, postupak je znatno otežan. Dok je kod djece stupanj kalcifikacije zuba pokazatelj spola, nakon 18 godina spolne razlike na skeletu su dobro izražene pa razlikovanje muškaraca od žena može biti pouzdano utvrđeno. Najpouzdanije informacije dobivaju se pregledom zdjelice, zatim lubanje i dugih kostiju, posebice natkoljenične kosti (1).

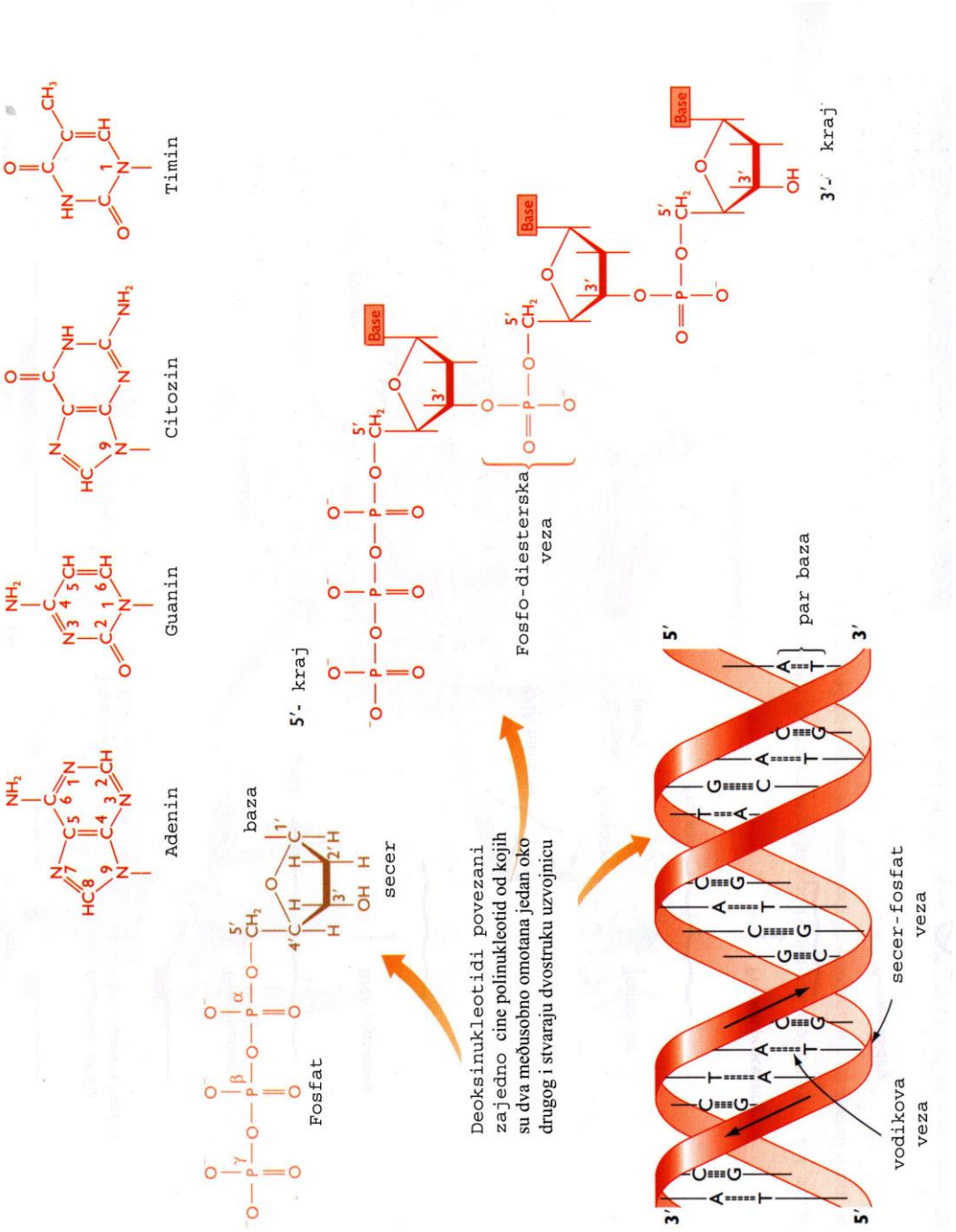
Određivanje životne dobi lakše je i preciznije što je osoba mlađa. Kod mladih osoba koriste se koštane i zubne promjene kao indikatori dobi: kalcifikacija i izbijanje zuba, postojanje centara okoštavanja, međusobno srastanje dijelova kostiju i duljina dugih kostiju. Kod odraslih ljudi koriste se tehnike i metode zasnovane na morfološkim i mikroskopskim promjenama na kostima, ponajprije na spojnoj plohi stidnih kostiju zdjelice, zglobnoj površini bočne kosti zdjelice i hvatištima rebara za prsnu kost, te zatvaranje lubanjskih šavova (1).

Analiza se temelji na usporedbi ljudske DNA, izolirane iz skeletnih uzoraka, s DNA izolirane iz krvnog uzorka, kose ili brisa sluznice pretpostavljenog najbližeg rođaka (3). DNA tehnologija, uključujući STR analizu i analizu mitohondrijske DNA, potvrđeno je metoda izbora u identifikaciji nestalih osoba u Domovinskom ratu u Hrvatskoj zbog mogućnosti tipiziranja visoko razgrađene DNA (3, 4). Ističe se kako je analiza mtDNA najbolji izbor ako se radi s veoma degradiranim materijalom. Međutim, primjenom izmijenjenih metoda izolacije DNA i pročišćavanja putem NaOH ili nekih drugih kemikalija (eng. *repurification*), utvrđeno je da uspješnost identifikacije putem genomske DNA može doseći vrijednosti više od 96% (1). Identifikacija ljudskih ostataka putem analize STR regija je nedostatna jedino kada dvostruko kopirani nuklearni markeri ne funkcioniraju, te se tada koristi analiza mtDNA (7). Iako je varijabilnost na svakom pojedinom lokusu mtDNA višestruko veća, analiza ponavljajućih sljedova (eng. *short tandem repeat*- STR) daje mnogo veću vjerojatnost pozitivne identifikacije zbog većeg broja analiziranih lokusa (1).

U konačnici se DNA profili iz kostiju i zuba žrtava uspoređuju s DNA profilima iz krvi živih rođaka. Genotip svakog kosturnog ostatka uspoređen je sa svim genotipovima u bazi podataka kako bi se pozitivno identificirala nestala osoba (4). Pri identifikaciji žrtve putem roditelja nužno je odrediti učestalost jednog zajedničkog alela kod svakog od roditelja, za što se koristi zbrajanje vjerojatnosti, odnosno, metoda *neisključenosti slučajno odabranih roditelja iz opće populacije* (eng. *random parents not excluded-RPNE*) (1).

1.3. DNA

DNA (deoksiribonukleoinska kiselina, eng. *deoxyribonucleic acid)* je građena od dva polinukleotidna lanca spiralno uvijena oko zajedničke osi i smještena je u svih 46 kromosoma, a predstavlja genetičku osnovu svakog organizma. Polinukleotidni lanci su građeni od purinskih i pirimidinskih parova baza koje su smještene u unutrašnjosti uzvojnice, dok su fosfatne i šećerne jedinice smještene s vanjske strane uzvojnice. Lanci su antiparalelni, odnosno, jedan lanac ima slobodnu hidroksilnu skupinu na položaju 5 u deoksiribozi u prvom nukleotidu u nizu (5' kraj) i na položaju 3 u deoksiribozi u zadnjem nukleotidu u nizu (3' kraj), dok je drugi lanac DNA suprotno usmjeren, od 3' prema 5' kraju. Vodikove veze među parovima baza povezuju dva lanca, pri čemu se baze sparuju prema principu komplementarnosti: uvijek adenin s timinim, a citozin s gvaninom. Slijed baza u lancu nije ograničen, već upravo taj različiti slijed čini različitu genetičku informaciju koja čini osnovu utvrđivanja identiteta određene osobe (1, 7, 8).



Slika 1. Struktura molekule DNA. Prilagođeno prema Brown (9).

Jezgrina DNA genetički je materijal koji nosi nasljednu poruku zapisanu u genima. Geni su dio kromosoma koji sadržava kodirajući i nekodirajući slijed DNA koji je važan za stvaranje funkcionalnih proteina, tRNA ili rRNA. Prema Mendelu, gen je definiran kao pojedinačna jedinica informacije koja utječe na nasljedna svojstva. Mjesto gena na kromosomu naziva se genskim lokusom, a genom označava ukupnost svih gena u stanici.

Procjenjuje se da ljudski genom čini samo 25% gena, a od toga samo 1% kodirajući sljedovi, dok ostalih 75% čine jednostavni ponavljajući sljedovi, duplicirani sljedovi i neklasificirana DNA. Jednostavni ponavljajući sljedovi obuhvaćaju kratka uzastopna ponavljanja koja su izuzetno važna pri identifikaciji DNA analizom (STRs, eng. *short-tandem repeats)* ili mikrosatelite, minisatelite (VNTRs, eng. *variable number of tandem repeats)* i ponavljanja sljedova duljine 14 do 500 nukleotida (7, 8).

Mitohondrijska DNA (mtDNA) građena je od dva komplementarna lanca koja se bitno razlikuju u sastavu: „teški lanac“ bogat je purinskim, a „laki lanac“ pirimidinskim bazama. Unutar sekvencije je 37 kodirajućih regija: 22 gena kodiraju transportnu RNA (tRNA), 2 kodiraju ribosomsku RNA (rRNA), 16 kodira glasničku RNA (mRNA) za enzime važne u procesima oksidativne fosforilacije i stvaranja adenozintrifosfata (ATP), dok je od nekodirajućih regija značajna samo kontrolna regija (eng. control region, -CR) u kojoj se nalazi ishodišno mjesto za replikaciju. Kontrolna regija mtDNA može se podijeliti na tri hipervarijabilne regije. Najviše se upotrebljava sekvenciranje hipervarijabilne regije 1 (HV1) i hipervarijabilne regije 2 (HV2) nekodirajućih regija mtDNA u sudskoj medicini i kriminalistici, zbog njihove visoke varijabilnosti unutar populacije, a populacijske studije rezultate temelje upravo na točkastim mutacijama unutar sekvence hipervarijabilne regije 1 (HV1) kontrolne regije mtDNA. Nasljeđivanje mtDNA samo po majčinskoj liniji omogućava, pri identifikaciji, kao referentini uzorak korištenje srodnika koji su u obiteljskom stablu relativno daleko od osobe čiji se identitet nastoji utvrditi. S druge strane, upravo to svojstvo nasljeđivanja smanjuje njezinu diskriminatornu sposobnost i čini ju nepodobnom pri identifikaciji u kojoj nemamo pretpostavljen identitet žrtve. Vrijednost mtDNA analize najviše dolazi do izražaja kod posmrtnih ostataka u kojima je DNA veoma degradirana, te je nemoguće izolirati kvalitetan genetički materijal za analizu jezgirne DNA (1, 10).

1.4. ANALIZA DNA

DNA analiza ima široku primjenu, a najkorištenija je u sudskoj medicini u nekoliko različitih područja: istraživanju kriminalnih radnji, utvrđivanju identiteta i dokazivanju srodstva. Zahvaljujući DNA analizi i projektima identifikacija žrtava rata, vraćena su imena tisućama posmrtnih ostataka, kako u Hrvatskoj, tako i u susjednim državama (1).

1.4.1. IZDVAJANJE DNA

DNA se u stanici ne nalazi u čistom obliku, nego je udružena s brojnim drugim molekulama koje mogu kočiti postupke analize DNA, kao na primjer, umnožavanje DNA tijekom PCR analize, stoga je njih potrebno ukloniti posebnim tehnikama. Tri su najčešće korištene metode izdvajanja DNA:

a) Metoda izdvajanja DNA s pomoću organskih otapala može se primijeniti na različitim uzorcima, jer mu se protokol može modificirati, a „kostur“ se uvijek iznova ponavlja kroz svaku varijantu. U prvoj fazi postupka doda se pufer koji stvara uvjete u kojima će proteinaza K moći obaviti digestiju proteina, razgrađujući membranski kompleks i ostavljajući genomsku DNA da „slobodno pliva“. U drugoj fazi fenol/kloroform/izoamilni alkohol „obara“ proteine i masti i ostavlja čistu DNA. Percipitacija DNA, kao treća faza, može se provoditi alkoholnom ili Centrikon® metodom. Prva se bazira na izmjeničnom ispiranju apsolutnim i 70%-tnim alkoholom, a druga na ispiranju DNA otopine kroz ultramembranu Centrikon® tubica. Membrana zadržava DNA, a u suprotnu stranu se doda TE pufer ili destilirana voda.
b) Izdvajanje DNA „Chelex® 100“ metodom je vrlo učinkovito kod uzoraka u kojima se očekuje minimalna količina DNA, a temelji se na kuhanju uzorka s tvorničkim pripravkom pod nazivom Chelex® 100. Nakon kuhanja, Chelex® 100 se veže za ione, uklanja skupa s molekulama na koje je vezan i ostaje čista DNA.
c) „Qiagen“ metoda izdvajanja DNA je jedan od najpouzdanijih i najjednostavnijih ekstrakcijskih kompleta. Postoji više varijanti koje se prilagođuju uzorcima. Princip rada zasniva se na osnovnim fazama digestije uz

proteinazu K koju joj omoguće kemikalije iz seta, transferiranju uzoraka na silika-membranu i pročišćavanju tako vezane DNA, te u konačnici, njezinom ispiranju u posebne tubice (1).

1.4.2. KVANTIFICIRANJE DNA

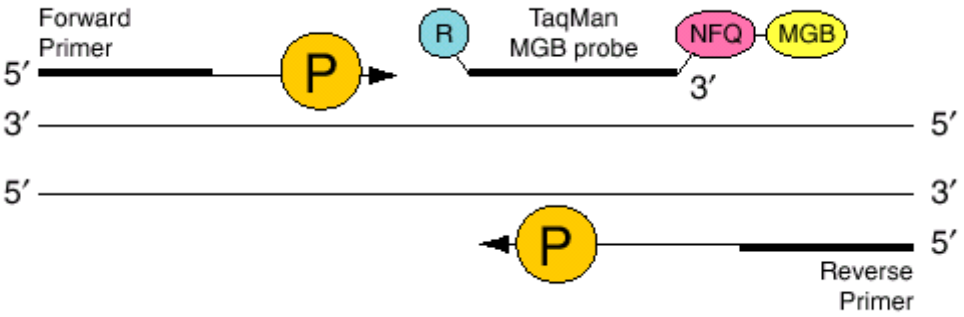
Ishod analize DNA uvelike ovisi o njezinoj kakvoći i količini. Metodama kvantifikacije utvrđujemo pravu količinu DNA za PCR analizu, ali i podrijetlo i čistoću (1). Kvantifikacija DNA osigurava optimalnu uporabu ograničenih količina DNA pronađenih u većini forenzičkih dokaznih materijala, kako se DNA ne bi potrošila u skupim ponavljajućim nizovima PCR analiza izvođenih sa neprikladnim brojem DNA predložaka (11).

Trenutačno jedna od najraširenijih metoda kvantifikacije izdvojene DNA jest hibridizacijska (slot-blot) metoda. To je komercijalna metoda koja se temelji na hibridizaciji sonde koja sadrži ulomke ljudske DNA. DNA izdvojena iz uzorka se najprije prebaci i imobilizira na membrani te se nakon toga veže s DNA-probom. Dobiveni rezultati se uspoređuju s pozitivnom kontrolom za koju postoje poznate koncentracije DNA. Postupak je složen, dugotrajan i dokazano je da katkad uzorci koji nisu kvantificirani u ovom tipu reakcije budu uspješno analizirani (1).

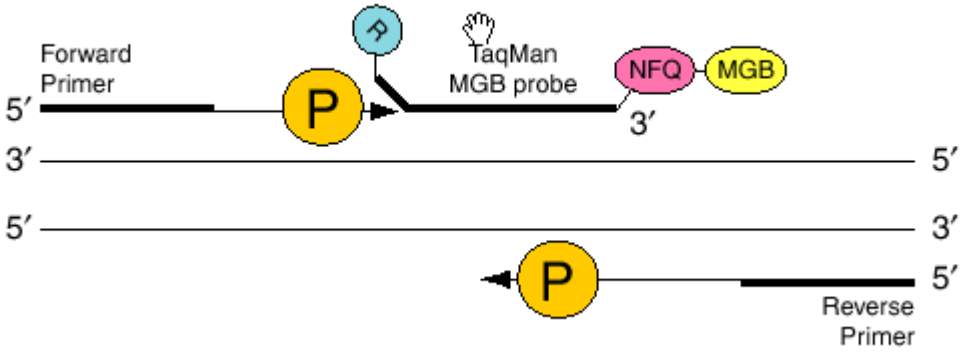
Uporabom kvantitativne PCR-reakcije u realnom vremenu (eng. *Quantitative real time PCR, QRT-PCR)*, uspješno se kvantificira ljudska DNA. Temelji se na detekciji i kvantifikaciji flourescentno obilježenog reportera čiji signal raste u izravnoj ovisnosti o povećanju broja kopija produkta u PCR reakcijskoj smjesi (1). QRT-PCR kvantifikacijski sustav je dokazano osjetljiv, pouzdan i veoma koristan u rutinskoj forenzičnoj DNA analizi, te može detektirati inhibitore koji su potencijalno prisutni u predlošcima. Kvantifikacija ljudske DNA sa kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (QRT-PRC) stekla je veliku važnost u forenzičnoj DNA i proučavanjima starih uzoraka DNA, te je postala esencijalna metoda osiguravanja kvalitete testiranja temeljenih na lančanoj reakciji polimeraze niskog broja kopija ili visoke razine oštećenosti DNA uzoraka (11, 12).

Tablica 1. Prikaz slijeda korištenog za kvantifikaciju ljudske DNA QRT-PCR-om.

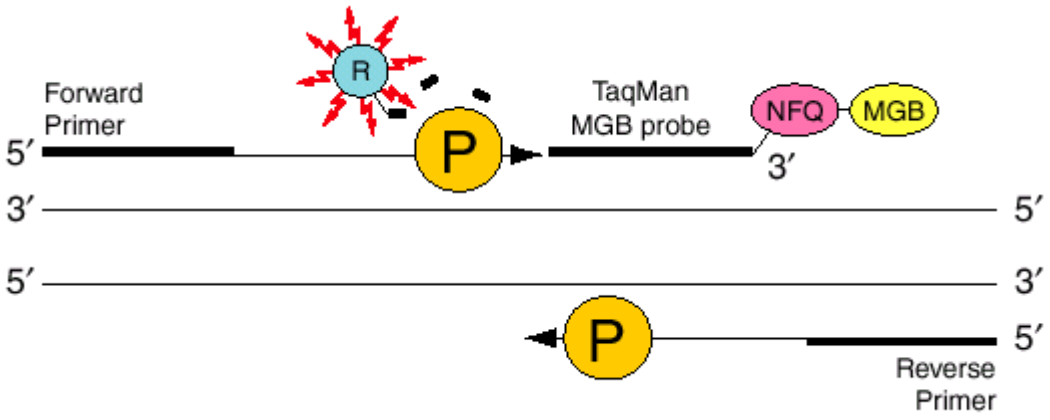
NAZIV		5' - SLIJED
RB1-2672 F	nDNA	CCAGAAAATAAATCAGATGGTATGTAACA
RB1-2750R	nDNA	TGGTTTAGGAGGGTTGCTTCC
RB1-2727	nDNA	FAM-CAGCACTTCTTTTGAGCACACGGTCG



Slika 2-1. Sadržaj proba za QRT-PCR reakciju.



Slika 2-2. Početak umnažanja ljudske DNA.

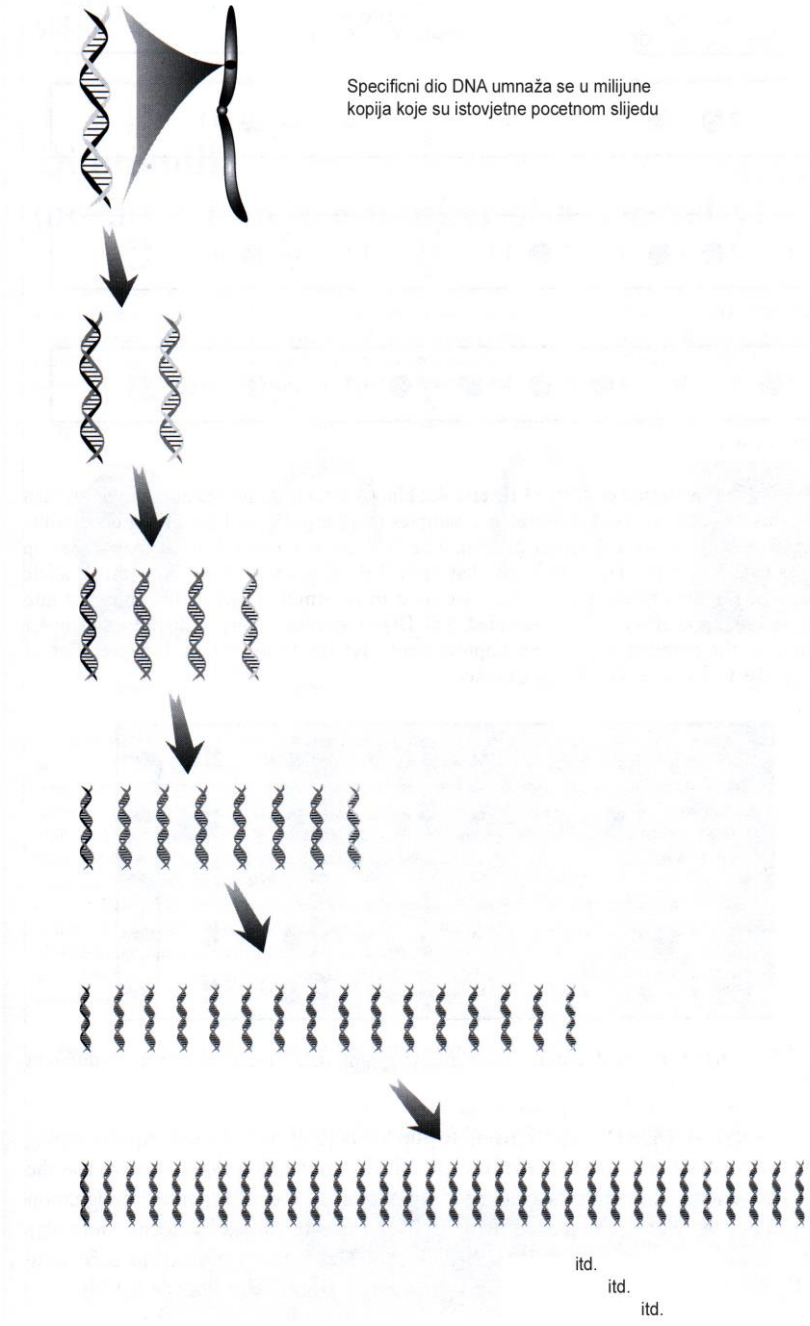


Slika 2-3. Tijek umnažanja ljudske DNA i oslobađanja fluorescentno obilježenog Reportera.

1.4.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZE (PCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) snažna je i osjetljiva analitička tehnika sa uporabom u mnogim poljima, uključujući molekularnu biologiju, kliničku dijagnostiku, populacijsku genetiku i forenzičku analizu (13). Nekoliko je koraka u procesu lančane reakcije polimeraze koje se, osim prema temperaturi, razlikuju i prema supstancama potrebnim za taj postupak. Prvi korak je zagrijavanje reakcije na temperaturu raspona 94-96°C koja se održava 1-9 minuta, nakon čega slijedi denaturacija, odnosno, zagrijavanje reakcije na 94-98°C u trajanju od 20-30 sekundi što uzrokuje pucanje vodikovih veza između baza i stvaranje jednolančane DNA. Spuštanje temperature na 50-65°C u trajanju od 20-40 sekundi omogućava vezivanje primera na jednolančani DNA predložak, što određuje učinkovitost i specifičnost PCR reakcije. Elongacija ili produljenje je sintetiziranje novog DNA lanca komplementarnog DNA predlošku uz pomoć enzima. Najčešće je to enzim Taq polimeraza, čija je optimalna aktivnost pri temperaturi od 75-80°C. Posljednji korak se odvija pri temperaturi raspona 70-74°C u trajanju od 5-15 minuta nakon posljednjeg PCR ciklusa, gdje enzim polimeraze provjerava da je svaka jednolančana DNA u potpunosti produžena. Nakon toga se, na temperaturi od 4-15°C uzorak može pohraniti na neko vrijeme.

Mogućnost analize malih količina ljudske DNA izoliranih iz starih kostiju i zuba metodama temeljenim na lančanoj reakciji polimeraze, pruža priliku identifikacije nepoznatih kosturnih ostataka putem komparativne genetičke analize pretpostavljene rodbine (6).



Slika 3. Prikaz lančane reakcije umnažanja specifičnog dijela DNA. Prilagođeno prema Rudin i sur.(14)

1.4.4. MULTIPLEKSNI STR-SUSTAVI

Genotipiziranje STR-a ili mikrosatelita predstavlja jednu od najpouzdanijih i izvodljivijih metoda DNA profiliranja u forenzičnoj istrazi i danas je ona osnovna metoda analize jezgrine DNA (15, 1). STR-sustavi za tipizaciju imaju mogućnost višekratne reakcije, odnosno, amplifikacije više lokusa istodobno, te izravne detekcije, pri čemu po jedna početnica od svakog para ima flourescentnu oznaku tako da je moguće razlikovati PCR-multiplekse prema različitim valnim duljinama svjetlosti (1).

Y-kromosomni STR (Y-STR) markeri se nasljeđuju s oca na sina, najvećim dijelom nepromijenjeni jer ne sudjeluju u rekombinaciji sa X kromosomom, pa genotipiziranje ove Y-specifične nerekombinantne regije (NRY) omogućava identifikaciju muške nestale osobe kada je jedina dostupna referenca muška rodbina s očeve strane, te može koristiti za praćenje roditeljske loze (4, 15). Unatoč manjoj sposobnosti razlikovanja u usporedbi sa autosomnim STR genotipiziranjem, Y-STR markeri su u širokoj uporabi u forenzičnim i populacijskim testovima (15). Čak i u slučajevima veoma degradiranih ljudskih ostataka iz masovnih grobnica starijih od 50 godina, Y-kromosomna i autosomna STR analiza može pridonijeti identifikaciji žrtava (4).

AmpFlSTR® Profiler™ Kit, AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit, AmpFlSTR® Cofiler™ Kit i *PowerPlex*™ 16 su jako osjetljivi mnogostruki sustavi za amplifikaciju STR-a, koji se mogu uspješno koristiti za dobivanje multilokusnog STR profila iz starih uzoraka kostiju i zuba sa minimalnom količinom ljudske DNA ili čak bez detektabilne ljudske DNA (6).

PowerPlex™ 16 je dvokomponentni komplet reagensa koji se sastoji od preamplifikacijskih komponenti i postamplifikacijskih komponenti koje sadrže sve kemikalije nužne za automatsku detekciju i analizu rezultata. Sustav dopušta koamplifikaciju i sadrži trobojnu detekciju 16 lokusa (1).

AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit je DNA identifikacijski komplet kojim se istodobno može analizirati 15 STR-lokusa. Osim što koristi nove boje, dodana mu je i peta, LIZ boja, koja obilježava *Size Standard* koji se sastoji od ulomaka duljine 500 pb (1).

1.4.5. DETEKCIJA

Detekcija se odvija nakon amplifikacije na nekom od analitičkih strojeva, a uporabom softvera se generiraju konačni genetički profili (1).

DNA sekvenciranje je proces utvrđivanja redoslijeda baza unutar landa DNA. Poznavanje DNA-sekvencije je preduvjet bilo kakvoj manipulaciji ciljanim segmentom nasljednog materijala. Postoji nekoliko tehnika sekveniciranja koje se međusobno razlikuju po osnovnim principima (1).

Sangerova metoda sekvenciranja zasniva se na zaustavljanju enzimske sinteze lanca DNA ugradnjom dideoksiribonukleozi-trifosfata. Sve generacije automatskih sekvencionera temelje se na Sangerovoj metodi (1).

Automatsko sekvenciranje trenutačno je najprimjenjivanija metoda analize DNA-sekvencija zbog brzine, jednostavnosti i širokog spektra primjenjivosti. Preduvjet za uspješno automatsko sekvenciranje je simultanost detekcije obilježenih ulomaka i procesa elektroforeze. Prednost u automatskoj detekciji imaju flourescentni biljezi. Krajnja detekcija zbiva se tijekom elektroforeze, prolaskom obilježene sekvencije kroz polje djelovanja detektora. Ovaj princip testiranja nasljednog materijala ponajprije se primjenjuje u procesu ispitivanja mtDNA i njezinih hipervarijabilnih regija (1).

S druge strane, analiza STR-molekularnih biljega podrazumijeva utvrđivanje broja ponavljanja određene kratke tandemski ponavljajuće jedinice. Zbog toga se obilježava bojom cijela početnica odabranog STR-lokusa (1).

1.5. UZORCI ZA ANALIZU

Problemi s kojima se forenzičari najčešće suočavaju prilikom rada s DNA izdvojenom iz uzoraka kosti i zubi iz masovnih grobnica ili sa mjesta velikih katastrofa, su mala količina DNA, visoka razina degradacije DNA, kontaminacija DNA, te prisutnost inhibitora (12).

Zubi imaju prioritet kao uzorak za analizu, ali kada lubanja ili zubi nisu pronađeni femur je, zbog svoje čvrste strukture, logičan izbor uzorka za DNA analizu. Zbog toga što su najveća i najjača kost u ljudskom kosturu, te su obično dobro očuvani, često se može uspješno izolirati DNA visoke kvalitete. Idealna situacija s očuvanim lubanjama, zubima i odgovarajućim brojem parova femura se rijetko pronalazi. Ako se identifikacija izvodi samo na temelju femura onda je logično prepoloviti broj uzoraka i ograničiti DNA analizu samo na lijevi ili desni femur. Iako je morfološki vrlo lagano razlikovati veće fragmente lijevog od desnog femura, problem se javlja kada jedan od femura nedostaje ili je uništen toliko da ne može poslužiti niti za usporedbu (3).

Kako bi se smanjila potrebna količina fragmenata kosti za identifikaciju, analiza kosti uključuje mjerenja dužine femura i dijametar femoralne glave, dijametre gornjeg šireg i donjeg šireg dijela fragmenata kostiju, te mjerenja gustoće i mjerenja mase i volumena fragmenata. Nakon ispitivanja kosti slijedi stvaranje baze podataka. Najčešće se koristi Trotterova jednadžba za izračunavanje visine tijela putem određivanja mjera bedrene kosti i dijametra femoralne glave, te se tako dobiva okvirna slika o fenotipu pokojnika. Vrlo često imamo samo dijelove femura, te u takvim situacijama nema načina da se sa sigurnošću spare lijevi i desni femur prema mjerenjima (3).

Jedan od problema sa izolacijom i tipizacijom DNA ljudskih ostataka iz masovnih grobnica je učestala teška degradacija, kao i posmrtna kontaminacija s bakterijama, gljivama, metalnim ionima i humusnom kiselinom. Ekstrakcija DNA iz tla uvijek rezultira izvlačenjem i drugih komponenti tla, uglavnom humusne kiseline i drugih humusnih supstanci, koje negativno interferiraju s procesom DNA detekcije. Dokazano je da dodavanje sintetičke humusne kiseline inhibira kvantitativni PCR u realnom vremenu (QRT-PCR). Ta inhibicija humusnom kiselinom se može ukloniti sa jednostavnim dodavanjem polivinil-polirolidon smole (PVPP). Također, više

koncentracije humusne kiseline uzrokuju lažno negativne rezultate, koji se mogu poništiti koristeći više Taq polimeraze (2, 11, 13).

2. CILJ RADA

- Opisati proces identifikacije osoba analizom DNA iz koštanih uzoraka.
- Istaknuti probleme izolacije DNA iz koštanih ostataka.
- Istaknuti probleme identifikacije žrtava rata zbog nemogućnosti prikupljanja uzoraka DNA pretpostavljene uže rodbine.

3. MATERIJALI I METODE

Najveći i najozbiljniji problem koji se javlja tijekom rada sa starim kosturnim ostacima jest, osim izuzetne pocijepanosti DNA molekule uslijed djelovanja bakterija i ostalih štetnih čimbenika okoliša, prisutnost moguće kontaminacije. U svrhu izbjegavanja moguće kontaminacije, u svim procesima ekstrakcije, umnažanja i vizualizacije DNA iz uzoraka, koriste se kemikalije visoke čistoće. Isto tako, koriste se sterilne i autoklavirane epruvete za jednokratnu uporabu. Laboratorijsko posuđe i pribor koji su korišteni u radu nisu za jednokratnu uporabu, oprani su na poseban način čime se spriječila kontaminacija DNA (10).

3.1. MATERIJALI

3.1.1.PRIBOR

Četkica za pranje uzoraka
Brusna četkica (disk)
Aluminijska folija
Polipropilenske tubice od 50 mL, Falcon
Polipropilenske tubice od 15 mL, Falcon
Papirići za vaganje
Nastavci za mikropipete s filterom, ART
Amicon Centricon 100 tubice
Kim Wipes
Eppendorf tubice od 1.5 mL

3.1.2. REAGENSI

Otopina hipoklorita (HOCl)

Destilirana voda

Ekstrakcijski pufer (5 mL 100 mM Tris-Cl pH 8.0; 5 mL 1 M NaCl; 25 mL 100 mM EDTA pH 8.0; 2.5 mL 10% SDS; redestilirana voda ad 50 mL)

Proteinaza K (20 mg/mL), Gibco BRL, Boehringer

Fenol/kloroform/izoamilni alkohol (25:24:1), Sigma

n-butanol

TE pufer

AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit

Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems

GeneScan™ –500 LIZ® Size Standard

3.1.3. INSTRUMENTI

Stolna bušilica

Grinder (usitnjavač)

Vorteks

Centrifuga

RT-PCR ABI Prism 7000 Sequence Detection System (7000 SDS)

GeneAmp® PCR System 9700

Eppendorf ThermoMixer® comfort

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

3.2. METODE

3.2.1. IZUZIMANJE UZORAKA

U radu je korištena bedrena kost. Za DNA analizu uzima se 5-20 g uzorka kosti, dok se za izolaciju izdvoji samo 2 g ili nešto manje, ovisno o protokolu (5). Površina kosti se očisti od ostataka mekog tkiva i tragova tla, te se lagano opere toplom vodom sa blagim detergentom i zatim ispere destiliranom vodom nekoliko puta i ostavi da se suši na zraku.

Dobro osušena kost se reže 2-3 mm duboko sa K9 tip 900 (KaVo Elektrotehnisches Werk, Leutkrich, Njemačka) kako bi se došlo do dijelova pogodnih za izolaciju DNA. Vrijeme rezanja (kontakt s kosti) ograničen je na 3 sekunde, jer bi duže izlaganje moglo dovesti do zagrijavanja kosti što bi rezultiralo brzim oštećenjem DNA.

Nakon što je kost izrezana na sitne kocke, uzorak se ispire u polipropilenskim tubicama (Falcon, 50 ml) sa 5% otopinom hipoklorita (HOCl), zatim u destiliranoj, deioniziranoj vodi (ddH_2O) 3-4 puta, te stavlja na sušenje sljedeća 24h na sobnoj temperaturi.

Nakon toga, svaki laboratorijski uzorak kosti stavljen je u tekući dušik 10 min i prebačen u komorice od čelika u kojima je smrvljen u fini prah. Zatim se prah važe u dvije Falconove tube, svaka sadržavajući 1 g uzorka. Ponavljajuća verzija smještena je u hladnjak na -20°C, a radni uzorak ide u proces izolacije DNA (4, 5, 6, 10).

3.2.2. IZOLACIJA DNA

Radni uzorak prođe kroz postupak dekalcifikacije kako bi se otopio kalcij i nečistoće koje mogu interferirati sa DNA prilikom procesa umnožavanja. Korišteni protokol rada:

1. u radni uzorak doda se 20 ml tvorničke EDTA (UltraPure, 0.5 M, pH 8.0);
2. uzorak se smješta u hladnjak na +4°C 3-5 dana na automatski rotor;
3. centrifugira se 5 minuta na 5000 rpm;
4. odbacuje se supernatant i dodaje ddH_2O do 30 mL, centrifugira se 5 minuta na 5000 rpm;

5. odvaja se supernatant i vraća u centrifugu 2 minute na 5000 rpm;
6. ponovno odvojimo supernatant i na taj način je uzorak spreman za postupak izolacije (6).

Vitalan korak u DNA analizi je izolacija DNA. Standardna izolacija fenol/kloroform/izoamil alkoholom, upotpunjena s drugim metodama i modifikacijama, se pokazala kao najučinkovitija metoda za ovaj korak (5). Korišteni protokol rada:

1. u polipropilensku tubicu doda se u uzorak 3 mL ekstrakcijskog pufera (100 µmol/L Tris-Cl, pH 8.0; 100 µmol/L NaCl; 50 µmol/L etilendiamintetraoctene kiseline [EDTA], pH 8.0; 2.5 mL 0.5% natrij dodecil-sulfat [SDS]), 150 µL proteinaze K i 50 µL ditiotreitola (DTT);
2. dobro se protrese i inkubira 48 sati u vodenoj kupelji na 56°C uz protresivanje;
3. nakon inkubacije, uzorku se doda 3 mL smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1;
4. centrifugira se 3 minute na 5000 okretaja, te se gornji sloj prebaci u čistu polipropilensku tubicu (Falcon od 15 mL);
5. doda se ponovno 3 mL smjese fenol/kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 25:24:1;
6. centrifugira se 3 minute na 5000 okretaja, gornji sloj se prebaci u čistu prolipropilensku tubicu;
7. doda se 3 mL n-butanola, promućka, te centrifugira 2 minute na 5000 rpm;
8. odbaci se gornji sloj, a donji se prebaci u Amicon Centricon 100 tubicu;
9. centrifugira se 30 min na 2600 rpm;
10. odbaci se donji sloj, a u gornji se doda ddH_2O do vrha tubice. Centrifugira se 15 minuta na 2600 rpm. Postupak se ponovi dva puta;
11. gornji dio Amicon Centricon 100 tubice se okrene u inverzni položaj i centrifugira 2 minute na 2600 rpm;
12. filtrat se prebaci u označenu Eppendorf tubicu od 1,5 mL, te je spreman za PCR (6, 10).

3.2.3. INSTRUMENTALNE TEHNIKE U DNA ANALIZI

3.2.3.1. PRIPREMA ZA PCR i PCR

U pripremi uzorka za PCR korišten je AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification kit koji sadržava: AmpFlSTR® Identifiler® Plus Master Mix, AmpFlSTR® Identifiler® Plus Primer Set i AmpFlSTR® Identifiler® Plus Control DNA 9947A.

Nakon uspješne izolacije, pošto smo uzorak stavili u Eppendorf tubicu od 1,5 mL, dodajemo:

AmpFlSTR® Identifiler® Plus Master Mix- 2,5 μL
AmpFlSTR® Identifiler® Plus Primer set- 1,25 μL

Također, potrebno je napraviti C-kontrolu za provjeru točnosti analize. Nju napravimo sa istim reagensima i u istim količinama, osim što umjesto uzorka dodajemo:

AmpFlSTR® Identifiler® Plus Control DNA 9947A- 0,5 μL
ddH_2O- 2 μL

Nakon izmiješanih sastojaka, uzorak i C-kontrolu stavljamo u PCR čiji protokol namjestimo manualno. PCR protokol u ovom postupku:

1. 11 minuta na 95°C;
2. 20 sekundi na 94°C;
3. 3 minute na 59°C;
4. 10 minuta na 60°C;
5. Na +4°C do pripreme za sekvenciranje (1, 5, 16) .

3.2.3.2. PRIPREMA ZA ODJELJIVANJE UMNOŽENIH FRAGMENATA

Nakon PCR rekacije, u posebne tubice stavlja se:

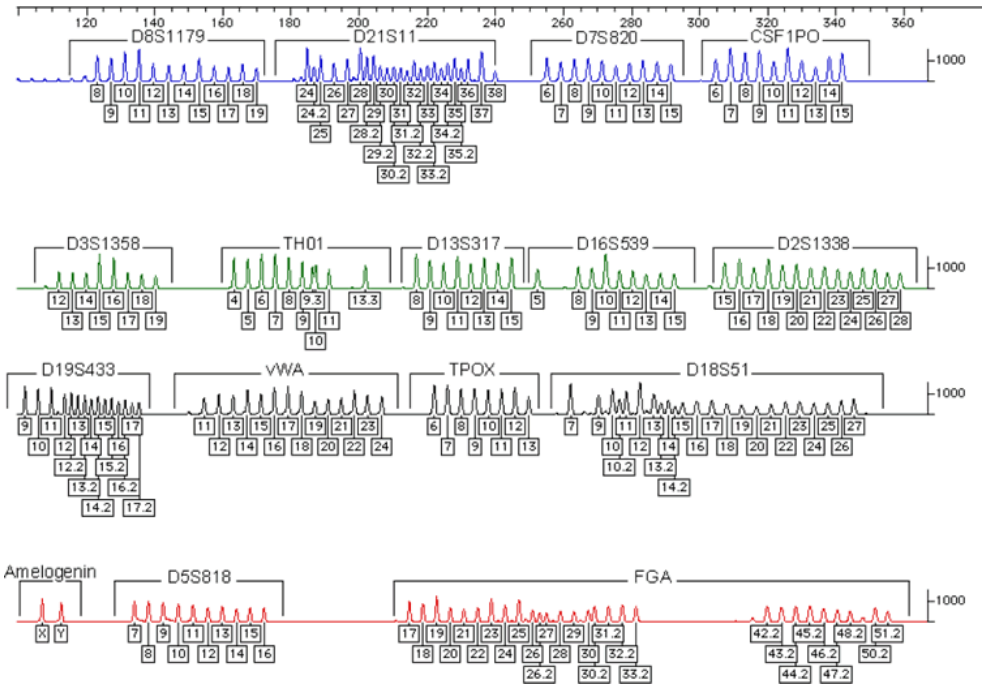
Formamid- 12 μL
Standard LIZ 500- 0,5 μL
uzorak- 2,5 μL

Nakon miješanja, uzorak stavljamo u Eppendorf ThermoMixer® comfort na 3 minute kako bismo doveli DNA do denaturacije. Odmah iz Eppendorf ThermoMixer® comforta uzorak stavljamo u led na 3 minute.

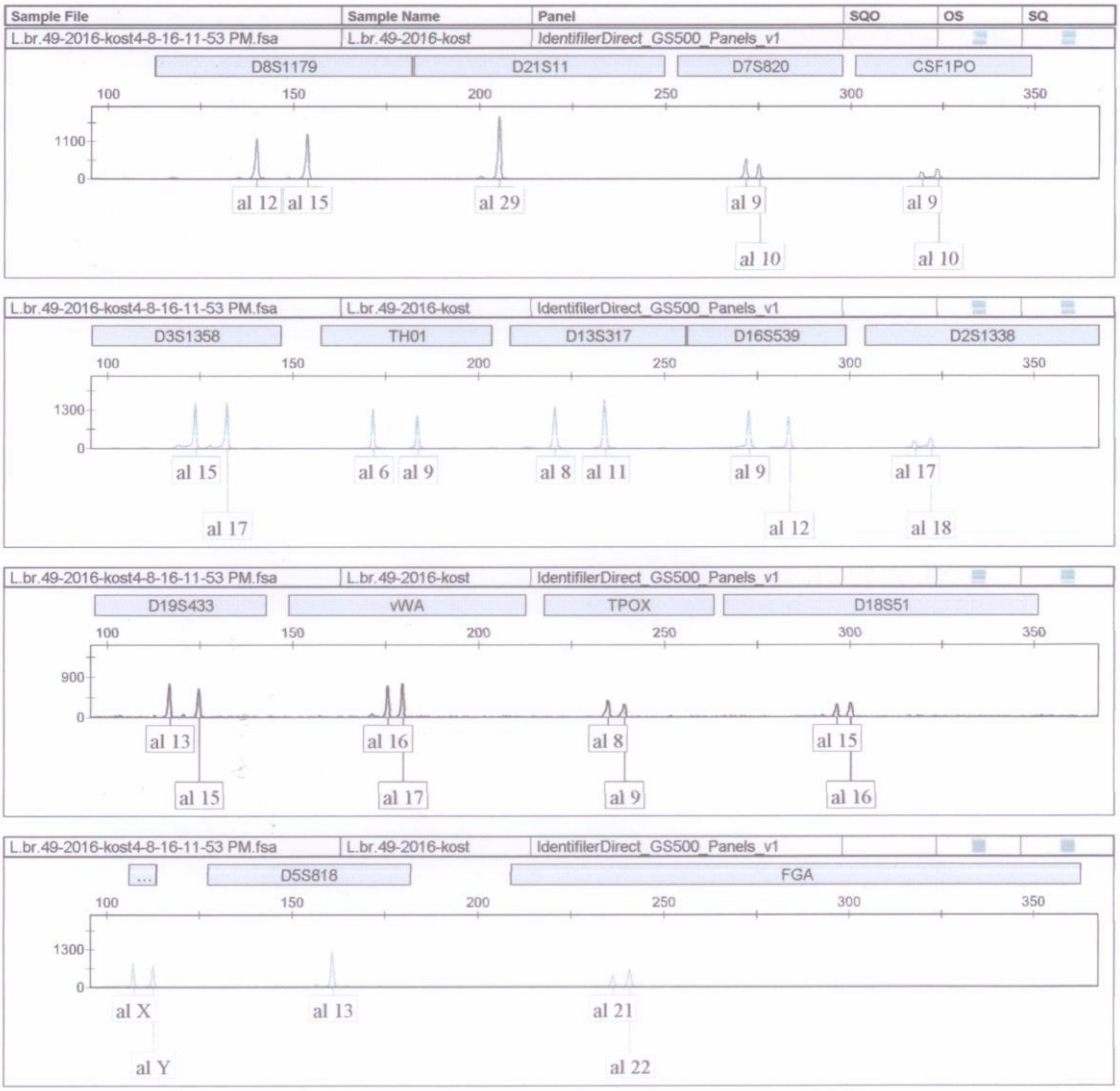
Cijela količina uzorka prebaci se u tubice za sekvencioner ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer. Sekvencioner ima zadani program sa određenim zadaćama, a vrijeme analize je 28 minuta.

4. REZULTATI

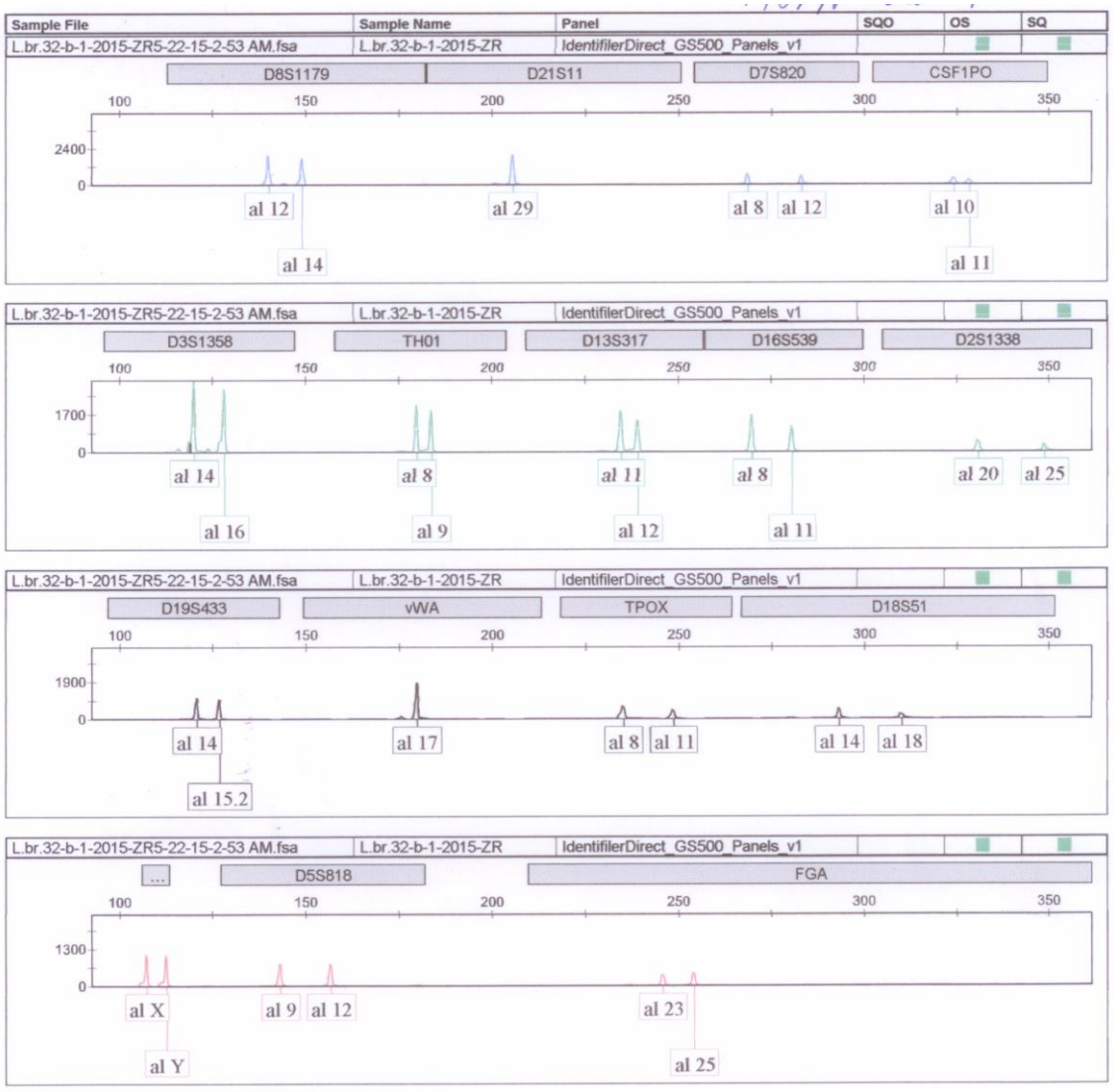
Autentičnost rezultata tipizacije mora se temeljiti na reproducibilnosti različitih PCR amplifikacijskih reakcija (sa različitim ulaznim DNA) iz barem dupliciranih DNA izvadaka (6).



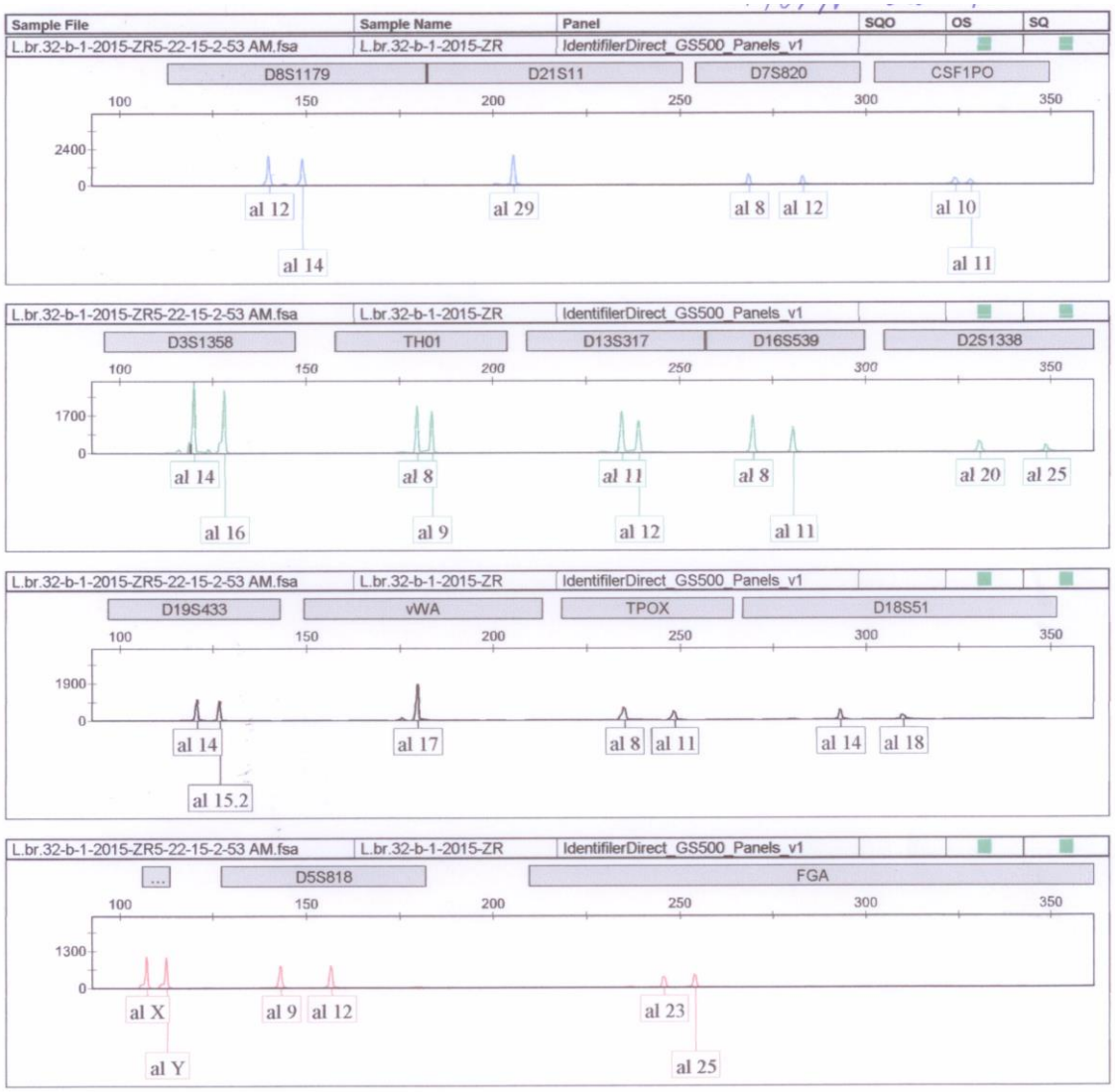
Slika 4-1. Prikaz ljestvice alela kompleta - AmpFlSTR® Identifiler® Kit. U sastavu se nalazi 15 biljega (*lokusa)* i lokus za određivanje spola - Amelogenin. U svakom lokusu naveden je popis mogućih alela.



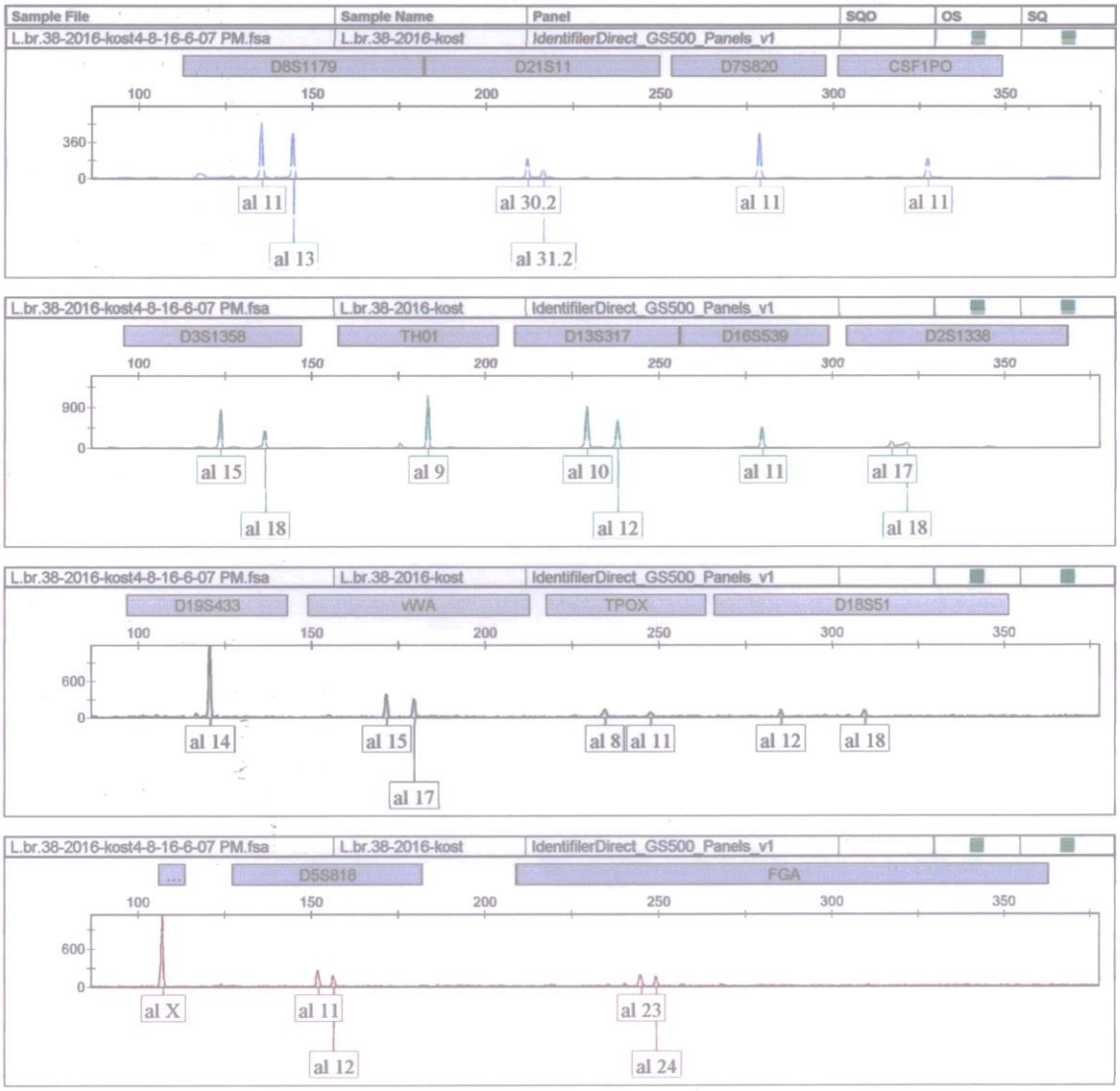
Slika 4-2. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka muške osobe umnožene u kompletu – AmpFlSTR® Identifiler® Kit.



Slika 4-3. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka muške osobe umnožene u kompletu – AmpFlSTR® Identifiler® Kit.



Slika 4-4. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka muške osobe umnožene u kompletu – AmpFlSTR® Identifiler® Kit.



Slika 4-5. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka ženske osobe umnožene u kompletu – AmpFlSTR® Identifiler® Kit.

Tablica 2. Prikaz rezultata analize 15 STR lokusa i gena za amelogenin.

LOKUSI	Kost NN	Krv -majka	Krv -sestra	Krv -sestra
D8S1179	8;13	12;13	13:13	13:13
D21S11	28;29	29;30	29:30	29:30
D7S820	9;9	9;9	9:11	9:11
CSF1PO	11;13	10;11	10:13	11:12
D3S1358	16;17	15;17	15:16	16:17
TH01	6;9,3	6;7	6:7	6:9,3
D13S317	11;13	11;13	11:11	12:13
D16S539	12;13	9;12	12:13	9:13
D2S1338	17;22	17;26	17:26	17:22
D19S433	14;15	14;14	14:15	14:16,2
vWa	17;18	18;19	14:18	17;18
TPOX	8;8	8;8	8;8	8;8
D18S51	11;13	11;16	13:16	13:16
D5S818	12;12	11;12	11:12	12:12
FGA	23;24	23;23,2	23:24	23:24
Amelogenin	XY	X;X	X;X	X;X

Rezultati analize:

Tablica br. 2 pokazuje rezultate analize za 15 ispitivanih STR lokusa i gena za amelogenin kojima su utvrđeni genotipovi za uzorke krvi pretpostavljene majke i sestara pokojnog xy. Rezultati analize gena za amelogenin utvrđuju za uzorak kosti genotip muške osobe. Usporedbom svakog pojedinog lokusa, određuje se što je pokojnik naslijedio od pretpostavljene majke, te što ima zajedničko sa sestrama. DNA rezultati analiziranog uzorka kosti podudaraju se s DNA rezultatima uzoraka krvi, te je utvrđeno da uzorci kosturnog ostatka pripadaju osobi xy kao sinu osobe xx.

Prema tome, vjerojatnost da je xx majka pokojnog xy je 99,986672%.

5. RASPRAVA

Dobro organiziran terenski rad i pažljivi postupci u obdukcijskoj sali mogu „ispričati priču“ o posljednjim trenucima života žrtava, dok je identifikacija žrtve isključivo u domeni DNA analize (4).

Iznimno je važno pobrinuti se o tijeku cjelokupnog procesa i izvoditi svaki dio analize u predviđenom vremenu jer neke studije pokazuju da, ukoliko se neki dijelovi analize ne obave u određenom vremenu, možda kasnije neće moći biti izvedeni (zbog uništenja lokacije ekshumacije, lošeg rukovanja uzorcima ili nekih drugih postupaka) (3).

Najčešće se koristi kombinacija različitih metoda DNA analiza čiji odabir ovisi o prethodno skupljenim podacima, uzorcima, razdoblju iz kojeg potječu, lokaciji iz koje su ekshumirani ostaci i dostupnosti uzoraka pretpostavljene rodbine.

Neki autori tvrde da razlika u odjeći i nakitu pomaže u procesu identifikacije u skoro pola slučajeva. Također je dokazano da je izložba osobnih stvari iznimno korisna članovima obitelji jer ne moraju prolaziti kroz teško iskustvo ulaska u obdukcijsku salu zbog identifikacije ostataka (5).

Iako je kvaliteta izvađene DNA iz zuba obično bolja od DNA iz kostiju, dokazano je da kvaliteta DNA varira između vrste kosti. Također je dokazano da je kvaliteta DNA dobivene iz dužih kostiju veća od DNA izvađene iz lubanje ili rebara (5, 6).

Problemi koji se najčešće susreću pri radu s DNA dobivenom iz kostiju iz masovnih grobnica su ograničena količina DNA, degradacija i kontaminacija uzoraka, te posmrtne promjene (2). Metoda EDTA dekalcifikacije uklanja ione kalcija koji interferiraju sa DNA prilikom amplifikacije (5).

Humusna kiselina, kao PCR inhibitor, interferira s reakcijom (inhibirajući aktivnost polimeraze) i uzrokuje različite razine smanjene efikasnosti PCR-a. Nakon utvrđivanja da 4 μg/mL humusne kiseline u potpunosti inhibira QRT-PCR, dodavanje 50 U/mL Taq polimeraze se pokazalo kao optimalna količina za prevladavanje inhibicije (12). No, poznato je i da humusna kiselina nema utjecaja na izdvajanje DNA i PCR amplifikaciju putem klasične organske ekstrakcije (13). Koristeći klasičnu organsku ekstrakciju,

izbjegli smo problem interferencije humusne kiseline tokom PCR reakcije. Uzorci su obrađivani sustavima koji analiziraju autosomne STR lokuse, zbog manjeg protoka vremena od stvaranja masovnih grobnica do ekshumacije, te je veća mogućnost prikupljanja uzoraka potencijalne rodbine, pa nije potrebno praćenje obiteljskog stabla muškom linijom kako bi se mogla koristiti analiza Y-STR lokusa.

6. ZAKLJUČCI

1. Najveći broj pozitivnih identifikacija postići će se kombinacijom različitih metoda DNA analize.

2. U identifikaciji je vrlo značajna prethodno prikupljena dokumentacija, te se na temelju nje koriste određene metode analize.

3. Metodama temeljenim na PCR reakciji moguće je analizirati male količine ljudske DNA izolirane iz starih kostiju, te pozitivno identificirati nepoznate kosturne ostatke.

4. Metodom *neisključenosti slučajno odabranih roditelja iz opće populacije* uspješno se identificira žrtva, putem roditelja, određivanjem zajedničkih alela.

7. LITERATURA

1. Primorac D, Marjanović D. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.

2. Definis- Gojanovic M, Sutlovic D. Skeletal remains from World War II mass grave: from Discovery to Identification. Croat Med J. 2007 Aug; 48(4): 520-527.

3. Sutlovic D, Boric I, Zulim T, Vucinovic A. Identification process of skeletal remains from mass graves: Our experience and proposal guidelines. Legal Medicine. 2014 Nov; 17 (2015): 102-108.

4. Boric I, Ljubkovic J, Sutlovic D. Discovering the 60 years old secret: identification of the World War II mass grave victims from the island of Daksa near Dubrovnik, Croatia. Croat Med J. 2011 Jun; 52(3): 327-335.

5. Andelinovic S, Sutlovic D, Erceg Ivkosic, et al. Twelve- year experience in identification of skeletal remains from mass graves. Croat Med J. 2005 Aug; 46 (4): 530-539.

6. Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, et al. DNA typing from skeletal remains: evaluation of muiltiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. Croat Med J. 2001 Jun; 42(3): 260-266.

7. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. 3.izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 622-636.

8. Primorac D, Primorac D, Butorac SS, Adamovic M. Analiza DNA u sudskoj medicini i njezina primjena u hrvatskome kaznenopravnom sustavu. Hrvatski ljetopis za kazneno pravo i praksu. Zagreb; 2009. Vol.16, broj 1/2009, str.3-26.

9. Brown TA. Genomes. 1st ed. BIOS Scientific Publishers Ltd; 1999.

10. Ljubković J. Obilježja ranosrednjovjekovnih i današnjih stanovnika južne Hrvatske analizom mitohondrijske DNA. Doktorska disertacija. Zagreb; 2011.

11. Sutlovic D, Definis- Gojanovic M, Andelinovic S, Gugic D, Primorac D. Taq Polymerase Reverses Inhibition of Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction by Humic Acid. Croat Med J. 2005 Sep; 46(4): 556-562.

12. Sutlovic D, Gamulin S, Definis-Gojanovic M, Gugic D, Andelinovic S. Interaction of humic acids with human Dna: Proposed mechanisms and kinetics. Electrophoresis. 2008 Apr; 29: 1467- 1472.

13. Sutlovic D, Definis- Gojanovic M, Andelinovic S. Rapid Extraction od Human DNA Containing Humic Acid. Croatia Chemica Acta. 2007 Jan; 80(1): 117-120.

14. Rudin N, Inman K. Forensic DNA Analysis. 2nd ed. Berkeley, CA; 2001.

15. Ljubkovic J, Stipisic A, Sutlovic D, Definis- Gojanovic M, et al. Y-chromosomal short tandem repeat haplotypes in Southern Croatian male population defined by 17 loci. Croat Med J. 2008 Apr; 49(2): 201-206.

16. AmpFlSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification Kit; Dostupno na stranici: http://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600801 Pristupljeno 13.05.2016.

8. SAŽETCI

8.1. SAŽETAK

Cilj: Opisati proces identifikacije ljudskih ostataka pronađenih u masovnim grobnicama analizom DNA iz koštanih uzoraka, istaknuti probleme izolacije DNA i nemogućnosti prikupljanja uzoraka DNA pretpostavljene uže rodbine.

Metode: Nakon uzimanja uzorka koštanih ostataka, izvršena je DNA ekstrakcija klasičnom organskom ekstrakcijom. Zatim se poslije kontrole dobivene DNA, uporabom lančane reakcije polimerazom (PCR) umnože ciljni fragmenti DNA. Umnoženi se fragmenti vizualiziraju na ABI Prism 310 Genetic Analyzeru.

Rezultati: Analize 15 STR lokusa i gena za amelogenin utvrđeni su genotipovi uzorka kosti žrtve i uzoraka krvi pretpostavljene rodbine. Usporedbom podudarnih lokusa utvrđeno je da je 99,986672% vjerojatnost da je xy sin majke xx.

Zaključak: Zbog dostupnosti uzoraka pretpostavljene rodbine i postojanja dosta zaživotnih podataka o pretpostavljenim žrtvama Domovinskog rata, analiza koštanih uzoraka rađena je putem analize autosomnih STR-sustava. Identifikacija je izvršena usporedbom genotipa svakog kosturnog ostatka sa genotipovima u postojećoj bazi podataka.

Ključne riječi: DNA analiza, identifikacija, uzorci koštanih ostataka

8.2. ABSTRACT

Aim: Descirbe the identification of human remains found in mass graves with DNA analysis of skeletal samples, underlain problems with DNA isolation and impossibility of gathering DNA samples from assumed close relatives.

Methods: After taking bone samples, DNA extraction is done by classical organic extraction method. Afterwards DNA control is done and by use of polymerase chain reaction (PCR) target fragments of DNA are amplified. Multiplied fragments are visualized on ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Results: With analysis of 15 STR loci and amelogenin gen, genotypes from victims bone samples and samples from assumed close relatives are established. Comparation of matching loci stated it is 99, 986672% probability that xy is son of mother xx.

Conclusion: Due to availabilty samples assumed close relatives and existence of pre-mortem data about assumed victims in 1991-1995 war, bone samples analysis is executed by autosomal STR- systems. Identification is done by comparation of genotype of every skeletal remain with genotypes in existing data base.

Key words: ostataka DNA analysis, identification, samples of skeletal remains, bone samples

9. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Ana Jančić

Datum rođenja: 17.05.1994.godine

Mobitel: 098/907-6965

e-mail: ana.jancic175@gmail.com

OBRAZOVANJE:

Osnovna škola „Ivana Brlić-Mažuranić“, Andrijaševci

Opća gimanzija „Matija Antun Reljković“, Vinkovci

Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu, Medicinsko laboratorijska dijagnostika

JEZICI: engleski jezik (polaznik jezične škole „Way Out“), njemački jezik

OSTALO: položen vozački ispit B kategorije, član literarne i likovne grupe kroz osnovnoškolsko obrazovanje, član Društva pisaca i pjesnika „Žubor slavonske riječi“ Cerna, te volonter u različitim organizacijama Vukovarsko-srijemske županije