

Identifikacija osoba analizom DNA iz koštanih uzoraka žrtava II. svjetskog rata

Zečić, Antonia

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:176:018712>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

ANTONIA ZEČIĆ

**IDENTIFIKACIJA OSOBA ANALIZOM DNA IZ KOŠTANIH
UZORAKA ŽRTAVA II. SVJETSKOG RATA**

Završni rad

Split, 2016. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

ANTONIA ZEČIĆ

**IDENTIFIKACIJA OSOBA ANALIZOM DNA IZ KOŠTANIH
UZORAKA ŽRTAVA II. SVJETSKOG RATA**

**IDENTIFICATION OF WORLD WAR II VICTIMS USING
DNA ANALYSIS OF BONE SAMPLES**

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

Prof. dr. sc. Davorka Sutlović

Split, 2016. godina

SADRŽAJ :

1. UVOD.....	1
1.1. Identifikacija	1
1.2. DNA.....	2
1.2.1 Nasljeđivanje DNA.....	3
1.3. Identifikacija iz koštanih ostataka žrtava rata	4
1.3.1. Postupak i metode ekshumacije i identifikacije	5
1.4. Identifikacija ljudskih ostataka DNA-analizom	8
1.4.1. Postupci analize DNA	8
1.4.2. Problemi identifikacije ljudskih ostataka DNA analizom.....	11
1.4.3. Uloga statističke vjerojatnosti u analizi DNA	12
2. CILJEVI RADA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Uzorak	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Priprema uzorka	16
3.2.2. Postupak izolacije.....	17
3.2.3. Kvantifikacija DNA.....	18
3.2.4. Umnažanje DNA	19
3.2.5. Detekcija PCR rezultata - razdvajanje umnoženih DNA fragmenata	19
4. REZULTATI	20
4.1. Primjer rezultata analize DNA	20
4.2. Rezultat analize DNA obrađivanog uzorka	22
5. RASPRAVA.....	25
6. ZAKLJUČCI.....	27
7. LITERATURA	28
8. SAŽETCI.....	30
8.1. Sažetak.....	30
8.2. Abstract	31
9. ŽIVOTOPIS.....	32

1. UVOD

Sudbina mnogih žrtava Drugog svjetskog rata ni nakon 70 godina još uvijek nije poznata. Identifikaciju, osim dugog vremenskog perioda od stradavanja do otkrića, otežavaju i loše sjećanje svjedoka, kvaliteta očuvanih podataka, ali i činjenica da mnoštvo masovnih grobnica sačinjavaju homogene grupe kao što su mladi muškarci u vojnoj uniformi. [1]

1.1. Identifikacija

Identifikacija označuje utvrđivanje istinitosti osoba, dijelova tijela, tragova i predmeta u svrhu otkrivanja pojedinih obilježja koja omogućuju nesumnjivo i neporecivo prepoznavanje. Proces identifikacije temelji se na dva osnovna postupka: prvi je traženje i bilježenje karakterističnih osobina objekta ispitivanja, a drugi je uspoređivanje utvrđenih značajki s već prije poznatim podacima o objektu za koji se identitet pretpostavlja. [2]

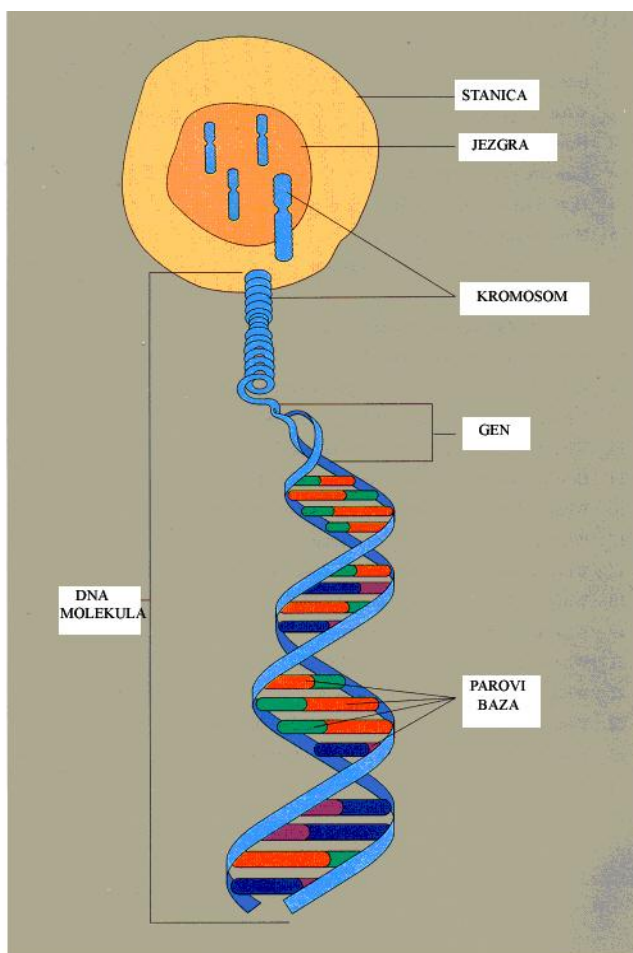
Identifikacija mrtvih osoba ili ljudskih ostataka odvija se u različitim situacijama i za sebe veže mnoga etička i pravna pitanja. Ipak, primarni cilj je pronaći nestalu osobu i odati počast mrtvoj osobi predajući je njezinoj obitelji i na taj način ispoštovati temeljna ljudska prava. Posebno značenje imaju ekshumacije i identifikacije žrtava rata, kako zbog donošenja mira žrtvi i njezinoj obitelji, tako i za dokazivanje ratnih zločina i pravnog progona odgovornih. [3]

Utvrđivanje identiteta mrtvih osoba ovisno o stanju tijela i okolnostima može biti jako težak i dugotrajan proces. Identifikacija je dodatno otežana ako se radi o velikom broju mrtvih osoba (masovne prometne nesreće, prirodne katastrofe, ratne masovne grobnice), problemu pridonose i poslijesmrtne promjene (zapaljena, unakažena, raskomadana, trula tijela). [2]

Zbog svega navedenoga metoda izbora u identifikaciji žrtava Drugog svjetskog rata ostaje DNA-analiza.

1.2. DNA

Molekula DNA (deoksiribonukleinska kiselina) nalazi se u stanici na dva mjesta, u jezgri (nukleusu) i mitohondrijima. Ukupna DNA jezgre smještena je u strukturama koje se zovu kromosomi. DNA je građena u obliku dvostruke uzvojnice, a čine je jedinice zvane nukleotidi koji su sastavljeni od šećera deoksiriboze, fosfata i četiri dušične baze: adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T). Lanci DNA sastavljeni od nukleotida povezani su fosfodieterskom vezom. Dva lanca postavljena su antiparalelno, savijena u spiralu i međusobno povezana vodikovim vezama između adenina i timina (A-T) te citozina i gvanina (C-G). Svaki pojedinačni kontakt između ovih jedinica predstavlja par baza (pb), a cijeli ljudski genom ima oko 3 milijarde parova baza. Izmjene baza ili razlika u broju ponavljanja parova baza koje imaju određeni redoslijed čine osnovu utvrđivanja identiteta osobe. [2,4]



Slika 1. Prikaz DNA uzvojnice.

1.2.1. Nasljeđivanje DNA

Genetički kod koji nosi jezgrina DNA zapisan je u genima; aktivnim segmentima koji se nalaze na točno određenom lokusu na lancu. Na svakom lokusu osoba posjeduje dva alela, dva različita oblika istog gena. Jedan alel naslijeđen je od oca, a drugi od majke. Roditelji prenose osobine na potomke putem DNA. Svaki čovjek posjeduje 23 para, odnosno 46 kromosoma, 23 od majke i 23 od oca. 22 para kromosoma su autosomalna i homologna, a jedan par je spolni te označava muški (XY) ili ženski (XX) spol. Jezgrina DNA nasljeđuje se podjednako od oba roditelja, a mitohondrijska DNA (mtDNA) izravno putem majčine linije. Majka na svoju djecu prenosi jednak slijed nukleotida mtDNA, a samo kćeri taj slijed prenose dalje na svoju djecu. Kromosom Y osim za određivanje spola pruža i bitne informacije pri utvrđivanju identiteta ili dokazivanju očinstva s obzirom na to da se nasljeđuje samo muškom linijom i muška osoba preko Y kromosoma nasljeđuje genotip identičan svojim precima. Pri analizi DNA bitno je spomenuti da se ona temelji na činjenici da se svaka osoba razlikuje samo u 0,5% DNA, no ti dijelovi sadrže mnoštvo razlika u slijedu nukleotida. Stoga se molekula DNA može koristiti kao jedinstven biljeg svake osobe i osnovna metoda identifikacije. [2,4]

1.3. Identifikacija iz koštanih ostataka žrtava rata

Proces identifikacije postaje složeniji u ratu i poslije njega zbog velikih migracija civilnog stanovništva, vojne pokretljivosti, prekida evidencije stanovništva, istovjetne vojne odjeće i obuće, namjernog uništavanja osobnih dokumenata, masovnih pogibija, velikog broja mrtvih u zajedničkim grobnicama, neodgovarajućeg pokapanja i iskapanja, premještanja tijela u sekundarne grobnice, dugog razdoblja od trenutka smrti do iskapanja sa znatnom truležnom izmijenjenošću ili skeletizacijom. Nadalje, zbog nepouzdatih identifikacijskih pokazatelja, postojanja samo pojedinih dijelova tijela ili fragmenata kostiju i nepostojanja zaživotnih podataka. [2]

Identifikaciju uzoraka iz masovnih grobnica dodatno otežava i uskraćivanje informacija o lokaciji grobova od strane pojedinaca i država u strahu od optužbe. Premještanje ostataka iz masovnih grobnica u sekundarne i tercijarne lokacije, rastavljanje dijelova tijela, miješanje i drobljenje također otežava određivanje broja i identifikaciju tijela. [3]



Slika 2. Koštani uzorci žrtve II. svjetskog rata. Izvor: arhiva KBC-a Split, Klinički zavod za patologiju, sudsku medicinu i citologiju.

Odgovornost društva moralno, a i zakonski, je vođenje točne evidencije broja stradalih i načina stradavanja, te stručno dokumentiranje događaja i postojanja zaživotnog ili poslijesmrtog nasilja zbog mogućih budućih sudskih sporova i dokazivanja ratnih zločina. Također, prema Ženevskim konvencijama za zaštitu žrtava rata, obitelj ima pravo doznati sudbinu svojih članova i pravo da im se na zahtjev vrate posmrtni ostatci umrlih i njihove stvari. [2,5]

1.3.1. Postupak i metode ekshumacije i identifikacije

Ekshumacija i identifikacija posmrtnih ostataka odvija se pod nadzorom multidisciplinarnog tima stručnjaka sastavljenog od specijalista sudske medicine, policijskih istražitelja, kriminalističkih tehničara, sudskih antropologa, stomatologa, radiologa i medicinskih genetičara. Prije ekshumacije potrebno je prikupiti što više informacija o događaju i osobama čije je ostatke moguće pronaći. Za lociranje pretpostavljene grobnice veliku ulogu imaju izjave svjedoka, ali je uvijek potrebno obaviti preliminarni posjet lokaciji, označiti mjesto kopanja i učiniti probna sondiranja. U slučaju grobnica iz Drugog svjetskog rata pronalazak nije uvijek jednostavan. Osim što su ubijene osobe bacane u prirodne jame, jame iskopane na skrovitim mjestima, protutenkovske rovove i rijeke; u vrijeme tadašnje Federalne Države Hrvatske, od 6. srpnja 1945. uklonjena su sva obilježja sa mjesta ukopa tijekom rata i pristup tim mjestima je onemogućavan na mnogobrojne načine. [2,3]



Slika 3. Masovna grobnica iz razdoblja II. svjetskog rata s kosturnim ostacima koji su podvrgnuti analizi DNA u svrhu identifikacije. [4]

Svaka ekshumacija započinje fotografiranjem šireg i užeg područja, čišćenjem površinske vegetacije, obilježavanjem granica pretpostavljenog groba te pretragom površine u svrhu pronalaska mogućih dokaza. Prije početka ekshumacije često je kopanje probnih jama radi utvrđivanja granica ukopnog mjesta i sakupljanja korisnih podataka o terenu i sastavu zemlje. Površinski dio zemlje moguće je ukloniti uporabom teških strojeva, zatim se nastavlja ručnim kopanjem i uporabom finijeg pribora do potpunog uklanjanja zemlje oko posmrtnih ostataka i pridruženih mu predmeta. Položaj i međusobni odnosi grobova i okolnih detalja skiciraju se, ucrtavaju unutar pravilne mreže kvadrata ili geodetski snimaju u lokalnom ili državnom koordinatnom sustavu. Ljudski posmrtni ostatci se označuju brojevima, fotografiraju, skiciraju u svom položaju, te se bilježi stanje tijela i svega što se nalazi uz tijelo ili na tijelu. Nakon toga se posmrtni ostatci zajedno s pripadajućim predmetima stavljaju u obilježenu vreću i prebacuju na mjesto sudskomedicinske obrade ili identifikacije. [2]

Postoje različite metode identifikacije ljudskih ostataka ovisno o okolnostima slučaja i stanju tijela. Identifikacija započinje pregledom i opisivanjem odjeće, obuće i svih predmeta nađenih uz tijelo i na tijelu. Postupak se nastavlja vanjskim i unutarnjim pregledom i opisom tijela koji je mnogo detaljniji ako je riječ o relativno svježim leševima. Ako se radi o analizi skeletnih ostataka primjenjuju se razne antropološke metode i mjerenja na očišćenim i opranim kostima. Prvo se odredi radi li se o ljudskim kostima, ovaj korak je osobito težak ako se radi o sitnim fragmentima koji se lako zamijene s kostima životinja ili predmetima. Spol se najpouzdanije odredi pregledom zdjelice, lubanje i dugih kostiju. Nakon toga slijedi određivanje životne dobi. Kod mlađih osoba dob se lakše i preciznije odredi na temelju koštanih i zubnih promjena koje prate rast i razvoj, a kod odraslih dob se procjenjuje na temelju morfoloških i mikroskopskih promjena na kostima. Određuje se i zaživotna visina mjerenjem dugih kostiju, te se traže znakovi zaživotne traume ili patoloških stanja. U identifikaciji se primjenjuju i neke druge metode kao što su usporedba rendgenskih snimaka učinjenih prije i poslije smrti ili usporedba dentalnih obilježja. [2]

1.4. Identifikacija ljudskih ostataka DNA-analizom

U mnogim situacijama zbog opsežnog truljenja ili uništenja kostiju te nepostojanja prikladnih medicinskih ili dentalnih podataka uobičajene metode identifikacije (identifikacija putem žive osobe koja je poznavala pokojnika direktnom identifikacijom lica ili specifičnih obilježja, odgovarajućim otiscima prstiju ili dentalnim obilježjima) ne mogu se koristiti. U ratnim okolnostima, s velikim brojem mrtvih, uglavnom pokopanih u iste grobnice i nedostatkom zaživotnih podataka identifikacija je dodatno otežana. [6] Kad su u pitanju koštani ostaci iz Drugog svjetskog rata DNA-analiza se pokazala kao učinkovita, a u mnogim slučajevima i jedina primjenjiva metoda identifikacije. [7]

DNA-analiza zasniva se na usporedbi genomske ili mitohondrijske DNA izolirane iz uzoraka kosti ili zuba ekshumiranih tijela, odnosno posmrtnih ostataka, s DNA izoliranom iz uzorka krvi, brisa bukalne sluznice ili dlake pretpostavljene uže rodbine. Važna osobina DNA jest da je stabilna i ne mijenja se tijekom vremena, pa se pravilno pohranjen uzorak može usporediti s drugim uzorkom uzetim i nakon nekoliko godina. [2,8]

1.4.1. Postupci analize DNA

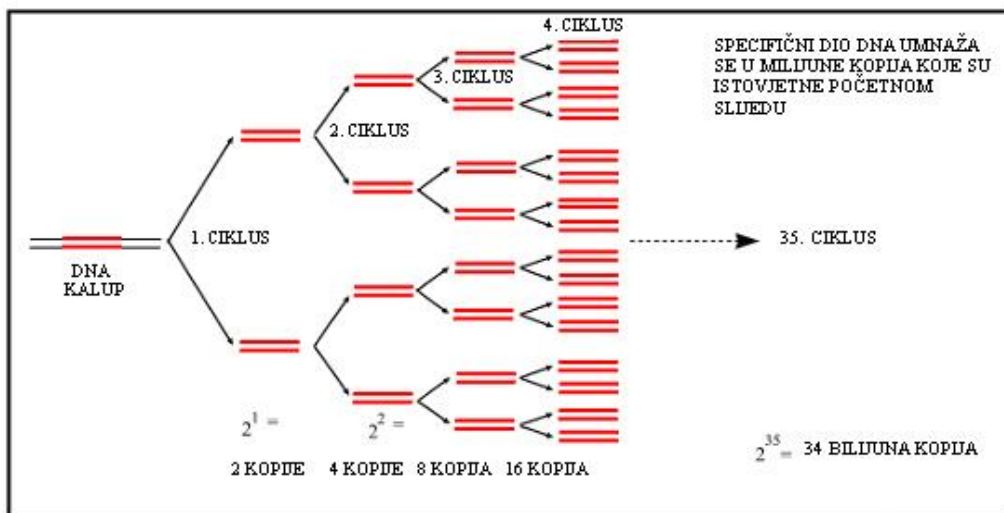
Uzorci kosti i zubi uzeti s terena dobro se očiste, operu i osuše, zatim se izrezivanjem uzima odgovarajući dio. [2] Zbog mogućnosti kontaminacije dnevno se izolira DNA samo iz jednog uzorka kosti. Odgovarajući odabir uzorka je ključan za uspješnu analizu DNA. Odabir ovisi o dostupnosti skeletnih elemenata i stanju posmrtnih ostataka, a forenzički stručnjak koristi vlastita znanja i procjene u odabiru odgovarajućeg uzorka. Poželjna težina uzorka kosti je 5-15 grama, a veći uzorci mogu osigurati bolju šansu za uspješnost analize DNA kod slučajeva gdje su posmrtni ostatci jako raspadnuti. Prilikom uzorkovanja fragmenata kosti treba izbjegavati područja gdje je kost izmijenjene boje, jer to može ukazivati na povećanu koncentraciju određenih metala u tlu i/ili visoku vlažnost u okruženju grobnice koji su možda rezultirali degradacijom DNA u uzorku kosti. [9]

Prvi korak je izolacija DNA iz uzorka. DNA se u stanici ne nalazi u čistom obliku, nego je udružena s brojnim drugim molekulama kao što su proteini, masti i druge kontaminirajuće supstance. Kemijske reakcije, kao npr. PCR, kojima će se umnožiti DNA ne mogu se odvijati u prisutnosti ovih molekula, zato ih je potrebno ukloniti. Za izolaciju DNA iz uzoraka kostiju

može se koristiti više različitih metoda, ovisno o praksi laboratorija. Međutim jedna od starijih je izolacija upotrebom organskih otapala. Tom metodom uklanja se velika količina proteina i ostalih molekula koje se oslobađaju pri izdvajanju DNA iz stanica, te izdvojena DNA ostaje sačuvana u velikim fragmentima i čišća nego nakon drugih ekstrakcijskih metoda. Tom metodom dobije se kvalitetna DNA u količinama dovoljnim za daljnju analizu. [2,8]

Izolacijom se dobije DNA koja bi trebala svojom kvalitetom i količinom osigurati dobivanje potpunog DNA profila. Ekstrakti DNA kostiju obično sadržavaju malu količinu DNA koja može biti i raspadnuta te sadržavati DNA bakterija, kvasaca i inhibitore. Zato se reakcijom kvantifikacije DNA određuje je li prisutna minimalna količina DNA potrebna za dobivanje uspješnog profila i jesu li prisutni inhibitori reakcije. Koncentracija humane DNA i prisutnost inhibitora uspješno se određuje uporabom kvantitativne PCR reakcije u realnom vremenu (Quantitative Real time PCR, QRT-PCR). [4,8]

Nakon kontrole dobivene DNA, uporabom lančane reakcije polimerazom (PCR) umnažaju se ciljni fragmenti DNA. PCR-lančana reakcija polimerazom metoda je kojom se ciljni slijed DNA umnaža u veliki broj istovjetnih kopija. Ta metoda posebno je pogodna za analizu razgrađenih, fragmentiranih dijelova DNA (koji su često iz koštanih ostataka), jer je moguće iz jedne kopije proizvesti milijarde DNA kopija koje su potpuno istovrsne početnom slijedu. Ciljni fragmenti DNA umnažaju se pomoću oligonukleotidnih početnica uz katalitičko djelovanje termostabilne DNA polimeraze. Izvor baza za sintezu su deoksinukleozid trifosfati (dNTP), a $MgCl_2$ služi kao koaktivator. PCR reakcija sastoji se od 3 osnovna koraka: denaturacije, hibridizacije i produljivanja lanaca. U fazi denaturacije koja se odvija pri visokoj temperaturi od $95^{\circ}C$ dolazi do razdvajanja polinukleotidnih lanaca. Zatim slijedi faza hibridizacije tj. povezivanja umjetno sintetiziranih i fluorescentno označenih DNA-početnica koje lociraju DNA-ulomke koji će biti umnoženi. U fazi produljivanja lanca komplementarne baze vežu se na slobodna mjesta uz aktivnost Taq-polimeraze. Nakon n ciklusa ciljni slijed umnožit će se 2^n puta. [2,3]



Slika 4. Prikaz lančane reakcije umnažanja specifičnog dijela DNA.

Ovisno o tome umnaža li se autosomalna ili mitohondrijska DNA, za umnažanje ciljnih fragmenata DNA koriste se različiti komercijalni sustavi. Također, razlikuju se i po broju uključenih lokusa koji se nalaze u datom komercijalnom sustavu. Jedan od njih je *AmpFLSTR Identifiler PCR* sustav koji u svom sastavu ima 16 lokusa od kojih je jedan Amelogenin kojim se određuje spol ispitivane osobe. Koristi se za uzorke koji bi se mogli identificirati putem DNA najbliže rodbine: roditelja, djece, braće ili sestara. Sustav *AmpFLSTR Yfiler PCR* koristi se za uzorke koji se mogli analiziraju putem DNA iz uzoraka rodbine naslijeđene muškom linijom.

Vizualiziranje tj. razdvajanje umnoženih DNA fragmenata, odvija se metodom kapilarne elektroforeze. Analiza umnoženih STR lokusa i određivanje genotipa uzorka odvija se u automatskom sustavu fluorescentne kapilarne elektroforeze za određivanje baznog slijeda, veličine i količine DNA fragmenta. Zahvaljujući populacijskim studijama moguće je statistički izraziti vjerojatnost da je osoba čiji je genotip dobiven iz uzorka nečiji krvi srodnik, te je moguće odrediti kolika je vjerojatnost nalaženja neke druge osobe s istim genotipom u određenoj populaciji. [8]

1.4.2. Problemi identifikacije ljudskih ostataka DNA analizom

Analiza DNA svakako je najtočnija metoda identifikacije, ali i ona ima svoja ograničenja. [2] Uspješnost identifikacije DNA-analizom ovisi o nekoliko čimbenika, a to su: količina uzorka, stupanj razgradnje DNA (poslijesmrtne degradacija), čistoća uzorka (zbog poslijesmrtne kontaminacije) i postojanje DNA uzoraka uže rodbine. Kada se DNA nađe izvan svog strukturnog okoliša ona je osjetljiva i podložna razgradnji, što utječe na rezultate analize. Vrijeme, temperatura, vlažnost, različite boje, svjetlo (UV i vidljivo svjetlo) te razna kemijska i biološka oštećenja narušavaju biološki integritet DNA. U slučaju DNA iz skeletnih ostataka pronađenih u masovnim grobnicama problem predstavljaju i truležna razgradnja te posmrtno onečišćenje DNA bakterijama, gljivicama, humusnim kiselinama, metalima i DNA nehumanog podrijetla. [4]

Osim količine, degradacije, kontaminacije DNA i posmrtnih promjena, problem u analizi DNA iz uzoraka kosti predstavljaju i inhibitori. Prisustvo inhibitora može utjecati na amplifikaciju DNA. Kod ovakvih uzoraka jedan od potencijalnih inhibitora je humusna kiselina. Prilikom ekstrakcije DNA uvijek će doći do ko-ekstrakcije drugih komponenata tla, uglavnom humusne kiseline ili drugih humusnih supstanci koje će negativno utjecati na proces detekcije DNA. [1]

Čak i u slučaju uspješne izolacije i dobivanja genotipa iz koštanog uzorka, veliki problem ostaje pronalazak najuže pretpostavljene rodbine za usporedbu uzorka DNA. U slučaju da skeletni ostatci pripadaju muškoj osobi, a pretpostavljeni roditelji su preminuli, osoba nema potomaka, a braća, sestre i rođaci su nedostupni u zadovoljavajućem broju, u identifikaciji je moguće koristiti analizu Y-STR-a. Y kromosom nasljeđuje se po muškoj liniji, s oca na sina, tako da identičan profil imaju sve muške osobe povezane s „očinskom rodbinskom linijom“. Odsutnost rekombinacije gena na 95% duljine ovoga kromosoma rezultira relativno malim stupnjem molekularne raznolikosti između biljega lociranih na njemu. Stoga se analiza Y kromosoma može koristiti kao dobra potvrdna metoda u slučajevima kada nema druge rodbine. Kao sustav za umnažanje DNA muške osobe često se koristi komplet *AmpFLSTR® Yfiler® PCR Amplification Kit*. [1,2]

Osim identifikacije putem Y kromosoma u mnogim slučajevima korisna je i identifikacija putem mitohondrijske DNA. Iako je STR analiza obično uspješna u velikom broju slučajeva, kao opcija u slučajevima neuspješne analize jezgrine DNA ostaje analiza mtDNA. [6] Mitohondrijska DNA nasljeđuje se putem majčine linije, te sva braća i sestre imaju slijed nukleotida mtDNA istovjetan slijedu nukleotida njihovih majki. Iz tog razloga se pri identifikaciji posmrtnih ostataka kao referentni uzorak mogu koristiti srodnici koji nisu dio najuže rodbine osobe čiji se identitet pokušava utvrditi. To mogu biti baka, majčina braća ili sestre, rođaci sa zajedničkom bakom ili čak prabakom itd. Druga velika prednost analize mtDNA je ta što je u odnosu na jezgrinu DNA povećana vjerojatnost izdvajanja dovoljne količine sačuvanih ulomaka DNA-molekula iz uzorka. Tome pridonosi činjenica da se u svakoj somatskoj stanici s aerobnim metabolizmom nalazi više stotina kopija mtDNA, te su ispitivani dijelovi mtDNA dugi samo tristotinjak parova baza što povećava vjerojatnost preživljenja ciljnog dijela molekule u težim uvjetima. [2]

1.4.3. Uloga statističke vjerojatnosti u analizi DNA

Razdioba roditeljskih genotipova u potomaka ovisi o kombinaciji alela u roditelja. Očekivana razdioba alela kod potomaka u različitim slučajevima sparivanja određena je Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Populacijskim studijama određenog područja određuje se učestalost pojavljivanja alela u nekoj populaciji. Svaka osoba u svakom ispitivanom lokusu posjeduje jedan ili dva alela (pika). Unutar određene populacije u svakom ispitivanom lokusu postoji određena učestalost (frekvencija) pojavljivanja svakog alela. Populacijskim studijama dobivaju se podatci o frekvencijama alela unutar te populacije, te se ti podatci koriste prilikom statističkog izračuna. Na taj način moguće je statistički izraziti kolika je vjerojatnost da je osoba čiji je genotip dobiven iz analiziranog uzorka nečiji krvni srodnik. Također je moguće odrediti kolika je vjerojatnost nalaženja neke druge osobe u određenoj populaciji koja ima isti genotip. Npr. ako je izračunom učestalosti pojavljivanja nekog alela na određenom lokusu unutar populacije određeno da je vjerojatnost pronalaska istog genotipa kao što je ispitivani genotip 1: 4 500 000, znači da postoji vjerojatnost pronalaska samo jedne osobe s tim genotipom u populaciji od 4 500 000 stanovnika. [2,4]

2. CILJEVI RADA

Ciljevi ovog rada su:

- Opisati proces identifikacije osoba analizom DNA iz koštanih uzoraka II. svjetskog rata.
- Istaknuti probleme izolacije DNA iz 70 godina starih koštanih ostataka.
- Istaknuti probleme identifikacije žrtava II. svjetskog rata zbog nemogućnosti prikupljanja uzoraka DNA pretpostavljene uže rodbine.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Pribor

Četkica za pranje uzoraka

Brusna četkica (disk)

Stolna bušilica

Grinder (usitnjivač)

Polipropilenske tubice od 50 ml, Falcon

Polipropilenske tubice od 15 ml, Falcon

Nastavci za mikropipete s filtrom, ART

Amicon Centricon 100 tubice

Kim Wipes

Eppendorf tubice od 1,5 ml

Reagensi

Otopina hipoklorita (HOCl)

Destilirana voda

Ekstrakcijski pufer

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

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

n-butanol

TE pufer

PCR reagensi za umnažanje u Identifiler sustavu

Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems

GeneScan™ –500 LIZ® Size Standard

Instrumenti

Mikrocentrifuga

Centrifuga

Ultrazvučna kupelj

GeneAmp® PCR System 9700

ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

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

3.1.1. Uzorak

U radu su korištene kost lubanje i bedrena kost (femur). Svi uzorci uzeti za obradu su fotografirani i propisno označeni: broj uzorka, datum, lokalizacija i druge napomene.



Slika 5. Prikaz korištenih koštanih ostataka.

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzorka

Prije ekstrakcije DNA uzorak kosti je dobro opran četkicom povremeno uronjenom u otopinu hipoklorita, pod mlazom tople vode. Na ovaj način s kosti se uklanjaju mogući ostateci mekog tkiva i tragovi zemlje. Dobro oprani uzorci kosti su zatim stavljeni sušiti u digestor preko noći. Sljedeći korak bio je usitnjavanje kosti. Kao podloga za bušenje korištena je alu-folija, a nastavci za bušenje prije stavljanja na bušilicu prethodno su dva puta oprani u otopini hipoklorita, dva puta u destiliranoj vodi te osušeni. Vizualnom procjenom određena je najbolja pozicija za uzimanje uzorka. Bušilicom je izbušeno nekoliko rupa na površinskom, kompaktnom dijelu kosti (do koštane srži), odabran se najoptimalniji dio kosti i usitnjen na manje fragmente. Usitnjena kost je zatim sakupljena u prethodno označenu polipropilensku tubicu od 50 ml. Oznaka pridodana ovom uzorku bila je 5/2016. Uslijedilo je vaganje uzorka, poželjno je da bude najmanje 3 grama uzorka. Nakon vaganja uzorak je ispiran više puta hipokloritom i destiliranom vodom. Oprani uzorci stavljeni su u digestor na sušenje preko noći. Sutradan je uslijedila pulverizacija kosti. Nakon tretiranja tekućim dušikom, uzorak je prebačen u metalnu komoricu (prethodno opranu dva puta u hipokloritu i dva puta u destiliranoj vodi) te čekićem samljeven u fini prah. [10] 1 g uzorka odvojen je u novu radnu epruvetu, a ostatak sačuvan u hladnjaku u slučaju ponavljanja postupka.

U uzorak je zatim dodano 20 ml 0,5 M EDTA, pH=8,0. Tako pripremljen uzorak ostavljen je u hladnjak + 4 °C na roleru. 24 sata. Metoda dekalifikacije uz pomoć EDTA koristan je korak u procesu izolacije DNA jer kalcijevi ioni mogu interferirati u procesu DNA amplifikacije. [6] Nakon 24 sata uzorak je centrifugiran na 5000 okretaja/5 minuta, pipetom je izbačen supernatant te je dodano 30 ml destilirane vode i ponovno centrifugirano na 5000 okretaja/5 minuta. Pipetom je ponovno uklonjen supernatant i uzorak je bio spreman za izolaciju.

3.2.2. Postupak izolacije

U ovom slučaju korištena metoda izdvajanja DNA je izdvajanje pomoću organskih otapala. Nakon EDTA dekalifikacije, u uzorak je dodano 3 ml ekstrakcijskog pufera (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 i redestilirana voda ad 50 ml) , 100 µl Proteinaze K i 30 µl DTT-a, uzorak je zatim bilo potrebno dobro protresti i promućkati te staviti na inkubaciju na 56°C, 48 sati u termoblok uz stalno potreskivanje. Korišteni pufer stvara uvjete u kojima Proteinaza K može obavljati svoju funkciju digestije proteina. Na ovaj način dolazi do razgradnje membranskih kompleksa unutar stanice i cjelokupna genomska DNA „slobodno pliva“ u novonastaloj suspenziji. [2]

IZOLACIJA DNA

Uzorak kosti
ili zuba

Izrezivanje fragmenata,
usitnjavanje, mljevenje, dodavanje
izolacijskog pufera i proteinaze K

Inkubacija 48 h na 56 °C

Centrifugiranje

Odbacivanje
gornjeg dijela

Niz izolacija smjesom
fenol kloroform izoamil alkohol,
centrifugiranje

Ukoncentriranje u
Microcon-100 cjevčicama

Otapanje DNA

DNA sa ili bez
inhibitora

Slika 6. Shematski prikaz izolacije DNA.

Nakon 48 h uslijedila je ekstrakcija fenol/kloroform/izoamilnim alkoholom. 3 ml fenol/kloroform/izoamilnog alkohola (25:24:1) dodano je u uzorak i centrifugirano na 5000 okretaja/3 minute. Supernatant je zatim prebačen u nove označene polipropilenske tubice te je isti postupak ponovljen još jednom. Ovoga puta supernatant nastao centrifugiranjem prebačen je u nove označene polipropilenske Falcon tubice od 15 ml. Ovim postupkom dobivamo „čistu DNA“. Otopina fenol/kloroform/izoamilni alkohol obara proteine i masti, a nakon toga dodani kloroform obara višak fenola i ostalih prljavština koje ostaju. [2]

Sljedeći korak je precipitacija DNA. U ovom slučaju radi se o alkoholnoj precipitaciji. 3 ml n-butanola dodano je u tubice, promućkano i centrifugirano na 5000 okretaja/3 minute. Nakon centrifugiranja DNA pada na dno tubice. Prilikom prebacivanja donjeg sloja tubice u nove Amicon Centricon filter tubice potrebno je smanjiti mogućnost kontaminacije n-butanolom gornjeg sloja. Iz ovog razloga pri svakom pipetiranju donjeg sloja korišten je novi ART nastavak, pri svakom ulaženju u Centricon tube nastavak je obrisao Kim Wipes papirom, te je pri ulaženju s nastavkom u donji sloj prvo istisnut zrak, pa tek onda uzet donji sloj. Ovako pripremljen uzorak centrifugiran je na 2600 okretaja/15 minuta. Nakon centrifugiranja odbačen je donji sloj koji je prošao filter te je u gornji dio dodana voda, te je centrifugiran na 2600 okretaja/15 minuta. Taj postupak ponovljen je još jednom. Nakon centrifugiranja 25 µl filtrata (DNA) je prebačeno u označenu Eppendorf tubicu od 1,5 ml i uslijedila je priprema za umnažanje DNA.

3.2.3. Kvantifikacija DNA

Kvantifikacija humane DNA napravljena je na RT-PCR ABI Prism 7000 Sequence Detection System (7000 SDS) instrumentu. Metodom kvantitativne PCR-reakcije u realnom vremenu (Quantitative Real time PCR, QRT-PCR) moguće je pratiti umnažanje humane DNA i odrediti prisutnost inhibitora i stupanj inhibicije. Osim primera, deoksinukleozid trifosfata i enzima Taq polimeraze uzorak sadržava još i fluorescentno obilježeni marker reagens (Reporter,R). Marker pokazuje koliko je DNA umnoženo i u kojem ciklusu. Koncentracija humane DNA proporcionalna je oslobođenoj koncentraciji markera. Ukoliko postoji inhibicija reakcije, umnožena količina DNA opada s povećanjem inhibitoriskog djelovanja, a broj ciklusa kod kojeg počinje umnažanje raste. Svaki uzorak u sebi sadrži i internu kontrolu (Internal Positive Control, IPC) koja se u normalnim uvjetima QRT-PCR reakcije umnoži. Ukoliko umnažanje interne kontrole izostane, a umnoži se humana DNA , onda je to znak da je u reakcijskoj smjesi prisutan neki od mogućih inhibitora. [11]

3.2.4. Umnažanje DNA

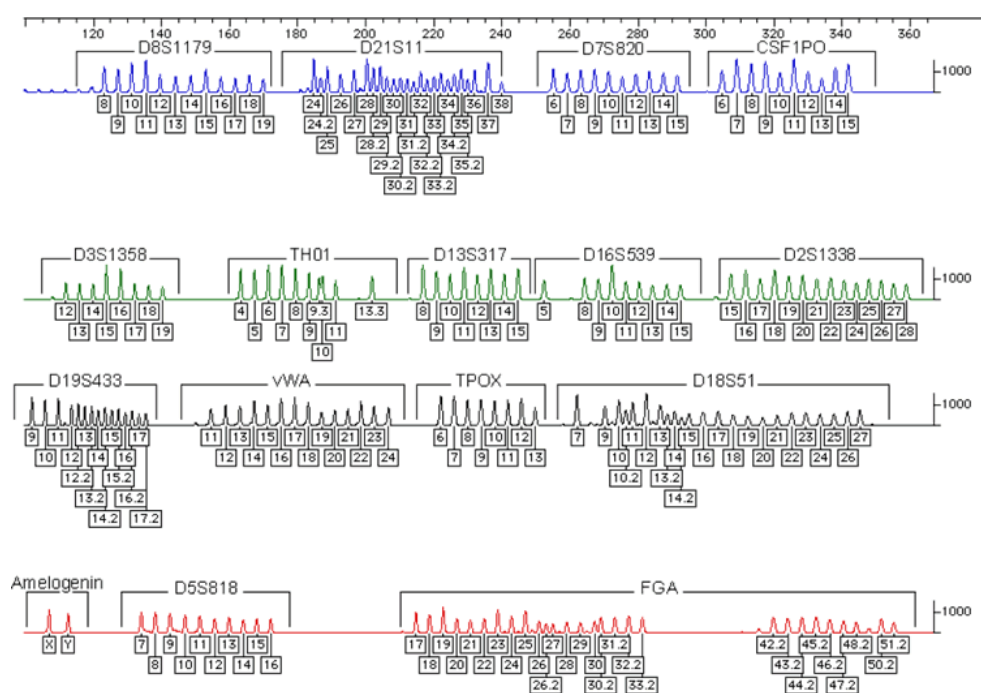
PCR amplifikacija obavljena je u GeneAmp® PCR System 9700 instrumentu. U uzorak dobivene DNA (25 µl) u Eppendorf tubice dodano je 3,75 µl mixa (2,5 mastermix+ 1,25 primer set). Uzorak je zatim kratko stavljen u mikrocentrifugu, potom postavljen u PCR. Za umnažanje korišten je *AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit*. Ovaj DNA identifikacijski komplet istodobno može analizirati 15 STR-lokusa i amelogenin (lokus za spol). Sustav se bazira na postojanju četiriju kompleksa početnica obilježenih različitim bojama. Umnoženi su lokusi: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO (obilježeni plavom bojom 6-FAM), D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338 (obilježeni zelenom bojom VIC), D19S433, TPOX, vWA, D18S51 (obilježeni crnom bojom NED) i lokusi amelogenin, D5S818 i FGA (obilježeni crvenom bojom PET). U *Identifileru* je prisutna i peta, narančasta boja LIZ kojom je obilježen *Size Standard* koji se sastoji od ulomaka duljine do 500 pb. [2]

3.2.5. Detekcija PCR rezultata - razdvajanje umnoženih DNA fragmenata

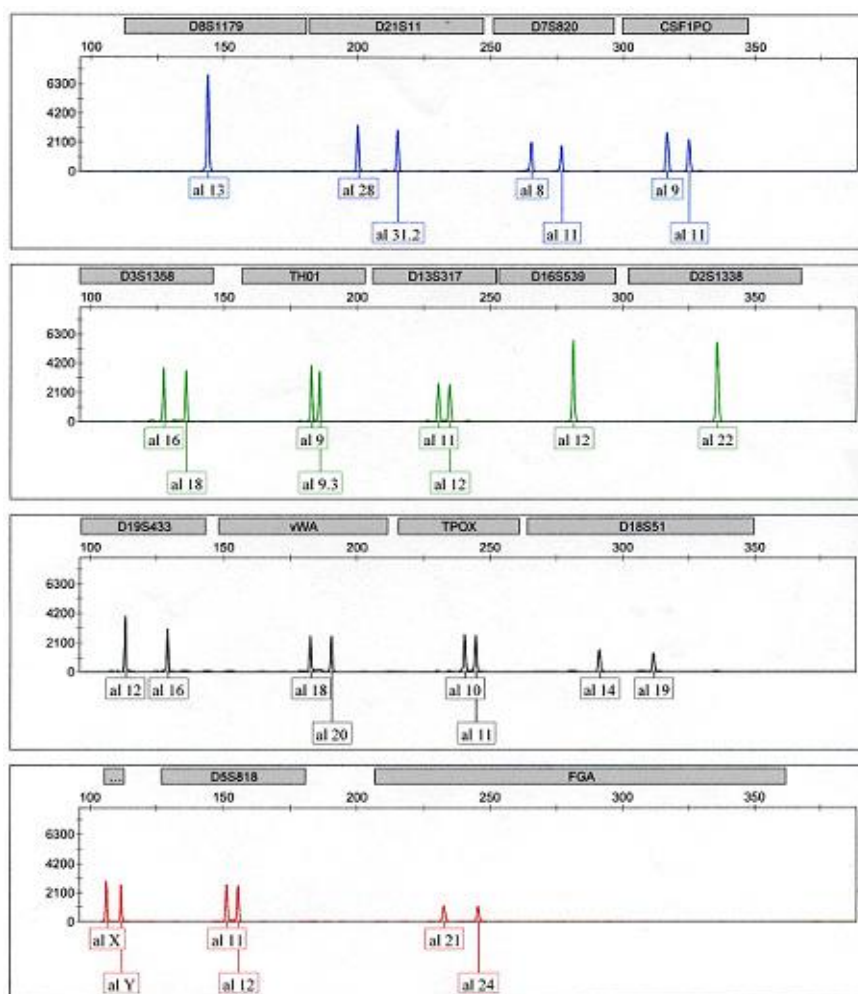
Detekcija PCR produkata obavljena je na ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). U 2,5 µl amplificiranog uzorka dodano je 12 µl formamida i 0,5 µl Liz 500 reagensa. Tako pripremljen uzorak stavljen je kratko u mikrocentrifugu zatim u Thermomixer na 95°C, 3 minute radi postizanja denaturacije, razdvajanja lanaca DNA. Nakon toga uzorak je stavljen 3 minute na led. Nakon hlađenja na ledu uzorak je prebačen u nove tubice. Prije postavljanja uzorka u instrument bilo je bitno pripaziti na mjehure zraka, koje bi igla mogla usisati i očitati krivi rezultat. Određivanje slijeda baza, veličine i količine DNA fragmenata unutar instrumenta odvija se metodom kapilarne elektroforeze. PCR produkti označeni su sa 5 različitih fluorescentnih boja koje se automatski unose u kapilaru za elektroforezu ispunjenu polimerom. Bojom označeni DNA fragmenti razdvajaju se po veličini. Prolaskom kroz kapilaru fluorescentna boja fragmenata pobuđena laserom emitira svjetlo pri valnoj duljini specifičnoj za svaku boju. Svjetlo se skuplja u kameru i spektrografom razdvaja prema valnoj duljini. Software interpretira rezultate računajući veličinu ili količinu fragmenata iz intenziteta fluorescencije. [12]

4. REZULTATI

4.1. Primjer rezultata analize DNA

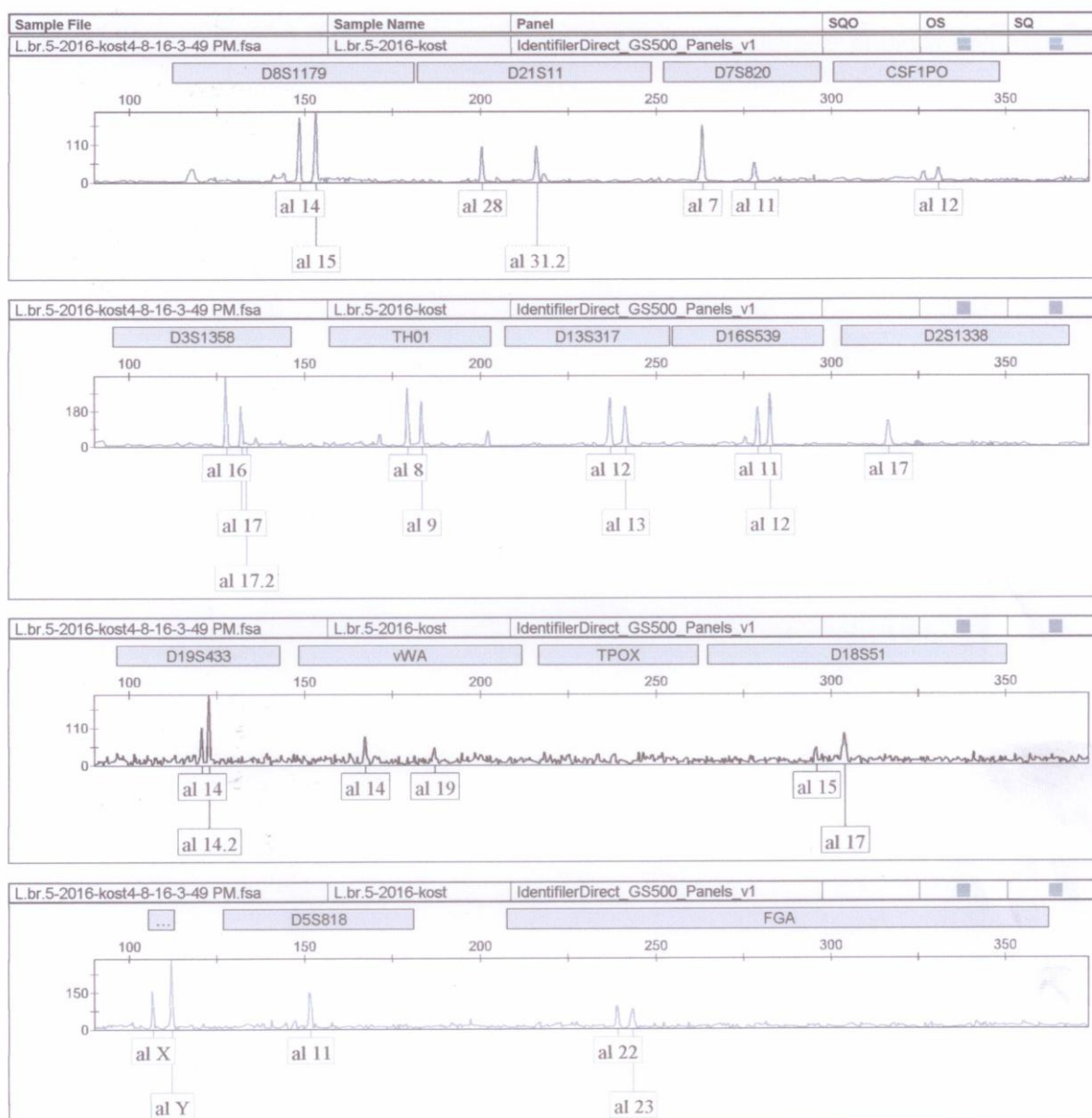


Slika 7. Prikaz ljestvice alela kompleta - *AmpFLSTR Identifiler Kit*. U sastavu se nalazi 15 biljega (*lokusa*) i lokus za određivanje spola - Amelogenin. U svakom lokusu naveden je popis mogućih alela.

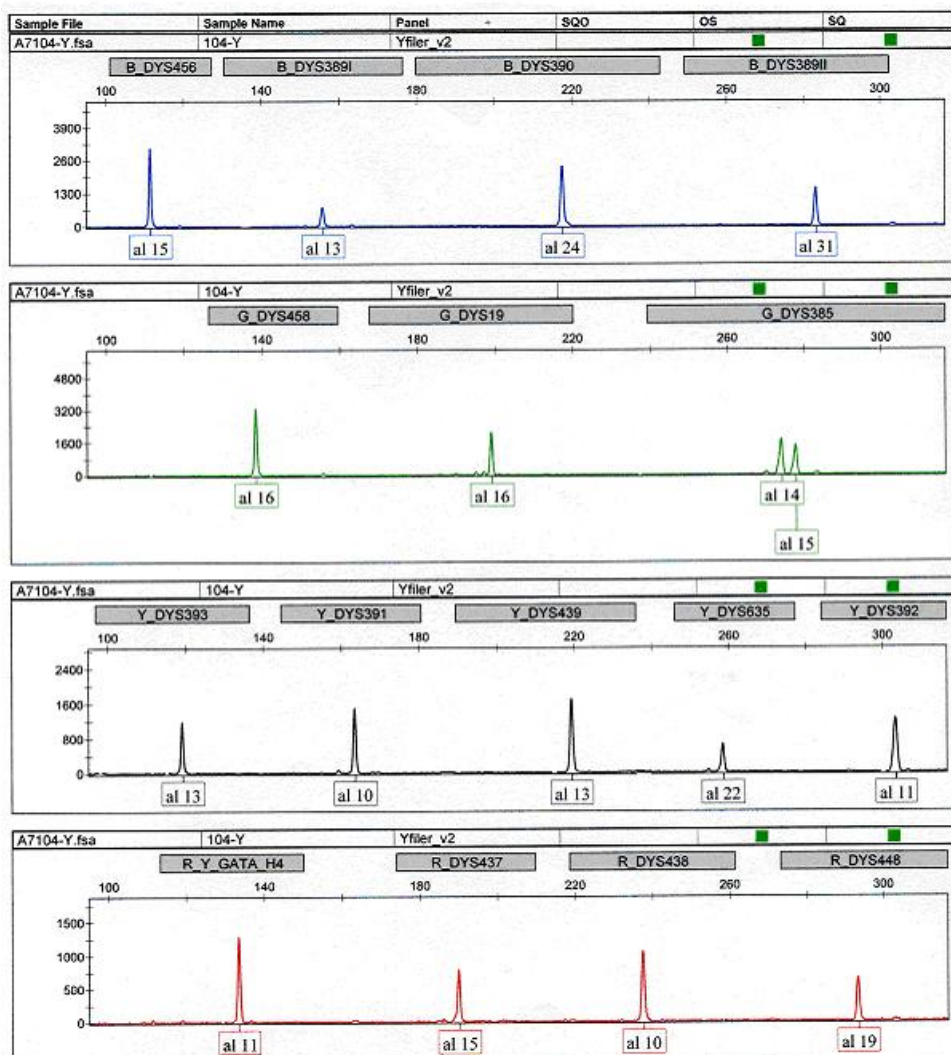


Slika 8. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz bioloških uzoraka muške osobe umnožene u kompletu – *AmpFLSTR Identifier Kit*.

4.2. Rezultat analize DNA obrađivanog uzorka



Slika 9. Prikaz rezultata analize DNA obrađivanog uzorka.



Slika 10. Prikaz rezultata analize DNA izolirane iz krvi muške osobe nakon umnažanja u kompletu - *AmpFISTR Yfiler PCR Kit*.

Tablica 1. Primjer pozitivne identifikacije osobe dobivene usporedbom DNA iz uzorka kosti s DNA iz uzoraka krvi najuže rodbine (2 brata)

LOKUS	DNA profil iz Krvi 1	DNA profil iz Kosti	DNA profil iz Krvi 2	Frekvencije alela u populaciji	Frekvencije alela u populaciji	UČESTALOST
DYS 456	15	15	15	0,642		0,41446236
DYS 389I	13	13	13	0,697		0,48792091
DYS 390	24	24	24	0,642		0,41446236
DYS 389II	30	30	30	0,349		0,12407299
DYS 458	17	17	17	0,459		0,21316419
DYS 19	15	15	15	0,220		0,050116
DYS 385	14;15	14;15	14;15	0,009	0,018	0,000324
DYS 393	13	13	13	0,903		0,81628491
DYS 391	11	11	11	0,624		0,39172224
DYS 439	13	13	13	0,321		0,10522059
DYS 635	23	23	23	0,569		0,32621339
DYS 392	11	11	11	0,908		0,82529936
Y GATA H4	11	11	11	0,633		0,40301211
DYS 437	15	15	15	0,615		0,38059275
DYS 438	10	10	10	0,697		0,48792091
DYS 448	19	19	19	0,495		0,24752475
VJEROJATNOST PRONALASKA ISTOG GENOTIPA 1 : 1,65x10¹¹						

5. RASPRAVA

DNA-identifikacijski komplet *AmpFLSTR Identifier Kit*, kakav je korišten u analizi obrađivanog uzorka, istodobno analizira 15 STR-lokusa i amelogenin. Primjer uspješne izolacije DNA i dobivanja potpunog DNA profila prikazan je na slici 8. Osoba nasljeđuje po jedan alel od oba roditelja. Ako osoba naslijedi isti alel od oba roditelja, onda se na tom lokusu nalazi samo jedan signal. Takav primjer vidljiv je na slici, npr. u lokusu D16S539 osoba je naslijedila alel 12 od oba roditelja. Ako osoba naslijedi različite alele, onda se u tom lokusu nalaze dva signala, npr. u lokusu D19S433 od jednog roditelja naslijeđen je alel 12, a od drugoga alel 16. [4]

Analiza obrađivanog uzorka kosti laboratorijskog broja 5/2016. rezultirala je nepotpunim DNA profilom (slika 9). Iako su na nekim lokusima uspješno dobiveni signali pojedinih alelnih inačica, neki su ispod granice detekcije, a neki su sasvim izostali. Također, očita je prisutnost dodatnih signala nespecifičnih PCR produkata. Izvor ovih dodatnih signala mogla bi biti kontaminacija s DNA bakterija ili kvasaca. [10] Ostali mogući razlozi dobivanja nepotpunog DNA profila su: DNA degradacija, DNA kontaminacija metalnim ionima i humusnom kiselinom te prisustvo inhibitora.

Ovako nepotpuni DNA profil nije moguće koristiti pri identifikaciji, te je analizu potrebno ponoviti s dodatnim koracima koji će osigurati uklanjanje potencijalnih kontaminanti ili inhibitora. Inhibicija je posebno značajan problem kod ekstrakcije DNA iz starih uzoraka. Prisustvo inhibitora kao što je humusna kiselina može rezultirati neuspjehom reakcijom QRT-PCR. Dokazano je da bi dodatak viška Taq-polimeraze u reakcijsku smjesu trebao rezultirati boljom QRT-PCR analizom uzoraka koji sadržavaju humusnu kiselinu. [13] Prisustvo humusne kiseline u uzorku potencijalno rezultira i inhibicijom PCR umnažanja DNA. Ipak, istraživanja su pokazala da dodatak PVPP-a (polivinil-polipirrolidon) reakcijskoj smjesi prije ekstrakcije rješava problem inhibicije umnažanja humusnom kiselinom. [14]

Osim problema vezanih za sam proces analize DNA, veliki problem u identifikaciji žrtava Drugog svjetskog rata predstavlja i pronalazak pretpostavljene uže rodbine za usporedbu DNA. Dug vremenski period od trenutka stradanja do procesa identifikacije otežava pronalazak najuže rodbine dovoljne za identifikaciju. U slučaju da su pretpostavljeni roditelji preminuli, osoba nema potomaka, a braća, sestre i rođaci su nedostupni u zadovoljavajućem

broju do izražaja dolazi važnost analize Y kromosoma. Muška osoba preko Y kromosoma naslijedi genotip identičan svojim predcima, te rođaci po muškoj liniji, kojima su daleki predci braća, posjeduju isti DNA haplotip. [4] Kao sustav za umnažanje DNA muške osobe često se koristi komplet *AmpFLSTR® Yfiler® PCR Amplification Kit*, te je primjer takve analize vidljiv na slici 10. Primjer usporedbe rezultata DNA umnožene u *AmpFLSTR Yfiler PCR Kit* sustavu i krvi najuže rodbine prikazan je u tablici 1. Usporedba je potvrdila da su ispitivani uzorci identični u svim umnoženim lokusima. Prema populacijskim studijama izračunate su učestalosti pojavljivanja svakog alela, te su ti podaci iskorišteni u statističkom izračunu. Zaključak je da DNA uzorak izoliran iz ispitivane kosti pripada XY osobi, kao bratu osobe čija je DNA izolirana iz uzoraka krvi i to s vjerojatnošću pronalaska iste osobe u općoj populaciji južne Hrvatske od 1: 1,6557 x 10¹¹.

6. ZAKLJUČCI

- Proces identifikacije osoba iz koštanih ostataka jako je dug i mukotrpan proces. Kada su u pitanju žrtve Drugog svjetskog rata taj proces postaje još složeniji zbog izuzetno loše očuvanosti skeletnih ostataka, ali i nepostojanja adekvatnih antemortalnih podataka za usporedbu.
- Unatoč velikom vremenskom periodu od trenutka smrti do ekshumacije, problemima truljenja, degradacije i kontaminacije, analiza DNA je metoda izbora u identifikaciji žrtava Drugog svjetskog rata.
- Analiza DNA je najpouzdanija i najtočnija metoda identifikacije osoba iz koštanih ostataka.
- U slučaju nedostatka bliže rodbine za usporedbu DNA kao dobra metoda identifikacije može poslužiti analiza Y kromosoma, s obzirom da identičan profil imaju sve muške osobe povezane s „očinskom rodbinskom linijom“.

7. LITERATURA

1. Definis Gojanović M, Sutlović D. Skeletal Remains from World War II Mass Grave: from Discovery to Identification. *Croatian Medical Journal*. 2007; 48:520-7.
2. Primorac D, i sur. Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada Zagreb; 2008.
3. Definis Gojanović M, Sutlović D. Sudska medicina i Drugi svjetski rat, s posebnim osvrtom na pobijene hercegovačke franjevce. Simpozij Stopama pobijenih, Široki brijeg; 2010.
4. Sutlović D, Definis Gojanović M. Priručnik o uporabi analize DNA u sudsko-medicinskoj praksi. Redak, Split, 2015.
5. Ženevske konvencije za zaštitu žrtava rata s dopunskim protokolima. Zagreb: Narodne novine, 1997.
6. Anđelinović Š, Sutlović D, Erceg Ivkošić I, Škaro V, Ivkošić A, Paić F, Režić B, Definis Gojanović M, Primorac D. Twelve-year Experience in Identification of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croatian Medical Journal*. 2005;46(4):530-9.
7. Marjanović D, Hadžić Metjahić N, Čakar J, Džehverović M, Dogan S, Ferić E, Džijan S, Škaro V, Projić P, Madžar T, Rod E, Primorac D. Identification of human remains from the Second World War mass graves uncovered in Bosnia and Herzegovina. *Croatian Medical Journal*. 2015;56:257-62.
8. Marić A, Definis-Gojanović M, Glavaš T. Tragom ubijenih hercegovačkih fratara. Mostar: Franjevačka tiskara, 2007.
9. International Commission on Missing Persons (ICMP). Standardne operative procedure za uzimanje uzoraka kostiju i zuba sa posmrtnih ostataka za analizu DNK u ICMP-u. Sarajevo, 2015.

10. Alonso A, Anđelinović Š, Martín P, Sutlović D, Erceg I, Huffine E, Fernández de Simón L, Albarrán C, Definis Gojanović M, Fernández-Rodríguez A, García P, Drmić I, Režić B, Kuret S, Sancho M, Primorac D. DNA Typing from Skeletal Remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR Systems on DNA Isolated from Bone and Teeth Samples. *Croatian Medical Journal*. 2001;42(3):260-6.
11. Ljubković J. Obilježja ranosrednjovjekovnih i današnjih stanovnika južne Hrvatske analizom mitohondrijske DNA. Doktorska disertacija. Zagreb, 2011.
12. ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer User Guide. Applied Biosystems. USA, 2001.
13. Sutlović D, Definis Gojanović M, Anđelinović Š, Gugić D, Primorac D. Taq Polymerase Reverses Inhibition of Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction by Humic Acid. *Croatian Medical Journal*. 2005;46(4):556-62.
14. Sutlović D, Definis Gojanović M, Anđelinović Š. Rapid Extraction of Human DNA Containing Humic Acid. *Croat. Chem. Acta* 80 (1) 117-120, 2007.

8. SAŽETCI

8.1. Sažetak

Ciljevi rada:

Detaljno opisati proces identifikacije osoba analizom DNA iz koštanih uzoraka II. svjetskog rata i istaknuti probleme izolacije DNA iz starih koštanih uzoraka te probleme pronalaska uže rodbine za usporedbu DNA.

Metode:

Izolacija DNA iz uzoraka kosti lubanje i femura provedena je standardnom fenol/kloroform/izoamilni alkohol ekstrakcijom. Prije ekstrakcije uzorci su tretirani metodom EDTA dekalifikacije. Kvantifikacija humane DNA napravljena je na RT-PCR ABI Prism 7000 Sequence Detection System instrumentu. PCR amplifikacija obavljena je u GeneAmp® PCR System 9700 instrumentu, a za umnažanje je korišten *AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit*. Umnoženi DNA fragmenti razdvojeni su na ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer instrumentu.

Rezultati:

Analizom koštanih uzoraka dobiven je nepotpuni DNA profil osobe. Identifikacija takvim profilom nije moguća, te je analizu potrebno ponoviti.

Zaključci:

Uzimajući u obzir dug vremenski period od trenutka stradavanja do ekshumacije, DNA analiza je metoda izbora u identifikaciji osoba iz koštanih ostataka. Bez obzira na probleme degradacije i kontaminacije, ona je najpouzdanija, najtočnija, a možda i jedina metoda identifikacije žrtava Drugog svjetskog rata.

8.2. Abstract

Aim:

To describe in detail the process of identification of skeletal remains from World War II victims using DNA analysis and to point out the problems of DNA isolation from old samples and the problems of finding close relatives for DNA comparison.

Methods:

DNA from skull and femur samples was isolated using standard phenol/chloroform/isoamyl alcohol extraction. EDTA decalcification procedure was performed before the extraction. DNA quantification was performed on a RT-PCR ABI Prism 7000 Sequence Detection System. The PCR amplification was performed on a GeneAmp® PCR System 9700, using the *AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification Kit*. Typing of PCR products was performed on an ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

Results:

Skeletal sample analysis resulted in an incomplete DNA profile. This kind of a DNA profile can not be used for identification and the samples must be reanalysed.

Conclusion:

Taking into consideration the time period from the moment of death to exhumation, DNA analysis is the method of choice in identification of skeletal remains. Regardless of the problems of degradation and contamination it is the most reliable, the most accurate and maybe the only method of identification of World War II victims.

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Antonia Zečić

Datum i mjesto rođenja: 6. studenog 1994., Split

Adresa: Dobrilina 6, 21 000 Split, Hrvatska

E-mail: antoniazecic@gmail.com

Telefon: 021/ 467 - 006

Mobitel: 091/ 786 - 3376

Obrazovanje:

2001. - 2009. Osnovna škola „Split 3“, Split

2004. - 2014. Učilište Jantar-ustanova za obrazovanje odraslih, engleski jezik

2009. - 2013. V. gimnazija „Vladimir Nazor“, Split

2013. - 2016. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Split

Strani jezici:

Engleski jezik – aktivno znanje

Talijanski jezik – pasivno znanje

Ostale aktivnosti:

2004. - 2011. ŽOK Split 1700, Split

Zahvala

Od srca zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na velikoj pomoći tijekom izrade ovoga rada.

Također zahvaljujem gospođi Boji Režić za pomoć prilikom obavljanja eksperimentalnog dijela rada.