

# Morfološka analiza i utvrđivanje srodstva Ostrogota s umjetno deformiranim lubanjama

---

Jurković, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:382540>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno - matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

**Mirna Jurković**

**Morfološka analiza i utvrđivanje srodstva Ostrogota s umjetno  
deformiranim lubanjama**

**Diplomski rad**

Zagreb, 2017 .

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Antropološkog centra Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti pod vodstvom prof. dr. sc. Marija Šlausa te na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Forenzičkom DNA laboratoriju tvrtke Genos pod vodstvom doc. dr. sc. Inge Marijanović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno - matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre biologije.

## ZAHVALE

Veliko hvala mojim mentorima doc. dr. sc. Ingi Marijanović i prof. dr. sc. Mariju Šlausu što su mi omogućili izradu ovog diplomskog rada te odgovarali na sva moja pitanja i pomagali mi u eksperimentalnom dijelu.

Hvala dr. sc. Vedrani Škaro koja mi je omogućila da dio rada izvedem u Forenzičkom DNA laboratoriju tvrtke Genos.

Također, zahvaljujem se dr. sc. Vlasti Vyroubal i dr. sc. Željki Bedić iz Antropološkog centra uz koje sam puno naučila i pritom se dobro zabavila.

Hvala dr. sc. Mariju Novaku bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio moguć, kao i zaposlenicima Molekularnog zavoda PMF-a koji su mi uskakali u pomoć kada je to bilo potrebno.

Hvala doc. dr. sc. Zoranu Tadiću koji mi je tijekom svih godina studiranja bio svojevrsni mentor iz sjene.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, a posebno roditeljima koji su mi omogućili da budem ovdje gdje jesam sada. Zahvalna sam vam za sve što ste mi pružili i što ste uvijek tu za mene.

Svim mojim prijateljima – hvala vam što postojite i hvala vam na svim našim uspomenama do sada i na onima koje ćemo tek stvoriti. Među njima su i moje Gracije kojima moram dodatno zahvaliti što su me uvijek spašavale s informacijama vezanim za faks koje su meni uvijek nekako uspjele promaknuti i Vale za koju šta god napišem bilo bi premalo.

I na kraju, posebno hvala ide Filipu, koji stvarno zna koliko teško može biti sa mnom, ali apsolutno uvijek zna naći način da sve okrene na dobro. Iako je student strojarstva, sa mnom je naučio dovoljno da ga se može smatrati i studentom biologije uz sve moje pripreme za ispite, seminare i posebno ovaj diplomski rad.

Ovaj rad posvećujem svom dedi, Antonu Mauhuru, čovjeku zbog kojeg od malih nogu volim biologiju.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

# **MORFOLOŠKA ANALIZA I UTVRĐIVANJE SRODSTVA OSTROGOTA S UMJETNO DEFORMIRANIM LUBANJAMA**

Mirna Jurković  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb , Hrvatska

Umjetno deformirane lubanje su fenomen koji se još od prapovijesti javlja u različitim kulturama na različitim geografskim područjima. Pretpostavlja se da je razlog postojanja ovakve trajne promjene tjelesnih karakteristika potreba za isticanjem određene socijalne grupe od ostatka populacije. Na nalazištu AN10A – NČ JASA u Hrvatskoj 2015. otkriveno je nalazište Ostrogota koje datira iz 5., 6. stoljeća i među 11 pojedinaca utvrđeno je da njih šestoro ima umjetno deformiranu lubanju. U ovom radu morfološki smo obradili skeletni materijal s nalazišta s posebnom pažnjom posvećenom pojedincima s deformiranom lubanjom, tj. načinima i tipovima na koji je do prisutne deformacije došlo. Analizom STR lokusa pokušalo se utvrditi srodstvo između pojedinaca s deformitetom i onih bez njega. Radna pretpostavka je bila da će pojedinci s deformiranom lubanjom biti u međusobnom srodstvu, što bi poslužilo kao dokaz za pretpostavku postojanja rituala kao izraza socijalnog statusa. Zbog slabe kvalitete drevne DNA i neadekvatnih uvjeta klasičnih laboratorija u kojima je analiza izvršena, dobivenim rezultatima nije bilo moguće utvrditi srodstvo pojedinaca. To navodi na potrebu ponavljanja eksperimenta u laboratoriju specijaliziranom za rad s drevnom DNA kao i upotrebu metoda sekvenciranja nove generacije u kombinaciji s analizom polimorfizama DNA različitih od STR lokusa.

(67 stranica, 44 slike, 8 tablica, 42 literaturnih navoda,  
jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: umjetno deformirane lubanje, analiza skeletnih ostataka, STR analiza,

Voditelj 1: prof. dr. sc. Mario Šlaus

Voditelj 2: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Ocjenitelji:

Rad prihvaćen:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation thesis

# **MORPHOLOGICAL ANALYSIS AND DETERMINATION OF MUTUAL KINSHIP BETWEEN OSTROGOTHS WITH ARTIFICIALLY DEFORMED SKULLS**

Mirna Jurković  
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb , Hrvatska

Artificially deformed skulls occur in different cultures and various geographic areas since prehistoric times. It is assumed that the reason for the existence of such a permanent change of physical characteristics was the need to distinguish certain social groups from the rest of the population. Site AN10 - NČ JASA 2015 in Croatia revealed the presence of an Ostrogoth cemetery that was in use from the 5<sup>th</sup> or 6<sup>th</sup> century AD. Among the 11 individuals recovered, six have had artificially deformed skulls. In this work we have analysed skeletal material from the site with special attention to individuals with a deformed skull and the ways and types in which present deformation occurred. Analysis of STR loci was attempted to determine kinship between individuals with deformed skulls and the ones without it. Our hypothesis was that individuals with deformed skull would be related one to another which would serve as proof for the assumption that the ritual was an expression of elevated social status. Due to the poor quality of ancient DNA and inadequate conditions in the classical laboratory where the analyses was performed, it wasn't possible to determine whether there is, in fact, a kinship relationship between individuals with deformed skulls. Concerning this the repetition of the experiment in a laboratory specialized for the analysis of ancient DNA is needed. Additionally, use of a next generation sequencing methods combined with the analysis of DNA polymorphisms different from STR loci could be valuable.

(67 pages, 44 figures, 8 tables, 42 references, original in:  
Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: artificially deformed skulls, morphological analysis, STR analysis

Supervisor 1: prof. dr. sc. Mario Šlaus

Supervisor 2: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Reviewers:

Thesis accepted:

## SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
1.1. Morfološka analiza .....	3
1.2. Drevna DNA (aDNA eng. <i>ancient DNA</i> ) .....	9
1.2.1. Izolacija drevne DNA iz uzoraka .....	12
1.3. Utvrđivanje srodstva.....	14
1.3.1. Struktura genomske DNA .....	14
1.3.2. DNA biljezi .....	17
1.3.3. Pravila kod utvrđivanja srodstva .....	19
1.4. Ciljevi istraživanja.....	21
2. MATERIJALI I METODE .....	23
2.1. Morfološka analiza .....	23
2.2. Ekstrakcija DNA.....	23
2.2.1. Dobivanje praha pužnice .....	24
2.2.2. Izolacija DNA iz praha pužnice .....	25
2.2.3. Mjerenje koncentracije umnožene DNA .....	27
2.2.4. PCR metoda za provjeru kvalitete DNA .....	27
2.2.5. Elektroforeza na gelu .....	28
2.3. Određivanje srodstva između pojedinaca .....	29
2.3.1. Višestruki (eng. <i>multiplex</i> ) PCR sustav <i>PowerPlex<sup>®</sup> Fusion</i> .....	30
2.3.2. Detekcija rezultata kapilarnom elektroforezom .....	33
3. REZULTATI.....	35
3.1. Izolacija DNA.....	49
3.2. Utvrđivanje srodnosti .....	50
4. RASPRAVA.....	58
5. ZAKLJUČAK .....	61
6. LITERATURA.....	62
7. ŽIVOTOPIS .....	66
8. PRILOZI.....	67

## 1. UVOD

Zahvaljujući napretku znanosti na području proučavanja DNA znanstvenici su u mogućnosti istraživati DNA iz organizama koji su umrli stoljećima, tisućljećima, pa čak i milijunima godina prije našeg vijeka. Ovaj pomak vremenskog okvira u kojem je moguće istraživati prirodu oko nas molekularno - genetičkim metodama doveo je do značajnog napretka na području evolucijskih, populacijskih te, u slučaju proučavanja ljudskih ostataka, antropoloških istraživanja. Bioarheologija kao znanstvena disciplina koja proučava ljudske skeletne ostatke iz arheološkoga konteksta kako bi rekonstruirala uvjete i kvalitetu nekadašnjih populacija pruža uvid u razumijevanje ljudske prošlosti. Osim što su jasniji nekadašnji uvjeti i kvaliteta života, moguće je analizirati podrijetlo, starost te smjer širenja pojedinih bolesti, kao i promjene i migracije između starih populacija.

Na nalazištu AN10A NČ – JASA 2015. u Baranji 2015. godine pronađeni su koštani ostaci za koje se utvrdilo da datiraju iz petog ili šestog stoljeća n.e. te da su najvjerojatnije pripadali Ostrogotima. Ostrogoti ili Istočni Goti bili su germansko barbarsko pleme koje je došlo s istoka i naselilo prostore zapadnog Rimskog Carstva i Bizanta te uvelike utjecalo na političke prilike kasnog rimskog Carstva. Porijeklom su najvjerojatnije pripadali Greutungima - Gotima koji su u trećem i četvrtom stoljeću počeli naseljavati prostor južno od Baltičkog mora te formirali kraljevstvo koje se protezalo od Baltičkog do Crnog mora. Tijekom četvrtog i petog stoljeća nalazili su se u vazalskom odnosu s Hunima te su zajedno s njima naselili prostor Balkanskog poluotoka. Nakon smrti posljednjeg hunskog vođe Atila, Ostrogoti su zajedno s ostalim plemenima (većinom germanskim) ovoga područja porazili Hune i naselili prostor Panonije. Uskoro su se proširili i po okolnim područjima te osnovali Ostrogotsko Kraljevstvo koje je trajalo do 553. godine (Sl. 1). Bizantsko – gotski rat (535. – 552. godine) koji je uslijedio doveo je do jake depopulacije ovoga područja, a preostali Ostrogoti stopili su se s Lombardima koji su osnovali kraljevstvo u Italiji 568. godine. U većem broju naroda koji su u navedenom razdoblju naseljavali Panoniju pronađene su umjetno deformirane lubanje te postoji pretpostavka se da su taj običaj ovi narodi mogli preuzeti od već spomenutih Huna s obzirom da se može povući paralela u pojavljivanju ovakvih lubanja s njihovim migracijama (Molnár i sur. 2014)





**Slika 1.** Ostrogotsko kraljevstvo na svom vrhuncu

Od 11 uzoraka koji su bili dopremljeni na analizu u Antropološki centar Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti za šest je utvrđeno da najvjerojatnije imaju umjetno deformirane lubanje, dok se za jedan uzorak o tome ne može ni nagađati zbog nedostatka skeletnog materijala u području lubanje.

Modifikacije koje uzrokuju trajne promjene izgleda tijela kao što su tetovaže, pirsinzi (eng. *piercing*), obrezivanje, različite vrste unakaženja kao što je npr. vezanje stopala kako bi mu se onemogućio rast i slično, u praksi su od početaka ljudske povijesti. Glavna misao vodilja ovih obreda isticanje je socijalnog statusa određene grupe. Osnove ovih običaja počivaju na teoriji hendikepa koja se svodi na seksualnu selekciju – lav s najvećom i najgušćom grivom pokazuje svoju superiornost nad ostalim mužjacima svoje vrste jer unatoč problemima koje mu ta griva stvara on uspijeva biti jednako dobar u životnim aktivnostima poput lova kao što će i mužjak pauna s najvećim i najljepšim repom biti prvi izbor svake ženke jer je unatoč velikom hendikepu koje mu stvara šareni i veliki rep u bježanju od predatora uspio preživjeti dokazujući time prisutnost gena koje ženka želi predati svojim potomcima (Koziel i sur. 2010). Dok kod ljudi neke modifikacije prate postavke teorije hendikepa, neke su prisutne samo kako bi se naglasila razlika između skupina ljudi različitog društvenog statusa bez potrebe naglašavanja superiornosti određenim hendikepom.

Različiti tipovi alteracije kostiju prisutni su u različitim dijelovima svijeta u prošlosti od kojih je najkarakterističnija umjetna deformacija lubanje (najstarije pronađene umjetno deformirane lubanje sežu u kasni paleolitik) i trepancija (prapovijesna kirurška metoda u kojoj se bušila rupa u glavi u svrhu otkrivanja sadržaja lubanje u medicinske ili mistične svrhe). Umjetna deformacija lubanje bila je visoko zastupljena u povijesti zahvaljujući plastičnosti lubanje kod novorođenčadi jer se od dana rođenja pa do otprilike treće godine života jakim pritiskom može utjecati na njen izgled (Molnár i sur. 2014). Ovaj običaj jedan je od

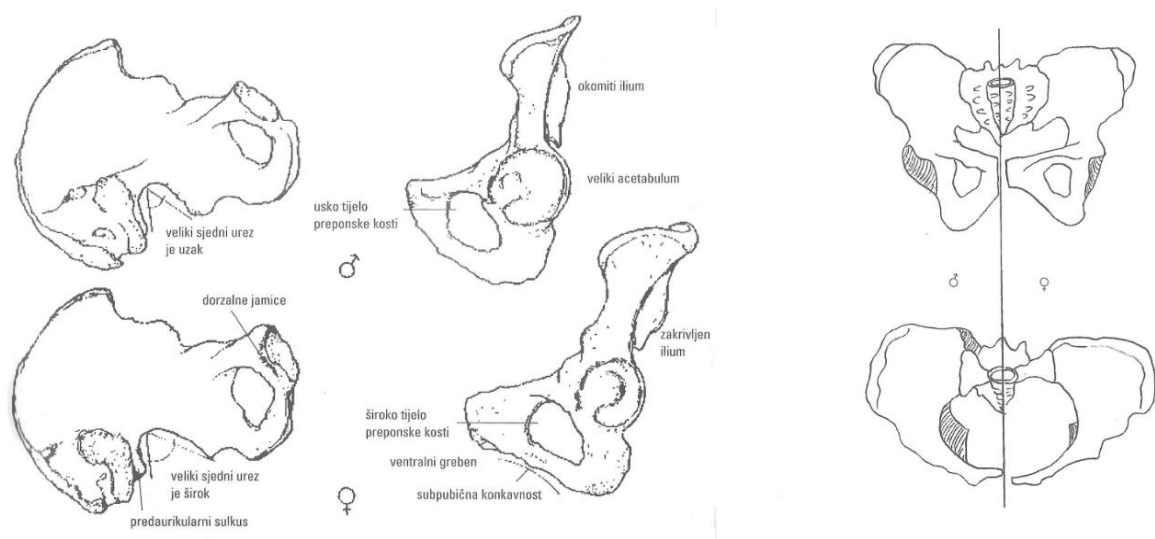
najzanimljivijih u ljudskoj povijesti, a pojavljivao se na svim kontinentima u različitim kulturama i različitim vremenskim razdobljima. S obzirom na konvergentni razvoj ovog običaja kroz povijest, najvjerojatnije je da je nastao kao iskaz socijalnog statusa za čime postoji potreba u većini ljudskih zajednica. Kako deformacija počinje odmah po rođenju, pojedinci nad kojima je ona provedena bili su specifični s obzirom na ostalu populaciju te su dodatno osigurali da bilo tko ne može u bilo kojem trenutku života imitirati njihov status za razliku od npr. tetovaža, naušnica ili sličnih obilježja do kojih se može doći i tijekom života. Logično je za zaključiti kako bi ovakav način obilježavanja jedinki mogao biti prisutan u određenim, na neki način, elitnijim obiteljima toga vremena.

### **1.1. Morfološka analiza**

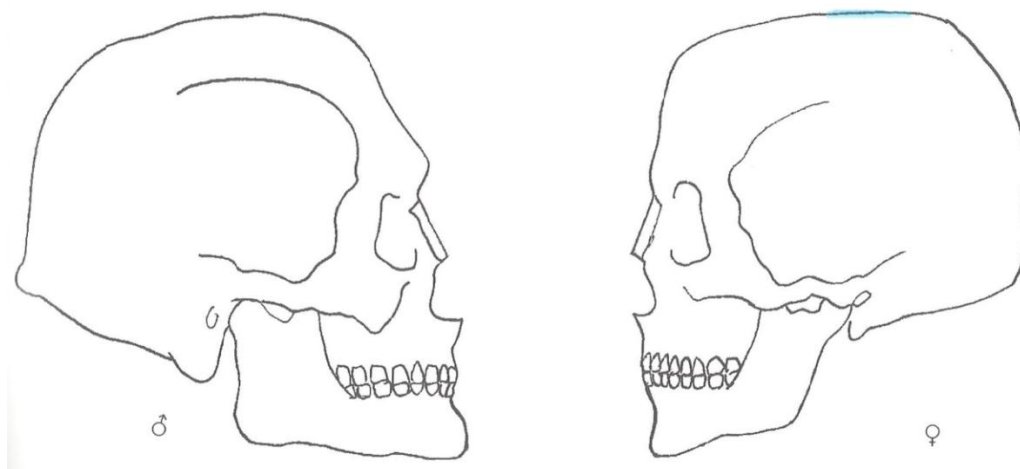
U morfološkoj analizi skeletnih ostataka potrebno je odrediti spol, starost u trenutku smrti te patološke promjene kao i, u slučaju postojanja takve, tip deformacije lubanje.

Spol se može odrediti na više različitih načina. Karakteristična obilježja muškog ili ženskog kostura nisu kod svakog pojedinca jasno izražena, a ponekad nedostaje dio kostura stoga je potrebno imati više kriterija ovisnih o različitim koštanim dijelovima. Postoje dva pristupa u određivanju spola – vizualni pregled morfologije kostura te statistička analiza izmjerenih vrijednosti različitih dijelova kostura, pri čemu se najčešće rabe diskriminantno funkcijske statističke analize. Vizualni pregled morfologije kostura temelji se na funkcionalnim razlikama i razlikama u veličini muških naspram ženskih kostiju. Kosti muškaraca u pravilu su robusnije, dulje i imaju jače izražena mišićna hvatišta od kostiju žena, a funkcionalna razlika očituje se u zdjeličnom obuču. On omogućava dvonožni hod, prenosi težinu tijela s kralježnice na kostur nogu, služi kao hvatište mišićima, štiti zdjelične organe i kod žena porod. Do razlike u izgledu zdjelice između žena i muškaraca došlo je zbog potreba evolucije. Ljudska vrsta "odlučila" je kao svoju najveću prednost odabrati mozak stoga je on morao narasti time povećavajući glavu novorođenčeta. Takva adaptacija otežala je ljudski porod na razinu neviđenu u životinjskom svijetu. Uz to, ljudska vrsta hoda na dvije noge stoga je kostur žene morao uskladiti potrebe uskog zdjeličnog obuča koji omogućava nesmetan uspravni hod i potrebe širokog zdjeličnog obuča da omogući porod. Zahvaljujući ovim razlikama, zdjelični obuč je izrazito zahvalan pri preciznom određivanju spola kada imamo samo skeletne ostatke s obzirom da ovisno o spolu postoje vizualno jasno izražene razlike (Phenice, 1969) (Sl. 2). Osim zdjelice, jaki spolni dimorfizam pokazuje i lubanja (Krogman i Isčan, 1986). Kod lubanje ne postoji funkcionalan razlog za razliku muškarca i

žene kao u primjeru zdjelice. Uzrok ovoj pojavi mogla bi biti činjenica da uz prirodnu selekciju postoji i spolna selekcija, a u obje selekcije pobjednik je onaj koji prenese svoje gene. Mlade žene imaju veće šanse za reproduksijski uspjeh i rađanje većeg broja djece stoga na biološkoj razini privlače muškarce koji u njima vide veće šanse za prijenos svojih gena (Jones i sur., 1995). Ženske lubanje su iz tog razloga sličnije dječjim, nego robusnim, jakim muškim lubanjama (Sl. 3). Diskriminantne funkcije za određivanje spola na temelju dimenzija bedrene i goljenične kosti su izrazito korisne. Problem kod ove metode je činjenica da se, kako bi se došlo do standardne vrijednosti, mora istražiti veliki broj kostiju točno određene populacije iz točno određenog vremenskog razdoblja za koje se točno zna kojeg su bili spola (Šlaus, 2006).



**Slika 2.** Morfološke građe u zdjelici žene i muškarca. Na desnoj strani može se vidjeti da je zdjelični obruč žene širi i kraći od onog kod muškarca (preuzeto iz Šlaus, 2006)

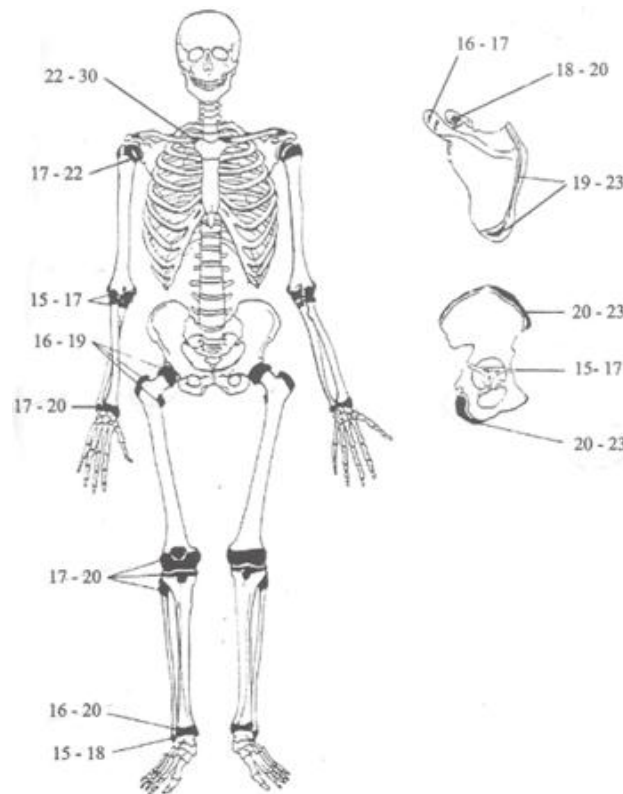


**Slika 3.** Morfološke razlike u građi muške i ženske lubanje (preuzeto iz Šlaus, 2006)

Spolni diformizam očituje se tek nakon puberteta stoga se spol djece kod morfoloških analiza kostura ne određuje. Postoji nekoliko mogućih metoda, ali nijedna nije potpuno pouzdana.

Kod određivanje dobi u trenutku smrti potrebno je imati na umu da se biološka (u ovom slučaju koštana) i kronološka starost ne moraju nužno poklapati (Šlaus, 2006). Do toga dolazi zbog činjenice se sva djeca ne razvijaju jednakom brzinom kao i zbog genetike, ekologije i socijalnog faktora. Stupanj razvoja ovisan je uvelike o mogućnosti kvalitetne prehrane, stoga će osobe koje su u djetinjstvu bile pothranjene kasniti sa svojim koštanim razvojem te će i analiza njihove dobi pregledom kostura rezultirati ponešto krivim rezultatima. Zbog navedenog, procjena dobi kod arheološkog materijala daje se u rasponu od pet godina (npr. Od 30 – 34 godine). Osim promatranjem stupnja razvoja kosti neke osobe, starost se određuje i stupnjem propadanja kostura ukoliko je do nje stiglo doći. Stoga će se kod procjena dobi kostura male djece koristiti zubi i njihov stupanj razvoja s obzirom da je poznato kada je vrijeme izbijanja kojeg zuba. Kada se radi o trajnom zubalu, potrebno je uzeti u obzir činjenicu da se ono počinje javljati kod djevojčica 6 mjeseci ranije od dječaka. Kod djece između otprilike desete i petnaeste godine života starost se određuje pomoću standardiziranih vrijednosti za duljinu femura i tibije. Kod starije dobi (između otprilike petnaeste i dvadeset i treće godine) dolazi do spajanje dijafiza s epifizima koje su to tada bile u potpunosti odvojene. S obzirom da za različite dijelove tijela dolazi do ovakvog spajanja u različitim trenucima života, ovaj način nam omogućuje određivanje unutar navedene dobne skupine (Sl. 4). Također, linija spoja epifize s dijafizom vidljiva je još neko vrijeme nakon što što je do spajanja došlo, stoga možemo odrediti je li do ove pojave došlo davno ili ne toliko davno prije smrti. Kao i kod izbijanja trajnih zuba, ovaj proces pojavljuje se kod žena dvije ili tri godine ranije nego kod muškaraca. Kod osoba koje su završile rast za određivanje starosti najadekvatnijima su se pokazale dvije strukture: pubična simfiza i aurikularna ploština crijevnne kosti, obje prisutne na zdjeličnom obroču. U morfologiji pubične simfize razlikujemo šest razdoblja (Brooks i Suchey, 1990) te je za svako pojedinačno razdoblje naveden rani i kasni stadij, pretpostavljena dob, standardna devijacija te u kojem se rasponu života može pojaviti opisani izgled. Aurikularna ploština čvršća je struktura od pubične simfize, te time postoji veća vjerojatnost da će ona biti očuvana na nalazištu. Iz te potrebe određeno je 8 razdoblja promjena u njenoj morfologiji (Lovejoy i sur., 1985). Svako razdoblje karakteristično je za raspon od pet godina ljudskog života. Osim navedenog, za određivanje starosti ljudskog kostura može se koristiti sternalni kraj četvrtog rebra, a kao dodatni kriterij

promatra se stupanj degeneracije određenih skeletnih dijelova, imajući na umu da je on uvelike ovisan o genetici i uvjetima života pojedinca.



**Slika 4.** Dob u kojem dolazi do spajanja epifiza s dijafizama za neke kosti u ljudskom tijelu (preuzeto iz Šlaus, 2006)

S obzirom da od pojedinca kojeg analiziramo imamo samo njegove kosti rijetko kada ćemo moći znati od kojih je sve bolesti bolovao, ili (u slučaju da je od jedne umro) koja je za njega bila fatalna. Razlog tomu je činjenica da velik broj bolesti uopće ne napada kosti, a u slučajevima kada bolest i ima tendenciju proširenja na kosti, vrlo vjerojatno ubije pojedinca prije navedene faze (Šlaus, 2006). Unatoč tome, postoji određen broj bolesti koje je moguće dokazati pomoću promjena na kostima. Općenito, postoje samo tri odgovora žive kosti na patološkog uzročnika, a to su gubitak kosti, stvaranje nove kosti ili simultani nastanak i gubitak kosti. Do ovih pojava dolazi iz različitih razloga koji daju specifičan izgled kosti, te je na temelju njega moguće odrediti samog uzročnika. Neke od bolesti koje se mogu dijagnosticirati iz kostiju su nespecifične zarazne bolesti poput periostitisa ili osteomijelitisa, specifične zarazne bolesti poput tuberkuloze ili lepre, metaboličke bolesti kao rahitis ili skorbut, te različite anemije i reumatske bolesti.

Kod određivanja trauma na početku je potrebno odrediti je li oštećenje kosti nastalo prije ili nakon smrti. U slučaju da je ozljeda antemortalna, vidjet će se srastanje ili početak srastanja same kosti. Kod perimortalnih ozljeda, odnosno ozljeda koje su nastupile neposredno prije smrti (i vjerojatno bile razlog samoj smrti) neće doći do srašćavanja, no postoji razlika između načina na koji reagira živa kost (ispunjena kolagenom itd.) i mrtva kost. Ozljede mogu nastati kao posljedica nesretnog slučaja ili namjernog nasilja. Najčešće ozljeđivani dio tijela u ovakvim situacijama su potkoljenica, ključna kost, nadlaktična, palačana kost i kuk, dok je kod namjernih ozljeda najveći broj ozljeda na glavi (Šlaus, 2006).

Kod analize kostiju i zuba pojedinca često se mogu primijetiti karakteristične promjene koje su posljedica dnevnih aktivnosti i teškog fizičkog rada ili habitualnih aktivnosti ukoliko pričamo o zubima. Osteoartritične promjene na zglobovima dugih kostiju i kralježnici glavni su pokazatelj količine fizičkog rada koju je pojedinac obavljao kroz život (Šlaus, 2006). Ovakvi podaci koriste se kako bi se odredile karakteristike određene populacije – kakvim su se poslovima bavili te kakva im je bila kvaliteta života.

Tip umjetne deformacije lubanje najčešće se određuje po najčešće korištenoj klasifikaciji u antropologiji, a to je klasifikacija po Dembu i Imbelloniju razvijena 1938. godine (Molnár i sur., 2014). Po njoj postoje četiri glavna tipa na koji se lubanja deformirala u prošlosti.

- *Tabular oblique*

Lubanja je karakteristična po kosoj ravnini na okcipitalnoj kosti te udubljenom i nakošenoj frontalnoj kosti. U većini slučajeva vidno je povećana dužina i širina lubanje. Deformacija se provodi anteriorno – posteriornom kompresijom pomoću čvrstih i krutih predmeta. Generalni oblik osi lubanje je pomaknu posteriorno naspram Frankfort horizontalne ravnine.



**Slika 5.** *Tabular oblique* tip deformacije (preuzeto sa <http://www.latinamericanstudies.org/maya-cranial-manipulation.htm>)

- *Tabular erect*

Povećani su hranidbeni kanali (lat. *nutrient foramen*) na tjemenim kostima, dolazi do formiranja dodatne kosti na lamboidnom šavu, a posteriorni dio velikog otvora (lat. *foramen magnum*) je zaravnjen. Ovakav tip deformacije postiže se postavljanjem udlage od čvrstih materijala što rezultira u anteriorno – posteriornoj kompresiji lubanje. Kranijum se povećava u visinu i širinu, a generalnu os oblika lubanje približno je ortogonalan naspram Frankfort horizontalne ravnine.



**Slika 6.** *Tabular erect* tip deformacije (preuzeto iz Molnár i sur., 2014)

- *Circular oblique*

Dolazi do manjeg ili većeg spoljštavanja frontalne i okcipitalne kosti u svodu lubanje. U područjima jače deformacije često je prisutan poprečni žlijeb koji pada direktno na generalnu os oblika lubanje. Prisutan je nagib unazad s obzirom na Frankfortsku horizontalnu ravninu. Rast u dužinu i širinu je ograničen, ali često je prisutan kompenzacijski rast u obliku longitudinalnog rasta svoda lubanje. Ovaj tip deformacije postiže se primjenom fleksibilnih materijala kao što su vrpce, zavoji ili trake.



**Slika 7.** *Circular oblique* tip deformacije (preuzeto iz Molnár i sur., 2014)

- *Circular erect*

Prisutan je blago ili izraženo spljoštavanje frontalne kosti. Često je prisutan poprečni žlijeb na frontalnoj kosti koji se nastavlja na temporalnim kostima i završava na okcipitalnoj kosti. Rast u dužinu i širinu je ograničen, a prisutno je izraženo izduljivanje lubanje. Kako bi se postigla ovakva deformacija koriste se materijali opisani u *Circular oblique* tipu.



**Slika 8.** *Circular erect* tip lubanje (preuzeto iz Molnár i sur., 2014)

## 1.2. Drevna DNA (aDNA eng. *ancient DNA*)

Otkriće DNA zasigurno je jedno od ključnih u suvremenoj znanosti. Ova nukleinska kiselina pruža uvid u funkcioniranje cjelokupnog živog svijeta uključujući nas same. Proučavajući DNA postepeno se slaže slagalica razvoja današnjih vrsta i njihovih predaka, odnosno evolucijskih procesa koji prate živi svijet od njegova početka. Dok uzorci DNA prikupljeni iz živućih organizama omogućuju tek indirektan uvid u prošlost vrsta, drevna DNA, prikupljena iz arheoloških i fosilnih uzoraka predstavlja mnogo direktniji i potpuniji pogled na evolucijska, povijesna i populacijska zbivanja (Willerslev i Cooper, 2005). Kao što su u morfologiji vrsta fosilni pronalasci imali ogromnu ulogu u vizualizaciji historijskih vrsta (teško bi bilo samo na temelju izgleda današnjih vrsta točno zaključiti kako su dijelovi tijela njihovih predaka izgledali), tako se otkrićem drevne DNA dobiva uvid u genetsku pozadinu živog svijeta prošlog vremena. Problem koji se javlja u istraživanjima ovakvog tipa DNA je njezina neočuvanost, odnosno slaba kvaliteta. Dugi vremenski period stajanja i okolišni uvjeti u kojima se nalazila poput temperature, pH, dostupnosti kisika i izloženosti vodi bitno utječu na njezinu strukturu (Pinhasi i sur. 2015). Nakon smrti organizma DNA obično bude degradirana uz pomoć endogenih nukleaza - enzima odgovornih za cijepanje fosfodiesterске veze (Alaeddini i sur. 2010). Osim vlastitih endonukleaza, problem predstavljaju i nukleazni



enzimi mikroorganizama, kukaca i gljivica koji naseljavaju organizam nakon njegove smrti kako bi sudjelovali u recikliranju materijala za daljnje korištenje. Ipak, postoje uvjeti u kojima se ovakva razgradnja može usporiti, čak i zaustaviti. U slučajevima brzog isušivanja, niskih temperatura i visokog saliniteta nukleaze budu uništene ili inaktivirane prije nego što uspiju u potpunosti degradirati DNA (Hofreiter i sur. 2001). Zbog te činjenice DNA iz mumificiranih ostataka (prirodna mumifikacija ili ona provedena od strane čovjeka) ili uzoraka iz permafrosta može ostati sačuvana duže od procijenjenog vremena opstanka *post mortem* DNA u uvjetima fiziološke koncentracije soli, neutralnog pH i temperature od 15°C koji iznosi oko 100 tisuća godina. No pokazalo se da ni u savršenim uvjetima nije moguće u istraživanjima koristiti DNA stariju od milijun godina (Willerslev i Cooper, 2005) s obzirom da endonukleaze nisu jedini problem u očuvanju posmrtno DNA. Oksidacija i pozadinsko zračenje modificiraju dušične baze i fosfodiestersku vezu dok hidrolitički procesi poput deaminacije i depurinacije destabiliziraju i stvaraju lomove u molekulama DNA. Za razliku od žive stanice gdje bi većina mutacija bila uklonjena uz pomoć popravljčkih mehanizama, u neživoj se stanici te mutacije nakupljaju degradirajući DNA čime se nepovratno gube dijelovi genetskog zapisa (Pääbo i sur. 2004). Stoga većina uzoraka drevne DNA ne sadrži fragmente duže od 100 –500 pb (Willerslev i Cooper, 2005). U počecima rada s ovakvom vrstom DNA (1984. Russ Higuchi i suradnici ustvrdili su postojanje DNA u muzejskom uzorku vrste *Quagga* starijem više od 150 godina) upravo veličina tih fragmenata predstavljala je veliki problem zbog nedostatka adekvatne metode za umnožavanje malih dijelova DNA. Uskoro otkriće lančane reakcije polimerazom (PCR, eng. *polymerase chain reaction*) krajem '80- ih godina napravilo je revoluciju u istraživanjima ove vrste (Pääbo i sur. 2004). No kao što je već navedeno, nije samo duljina fragmenata bila prepreka proučavanju DNA. Greške koje ovakva DNA sadrži u svojoj strukturi predstavljaju problem pri amplifikaciji elemenata kao i potencijalno krivoj interpretaciji rezultata analize nakon umnožavanja. Lezije koje nastaju u molekulama DNA mogu uzrokovati uklanjanje dušičnih baza (rezultat depurinacije), unakrsno povezivanje lanaca DNA ili DNA i proteina ili nastajanje hidantoina (oksidacijskog produkta pirimidinskih baza) (Alaeddini i sur. 2010). Unakrsno povezivanje i uklanjanje baza može spriječiti amplifikaciju, blokirajući rad DNA polimeraze (odnosno *Taq* polimeraze u PCR reakciji). Pirimidinske baze sklonije su promjeni baza zbog visoke stope hidrolitičke deaminacije citozina u uracil ili timin. Ovakva tranzicija baza označava se kao CG →TA tranzicija s obzirom na komplementarnu prirodu DNA (ukoliko na jednom lancu dođe do tranzicije C→T, na drugom će doći do promjene G u A) zbog koje se na promatranom nukleotidnom slijedu ne može znati na kojem je lancu došlo do prvotne modifikacije

(Willerslev i Cooper, 2005). Osim CG→TA tranzicija prisutna je i ona u obrnutom smjeru, ali u rjeđem postotku. Ukoliko do toga dođe, amplifikacija lanca bit će moguća, ali će dovesti do ugradnje pogrešnih nukleotida (Pääbo i sur. 2014). Kod umnožavanja DNA postoji vjerojatnost stvaranja ovakvih sekvencijskih artefakata za koje se pokazalo da mogu imitirati očekivane evolucijske promjene (Willerslev i Cooper, 2005). Postoje neke metode kojima se pokušava nadići modifikacije kako bi količina i kvaliteta umnožene DNA bile veće, a vjernost umnoženih sljedova bolja. Na primjer uracil-N-glikozilaza (UNG) uklanja deaminacijske produkte citozina, dok N-fenaciltiazol bromid (PTB) prekida unakrsne veze koje lanci stvaraju međusobno ili s proteinima. Također, polimeraze visoke kvalitete poput *Pfu* i *TaqHifi* mogu smanjiti pogreške koje nastaju u amplificiranim sljedovima i općenito povećati efikasnost umnožavanja (Jacobs i Schär, 2011). Unatoč ovim otkrićima, mehanizmi nastanka oštećenja *post mortem* DNA nisu u potpunosti rasvijetljeni stoga ni mehanizmi popravka nisu posve adekvatni (Willerslev i Cooper, 2005).

Kod rada s drevnom DNA, osim navedenog, prisutan je i jako izraženi problem kontaminacije. Nakon što je PCR metoda omogućila rad s drevnom DNA objavljen je veliki broj članaka u kojima se tvrdilo da je moguće izolirati DNA iz uzoraka starih preko nekoliko milijuna godina. Jedan od takvih radova napisan od strane Woodwarda i suradnika 1994. godine dokazivao je izolaciju mitohondrijskog citokroma b iz kostiju dinosaura starijih od 80 milijuna godina. Ipak, najveće otkriće bilo je dobivanje sljedova iz halobakterije stare 250 milijuna godina. Kako se kasnije pokazalo, ovi revolucionarni rezultati bili su rezultat kontaminacije uzoraka – slijed izoliran iz kostiju dinosaura pripadao je ljudskom Y kromosomu, dok je halobakterijska DNA ipak pripadala modernim bakterijama. Veliki postotak kontaminacije rezultat je male količine izvorne DNA u uzorku kao rezultat njezine degradacije kroz vrijeme nasuprot velike količine suvremene DNA u okolišu. Ukoliko u uzorku postoji suvremena DNA početnice će se u PCR reakciji vezati na njezine lance i umnožiti nju nauštrb drevne DNA zbog njezine oštećenosti koja će inhibirati djelovanje DNA polimeraza (Shapiro i Hofreiter, 2012). Kontaminirati uzroke moguće je pri vršenju samog eksperimenta zbog nedovoljno pažljivog rukovanja ili zbog već prisutne kontaminacije laboratorija i laboratorijskog pribora. Zbog te činjenice potrebno je poduzeti stroge mjere opreza, te svakako ponoviti eksperiment u drugom, neovisnom laboratoriju od strane drugih znanstvenika. Teže uočljivu kontaminaciju predstavlja kontaminacija samog uzorka prije njegovog dostavljanja u laboratorij. To se posebno tiče istraživanja ljudskih ostataka koji se nalaze okruženi sa suvremenom ljudskom DNA koja je dovoljno slična DNA ljudskih

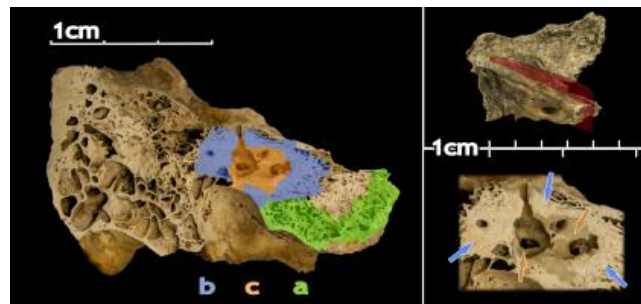
uzoraka iz prošlosti da kontaminaciju, ukoliko do nje dođe, bez ponavljanja eksperimenta u neovisnom laboratoriju u većini slučajeva nije moguće otkriti (Hofreiter i sur. 2001).

### 1.2.1. Izolacija drevne DNA iz uzoraka

Kod živih organizama meka tkiva poput kože i mišića sadrže veću količinu DNA od one sadržane u kostima pa se na početku rada s drevnom DNA veću pažnju posvećivalo ekstrakciji DNA iz tih dijelova ljudskog tijela (Shapiro i Hofreiter, 2012). Kasnija istraživanja pokazala su obrnutu situaciju u mrtvom organizmu – u prosjeku je DNA više očuvana u kostima. Postoje dvije vrste koštanog tkiva koje su biološki jednake, ali se razlikuju po svojoj mikrostrukturi. Kortikalna ili kompaktna kost ima visoku čvrstoću i gustoću te čini 80% ukupne težine ljudskog kostura. Ima funkciju potpore tijela, štiti organe te sprema i otpušta kemijske elemente, posebno kalcij. Mnogo je čvršće, teža i tvrđa od trabekularne kosti. Trabekularna (spongiozna, spužvasta) kost ima puno manju gustoću od kortikalne kosti čime je mekša, ali mnogo fleksibilnija. Nalazi se na krajevima dugih kostiju i u unutrašnjosti kralježaka. Zauzima veću površinu zbog čega je pogodna za odvijanje metaboličkih aktivnosti. Dobro je prokrvljena i često sadrži koštanu srž u kojoj se odvija hematopoeza.

Kosti u matriksu osteoida (organskom koštanom matriksu) i zubi u dentinu (čvrstom neprokrvljenom tkivu koje zubu daje oblik i čini njegov najveći dio) sadrže mineralnu sol hidroksiapatit. To je kristalni kompleks sastavljen od kalcija i fosfata koji je odgovoran za njihovu tvrdoću i čvrstoću. Rezultati istraživanja pokazuju da se hidroksiapatit i DNA specifično vežu što DNA čini otpornijom na propadanje, djelovanje nukleaza i hidrolitičku depurinaciju (Brundin i sur. 2013). Ovako vezana, pokazuje 100 do 1000 puta veću otpornost od DNA koja nije vezana s hidroksiapatitom. S obzirom da je kortikalno koštano tkivo mnogo čvršće od trabekularnog što ga čini manje sklonom podlijeganju okolišnim faktorima i još k tome sadrži hidroksiapatit, izolacija DNA vrši se iz ovih dijelova skeleta. Dugo vremena se najboljim izvorom DNA smatrala kortikalna kost femura i tibije, s obzirom da one nose veliku težinu ljudskog tijela te su time izrazito čvrste i otporne. Kasnija istraživanja pokazala su da je dentin zuba mnogo bolji za izolaciju endogene DNA (Pinhasi i sur. 2015). Ipak, uvjerljivo najbolji dio skeleta za izolaciju DNA je petrozni dio temporalne kosti lubanje (lat. *pars petrosa*), ujedno i najgušća je i najtvrđa kost u ljudskom tijelu (Gamba i sur. 2014). Petrozna kost čini endokranijski dio temporalne kosti u kojemu se nalaze organi sluha i ravnoteže. Količina odavde izolirane DNA 4 - 16 puta je veća od one dobivane izolacijom iz zubi te 183 puta veća u odnosu na DNA dobivenu iz metatarzalnih, metakarpalnih kostiju i rebara

(Pinhasi i sur. 2015). Najnovija istraživanja otišla su korak dalje i pokazala da izolacije DNA iz različitih dijelova petroznog dijela temporalne kosti ne daju jednake rezultate. Međusobno povezane unutrašnje šupljine petroznog dijela temporalne kosti sadrže koštani labirint (lat. *osseous labyrinth*) sastavljen od pužnice (lat. *cochlea*), predvorja (lat. *vestibulum*) i polukružnih kanalića (lat. *canalis semicircularis*). Koštani labirint razvija se hrskavičnom diferencijacijom iz mezenhima, a njegova osifikacija završava malo prije samog rođenja. Upravo je ova struktura (a u njoj posebno pužnica) najzahvalnija za izolaciju DNA. U usporedbi s kortikalnom strukturom koja okružuje koštani kanalić količina izolirane DNA je do 65 puta veća, a u usporedbi sa spongioznim dijelom trabekularne kosti količina je veća i do 177 puta (Sl. 9). Za ovakve rezultate, osim čvrstoće, zahvalna je i pozicija koštanog kanalića jer je, osim što se već nalazi u samoj lubanji, dodatno zaštićen okolnim strukturama. Kao rezultat imuniji je na okolišne faktore kao i na moguću kontaminaciju.



**Slika 9.** Medijalni pogled na lijevi petrozni dio temporalne kosti. Slovom a je označen spužvasti dio kosti, b predstavlja čvrstu kost koja okružuje unutarnje uho, dok je c dio koji sadži pužnicu, polukružne kanalice i vestibulum.

Ekstrakcijske metode za aDNA moraju izbjegavati pretjerano agresivne metode poput visokih temperatura ili upotrebe snažnih deterdženata. Ovakvi postupci doveli bi do povećane stope oslobađanja DNA, ali bi izazvali dodatna oštećenja već same po sebi dovoljno oštećene DNA. Time bi konačna koncentracija koja bi mogla biti iskorištena u daljnjem istraživanju opala čineći ovaj postupak kontraproduktivnim. Još jedan problem koji je potrebno riješiti kod ekstrakcije aDNA je velika količina PCR inhibitora koji su često prisutni kod kostiju i zuba drevnog materijala. Ovi inhibitori budu pročišćeni zajedno s aDNA te interferiraju s njezinom amplifikacijom. U praksi se najboljom pokazala metoda koju su razvili Rohland i Hofreiter (2007) analizirajući veći broj uzoraka kostiju i zuba spiljskih medvjeda iz zadnjeg ledenog doba, modificirana dodatnom analizom Dabneya i suradnika (Dabney i sur., 2013). Rohland – Hofreiterova metoda ekstrakcije aDNA zapravo je kompromis između otpuštanja DNA, njene degradacije te odvajanja DNA od inhibitora PCR-a u svrhu maksimiziranja količine DNA

dostupne za daljnje aplikacije (Rohland i Hofreiter, 2007). Dabney i suradnici (2013) shvatili su da u rezultatima dobivenima Rohland – Hofreiterovom metodom postoji razlika u uspješnosti izolacije DNA fragmenata ovisno o njihovoj veličini - maleni fragmenti bili su puno manje zastupljeni od većih fragmenata te su taj problem riješili modifikacijom prvotnog protokola.

### **1.3. Utvrđivanje srodstva**

Ljudska DNA kod svake je osobe identična u više od 99,7 % tj. od ukupne ljudske DNA zapravo je samo manje od 0,3% različito od osobe do osobe (oko 10 milijuna nukleotida) i čini tu osobu jedinstvenom (osim u slučaju jednojajčanih blizanaca) (Primorac, 2008). Varijabilne regije DNA sastoje se od velikog broja polimorfizama, koje dijelimo na polimorfizme s obzirom na sadržaj te polimorfizme s obzirom na duljinu sljedova. Ovi polimorfizmi omogućuju utvrđivanje identiteta pojedinca . Analiza DNA u svrhe određivanje identiteta ili međusobnog srodstva različitih osoba započela je osamdesetih godina dvadesetog stoljeća. Za provedbu ovakve analize koriste se različiti dijelovi lanca DNA čija je struktura dobro poznata znanstvenicima.

#### **1.3.1. Struktura genomske DNA**

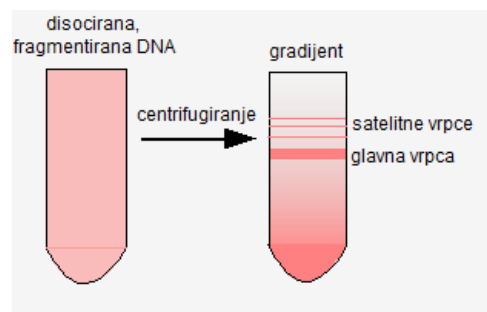
DNA organizama sastoji se od kodirajućeg i nekodirajućeg slijeda nukleotida. Kodirajući dio sadrži gene koji su zaslužni za strukturne i regulatorne funkcije DNA, dok funkcija nekodirajućeg dijela još uvijek nije razjašnjena. Sve do nedavno, nekodirajuća DNA smatrala se potpuno nefunkcionalnom i nepotrebnom te je uz nju vezan naziv otpadna DNA (eng. *junk DNA*). Do ovog zaključka dovelo je otkriće nedostatka korelacije između dužine kromosomalne DNA kod različitih organizama i njihovog stupnja razvoja (tzv. paradoks C vrijednosti u kojem C vrijednost predstavlja količinu DNA po haploidnom kromosomskom setu eukariota) što je pretpostavilo postojanje različitih količina nepotrebne DNA u pojedinim organizmima koja se nalazi između pojedinih gena i unutar gena u obliku introna (Lodish 2000).

Iako je struktura DNA dobro poznata već dugo vremena, ekspresija gena predstavljala je enigmu znanstvenicima. Naime, sve stanice u organizmu sadrže jednake molekule DNA, no način na koji se ta DNA eksplicira u različitim organima i tkivima potpuno je drugačija (Panneerchelvam i Norazmi, 2003). Razvojem epigenike otkrila se uloga za način ekspresije ključnih regulatornih gena koji su dio ove "dodatne" DNA. Općenito otkrića na području

epigenetike pridaju potencijalno veliku važnost nekodirajućoj DNA (Ko i Suztak, 2013). Unatoč ovakvim otkrićima, velika količina DNA nema poznatu ulogu u organizmu. S obzirom na njenu razbacanost po genomu pretpostavljena je njena zaštitna uloga kod mutacija i rekombinacije (eng. *crossing over*) na način da služi kao svojevrsna *tampon zona* kako se određena mutacija ili rekombinacija ne bi proširila na preveliki dio kodirajućih gena.

Općenito, DNA se može podijeliti na solitarnu i repetitivnu DNA. Solitarna DNA (određeni sljedovi koji se pojavljuju samo jednom duž ovojnice) zauzima oko 50 – 60% genoma. Prema zakonima Mendelove genetike samo jedna kopija svakog gena je sadržana u haploidnom DNA setu zbog čega se pretpostavlja da solitarna DNA sadrži većinu DNA koja kodira mRNA. Ova kodirajuća DNA zapravo zauzima mali dio solitarne DNA, dok većina solitarne DNA nema trenutno poznato ulogu u organizmu, osim da razdvaja funkcionalne dijelove DNA zbog čega je se i naziva razdvajajućom DNA (eng. *spacer DNA*). Zapravo se u otprilike  $3 \times 10^9$  pb koliko je dug ljudski genom nalazi samo otprilike 20 000 – 25 000 gena koji kodiraju za proteine. Zahvaljujući alternativnom prekrajanju zbog kojeg svaki gen kodira za više mRNA, pretpostavlja se da ovi geni kodiraju za oko 100 000 proteina (Primorac, 2008). U ukupnoj količini humane DNA regije koje sadrži gene koji kodiraju strukturne proteine ili funkcionalne RNA molekule zauzimaju manje od 10% ukupne količine DNA (Panneerchelvam i Norazmi, 2003). Kodirajući geni mogu pripadati upravo spomenutoj solitarnoj DNA ili su dio genskih obitelji koje se sastoje od gena koji kodiraju slične, ali ne identične aminokiselinske sljedove. Za ove sljedove smatra se da su nastale duplikacijom nekog drevnog gena do koje je došlo nejednakom rekombinacijom pri nastanku spolnih stanica. Evolucijom je došlo do nakupljanja različitih mutacija na nastalim genima od kojih su se uslijed prirodne selekcije neke zadržale, a neke ne. Među dupliciranim genima mogu se pronaći i *pseudogeni* – geni koji su također nastali duplikacijom nekog drevnog gena, ali kao rezultat evolucijskih mehanizama i selekcije se više ne prepisuju u mRNA ili je translatacija njihove mRNA blokirana. S obzirom da nisu štetni za funkciju organizma, ostali su prisutni kao zapis u lancu DNA. U lancu DNA nalaze se i geni koji se uzastopno ponavljaju kroz lanac DNA. Ovi geni kodiraju translaciju tRNA, rRNA, histona te još nekoliko različitih proteina. Razlikuju se od dupliciranih gena po tome što su njihovi produkti identični. Razlog za postojanje ovih regija leži u činjenici da je ponekad potrebno proizvesti ogroman broj istih molekula u kratkom vremenskom periodu, što bi bilo nemoguće ukoliko bi postojala transkripcija iz samo jednog gena.

Osim repetitivne DNA u obliku opisanih dupliciranih i uzastopno ponavljajućih gena, eukariotska stanica sadrži višestruke kopije drugih DNA sljedova u genomu. Nju čine mobilni elementi, nazvani tako jer se mogu izrezivati i ubacivati na različita mjesta po genomu i visoko repetitivna satelitna DNA koja se sastoji od velikog broja setova ponavljajućih sljedova nukleotida rasprostranih po genomu. Naziv satelitna dobila je prilikom eksperimenta hibridizacije DNA u kojem se pokazivalo koliko je vremena potrebno različitim dijelovima DNA da formiraju dvostruke lance nakon prvotnog razdvajanja u jednolančane fragmente. S obzirom da repetitivna DNA sadrži veliki broj ponovljenih sljedova nukleotida duž genoma, ona puno brže nalazi komplementarne lance od fragmenata koji se rjeđe ili uopće ne ponavljaju duž lanca (Lodish, 2000). Na gradijentu gustoće ovakva DNA stvara dodatne vrpce uz vrpcu glavnine DNA (Sl. 10). Ovisno o dužini osnovnog slijeda koji se ponavlja različit broj puta ovisno o lokusu u satelitnoj DNA razlikujemo mini i mikrosatelite.



**Slika 10.** DNA je na početku denaturirana i izrezana u fragmente veličine od otprilike 1000 pb nakon čega je stavljena u uvjete u kojoj dolazi do njezine ponovne hibridizacije. S obzirom da se ponavljajućih sljedova ima više po genomu do reasocijacije ovih dijelova dolazi brže te ove dijelove pri centrifugiranju vidimo kao dodatnu vrpcu. Preuzeto i prepravljeno sa [home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/114/114.html](http://home.cc.umanitoba.ca/~frist/PLNT3140/114/114.html)

Uloga repetitivna nekodirajuća DNA nije poznata. Neki znanstvenici pretpostavljaju joj strukturnu i funkcionalnu ulogu, no pravih dokaza za takvu tvrdnju nedostaje, stoga je moguće da repetitivna DNA nema nikakvu esencijalnu ulogu (Biscotti i sur. 2015)

Kodirajući dio DNA je podvrgnut evlucijskim pritiscima te se prirodnom selekcijom odabiru mutacije korisne za vrstu koje će se zadržati, a nestaju mutacije koje su štetne za vrstu (Panneerchelvam i Norazmi, 2003). Mutacije u kojima dolazi do promjene broja i redoslijeda sljedova DNA koji kodiraju za proteine poremete joj strukturu te je lako moguće da će dovesti do razvoja genetičkih bolesti (npr. mentalna retardacija zbog fragilnog X kromosoma, Huntingtova bolest) (Primorac, 2008). Kod nekodirajuće DNA ovakve mutacije najčešće neće biti štetne za organizam te selekcijski mehanizmi na njih neće djelovati. Ovakav razvoj događaja dovodi do akumulacije mutacija na dijelovima nekodirajuće DNA što u globalu

dovodi do razvoja genetičke raznolikosti nekodirajuće regije, koja je evolucijskim pritiscima smanjena u kodirajućoj regiji DNA (Panneerchelvam i Norazmi, 2003).

Unutar vrste, nukleotidni sljedovi satelitne DNA visoko su konzervirani, ali broj ponavljanja jednakih sljedova na različitim lokusima i time duljina lokusa razlikuje se između pojedinaca (rezultat akumuliranja mutacija). Do tih razlika (mutacija) dolazi zbog nejednake rekombinacije ovih regija usred razvoja prekursora spermija i oocite te za vrijeme mejoze (Lodish 2000).

### **1.3.2. DNA biljezi**

Varijabilnost DNA koja omogućuje utvrđivanje identiteta pojedinca očituje se ili u polimorfizmima s obzirom na sadržaj ili polimorfizmima s obzirom na duljinu sljedova nukleotida. Lokuse s velikim brojem polimorfizama nazivamo DNA biljezi. Najmanja razlika u broju ponavljanja sljedova mini i mikrosatelita može biti detektirana molekularnim metodama te je upravo ova vrsta polimorfizama najčešće korištena kod utvrđivanja identiteta ili srodstva pojedinca. Prvi proučavani biljezi bili su VNTR (eng. *variable tandem repeats*) biljezi, odnosno minisateliti pomoću kojih je Alec Jeffrey 1985. riješio slučaj dvostrukog umorstva tehnikom RFLP (eng. *restriction fragment length polymorphism*) koja se temelji na različitoj duljini fragmenata koje sadrže ponavljajuće sljedove DNA, a dobiveni su djelovanjem restriksijskih endonukleaza (Benecke, 2002). Ovo je bio prvi slučaj rješavanja umorstva pomoću DNA analize.

Danas su u uporabi uglavnom STR (eng. *short tandem repeats*) biljezi – molekularno manji biljezi (mikrosateliti) koji su ubrzali i olakšali proces utvrđivanja srodstva ili identiteta. Proučavanje STR lokusa naspram VNTR lokusa posebno je poboljšalo rezultate istraživanja drevne DNA s obzirom da veličina njihovih alela iznosi između 100 i 400 parova baza dok je veličina alela VNTR lokusa između 400 i 1000 parova baza (Butler, 2005). Ova razlika može biti ključna u dobivanju rezultata u radu s oštećenom i fragmentiranom DNA. Osim u forenzičkim istraživanjima, STR biljezi koriste se kao predmet genetičkih istraživanja u medicini, s obzirom da određeni trinukleotidni lokusi (osnovna ponavljajuća jedinica ovih lokusa sastoji se od 3 baze) kod kojih se pokazalo da je njihova hiperekspanzija povezana s određenim genetskim bolestima (Primorac, 2008).

STR – ovi se u prosjeku pojavljuju na svakih 10 000 nukleotida u ljudskom genomu. Ponavljajući slijed ovih biljega sastoji se od 2 – 7 parova baza te se na svakom pojedinom



lokusu ponavlja određeni broj puta (Butler, 2011). Svaki lokus predstavlja jedan STR biljeg. U većini istraživanja s ciljem dokazivanja srodstva koriste se tetranukleotidni lokusi, tj. STR biljezi čiji ponavljački sljedovi sadrže četiri baze koje se, ovisno u lokusu pojavljuju između 5 i otprilike 50 puta (Primorac, 2008). Broj ponavljanja osnovne ponavljačke jedinice u pojedinom lokusu razlikuje se od osobe do osobe te se korištenjem većeg broja STR biljega i istovremenom analizom ciljanih lokusa povećava vjerojatnost razlikovanja različitih osoba. Dvije osobe mogu se poklapati na jedan, dva ili tri lokusa, ali sa svakim novim lokusom, ta vjerojatnost opada. Vjerojatnost da će se dvije osobe poklapati na 15 promatranih STR lokusa praktički je nemoguća. Ovakva je vjerojatnost izračunata za kavkazoidno stanovništvo i iznosi  $1/1,83 \times 10^{17}$  što bi značilo da bi ljudska populacija trebala brojati 18300 bilijuna ( $1,83 \times 10^{14}$ ) pojedinaca kako bi se zadovoljio matematički model u kojem bi takvo poklapanje bilo vjerojatno.

Uz visoku diskriminatornu moć, prednost STR biljega očituje se i u mogućnosti istovremenog proučavanja većeg broja ovih lokusa u PCR višetrukim sustavima (eng. *multiplex PCR*). S obzirom da je postupak automatiziran u pojedinim dijelovima, ova je metoda uvelike pojednostavila i ubrzala proces analize (Butler, 2005). Naime, detekcija umnoženih STR alela vrši se fluorescencijski pri kapilarnoj elektroforezi čime se uvelike povećala osjetljivost metode i jednostavnost mjerenja alela s obzirom da se svaki razlikuje po duljini i boji kojom je obilježen. Rezultat STR analize očituje se u elektroforegramu ili DNA profilu koji predstavlja jedinstvenu kombinaciju detektiranih alelnih varijanti na STR lokusima. Međusobnom usporednom DNA profila različitih osoba moguće je utvrditi njihov stupanj srodnosti. Prosječna veličina ciljanih STR biljega u komercijalnim kitovima kreće se između 100 i 500 parova baza, dok je u veličina fragmenata oštećene i degradirane DNA najčešće manja od 200 parova baza. Iz tog razloga analiza STR lokusa nekada ne uspijeva dati jasne i potpune DNA profile. Ovaj problem najviše se javlja u proučavanjima drevne DNA. Kao rješenje ovoga problema pojavila se SNP (eng. *single nucleotide polymorphism*) nova tehnika analize degradiranih molekula čije ciljne regije sadrže oko 150 parova baza. Ova se metoda pokazala izrazito uspješnom u analiziranju stare i fragmentirane DNA (Fernandes i sur., 2017) Nažalost, uz svoje prednosti, ovakva tehnika zahtijeva instrumente koji mogu precizno detektirati razlike u samo jednoj dušičnoj bazi zbog čega je vrlo skupa i najčešće nedostupna standardnim laboratorijima.

### 1.3.3. Pravila kod utvrđivanja srodstva

U utvrđivanju srodstva koriste se osnovni principi nasljeđivanja koje je postavio Gregor Mendel, otac moderne genetike (Primorac, 2008). Nasljeđivanje po Mendelu temelji se na tri zakona: zakon dominantnih gena naspram recesivnih tj. zakon uniformnosti, zakon nezavisne razdvajanja gena koji kaže da potomak nasljeđuje samo jedan alel od svakog roditelja te zakon nezavisne segregacije koji se očituje razdvajanjem svakog lokusa neovisno o drugim lokusima (osim u slučajevima vezanih genima koji tvore haplotipove koji se nasljeđuju zajedno). Svaki pojedinac naslijedi polovicu genetičke informacije od majke (ovdje ne računajući s mitohondrijskom DNA, koja se u potpunosti nasljeđuje od majke), a polovicu od oca. Zahvaljujući toj činjenici moguće je utvrditi genetičku povezanost danih pojedinaca. Postoje četiri pravila kod utvrđivanja roditeljstva utemeljena na Mendelovim zakonima:

1. Ukoliko se ne radi o mutaciji određenog gena, dijete ne može imati alel, a da taj nije prisutan ili kod oca ili kod majke.
2. Po jedan alel mora se naslijediti od svakog roditelja.
3. Aleli kod djeteta ne mogu biti istovjetni osim u slučaju kada oba roditelja imaju taj isti alel.
4. Genetički biljeg koji nosi dijete mora biti prisutan kao istovjetan par kod oba roditelja.

Osim shvaćanja nasljeđivanja gena po Mendelovim zakonima, potrebno je poznavati ponašanje alela u populaciji koje se 1908., neovisno jedan o drugome, opisali Wilhelm Weinberg i G.H. Hardy u formuli  $p^2+2pq+q^2=1$  u kojoj  $p^2$  pokazuje učestalost homozigota za alel A1,  $q^2$  homozigota za A2, a  $2pq$  učestalost heterozigota u populaciji. Pretpostavivši da je ova jednadžba točna dolazi se do zaključka da je učestalost alela na određenom lokusu u određenoj populaciji konstantna. Postoje odstupanja od ovoga pravila koja se trebaju uzeti u obzir pri određivanju populacije na kojoj se utvrđuje učestalost pojedinih alela (Weir, 1992).

Utvrdivanje srodstva najčešće se radi kako bi se utvrdilo očinstvo, no principi su isti za utvrđivanje majčinstva. Računanje drugih srodstvenih odnosa mnogo je kompleksnije. Izračun se u takvim slučajevima provodi pomoću odgovarajućih algoritama i ne izvodi ga se ručno već za njega postoje odgovarajući programi (npr. *Gene Marker HID (Soft Genetics)*).

Kod testiranja očinstva potrebno je odrediti tzv. obavezni alel. Ukoliko je majka homozigot AA, a dijete heterozigot AB za određeni lokus, obavezni alel koji otac predaje djetetu je B. U slučaju kada su i majka i dijete heterozigoti za određeni genski lokus (AB),

obavezni očev alel je ili A ili B. Ukoliko otac nije nositelj obveznog alela primjenjuju se komplicirani statistički obrasci koji uzimaju u obzir učestalost pojavljivanja mutacija na konkretnom lokusu (Primorac, 2008). Općenito je prihvaćeno da se ispitanika ne može odbaciti kao biološkog oca ukoliko najmanje 3 alela na promatranim lokusima nisu podudarna s obveznim alelom kod djeteta. Ukoliko se ustvrdi mogućnost očinstva, potrebno je izračunati indeks očinstva (PI, eng. *paternity index*). Njime se određuje vjerojatnost da je potencijalni otac prenio na dijete obavezni alel u odnosu na nekog nesrodnog pojedinca iz populacije. To je omjer vjerojatnosti da je potencijalni otac prenio obavezni gen na dijete naspram vjerojatnosti da je to napravio neki nesrodni pojedinac iz populacije. Vjerojatnost da je otac prenio obavezni alel može iznositi 1 u slučaju kada je homozigot za obavezni alel, ili ako u slučaju dva obavezna alela na genskom lokusu pretpostavljeni otac sadrži oba. Ova vjerojatnost iznosi 0,5 ako njegov promatrani genski lokus sadrži samo jedan obavezni alel ili ako sadržava jedan od obaveznih alela. S obzirom na navedeno PI može iznositi ili  $1/p$  ili  $0,5/p$ . Ukoliko se po genotipovima majke i djeteta odrede dva obavezna alela  $p = p_1 + p_2$ , te će time i indeks očinstva postati ili  $PI = 1/(p_1+p_2)$  ili  $PI = 0,5/(p_1+p_2)$ . Indeks očinstva se računa za svaki promatrani lokus, te se kombinirani indeks očinstva (CPI, eng. *combined paternity index*) računa množenjem vrijednosti svakog promatranog lokusa, odnosno  $CPI = PI_1 \times PI_2 \times PI_3 \times \dots \times PI_n$ . Uzimajući u obzir postavke vjerojatnosti koje je u 18. –om stoljeću postavio matematičar Bayes u svojoj formuli vjerojatnosti koja uključuje sve mogućnosti u prostoru dobiva se formula za računanje vjerojatnosti očinstva (PP eng. *probability of paternity*):

$$PP = CPI / (CPI+1)$$

Da bi se očinstvo moglo u potpunosti potvrditi najniža vrijednost PP-a, u slučaju kada su poznati majčini i djetetovi aleli za promatrane lokuse iznosi 0,99999 ili 99,999%, a u slučaju kada su poznati samo genski biljezi djeteta 0,9999 ili 99,99% zbog gubitka informacija. U tablici 1 i 2 prikazani su podaci koji se uvrštavaju za PI ovisno o (ne)poznavanju majčinih genskih biljega. Vrijednost  $p$  određuje se iz postojećih baza podataka za određenu populaciju.

**Tablica 1.** Formule za računanje očinstva u prisutnosti majke (preuzeto iz Primorac, 2008)

Aleli djeteta	Aleli majke	Aleli oca	PI
AA	AB	AA	1/a
AB	BC ili BB	AA	1/a
AA	AA	AA	1/a
AB	BB ili BC	AC ili AB	1/2a
AA	AB	AB ili AC	1/2a
AA	AA	AB	1/2a
AB	AB	AB	1/(a+b)
AB	AB	AA	1/(a+b)
AB	AB	AC	1/2(a+b)

**Tablica 2.** Formule za računanje roditeljstva u odsutnosti jednog roditelja (preuzeto iz Primorac, 2008)

Aleli djeteta	Aleli testiranog roditelja	PI
AA	AA	1/a
AB	AA	1/2a
AA	AB	1/2a
AB	AB	a+b/4ab
AB	AC	1/4a

## 1.4. Ciljevi istraživanja

U ovome radu morfološki ćemo obraditi skeletne ostatke 11 Ostrogota nađenih na nalazištu u području Baranje čime ćemo dobiti podatke vezane za njihov spol i dob te patološke promjene i traume koje su proživjeli za vrijeme života, a ostavile su svoj trag na kostima. Iz pužnice deset pojedinaca izolirat ćemo DNA (kod jednog uzorka nisu prisutne temporalne kosti stoga ne možemo izolirati DNA iz pužnice) kako bi nadalje analizom STR lokusa dobili odgovore na pitanja o srodstvu između pojedinaca s deformiranom lubanjom u odnosu na one bez deformiteta kako bi se napravio novi korak u rasvjetljavanju ovog fenomena. S obzirom da su ostaci stari više od 15 stoljeća radit ćemo s drevnom DNA koja zbog svojih karakteristika predstavlja izazov za znanstvenike. Uzorke ćemo analizirati pomoću komercijalno dostupnog *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion (Promega)* kita za utvrđivanje srodnosti.

Ciljevi diplomskog rada su:

- Morfološka analiza koštanih ostataka 11 Ostrogota s nalazišta AN10A NČ- JASA.
- Ekstrakcija DNA iz pužnice uha svakog pojedinca
- Utvrđivanje srodnosti između pojedinaca *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion (Promega)* sustavom u kombinaciji s kapilarnom elektroforezom
- Korištenje rezultata dobivenih iz utvrđivanja srodnosti kako bi pokušali objasniti pojavu umjetno deformiranih lubanja

## **2. MATERIJALI I METODE**

### **2.1. Morfološka analiza**

Osteološki materijal dostavljen je na analizu direktno s nalazišta te smo ga za početak oprali vodom. Nakon sušenja napravili smo inventuru svih kostiju, zglobnih ploština i zubi pomoću obrasca u kojemu su popisane sve kosti u ljudskom tijelu. U obrascu smo bilježili stupanj uščuvanosti kostiju na način da je šifra 0 označavala da kost nije bila prisutna, 2 da je bila prisutna u manje od 50% svoje površine i 1 da je bila prisutna u više od 50% svoje površine. Izvršili smo i inventuru zuba na način da smo u obrascu uz svaki zub inače prisutan u ljudskoj čeljusti zabilježili i oznaku ovisno o stanju u kojem je bio pronađen (prisutan, antemortalno izgubljen, postmortalno ispao, neizrastao, djelomično izrastao). Zabilježili smo i prisutnost karijesa, njegov obim i položaj (okluzalan, lingualan, bukan, intraprosimalan, na korijenu zuba) kao i pojavu alveolarnih apscesa i hipoplastičnih defekata na zubnoj caklini. Alveolarni apsces ili granulom nastaje kada se bakterije iz karijesa prošire u zubnu alveolu preko korijena zuba (Šlaus, 2006), a hipoplastični defekt označava razvojni poremećaj zubne cakline. U velikom postotku slučajeva povezan je sa sustavnim fiziološkim stresom poput izgladnjivanja, fizičke ili psihološke traume, zarazne bolesti, metaboličkog poremećaja. S obzirom da se caklina razvija kod djece ovakav defekt ukazivao nam je da je ovakva vrsta stresa bila prisutna kod pojedinca u subadultnom životu. Nakon inventure kostiju i zuba za svakog pojedinca odredili smo spol, starost u trenutku smrti te prisutnost patoloških promjena kombinacijom utvrđenih metoda ovisno o stanju u kojem se kostur nalazio.

Tip deformacije lubanja utvrđen je prema klasifikaciji po Dembu i Imbelloniju (Molnár i sur., 2014).

### **2.2. Ekstrakcija DNA**

Ekstrakcija drevne DNA iz kosti sastoji se od dobivanja praha same kosti te kemijske izolacije DNA iz tog praha. Postupak izolacije DNA ovisi o tkivu te uščuvanosti DNA koju želimo izolirati. U izolaciji DNA iz koštanog praha najboljom se pokazala metoda po Rohlandu i Hofreiteru (Rohland i Hofreiter, 2007) dodatno modificirana od strane Dabneya i suradnika (2013) koju smo primijenili u ovom radu.

### 2.2.1. Dobivanje praha pužnice

Kao u svim postupcima rada s drevnom DNA, i kod prvog koraka, tj. dobivanja praha pužnice poduzeli smo sve mjere opreza kako ne bi došlo do kontaminacije materijala. Koristili smo mrežicu za kosu te masku za lice, kao i kutu i kutiju rukavica s obzirom da smo njih više puta mijenjali kroz postupak. Na rukama smo uvijek imali jedan par rukavica koji nismo skidali, te na njima drugi par rukavica koji smo mijenjali kada god je postojala i najmanja šansa da je došlo do njihove kontaminacije. *Eppendorf* tubice u koje ćemo odlagati prah pužnice prethodno smo ozračili UV svjetlom u trajanju od pola sata (unatoč natpisu na pakiranju, u radu s drevnom DNA uvijek treba pretpostaviti da je sav laboratorijski materijal kontaminiran). U radu smo koristili običnu modelarsku brusilicu s nastavkom za brušenje srednje veličine. Podlogu za rad na početku smo oprali 10% - tnom otopinom varikine (natrijev hipoklorit, NaClO) kako bi uništili (tj. razgradili) potencijalno prisutne molekule DNA, a zatim smo varikinu zbog svojeg nagrizajućeg djelovanja isprali 70% - tnim alkoholom. Isti smo postupak primijenili i na modelarsku bušilicu. Nakon sušenja započeli smo proces ekstrakcije praha.

Na podlogu za rad stavili smo aluminijsku foliju. Foliju smo obrisali papirnatim ubrusom natopljenim varikinom, te nakon toga papirnatim ubrusom natopljenim alkoholom. Nastavak za brušenje srednje veličine stavili smo na 30 –ak sekundi u kadicu u kojoj se nalazi varikina, te dodatnih 30- ak sekundi u kadicu ispunjenu alkoholom. Nakon toga smo nastavak stavili na bušilicu te ovisno o stanju materijala pojedinog uzorka (tj. ovisno o tome je li petrozni dio temporalne kosti odvojen od ostatka lubanje) uzeli lubanju ili samu petroznu kost (Sl. 11). Na petroznoj kosti locirali smo dio koji okružuje unutarnje uho (na Slici 9. označeno s *b*) te smo ga brusili na način da prah kosti pada po pripremljenoj foliji sve dok nismo došli do pužnice (na Slici 9. označeno s *c*). U tom trenutku, kao mjeru zaštite od kontaminacije bacili smo foliju nad kojom smo do sada brusili, nastavak za brusilicu smo ponovno stavili prvo u varikinu, a zatim u alkohol te uzeli nove rukavice i novu foliju koju smo također prvo obrisali varikinom pa alkoholom. Brusilicom namještenom na manju brzinu nego maloprije smo brusili pužnicu skupljajući prah. U slučaju da smo primijetili ikakve dodatke prahu pužnice poput zemlje i tome slično, bacili smo foliju i ponovili sve dok nismo dobili što čišći prah mase otprilike između 85 i 120 mg. Taj prah oprezno smo usuli u *Eppendorf* tubicu od 1,5 mL bez doticanja praha ili dijela folije koja dotiče prah. Prah je ispunjavao otprilike jednu trećinu tubice. Svaku tubicu označili smo rednim brojem uzorka. Ovaj postupak ponovili smo za svih 10 uzoraka.



**Slika 11.** Petrozni dio temporalne kosti kao dio lubanje (lijevo) i kao dio temporalne kosti odvojen od lubanje (desno). Strelicama je prikazano mjesto na petroznom dijelu gdje je došlo do brušenja.

### 2.2.2. Izolacija DNA iz praha pužnice

Sve površine i kemijsko posuđe (bočice, žlice, kadice, itd.) koje ćemo koristiti oprali smo otopinom izosana (Izosan<sup>®</sup> G, Pliva) koncentracije 0,0058 M. Izosan je natrijev dikloroizocijanurat dihidrat te služi za dezinfekciju. Laminar smo nakon toga, zajedno sa svim posuđem ostavili pod UV svjetlom 40-ak minuta. *Eppendorf* tubice s prahom također smo stavili pod UV lampu na 15-ak minuta kako bi uklonili sve tragove kontaminacije na vanjskom dijelu tubice s obzirom da UV zračenje ne prodire u njihovu unutrašnjost pa je time DNA u prahu zaštićena. Napravili smo ekstrakcijski pufer (koji je u konačnoj koncentraciji sadržavao 0,45 M EDTA, 0, 25 mg/mL proteinaze K, pH 8.0) bez proteinaze K u *Falcon* tubicu od 50 mL te i njega stavili zračiti na 30 minuta, nakon čega smo dodali proteinazu te pipetom izmiješali otopinu. Kombinacijom EDTA i proteinaze K omogućili smo otpuštanje DNA iz koštanog praha. U radu s koštanim materijalom potrebna je veća količina EDTA naspram rada s drugačijim tipom tkiva jer ona otapa hidroksiapatitski matriks specifičan za uzorke kostiju i zuba.

U svaku tubicu s prahom kao i u praznu tubicu koja nam služi kao negativna kontrola izolacije DNA stavili smo 1 mL ekstrakcijskog pufera nakon čega smo svaku tubicu jako dobro vorteksirali sve dok sav prah nije bio otopljen. Tubice smo stavili na horizontalnu miješalicu s uključenom rotacijom i ostavili ih na temperaturi od 37 °C u trajanju od otprilike 18 sati.

Pripremili smo vezujući pufer koji je u konačnoj koncentraciji sadržavao 5 M gvanidin hidroklorida, 40% izopropanola, 0,05% Tween-20 te 90 mM natrijevog acetata, pH 5.2.



Gvanidin hidroklorid je agens koji snažno denaturira proteine uključujući nukleaze kako bi se u potpunosti otpustila nukleinska kiselina (u ovom slučaju DNA). Također, remeti mogućnost asocijacije DNA molekula s vodom pripremajući uvjete za spajanje DNA sa silikom. Izopropanol dodali smo kako bi pojačali utjecaj pufera na vezanje DNA na siliku. Natrijev acetat u vezujućem puferu poslužio je za održavanje pH. Pripremili smo i TET pufer konačne koncentracije 10 mM TrisHCl, 1mM EDTA, 0,05% Tween-20, pH 8.0 koji će nam kasnije poslužiti u eluciji DNA kroz silika membranu (prolaskom TrisHCl-a DNA će se hidratizirati i otpustiti od membrane).

Sljedeći dan ponovno smo proveli mjere za sprečavanje kontaminacije (oprali smo izosanom i ozračili UV svjetlom sve kemijsko posuđe koje ćemo koristiti, ovaj put bez tubica s prahom). PE pufer (*Qiagen*) i TET pufer također smo 20 minuta ostavili pod UV lampom.

Konstruirali smo vezujuće aparature (*Zymo-Spin V* rezervoar (*ZymoResearch*) + *MinElute* silika kolonice (*Qiagen*)):

*Zymo-Spin* rezervoare odvojili smo od pripadajuće kolone i potopili u kadnicu s varikinom te ih ostavili tako 20 minuta, nakon čega smo rezervoare dobro isprali destiliranom vodom, očistili izosanom i stavili pod UV lampu na 30 minuta. *MinElute* kolone sa silika gelom (po jednu za svaki uzorak koji imamo) izvadili smo iz tubice u kojoj su došle i svaku snažno pričvrstili na pojedine *Zymo-Spin* rezervoare. Čepove kolona smo odrezali škarama i spremili zajedno s tubicama iz koje smo izvadili kolone. Novodizajniranu *MinElute* kolonu sa *Zymo-Spin* rezervoarom stavili smo u *Falkon* tubicu koju smo zatim začepili te smo falkonicu i kolonu označili brojem koji je odgovarao broju tubice iz koje ćemo stavljati sadržaj u aparaturu. Tubice u kojima se nalazi DNA smo centrifugirali 2 minute na 16100 g.

U svaku pojedinu vezujuću aparaturu, stavili smo 13 mL vezujućeg pufera. Pipetom smo pokupili što je moguće više supernatanta i dodali ga vezujućem puferu u 11 aparatura (po jedna za svaki uzorak i negativnu kontrolu, označili brojevima s prvotnih tubica). Čepove *Falkon* tubica aparatura osigurali smo trakom za autoklaviranje te ih centrifugirali 4 min na 1500 g, nakon čega smo aparature okrenuli za 90° i ponovno ih centrifugirali, ovaj puta 2 minute pri istoj brzini. Vezujuću aparaturu smo razdvojili i stavili *MinElute* kolone u tubice iz kojih smo ih prethodno izvadili i začepili prethodno odrezanim čepom. Tubice s kolonama smo centrifugirali na suho 1 minutu pri 3 300 g, nakon čega smo im dodali 650 µL PE ispirajućeg pufera (u komercijalni PE pufer prvo smo dodali 25 µL 100%- tnog etanola koji služi za uklanjanje soli). Ispiranje služi kako bi se sa silike membrane uklonilo sve osim

DNA. Uslijedilo je centrifugiranje u trajanju od 1 minute pri 3 300 g. Sadržaj tubica zatim smo odbacili i ponovili prethodni postupak s dodavanjem PE pufera, centrifugiranjem i odbacivanjem sadržaja tubice. Tubice smo centrifugirali na suho u trajanju od 1 minuta pri 1600 g, nakon čega smo kolone prebacili u čiste *Eppendorf* tubice volumena 1,5 mL (prije toga smo tubice ozračili UV svjetlom u trajanju od 10 minuta). Centrifugiranje na suho bilo je potrebno za potpuno ispiranje alkohola sa silika membrane kako bi bili u mogućnosti dobiti čisti eluat DNA. Zatim smo napravili eluciju dodavanjem 12,5  $\mu$ L TET pufera na silika membranu, inkubacijom na sobnoj temperaturi u trajanju od 5-10 minuta te centrifugiranjem u trajanju od 30 sekundi na 16 100 g. Eluciju smo ponovili kako bi dobili oko 25  $\mu$ L DNA ekstrakta koji smo do daljnjeg istraživanja spremili na 4°.

### **2.2.3. Mjerenje koncentracije umnožene DNA**

Za mjerenje koncentracije koristili smo spektrofotometar *NanoDrop 2000c* (*Thermo Scientific*). Spektrofotometrijom se mjeri količina svjetlosti koju neka tvar apsorbira kada kroz nju prolazi zraka svjetlosti. Osim za apsorbanciju, spektrofotometar može mjeriti i koncentraciju danog uzorka. Naime, valna duljina svjetlosti nakon njenog prolaska ovisi o dužini kivete i koncentraciji samog uzorka, stoga mjereći apsorbanciju možemo dobiti i podatke o koncentraciji. Mjerenjem apsorbancije pri valnim duljinama od 260 i 280 nm moguće je utvrditi čistoću DNA odnosno prisutnost RNA i proteina u uzorku, dok izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 230 nm utvrđuje prisutnost spojeva koji kontaminiraju DNA poput karbohidrata, peptida, fenola, itd.

Spektrofotometar *NanoDrop* je automatiziran. Pipetom smo nanijeli 2  $\mu$ L uzorka, odabrali opciju za mjerenje koncentracije DNA i dobili izračunate rezultate. Pri prvom mjerenju umjesto uzorka stavili smo 2  $\mu$ L pufera u kojem se DNA nalazi te izmjerili vrijednost kako bi spektrofotometar u radu s uzorcima mogao izračunati vrijednosti samo za supstancu čije podatke želimo.

### **2.2.4. PCR metoda za provjeru kvalitete DNA**

PCR reakcija koristi se kako bi se amplificirala postojeća DNA. Sastoji se od nekoliko koraka koji uključuje denaturaciju lanaca (pri temperaturi od 95°C), aneliranje tj. pripajanje početnica (pri temperaturama od 55°C - 65°C) i produljenje lanaca uslijed djelovanja *Taq* polimeraze (pri temperaturi od 72°C). Ovi koraci ponavljaju se određeni broj puta svakim ciklusom stvarajući kopije početne DNA.

Za provedbu PCR reakcije koristili smo PCR *Master Mix* koji sadrži deoksinukleotid trifosfate (dNTP), pufer,  $MgCl_2$  i par početnica, *AmpliTaq Gold* polimerazu, uzorke s izoliranom DNA te negativnu kontrolu koja je prolazila sve korake kao i uzorci, pozitivnu kontrolu PCR reakcije u koju smo stavili endogenu humanu DNA i negativnu kontrolu PCR reakcije u koju smo umjesto uzorka DNA stavili destiliranu vodu

Posebni laminar (u kojem nismo vršili nijedan od prethodno opisanih postupaka) smo zajedno s pipetama i PCR epruvetama očistili po prije opisanim postupcima sprečavanja kontaminacije DNA. S obzirom da smo koristili početnice za ljudsku DNA, morali smo posebno paziti na kontaminaciju vlastitom DNA s obzirom da PCR pri umnožavanju daje prednost kvalitetnijim i dužim fragmentima nauštrb fragmenata drevne DNA.

Napravili smo smjesu *MasterMixa* i *AmpliTaq Gold* polimeraze kao što je navedeno u tablici 3. U svaku PCR tubici stavili smo 45  $\mu L$  smjese *MasterMixa* i *AmpliTaq Gold* polimeraze te 5  $\mu L$  pojedinog uzorka, odnosno negativne kontrole izolacije DNA te pozitivne ili negativne kontrole PCR reakcije . Tubice smo stavili u PCR uređaj (*ProFlex<sup>TM</sup> PCR Systems*) koji smo namjestili na standardni program za *AmpliTaq Gold* polimerazu:

- 95°C u trajanju od 7 minuta (aktivacija *Taq* polimeraze)
- 95°C u trajanju od 45 sekundi (denaturacija DNA)
- 60°C u trajanju od 45 sekundi (spajanje početnica na ciljnu regiju, hibridizacija)
- 72°C u trajanju od 90 sekundi (produljivanje lanca)

Ponavljanje reakcije od drugog do četvrtog koraka u 34 ciklusa

- 72°C u trajanju od 10 minuta (završno produljivanje)
- 15°C  $\infty$  (zaustavljanje reakcije)

**Tablica 3.** Smjesa *Mastermixa* i *Amplitaq Gold* polimeraze. Imamo ukupno 13 PCR reakcija (10 uzoraka, negativna kontrola izolacije te pozitivna i negativna kontrola PCR-a), ali u pripremi smjese dodajemo volumen za još jednu reakciju zbog gubitaka uslijed pipetiranja otopina.

	Volumen za 1 reakciju	Volumen za 14 reakcija
<i>MasterMix</i>	45 $\mu L$	630 $\mu L$
<i>Amplitaq Gold polimeraza</i>	0,25 $\mu L$	3,5 $\mu L$

### 2.2.5. Elektroforeza na gelu

Elektroforeza na gelu metoda je kojom detektiramo fragmente različitih duljina ovisno o njihovoj brzini kretanja kroz električno polje na gelu koji sadrži sitne pore. Molekule DNA negativno su nabijene zbog prisustva fosfatnih skupina te će putovati prema pozitivnom

naboju, odnosno od anode prema katodi. Brže će putovati manji fragmenti, dok će većim fragmentima trebati više vremena da prijeđu isti put. Na temelju toga dobiva se elektroforegram u kojem se mogu odrediti veličine dobivenih fragmenata temeljem njihove usporedbe s poznatim duljinama fragmenata DNA ljestvi (eng. *DNA ladder*). Fragmente je potrebno na neki način obilježiti kako bi se mogla odrediti njihovu poziciju na gelu nakon provedene elektroforeze. Za označavanje se koristi etidij bromid ili u novije vrijeme boje poput *Gel red*-a zbog mutagenosti etidij bromida.

Kako bi dobili 2% -tni agarozni gel, u *Erlenmayerovu* smo tikvicu stavili 2 g agaroze i 100 mL 1 X TBE pufera. Otopinu smo zagrijali u mikrovalnoj pećnici pazeći da ne provrije izvan tikvice. Otopina je zadovoljavajuća kada u njoj ne možemo vidjeti nikakva zrnca agaroze jer ćemo u suprotnom dobiti iskrivljene vrpce kao rezultat. Gel smo, nakon što smo ga nekoliko minuta pustili da se ohladi, prelili u kadicu i stavili češljic kojim ćemo u gelu dobiti 15 jažica (11 uzoraka + pozitivna i negativna kontrola PCR reakcije + DNA ljestve kao referenca u prvoj i zadnjoj jažici). Pustili smo gel da se ohladi i stvrdne (otprilike 20 minuta). Za to vrijeme smo u svaku pojedinu čistu tubicu stavili 20  $\mu$ L iz tubica s PCR produktima i pomiješali je s po 4  $\mu$ L boje za provjeru pozicije uzoraka (eng. *gel loading dye/buffer*) (*CoralLoad<sup>TM</sup> concentrate, Qiagen*) koja oboji uzorke kako bismo mogli vidjeti jesu li krenuli kada spojimo gel na struju i do kuda su došli tijekom elektroforeze. U svaku jažicu stavili smo po 5  $\mu$ L uzorka: u prvu DNA ljestve (*Specimen Control Size Ladder master mix, Invivoscribe*), zatim u sljedeću negativnu PCR kontrolu pa negativnu kontrolu izolacije DNA, zatim svaki od 10 uzoraka s izoliranom DNA, pozitivnu kontrolu PCR reakcije te na kraju ponovno DNA ljestve. Napon smo namjestili na 110 V, upalili aparaturu te provjerili jesu li uzorci krenuli i pustili gel oko 2 sata kada smo, provjerom boje na uzorcima, zaključili da su prešli određenu duljinu dovoljnu da se razdvoje ovisno o duljini fragmenata. Ugasili smo aparaturu i stavili gel u posudu s otopinom etidij bromida i odložili je zatvorenu u frižider. Nakon desetak minuta izvadili smo gel i stavili ga pod ultraljubičasto svjetlo i obradili *Kodak 1 D 3.6 Scientific Imaging Systems* sustavom.

### **2.3. Određivanje srodstva između pojedinaca**

Prednost novih tehnika STR analize u odnosu na stare leži u dvije bitne razlike: korištenju višestrukih reakcija koje omogućuje istovremeno amplifikaciju većeg broja različitih lokusa te mogućnost izravnog detektiranja PCR multipleksa. Naime, po jedna početnica svakoga para fluorescencijski je označena čime ih je moguće razlikovati po

različitim valnim duljinama svjetlosti (Primorac, 2008).. U radu s višestrukim PCR sustavima (što je zapravo jednako izvođenju više razdvojenih PCR reakcija u samo jednoj reakciji) dolazi do amplifikacije DNA korištenjem više različitih parova početnica. Ovi parovi moraju biti međusobno kompatibilni na način da temperatura pri kojoj dolazi do vezanja početnica na kalup bude otprilike jednaka za sve parove te početnice te da početnice ne budu međusobno komplementarne kako ne bi došlo do stvaranja dimera početnica (međusobnim vezanjem početnica umjesto vezanja početnica na ciljani lokus DNA) (Butler, 2005).

Kao i u svakoj PCR reakciji, a pogotovo PCR reakciji s drevnom DNA, postoji velika mogućnost kontaminacije stoga su poduzete jednake mjere opreza kao što je navedeno u prošlim koracima. Također, uzima se uzorak DNA osoba koje su radile s uzorcima kako bi ih se moglo isključiti kao izvor kontaminacije prilikom interpretacije rezultata.

Usporedbom DNA profila koje dobijemo iz uzoraka utvrdit ćemo međusobna poklapanja alela na promatranim lokusima.

### **2.3.1. Višestruki (eng. *multiplex*) PCR sustav *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion***

Sustav *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion (Promega)* koristi višestruku analizu 24 lokusa koji sadrže STR lokuse iz CODIS-a (eng. *Combined DNA Index System*, službena američka DNA baza podataka) i ESS-a (eng. *European Standard Set*, službena europska DNA baza podataka) zajedno sa amelogeninskim lokusom za determinaciju spola te Penta D, Penta E, D2S1338 i D19S433 lokusima za povećanje diskriminacijske moći (Tab. 4). CODIS u svojoj bazi sadrži 13, a ESS 12 STR lokusa, no zbog ponavljanja u ove dvije baze, njihova kombinacija sadrži 19 različitih lokusa. Postoji službeni način na koji mora biti izvršena nomenklatura STR biljeg, tako npr. u biljegu D18S51 slovo *D* označava da se radi o DNA, 18 broj kromosoma na kojemu se lokus nalazi, oznaka *S* da je lokus prisutan u jednoj kopiji (ako se sljedovi ponavljaju na više mjesta, stavlja se oznaka *Z*), a zadnji broj u imenu ukazuje da je to 51. otkriveni i kategorizirani biljeg na 18 – om kromosomu. S obzirom da su neki STR biljezi otkriveni prije uvođenja ovog pravila, zadržani su njihovi stari nazivi (obično ime lokusa bude jednako imenu gena u čiji sustav ulazi) (Primorac, 2008). Amelogeninski lokus ne spada u STR biljege. Amelogenin je spolno vezani gen koji kodira za proteine koji sudjeluju u razvoju zubne cakline. S obzirom da se razlikuje u veličini koju zauzima na X odnosno Y kromosomu (na X-u 106 pb, na Y-u 112 pb) odličan je pokazatelj spola kod analize DNA.

*PowerPlex<sup>®</sup> Fusion* sustav sadrži 5 različitih boja - fluorescein (plava), JOE (zelena), TMR-ET (žuta), CXR-ET (crvena) – koje različito obilježavaju različite skupine lokusa (SI. 12), te WEN koja boji standardne dužine fragmenata (eng. *Internal Lane Standard*) koji služe za kalibraciju uređaja kapilarne elektroforeze.

**Tablica 4.** STR lokusi koji se umnožavaju *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion (Promega)* kitom, fluorescencijska boja kojom se obilježavaju, njihov položaj u genomu čovjeka te slijed nukleotida njihove ponavljajuće jedinice (preuzeto i prepravljeno iz *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion System Technical Manual*, 2016)

STR lokus	Boja	Lokacija	5' → 3'
Amelogenin <sup>s</sup>	Fluorescein	Xp22.1–22.3 and Y	nije primjenjivo
D3S1358	Fluorescein	3p21.31 (45.557Mb)	TCTA kompleks
D1S1656	Fluorescein	1q42 (228.972Mb)	TAGA kompleks
D2S441	Fluorescein	2p14 (68.214Mb)	TCTA
D10S1248	Fluorescein	10q26.3 (130.567Mb)	GGAA
D13S317	Fluorescein	13q31.1 (81.62Mb)	TATC
Penta E	Fluorescein	15q26.2 (95.175Mb)	AAAGA
D16S539	JOE	16q24.1 (84.944Mb)	GATA
D18S51	JOE	18q21.33 (59.1Mb)	AGAA (19)
D2S1338	JOE	2q35 (218.705Mb)	TGCC/TTCC
CSF1PO	JOE	5q33.1 (149.436Mb)	AGAT
Penta D	JOE	21q22.3 (43.88Mb)	AAAGA
TH01	TMR-ET	11p15.5 (2.149Mb)	AATG (19)
vWA	TMR-ET	12p13.31 (5.963Mb)	TCTA kompleks (19)
D21S11	TMR-ET	21q21.1 (19.476Mb)	TCTA kompleks (19)
D7S820	TMR-ET	7q21.11 (83.433Mb)	GATA
D5S818	TMR-ET	5q23.2 (123.139Mb)	AGAT
TPOX	TMR-ET	2p25.3 (1.472Mb)	AATG
DYS391	TMR-ET	Y	TCTA
D8S1179	CXR-ET	8q24.13 (125.976Mb)	TCTA kompleks (19)
D12S391	CXR-ET	12p12 (12.341Mb)	AGAT/AGAC kompleks
D19S433	CXR-ET	19q12 (35.109Mb)	AAGG kompleks
FGA	CXR-ET	4q28 (155.866Mb)	TTTC kompleks (19)
D22S1045	CXR-ET	22q12.3 (35.779Mb)	ATT



**Slika 12.** STR lokusi i fluorescencijske boje kojima su obilježeni te skala za usporedbu njihovih veličina izražena u parovima baza. (preuzeto iz *PowerPlex® Fusion System*, Promega, 2016)

S obzirom na izgled gela u provedenoj elektroforezi na gelu te izmjerenu koncentraciju DNA pomoću *NanoDropa* odabrali smo 6 uzoraka nad kojima smo proveli daljnje istraživanje s obzirom da je za njih postojala najveća vjerojatnost da će dati rezultate. U reakciji su sudjelovale i negativna i pozitivna kontrola DNA zbog čega smo sve ukupno imali 8 reakcija.

Na početku smo napravili smjesu *Master Mix*-a s parovima početnica prema uputama proizvođača (Tab. 5). U svaku PCR tubicu pipetirali smo po 5  $\mu\text{L}$  *Master Mix*a te 7,5  $\mu\text{L}$  DNA (preporučena koncentracija DNA izmjerena pri apsorbanciji od 260 nm iznosi između 0,25 i 0,5 ng). U tubicu za pozitivnu kontrolu smo pipetirali 2,5  $\mu\text{L}$  2800 *Control DNA* (0,5 ng/ $\mu\text{L}$ ) i 5  $\mu\text{L}$  destilirane vode koja ne sadrži DNA ni nukleaze (*DNA-free dd H<sub>2</sub>O*), dok smo kao negativnu kontrolu koristili 7,5  $\mu\text{L}$  već spomenute destilirane vode (*DNA-free dd H<sub>2</sub>O*). Uzorke smo stavili u PCR uređaj *Veriti Thermal Cycler* (*Applied Biosystems*) koji smo zatim namjestili na odgovarajući program i pokrenuli:

- 96°C u trajanju od 1 minute (aktivacija *Taq* polimeraze)
- 94°C u trajanju od 10 sekundi (denaturacija DNA)
- 59°C u trajanju od 1 minute (spajanje početnica na ciljnu regiju, hibridizacija)
- 72°C u trajanju od 90 sekundi (produljivanje lanca)
- Ponavljanje reakcije od drugog do četvrtog koraka u 30 ciklusa
- 60°C u trajanju od 10 minuta (završno produljivanje)
- 4°C  $\infty$  (zaustavljanje reakcije)

**Tablica 5.** Smjesa za *Master Mix* s parovima početnica. Imamo ukupno 7 uzoraka (6 uzoraka sa DNA i kontrolu izolacije), ali u pripremi smjese dodajemo volumen za još jednu reakciju zbog gubitaka uslijed pipetiranja otopina.

	<b>Volumen za 1 reakciju</b>	<b>Volumen za 7 reakcija</b>
<i>PowerPlex® Fusion</i> <i>5X Master Mix</i>	2,5 µL	17,5 µL
<i>PowerPlex® Fusion</i> <i>5X Primer Pair Mix</i>	2,5 µL	17,5 µL

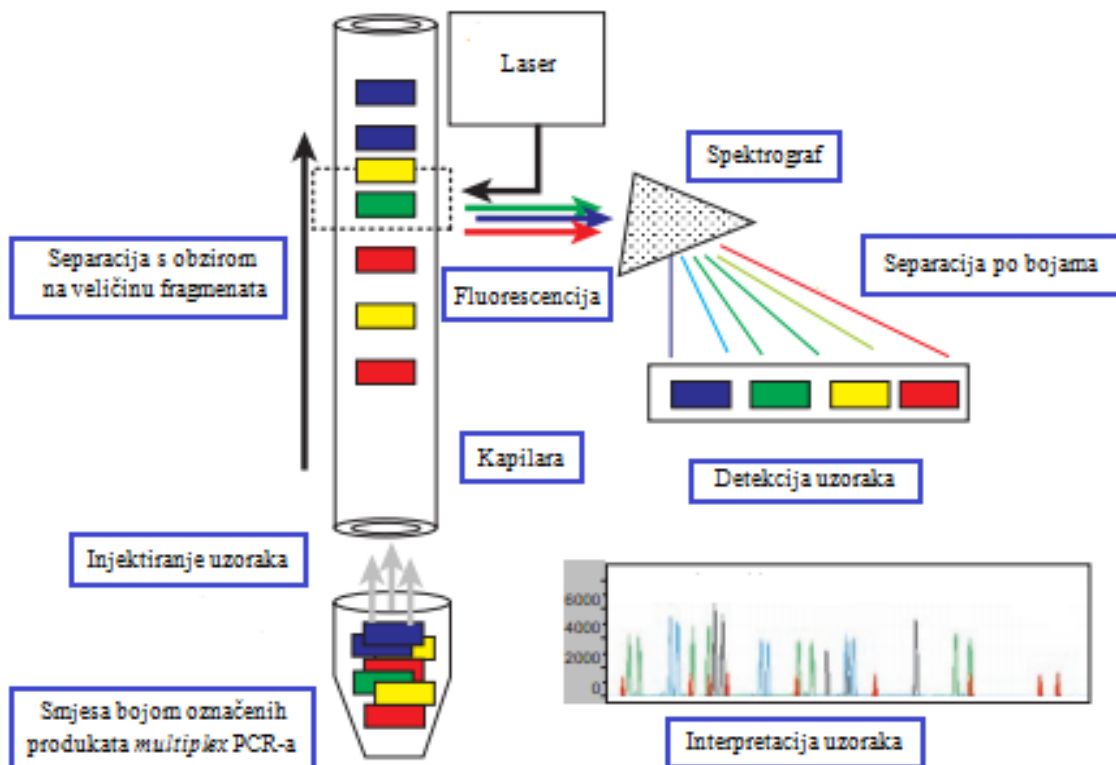
Po završetku amplifikacije umnožene uzorke smo pripremili za kapilarnu elektroforezu. Napravili smo smjesu visoko deioniziranog formamida (*Hi-Di™ formamide Applied Biosystems*) koji služi kao otapalo u reakciji i *WEN Internal Lane Standard 500* koji smo dobili kao dio kita, a služi za kalibraciju uređaja kapilarne elektroforeze. Volumen smjese ovisi o broju reakcija (Tab. 5). Osim tubica koje smo imali do sada (šest uzoraka izolirane DNA te pozitivna i negativna kontrola PCR reakcije) pripremili smo još jednu tubicu s *PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix* – om koji je također bio prisutan u kitu, a koristit ćemo ga kao referencu za veličine umnoženih alela. U jažice na pločici uređaja (*96 well* pločica) smo za svaki pojedini uzorak, kontrolu i *PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix* pipetirali 11 µL smjese formamida i *WEN Internal Lane Standard 500*. U svaku jažicu smo dodali 1 µL PCR produkta, a u jednu 1 µL *PowerPlex® Fusion Allelic Ladder Mix*-a. Pločicu uređaja smo centrifugirali kako bi uklonili mjehuriće zraka iz jažica nakon čega je uslijedila denaturacija uzoraka - pločicu smo stavili 3 minute na 95 °C u PCR uređaj (*Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems*). Odmah zatim uzorke smo stavili na led na 2 minute. Uzorke smo zatim stavili na blok u genetičkom analizatoru 3130 (*3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems*) gdje će umnoženi fragmenti biti razdvojeni kapilarnom elektroforezom. Veličina fragmenata određena je na osnovi standarda poznate molekularne mase programom *GeneMapper® ID-X (Applied Biosystems)*. Genotip je utvrđen usporedbom s odgovarajućim standardom (*Allelic Ladder*).

### **2.3.2. Detekcija rezultata kapilarnom elektroforezom**

Sustav za kapilarnu elektroforezu sastoji se od uske staklene kapilare koja je ispunjena specijalno izrađenim polimerom za analizu ulomaka s visokom rezolucijom (mikrosatelitna DNA), dva pufera, izvora laserske zrake, detektora fluorescencije, dvije elektrode spojene na izvor visokog napona, držača tubica s uzorcima i računala koje regulira injektiranje uzoraka i njihovu detekciju. Električna struja koja prolazi kroz gel uzrokuje migriranje fragmenata DNA od pozitivne prema negativnoj elektrodi. Na točno određenom dijelu kapilare fiksirana



laserska zraka detektira trenutak u kojem fragment DNA prođe tim dijelom (manji fragmenti putuju brže kroz polimer, a veći fragmenti putuju duže). Laserska zraka uzrokuje pobuđivanje fluorofora u umnoženim fragmentima i time emisiju svjetlosti određene valne duljine koju detektira i bilježi fotosenzitivni detektor. Udaranje fotona u detektor konvertira se u električni signal. Jačina rezultantne struje proporcionalna je intenzitetu emitiranog svjetla (Butler, 2012). Podaci o razdvajanju i veličini fragmenata prikazuju se upravo kao funkcija danog intenziteta (Sl. 8), u elektroforegramu vidljivi kao pikovi (eng. *peak*). Elektroferogram se analizira pomoću računalnog programa koji identificira DNA ulomke, određuje njihove duljine, visine signala i ostale parametre te ih na kraju prezentira grafički u svakoj boji kojom su obilježeni. Slijedi usporedba s dužinama alela alelnih ljestava i svaki analizirani alel dobiva svoju brojčanu oznaku koja predstavlja broj ponavljanja osnovne ponavljajuće jedinice u danom alelu (Primorac, 2008).



Slika 13. Princip rada kapilarne elektroforeze (preuzeto i prepravljeno iz Butler, 2012)

### 3. REZULTATI

Na grafičkom prikazu ušćuvanosti kostura svakog pojedinca narančastom bojom su prikazane kosti prisutne u uzorku. Grafički je prikazana i prisutnost zuba. Narančasta boja ponovno ukazuje na prisutnost strukture u uzorku, žuta ukazuje na činjenicu da je zub ispao za vrijeme života, a zelena da je ispao postmortalno. Karijes je prikazan crnom oznakom na kruni zuba, a alveolarni apsces je prikazan iscrtkanom oznakom na korijenu zuba.

Rezultati morfološke analize uzoraka na čijim lubanjama nema naznaka umjetne deformacije:

- Uzorak U-364



**Slika 14.** Grafički prikaz prisutnih kostiju u uzorku U – 364. . Narančastom bojom su označene prisutne kosti. U uzorku nisu pronađeni zubi.

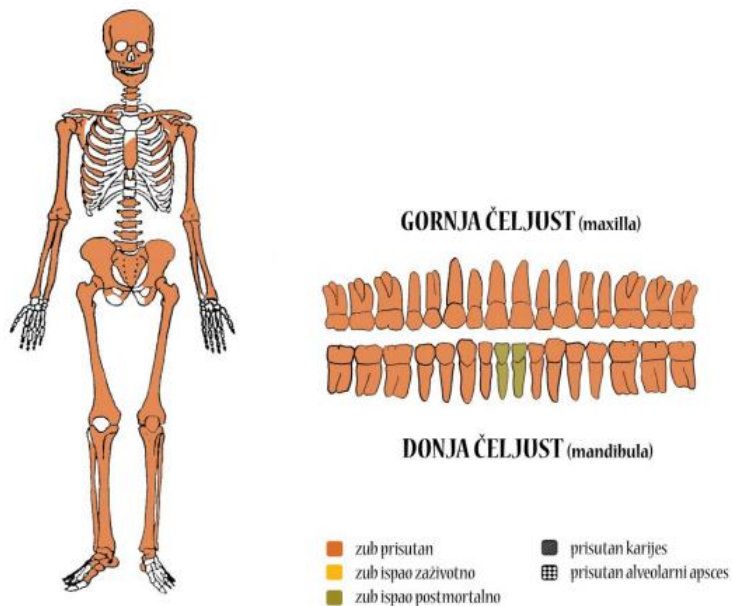
Opisanim metodama utvrđivanja spola i starosti utvrdili smo da je osoba najvjerojatnije muškarac te da je u trenutku smrti imala više od 45 godina. Na desnom ramenu, laktovima, kukovima i desnoj podlaktici prisutan je blagi degenerativni osteoartritis čije je obilježje stvaranje osteofita (koštane kvрге, izraštaji na kosti, lokalne hipertrofije kosti) oko rubova zglobnih ploština. Promjene vidljive u degenerativnom osteoartritisu su rezultat mikrotrauma koje su posljedica svakodnevnih aktivnosti. Na lijevoj lisnoj kosti prisutan je umjereni zarasli periostitis koji može biti posljedica više različitih događaja kao što su specifične zarazne bolesti koje se krvlju prenesu do kostiju (npr. sifilis), nespecifične bakterijske infekcije, lokalizirane traume, venozne insuficijencije itd. Na desnoj goljeničnoj i lisnoj kosti prisutan je osteomijelitis. To je jaka akutna ili kronična infekcija kosti koja nastaje kada baktetrije

hematogenim putem dolaze do kosti koju inficiraju čime dolazi do upale i stvaranja gnoja. Na desnoj lakatnoj kosti i lijevom iveru prisutna je jaka osifikacija (stvaranje nove kosti). Kosti šaka i stopala stanjene s naglašenim fleksorima i koštanim trnovima (Sl. 15). Ove promjene su obično karakteristične za lepru, ali s obzirom da nedostaje veliki dio kostura na kojemu bi mogli potražiti ostale dokaze za ovu bolest, ne možemo tvrditi da je osoba zaista od nje bolovala. Lepra je bolest koju uzrokuje *Mycobacterium leprae* i očituje se u dva klinička oblika – tuberkuloidnom kod kojeg bijela krvna zrnca uništavaju uzročnike lepre, ali istovremeno uništavaju i periferne živce i težem, lepromatoznom obliku. U ovom obliku antitijela pokušavaju uništiti uzročnike bolesti bušenjem rupe u stijenci, no bacili lepre imaju izrazito debele stijenke pa to nije odveć učinkovito, a kao dodatnu zaštitnu od antitijela skrivaju se u ljudskim stanicama. Razmnožavanje bakterija u organizmu s vremenom dovodi do promjena na koži, sljepila, te destrukcije kostiju. Ukoliko je analizirani pojedinac bolovao od lepre, bio je to lepromatozni oblik. S obzirom kod opisanog pojedinca nije bila prisutna temporalna kost, na njemu nismo proveli izolaciju DNA.



**Slika 15.** Stanjeni vrhovi metatarzalnih kostiju stopala

- Uzorak U – 1133



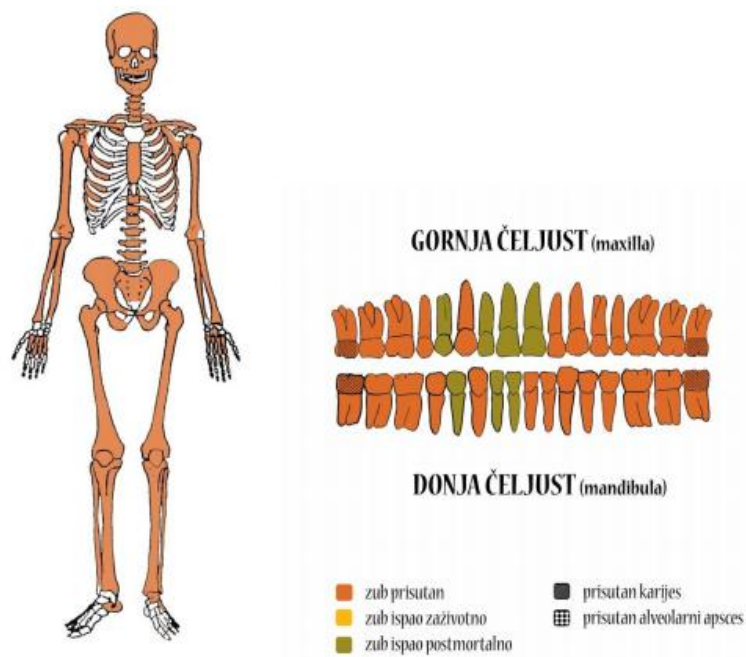
**Slika 16.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 1133. Narančastom bojom su označene prisutne kosti.

Kostur je pripadao ženskoj osobi koja je u trenutku smrti imala između 25 i 30 godina. U orbitama lubanje prisutna je blago zarasla *cribra orbitalia* (na gornjim svodovima orbita pojavljuje se šupljikavost). Ovu pojavu smatra se posljedicom anemije koju je promatrana ženska osoba očito imala u nekom trenutku života. Degenerativni osteoartritis prisutan je na dva prsna i dva slabinska kralješka. Na tri slabinska kralješka ustvrdili smo prisutnost Schmorlovih defekata koji se očituju reapsorpcijom dijelova tijela kralježaka, a rezultat su propadanja intervertebralnog diska u tijelo susjednih kralježaka. Nastaju uslijed jakog mehaničkog opterećenja kralježnice. Izražene čučee plohe (eng. *squatting facets*) prisutne su na goljениčnim kostima (Sl.17). To su specijalne koštane modifikacije koje se nalaze uglavnom na stopalima ili zglobovima a posljedica su kontakta dvije kosti kada je jedna od kosti previše savinuta prema gore (hiperdorzifleksija). Pokazuju da je osoba često čučala.



**Slika 17.** Čučee plohe na goljениčnoj kosti (lijevoj)

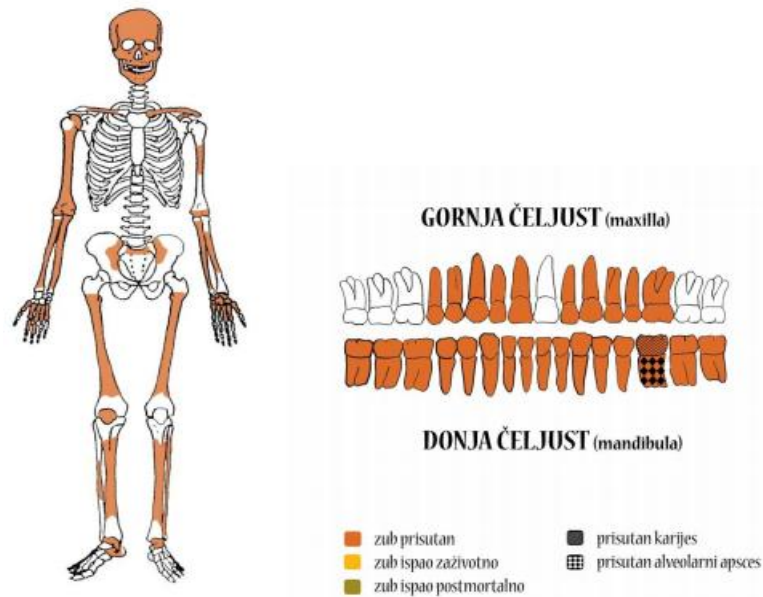
- Uzorak U – 520



**Slika 18.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 520. Narančastom bojom su označene prisutne kosti.

Kostur pripada muškoj osobi koja je u trenutku starosti imala između 30 i 35 godina. u orbitama lubanje prisutna je blaga zarasla *cribra orbitalia*, a na unutarnjoj strani čeone i tjemenih kostiju zarasli upalni proces. Na četvrtom prsnom kralješku prisutan je degenerativni osteoartritis, dok su na većem broju kralježaka vidljivi Schmorlovi defekti. Na hvatištu velikog prsnog mišića (lat. *pectoralis maior*) desne nadlaktične kosti vidljiv je benigni kortikalni defekt koji je u vidu udubljenja na kostoklavikularnom ligamentu (lat. *fossa rhomoida*) prisutan i na desnoj ključnoj kosti. Ovi defekti rezultat su intenzivne fizičke aktivnosti mišića vezanih za dio kostura gdje defekti nastaju. U ovom slučaju riječ je o aktivnosti koju su provodili mišići ramenog obruča. Na zubima su vidljivi hipoplastični defekti.

- Uzorak U – 527



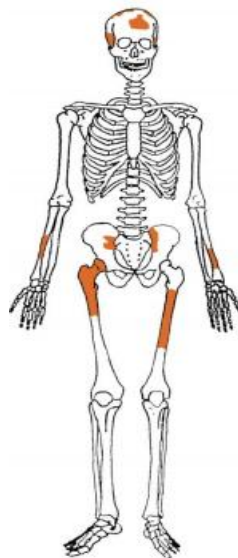
**Slika 19.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 527. Narančastom bojom označene su prisutne kosti.

Kostur je pripadao muškarcu koji je u trenutku smrti imao između 45 i 55 godina. Na obje nadlaktične kosti ustvrdili smo postojanje jakih benignih kortikalnih defekata od kojih je najizraženije mišićno hvatište deltoidnog mišića (lat. *deltoideus*). Usporedba s normalnim *deltoideusom* vidljiva je na slici 20. Na goljeničnim i lisnim kostima prisutan je blagi zarasli periostitis, a na križnoj kosti makroporozitet.



**Slika 20.** Usporedba desne nadlaktične kosti iz uzorka U – 527 s normalnom nadlaktičnom kosti s istog nalazišta. Izraženo je mišićno hvatište za deltoidni mišić.

- Uzorak U – 859

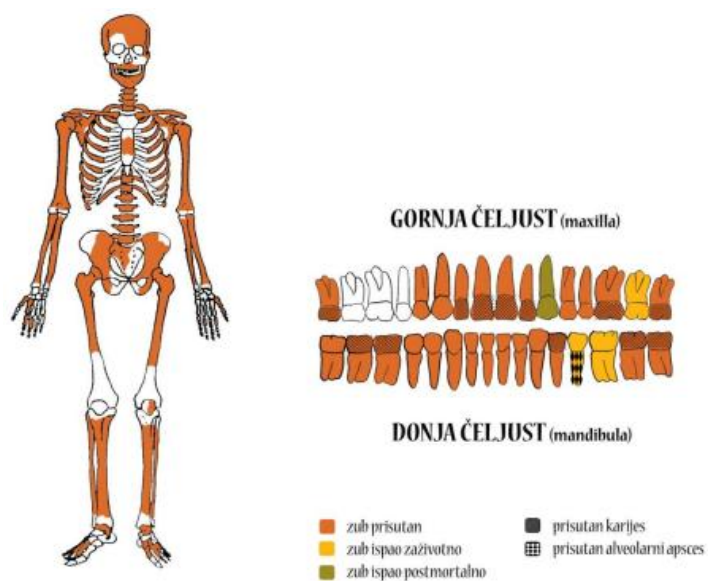


**Slika 21.** Grafički prikaz prisutnih kostiju u uzorku U – 859. Narančastom bojom su prikazane prisutne kosti. U uzorku nisu pronađeni zubi.

Kostur je pripadao djetetu starosti između jedne i dvije godine. Na prisutnim dijelovima kostura nisu prisutne patološke promjene.

Rezultati morfološke analize uzoraka s lubanjama s umjetnom deformacijom:

- U – 810



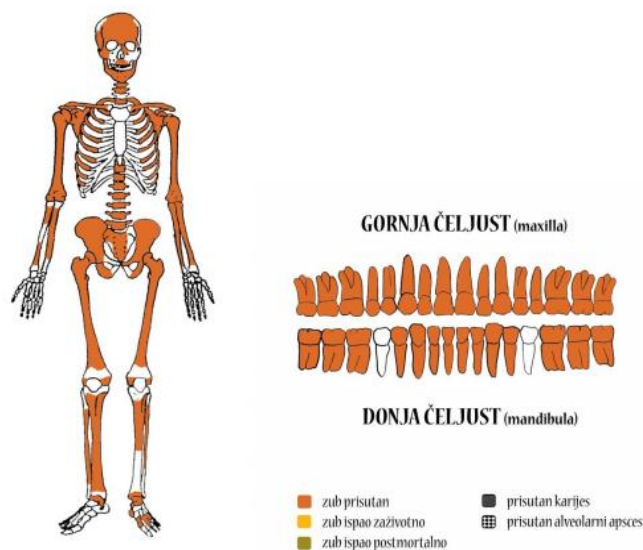
**Slika 22.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 810. Narančastom bojom su prikazane kosti prisutne u uzorku.

Kostur je pripadao ženi koja je u trenutku smrti imala između 18 i 25 godina. Na unutarnjoj strani čeonu kosti ustvrdili smo prisutnost dvije lezije i blagog aktivnog upalnog procesa. Još jedna lezija pronađena je u lijevoj orbiti. Na tjemenim i zatiljnim kostima uočena je ektokranijalna poroznost. Udubljeni defekt je prisutan na drugom, dok na trećem, četvrtom i petom slabinskom kralješku nalazimo degenerativni osteoartritis. Na obje lisne i goljenične kosti uočili smo blagi zarasli periostitis. Lubanja je deformirana što je rezultiralo zaravnjenom zatiljnom kosti i blago utisnutim tjemenim kostima (Sl. 23) stoga je vjerojatno riječ o *circular erect* deformaciji.



**Slika 23.** S lijeve strane je umjetno deformirana lubanja iz uzorka U – 810. S desne strane nalazi se shematski prikaz deformacije (crveno) u odnosu na normalnu građu lubanje.

- U – 766



**Slika 24.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 766. Narančastom bojom su naznačene prisutne kosti.



Radi se o ženskoj osobi koja je umrla između 15 - e i 17 - e godine života. Litički defekti su utvrđeni na glenoidnim šupljinama obiju lopatica (plitka udubljenja na lopatici u koje ulazi glava nadlaktične kosti te formira rame) (Sl. 25). Na goljeničnoj kosti utvrđena je lezija pravilnih rubova i ravnog dna. Zbog prisustva litičkih lezija postoji mogućnost *osteochondritis dissecans*. To je bolest kod koje dolazi do prekida dotoka krvi u rubne dijelove kosti. Zbog gubitka dotoka krvi, taj dio kosti umire. Oštećeni dio kosti puca i odlama se unutar zgloba, mehaničkim pritiscima se usitnjuje i s vremenom apsorbira. Uzrok bolesti je nepoznat no pretpostavlja se da za bolest postoji određena genetska predispozicija, s obzirom da je uočeno kako se bolest javlja u nekoliko generacija. Na većem broju kralježaka prisutni su Schmorlovi defekti, a na orbitama blaga zarasla *cribra orbitalia*. Na lijevoj lisnoj kosti vidljiv je blagi zarasli periostitis. S obzirom na jako visoko čelo pretpostavili smo da je ova lubanja umjetno deformirana (Sl. 26), no to ne možemo tvrditi sa sigurnošću.

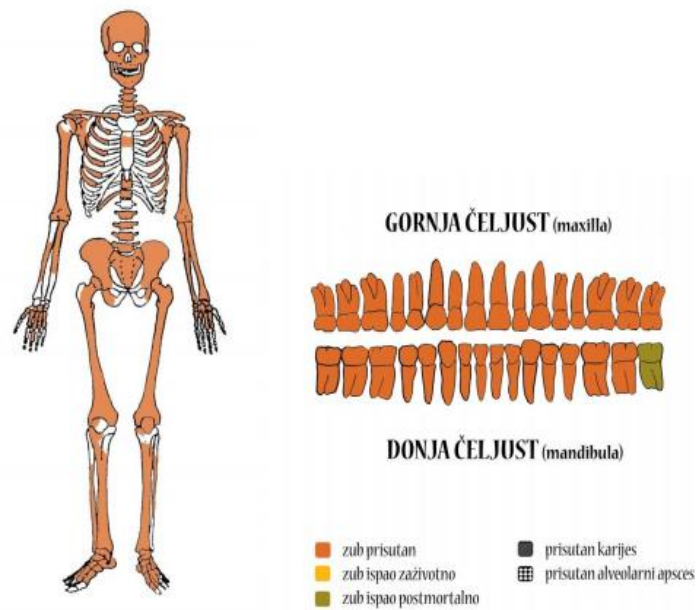


**Slika 25.** Litički defekt na glenoidnoj šupljini lopatice kod uzorka U – 766



**Slika 26.** Vjerojatno umjetno deformirana lubanja uzorka U – 766 (desni profil)

- U – 528



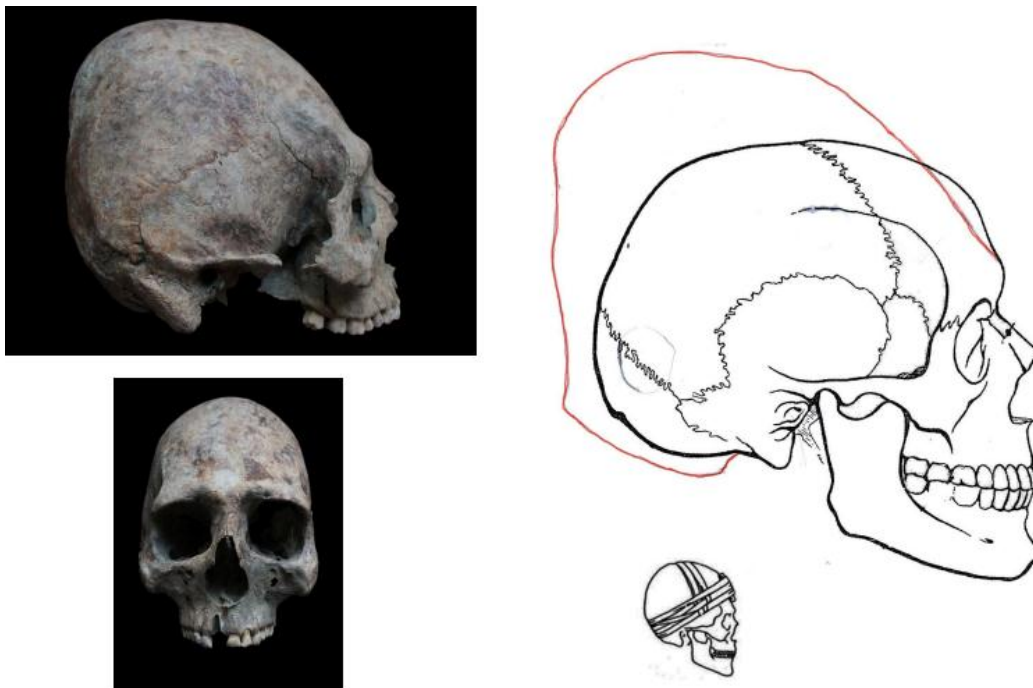
**Slika 27.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 528. Narančastom bojom prikazane su prisutne kosti.

Kostur je pripadao muškarcu koji je u trenutku smrti imao između 30 i 40 godina. Na vrhu lubanje vidljiva je ektokranijalna poroznost koja se naziva i "kost u obliku narančine kore" jer se sastoji od plitkih rupica pri vrhu svoda lubanje. Ova pojava upućuje na neadekvatnu prehranu pojedinca u određenom razdoblju koje je prethodilo smrti. Na dijelovima kostura uočili smo degenerativni osteoarthritis kao i Schmorlov defekt na drugom slabinskom kralješku. Na lijevoj lopatici u glenoidnoj šupljini prisutna je litička lezija koja bi mogla upućivati na *osteochondritis disekans*, a na hvatištu velikog prsnog mišića (lat. *pectoralis maior*) desne nadlaktične kosti utvrđen je blagi kortikalni defekt. Lateralni epikondilitis (danas poznati kao teniski lakat), koji je najčešći sindrom prenaprežanja sustava za kretanja kod ljudi, prisutan je na lijevom laktu (Sl. 28). Nastaje kada se često ponavljaju aktivnosti koje uključuju ispruživanje šake i prstiju ili okretanje podlaktice na način da dlan gleda prema gore ili kombinacijom opisanih kretanja. Na desnoj palčanoj kosti uočili smo zadebljanje koje je vjerojatno posljedica zarasle frakture. Na drugom slabinskom i 12 – om prsnom kralješku prisutna je litička lezija sa sklerotičnim dnom, a na desnom stopalu na polovici dijafize druge i treće metatarzalne kosti došlo je do stvaranja nove zglobove plohe, vjerojatno kao rezultat traume (Sl. 28). Na zubima smo uočili hipoplastične defekte. Lubanja je umjetno deformirana, vjerojatno *tabular – erect* tipom deformacije (Sl. 29). Na lijevoj čeonj kosti prisutna je i fraktura nastala za života pojedinca. Na lijevoj stražnjoj strani glave nalazi se otvor (Sl. 30) koji podsjeća na rezultat trepancije. Nažalost, kost je dosta oštećena postmortalno, stoga

nemamo dovoljno informacija kojima bi mogli tvrditi da je trepancija uistinu izvedena nad ovim pojedincem.



**Slika 28.** Na lijevoj slici vidljiv je lateralni epikondilitis, a na desnoj novonastala zglobna ploha na polovici dijafize druge i treće metatarzalne kosti.

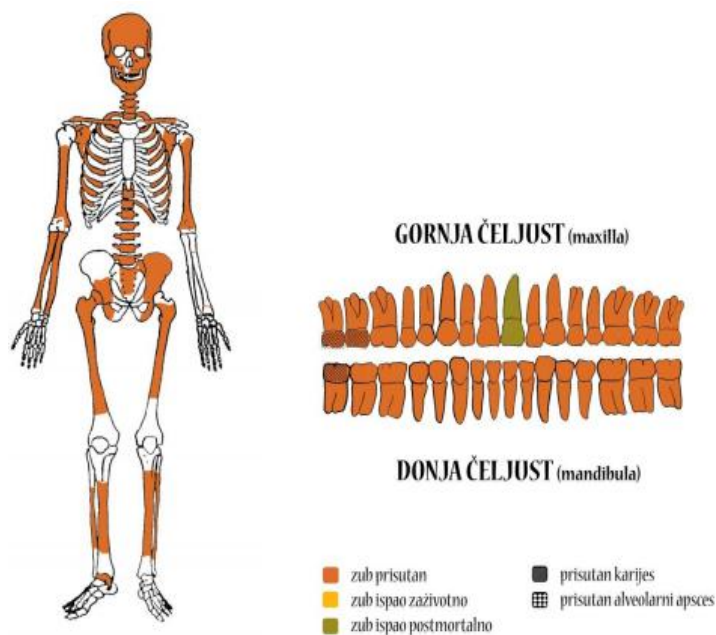


**Slika 29.** S lijeve strane vidljiva je deformirana lubanja muškarca. S desne strane nalazi se shematski prikaz deformacije (crveno) u odnosu na normalnu građu lubanje kao i predloženi model vezanja trakama i udlagom prema Molnár i sur. 2014



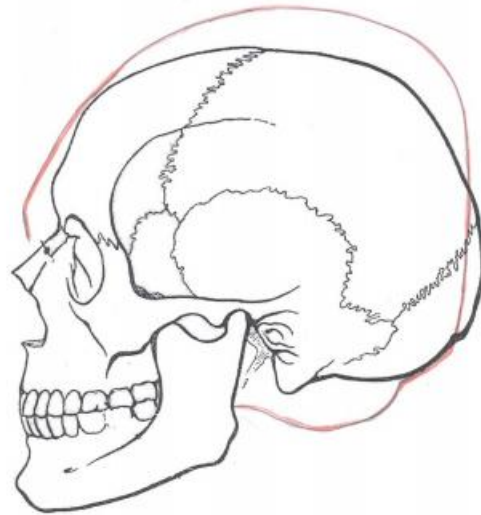
Slika 30. Otvor na stražnjoj strani lubanje koji bi mogao biti posljedica trepancije.

- U – 811



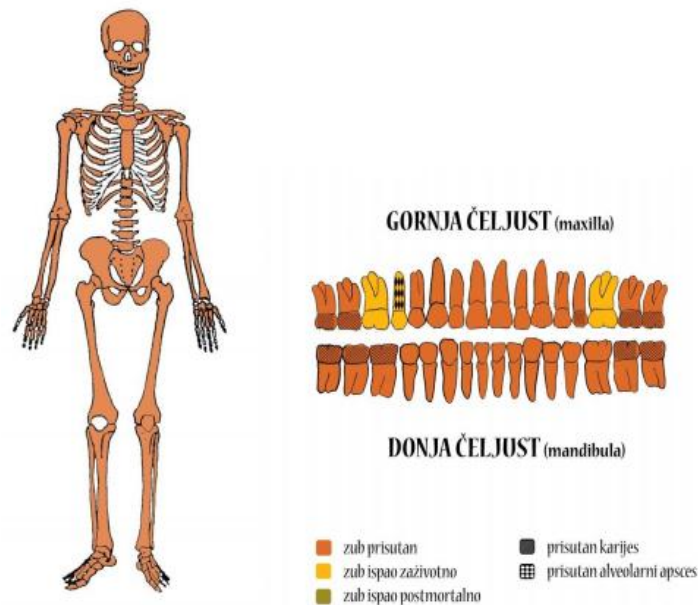
Slika 31. Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba iz uzorka U – 811. Narančastom bojom su prikazane prisutne kosti.

Radi se o muškarcu koji je u trenutku smrti imao između 30 i 35 godina. Na lisnim kostima vidljiv je blagi zarasli lokalizirani periostitis. Koštane izrasline prisutne su na prvom, drugom i trećem slabinskom kralješku. Mišićno hvatište za mali obli mišić (lat. *musculus teres maior*) izraženo je na obje nadlaktične kosti što ukazuje na intenzivnu fizičku aktivnost koju su obavljali mišići ramenog obruča. Tip deformacije lubanje vjerojatno je *circular erect* s obzirom da je zatiljna kost zaravnjena, čeona malo ukošena, a cijela kalota lubanje vertikalno izdužena (Sl. 32).



**Slika 32.** S lijeve strane prikazana je umjetno deformirana lubanja uzorka U – 811, a s desne strane je shematski prikaz deformacije (crveno) u odnosu na normalnu građu lubanje

- U -526



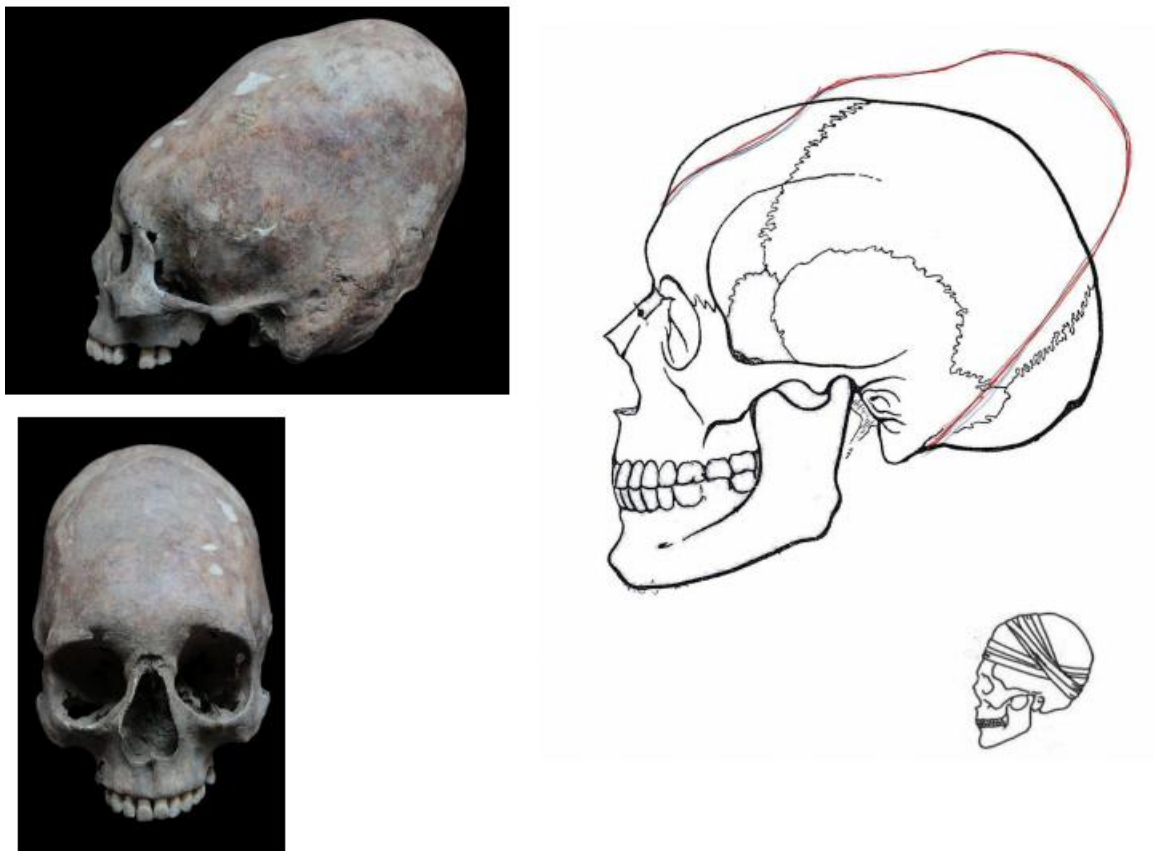
**Slika 33.** Grafički prikaz prisutnih kostiju i zuba u uzorku U – 526. Narančastom bojom su označene prisutne kosti.

Kostur je pripadao ženi koja je u trenutku smrti imala između 30 i 40 godina. Na većem broju kralježaka prisutan je degenerativni osteoartritis, kao i Schmorlovi defekti. Na trećem i četvrtom kralješku prisutne su litičke lezije. Na desnoj nadlaktičnoj kosti medijalni kondil je

puno manji od onoga na lijevoj ruci (Sl. 34), što je rezultat ili normalne morfološke varijacije ili dobro zarasle frakture. Na zubima smo utvrdili prisutnost hipoplastičnih defekata kao i karijesa i apscesa (Sl. 34). Čeona i zatiljna kost lubanje su zaravnjene, a glava je ukošena prema nazad u odnosu na Frankfort horizontalnu ravninu što je dovelo do kompenzacijskom rasta u visinu što upućuje na *circular oblique* tip deformacije (Sl. 35).

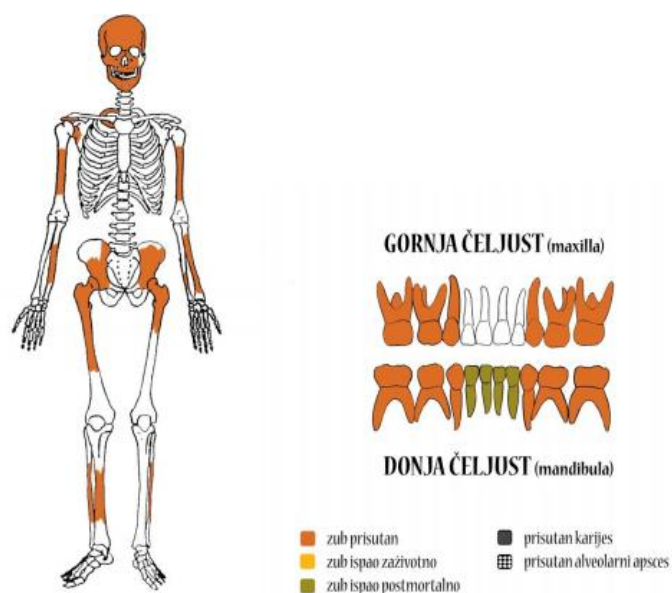


**Slika 34.** S lijeve strane prikazana je usporedba desnog i lijevog medijalnog kondila nadlaktične kosti, a s desne strane prikazan je karijes i apsces na gornjoj čeljusti



**Slika 35.** S lijeve strane prikazana je deformirana lubanja uzorka U – 526, a s desne strane shematski prikaz deformacije (crveno) u odnosu na normalnu građu lubanje kao i predloženi model vezanja lubanje trakama prema Molnár i sur. 2014

- U – 821



**Slika 36.** Grafički prikaz kostiju i zuba prisutnih u uzorku U – 821. Narančastom bojom su prikazane prisutne kosti.

Radi se o djetetu koje je umrlo između šeste i sedme godine starosti. Na čeonj, zatiljnoj i obje tjemene kosti uočili smo aktivni upalni proces praćen makroporozitetom (Sl. 37). Čelo je izrazito visoko, a zatiljna kost plosnata što upućuje na umjetno deformirano lubanju (Sl. 37), a moguće je da je do navedenog upalnog procesa došlo zbog traka za povezivanje koje su se koristile pri deformaciji.



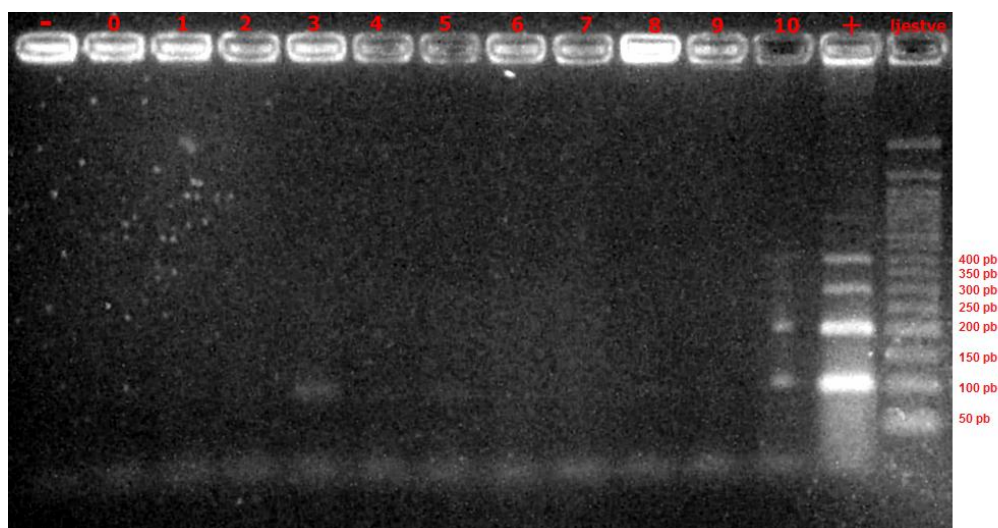
**Slika 37.** S lijeve strane prikazan je upalni proces na čeonj kosti. Gore desno prikazan je desni profil umjetno deformirane lubanje uzorka U – 821. Strelice označavaju mjesta gdje je vidljiva utisnuta kost kao rezultat pritiska traka korištenih za deformaciju. Dolje desno prikazan je lijevi profil deformirane lubanje.

### 3.1. Izolacija DNA

Kako bi provjerili uspješnost izolacije DNA prije daljnje analize utvrđivanja srodstva umnožili smo DNA uzoraka PCR metodom te odredili koncentraciju DNA u svakom pojedinom uzorku kao i stopu čistoće DNA i prisutnost spojeva koji je kontaminiraju. Vizualizirali smo rezultate elektroforezom na gelu. Dobiveni rezultati spektrofotometrije vidljivi su u tablici 6, a rezultati elektroforeze na slici 38.

Tablica 6 Rezultati spektrofotometrije. Stupac A 260 predstavlja izmjerenu apsorbanciju pri valnoj duljini svjetlosti od 260 nm, a stupac A 280 onu pri 280 nm. Omjer te dvije vrijednosti (stupac 260/280) prikazuje čistoću DNA i u savršenom slučaju taj omjer iznosi između 1,8 i 2. Omjer vrijednosti apsorbancije pri valnim duljinama svjetlosti od 260 i 230 nm prikazuje prisutnost spojeva koji kontaminiraju DNA (trebala bi iznositi između 2.0 i 2.2)

Broj tubice	Uzorak	Koncentracija (ng/μL)	A 260	A 280	260/280	260/230
0	Kontrola	3,48	0,70	0,045	1,56	2,71
1	U - 1133	16,22	0,324	0,203	1,60	3,03
2	U - 520	34,68	0,694	0,447	1,55	1,94
3	U - 527	17,46	0,349	0,218	1,60	-3,46
4	U - 810	20,44	0,409	0,281	1,46	-1,46
5	U -766	14,83	0,297	0,176	1,68	-0,87
6	u - 859	33,20	0,664	0,422	1,57	-8,86
7	U - 528	47,26	0,945	0,611	1,55	-1,11
8	U - 811	1,50	0,030	0,020	1,48	-0,04
9	U - 526	27,61	0,552	0,364	1,52	1,21
10	U - 821	15,29	0,306	0,200	1,53	-0,92



**Slika 38.** Rezultati elektroforeze na gelu. Brojevi predstavljaju broj tubice (uzorak se može očitati iz tablice 6), - označava negativnu, a + pozitivnu kontrolu PCR reakcije, zadnji stupac predstavlja DNA ljestve. Band je jasno vidljiv na uzorku 3 i 10, dok se mijenjanjem kontrasta i usporedbom različito kontrastiranih slika mogu uočiti *bandovi* na pruzi uzoraka 4, 5, 6 i 9.



Iz dobivenih rezultata spektrofotometrije i elektroforeze napravili smo tablicu (Tab. 7) na temelju koje smo izabrali uzorke za daljnju obradu (kombinacija najmanje kontaminacije uzorka s najvećom koncentracijom DNA i vidljivosti na gelu s najvećom prednosti danom uzorcima vidljivima na gelu).

Tablica 7 Rezultati elektroforeze na gelu i spektrofotometrije za vrijednost koncentracije DNA u pojedinom uzorku. Sivom bojom su istaknuti uzorci korišteni u daljnjoj analizi.

Šifra uzorka	Spol	Dob	Vrpca *	Koncentracija DNA (ng/ μL)	Deformacija lubanje
U - 1133	Ž	25 - 30	-	16,22	-
U - 520	M	30 -35	-	34,68	-
U - 527	M	45 - 55	++	17,46	-
U - 810	Ž	18 -25	+/-	20,44	+
U - 766	Ž	15 - 17	+	14,83	+
U - 859	DIJETE	1 - 2	+/-	33,2	-
U - 528	M	30 - 40	-	47,26	+
U - 811	M	30 - 35	+/-	1,5	+
U - 526	Ž	30 - 40	+/-	27,61	+
U - 821	DIJETE	6 - 7	++	15,29	+

\* jačina elektroforetske vrpce

### 3.2. Utvrđivanje srodnosti

Za uzorke nad kojima je provedena analiza dobiveni su elektroforegrami koji nam prikazuju parcijalne DNA profile svakog pojedinca (na nekim lokusima umnožen je samo jedan ili čak niti jedan alel) (Sl. 39 - 44). Podaci izvučeni iz dobivenih profila priloženi su u Prilogu 1. Na nekim lokusima dobiven je miješani uzorak što upućuje na umnožavanje lokusa više pojedinaca kao rezultat kontaminacije. Nije moguće odrediti kada je do kontaminacije došlo (prilikom provođenja koraka ovog eksperimenta ili je kontaminacija postojala u samom materijalu). Miješani uzorak očituje se pojavom više od dva pika na određenom lokusu. U slučaju njegovog pojavljivanja u DNA profilu ispitivane osobe potrebno je utvrditi kvantitativni omjer zastupljenosti pojedinačnih alela. U slučaju kada je količinska zastupljenost alela međusobno različita određuje se dominirajuća i slabije zastupljena frakcija (u Prilogu 1. kod miješanih uzoraka dominirajući aleli su podebljani). Na lokusima gdje je na DNA profilu prisutan samo jedan alel vjerojatno je da se drugi alel nije umnožio.

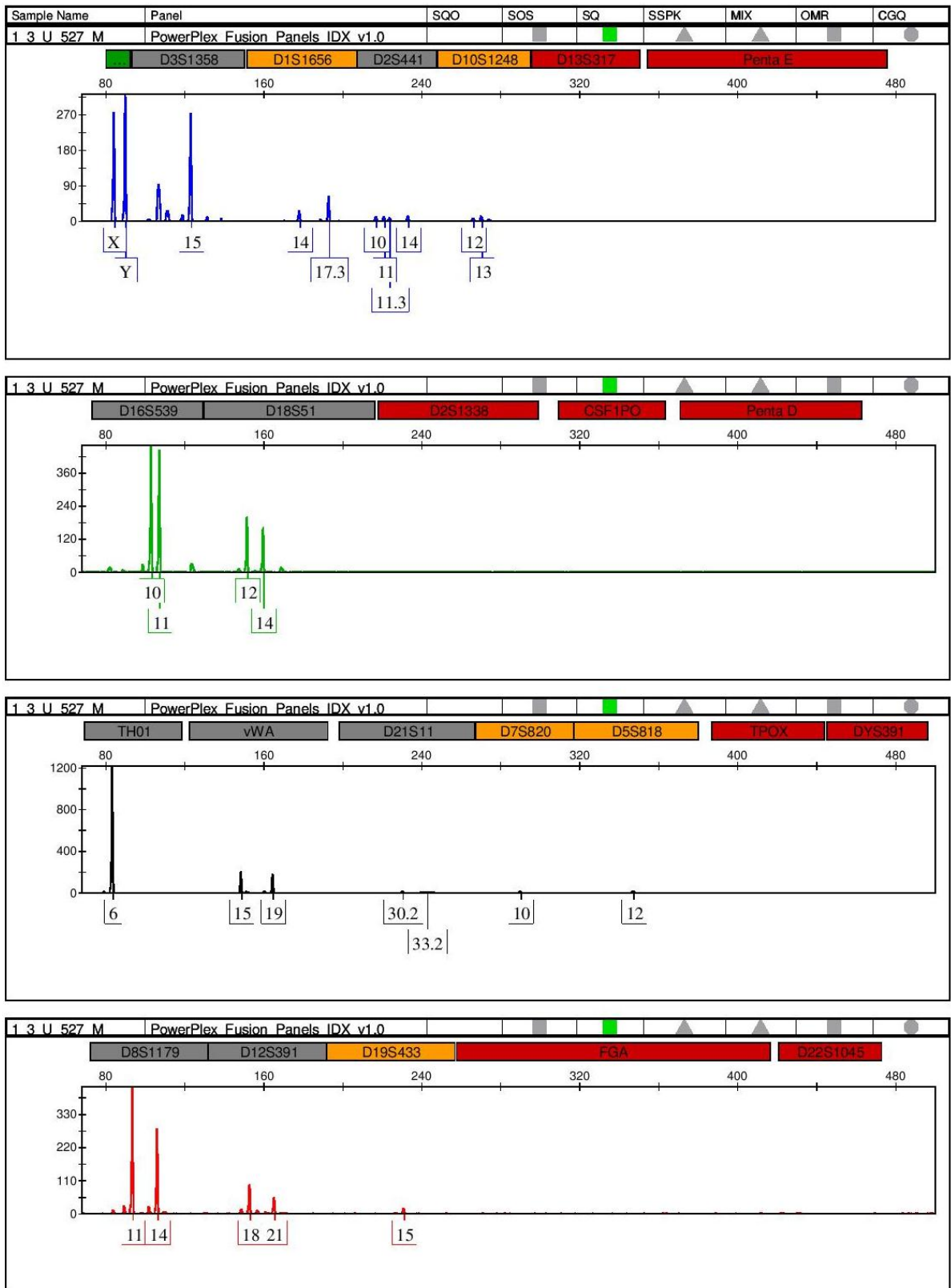
Usporedbom dobivenih DNA profila bili smo u mogućnosti usporediti jedino profile muškarca u dobi između 45 i 55 godina i djeteta u dobi između 1 i 2 godine, oboje bez

deformacije na lubanji (Tablica 8). Od 23 prisutna lokusa 14 ih je bilo usporedivih (potreban barem jedan prisutan alel na danom lokusu). Od tih 14 alela četiri se nisu poklapala (lokusi na alelima D1S1656, D18S51, D21S11, D8S1179). Uzimajući u obzir pravilo isključenja koje kaže da je dovoljna nepodudarnost u 3 lokusa kako bi se mogla isključiti mogućnost očinstva, možemo zaključiti da analizirani muškarac nije otac analiziranom djetetu. Za utvrđivanje drugih oblika srodstva nema dovoljno podataka. Za utvrđivanje bilo kakvog srodstva u analiziranim primjercima osim navedenog, nismo dobili dovoljno podataka.

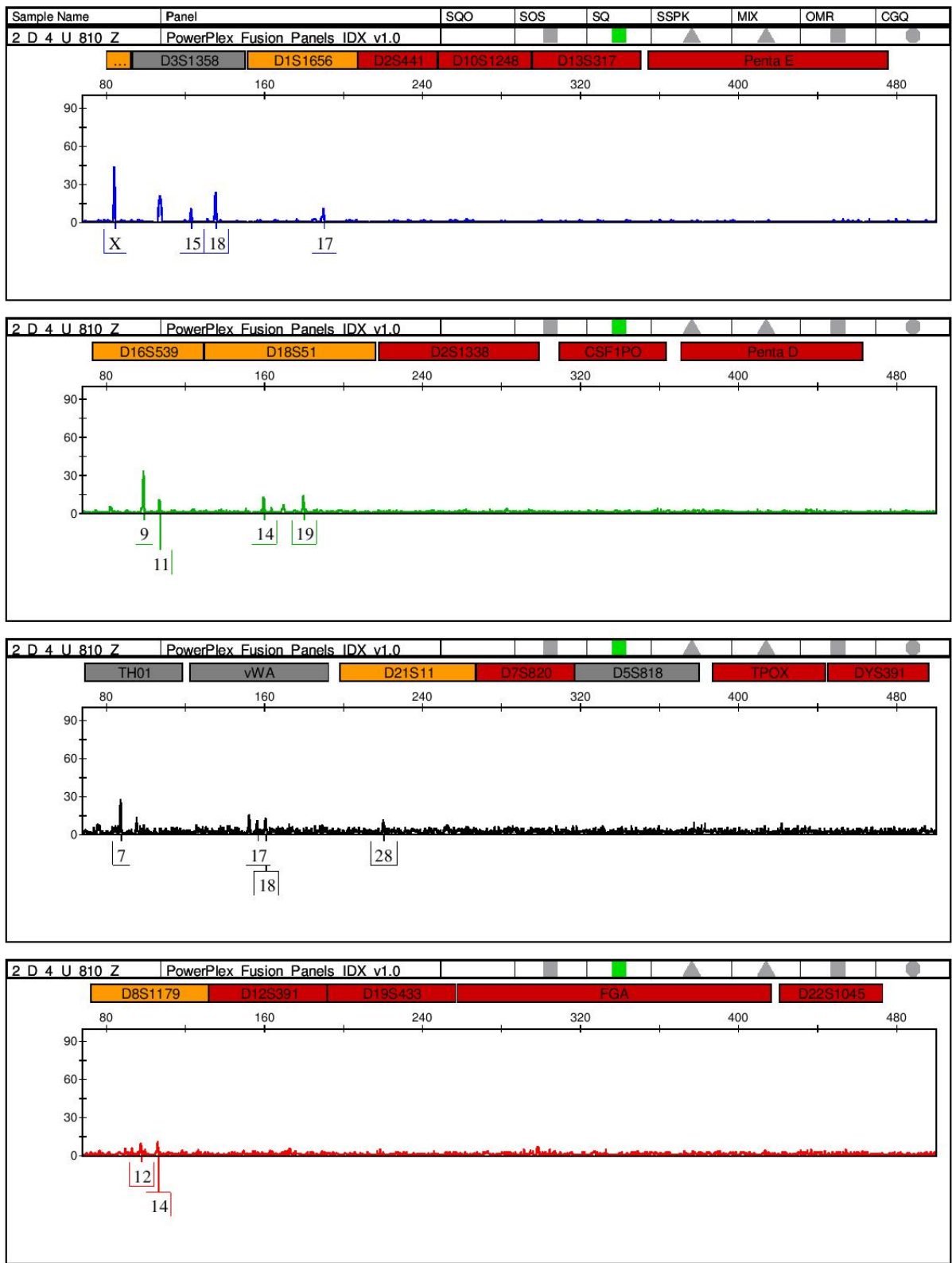
Amelogeninski lokus djeteta U – 859 sadrži alele X i Y te smo time ustvrdili da se radilo o dječaku. Kod drugog analiziranog djeteta (U – 821) nije došlo do umnožavanja alela amelogeninskog lokusa stoga ne možemo znati koje je ono bilo spola.

Tablica 8 Usporedba alela analiziranog muškarca (U – 527) i djeteta (U – 859) na STR lokusima *PowerPlex® Fusion* (Promega)

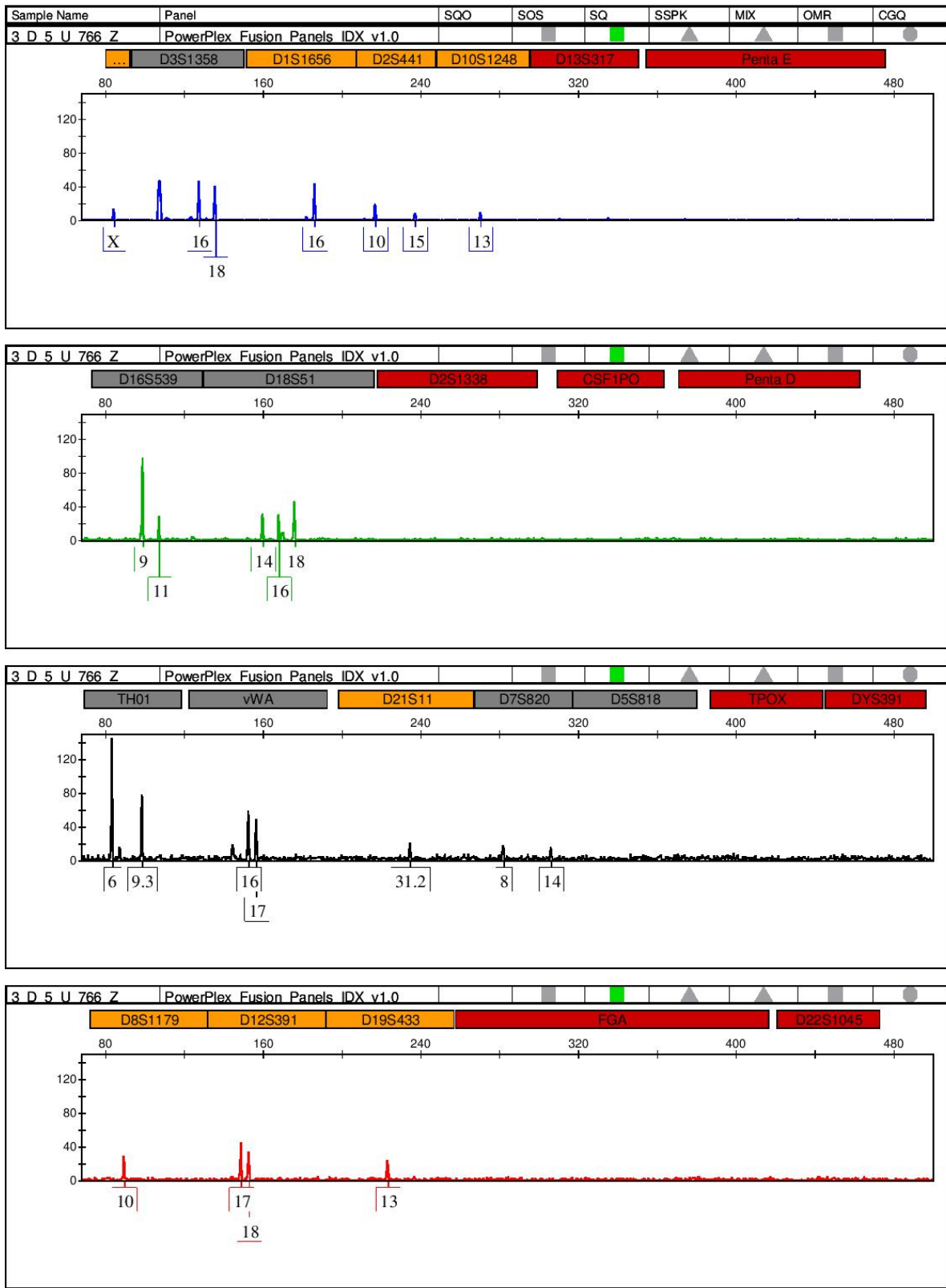
Lokus	U - 527 (muškarac)	U - 859 (dijete)	zajednički alel
amelogenin	X, Y	X, Y	
D3S1358	15, 15	15, 18	15
D1S1656	14, 17.3	12, 16	/
D2S441	<b>10, 11, 11.3, 14</b>	11, 14	11, 14
D10S1248	12, 13	13, 15	13
D13S317	/	9, 12	
Penta E	/	<b>7, 11, 13</b>	
D16S539	10, 11	11, 13	11
D18S51	12, 14	13, 19	/
D2S1338	/	<b>16, 17, 19, 25</b>	
CSF1PO	/	9, 11	
Penta D	/	9, 11	
TH01	6, 6	6, 7	6
wWA	15, 19	<b>15, 16, 18</b>	15
D21S11	30.2, 33.2	28, 30	/
D7S820	10,	8, 8	
D5S818	12,	12, 13	12
TPOX	/	9, 11	
DYS391	/	/	
D8S1179	11, 14	13, 16	/
D12S391	18, 21	<b>19, 21, 23</b>	21
D19S433	15,	13, 14	
FGA	/	18, 20	
D22S1045	/	15, 16, 17	



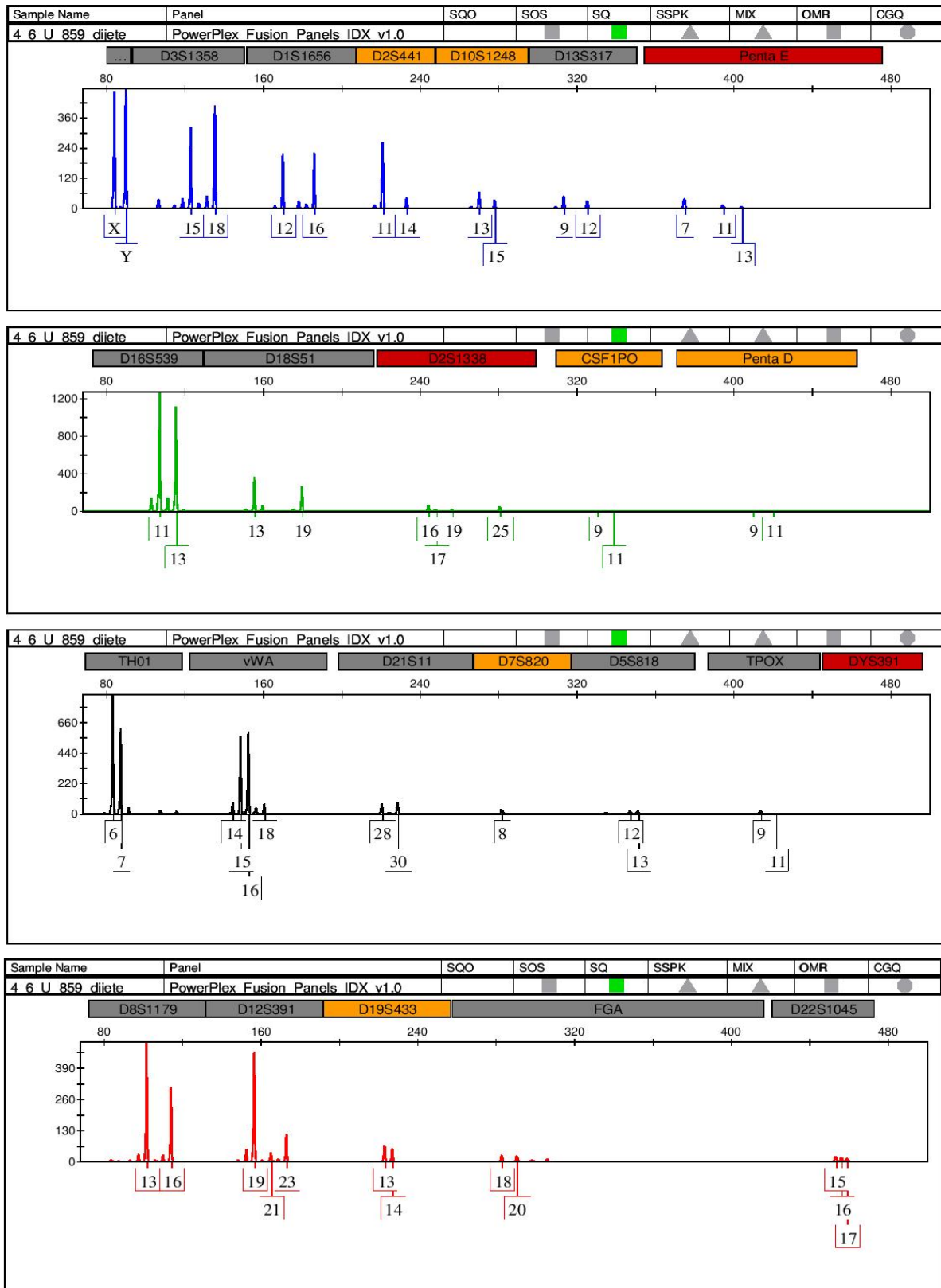
**Slika 39.** Parcijalni DNA profil muškarca s nalazišta AN10A NČ – JASA u dobi između 45 i 55 godina dobiven *PowerPlex® Fusion (Promega)* iz praha pužnice uha



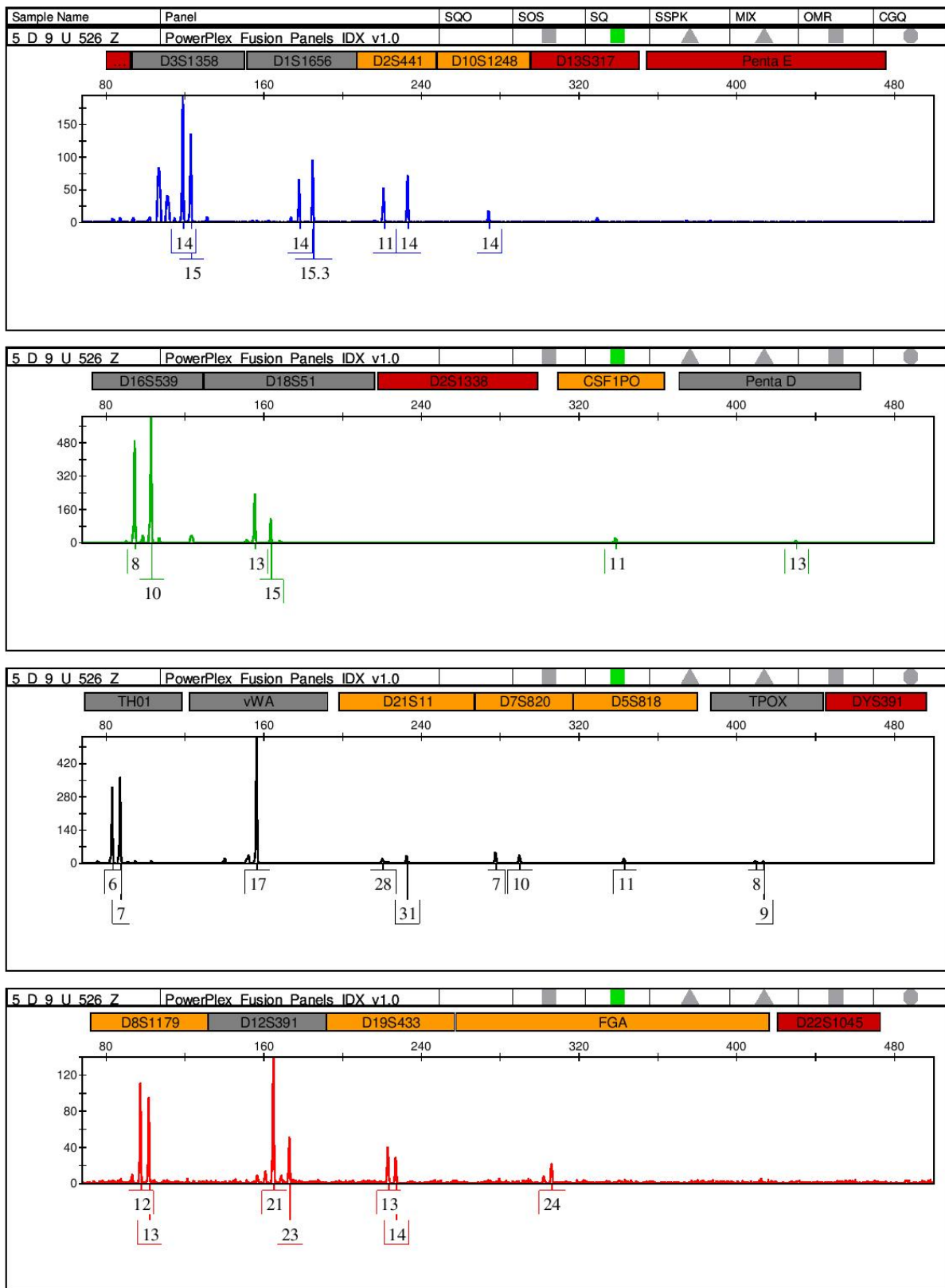
Slika 40. Parcijalni DNA profil žene s nalazišta AN10A NČ – JASA u dobi između 18 i 25 godina dobiven PowerPlex® Fusion (Promega) iz praha pužnice uha



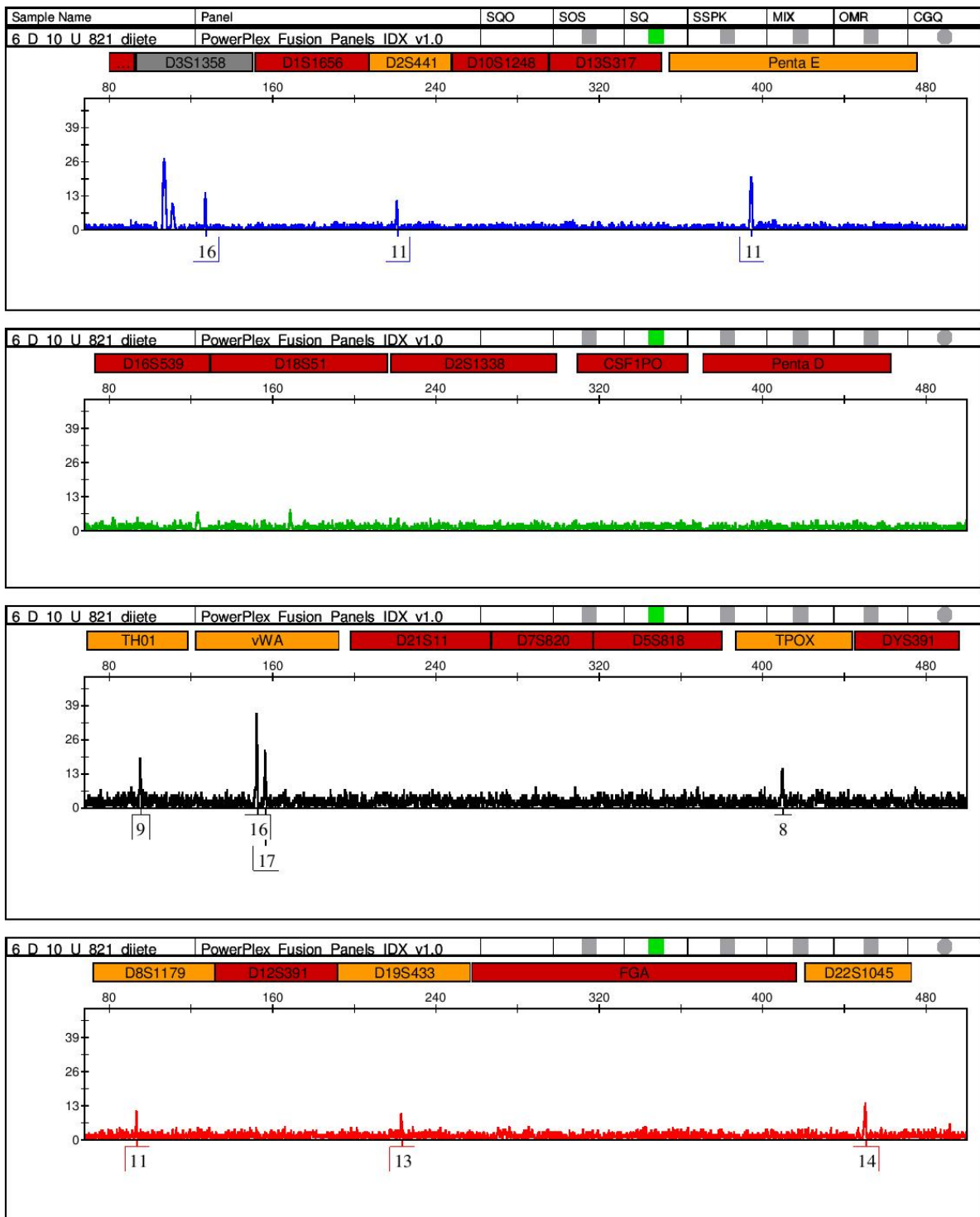
**Slika 41.** Parcijalni DNA profil žene s nalazišta AN10A NČ – JASA u dobi između 15 i 17 godina dobiven *PowerPlex® Fusion (Promega)* iz praha pužnice uha



Slika 42. Parcijalni DNA profil djeteta s nalazišta AN10A NČ – JASA u dobi između 1 i 2 godina dobiven *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion (Promega)* iz praha pužnice uha



Slika 43. Parcijalni DNA profil žene s nalazišta AN10A NČ – JASA u dobi između 30 i 40 godina dobiven *PowerPlex® Fusion (Promega)* iz praha pužnice uha



Slika 44. Parcijalni DNA profil djeteta s nalazišta AN10A NČ – JASA u dobi između 6 i 7 godina dobiven *PowerPlex® Fusion (Promega)* iz praha pužnice uha



## 4. RASPRAVA

Morfološkom analizom skeletnih ostataka jedanaestero Ostrogota s nalazišta AN10A NČ – JASA kod šestoro osoba utvrđena je deformirana lubanja. Lubanje su deformirane trima od četiriju osnovnih metoda koje su ustvrdili Dembo i Imbelloni 1938 godine (Molnár i sur., 2014). Za lubanje žene koja je u trenutku smrti imala između 18 i 25 godina i muškarca u dobi između 30 i 35 godina pokazalo se da su deformirane *circular erect* tipom deformacije. Tip deformacije prisutan kod lubanje muškarca u dobi između 30 i 40 godina je *tabular erect*, dok lubanja žene koja je umrla u starosti između 30 i 40 godina pripada *circular oblique* tipu. Kod ženske osobe starosti između 15 i 17 godina i djeteta koje je umrlo u dobi od 6 ili 7 godina izgled lubanje upućuje na prisutnu deformaciju, ali nedostatak skeletnog materijala onemogućuje određivanje tipa deformacije. Ove metode u skladu su s već utvrđenima tipovima deformacije iz prijašnjih analiza umjetno deformiranih lubanja pronađenim na euroazijskom području. U radu Molnár i sur. (2014) morfološki je analizirano 9 umjetno deformiranih lubanja s područja Panonije te se pokazalo da su prisutni tipovi deformacije bili upravo oni kojima su deformirane lubanje Ostrogota analiziranih u ovom radu na temelju čega se može zaključiti da one pripadaju jednoj od utvrđenih faza ovoga rituala na euroazijskom području. Sveukupno je utvrđeno šest takvih osnovnih faza umjetno deformiranih lubanja ovisno o mjestu pronalaska (Molnár i sur. 2014). Skeletni ostaci obrađeni u ovom radu pripadaju tzv. skupini dunavskog bazena koja obuhvaća pronalaska područja središnje Europe. Centar ove skupine predstavljaju mađarska nalazišta koja broje više od 200 pronađenih lubanja deformiranih metodama opisanima u ovom radu. Osim ostrogotskih, deformirane lubanje koje datiraju iz petog, šestog stoljeća (tzv. hunsko – germanski period) s područja panonskog bazena pronađene su i kod pripadnika naroda poput Sarmatinaca, Alana, Gepida. Zaključci doneseni proučavanjem faza deformiranih lubanja euroazijskog područja idu u prilog teoriji da je ritual naslijeđen od Huna s obzirom da mjesta pronalazaka odgovaraju njihovim migracijskim rutama na putu iz Azije prema Europi.

Većina patoloških promjena na kostima utvrđena na analiziranim skeletnim ostacima karakteristična je za populacije toga vremena. Naznaka *osteochondritis dissecans* izrazito je zanimljiva s obzirom da se ova bolest ne javlja često, a za njen razvoj postoji pretpostavljena genetska predispozicija (Andrew i sur. 1981). Litičke lezije utvrđene kod muškarca u dobi između 30 i 40 godina i kod žene u dobi od 15 i 17 godina, oboje s prisutnom deformacijom lubanje mogle bi biti rezultat ove bolesti. Ovakvo otkriće išlo bi u prilog teoriji o međusobnom srodstvu pojedinaca s umjetno deformiranom lubanjom, no izgled uočenih lezija

nije dovoljno specifičan stoga se na temelju njih ne može tvrditi da je bolest uistinu bila prisutna. U slučaju *osteochondritis dissecans* bilo bi potrebno molekularno – genetičkim metodama odrediti je li se bolest javila sporadično ili je naslijeđena. Naime, u slučaju genetičke pozadine nastanka bolesti prisutna je mutacija na genu ACAN koji kodira za agrekan – najvažniji proteoglikan u međustaničnoj tvari te zajedno s ostalim proteoglikanima predstavlja dio osnovne tvari vezivnog tkiva (Gu i sur. 2013). S obzirom da se radi o drevnoj DNA, pitanje je bilo moguće umnožiti točno taj dio genoma. Zanimljivo je da ovaj gen pripada u VNTR – ove, a kod mutacije za koju se zaključilo da uzrokuje *osteochondritis dissecans* prisutan je manji broj ponavljanja sljedova od normalnog stoga bi se mutacija mogla utvrditi korištenjem tehnike poput RFLP-a.

Rezultati izolacije DNA vizualizirani na elektroforetskom gelu nisu bili zadovoljavajući. Ovakav ishod rezultat je same degradiranosti drevne DNA koja kod korištenja PCR metode može onemogućiti umnožavanje nekih njenih dijelova ili čak potpunu odsutnost ciljanih fragmenata u samoj nukleinskoj kiselini (Fernandes i sur. 2017). Kao što se moglo vidjeti u rezultatima spektrofotometrije, u uzorcima je bila prisutna određena količina spojeva koji kontaminiraju DNA. Također, veliki problem u provedbi ekstrakcije predstavlja neadekvatnost klasičnih laboratorija za rad s drevnom DNA što navodi na zaključak da je njenu izolaciju, uz sav oprez koji se može pružiti u klasičnom laboratoriju, ipak potrebno provesti u za to specijaliziranom laboratoriju.

Utvrđivanje srodstva usporedbom STR lokusa *PowerPlex<sup>®</sup> Fusion (Promega)* kitom odbacilo je mogućnost da je muškarac u dobi između 45 i 55 godina otac djetetu u dobi između jedne i dvije godine (oba pojedinca nisu imala deformaciju lubanje). Također, pokazalo se da se radi o djetetu muškog spola, što nije bilo moguće dokazati morfološkom analizom s obzirom da razlike u građi kostura između spolova nisu izražene kod djece. Zbog premalog broja umnoženih STR lokusa nije bilo moguće odrediti drugi oblik srodstva kod navedenih pojedinaca niti ikakav oblik srodstva između bilo koje druge analizirane osobe. Analiza STR lokusa adekvatna je metoda u ispitivanju srodstva živućih pojedinaca, no zbog oštećenja drevne DNA koja uvelike utječe na rezultate dobivene njenom provedbom nije prikladna kod istraživanja ovoga tipa (Fernandes i sur. 2017). DNA fragmenti dobiveni iz ljudskih ostataka male su duljine (često između 30 i 70 pb), što u kombinaciji s inhibitorima PCR reakcije (prisutnima u oštećenoj DNA) onemogućuje dobivanje adekvatnih rezultata. Nedostatak STR analize kao i ostalih analiza koje koriste PCR može se nadvladati uporabom sekvenciranja nove generacije u kojima nije potreba uporaba PCR uređaja. Ovakav tip

sekvenciranja koristi se pri analizi jednonukleotidnih polimorfizama (SNP, eng. *single nucleotid polymorphism*) koji za razliku od proučavanja STR lokusa daje izrazito dobre rezultate (Butler i sur. 2007). SNP – ovi su varijacije u DNA sljedovima koje se javljaju kada je jedan nukleotid u slijedu različit od onoga koji je određen kao norma u ljudskoj populaciji i javljaju se u više od 1% ljudske populacije. Mutacije SNP – ova su vrlo rijetke, stoga oni više – manje nepromijenjeni prelaze iz generacije u generaciju obitelji. SNP – ovi se javljaju otprilike svakih 100 do 300 baza kroz cijelu dužinu ljudskog genoma (ukupno ih je oko 30 milijuna u jednom genomu). U istraživanju ovog tipa potrebno je analizirati veći broj jednonukleotidnih polimorfizama kako bi se dobio specifični DNA profil. DNA za SNP analizu obično se priprema stvaranjem DNA proba, odnosno željeni fragmenti DNA su pocijepani određenim restriktivnim enzimima te zatim stavljeni u istovjetne vektore s tim da jedan vektor sadrži samo jedan fragment DNA. Do umnožavanja dolazi stavljanjem vektora u organizam domaćina nakon čega može doći do analize polimorfizama. Ovakva metoda korištena je u proučavanju genomske uzorka europske populacije u prošlosti (pojedinci koji su živjeli između 6500 i 300 pr.n.e.). 163 od 230 uzoraka analizirano je upravo ovom metodom i pokazalo je vidno bolje rezultate od bilo koje druge korištene tehnike provedene na drugim uzorcima (Mathieson i sur. 2015).

## 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu morfološki je analizirano 11 Ostrogota na temelju čega im je određena spol, dob te prisutnost patoloških promjena ili traumi. Uz navedeno utvrđena je prisutnost ili odsustvo deformacije lubanje pri čemu se pokazalo da je ona prisutna kod šest osoba. Na temelju analize deformacija bilo je moguće utvrditi da one pripadaju trima tipovima: *tabular erect*, *circular erect* i *circular oblique*. Ovi rezultati podudarni su sa prijašnjim istraživanjima deformiranih lubanja u području panonskog bazena što analizirane primjerke Ostrogota stavlja u 3. skupinu razvoja umjetno deformiranih lubanja područja Euroazije – skupinu dunavskog bazena.n

Analizom STR lokusa nije bilo moguće dokazati srodstvo pojedinaca, osim djelomično u slučaju muškaraca u dobi između 45 i 55 godina i djeteta u dobi između jedne i dvije godine u kojem je isključena mogućnost da je muškarac otac djeteta. Razlog slaboj uspješnosti analize je neadekvatnost klasičnih laboratorija za rad s drevnom DNA kao i sama oštećenost DNA kod koje uvijek postoji mogućnost da su ciljani fragmenti previše oštećeni za ikakvu analizu.

Drevna DNA izrazito je zanimljiva kako s biološkog tako i s antropološkog gledišta. Njena analiza dovela je do značajnog napretka na području evolucijskih, populacijskih te antropoloških istraživanja. Daljnji napredak i dostupnost molekularno – genetičkih metoda prilagođenih za rad s drevnom DNA dovesti će do veće iskoristivosti oštećenog genomske materijala u istraživanjima što će omogućiti nova saznanja vezana za prošlost živih organizama i njihovu evoluciju, kao i povijesna i populacijska istraživanja.

## 6. LITERATURA

Alaeddini, R., Walsh, S. J., Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—A review. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), 148-157.

Andrew TA, Spivey J, Lindebaum RH. Familial osteochondritis dissecans and dwarfism. *Acta Orthop Scand*. 1981 Oct;52(5):519-23.

Bansal, A., Shetty, D., Bindal, R., Pathak, A. (2012). Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(3), 395.

Benecke, M. (2002). Coding or non-coding, that is the question: Having solved the last technical hurdles to extract DNA information from virtually any biological material, forensic biologists now have to ponder the ethical and social questions of using information from exonic DNA. *EMBO reports*, 3(6), 498-502.

Biscotti, M. A., Olmo, E., Heslop-Harrison, J. S. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23(3), 415-420.

Brooks, S., Suchey, J. M. (1990). Skeletal age determination based on the os pubis: A comparison of the Acsádi-Nemeskéri and Suchey-Brooks methods. *Human Evolution*, 5(3), 227-238.

Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., Sjögren, U. (2013). DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. *Journal of Endodontics*, 39(2), 211-216.

Brundin, M., Figdor, D., Sundqvist, G., Sjögren, U. (2013). DNA Binding to Hydroxyapatite: A Potential Mechanism for Preservation of Microbial DNA. *Journal of Endodontics*, 39(2), 211-216.

Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Burlington, MA: Elsevier Academic Press.

Butler, J. M. (2012). *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*. Waltham, MA: Elsevier/Academic Press.

Butler, J. M., Coble, M. D., & Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 3(3), 200-205.

Cooper, M. E., Thallas, V., Forbes, J., Scalbert, E., Sastra, S., Darby, I., Soulis, T. (2000). The cross-link breaker, N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular advanced glycation end-product accumulation. *Diabetologia*, 43(5), 660-664.

Dabney, J., Knapp, M., Glocke, I., Gansauge, M., Weihmann, A., Nickel, B., . . . Meyer, M. (2013). Complete mitochondrial genome sequence of a Middle Pleistocene cave bear

reconstructed from ultrashort DNA fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15758-15763.

Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Finarelli, J. A., Byrne, J., Connolly, E., . . . Carlsson, J. (2017). The Identification of a 1916 Irish Rebel: New Approach for Estimating Relatedness From Low Coverage Homozygous Genomes. *Scientific Reports*, 7, 41529.

Gamba, C., Jones, E. R., Teasdale, M. D., Mclaughlin, R. L., Gonzalez-Fortes, G., Mattiangeli, V., . . . Pinhasi, R. (2014). Genome flux and stasis in a five millennium transect of European prehistory. *Nature Communications*, 5, 5257.

Gu, J., Guan, F., Guan, G., Xu, G., Wang, X., Zhao, W., . . . Yan, J. Gu, J., Guan, F., Guan, G., Xu, G., Wang, X., Zhao, W., . . . Yan, J. (2013). Aggrecan Variable Number of Tandem Repeat Polymorphism and Lumbar Disc Degeneration. *Spine*, 38(25).

Hofreiter, M., Serre, D., Poinar, H. N., Kuch, M., Pääbo, S. (2001). Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 353-359.

Jacobs, A. L., Schär, P. (2011). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*, 121(1), 1-20.

Jacobs, A. L., Schär, P. (2011). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma*, 121(1), 1-20.

Jones, D., Brace, C. L., Jankowiak, W., Laland, K. N., Musselman, L. E., Langlois, J. H., . . . Symons, D. (1995). Sexual Selection, Physical Attractiveness, and Facial Neoteny: Cross-cultural Evidence and Implications [and Comments and Reply]. *Current Anthropology*, 36(5), 723-748.

Ko, Y., Susztak, K. (2013). Epigenomics: The Science of No-Longer-Junk DNA. Why Study it in Chronic Kidney Disease? *Seminars in Nephrology*, 33(4), 354-362.

Ko, Y., Susztak, K. (2013). Epigenomics: The Science of No-Longer-Junk DNA. Why Study it in Chronic Kidney Disease? *Seminars in Nephrology*, 33(4), 354-362.

Koziel S., Kretschmer W., Pawlowski B. (2010) Tattoo and piercing as signals of biological quality. *Evolution and Human Behavior* 31: 187-192

Krogman, W.M. i I Isçan, M.Y. (1986). *The Human Skeleton in Forensic Medicine*. Springfield: Charles C. Thomas

Lodish, H. F. (2000). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman.

Lovejoy, C. O., Meindl, R. S., Pryzbeck, T. R., Mensforth, R. P. (1985). Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: A new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1), 15-28.

- Mathieson, I., Lazaridis, I., Rohland, N., Mallick, S., Patterson, N., Roodenberg, S. A., . . . Reich, D. (2015). Genome-wide patterns of selection in 230 ancient Eurasians. *Nature*, 528(7583), 499-503.
- Molnár, M., János, I., Szűcs, L., Szathmáry, L. (2014). Artificially deformed crania from the Hun-Germanic Period (5th–6th century ad) in northeastern Hungary: historical and morphological analysis. *Neurosurgical Focus*, 36(4).
- Ortner, D. J., Putschar, W. G. (1981). Identification of pathological conditions in human skeletal remains. Washington: Smithsonian Institution Press.
- Pääbo, S., Poinar, H., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., . . . Hofreiter, M. (2004). Genetic Analyses from Ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 645-679.
- Panneerchelvam, S., Norazmi, M. N. (2003). Forensic DNA Profiling and Database. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 10(2), 20–26.
- Phenice, T. W. (1969). A newly developed visual method of sexing the os pubis. *American Journal of Physical Anthropology*, 30(2), 297-301.
- Pinhasi, R., Fernandes, D., Sirak, K., Novak, M., Connell, S., Alpaslan-Roodenberg, S., . . . Hofreiter, M. (2015). Optimal Ancient DNA Yields from the Inner Ear Part of the Human Petrous Bone. *Plos One*, 10(6).
- Primorac, D. (2008). Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada.
- Rich, J., Ogryzko, V. V., Pirozhkova, I. V. (2014). Satellite DNA and related diseases. *Biopolymers and Cell*, 30(4), 249-259.
- Rohland, N., Hofreiter, M. (2007). Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nature Protocols*, 2(7), 1756-1762.
- Shapiro, B. A., Hofreiter, M. (2012). Ancient DNA: methods and protocols. New York: Humana Press.
- Shved, N., Haas, C., Papageorgopoulou, C., Akguel, G., Paulsen, K., Bouwman, A., . . . Rühli, F. (2014). Post Mortem DNA Degradation of Human Tissue Experimentally Mummified in Salt. *PLoS ONE*, 9(10).
- Šlaus, M. (2006). Bioarheologija: demografija, zdravlje, traume i prehrana starohrvatskih populacija. Zagreb: Školska knjiga.
- Ugarkovic, D. (2005). Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO reports*, 6(11), 1035-1039.
- Weir BS. (1992) Population genetics of DNA profiles. *J Forensic Sci* 1993;33:218-25

Willerslev, E., Cooper, A. (2005). Review Paper. Ancient DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1558), 3-16.



## 7. ŽIVOTOPIS

### Osobne informacije

Datum i mjesto rođenja: 15. 5. 1992., Rijeka

### Obrazovanje

Osnovna škola (1999. – 2007.)

Osnovna škola Brajda, Rijeka

Srednja škola (2007. – 2011.)

Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka, Rijeka

Prirodoslovno – matematički smjer

Prediplomski studij (2011. – 2014.)

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb – Biološki odsjek

Naziv dodijeljene kvalifikacije: univ. bacc. biol.

Naslov završnog rada: Neuroendokrina kontrola roditeljskog ponašanja

Diplomski studij (2014. - )

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb – Biološki odsjek

Eksperimentalna biologija – Fiziologija i imunobiologija

### Osobne vještine

Vladanje engleskim jezikom

Komunikativnost, odgovornost, samostalnost u radu

IT vještine (Microsoft Office, programski jezik Pascal)

### Dodatne informacije

Odrađena laboratorijska praksa u laboratoriju za molekularnu neuropsihijatriju na Institutu Ruđer Bošković

Volonterstvo na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u projektu pod vodstvom prof. dr. sc. Aleksandre Sindić

Volonterstvo u Antropološkom centru (Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti)

## **8. PRILOZI**

Prilog 1. Usporedba umnoženih lokusa između pojedinaca