

POKUS O INTAKTNÍ VYZVEDNUTÍ KOSTERNÍCH POZŮSTATKŮ PRO ÚČELY GENETICKÝCH ANALÝZ

An attempt of excavation of human skeletal remains for palaeogenetic purposes

Eva Drozdová¹, Kateřina Boberová¹,
Kristýna Pížová¹, Josef Unger², Josef Duda²,
Lukáš Šín², Bohuslav Klíma³

¹Laboratoř biologické a molekulární antropologie,
Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika

²Ústav antropologie, Přírodovědecká fakulta,
Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

³Katedra historie, Pedagogická fakulta,
Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

Abstract

In the graveyards of Diváky-Padelky za humny (dating between 9th and 11th centuries AD) and Znojmo-Hradiste (Great Moravian period) an attempt has been made to extract the samples in so called sterile way for the purpose of genetic analysis.

In the research period during 2008 the exhumation of grave No. 160 in the graveyard of Diváky was carried out using this sterile method and afterwards the anthropological and genetic analysis of the skeletal remains was completed. The anthropological analysis showed that the skeleton was a female, aged between 24–30 years and this result was confirmed by the genetic analysis using the section of the SRY gene and analyzing the gene for amelogenin. Due to the fact that the method of exhumation at Diváky was both time-consuming and physically demanding and at the same time prevented the thorough documentation of the site, in 2009 a new method was used. Prior to the actual exhumation of the skeleton, one long bone was lifted from the grave using a sterile method and this proved to be a more suitable way because it did not interrupt the flow of the research. During the next research season of 2009 and 2010 this method was applied at both graveyards. The experiences at both Diváky and Znojmo show that this way of on-site preparation and laboratory processing of skeletal remains is more suitable in the lifting of bone tissue for genetic analysis.

Key words: *physical anthropology, palaeogenetics, human skeletal material, Old Slavonic period, Diváky, Znojmo Hradiště*

Úvod

V posledních deseti letech došlo k propojení do té doby poměrně vzdálených oborů, jako je molekulární biologie a genetik s antropologií a archeologií. Do antropologických analýz byly přejaty některé molekulárně biologické postupy. Techniky zkoumání historické DNA z kosterních pozůstatků, objevených při archeologických výzkumech, byly zdokonaleny do té míry, že v dnešní době je možné z kosterních vzorků starých až 100 000 let vyizolovat malé množství historické DNA, která je nositelem genetické informace (Ovchinnikov et al., 2000; Krings et al., 2000). Historická DNA nám může poskytnout téměř stejné informace o svém nositeli jako DNA recentního člověka. Zásadním problémem při analýze historické DNA je nebezpečí kontaminace právě současnou DNA, která se do následných enzymatických reakcí zapojuje mnohem ochotněji než málo kvalitní a fragmentovaná historická DNA. K pokusům

popisovaným v tomto článku nás inspirovala práce dánských badatelů (Melchior et al., 2008), kteří analyzovali autentické sekvence mitochondriální DNA z historických kosterních pozůstatků vykopaných na vikingském pohřebišti Galgedil, datovaném cca do 11. stol. n. l. Dánští badatelé se pokusili před vlastním genetickým výzkumem minimalizovat kontaminaci kostní tkáně recentní DNA už od začátku preparace kosterních pozůstatků.

Práce dánských badatelů (Melchior et al., 2008) byla podnětem pro vypracování metodiky vyzvednutí kosterních pozůstatků bez přímého dotyku lidské ruky, aplikované na naše podmínky.

Pro úspěšnou izolaci historické DNA z kosterních vzorků je nutné, aby byly v kostní tkáni zachovány buňky, ze kterých by bylo možné vyizolovat autentickou genetickou informaci a to buď z mitochondrií, buněčných organel, které se nacházejí v cytoplasmě a nesou tzv. vedlejší genom lidské buňky o délce pouze 16 569 bp a nebo z jádra buňky, kde se nachází vlastní genetická informace organismu, tvořená 46 molekulami DNA, které nazýváme chromozomy. Jeho velikost je $3,3 \times 10^9$ bp (Brdička, 2001; Snustad & Simmons, 2009).

Je všeobecně známo, že výzkum historické DNA z kosterních pozůstatků vymřelých populací naráží vždy na několik závažných problémů. Prvním problémem je stav zachovalosti autentické DNA v kostech, který je primárně ovlivněn podmínkami v zemi, kde byl uložen (složením půdy, vodními poměry, teplotou apod.), a stářím kosterních pozůstatků (čím déle od smrti jedince, tím méně DNA se zachová) a je téměř vždy špatný. DNA je degradována enzymatickými a chemickými procesy. Tato degradace začíná ihned po smrti organismu primárně buněčnou autolýzou a aktivitou mikroorganismů z vnějšího prostředí (čím menší je mikrobiální aktivita, tím je větší naděje, že se DNA zachová). Aktivita enzymů způsobuje fragmentaci DNA a tím dochází k redukci množství zachovalé DNA. Oxidační procesy opět způsobují fragmentarizaci řetězců a také modifikaci nukleotidů, hydrolytické reakce způsobují ztrátu aminokyselin, což opět způsobuje potíže při izolaci DNA (Donoghue, 2008). Fragmentarizace řetězců pak vede k tomu, že takto fragmentovaná DNA je neamplifikovatelná, tedy dále nepracovatelná, nebo ji lze zpracovávat jen s velkými obtížemi.

Druhým problémem, ještě závažnějším, je kontaminace historických kosterních pozůstatků současnou DNA, kterou každý člověk šíří neustále kolem sebe. Někteří autoři uvádějí (Melchior et al., 2008), že právě při preparaci a vyzvedávání kosterních pozůstatků dochází k největší kontaminaci recentní DNA, a tím ke znehodnocení kosterních vzorků pro genetické analýzy. Na kontaminaci kosterních pozůstatků recentní DNA se dále vydatně podílí i následné antropologické zpracování v laboratoři, kdy při čištění, rekonstrukci nebo při vlastní antropologické analýze se kosterních pozůstatků dotýká velké množství osob. Problémem je také skladování kosterních pozůstatků v depozitářích, které jsou často situovány ve sklepních nebo půdních prostorách, kde podmínky (teplota a vlhkost, prašnost) nejsou pro zachování historické DNA vhodné. Velmi rychle zde však také dochází k degradaci současnou DNA, která kosterní pozůstatky kontaminovala (Sampietro et al., 2006). Nemluvě o již dlouho vykopaných kosterních pozůstatcích, které byly v 60. a 70. letech 20. stol. chemicky ošetřovány – zpevňovány (prostoupeny chemickými látkami na akrylátové bázi) a tedy veškeré zbytky genetické informace byly zničeny. Z výše uvedených důvodů je nutné se problematikou vyzvedávání a nakládání s kosterními pozůstatky, u kterých se předpokládá genetický výzkum, zabývat.

Existuje konsensus, jak nakládat s kosterními pozůstatky při odběru vzorku v laboratoři před vlastním genetickým zpracováním (Cunha et al., 2000; Hummel, 2003; Sampietro et al., 2006; Donoghue, 2008; Vaňharová & Drozdová, 2008; Vaňha-

rová, 2011). Co však dělat přímo na lokalitě, abychom alespoň kontaminaci recentní DNA minimalizovali, když už nemůžeme zabránit poškození DNA vlivem vnějších podmínek prostředí, ve kterém jsou kosti uloženy? Pokusili jsme se o vyzvednutí kosterních pozůstatků tak, abychom zamezili jejich kontaktu s recentní DNA.

Metodika

K experimentu jsme vybrali dvě lokality: pohřebiště Diváky – Padělký za humny, datované do 9. až 11. století n. l., zkoumané v letech 2000 až 2009 Ústavem antropologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity ve spolupráci s Ústavem archeologické památkové péče Brno (Drozdová & Unger, 2005), a nově objevené pohřebiště ve Znojmě Hradišti, datované do středohradištního období (Klíma & Kratochvíl, 2009), zkoumané Katedrou historie Pedagogické fakulty Masarykovy univerzity. Na pohřebišti Diváky bylo vedle dokladů o osídlení v neolitu lidem s kulturou moravské malované keramiky, depotu tří nádobek kultury zvoncovitých pohárů, hrobu únětické kultury a několika žárových hrobů velatické kultury, dosud prozkoumáno 147 kostrových hrobů ze střední a mladší doby hradištní (Unger, 2005; Unger, 2006). Na pohřebišti ve Znojmě – hradišti datovaného do období Velké Moravy bylo dodnes objeveno více než 300 hrobů (Drozdová, 2011).

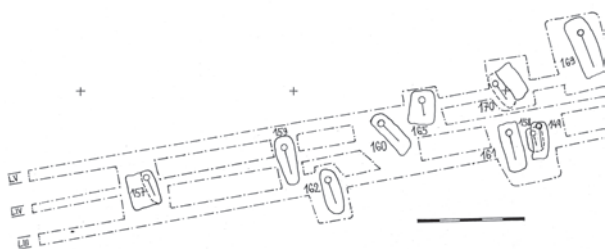
První část experimentu jsme provedli ve výzkumné sezóně 2008 na pohřebišti v Divákách v červenci (termín byl fixní, protože výzkum se konal pouze během července) (Obrázek 1). Naším cílem bylo vyzvednout kosterní pozůstatky z jednoho hrobu na pohřebišti (jednalo se o hrob 160, který byl náhodně vybrán), kosterní pozůstatky antropologicky zhodnotit a podrobit je genetické analýze – v našich podmínkách genetickému určení pohlaví. Nakonec popsat naše zkušenosti s tímto způsobem vyzvedávání kosterních pozůstatků, vyjádřit jeho klady a zápory. Druhá část experimentu proběhla v letní sezóně 2009. Ve Znojmě Hradišti v měsíci červenci a srpnu a v Divákách v červenci. Tentokrát bylo našim cílem modifikovat metodiku odběru vzorků pro genetické analýzy tak, abychom vyzvedli co nejvíce vzorků a co nejméně jsme zpomalili archeologický výzkum. Modifikace použité metodiky vycházela z našich zkušeností z předešlého roku.

a) Metodika terénního výzkumu

Postup použitý v roce 2008 na pohřebišti Diváky

K preparaci kosterních pozůstatků v terénu jsme použili běžně užívané preparační techniky. Bez použití ochranných pomůcek byl hrob odkrýván asi do 10 cm vrstvy zeminy nad vlastní kostrou. Jakmile byla vymezena hrobová jáma, byl hrob přikryt igelitovou plachtou a s odkrytím kostry se pokračovalo až následujícího dne.

Obrázek 1. Zkoumaná část pohřebiště Diváky – Padělký za Humny v roce 2008, s hrobem 160 (kresba M. Šodek)



Preparační tým se skládal ze tří členů (2 muži a 1 žena) a fotografa (žena) (Obrázek 2), který se na vlastní preparaci nepodílel. Všichni 4 členové experimentálního týmu byli oblečeni v ochranných oděvech a dalších pomůckách tak, aby byla eliminována možnost přenosu jejich DNA na preparované kosterní pozůstatky. Všichni byli oblečeni v ochranné kombinéze

MINTO 34778 s kapucí, na očích měli ochranné brýle Artilex Swiss Safety A. G., na ústech a nosu respirátor, běžně k dostání v prodejnách pracovních pomůcek. Ruce měli chráněny dvěma páry sterilních rukavic SEMPERMED® Natural Latex, na nohou měli igelitové návleky. Všechny ochranné pomůcky, kromě sterilně balených rukavic, byly sterilizovány UV zářením po dobu 20 minut z každé strany a poté uzavřeny do stejné vystylikované igelitové pytle a tento uložen do UV zářením vystylikované kartónové krabice s víkem, určené ke skladování kosterních pozůstatků (Obrázek 3). Nástroje určené k preparaci kostry byly nově zakoupeny (3 motyčky, 3 špachtle, 3 štětce a 3 zahradnické kovové lopatky) a před použitím očištěny 5% NaClO (SAVO) a 96% EtOH a vystylikovány opět UV zářením po dobu 20 minut. Na lokalitu byly přepravovány stejným způsobem jako ochranné pomůcky.

Preparované kosterní pozůstatky byly ihned po uvolnění ze země odebírány do vystylikovaného igelitového pytle, který byl uložen ve vystylikované kartónové krabici na kosterní vzorky s víkem. Kvůli minimalizaci kontaminace kosterních pozůstatků recentní DNA, byla dokumentace prováděna pouze fotograficky.

Během preparace, která trvala asi 3 hodiny, se ke členům experimentálního týmu a k preparovanému hrobu nesměli přiblížit žádní nechráněni lidé. Preparační tým pracoval bez přestávky, dokud nebyly ze země vyzvednuty veškeré kosti preparované kostry (Obrázek 4). Po vyzvednutí všech kostí preparované kostry byla krabice s kosterními pozůstatky uzavřena a odvezena do Laboratoře biologické a molekulární antropologie Ústavu experimentální biologie PřF MU, kde byly za standardních ste-

Obrázek 2. Příprava před preparací kostry, lokalita Diváky – Padělký za Humny, rok 2008 (foto E. Drozdová)



Obrázek 3. Přenos sterilních pomůcek na lokalitu Diváky – Padělký za Humny, rok 2008 (foto E. Drozdová)



rilních podmínek odebrány vzorky kostní tkáně. Teprve potom byly kosterní pozůstatky podrobeny antropologické analýze.

Postup použitý v letech 2009, 2010 a 2011 na pohřebišti Znojmo Hradiště a Diváky

K preparaci kosterních pozůstatků v terénu jsme použili běžně užívané preparační techniky. Při práci byly použity běžné preparační nástroje: kovová lopatka a motýčka s dřevěnou rukojetí, dřevěné špachtle, štětce ze syntetického vlákna, igelitový sedák (Obrázek 5). Preparační tým se skládal z jednoho pracovníka (1 žena), který měl dva pomocníky, kteří se přímo na vyzvedávání nepodíleli. Ochranný oděv se sestával z kombinézy MINTO 34778 s kapucí, respirátoru, igelitových návleků, brýlí a latexových rukavic. Před preparací každého hrobu byly pomůcky ošetřeny 5% NaClO a 96% EtOH a následně sterilizovány spolu s ochranným oděvem a uzavíratelnými plastovými sáčky 20 minut UV zářením. Po sterilizaci byly všechny pomůcky uloženy do transportních sáčků, uzavřeny švem a naskládány do plastového boxu s víkem, který sloužil k transportu na pohřebiště a chránil předměty před kontaminací z vnějšího

Obrázek 4. Preparace kosterních pozůstatků z hrobu 160, Diváky – Padělky za humny, rok 2008 (foto E. Drozdová)



Obrázek 5. Pomůcky užívané pro preparaci vzorků na lokalitě Znojmo – Hradiště, rok 2009 (foto V. Dadejová)



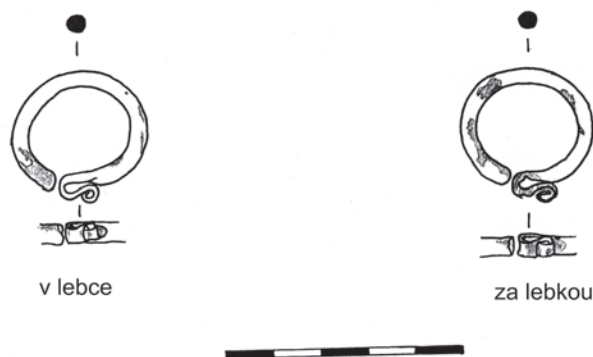
prostředí. Obsah boxu sloužil vždy pro preparaci dvou hrobů. Vlastní postup při preparaci hrobu a vyzvedávání vzorku „sterilním“ způsobem byl oproti experimentu v roce 2008 modifikován tak, aby nebránil archeologickému výzkumu hrobu a jeho řádné dokumentaci. Vzhledem k tomu, že pro analýzu DNA jsou nejvhodnější zuby nebo kompakta dlouhých kostí, bylo rozhodnuto o sterilním odběru lýtkových kostí. Skelet byl odkrýván běžným způsobem až na úroveň česky. Nyní přišel čas na odběr vzorku. Vlastní příprava na „sterilní“ preparaci probíhala 2 m od aktuálně preparovaného hrobu. Těsně pod víkem plastové krabice byly uloženy rukavice, dále následovalo oblékání do kombinézy, respirátoru, brýlí a na závěr se navlékl na ruce druhý pár rukavic. Po sestupu do hrobové jámy byly veškeré dosud odkryté části skeletu očištěny pomocí vatového tamponu NaClO a EtOH. Poté byla po vrstvách odkryta jedna končetina (Obrázek 6). V momentě, kdy byla obnažena, přišla na řadu fotografická dokumentace prováděná technikem výzkumu z dálky asi jednoho metru od hrobové jámy. Ke kostře bylo opatrně přiloženo měřítko, tabulka s číslem hrobu a severka. Po zdokumentování byla fibula opatrně vyjmuta a uložena do sterilního sáčku s uzavíratelným švem, ihned označeným číslem hrobu, datem a jménem osoby, která odběr prováděla. Vzorky pro analýzu DNA byly uloženy do plastového boxu, aby byla minimalizována doba expozice UV zářením ze slunečního svitu, které DNA poškozuje. Při ukládání byly zároveň vyjmuty i pomůcky pro preparaci. Použitý ochranný oděv a nářadí byl uložen do igelitového pytle mimo box. Veškeré odebrané kosterní pozůstatky byly co nejrychleji dopraveny do výzkumné základny, kde byly uloženy do mrazicího boxu a skladovány při teplotě -20°C . Po ukončení terénního výzkumu byly vzorky převezeny v polystyrénové krabici na Přírodovědeckou fakultu Masarykovy univerzity. Podobným způsobem bylo postupováno v letní sezóně 2009 také na lokalitě Diváky.

b) Metodika antropologické analýzy

Antropologický rozbor byl proveden standardními antropologickými metodami metrickými a morfoskopickými. Pohlaví bylo určováno dvěma metrickými metodami podle pánve (Novotný, 1981; Murail et al., 2003) a podle morfologie lebky. K určení věku byla užita kombinovaná metoda Nemeskéri et al. (Knussmann, 1988), Lovejoyovo schéma obrusu zubů (White & Folkens, 2005) a schéma stupně uzavření růstových štěrbin dle Brothwellova schématu (Knussmann, 1988).

Obrázek 6. Preparace kosterních pozůstatků pro účely genetické analýzy na pohřebišti Znojmo – Hradiště, rok 2009 (foto V. Dadejová)



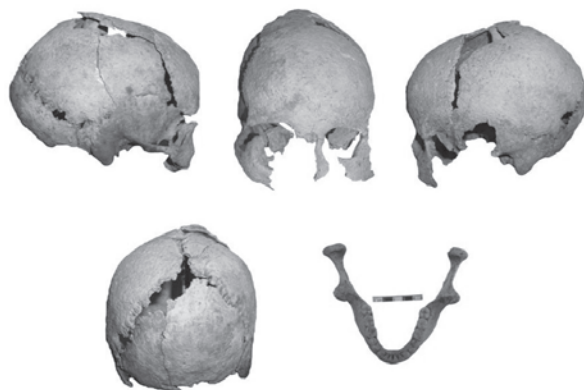
Obrázek 7. Stříbrem plátované záušnice z hrobu 160, Diváky – Padělký za humny (kresba M. Šodek)**c) Metodika genetické analýzy**

Z kosterních pozůstatků bylo za sterilních podmínek odebráno 6 vzorků kostní tkáně (fragment žebra, tělo krčního obratle, os metacarpale III, fragment kosti temenní, řezák, fragment levé kosti pánevní). Odběr byl prováděn sterilními rukavicemi SEMPERMED® Natural Latex v ochranné kombinéze MINTO 34778 s kapucí, s respirátorem, igelitovými návleky a ochrannými brýlemi. Z odebraných vzorků bylo pomocí vrtačky DREMEL® Stylus™ Lithium-Ion a sterilních brusných pásů DREMEL® 408 odstraněno přibližně 1–2 mm povrchové kostní tkáně, aby byla minimalizována možnost kontaminace vzorků recentní DNA. Mechanicky ošetřené vzorky byly poté očištěny 5% NaClO (SAVO) a 96% EtOH a krátce sterilizovány UV zářením (10 minut každá strana). Pomocí oscilačního kulového mlýnu Retsch® MM301 byly vzorky rozemlety na prášek. Nádobky, náležící k mlýnu, bylo nutné po každém mletí důkladně vymýt, očistit 5% NaClO a 96% EtOH a sterilizovat UV zářením, aby se zabránilo kontaminaci mezi vzorky. Vzorky, rozemleté na jemný prášek, byly dekalcičovány působením 0,5M EDTA (pH 8,0) při teplotě 4 °C. K izolaci DNA byl použit izolační kit QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen). Z každého kosterního vzorku byla izolace DNA provedena třikrát a každý izolovaný vzorek DNA byl poté analyzován samostatně.

Pro genetické určení pohlaví byla užita metoda analýzy genu SRY a genu pro amelogenin. První metoda umožňuje přímou identifikaci pouze jedinců mužského pohlaví. Je dána amplifikací úseku genu SRY, dlouhého 93 bp (Cunha et al., 2000). Gen SRY (*Sex determining Region Y*) se nachází na krátkém raménku chromozomu Y (Yp11.3). Jedinci ženského pohlaví jsou určeni nepřímo, nepřítomností amplifikačního produktu.

Amelogenin je gen kódující protein zubní skloviny. Lidský gen pro amelogenin má dvě kopie, jedna kopie se nachází na chromozomu X (Xp22.31-p22.1) a druhá na chromozomu Y (Yp11.2) (Hummel, 2003). Metoda amplifikace úseku sekvence z prvního intronu genu pro amelogenin umožňuje rozlišit obě pohlaví, a to díky odlišné délce amplifikačních produktů mužské a ženské DNA. V prvním intronu genu pro amelogenin na X chromozomu je přítomna delece 6 bp (Mannucci et al., 1994; Sullivan et al., 1993). DNA úsek amplifikovaný z X chromozomu je dlouhý 106 bp, DNA úsek amplifikovaný z Y chromozomu je dlouhý 112 bp (Kaestle & Horsburgh, 2002; Cunha et al., 2000; Sullivan et al., 1993).

Amplifikace DNA izolované z kosterních vzorků byla provedena podle modifikovaného protokolu dle Hummelové (amelogenin) a Cunhy (SRY) (Hummel, 2003; Cunha et al., 2000). Produkty amplifikace byly separovány gelovou elektroforézou (3% agarozový gel, 5% MetaPhor®) a zviditelněny použitím interkalačního činidla EtBr. Výsledky byly hodnoceny na transiluminátoru pod UV světlem a dokumentovány digitálním

Obrázek 8. Lebka ženy z hrobu 160, Diváky – Padělký za humny (foto E. Drozdová)

fotoparářem.

Pracoviště sestává ze 3 oddělených místností, aby se zabránilo kontaminaci vzorků recentní DNA a kontaktu amplifikačních produktů se vzorky. V pre-PCR místnosti probíhá zpracování vzorků a extrakce DNA, v PCR místnosti amplifikace vybraných úseků DNA a v post-PCR místnosti detekce amplifikátů. Používá se jednorázový sterilní spotřební materiál, pracuje se v ochranné kombinéze DuPont™ Tyvek® s respirátorem, ochrannými brýlemi a igelitovými návleky. Pracovní plocha Biohazard boxu (Euroflow EF/S, Clean Air) a laminárního boxu BIOAIR aura mini je pravidelně čištěna 5% NaClO (SAVO) a denaturovaným lihem a sterilizována UV zářením mezi jednotlivými pracovními úkony.

Výsledky následného výzkumu hrobu 160 z lokality Diváky – Padělký za humny**Výsledky archeologické analýzy**

Archeologická dokumentace objevené situace v hrobu 160 byla provedena dodatečně. V hrobové jámě obdélníkového tvaru o rozměrech 235 × 70 cm ležela kostra jedince pohřbeného na zádech s horními končetinami podél těla, přičemž kosti levého předloktí se nacházely pod levou pánevní kostí, radius pravé kosti ležel nad a ulna pod pravou pánevní kostí. Pravá klíční kost otočena oproti anatomické poloze o 90°. V zásypu hrobu nalezena myši čelist. Délka kostry in situ 165 cm, orientace JJZ-SSV (azimut 224°). Při preparaci byla u lebky nalezena bronzová stříbrem plátovaná záušnice, další párová záušnice byla nalezena v laboratoři při ošetření kosterních pozůstatků (Obrázek 7). V oblasti hrudníku nalezen malý železný cvoček. Jedná se o hrob ženy vybavené kvalitními postříbřenými záušnicemi z 11. století. Podle rozvolněné pánve a rukou pod pánví se zdá, že byla pohřbena v rakvi, přestože stopy dřeva nebyly při výzkumu zjištěny.

Výsledky antropologické analýzy

Zkoumané kosterní pozůstatky byly poměrně silně poškozené. Z lebky se podařilo rekonstruovat mozkovnu a zachovala se nepoškozená dolní čelist s kompletním chrupem (Obrázek 8). Postkranální skelet byl poškozen pobýtem v zemi, konce dlouhých kostí byly abradovány, žebra a obratle rozlámané. Zachovalost kosterních pozůstatků shrnuje obrázek 9.

Kosterní pozůstatky patřily jednoznačně ženě, což potvrdily obě metody metrického hodnocení podle pánevní kosti. Navíc v sulcus preauricularis se nacházely poporodní změny. Podle kombinované metody se žena dožila 19–28 let, protože měla čerstvě přirostlou crista iliaca je možné její věk posunout nad 24 let a obris zubů ukazoval na věk 24–30 let. Proto jsme odhadovaný věk zúžili na interval 24–30 let. Výška postavy byla

podle délky pravého femuru $165,4 \pm 4,49$ cm. Na kosterních pozůstatcích nebyly patrné žádné patologické změny.

Výsledky genetické analýzy

Z kosterních pozůstatků, vyzvednutých z hrobu 160, bylo odebráno 6 vzorků kostní tkáně (fragment žebra, řezáku, páneve, kosti temenní, obratle a os metacarpale III). Pohlaví bylo určováno na základě detekce markeru SRY a amelogeninového markeru. Analýzou markeru SRY bylo pohlaví stanoveno jako ženské (Obrázek 10, Tabulka 1). Za průkazné stanovení ženského pohlaví byl považován výsledek, kdy nebyl přítomný hledaný amplifikační produkt a zároveň byly přítomny tzv. primer-dimery (polymerázová řetězová reakce nebyla inhibována). U vzorku DNA z temenní kosti (3. izolace) byl na agarózovém gelu pozorován hledaný produkt. Jednalo se však o jediný případ, ke kterému pravděpodobně došlo *cross*-kontaminací (kontaminací křížem) mezi vzorky.

Analýzou amelogeninového markeru bylo rovněž určeno ženské pohlaví. Na MetaPhor® gelu byl pozorován jeden amplifikační produkt (Obrázek 11) v případě analýzy vzorku DNA z žebra (1., 2., 3. izolace) a vzorku DNA z obratle (2. izolace). U ostatních DNA vzorků se hledané úseky nepodařilo amplifikovat.

Diskuse

Dánští kolegové z kosterních pozůstatků odebírali pouze tři zuby a jejich preparace v ochranných pomůckách byla omezena na lebku preparovaného jedince. Zkoumali celkem 14 hrobů (Melchior et al., 2008). Naším cílem bylo v první fázi zjistit, jestli je proveditelná preparace celé kostry bez přímého dotyku lidské ruky, proto byla naše situace od situace na pohřebišti Galgedil odlišná. Pro naše účely (izolaci jaderné DNA) jsme potřebovali totiž kromě zubů také kompaktní dlouhých kostí, která je pro izolaci jaderné DNA nejvhodnější (Faermann et al.,

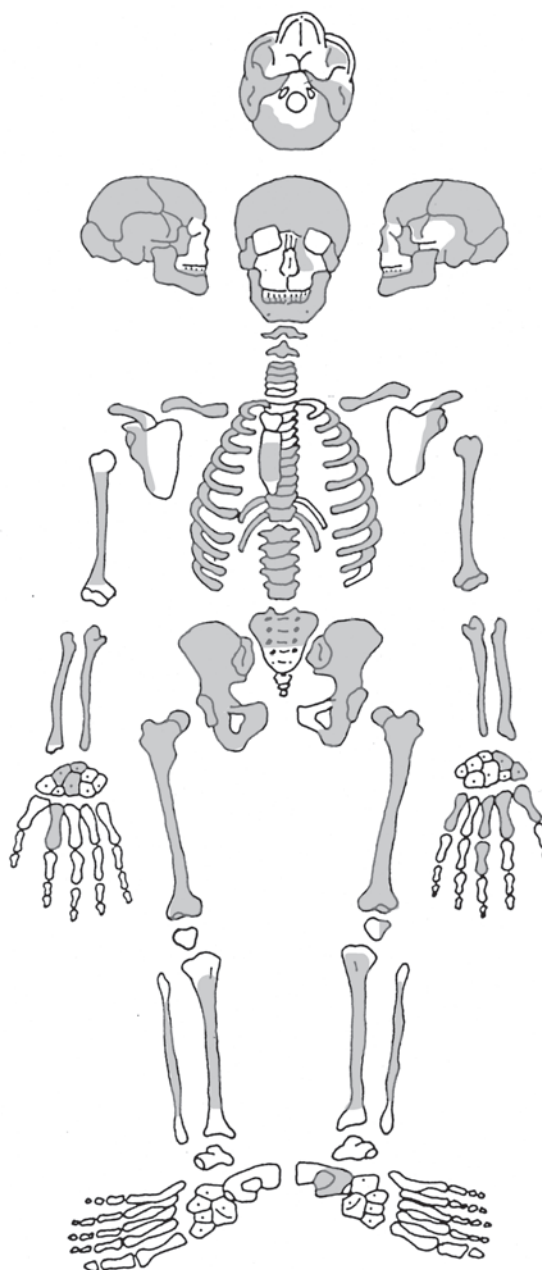
Tabulka 1. Výsledky analýzy markeru SRY ze vzorků kostní tkáně, odebraných z hrobu 160 (Diváky – Padělký za Humny) v roce 2008

Vzorek	1. izolace	2. izolace	3. izolace
žebro	negativní	negativní	negativní
řezák	negativní	negativní	negativní
pánev	–	–	negativní
temenní kost	–	negativní	pozitivní
obratel	–	negativní	negativní
os metacarpale III	negativní	negativní	negativní

Poznámka: „negativní“ – negativní výsledek amplifikace úseku z SRY genu za přítomnosti primer-dimerů; „pozitivní“ – pozitivní výsledek amplifikace úseku z SRY genu; „–“ negativní výsledek za nepřítomnosti primer-dimerů

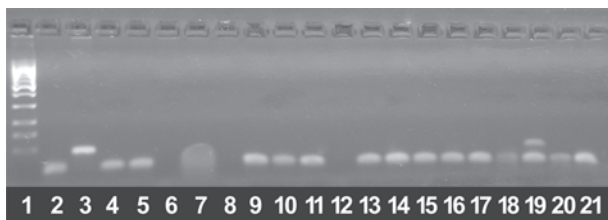
1995; Hummel, 2003). Za tímto účelem jsme provedli experiment v sezóně 2008 na pohřebišti Diváky, kdy vlastní preparace kosterních pozůstatků z hrobu 160 v ochranných pomůckách proběhla dobře. Celá akce trvala 3 hodiny, za tuto dobu nepřišli členové preparačního týmu, ani kosterní pozůstatky do styku s ostatními pracovníky, kteří nebyli chráněni (nechráněni pracovníci výzkumu měli povoleno přiblížit se k preparovanému hrobu na vzdálenost maximálně 5 m). Jediné, co při preparaci chybělo, byla ochrana hrobu stanem z plastové fólie. Tak by byly preparované pozůstatky dokonale chráněny před případnou kontaminací přinesenou např. větrem. Vzhledem k tomu, že jsme preparovali pouze jediný hrob, pracovali jsme bez přestávky, celé 3 hodiny, což při vysokých letních teplotách, v plastové kombinéze a dvou párech gumových rukavic na rukou, je silně vyčerpávající. Pokud bychom si udělali přestávku, bylo by nutné všechny ochranné pomůcky vyměnit za sterilní nebo je znovu vysterilizovat. Každá kost preparované kostry

Obrázek 9. Schéma zachovalosti kosterních pozůstatků z hrobu 160, Diváky – Padělký za humny



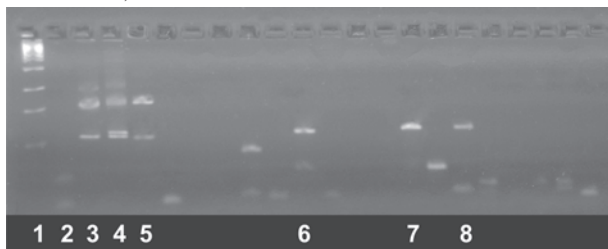
musí být vyzvednuta ihned po vykopání, což omezuje možnost dokumentace celé kostry a také možnost dokumentace všech archeologických nálezů v hrobě. Tento způsob práce je vysoce efektivní, pokud se týče zabránění kontaminace vyzvedávaných kosterních pozůstatků, ale velmi zdoluhavý a neefektivní z hlediska archeologického výzkumu pohřebišť. Pokud bychom chtěli tímto způsobem vyzvednout více hrobů nebo celé pohřebiště, jednalo by se o vysoce nákladnou a náročnou akci, při které by bylo spotřebováno velké množství jednorázových ochranných pomůcek, protože jakmile se preparátor vzdálí od preparovaného hrobu, je nutné všechny ochranné pomůcky i nástroje vyměnit za sterilní. Proto by na lokalitě musela být možnost sterilizace UV zářením prostřednictvím přenosné germicidní lampy a k tomu vyhrazená místnost. Veškeré úkony spojené s výzkumem pohřebišť by se musely konat v ochranných pomůckách (nivelace, dokumentace atd.). Pro práci na preparaci kosterních pozůstatků by muselo být vyčleněno ně-

Obrázek 10. Hrob 160, Diváky – Padělký za humny. Analýza markeru SRY, 3% agaróзовý gel (foto K. Boberová)



Poznámka: 1: hmotnostní standard, 2: negativní kontrola, 3: pozitivní kontrola – muž, 4–9: vzorky 1. izolace (vzorek z žebra, řezáku, pánve, kosti temenní, obratle a os metacarpale III), 10–15: vzorky 2. izolace (vzorek z žebra, řezáku, pánve, kosti temenní, obratle a os metacarpale III), 16–21: vzorky 3. izolace (vzorek z žebra, řezáku, pánve, kosti temenní, obratle a os metacarpale III)

Obrázek 11. Hrob 160, Diváky – Padělký za humny, výsledky analýzy amelogeninového markeru, 5% MetaPhor® gel (foto K. Boberová)



Poznámka: 1: hmotnostní standard, 2: negativní kontrola, 3: pozitivní kontrola – žena, 4: pozitivní kontrola – muž, 5: vzorek z žebra (1. izolace), 6: vzorek z žebra (2. izolace), 7: vzorek z obratle (2. izolace), 8: vzorek z žebra (3. izolace)

kolik týmů, které by se v práci na vyzvedávání hrobů střídaly, protože práce v horkém letním počasí v ochranných pomůckách po delší dobu ohrožuje lidské zdraví. Veškeré nástroje pro preparaci kosterních pozůstatků, i krabice pro uložení kosterních vzorků, by musely být sterilní.

Ve druhé fázi jsme se snažili modifikovat techniku vyzvedávání vzorků tak, aby byl naplněn požadavek sterility vzorku, ale celý proces vyzvedávání by probíhal tak, aby nebránil plynulosti archeologického výzkumu. Tento modifikovaný postup vyzvedávání kosterních pozůstatků, který jsme poprvé použili v létě roku 2009 na pohřebištích Znojmo – Hradiště a Diváky, se osvědčil lépe. Sterilní preparace pouze jedné kosti se ukázala jako vhodný způsob odběru vzorků pro genetické analýzy. Při výše popsaném postupu byl striktně dodržen „sterilní“ způsob vyzvednutí vzorku pro genetickou analýzu, práce však probíhala rychle, nezdržovala archeologický výzkum a umožnila použití dokumentačních technik užívaných k dokumentaci při archeologickém výzkumu a tedy nijak nenarušila průběh celého výzkumu pohřebiště. Tímto způsobem byly v letní sezóně 2009 vyzvednuty na pohřebišti Diváky vzorky z 10 hrobů a na pohřebišti Znojmo – Hradiště vzorky ze 66 hrobů. Takto modifikovaná metodika odběru vzorků umožnila skloubit potřebu zabránění kontaminace kosterních pozůstatků recentní genetickou informací a zároveň nenarušit průběh archeologického výzkumu. V dalších výzkumných sezónách (2010, 2011) bylo na pohřebišti Znojmo – Hradiště sterilním způsobem vyzvednuto velké množství kosterních vzorků, ze kterých byla získána analyzovatelná DNA v dostatečném množství a kvalitě, umožňující využít pro analýzu DNA také další, robustnější, metodiky (např. qRT PCR, analýza STR markerů apod.). Výsledky těchto analýz budou publikovány v samostatné studii.

Oba experimenty také ukázaly, jak je důležité předem vy-

pracovat protokol pro „sterilní“ preparaci kosterních pozůstatků na pohřebišti (pracovní postup), jehož striktní dodržování při odběru vzorků z každého nalezeného jedince zajistí sterilní podmínky pro vyzvedávání kosterních pozůstatků a hlavně opakovatelnost a reprodukovatelnost postupu v budoucnu, což je zásadní pro publikovatelnost výsledků. Podobné protokoly jsou běžně dodržovány v laboratorních pracujících s biologickými materiálem, kde je nebezpečí kontaminace lidskou DNA a nebo naopak nákazy člověka ze zpracovávaných vzorků. Ke stejným závěrům docházejí i další autoři (Sampietro et al., 2006). Ukazuje se, že tento protokol je nutné mírně přizpůsobovat místním podmínkám výzkumu.

Naše zkušenosti z preparace kosterních pozůstatků bez přímého dotyku lidské ruky na pohřebišti v Divákách a ve Znojme – Hradišti ukazují, že vyzvednutí kosterních vzorků tímto způsobem je proveditelné a možné. Především sezóna 2009 ukázala, že lze odběr vzorků skloubit s archeologickým výzkumem, aniž by byl tento závažným způsobem omezen. Proto by měli badatelé, kteří vyzvedávají kosterní pozůstatky z hrobových celků, uvažovat o zavedení odběru vzorků pro genetické analýzy podobným způsobem.

Závěr

Jak ukázal první experiment v roce 2008, postup „sterilního“ vyzvednutí celé kostry není použitelný rutinně při vyzvedávání kosterních pozůstatků. Zvláště v dnešní době, kdy se archeologické výzkumy orientují především směrem k záchranným výzkumům (kde je důležité co nejrychlejší provedení výzkumu). Jak se ukazuje, tento postup je použitelný pouze při výzkumu velmi vzácných kosterních pozůstatků, kdy je dostatek času a prostředků pro archeologický i antropologický výzkum. Experiment z roku 2009 naopak ukázal cestu, kterou by se měl odběr vzorků pro genetickou analýzu ubírat. Závěry experimentů ukazují, že postup „sterilního“ vyzvednutí jedné kosti pro genetickou analýzu je vhodnější, protože narušuje plynulost a rychlost archeologického výzkumu jen velmi málo. Někdy však mohou být podmínky terénního archeologického výzkumu silně omezené. V těchto případech doporučujeme použít k vyzvednutí vzorků pro genetickou analýzu sterilní rukavice a nástroje očištěné 5% NaClO (SAVO) a 96% EtOH, a okamžitě odebrání jedné z dlouhých kostí a několika zubů do sterilního papírového sáčku jako vzorků pro možné genetické analýzy.

Poděkování

Výzkum byl podpořen výzkumným záměrem MŠMT č. MSM 0021622427 a Grantovou agenturou České republiky projekt č. 404/08/0657.

Souhrn

Na pohřebištích Diváky – Padělký za humny (datace od 9. do 11. století n. l.) a Znojmo – Hradiště (období velkomoravské) byl učiněn pokus o odběr vzorků tzv. „sterilním způsobem“ pro účely genetické analýzy. Tímto způsobem byl na pohřebišti Diváky vypreparován hrob 160. Poté byla provedena antropologická a genetická analýza kosterních pozůstatků. Antropologická analýza určila, že se jedná o ženu, starou asi 24–30 let. Genetická analýza potvrdila ženské pohlaví metodou detekce úseku SRY genu i metodou analýzy genu pro amelogenin. Protože způsob preparace užitý na pohřebišti Diváky byl časově i fyzicky náročný a bránil v dokonalé dokumentaci hrobu, byl ve výzkumné sezóně 2009 použit jiný postup, kdy byla před vlastním odkrytím kostry vyzvednuta tzv. „sterilním způsobem“ pouze jedna dlouhá kost. Tento postup se ukázal jako vhodnější, nebránil plynulosti archeologického výzkumu. Tento postup byl v sezónách 2009, 2010 a 2011 aplikován na obou pohřebištích. Zkušenosti z terénní preparace i laboratorního zpracování kosterních pozůstatků v Divákách a ve Znojme

ukazují, že tento postup je pro vyzvedávání vzorků kostní tkáně pro účely genetické analýzy vhodný.

Klíčová slova: antropologie, paleogenetika, období velkomoravské a mladohradištní, Diváky, Znojmo Hradiště

Literatura

- Brdička, R. (2001). *Lidský genom na přelomu tisíciletí*. Praha: Grada.
- Cunha, E., Fily, M.-L., Clisson, I., Santos, A. L., Silva, A. M., Umbelino, C., César, P., Corte-Real, A., Crubézy, E., & Ludes, B. (2000). Children at the convent: Comparing historical data, morphology and DNA extracted from ancient tissues for sex diagnosis at Santa Clara-a-a-Velha (Coimbra, Portugal). *Journal of Archaeological Science*, 27(10), 949–952.
- Donoghue, H. (2008). Molecular Palaeopathology of Human Infectious Disease. In R. Pinhasi, S. Mays (Eds.), *Advances in Human Palaeopathology* (pp. 147–176). Chichester: Wiley and Sons Ltd.
- Drozdová, E., & Unger, J. (2005). Pět let školního archeologického – antropologického výzkumu v Divákách. *Česká antropologie*, 55, 38–41.
- Drozdová, E. (2011). Výsledky základní antropologické analýzy kosterních pozůstatků z pohřebišť ve Znojme Hradišti, sonda Šoba, sezóny 2007 a 2008. In L. Bilek, J. Kováčik (Eds.), *Šestnáct příspěvků k dějinám (Velké) Moravy. Sborník k narozeninám Bohuslava F. Klímy* (pp. 47–57). Brno: Masarykova univerzita.
- Faerman, M., Filon, D., Kahila, G., Greenblatt, C. L., Smith, P., & Oppenheim, A. (1995). Sex identification of archaeological human remains based on amplification of the X and Y amelogenin alleles. *Gene*, 167, 327–332.
- Hummel, S. (2003). *Ancient DNA Typing: Methods, Strategies and Applications*. Berlin, Heidelberg, New York, Hong Kong, London, Milan, Paris, Tokyo: Springer.
- Kaestle, F. A., & Horsburgh, K. A. (2002). Ancient DNA in Anthropology: Methods, Applications, and Ethics. *Yearbook of Physical Anthropology*, 45, 92–130.
- Klíma, B., & Kratochvíl, L. (2009). Velkomoravské hradiště sv. Hypolita ve Znojme – výzkumná sezóna r. 2008. In *Přehled výzkumů*, 50(1–2), 450–455. Brno: Archeologický ústav AV ČR v Brně.
- Knussmann, R. (1988). *Anthropologie. Handbuch der vergleichenden Biologie des Menschen. Band I und II*. Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Krings, M., Capelli, C., Tschentscher, F., Geisert, H., Meyer, S., Haeseler, von A., Grosschmidt, K., Possnert, G., Paunovic, M., & Paabo, S. (2000). A view of Neanderthal genetic diversity. *Nature Genetics*, 26(2), 144–146.
- Mannucci, A., Sullivan, K. M., Ivanov, P. L., & Gill, P. (1994). Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *International Journal of Legal Medicine*, 106(4), 190–193.
- Melchior, L., Kivisild, T., Lynnerup, N., & Dissing, J. (2008). Evidence of Authentic DNA from Danish Viking Age Skeletons Untouched by Humans for 1000 Years. *PLoS ONE*, 3(5). Retrieved 2. 6. 2008 from the World Wide Web: <http://www.plosone.org/article/lookup?articleURI=info:doi/10.1371/journal.pone.0002214>.
- Murail, P., Brůžek, J., Houet, F., & Cunha, E. (2003). DSP: A Tool for Probabilistic Sex Diagnosis using Worldwide Variability in Hip – Bone Measurements. *Bulletin set Mémoires de la Société d'Anthropologie de Paris*, 17(3–4), 167–176.
- Novotný, V. (1981). *Pohlavní rozdíly a identifikace pohlaví pánevní kosti*. Nepublikovaná kandidátská disertační práce. Brno: Lékařská fakulta UJEP.
- Ovchinnikov, I. V., Götherström, A., Romanova, G. P., Khari-
- tonov, M. V., Lidén, K., & Goodwin, W. (2000). Molecular analysis of Neanderthal DNA from the northern Caucasus. *Nature*, 404, 490–493.
- Sampietro, M. L., Gilbert, M. T., Lao, O., Caramelli, D., Lari, M., Bertranpetit, J., & Lalueza-Fox, C. (2006). Tracking down Human Contamination in Ancient Human Teeth. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1801–1807.
- Sjøvold, T. (1990). Estimation of Stature from Long Bones Utilizing the Line of Organic Correlation. *Human Evolution*, 5(5), 431–447.
- Snustad, P. D., & Simmons, M. J. (2009). *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita.
- Sullivan, K. M., Mannucci, A., Kimpton, C. P., & Gill, P. (1993). A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques*, 15(4), 636–641.
- Unger, J. (2005). Kdo jste byly děti z hrobů 14, 44 a 63 v Divákách? *Živá archeologie – REA*, 6, 21–22.
- Unger, J. (2006). Problematika manipulace s těly zemřelých na hradištním pohřebišti v Divákách. *Študijné zvesti*, 39(1), 167–170.
- Vaňharová, M., & Drozdová, E. (2008). Sex determination of skeletal remains of 4000 years old children and juveniles from Hoštice 1 za Hanou (Czech Republic) by ancient DNA analysis. *Anthropological Review*, 71(1), 63–70.
- Vaňharová, M. (2011). Určení pohlaví dětí prostřednictvím analýzy DNA na pohřebišti Hoštice I za Hanou. In E. Drozdová, et al., *Hoštice I za Hanou. Výsledky antropologické analýzy pohřebišť lidu kultury zvoncovitých pohárů* (pp. 104–120). Brno: Masarykova univerzita.
- White, T. D., & Folkens, P. A. (2005). *The Human Bone Manual*. San Diego: Academic Press.