

اثبات نسب بین دختر و استخوان اسکلت مادر با روش‌های تشخیصی ژنتیک مولکولی

● مهسا آذری

کارشناس باستان‌شناسی، بخش باستان‌شناسی،
دانشکده ادبیات و علوم انسانی، دانشگاه تربیت
مدرس، تهران، ایران



● دکتر داریوش فرهود

متخصص ژنتیک، دانشکده بهداشت، دانشگاه
علوم پزشکی تهران، گروه علوم پایه/اخلاق،
فرهنگستان علوم پزشکی ایران، کلینیک
ژنتیک، تهران، ایران



farhud@tums.ac.ir

● هاجر آراین

کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، کلینیک ژنتیک

● عاطفه محرابی

کارشناس ارشد ژنتیک مولکولی، کلینیک
ژنتیک، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه
آزاد اسلامی/واحد تهران پزشکی، تهران، ایران



□ مقدمه

علم ژنتیک، دانشی بسیار ارزشمند برای تمام دوره‌ها است. به وسیله فناوری‌های این رشته ما به حقیقت ماجرا پی می‌بریم، از این رو پیشرفت در این حوزه، نتایج درخشان و اطمینان بخش تری خواهد داشت. علم ژنتیک در حوزه‌هایی با عنوان تعیین هویت، پزشکی قانونی، باستان‌شناسی و تشخیص بیماری‌ها کارکرد بسیار مطلوبی دارد. بنابراین محدودیت زمانی برای استفاده از داده‌های موجود در این حوزه وجود ندارد. امروزه ما حتی شاهد نتایج صحیح با درصد بالا از مطالعات ژنتیک باستان‌شناسی بر روی بقایای انسانی به دست آمده، در بخش‌های مختلف ایران مانند بانوی ۷ هزار ساله (کاوش خیابان مولوی تهران) (۲-۱)، بقایای مربوط به ایلام میانی (۴-۳) و گورستان عصر آهن مسجد کبود تبریز هستیم (۶-۵). آگاهی از تاریخ و تمدن با استفاده از متون و بناهای تاریخی به همراه اطلاعات کسب شده از بقایای انسان باستانی به عنوان مدرک و شواهد روزگار خود، بسیار حائز اهمیت است و موجب افزایش اطلاعات تاریخی برای تاریخ دانان می‌شود؛ و به نوعی گنجینه‌های یک کشور به حساب می‌آیند.

□ چکیده

در این مقاله از اهمیت وجود علم ژنتیک در زندگی و جوامع امروزی و میزان کمک رسانی این دانش به ما بدون محدودیت زمانی بحث شده است. برای ملموس بودن این مبحث به تشریح یک نمونه آزمایش ژنتیکی در ارتباط با مراجعه کننده به کلینیک ژنتیک، مربوط به سال ۱۳۹۹ پرداخته شده است. فرد مراجعه کننده خواستار آزمایش‌های ژنتیک با استفاده از خون خود و بخشی از استخوان یک فرد فوت شده بود، چرا که فرد مادر خود را از کودکی گم کرده بود و شواهد متوفی نشان از مادرش را داشته و در نهایت برای از بین رفتن شک و تردید، مراجعه کننده خواستار آزمایش تعیین هویت شده بود. نتایج آزمایش‌ها و مقایسه مارکرهای به دست آمده نشان داد نمونه استخوان با نمونه فرد مراجع همخوانی داشته و متعلق به مادر وی می‌باشد. به همین صورت از اطلاعات ماده ژنتیکی پس از حتی گذشت سالیان متمادی می‌توان اطلاعات کمک کننده‌ای را به دست آورد.

کلید واژه: آزمایش ژنتیک مولکولی، DNA استخوان اسکلت، تعیین هویت، پزشکی قانونی

اطمینان فرزند درخواست تعیین هویت با استفاده از آزمایش ژنتیک با قطعه ایی از استخوان جسد مربوطه ارائه شد.

نحوه انجام آزمایش

برای تعیین هویت در این مطالعه از آزمایش‌های مولکولی PCR و MLPA استفاده شده است. این مطالعه با استفاده از بخشی از استخوان لگن جسد فرد مجهول الهویه و خون مراجعه کننده صورت گرفته است. فارغ از قدمت نمونه مرحله پاکسازی در رسیدن به پاسخ بسیار کمک رسان مهمی است. بعد از مراحل پاکسازی عمل خرد کردن استخوان انجام می‌شود تا نتیجه دارای اشکال نباشد و ما بتوانیم به اصل DNA مورد نظر از استخوان برسیم. استخوان با دستگاه میکروتوم، تراش استخوانی داده شده و به ابعاد بسیار ریز تبدیل می‌شود. در مرحله بعد استخراج DNA با استفاده از کیت (QIAamp DNA Investigator Kit, QIAGEN, Germany) صورت گرفته و مرحله PCR توسط کیت (AmpFLSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit, Thermo Fisher, UK) انجام شده است؛ بعد از مرحله PCR مرحله الکتروفورز انجام گرفت که به موجب اطمینان و چک باند به دست آمده برای اجرا، توالی بر روی ژل آگارز امتحان شد. در نهایت تست MLPA (جداسازی با قطعات نشان دار) با استفاده از IRFiling Kit v2.2 صورت گرفت. در این آزمایش مارکرهای ژنتیکی خاص، (۱۶ مارکر) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت؛ قابل ذکر است که کیت‌های مورد استفاده در این آزمایش بسیار حساس بوده و توانایی تشخیص DNA با مقادیر پایین را نیز داشته‌اند. به کارگیری جدید و احتیاط، از ضروریات کار برای رسیدن به نتیجه صحیح است که باید رعایت شود تا به موجب آلودگی، نتیجه عکس به ما ندهد (۳). به طور مثال، DNA فرزند فرضی موجب آلودگی و نفوذ در جواب ما نشده باشد و جواب تنها مربوط به استخوان فرد مجهول باشد که بتوان با ضریب بالا از اطمینان، تطبیق را در مراحل بعد انجام دهیم.

نتایج و یافته‌ها

در روش تعیین هویت StR^1 ، محاسبه براساس میزان

استخراج اطلاعات با استفاده از DNA و بهره بردن از این دانش در حوزه تکامل و تاریخ بشر در چند دهه اخیر توسط پژوهشگران بسیار به کار رفته است.

ماده تشکیل دهنده محتوای ژنتیک انسان DNA دارای ساختار مارپیچ دوگانه است. دو نوع بر هم کنش وجود دارد که سبب پایداری مارپیچ DNA می‌شوند، مورد اول پیوندهای هیدروژنی می‌باشند و عامل بعدی نیروهای جفت بازها است (۷). به دست آوردن DNA فرد، پس از مرگ و حتی بعد از تجزیه شدن بقایا، از استخوان و یا از خاک ناحیه‌ای که بقایا در آن بوده است مقدور و امکانپذیر است؛ اما میزان سالم بودن و کمتر آسیب رسیدن به رشته‌های DNA بقایا به دو عامل بستگی دارد: ۱- میزان PH خاک (۳) که مربوط به مواد شیمیایی موجود در خاک بستر است و نباید فراتر از حد مقاومت DNA باشد. ۲- DNA در معرض حرارت بالا یا سوختگی با دمای بالا قرار نگرفته باشد. به همین دلیل امروزه ما شاهد مقالات متعدد در رابطه با به دست آوردن DNA نئاندرتال و نوع بیماری‌های مشابه با انسان امروزی هستیم (۸)؛ بنابراین کسب اطلاعات ژنتیکی حتی قدمتی فراتر از دوره تاریخی، مربوط به دوره پلئولیتیک و هولوسن در بر می‌گیرد که باعث شفاف سازی از نحوه تکامل و انواع بیماری‌های عفونی باستان به وسیله میکرو ارگانسیم‌های عفونت زای موجود در استخوان می‌شود (۹،۱۰). در نتیجه اطلاعاتی که ما می‌توانیم به منظور حل مسئله از DNA برداشت کنیم محدودیت زمانی ندارد. در این مقاله به یک مورد در ارتباط با استخراج DNA از استخوان پرداخته‌ایم تا به عنوان مثالی از اهمیت آزمایش‌های ژنتیکی در شفاف سازی و حل مشکلات باشد.

روش‌ها و ابزار مطالعه

شرح مورد

در سال ۱۳۹۹ فردی با مراجعه به کلینیک ژنتیک فرهود خواستار آزمایش تعیین هویت با استفاده از قطعه‌ای از استخوان شد. فرد مراجعه کننده سال‌ها از مادر خود بی‌اطلاع بود و در نهایت جسد دفن شده‌ای به عنوان جسد مادر ایشان معرفی شده بود. به علت شواهد ناکافی و عدم

1- Short Tandem Repeats



مولکول دارای ویژگی‌های متفاوت هستند یکی از مهم‌ترین کاربردهای آزمایش مولکولی برای تشخیص هویت، کشف روابط خانوادگی، تشخیص هویت اجساد سوخته و ... این حوزه حلال بسیاری از مشکلات و ادعاهای موجود در پزشکی قانونی است؛ چرا که این نوع آزمایش بسیار دقیق و با خطای پایین انجام می‌شود از آنجا که خصوصیات ژنتیکی فرد در همه سلول‌هایش وجود دارد، استفاده از این شیوه به پژوهشگران امکان می‌دهد با در اختیار داشتن یک قطعه مو، یک قطره خون، یک قطعه استخوان یا حتی آثار بزاق دهان یک فرد نسبت به شناسایی او اقدام کنند.

نمونه‌های قابل استفاده برای بررسی DNA در پزشکی قانونی خون و لکه‌های خون، دندان و استخوان، بزاق، ادرار و دیگر مایعات بیولوژیک، بافت و اندام، ناخن و مو هستند (۱۱).

DNA در تمام سلول‌های بدن وجود دارد. یکی از آسان‌ترین و بی‌خطرترین راه‌های دستیابی به سلول‌ها برای آزمایش DNA، استفاده از یک گوش پاک کن است که به وسیله آن می‌توان سلول‌های سطح داخلی مخاط دهان را به دست می‌آورد. سپس در آزمایشگاه، DNA از سلول‌ها جدا می‌شود و بخش‌های خاصی از آن مورد بررسی قرار می‌گیرد. این بخش‌های خاص می‌توانند ارتباطات فامیلی و خانوادگی بین افراد را نشان دهند و یا در تعیین هویت فرد مؤثر باشند.

دستیابی به اطلاعات چنین بررسی‌های مولکولی که مربوط به تشخیص هویت علی‌الخصوص از روی بازمانده‌های جسد می‌شود، مستلزم صرف زمان و انجام مراحل بیشتری است؛ چرا که راه دسترسی به اطلاعات جسد محدود است و تنها مورد قابل مطالعه که دارای DNA قابل بررسی باشد اغلب باقیمانده استخوان‌ها می‌باشد. در استخراج DNA از استخوان به شرط عبور از مرحله برش استخوان و شستشو، آلودگی زدایی مناسب، استفاده از محلول‌های ویژه وارد روال عادی استخراج شده و به مراحل آزمایشی معمول می‌رسیم. بنا بر فرآیند اشاره شده، کسب اطلاعات برای تعیین هویت از باقیمانده جسد در مقایسه با تعیین هویت دو فرد زنده زمانبر بوده و احتیاج به صبر و شکیبایی بیشتری دارد؛ مخصوصاً اگر مرحله پیش از آزمایش که مربوط به کسب

تکرار توالی نوکلئوتیدی و مقایسه با زنجیره‌های نوکلئوتیدی افراد دیگر صورت می‌گیرد. از آنجایی که هر فرد یک سری از کروموزوم‌های خود را از مادر و یک سری را از پدر می‌گیرد و میزان تکرار این واحدها در هر شخصی متفاوت از دیگری است، مشابهت تکرار واحدها تنها مربوط به افراد هم‌خانواده و دارای نسبت بسیار نزدیک می‌باشد. مارکرهای مورد بررسی این آزمایش، ۱۶ ناحیه ژنی از استخوان جسد و شخص درخواست دهنده را مورد بررسی و تطبیق قرار می‌دهد. در این مطالعه عدم تطابق بیش از یک مارکر از این ۱۶ مارکر، وجود نسبیت مادر-دختری را منتفی در نظر گرفته و وجود رابطه مادر-دختری بین دو فرد را رد شده اعلام می‌کند.

نتایج یافت شده پس از انجام آزمایش نشان داد که فاکتورهای ژنتیکی دو فرد اشاره شده کاملاً مشابه بوده، لذا نسبیت مادر و فرزندی نامبردگان تأیید می‌شود (به دلیل حفظ حریم خصوصی اشخاص از آوردن جدول اطلاعات اختصاصی مربوط به مارکرهای این دو شخص خودداری شده است). بنابراین فرزند به وسیله نتایج آزمایش مولکولی DNA توانست با اطمینان خاطر مادر خود را پیدا کند. وجود ۱۶ ناحیه برای تشخیص و مقایسه، مسئله را حل کرده و جایی برای شک و شبهه نمی‌گذارد، زیرا مارکرهای ثبت شده جهانی برای تعیین هویت به این حد یکسان تنها از پدر و مادر به فرزند منتقل می‌شود.

□ بحث

آزمایشی که در این مقاله شرح شد مربوط به تشخیص هویت از استخوانی است که توسط مراجعه کننده با عنوان فرزند فرضی آورده شده بود. مراحل استخراج DNA برای نمونه‌های امروزی و قدمت فراتر از عصر حاضر، گرچه یکسان است اما مقدار حرارت و محلول برای استفاده متفاوت است و دلیل آن، تفاوت میزان مقاومت در سلول و کروموزوم و توالی ژنومی است؛ بی‌شک هرچه قدمت بیشتر باشد، احتیاط بیشتری را می‌طلبد و امکان برداشت DNA به میزان اندک را موجب می‌شود. DNA تمام اطلاعات تعیین هویت را در خود دارد و می‌توان گفت هر فرد براساس اطلاعات ثبت شده روی این



بهبود از زمان مراحل آلودگی زدایی طی شود (۳). ما در این مقاله به یکی از مزایای علم ژنتیک اشاره کردیم؛ بی شک علوم مربوط به حوزه ژنتیک هم اکنون و با پیشرفت بیشتر در آینده به عنوان چراغ روشن کننده مسیر تاریخ مجهولات و مکتومات در رابطه با حوزه پزشکی قانونی، تعیین هویت و حتی رشته باستان شناسی برای افزودن آگاهی به محققان کمک رسانی می کنند و از جمله علوم ضروری برای زندگی بشر به حساب خواهند آمد.

مجوز و قانع کردن مجریان قانون برای اجازه انجام نبش قبر را هم در نظر بگیریم. نکته دیگری که باید در استخراج DNA توجه شود، انتخاب صحیح پرایمرها است (۸) تا اختصاصیت و حساسیت آزمایش بالاتر باشد و خسارت کمتری را موجب شود. نبود آلودگی در داده‌ها (داده بدون محدودیت زمانی) بسیار پر اهمیت است و ما را به حقیقت نزدیک تر می کند. بنابراین برای رسیدن به هدف در آزمایش، نیاز است از نبود آلودگی اطمینان حاصل کرده و از همان ابتدا به منظور استفاده

References:

- 1- Paknashad N, Mowlavi G, Camet JD, Jelodar ME, Mobedi I, Makki M, et al. (2016). Paleoparasitological evidence of pinworm (*Enterobius vermicularis*) infection in a female adolescent residing in ancient Tehran (Iran) 7000 years ago. *Parasites & vectors*;9(1):1-4.
- 2- Fugassa MH, Beltrame MO, Sardella NH, Civalero MT, Aschero C (2010). Paleoparasitological results from coprolites dated at the Pleistocene-Holocene transition as source of paleoecological evidence in Patagonia. *Journal of archaeological Science*;37(4):880-4.
- 3- Niknami K, Ramezani M (2017). An introduction to genetic archaeology. *The organization for researching and composing university textbooks in the Islamic sciences and the Humanities (SAMT)*. P: 169, 329.
- 4- Brandstätter A, Peterson CT, Irwin JA, Mpoke S, Koech DK, et al. (2004). Mitochondrial DNA control region sequences from Nairobi (Kenya): inferring phylogenetic parameters for the establishment of a forensic database. *International journal of legal medicine*;118(5):294-306.
- 5- Zandkarimi H, Bagherzadeh kasiri M, Ajorloo B, Omrani B (2015). Strontium Stable isotope analysis and trace elements Sr and Ba in the skeletons of the Iron Age cemetery of Blue Masque in Tabriz. *10.22059/IARCS.2015.57749*. P: 86-99.
- 6- Price TD, Burton JH. *An introduction to archaeological chemistry* (2010). Springer Science & Business Media. P: 73-126.
- 7- Abdolah S, Haghighi M, Aligholi H (2017). Physical and chemical properties of DNA Ligases. *Shefayekhatam*. P: 41-53.
- 8- D, Petrov DA (2018). Evidence that RNA viruses drove adaptive introgression between Neanderthals and modern humans. *Cell*, 175:360-371. e13.
- 9- Farhud D D, Azari M, Mehrabi A (2022). The History of coronavirus: From Neanderthals to Present. *Iran journal of Public Health*. P: 531-534.
- 10- Mays S (2010). *The archaeology of human bones*. Routledge. P: 202-490.
- 11- Lee HC, Ladd C, Scherzinger CA, Bourke MT (1998). Forensic applications of DNA typing: part 2 collection and preservation of DNA evidence. *The American journal of forensic medicine and pathology*;19(1):10-8.

