

АНАЛИЗА ДНК ИЗ ХУМАНИХ СКЕЛЕТНИХ ОСТАТАКА

Божана Филиповић, Стојко Видовић, Зоран Обрадовић, Данијела Мушић

Медицински факултет, Катедра за биологију са хуманом генетиком, Бања Лука
Међународна комисија за нестале особе, ДНК лабораторија, Бања Лука
Медицински факултет, Катедра за судску медицину, Бања Лука

Abstract

FILIPOVIC, Bozana, S. VIDOVIC, Z. OBRADOVIC, Danijela MUSIC: DNA ANALYSIS FROM HUMAN BONE REMAINS. *Skup 2:* 333-338. [Faculty of Medicine, Department of Biology and Human Genetics, Banja Luka; International Commission for missing persons, DNA laboratory, Banja Luka; Faculty of Medicine, Department of forensic medicine, Banja Luka].

Different biological materials (blood, saliva, hair, sperm etc.) were successfully analyzed in DNA laboratory in Banja Luka. However, the highest percent of all analyzed samples are skeletal remains of persons missing in the latest war in Bosnia and Herzegovina and the region. More than 4500 extractions from about 2500 of bone samples were performed in our lab as a part of ICMP's programme for DNA identification of missing persons. During our work we have noticed that quality of generated DNA profile depends on the type of bone and its structure. The most difficult for DNA analysis are clavicle, ulna, calcaneus, humerus, rib, skull and metacarpal bone for which more than 50% of analyses were unsuccessful. On the other side, the best results were obtained with scapula, ishium, femur, pubis and radius bone where DNA analysis was successful in more than 80%. Beside all this, results of the analysis depend on the general state of the sample, as DNA degradation, presence of different impurities and inhibitors etc. The most adequate in overcoming these problems turned out to be some modifications of standard extraction and PCR protocols, as EDTA decalcification, sample dilutions and increased primers concentration.

Key words: bone samples, DNA analysis, DNA degradation, inhibitors, modifications.

Сажетак

У ДНК лабораторији Бања Лука до сада су успјешно анализирани најразличитији биолошки материјали, као што су крв, пљувачка, длаке, сперма итд. Ипак, највећи проценат анализираних узорака чине скелетни остаци особа несталих у току протеклог рата на подручју Босне и Херцеговине и земаља у региону. До сада је, у оквиру ICMP-овог (Међународна комисија за нестале особе) програма идентификације несталих особа, у овој лабораторији урађено више од 4500 екстракција из око 2500 коштаних узорака. У току нашег рада уочили смо да на квалитет генерисаних ДНК профила значајно утиче тип кости којем узорак припада, тј. његова структура. Као најтеже за ДНК анализу, у том смислу, показале су се крчуне кости, жбице, петне кости, рамене кости, ребра, кости лобање, те кости доручја, код којих је више од 50% анализа било без адекватних резултата. С друге стране, највећи успјех постигнут је са костима лопатица, препонским, бутним, сједалним и лакатним костима, код којих је ДНК анализа била успјешна у више од 80% случајева. Осим наведеног, успјешност анализе такође зависи и од општег стања узорка, тј. степена деградације ДНК у узорку, присуства различитих инхибитора екстракције и PCR амплификације итд. Као најефикасније, у превазилажењу поменутих проблема, показале су се накнадне модификације стандардних протокола за екстракцију и PCR, као што су декалцификација са EDTA, разблажење узорака и у неким случајевима, повећање концентрације прајмера.

Кључне ријечи: коштани узорци, ДНК анализа, деградација ДНК, инхибитори, модификације.

УВОД

У ДНК лабораторији Бања Лука, од момента отварања до данас, са великим успјехом је анализирана ДНК из најразличитијег биолошког материјала (крв, плувачка, коријен длаке, сперма итд.), али се рад ове лабораторије прије свега базира на анализи ДНК из хуманих скелетних остатака.

У току нашег рада, показало се да коштани узорци представљају веома захтјеван материјал за ДНК анализу у погледу разних модификација стандардних протокола за екстракцију или PCR. Најчешћи проблем представља присуство различитих инхибитора екстракције и PCR-а (хумусне киселине) (Zipper et al., 2003), који у коштане узорке доспијевају из земљишта у ком је скелет био покопан, те деградација ДНК услед дуготрајне изложености негативном дејству различитих фактора спољашње средине (Burger et al., 1999). Важно је поменути да је коштани материјал старости 10-13 година. Као посљедица наведеног, из појединих узорака се или не може добити ДНК профил, или је добијени профил непотпун. Под непотпуним профилем подразумијева се профил код кога амплификација није дала резултат на 3 или више од укупно 15 анализираних STR локуса. Такав профил се не може користити за ДНК идентификацију.

Стандардни коштани узорак који се користи у сврху ДНК анализе је бутна кост, која даје задовољавајуће резултате. Међутим, веома често се јавља потреба да се за анализу користе и други дијелови скелетних остатака, као што су кости лобање, ребра, пршљенови итд. То је, нарочито, случај када је потребно урадити реасоцијацију скелетних остатака.

Наше искуство говори да различити типови костију не дају исте резултате, тј. да структура кости која се анализира такође утиче на успјешност ДНК анализе.

Компактно коштано ткиво (*substantia ossea compacta s. corticalis*) налази се на површини кости у облику наслаге. Најдебља је на средини дугих костију (дијафиза), а много тања на крајевима истих (епифизе), те у плочастим и кратким костима. Карактеристика овог ткива су Хаверсови и Волкманови канали испуњени крвним жилама. Око једног Хаверсовог канала су концентрично распоређене коштане ламеле и шупљине у којима се налазе коштане ћелије једног остеона.

Спужвасто коштано ткиво (*substantia ossea spongiosa*) се састоји од коштаних гредица које ограничавају уске просторе испуњене коштаном сржи. Дебљина гредица овиси о броју ламела које их изграђују. Ово ткиво се налази на епифизама дугих костију, те у унутрашњости кратких и плочастих костију. Не посједује ни Хаверсове ни Волкманове канале, па самим тим ни крвне жиле.

Коштане ћелије су спљоштене, са разгранатим цитоплазматским изданцима. Смјештене су у шупљинама коштане међућелијске супстанце. Трупови ћелија леже у овалним лакунама (*lacunae osseae*), а изданци у танким каналићима (*canaliculli ossei*) и код млађих особа међусобно су у контакту (Harrison, 1971; Duančić, 1972; Nilsson Lennart, 1993)

Циљ овог рада био је да се утврди који типови костију представљају најбољи избор при одабиру узорка за ДНК анализу.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИКА

Материјал за овај рад представљају различити дијелови хуманог скелета и то 114 бутних, 20 кључних, 18 петних, 7 лакатних, 9 пубичних, 20 рамених, 20 сједалних, 371 лобањских костију, 24 доње вилице, 30 ребара, 83 пршљена, 362 зуба, 23 кости доручја и 39 костију доножја, те 10 лопатица.

Ријеч је о скелетним остацима старим 10-13 година. Битно је напоменути да нисмо имали улазне податке о прецизној старости сваке појединачне кости, као ни податке о факторима средине којим је дати узорак био изложен.

Кости су очишћене, опране и осушене, а након тога самљевене у комерцијалним блендерима. Као додатна метода, у неким сличајевима је примијењена декалцификација узорка са EDTA, ради постизања што бољих резултата екстракције.

Екстракција ДНК је рађена по принципу везивања за силика мембрану, уз кориштење QIAGEN-Maxi китова.

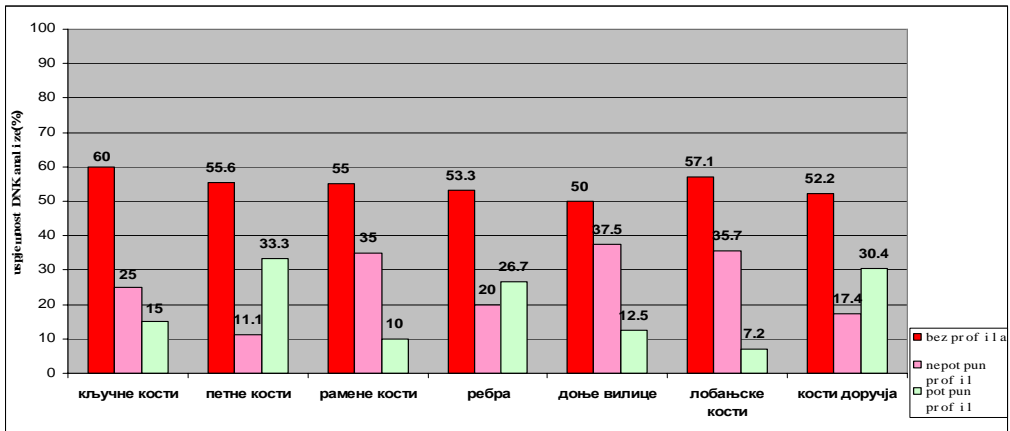
За PCR је кориштен комерцијални Промега кит PowerPlex16 System, који укључује 15 STR локуса и амелогенин. Као смјернице у одређивању количине узорка која ће се користити за PCR послужили су резултати PicoGreen квантификације ДНК, рађене помоћу Fluoroskan Ascent FL машине.

Сепарација амплификованих STR локуса рађена је уз помоћ ABI PRISM 310 Genetic Analyzer секвенатора. Сирови подаци су прикупљени помоћу Data Collection програма, а затим анализирани у GenScan и Genotyper програмима.

РЕЗУЛТАТИ

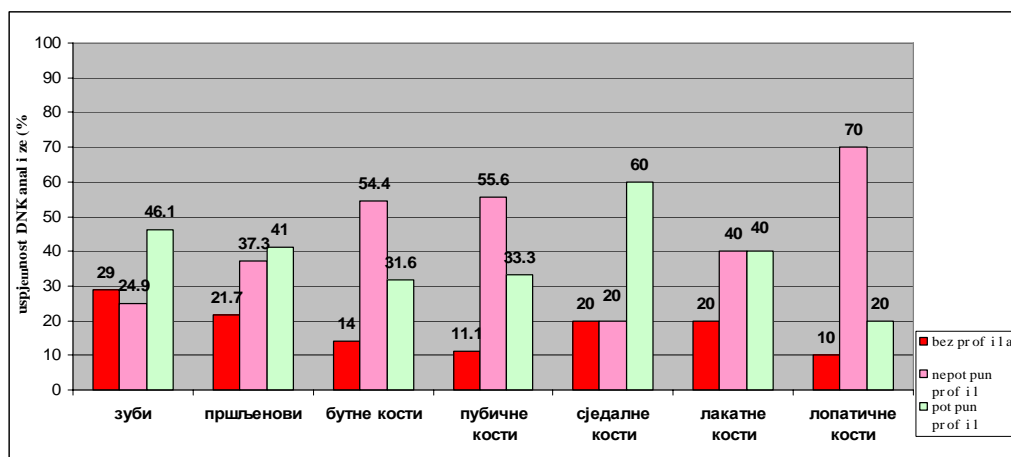
Резултати су добијени за поменутих 15 група костију, а затим изражени процентуално и представљени графички.

Најлошији резултати ДНК анализе добијени су кориштењем кључних, петних, рамених костију, ребара, доњих вилица, те костију лобање и доручја. У случају ових костију, преко 50% анализа су биле без резултата. Као нарочито лош материјал за ДНК идентификацију могу се издвојити доње вилице, те рамене и лобањске кости, код којих је добијен и највећи проценат непотпуних профила (Слика 1).



Слика 1. Резултати ДНК анализе са хуманим коштанним остацима.

Највећи успјех постигнут је у раду са зубима, пршљеновима, бутним, пубичним, сједалним, лакатним костима и лопатицама. Код ових типова костију успјешност ДНК анализа се креће од 70 до 90%, при чему је највећи број потпуних ДНК профила добијен из зуба, пршљенова и сједалних костију (Слика 2.).



Слика 2. Резултати успјешне ДНК анализе са хуманисм коштаном остацима

ДИСКУСИЈА

Као извор ДНК у сврху идентификације могу послужити сва ткива и тјелесне течности. Ипак, количина ДНК која се може екстраховати из различитих ткива веома варира због различите густине ћелија и грађе ткива. Узорци као што су крв, фоликул длаке и епителне ћелије садрже велику количину ДНК (1 μ л крви садржи 30ng ДНК) и представљају одличан материјал за ДНК анализу (Romac et al., 1999), док коштаном ткиво, као потпорно ткиво са великим садржајем чврсте међућелијске супстанце, представља слаб извор ДНК (1gr кости садржи 0.5ng ДНК). Због саме грађе коштаног ткива – мале густине ћелија и њихове окружености чврстим ламелама, потребне су агресивније методе екстракције ДНК у односу на друге врсте биолошких материјала. У оваквим случајевима се веома корисном показала додатна метода декалцификације узорака са EDTA, прије екстракције (Zoledziowska et al., 2002). Поред ових потешкоћа, везаних за екстракцију ДНК из коштаног ткива, додатни проблем је дуг временски период (10-13 година) у ком су кости биле изложене негативном дејству одређених физичко-хемијских фактора, као што су: рН земљишта, влажност, варирања температуре, присуство бактерија и гљивица са убрзаним трулежним процесима, присуство хумусних киселина итд. Резултат дјеловања поменутих фактора су деградација ДНК, контаминација микробијалном ДНК, те присуство различитих инхибитора екстракције или PCR-а (Cipollaro et al., 1998). С друге стране се, управо усљед агресивности метода екстракције, у неким случајевима у екстракту налази велика концентрација ДНК молекула, што доводи до инхибирања PCR реакције. У тим случајевима, рјешење представља разблаживање и кориштење мањих количина узорка за PCR.

Уобичајено је, да се за екстракцију, из коштаног материјала користи исјечак бутне кости. Међутим, често постоји потреба да се у ту сврху користе и друге кости, а нарочито, при реасоцијацији скелетних остатака ексхумираних из масовних гробница. У овом раду, анализирали смо успјешност екстракције ДНК из различитих дијелова хуманог скелета.

Најтежим за обраду показале су се кости чији већи дио чини спонгиозна супстанца, у чијим се шупљинама накуља велика количина нечистоћа које је веома тешко уклонити. Проблем представља и велика количина хумусних киселина које се

ко-екстрахују са ДНК. Због њихове сличности са ДНК у физичко-хемијским карактеристикама, чињенице да хелирају јоне метала и интерагују са бројним органским једињењима, хумусне киселине умногоме ометају, како квантификацију ДНК флуоресцентним бојама, тако екстракцију и амплификацију (Harrу et al., 1999). Иако се, због поменутих проблем, резултати PicoGreen квантификације не могу сматрати апсолутно тачним, ипак, могу послужити као смјернице за одређивање количине узорка која ће се користити за PCR (Committee on DNA Technology in Forensic Science., 1992).

За разлику од костију гдје је присутна велика количина спонгиозног ткива, зуби представљају одличан материјал за ДНК анализу, јер, захваљујући њиховој структури, много спорије наступа деградација ДНК. Наиме, цаклина (*substantia adamantina*), која прекрива дентин у подручју зубне круне, представља најтврђу твар у тијелу. Разлог томе је велики постотак анорганских твари (hydroxilapatit - 90%), док органске твари чине свега 3 до 4 процента цаклине. Други разлог је што су ћелије дентина (одонтобласти) смјештене у дубини зуба, на самој периферији зубне пулпе, што их чини донекле заштићеним од дјеловања физичких фактора (Duančić, 1972; Nilsson Lennart., 1993).

ЗАКЉУЧЦИ

Као најпогоднији хумани коштани материјал за ДНК анализу показали су се зуби, пршљенови, бутне, пубичне, сједалне, лакатне кости и лопатице. С друге стране, као најлошији избор хуманих коштаних остатака за ДНК анализу показале су се кључне, петне, рамене кости, ребра, доње вилице, те кости лобање и доручја. Објашњење оваквих резултата би, вјероватно, требало потражити у самој структури костију. Резултати овог рада представљају наше искуство у раду са коштаним узорцима, и могу послужити као смјернице при одабиру узорака скелетних остатака у сврху идентификације путем ДНК анализе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burger, J., S. Hummel, B. Herrmann, W. Henke: DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis*, 20: 1722-1728., 1999.
2. Cipollaro, M., G. Di Bernardo, A. Forte, G. Galano, L. De Masi, U. Galderisi, M. F. Guarino, F. Angelini, A. Cascino: Histological analysis and ancient DNA amplification of human bone remains found in Caius Iulius Polybius house in Pompeii. *Biochem Biophys Res Commun* 247 (3):901 - 904., 1998.
3. Committee on DNA Technology in Forensic Science. DNA technology in forensic science. National Academy Press: 51-73. Washington D.C., 1992.
4. Duančić, V.: **Основи histologije čovjeka**. Medicinska knjiga: 144-148. Beograd – Zagreb, 1972.
5. Harrison, R. J.: Bones. In: Romanes GJ, editor. Cunningham's Textbook of Anatomy. Twelfth edition: 75-84. Oxford University Press, 1971.
6. Harry M., B. Gambier, Y. Bourezgui, E. Garnier-Sillam: Evaluation of purification procedures for DNA extracted from organic rich samples: Interference with humic substances. *Analisis* 27 (5): 439 - 442., 1999.
7. Nilsson Lennart. Behold Man. Harrap: 120-128. London, 1993.
8. Romac S., S. Vukosavić, O. Stojković, B. Čuljković: PCR u kliničkoj dijagnostici. Foto Futura: 32. Beograd, 1999.
9. Zoledziewska, M., S. Gronkiewicz, T. Dobosz: Comparison of various decalcifiers in preparation of DNA from human rib bones. *Anthropological Review* 65: 75-80., 2002.

10. Zipper, H., C. Buta, K. Lammle, H. Brunner, J. Bernhagen, F. Vitzhum: Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research*, Vol. 31 (7): 39., 2003.

Примљено: 11.11.2005.

Одобрено: 5.10.2006.