

Genetska identifikacija pogrešanih oseb

Missing persons genetic identification

Matija Bajželj, Irena Zupanič Pajnič

Inštitut za sodno medicino, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

Korespondenca/

Correspondence:

Irena Zupanič Pajnič,
e: irena.zupanic@mf.uni-lj.si

Gljučne besede:

identifikacija; človeški posmrtni ostanki; genetska tipizacija; mikrosateliti; mtDNA

Key words:

identification; human remains; genetic typing; microsatellites; mtDNA

Citirajte kot/Cite as:

Zdrav Vestn. 2017;
86:318–29.

Prispelo: 30. 10. 2016

Sprejeto: 9. 4. 2017

Izvleček

Prispevek na pregleden način opisuje identifikacijo pogrešanih oseb iz neprepoznavnih posmrtnih ostankov, ki jo opravimo z molekularno-genetskimi metodami. Izredno polimorfna, individualno specifična področja, ki nam omogočajo prepoznavo pogrešanega, so mikrosateliti na avtosomih in kromosomu Y ter kontrolna regija mitohondrijske DNA. Za primerjavo genetskih profilov je potrebno odvzeti biološki material iz posmrtnih ostankov in pridobiti primerjalne referenčne vzorce. Če so ostanke našli kmalu po domnevni smrti pogrešanega, poskušamo pridobiti primerjalne vzorce z njegovih osebnih predmetov. Če teh ni, uporabimo kot referenčne vzorce brise ustnih sluznic njegovih sorodnikov ali morebitna, v zdravstvenih ustanovah arhivirana tkiva, če je bila v času življenja pogrešane osebe opravljena biopsija za potrebe medicinske diagnostike. Kadar ni ne osebnih predmetov, ne svojcev in ne arhiviranih tkiv pogrešane osebe, genetska identifikacija ni možna. Kot biološki material najpogosteje uporabimo kri, mehka tkiva, nohte, zobe ali kosti, kar je odvisno od stanja posmrtnih ostankov. Postopki, ki jih uporabljamo za ekstrakcijo DNA iz različnih tkiv, se med seboj razlikujejo po zahtevnosti in času, ki ga porabimo za pridobitev DNA. Najzahtevnejša in časovno potratna je izolacija DNA iz kosti in zob, zato se zanjo odločimo le v primeru skeletiziranih posmrtnih ostankov, ali ko iz drugih tkiv ne uspemo pridobiti zadostne količine DNA za genetsko identifikacijo. Ob ujemanju genetskih profilov neprepoznavnih posmrtnih ostankov in primerjalnih vzorcev pogrešane osebe je potrebno moč genetskega dokaza statistično ovrednotiti in podati verjetnost identifikacije.

Abstract

This article presents identification of missing persons from badly preserved post-mortem remains using molecular genetics methods. Extremely polymorphic and individually specific genetic markers that enable the identification of missing persons are microsatellites on autosomal chromosomes, microsatellites on Y chromosome and control region of mitochondrial DNA. For genetic profile comparison, biological material from post-mortem remains and reference samples have to be collected. If post-mortem remains are found shortly after the presumed death of the missing person, their personal items are used for comparison. If these are not available, (the missing person's) relatives could be used as reference samples or achieved tissues stored in medical institutions if biopsy for the needs of medical diagnostics was performed earlier during their life. When reference samples are not available, genetic identification is not possible. The type of biological material sampled from the deceased depends on the condition of human remains. Blood, soft tissues, nails, teeth or bones are most commonly used for genetic identification, and the time required for DNA extraction depends on the type of biological material. The most demanding and time consuming is extraction of DNA from teeth and bones, therefore we use it in cases when only skeleton is available or we cannot get a sufficient amount of DNA for genetic identification from other tissues. If the genetic profile of post-mortem remains and a reference sample of the missing person match, the strength of genetic evidence has to be statistically evaluated and the probability of identification reported.

1. Uvod

Genetski identifikacijski testi s preiskavo DNA veljajo v svetu kot dokazni material v civilnih in kazenskih postopkih že skoraj trideset let; v Sloveniji se uporabljajo dobrih dvajset let. Poleg identifikacije bioloških sledi v kriminalistiki in preverjanju sorodstvenih povezav z molekularno-genetskimi metodami identificiramo tudi pogrešane osebe. Te so lahko žrtve množičnih nesreč, kot so naravne katastrofe (potresi, poplave, požari, tsunamiji), letalske in železniške nesreče ter teroristični napadi. Tudi v primerih zoglenelih trupel, utopljenecv ali obešencev, ki jih najdejo po daljšem času in so s tradicionalnimi sodnomoedicinskimi metodami neprepoznavni, se za identifikacijo poslužujemo genetskih preiskav. Kot primerjalne vzorce lahko uporabimo osebne predmete pogrešane osebe, biološke vzorce njegovih sorodnikov ali morebitna v zdravstvenih ustanovah arhivirana tkiva. Kadar ni ne osebnih predmetov, ne svojcev in ne arhiviranih tkiv pokojnika, genetska identifikacija ni možna (1). Identifikacija pogrešanih oseb je do odkritja izredno polimorfnih področij molekule DNA temeljila na tradicionalnih sodnomoedicinskih in antropoloških metodah. Danes se te metode dopolnjujejo s preiskavo DNA, ki predstavlja zadnjo fazo v postopku identifikacije (2). Pogosto je genetska identifikacija edina možna metoda identifikacije pogrešanih oseb, zlasti v primerih, ko so posmrtni ostanki slabo ohranjeni (3). Preiskavo DNA uporabljamo pri identifikaciji pogrešanih oseb zaradi lastnosti molekule DNA, ki je edinstvena za vsakega posameznika in ostaja enaka vse življenje, v nekaterih delih organizma, zlasti v kosteh in zobeh, pa ostane razmeroma dobro ohranjena tudi dlje časa po smrti (4), zato je možno pridobiti genetski material tudi iz zelo starih skele-

tnih ostankov. Pri nas so bili najstarejši skeletni ostanki, uporabljeni za genetsko identifikacijo, 300 let stari skeleti iz Auerspergove grobnice (5).

Uspešnost genetskih identifikacijskih metod je odvisna od količine in kakovosti izolirane DNA in torej od ohranjenosti biološkega materiala, ki ga iz posmrtnih ostankov pridobimo. Če je le možno, analiziramo dolžinske polimorfizme jedrne DNA (avtosomne kromosome in kromosom Y), saj je ta najbolj polimorfna. Pri starih in problematičnih vzorcih pa se lahko zgodi, da zaradi močne razgradnje jedrne DNA te ni mogoče pridobiti v zadostnih količinah. V takih primerih se poslužujemo preiskave mitohondrijske DNA (mtDNA), ki je zaradi krožne oblike manj izpostavljena razgradnji v naravnem okolju in se v celici nahaja v številnih kopijah, kar omogoča njeno analizo iz slabo ohranjenih vzorcev (6). Z genetskimi metodami identificiramo skeletne ostanke in slabo ohranjene ali močno poškodovane človeške posmrtne ostanke (v letalskih, železniških in prometnih nesrečah, eksplozijah in požarih zoglenela in močno poškodovana trupla, žrtve naravnih nesreč, terorističnih napadov ali vojn, žrtve povojnih množičnih pobojev v prikritih grobiščih in druge). Ob preiskavi jedrne DNA nam tipizacija mtDNA v rutinskih preiskavah omogoča celosten pristop k molekularno-genetskimi identifikacijam biološkega materiala (7).

Identifikacija pogrešane osebe s preiskavo DNA je sestavljena iz štirih stopenj; odvzem biološkega materiala iz posmrtnih ostankov, odvzem referenčnega materiala za primerjavo s posmrtnimi ostanki (osebni predmeti, arhivirana tkiva ali biološki vzorci sorodnikov), preiskava DNA posmrtnih ostankov in referenčnih vzorcev (ekstrakcija DNA,

določitev količine DNA v vzorcih, pomnoževanje DNA in določitev genetskih profilov) in v zadnji fazi primerjava genetskih profilov posmrtnih ostankov in referenčnih vzorcev, ki ob ujemanju profilov zajema interpretacijo in statistično ovrednotenje genetskega dokaza ter izračun verjetnosti sorodstvenih povezav (8). Preveriti je potrebno še čistost ekstrakcijskih in pomnoževalnih negativnih kontrol. Pridobljene genetske profile posmrtnih ostankov pa je potrebno primerjati tudi z genetskimi profili oseb iz eliminacijske podatkovne zbirke, ki jo sestavljajo osebe, ki so sodelovale pri kateri koli fazi identifikacije.

2. Biološki material, odvzet iz posmrtnih ostankov

Ohranjenost DNA v posmrtnih ostankih s starostjo pada, na kar v največji meri vpliva okolje, v katerem se je truplo nahajalo od smrti do najdbe. Od stanja posmrtnih ostankov je odvisno, kako zahtevna bo identifikacija pogrešane osebe. Najtežje so identifikacije v primeru letalskih nesreč ali eksplozij, ko je genetska identifikacija nujna. Posmrtni ostanki so lahko posamični, močno razgrajeni ali pa so pomešani med seboj (eksplozije in množična grobišča, pri katerih so bili različni deli telesa preneseni med različnimi grobovi) (3). Če so posmrtni ostanki fragmentirani, je ključnega pomena njihovo vzorčenje (vsak del trupla mora biti shranjen samostojno in kot tak tudi označen). Da različni deli trupla pripadajo isti osebi, lahko potrdimo z genetsko preiskavo. Deli trupla, ki imajo enak genetski profil, pripadajo isti osebi (9).

V forenzično-genetskem laboratoriju morajo biti na razpolago tehnike, ki omogočajo pridobitev DNA iz najrazličnejših bioloških materialov. Od ohranjenosti posmrtnih ostankov je odvisna

izbira biološkega materiala za genetsko preiskavo. Preiskavo opravimo najhitreje, če uspemo pridobiti DNA iz krvi, sledijo ji mehka tkiva in nohti, postopek pa je najdaljši pri popolnoma skeletiziranih posmrtnih ostankih, ki nam omogočajo pridobiti DNA le iz kosti in zob. Kri in mehka tkiva je za genetsko preiskavo možno pridobiti le v primeru, ko je bilo truplo najdeno kmalu po smrti. Če imamo opravka s trupli, ki so bila povožena z vlakom ali udeležena v prometnih nesrečah in je truplo pooglenelo, običajno iz takega trupla dobimo dovolj kakovostno kri iz aorte (2). Pri pooglenelih truplih lahko za genetske preiskave uporabimo tudi vzorce rdečega mišičnega tkiva globoko v telesu, hrustanca iz kolka in brisa mehurja (10). Nohte uporabimo takrat, ko je truplo močno razgrajeno, a ni skeletizirano, tu so nohti še prisotni. V primeru, da imamo opravka s skeletiziranimi posmrtnimi ostanki, ki so bili najdeni več let po smrti, se odločimo za ekstrakcijo DNA iz kosti in zob. Ekstrakcija DNA iz skeletnih ostankov zahteva največ predpriprav in časa (3).

3. Primerjalni ali referenčni material

Kot referenčni material lahko uporabimo neposredni referenčni material, osebne predmete pogrešanega ali biološki material njegovih sorodnikov (3). Neposredni referenčni material je biološki material, ki ima določeno dokumentacijo, s katero lahko potrdimo, da pripada pogrešani osebi. Običajno ga odvzame zdravnik med zdravniškim pregledom (biopsije) v času življenja pogrešanega. Najpomembnejša prednost neposrednega referenčnega materiala je v tem, da nedvomno pripada pogrešani osebi ter je njegova kakovost dovolj velika, da lahko iz njega pridobimo kompleten genetski profil (3). Če ni ustrezne

dokumentacije glede izvora neposrednega biološkega materiala, je potreben dober premislek, ali ga bomo uporabili. Kot osebne predmete uporabimo predmete, za katere menimo, da jih je uporabljala le pogrešana oseba (zobna ščetka, brivnik, glavnik, ponošena oblačila) (3). Osebni predmeti za razliko od neposrednega referenčnega materiala nimajo spremljajoče dokumentacije, ki bi potrjevala njihovo avtentičnost. Možno je, da so osebne predmete pogrešanega uporabljali tudi drugi družinski člani, kar v praksi opazimo pri pridobitvi mešanih genetskih profilov iz referenčnih zobnih ščetk, zato je pomembno, da pridobimo informacije o tem, kdo je osebne predmete pogrešanega dejansko uporabljal. Če je osebne predmete pogrešanega uporabljalo več oseb, jih moramo tipizirati in njihove genetske profile uporabiti za eliminacijske namene ob primerjavi profilov posmrtnih ostankov in osebnih predmetov pogrešanega. Za osebne predmete ni nobenega zagotovila, da bo kakovost bioloških sledi na njih dovolj velika za pridobitev kompletnega genetskega profila, a običajno iz njih pridobimo kompletne profile. Poleg neposrednega referenčnega materiala in osebnih predmetov lahko kot referenčni material uporabimo tudi biološke vzorce sorodnikov pogrešane osebe (3). Če se odločimo za uporabo sorodnikov, imamo na voljo dovolj kakovosten biološki vzorec (kri ali slino, običajno odvzeto v ambulantni) za pridobitev kompletnih profilov, upoštevati pa moramo možnost, da sorodniki s pogrešanim niso genetsko povezani, kot se predvideva, kar se zgodi v primeru nebiološkega očetovstva ali posvojitve (3). Pridobitev referenčnega materiala genetsko nepovezanih sorodnikov lahko privede v lažno negativne rezultate genetske identifikacije (11). V študiji, ki jo je opravil Hartman s sodelavci (12), so večji del pogrešanih oseb

(82 %) uspešno identificirali s pomočjo referenčnih vzorcev sorodnikov. Bližnji sorodniki omogočajo natančnejšo identifikacijo kot daljnji sorodniki (13). Če bližnjih sorodnikov ni, moramo za uspešno genetsko identifikacijo zbrati večje število daljnjih sorodnikov, kar močno poveča stroške genetske preiskave (9). S pomočjo sestričen, bratrancev, nečakov in nečakinj po materini liniji na primer lahko preverimo ujemanje mt-DNA, ki se prenaša po materini liniji v nespremenjeni obliki iz roda v rod. Če poznamo daljnje sorodnike po očetovi liniji, pregledamo kromosom Y, ki se v nespremenjeni obliki prenaša z očeta na sina, zaradi česar imajo vsi moški potomci identičen kromosom Y. To je zelo pomembno, ko stopimo v stik s svojci pogrešanih oseb ali žrtev povojnih bojov in jim razložimo, da lahko za identifikacijo poleg bližnjih uporabimo tudi daljnje sorodnike. S preiskavo več še živčih sorodnikov povečamo statistično verjetnost, ki je potrebna za pozitivno identifikacijo (7). Pri vseh masovnih katastrofah, kjer začnemo z identifikacijo pogrešanih oseb neposredno po nesreči (letalske in železniške nesreče, teroristični napadi ...), so za genetske preiskave najprimernejši referenčni vzorci osebni predmeti ali arhivirana tkiva. Tovrstni vzorci nam namreč omogočajo neposredno primerjavo genetskih profilov v smislu iskanja identičnosti, kar je, zaradi majhnega števila referenčnih vzorcev in visokih izračunanih verjetnosti identifikacije, iz ekonomskega vidika najbolj racionalen pristop. Pri zastarelih masovnih katastrofah (množična grobišča iz časa 2. svetovne vojne v Sloveniji, množična grobišča v Bosni in Hercegovini ...) pa osebnih predmetov in arhiviranih bioloških vzorcev pogrešanih po vrsti let več ni možno zbrati, zato nam služijo kot referenčni vzorci biološki vzorci njihovih še živčih sorodnikov (9).

4. Kronološko dokumentiranje postopka identifikacije

Kronološko dokumentiranje postopka je nujno za zagotavljanje pristnosti vzorca. Dokumentiranje se prične s fazo odvzema vzorca, potrebno pa ga je voditi skozi celoten postopek identifikacije. Po odvzemu je potrebno vzorec ustrezno shraniti in označiti. Pri identifikaciji sodelujejo strokovnjaki različnih področij, kar mora biti ustrezno dokumentirano. Ustrezno shranjevanje evidenčnega materiala in z njim povezana kronološka dokumentacija o odvzemu, transportu in opravljenih analizah so ključnega pomena za ustrezno genetsko identifikacijo in poročilo o identiteti, ki se ga velikokrat uporabi tudi na sodiščih (3).

5. Preiskave DNA za identifikacijo pogrešanih oseb

DNA je nosilka genetske informacije v živih organizmih in se nahaja v jedru vsake evkariontske celice (14). Molekule DNA najdemo tudi v mitohondrijih, organelih, odgovornih za proizvodnjo celične energije (15). Vsaka celica vsebuje približno 500 mitohondrijev, vsak mitohondrij pa 5 do 10 molekul DNA. MtDNA predstavlja pri človeku približno 0,3 % genomske DNA. Je dvovertična, kovalentno zaprta krožna molekula, ki jo sestavljata zunanja težka veriga (veriga H) in notranja lahka veriga (veriga L). Mitohondrijski genom je razmeroma majhen, njegova dolžina je približno 16.500 baznih parov. Veliko mitohondrijev vsebujejo srčno, mišično in jetrno tkivo. Znotraj vsakega mitohondrija je več kopij njegovega kromosoma. Ker smo ljudje strukturno in funkcionalno grajeni podobno, je zato tudi DNA med posamezniki podobna. Vendar v molekuli DNA obstajajo področja, v katerih se posamezniki med seboj razlikujemo,

kar preiskujemo pri identifikaciji pogrešanih oseb. Pri jedrni DNA imajo omejena področja obliko ponavljajočih se zaporedij, imenovanih mikrosateliti ali kratke tandemske ponovitve (*angl.* Short Tandem Repeat, STR), ki predstavljajo dolžinske polimorfizme, pri mtDNA pa preiskujemo sekvenčne polimorfizme v kontrolni regiji (3). Mikrosateliti imajo obliko kratkih nukleotidnih zaporedij, ki se v genomu ponavljajo v številnih identičnih ali sorodnih kopijah. Nahajajo se v nekodirni DNA in sicer v intronih in nukleotidnih zaporedjih med geni. Dolgi so 2–7 baznih parov, število ponovitev pa je manjše od 100 (16). Ponavljajoča se zaporedja naj bi predstavljala 3 % človeškega genoma oziroma približno 90 milijonov baznih parov (17). Pri genetski identifikaciji pogrešanih oseb opravljamo preiskave mikrosatelitov na avtosomnih kromosomih in kromosomu Y, kadar imamo na razpolago le daljnje sorodnike po materini liniji, ali v primeru, da je DNA močno razgrajena in preiskava jedrne DNA ni mogoča, pa preiskujemo polimorfizme mtDNA.

5.1. Preiskave mikrosatelitov na avtosomnih kromosomih

Avtosomni mikrosateliti, ki se dedujejo kodominantno, se nahajajo na katerem koli izmed 22 parov avtosomnih kromosomov, torej kromosomih, ki niso odgovorni za določitev spola. Variabilnost mikrosatelitov znotraj populacije je tako visoka, da lahko z uporabo večjega števila lokusov med seboj razlikujemo kateri koli osebi, razen enojajčnih dvojčkov. Avtosomne mikrosatelite pomnožujemo z verižno reakcijo s polimerazo (*angl.* Polymerase Chain Reaction, PCR), v kateri se oba alela heterozigotnega para zaradi podobne velikosti in dolžin do 400 baznih parov učinkovito pomnožujeta (14). V reakciji PCR hkra-

ti pomnožujemo večje število področij STR, kar nam omogoča hitrejšo analizo in manjšo porabo iz posmrtnih ostankov ekstrahirane DNA. Po strokovnih priporočilih naj bi bilo za identifikacijo pogrešanih oseb, če se kot referenčni material uporablja biološki material sorodnikov, potrebno preiskovati najmanj dvanajst avtosomnih mikrosatelitov (12). V praksi uporabljamo različne komplete za pomnoževanje 15 ali več mikrosatelitov hkrati (18). Kadar imamo opravka z močno razgrajeno DNA, se lahko zgodi, da daljših področij STR ne uspemo pomnožiti, zato so na trgu kompleti, ki omogočajo pomnoževanje področij STR, katerih dolžina ne presega 250 baznih parov (3).

5.2. Preiskave mikrosatelitov na spolnem kromosomu Y

Poleg preiskave mikrosatelitov avtosomnih kromosomov se lahko pri identifikacijah poslužujemo tudi preiskave mikrosatelitov spolnih kromosomov. Tako kot avtosomi in kromosom X, tudi kromosom Y vsebuje mikrosatelite, vendar jih je na kromosomu Y manj zaradi njegove majhnosti. Kromosom Y je namreč drugi najmanjši človeški kromosom; dolg je 60 milijonov baznih parov (16). Kromosom Y ni udeležen v rekombinaciji, zato lahko z genetsko preiskavo mikrosatelitov kromosoma Y sledimo paternalni liniji, saj imajo vsi potomci istega očeta identičen haplotip kromosoma Y. Odsek molekule DNA, ki je podedovan le po enem od staršev, imenujemo haplotip. Pri identifikaciji pogrešanih oseb lahko s pomočjo kromosoma Y kot referenčne vzorce uporabimo tudi daljnje sorodnike po očetovi liniji. Ta vrsta analize pa ni uporabna pri žrtvah ženskega spola (19).

5.3. Preiskava mitohondrijske DNA

Pri mtDNA za identifikacijske namene preiskujemo sekvenčne polimorfizme v kontrolni regiji. Prednost mtDNA pred avtosomno pri identifikaciji močno razgrajenih vzorcev posmrtnih ostankov je v tem, da se DNA ohrani dlje časa, saj jo pred razgradnjo ščitita krožna oblika in mitohondrijska ovojnica, obenem pa je v celici prisotna v številnih kopijah. Mutacije se v mitohondrijskem genomu pojavljajo precej pogosteje v primerjavi z jedrnim genomom. Vzrok je izpostavljenost mtDNA reaktivnim kisikovim spojinam, ki nastajajo pri oksidativni fosforilaciji (20). MtDNA se prenaša z matere na otroke, zato lahko s pomočjo analize mtDNA sledimo le materini liniji (3). Če iz posmrtnih ostankov zaradi razgrajenosti DNA uspemo pridobiti le profil mtDNA, lahko kljub temu opravimo identifikacijo, vendar lahko kot referenčne osebe uporabimo le sorodnike po materini strani. Preiskave mtDNA pa so uporabne tudi za določanje identitete starih posmrtnih ostankov, ko so med še živečimi sorodniki na voljo le več generacij oddaljeni sorodniki po materini liniji. Ker pri mtDNA ni rekombinacije, je stopnja identifikacije s preiskavo mtDNA nižja od stopnje identifikacije, ki jo dosegamo z preiskavami jedrne DNA. Stopnja identifikacije, ki jo dosegamo z preiskavo jedrne DNA, je praktično 100 %, stopnja identifikacije s preiskavo mtDNA pa je 98–99 %, kar velja tudi za kromosom Y, ki se prenaša iz očeta na sinove in se ne rekombinira (21).

Za izvedbo genetske preiskave moramo pridobiti DNA iz posmrtnih ostankov. Temu sledi določitev količine DNA v vzorcih ter pomnoževanje DNA v reakciji PCR, pri čemer pridobimo ge-

netske profile avtosomne jedrne DNA, če pomnožujemo mikrosatelite kromosoma Y, pa haplotipe kromosoma Y. Pri sekvenciranju kontrolne regije mtDNA, pridobimo haplotipe mtDNA.

6. Pridobitev DNA iz posmrtnih ostankov

6.1. Pridobitev DNA iz krvi, mehkih tkiv in nohtov

Izolacija DNA iz krvi je med manj zahtevnimi ekstrakcijskimi metodami v forenzični genetiki in nam omogoča hitro pridobitev DNA. Hemoglobin inhibira reakcijo PCR, zato ga je potrebno iz ekstrakta odstraniti (22). Učinkovita metoda čiščenja DNA je vezava DNA na magnetne delce in njeno spiranje, pri čemer uporabimo avtomatiziran postopek, ki poteka v napravi Biorobot EZ1 (Qia-gen). Prednost te metode pred v forenzičnih preiskavah pogosto uporabljano organsko ekstrakcijo je v tem, da ne zahteva uporabe strupenih organskih topil, kot sta fenol in kloroform (23). Celoten postopek čiščenja DNA je avtomatiziran in traja le 20 minut. Nukleinske kisline se vežejo na s silicijem prevlečene površine magnetnih delcev v prisotnosti kationičnih soli, ki lizirajo celice, denaturirajo proteine, inaktivirajo nukleaze in pospešujejo vezavo DNA na magnetne delce (24). Ekstrakcija DNA iz krvi je v primerjavi z ekstrakcijo DNA iz kosti veliko hitrejša, saj celoten postopek ekstrakcije traja le slabo uro, ekstrakcija DNA iz kosti pa več dni (25).

Mehka tkiva uporabimo v primeru, ko zaradi slabo ohranjenih posmrtnih ostankov ekstrakcija iz krvi ni več možna. Za genetsko identifikacijo najprimernejši vzorci mehkega tkiva so srčno, mišično, jetrno in ledvično tkivo (17).

Ko je potrebno identificirati močno razpadlo truplo, pridobimo genetski

material iz zob ali kosti, lahko pa kot alternativo uporabimo tudi nohte. Nohti vsebujejo keratin, ki ga le redki mikroorganizmi lahko uporabijo kot hrano. Zato DNA v nohtih ni tako podvržena razgradnji kot v mehkih tkivih in se lahko ohrani tudi dlje časa po smrti. Najprimernejši so nohti na palcih nog, saj so najdebelejši. Postopek ekstrakcije iz nohtov je krajši in manj zahteven kot iz kosti in zob. Pri svežih nohtih je verjetnost pridobitve kakovostnih profilov sorazmerno velika, v primeru starih nohtov pa je kakovost profila odvisna od okolja, v katerem so se ti nahajali. Keratinizirana tkiva vsebujejo disulfidne vezi, zato je potrebna inkubacija v ekstrakcijskem pufri z dodanim DTT. Metoda alkalne ekstrakcije in uporaba pufra TN_{Ca} omogočata razgradnjo keratiniziranega tkiva že v 2–5 urah (21).

6.2. Pridobitev DNA iz skeletnih ostankov

V primeru, ko gre za identifikacijo pogrešane osebe, katere posmrtni ostanki so slabo ohranjeni ali pa je minilo več let do odkritja, ekstrakcija DNA iz krvi in mehkih tkiv ni več možna, saj so se ta tkiva razgradila. Po smrti organizma namreč nukleaze celičnih lizosomov kot tudi bakterije in glive razgrajujejo DNA. DNA pa se lahko tudi več stoletij ohrani v kosteh in zobeh, saj je vezana na hidroksiapatit in je zato težje razgradljiva. Kako dobro se DNA v skeletnih ostankih ohrani, je odvisno od okolja, v katerem se ti nahajajo. Dejavniki okolja, ki vplivajo na ohranitev molekule DNA, so temperatura, vlažnost, UV sevanje, pH in kemijske lastnosti zemlje, v kateri so bili skeletni ostanki zakopani, ter prisotnost mikroorganizmov (26). Najboljše za ohranitev DNA so nizke temperature in čim manj padavin. Velik vpliv ima tudi, če se skeletni ostanki hitro posušijo. Naj-

bolje se DNA ohrani v skeletnih ostan-kih, ki se nahajajo v prsti z nevtralnimi ali rahlo bazičnim pH in kjer je koncentracija soli povečana, vsebnost huminskih kislin in vlažnost pa nizki. Velik vpliv ima tudi način shranjevanja skeletnih ostankov takoj po izkopu. Najbolje je, če identifikacijo opravimo takoj po izkopu, slabše pa, če so skeletni ostanki dlje časa shranjeni pri sobni temperaturi. Če identifikacije ne moremo opraviti takoj, je najustreznejše, da delčke kosti in zob zamrznemo (1).

Za ekstrakcijo DNA so najprimernejše dolge kosti, ki imajo največji delež kompaktne kostnine in posledično tudi več hidroksiapatita, na katerega se vežejo molekule DNA. Vezava najverjetneje poteka tako, da se med seboj povežejo hidroksilne skupine v molekuli hidroksiapatita s fosfatnimi skupinami v molekuli DNA. Med dolgimi kostmi so najprimernejše stegenice in golenice, najmanj primerne pa so ploščate kosti, npr. lobanjske kosti (1).

Če v laboratorij prejmemo celotne stegenice, najprej odrežemo 8–10 cm dolg in 2–3 cm širok košček kosti, ki ga potem uporabimo za nadaljnjo identifikacijo. Kost očistimo zemlje in jih speremo v destilirani vodi, ki ji dodamo detergent. Sledi večkratno spiranje z vodo. Poskrbeti moramo, da so kosti ustrezno označene. Z brusilnikom odstranimo površinsko plast, pri čemer pregrevanje kosti preprečimo z uporabo tekočega dušika. Mehanskemu čiščenju sledi kemično čiščenje z detergentom, vodo in etanolom, zato da odstranimo površinsko kontaminacijo (27). Detergent oksidativno deluje in povzroči, da se sodobna (eksogena) DNA, ki je večinoma na površini, razcepi na kratke fragmente ali posamezne baze, medtem ko endogena DNA ostane nepoškodovana zaradi vezave na hidroksiapatit. Pri mletju je ključnega pomena pridobitev finega kostnega prahu, ki

omogoča bolj učinkovito dekalifikacijo, pregrevanje med mletjem pa ponovno preprečujemo z uporabo tekočega dušika. Za ekstrakcijo uporabimo pol grama kostnega prahu, ki ga dekalificiramo v z 0,5 M EDTA. Ta omogoča raztapljanje ogrodja iz hidroksiapatita in temelji na tvorbi kompleksov med EDTA in ioni kalcija (1). Cilj mehanskega in kemičnega čiščenja je pridobitev endogene DNA kosti in odstranitev eksogene (sodobne) DNA iz površine. Zato je zelo pomembno preprečevanje kontaminacije. Za delo v laboratoriju uporabljamo zaščitni plašč, kapo in masko ter dvojne rokavice. Vse pripomočke, ki jih potrebujemo za brušenje, rezanje in mletje kosti, obrišemo z natrijevim hipokloridom, destilirano vodo in etanolom, steriliziramo in čez noč obsevamo z UV svetlobo. Z belilom, vodo in etanolom pred in po končanem delu očistimo delovne površine. Pri vseh postopkih uporabljamo negativne kontrole, da preverjamo čistočo izolacijskih in pomnoževalnih reagentov in laboratorijske plastike. Pomembna je tudi priprava eliminacijske podatkovne zbirke (28).

7. Določitev količine DNA v vzorcih

Pred pomnoževanjem DNA v reakciji PCR opravimo kvantifikacijo ali določitev količine DNA v vzorcu z reakcijo PCR v realnem času. S to reakcijo lahko presodimo, ali je vzorec primeren za tipizacijo mikrosatelitov jedrne DNA ali le za tipizacijo mtDNA. Kadar hkrati pomnožujemo kratek in dolg fragment DNA, lahko iz njunega razmerja izračunamo tudi stopnjo razgrajenosti DNA, ki smo jo pridobili iz posmrtnih ostankov, kar nam pomaga pri izbiri genetskih označevalcev, ki jih bomo tipizirali. Poleg količine DNA v vzorcu in stopnje njene degradiranosti, lahko z novejšimi

kvantifikacijskimi kompleti ugotavljamo tudi prisotnost inhibitorjev reakcije PCR v ekstraktu (29). Če je začetna koncentracija DNA v vzorcu zelo nizka, se zaradi stohastičnega učinka možnost napak pri pomnoževanju v reakciji PCR poveča, saj lahko pride do izpada alelov zaradi nepomnožitve, kar moramo upoštevati pri interpretaciji rezultatov.

8. Pomnoževanje DNA v reakciji PCR

Ne glede na to, katera področja človeškega genoma želimo preiskovati (jedrno DNA ali mtDNA), je najprej potrebno pomnoževanje DNA v reakciji PCR. Metoda PCR je zelo uporabna v forenzično-genetskih preiskavah, saj preiskujemo zelo majhne količine DNA, ki je pogosto tudi močno razgrajena. Reakcija PCR pomnožuje molekule DNA na enak način, kot se to dogaja v celici. Reakcija temelji na prileganju in podaljševanju dveh oligonukleotidnih začetnikov, ki omejujeta področje DNA, ki ga želimo pomnožiti (17). Najprej poteče denaturacija, zaradi katere se dvojna vijačnica razpre. Potem vsak oligonukleotidni začetnik hibridizira z eno od ločenih verig, medtem pa temperaturno obstojna DNA polimeraza podaljšuje verigo. Iz ene molekule DNA ob optimalnih pogojih dobimo 2^n molekul produkta, kjer n pomeni število ciklov reakcije, teh pa je običajno 28–30 (17). Med reakcijo se pomnoženi fragmenti DNA označujejo s fluorescenčnimi barvili, ki nam služijo za zaznavo produktov v kapilarni elektroforezi, ki mora imeti sposobnost razlikovanja med fragmenti, ki se med seboj razlikujejo za en sam nukleotid (3). Pri tem postopku fluorescentno označene fragmente DNA ločimo na podlagi njihove molekulske mase. Produkta reakcije PCR vbrizgamo v kapilaro, ki vsebuje denaturacijski polimer. Električni tok, ki

steče skozi polimer, povzroči, da se negativno nabiti produkti premikajo proti pozitivnemu delu kapilare. Fragmenti DNA z manjšo molekulsko maso potujejo hitreje, laserski žarek jih registrira in v reakciji PCR hkrati pomnožene mikrosatelite tako lahko razlikujemo med seboj na podlagi različnih dolžin in obarvanja z različnimi fluorokromi (3).

9. Statistična ocena moči genetskega dokaza in interpretacija rezultatov

Laboratorijskemu delu v postopku identifikacije pogrešane osebe sledi interpretacija dobljenih rezultatov. Genetski profil posmrtnih ostankov primerjamo z referenčnim vzorcem in potrdimo ali ovržemo ujemanje (3). Če se genetski profil posmrtnega ostanka in genetski profil referenčnega vzorca (npr. zobne ščetke kot osebne predmeta pogrešane osebe) ujemata, nas zanima, kakšna je verjetnost, da imata oba genetska profila isti izvor, oziroma, kakšna je verjetnost, da ima naključno izbrana oseba iz slovenske populacije enak genetski profil kot biološka sled, najdena na preiskovani zobni ščetki, ali kakšna je verjetnost, da je ujemanje profila posmrtnih ostankov in profila bioloških sledi na zobni ščetki naključno (9). Ujemanje dveh genetskih profilov statistično ovrednotimo z verjetnostnim razmerjem, ki ga označimo s kratico LR (*angl.* Likelihood Ratio) in je obratno sorazmerno frekvenci genetskega profila: $LR = 1 / \text{frekvenca genetskega profila}$ (9). Pri izračunu verjetnostnega razmerja primerjamo verjetnost dogodka, da pripada biološka sled na zobni ščetki pogrešanemu (števec) in verjetnost dogodka, da pripada biološka sled na zobni ščetki naključno izbrani osebi iz slovenske populacije, če je pogrešani Slovenec (imenovalec). Verjetnost v

števcu je 1, verjetnost v imenovalcu pa je enaka frekvenci genetskega profila. Verjetnostno razmerje nam pove, kolikokrat bolj verjetno je, da pripada biološka sled na zobni ščetki pogrešanemu, kot da pripada naključno izbrani osebi iz slovenske populacije (9). Izračunamo ga s pomočjo različnih forenzičnih statističnih programov (30).

10. Primeri genetskih identifikacij pogrešanih oseb

Kot primer uporabe genetskih metod za identifikacijo pogrešanih oseb naj omenim letalsko nesrečo v Spitsbergnu. Olaisen in sodelavci (31) so identificirali 139 od skupno 141 ruskih in ukrajinskih žrtev s primerjavo s sorodniki. Najprimernejši referenčni vzorci so bile matere, očetje ali otroci žrtev, če so bile na razpolago le sestre ali bratje, pa so kot referenčne uporabili vzorce več bratov in/ali sester. Zaradi izredno visokega odstotka uspešnih identifikacij (98,6 %), hitrih analiz in razmeroma nizke cene (3–5 % cene celotne operacije) se je genetska identifikacija izkazala kot izredno primerna identifikacijska metoda pri množičnih katastrofah.

Z genetskimi metodami so identificirali tudi večino žrtev množičnih pobojev na ozemlju bivše Jugoslavije (32,33). Uspešna je bila identifikacija žrtev poveljnih množičnih pobojev v Sloveniji (34-36), kjer imamo evidentiranih preko 600 množičnih grobišč. Pri desetih grobiščih smo opravili molekularnogenetsko identifikacijo. To so grobišča, za katera so v glavnem bili na razpolago poimenski sezname žrtev, na osnovi katerih smo lahko zbrali primerjalne vzorce ustnih sluznic še živečih sorodnikov. Največje grobišče, ki smo ga molekularno genetsko obdelali, je grobišče Konfin I, iz katerega so leta 2006 izkopalni skeletne ostanke 88 žrtev, kjer

smo uspeli pridobiti brise ustnih sluznic še živečih bližnjih in daljnjih sorodnikov za 44 žrtev. Za preiskave smo uporabili stegenice, katerih genetske profile smo primerjali s še živečimi sorodniki. Ob primerjavi genetskih profilov kosti s še živečimi sorodniki smo pri 32 kosteh zasledili ujemanje z referenčnimi osebami (sestrami, brati, hčerkami, sinovi, bratanci in nečaki) ter statistično ovrednotili verjetnosti sorodstvenih povezav, ki je pri vseh 32 žrtvah presegala zahtevano verjetnost 99,9 % (verjetnost sorodstva, ki presega vrednost 99,9 %, zadostuje za pozitivno identifikacijo). Pred pričetkom molekularnogenetskih preiskav smo z namenom sledljivosti v primeru pojava kontaminacije pripravili eliminacijsko podatkovno zbirko, ki je vsebovala genetske profile vseh oseb, ki smo bile kakor koli v stiku s skeletnimi ostanki med izkopom, shranjevanjem vzorcev ter antropološko in genetsko študijo. Avtosomno jedrno DNA, kromosom Y in mtDNA smo tipizirali pri kosteh, pri referenčnih osebah – še živečih sorodnikih, smo tipizirali avtosomno jedrno DNA, za sorodnike po materini liniji pa je bilo potrebno pridobiti tudi haplotipe mtDNA, za sorodnike po očetovi liniji pa tudi haplotipe kromosoma Y. Pri osebah za eliminacijsko podatkovno zbirko smo poleg avtosomne jedrne DNA tipizirali še mtDNA in pri moških osebah mikrosatelite kromosoma Y. Dokazali smo, da je ob preiskavi večjega števila genetskih označevalcev (avtosomni mikrosateliti, mikrosateliti kromosoma Y in kontrolna regija mtDNA) in vključitvi tako bližnjih kot daljnjih sorodnikov žrtev v analizo, možno pozitivno identificirati žrtve druge svetovne vojne, za katere je zaradi časovne oddaljenosti težko pridobiti še živeče bližnje sorodnike. Za žrtve poveljnih pobojev v slovenskih grobiščih smo uspeli določiti tudi barvo oči in las (37).

Kot primer genetske identifikacije pogrešanih oseb v rutinskih preiskavah Laboratorija za molekularno genetiko Inštituta za sodno medicino naj navedem balonarsko nesrečo, ki se je 23. avgusta 2012 zgodila na Ljubljanskem barju. Zaradi striženja vetra pri tleh balon ni uspešno pristal, temveč ga je pričelo odbijati od tal, kar je povzročilo, da so nekateri potniki padli iz balona, tisti, ki so na balonu ostali, pa so zaradi vžiga utrpeli hude telesne poškodbe, nekateri celo smrtne. Na balonu je bilo 32 ljudi, 12 udeležencev nesreče je bilo huje poškodovanih, 14 lažje. Umrlo je šest ljudi, štirje na kraju nesreče, dva pa kasneje v bolnišnici (38). Štirje smrtno poškodovani in eden preživel, ki pa je kasneje tudi umrl, so bili tako hudo poškodovani, da smo lahko njihovo identiteto potrdili le

z genetskimi metodami. Kot primerjalne vzorce smo analizirali bližnje sorodnike preminulih (brate, sestre, sinove, matere, očete), iz pooglenelih trupel pa smo odvzeli kri iz aorte, iz katere smo uspeli pridobiti genetske profile. Identifikacijo vseh pogrešanih smo izvedli v 36 urah.

11. Zaključek

Genetska identifikacija je najnovejša identifikacijska metoda, katere razvoj se je pričel po odkritju izredno polimorfni odsekov DNA. Sodnomoedicinske in antropološke metode tako danes dopolnjuje genetska identifikacija, katere rezultati so najzanesljivejši in nam omogočajo identifikacijo močno razgrajenih, fragmentiranih ali skeletiziranih neprepoznanih posmrtnih ostankov.

Literatura

- Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija posmrtnih ostankov. *Med Razgl.* 2013;52(2):213–234.
- Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija neznanih trupel iz skeletnih ostankov in zob. In: Luzar B, Poljak M, Glavač D, Balažič J, ur. *Molekularna diagnostika v medicini. 15. spominsko srečanje akademika Janeza Miličinskega in 36. memorialni sestanek profesorja Janeza Plečnika in 1. srečanje slovenskega društva za humano genetiko z mednarodno udeležbo.* Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2005. p. 73–84.
- Sozer Ca. *DNA Analysis for Missing person Identification in Mass Fatalities.* Boca Raton: Taylor & Francis; 2014.
- Comité international de la Croix-Rouge. *Missing people, DNA analysis and identification of human remains. A guide to best practice in armed conflicts and other situations of armed violence.* 2 nd ed. Geneva: ICRC; 2009.
- Zupanič Pajnič I. Molekularnogenetska preiskava 300 let starih skeletov iz Auerspergove grobnice. *Zdrav Vestn.* 2013;82(12):796–808.
- Zupanič Pajnič I, Balažič J, Komel R. Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA control region in the Slovenian population. *Int J Legal Med.* 2004;118(1):1–4.
- Zupanič-Pajnič I. Genetika v pravosodju in njena uporaba pri preverjanju sorodnosti in identifikacijah. *Drevesa.* 2013;20:16–20.
- Montelius K, Stenersen M, Sajantila A. *Disaster Victim Management: DNA Identification.* Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine. 2nd ed. New York: Elsevier, 2015.
- Zupanič Pajnič I. Forenzična genetika. *Med Razgl.* 2011;50(3):325–340.
- Ferreira TG, Paula KA, Nogueirac RF, Oliveira ES, Moraesa AV. A comparative study between muscle, cartilage and swab from inside the urinary bladder samples for DNA typing of severely burnt bodies in disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* 2015;19:e617–e618.
- Baeta M, Núñez C, Cardoso S, Palencia-Madrid L, Herrasti L, Etxeberria F, de Pancorbo M. Digging up the recent Spanish memory: genetic identification of human remains from mass graves of the Spanish Civil War and posterior dictatorship. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;19:272–279.
- Hartman D, Benton L, Morenos L, Beyer J, Spiden M, Stock A. Examples of kinship analysis where Profiler Plus™ was not discriminatory enough for the identification of victims using DNA identification. *Forensic Sci Int.* 2011;205(1–3):64–68.
- Bradford L, Heal J, Anderson J, Faragher N, Duval K, Lalonde S. Disaster victim investigation recommendations from two simulated mass disaster scenarios utilized for user acceptance testing CODIS 6.0. *Forensic Sci Int Genet.* 2011;5(4):291–296.
- Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology & Technology behind STR Markers.* San Diego: Academic Press; 2001.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Science; 2002.
- Šterlinko H. Preiskava avtosomnih in na kromosom Y vezanih mikrosatelitnih in minisatelitnih lokusov za reševanje sodnomoedicinskih primerov

- [Master's Thesis], Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2000. p. 2–5.
17. Zupanič I. Uvedba preiskave DNA za prepoznavanje oseb in preverjanje sorodstvenih povezav v slovenski populaciji [Master's Thesis]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 1999. p. 2–3,38.
 18. Zupanič Pajnič I, Gornjak Pogorelc B, Balažič J, Zupanc T, Štefanič B. Highly efficient nuclear DNA typing of the World War II skeletal remains using three new autosomal short tandem repeat amplification kits with the extended European Standard Set of loci. *Croat Med J.* 2012;53(1):17–23.
 19. Diegoli MT. Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes. *Forensic Sci Int Genet.* 2015;18:140–151.
 20. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *An introduction to Forensic Genetics.* Chichester: John Wiley & Sons; 2007. p. 125–127.
 21. Zupanič Pajnič I. Identifikacija oseb iz starih in slabo ohranjenih bioloških materialov s polimorfizmi mitohondrijske DNA [PhD Thesis]. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; 2006. p. 2–3.
 22. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clinical Microb.* 2001;39(2):485–493.
 23. Zupanič-Pajnič I, Debska M, Gornjak-Pogorelc B, Vodopivec Mohorčič K, Balažič J, Zupanc T, Geršak K. Highly efficient automated extraction of DNA from old and contemporary skeletal remains. *J Forensic Legal Med.* 2016;37:78–86.
 24. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PME, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clinical Microb.* 1990;28(3):495–503.
 25. Qamar W, Khan MR, Arafah A. Optimization of conditions to extract high quality DNA for PCR analysis from whole blood using SDS-Proteinase K method. *Saudi J Biol Sci.* 2016. In press.
 26. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(6):1939–43.
 27. Zupanič Pajnič I. Visoko učinkovita metoda ekstrakcije DNA iz skeletnih ostankov. *Zdrav Vestn.* 2011;80(3):171–181.
 28. Zupanič Pajnič I. Extraction of DNA from human skeletal material. *Methods Mol Biol.* 2016;1420:89–108.
 29. Ewing MM, Thompsona JM, McLaren RS, Purperob VM, Thomasb KJ, Dobrowskic PA, DeGrootc GA, Romsosd EL, Stortsa DR. Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant system. *Forensic Sci Int Genet.* 2016;23:166–177.
 30. Brenner CH. *DNA-VIEW 2007 User Guide,* Oakland (CA); 2007.
 31. Olaisen B, Stenersen M, Mevag B. Identification by DNA analysis of the victims of the august 1996 Spitsbergen civil aircraft disaster. *Nature Genet.* 1997;15(4):402–405.
 32. Davoren J, Vanek D, Konjhodžić R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ. Highly effective DNA extraction method for nuclear short tandem repeat testing of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J.* 2007;48(4):478–485.
 33. Jakovski Z, Nikolova K, Jeneska B, Cakar Z, Stančkov A, Poposka V, Pavlovski G, Duma A. Forensic DNA analysis in the identification of human remains in mass graves. *J Cli Path Forensic Med.* 2010;1(1):1–4.
 34. Zupanič Pajnič I. Genetic identification of Second World War victim's skeletal remains. Saarbrücken: Lap Lambert Academic Publishing; 2013.
 35. Zupanič Pajnič I. Molekularno genetska identifikacija domobranskih žrtev. *Zdrav Vestn.* 2008;77(11):745–750.
 36. Zupanič-Pajnič I, Gornjak-Pogorelc B, Balažič J. Molecular genetic identification of skeletal remains from the Second world war Konfin I mass grave in Slovenia. *Int J Legal Med.* 2010;124(4):307–317.
 37. Chaitanya L, Zupanič Pajnič I, Walsh S, Balažič J, Zupanc T, Kayser M. Bringing colour back after 70 years: Predicting eye and hair colour from skeletal remains of World War II victims using the HIRISplex system, *Forensic Sci Int Genet.* 2016;26(1):48–57.
 38. STA. Leto dni po balonarski nesreči na Barju: štiri osebe še z zdravstvenimi težavami. 2013. Available from: <http://www.24ur.com/novice/slovenija/leto-po-balonarski-nesreci-na-barju-stiri-osebe-se-z-zdravstvenimi-tezavami.html>.