

DAMIR MARJANOVIĆ
DRAGAN PRIMORAC
ADNA AŠIĆ

FORENZIČKA GENETIKA

osnove i primjena



INSTITUT ZA
ANTROPOLOGIJU
INSTITUTE FOR
ANTHROPOLOGICAL
RESEARCH



Impresum

Izdavač

Institut za antropologiju
Ljudevita Gaja 32, 10000, Zagreb
<https://inantro.hr>

Za izdavača

Damir Marjanović

Autori

Damir Marjanović
Dragan Primorac
Adna Ašić

Pomoćni urednici

Petar Projić, Vedrana Škaro

Suradnici

Amra Džuho, Dubravka Havaš Auguštin, Jelena Šarac, Josip Crnjac,
Lana Salihefendić, Larisa Bešić, Natalija Novokmet, Rijad Konjhodžić

Recenzenti

Gordan Lauc, Jasmina Čakar, Petra Uvodić

Lektorica

Vesna Trkanjec

Grafičko oblikovanje

Ana Zubić

Tisak

Tiskara Zelina d.d.

Naklada

500

© Institut za antropologiju, Zagreb, 2025.

ISBN: 9789538092077

CIP zapis je dostupan u računalnome katalogu Nacionalne i sveučilišne
knjižnice u Zagrebu pod brojem 001257719.



Damir Marjanović
Dragan Primorac
Adna Ašić

FORENZIČKA GENETIKA

osnove i primjena

Zagreb, 2025.

Sadržaj

PREDGOVOR	12
ŽIVOTOPISI AUTORA	15
1. UVOD	26
1.1 TEMELJI FORENZIČKE ZNANOSTI	28
1.1.1. Što je forenzička znanost?	28
1.1.2. Područje forenzičke znanosti	30
1.1.3. Klasične kriminalističke metode identifikacije osoba i individualizacije humanih tragova	43
1.1.3.1. Identifikacija i individualizacija primjenom analize fenotipskih biljega	43
1.1.3.2. Identifikacija i individualizacija putem otiska prsta	47
1.1.3.3. Identifikacija putem zubnog kartona	52
1.1.3.4. Identifikacija i individualizacija skeletnih ostataka	56
1.2. OSNOVNI MODELI MOLEKULARNE GENETIKE	62
1.2.1. Stanica	62
1.2.2. Kromosomi	65
1.2.3. Dezoksiribonukleinska kiselina (DNA)	68
2. POVIJESNI RAZVOJ FORENZIČKE GENETIKE	76
3. VARIJABILNOST DNA I MOLEKULARNI BILJEZI U FORENZIČKOJ GENETICI	90
3.1. VNTR BILJEZI	92
3.1.1. RFLP analiza minisatelitnih biljega	93
3.2. STR BILJEZI	95
3.2.1. Struktura i nomenklatura STR molekularnih biljega	96
3.2.2. Standardni STR sustav lokusa	99
3.2.2.1. CODIS lokusi	100
3.2.2.2. INTERPOL-ov standardni set lokusa (ISSOL)	102
3.2.2.3. Europski standardni set lokusa (ESS)	103
3.2.2.4. Alu ponavljajući biljezi	103
3.3. SNP BILJEZI	105
3.4. HIPERVARIJABILNA REGIJA mtDNA	114

4. OSNOVNI MODELI I FAZE PROCESA ANALIZE DNA	120
4.1. BIOLOŠKI TRAGOVI	121
4.2. PRIKUPLJANJE I POHRANJIVANJE UZORAKA	123
4.3. IDENTIFIKACIJA VRSTE BIOLOŠKOG TRAGA	127
4.3.1. Testiranje i identifikacija tjelesnih tekućina	128
4.3.1.1. Testiranje i identifikacija tragova krvi	128
4.3.1.2. Testiranje i identifikacija tragova sperme	133
4.3.1.3. Testiranje i identifikacija tragova pljuvačke	137
4.3.1.4. Testiranje i identifikacija tragova urina	138
4.3.2. Testiranje i identifikacija tragova dlake	138
4.4. METODE IZOLACIJE DNA	143
4.4.1. Izolacija DNA pomoću organskih otapala	144
4.4.2. Izolacija DNA „Chelex® 100” metodom	146
4.4.3. Izolacija DNA „Qiagen” metodom	147
4.4.4. Promega IQ™ System	150
4.4.5. Prepfil® Forensic DNA Extraction Kit	151
4.4.6. Invitrogen ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit	151
4.4.7. Ostale metode izolacije DNA	151
4.5. METODE KVANTIFIKACIJE DNA	154
4.5.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine DNA u uzorku	154
4.5.2. Vizualizacija DNA metodom agarozne gel elektroforeze	155
4.5.3. Kvantifikacija DNA metodom hibridizacije	159
4.5.3.1. QuantiBlot Human DNK Quantitation Kit	159
4.5.3.2. AluQuant® Human DNA Quantitation System	160
4.5.4. qPCR kvantifikacija	160
4.5.4.1. Quantifiler® Trio DNA Identification Kit	161
4.5.4.2. Quantifiler™ HP (Human Plus) DNA Quantification Kit	164
4.5.4.3. Plexor® HY System	164
4.5.4.4. PowerQuant® System	165
4.5.4.5. Investigator® Quantiplex Pro sustavi	166
4.6. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM	167
4.6.1. Osnovne postavke i biokemijski model PCR-a	167
4.6.2. Optimizacija osnovnih parametara primjene lančane reakcije polimerazom u forenzičkoj genetici	170
4.7. DETEKCIJA PCR REZULTATA	171
4.7.1. Detekcija alelnih varijanti na STR lokusima	172
4.7.1.1. DNA profil	175
4.7.2. DNA sekvenciranje	178
4.8. PRIMJENA AUTOSOMNIH VIŠELOKUSNIH PCR SUSTAVA U FORENZIČKOJ GENETICI	180

4.8.1. Rani PCR sustavi	180	5.2.3.4. Statistička i bioinformatička obrada podataka	240
4.8.1.1. AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification Kit	180	5.2.3.5. Jezgrini pseudogeni	242
4.8.1.2. AmpliType® PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit	181	5.2.3. Heteroplazmija	242
4.8.2. Komercijalni multipleks PCR sustavi za analizu autosomnih STR lokusa	182	5.3. OSOBITOSTI X KROMOSOMA I NJEGOVA PRIMJENA	
4.8.2.1. PowerPlex™ 16 sustav	186	U FORENZIČKOJ GENETICI	243
4.8.2.2. PowerPlex® ESX / ESI	188	5.3.1. Osnovna citogenetička obilježja kromosoma X	244
4.8.2.3. PowerPlex® 21	189	5.3.2. Citogenetička usporedba kromosoma X i Y čovjeka	247
4.8.2.4. PowerPlex® Fusion / Fusion 6C	190	5.3.3. Geni kromosoma X i molekularno-genetičko određivanje spolova	247
4.8.2.5. PowerPlex® 35GY	190	5.3.4. X vezani STR biljezi	248
4.8.2.6. AmpFlSTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit	192	5.3.5. Primjene X-STR biljega u forenzičkoj analizi DNA	251
4.8.2.7. AmpFlSTR™ NGM / NGM SElect PCR Amplification Kit	193	5.3.6. Mogućnost primjene X-STR biljega u slučajevima testiranja srodstva	252
4.8.2.8. GlobalFiler™ PCR Amplification Kit	195	5.3.6.1. Testiranje očinstva na humanim skeletnim ostatcima	
4.8.2.9. VeriFiler™ Plus / VeriFiler™ Express PCR Amplification Kit	195	i njihova posthumna identifikacija	252
4.8.2.10. Investigator IDplex kit	196	5.3.6.2. Testiranje očinstva kada su potencijalni očevi bliski srodnici	252
4.8.2.11. Investigator ESSplex / ESSplex SE sustavi	196	5.3.6.3. Testiranje očinstva kada potencijalni otac nije dostupan	253
4.8.2.12. Investigator 24plex QS / 24plex GO! sustavi	197	5.3.6.4. Utvrđivanje očinstva u slučaju silovanja i incesta	253
4.8.3. MiniSTR sustavi	197	5.3.6.5. Utvrđivanje majčinstva	253
4.8.4. Direktni amplifikacijski STR sustavi	199	6. TEHNOLOŠKI RAZVOJNI TRENDovi U FORENZIČKOJ GENETICI	258
4.9. NAJČEŠĆI IZAZOVI U PROCESU FORENZIČKE ANALIZE DNA	201	6.1. AUTOMATIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE DNA	259
4.9.1. Analiza tragova koje karakterizira prisustvo malih količina DNA	201	6.1.1. Promega Maxwell® 16 System	260
4.9.2. Analiza miješanih tragova	206	6.1.2. Maxwell® RSC 48 Instrument	261
4.9.3. Degradirana DNA	208	6.1.3. Qiagen EZ1 Advanced Instrument	262
4.9.4. Mikrovarijante	209	6.1.4. Qiagen QIA-symphony® SP Instrument	262
4.9.5. Mutacije	210	6.1.5. Applied Biosystems™ HID NIMBUS® Presto System	263
4.9.6. Izazovi akreditacije laboratorija	211	6.1.6. Hamilton Microlab® VANTAGE Liquid Handling System	264
4.9.7. Izazovi u interpretaciji rezultata na sudu	213	6.1.7. AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System	264
5. PRIMJENA ANALIZE RODOSLOVNIH BILJEGA I KROMOSOMA X		6.1.8. Freedom EVO® Forensics DNA System	264
U FORENZIČKOJ GENETICI	220	6.1.9. Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation	263
5.1. ANALIZA KROMOSOMA Y U FORENZIČKOJ GENETICI	221	6.1.10. iPrep™ Purification Instrument	266
5.1.1. Citogenetička struktura i geni kromosoma Y	223	6.2. RAZVOJ I TRENDovi PCR TEHNOLOGIJE	267
5.1.2. Primjena kromosoma Y u forenzičkoj i populacijskoj genetici	225	6.2.1. Applied Biosystems PCR uređaji	268
5.1.2.1. Minimalni haplotip	226	6.2.2. Eppendorf PCR uređaji	271
5.1.2.2. Komercijalni Y-STR multipleks sustavi	227	6.2.3. Rotor-Gene Q	272
5.2. ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNA	229	6.2.4. Ostali PCR uređaji	272
5.2.1. Nasljeđivanje mitohondrijske DNA	232	6.3. RAZVOJ METODA I TEHNOLOGIJE ANALIZE DNA BILJEGA	
5.2.2. Značenje analize mtDNA u sudskoj medicini	233	U FORENZIČKOJ GENETICI	273
5.2.3. Instrumentalne metode analize mitohondrijske DNA	235	6.3.1. Fluorescentno obilježavanje i detekcija	273
5.2.3.1. Sangerovo sekvenciranje mtDNA	235	6.3.2. Razvoj DNA sekvencera i genetičkih analizatora	276
5.2.3.2. Ekstenzija za jednu bazu	237	6.3.2.1. Automatski genetički gel analizatori	277
5.2.3.3. Sekvenciranje nove generacije (NGS)	238	6.3.2.1.1. ABI PRISM® 373 DNA Sequencer	277

6.3.2.1.2. ABI PRISM® 377 DNA Sequencer	278
6.3.2.2. Automatski kapilarni genetički analizatori	279
6.3.2.2.1. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	279
6.3.2.2.2. Ostali sustavi za detekciju molekularnih biljega	280
6.3.2.3. Najnoviji trendovi u proizvodnji automatskih kapilarnih genetičkih analizatora	282
6.3.2.3.1. Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer for Human Identification (HID)	282
6.3.2.3.2. Applied Biosystems™ SeqStudio™ Flex Series Genetic Analyzer ...	283
6.3.2.3.3. Uređaji za kapilarnu elektroforezu tvrtke Promega	283
6.4. NOVI TEHNOLOŠKI SMJEROVI U FORENZIČKOJ GENETICI	286
6.4.1. Primjena analize RNA i epigenetičkih promjena u forenzičkoj genetici	286
6.4.2. Nova generacija sekvenciranja	288
6.4.2.1. Razvoj prvih platformi	288
6.4.2.2. Novi NGS trendovi u forenzičkog genetici	290
6.4.2.2.1. Pirosekvenciranje	290
6.4.2.2.2. Sekvenciranje korištenjem tehnologije reverzibilnog terminatora ..	292
6.4.2.2.3. Nanopor tehnologija	294
6.4.2.2.4. Ion poluprovodnička tehnologija	295
6.4.2.2.5. Treća generacija sekvenciranja	295
6.4.3. Primjena indel biljega u forenzičkoj genetici	296
7. OSNOVNA BIostatistička PRAVILA U FORENZIČKOJ GENETICI	302
7.1. MENDELOVI ZAKONI NASLJEĐIVANJA	303
7.2. HARDY-WEINBERGOVA RAVNOTEŽA	304
7.3. NERAVNOTEŽA VEZANOSTI GENA	305
7.4. KREIRANJE POPULACIJSKE BAZE PODATAKA	306
7.5. PRAVILA PRILIKOM TESTIRANJA RODITELJSTVA	310
7.6. DOKAZIVANJE OČINSTVA (RODITELJSTVA)	310
7.6.1. Statistički postupci i dokazivanje očinstva – indeks očinstva ili kombinirani indeks očinstva	311
7.6.2. Vjerojatnost očinstva (W)	312
7.6.3. Neisključenost slučajne osobe u općoj populaciji (random man not excluded ili RMNE)	314
7.6.4. Bezmajčinsko testiranje očinstva	317
7.6.5. Utvrđivanje majčinstva	320
7.6.6. Utvrđivanje roditeljstva nasuprot forenzičkoj analizi DNA	320
7.7. FORENZIČKA INDIVIDUALIZACIJA	321
7.8. STATISTIČKA ANALIZA MIJEŠANIH I LCN TRAGOVA	323
7.8.1. Statistička analiza miješanih tragova	323
7.8.2. Statistička analiza LCN tragova	324

7.9. STATISTIČKO UTVRĐIVANJE BIOLOŠKOGA SRODSTVA	325
7.10. IDENTIFIKACIJA ŽRTAVA MASOVNIH KATASTROFA	326
7.11. STATISTIČKA PRAVILA U ANALIZI SPOLNO VEZANIH BILJEGA	326
7.11.1. Presentacija rezultata dobivenih upotrebom Y-STR sustava	326
7.11.2. Presentacija rezultata dobivenih upotrebom X-STR sustava	327
7.12. BIostatistika U ANALIZI mtDNA	329
8. DNA BAZE PODATAKA	332
8.1. KRITERIJI ZA KREIRANJE LEGISLATIVE U VEZI SA DNA BAZOM PODATAKA	334
8.1.1. Kriteriji za arhiviranje profila	334
8.1.1.1. Profili osuđenih prijestupnika	334
8.1.1.2. Profili osumnjičenika	334
8.1.1.3. Profili dobiveni iz mrlja (tragova) nađenih na mjestu zločina	335
8.1.2. Kriteriji za uklanjanje profila iz baze podataka	335
8.1.2.1. Profili osuđenih prijestupnika	335
8.1.2.2. Osumnjičenici / uhićenici	335
8.1.3. Čuvanje uzoraka	335
8.2. FORENZIČKE DNA BAZE PODATAKA U SVIJETU	336
8.2.1. CODIS baza podataka – Sjedinjene Američke Države	337
8.2.2. NDNAD baza podataka – Engleska	338
8.2.3. Primjena analiza DNA u Njemačkoj	340
8.2.4. Europska razmjena DNA podataka	341
8.2.5. INTERPOL-ov globalni DNK protokol	342
8.3. AKTUALNO STANJE U REGIJI	343
9. FORENZIČKA ANALIZA DNA BILJNIH I ŽIVOTINJSKIH BIOLOŠKIH TRAGOVA	346
9.1. FORENZIČKA BOTANIKA	347
9.1.1. Osnovne molekularno-genetičke tehnike u analizi biljnoga materijala	348
9.1.1.1. Analiza STR molekularnih biljega na biljnim tragovima	348
9.1.2. Analiza nasumičnih (nepoznatih) polimorfni biljega	349
9.1.2.1. Analiza nasumično umnožene polimorfne DNA (RAPD)	350
9.1.2.2. Polimorfizmi dužine amplificiranih odsječaka (AFLP)	351
9.1.2.3. SNP analiza biljnog genoma	352
9.1.2.4. Identifikacija vrste	353
9.1.2.5. Palinologija i mikologija	355
9.2. OSNOVE ANIMALNE FORENZIČKE ANALIZE DNA	356
9.2.1. Forenzička entomologija	356
9.2.1.1. Analiza humane DNA izolirane iz kukaca	358
9.2.1.2. Analiza ribonukleinske kiseline (RNA analiza)	359
9.2.2. Forenzička analiza DNA kralježnjaka	359

9.2.2.1. Analiza animalne nuklearne DNA	360
9.2.2.2. Analiza animalne mitohondrijske DNA	361
9.2.3. Forenzička analiza DNA u kontroli porijekla prehrambenih proizvoda	362
10. UPOTREBA ANALIZE DNA U ODREĐIVANJU TJELESNIH OSOBINA	368
10.1. ODREĐIVANJE STUPNJA PIGMENTACIJE – PREDVIĐANJE BOJE OČIJU, KOSE I KOŽE	371
10.2. ODREĐIVANJE VISINE POMOĆU ANALIZE DNA	375
10.3. PREDVIĐANJE KRONOLOŠKE DOBI POMOĆU METILACIJE DNA	376
10.4. ANALIZA OSTALIH VIDLJIVIH OSOBINA POMOĆU DNA	377
11. MIKROBIOLOGIJA U FORENZICI	382
11.1. FORENZIČKA MIKROBIOLOGIJA	383
11.1.1. Pregled povijesti i razvoja forenzičke mikrobiologije	384
11.1.2. Bioterrorizam	385
11.1.3. Ostala kaznena djela i ova disciplina	385
11.2. TEHNIKE U FORENZIČKOG MIKROBIOLOGIJI	385
11.2.1. Genotipizacija	386
11.2.2. RAPD-PCR	387
11.2.3. Validacija rezultata	388
11.2.4. Mikrobni potpis (engl. microbial fingerprint)	388
11.2.5. Identifikacija osobe putem mikrobioma	389
11.2.6. Forenzička mikrobiologija u postmortem analizama	390
11.3. ZAKLJUČAK	392
12. PRILOG: PROCEDURE PRIKUPLJANJA I OZNAČAVANJA BIOLOŠKIH TRAGOVA NAMIJENJENIH ZA ANALIZU DNA	396
12.1. PRIKUPLJANJE TRAGOVA KRVI	397
12.1.1. Prikupljanje neosušenih tragova krvi s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu	397
12.1.2. Prikupljanje neosušenih tragova krvi s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu	398
12.1.3. Prikupljanje osušenih tragova krvi s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu	399
12.1.4. Prikupljanje osušenih tragova krvi s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu	400
12.1.5. Tragovi krvi na mokroj ili vlažnoj obući i odjeći	400
12.2. PRIKUPLJANJE TRAGOVA SPERME	401
12.2.1. Razdoblje u kojem je neophodno prikupiti trag sperme	401
12.2.2. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova sperme s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu	402

12.2.3. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova sperme s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu	403
12.2.4. Prikupljanje osušenih tragova sperme s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu	404
12.2.5. Prikupljanje osušenih tragova sperme s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu	404
12.2.6. Prikupljanje tragova sperme iz tijela žrtve (vaginalni i analni bris)	405
12.2.7. Prikupljanje tragova sperme s tijela žrtve	405
12.2.8. Prikupljanje tragova sperme iz usta	406
12.2.9. Rano testiranje spornog očinstva	406
12.3. PRIKUPLJANJE TRAGOVA PLJUVAČKE 404	
12.3.1. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu	406
12.3.2. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu	407
12.3.3. Prikupljanje osušenih tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu	407
12.3.4. Prikupljanje osušenih tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu	408
12.3.5. Prikupljanje tragova pljuvačke s tijela	408
12.4. PRIKUPLJANJE TRAGOVA DLAKA	409
12.4.1. Prikupljanje pronađenih tragova dlake na mjestu zločina	409
12.4.2. Prikupljanje dlaka s tijela žrtve	409
12.4.3. Prikupljanje dlaka s tijela žrtve na kojima se mogu nalaziti tragovi sperme ili krvi	410
12.5. PRIKUPLJANJE BIOLOŠKIH TRAGOVA ISPOD NOKATA I IZ FECESA	410
12.6. PRIKUPLJANJE NESPOJNIH BIOLOŠKIH UZORAKA	411
12.6.1. Prikupljanje nespornih uzoraka bukalne sluznice (sluznice usne šupljine)	412
12.6.2. Prikupljanje nespornih uzoraka krvi	413
12.6.3. Prikupljanje skeletnih ostataka	414
12.6.4. Prikupljanje osobnih predmeta s ciljem prikupljanja nespornih uzoraka	415
12.7. OZNAČAVANJE PRIKUPLJENIH BIOLOŠKIH TRAGOVA	416
INDEX POJMOVA	418

Predgovor

Malo je znanstvenih disciplina u kratkom vremenskom periodu tako snažno evoluiralo kao što je slučaj s forenzičkom genetikom. Opseg njene primjene te svakodnevni novi izazovi s kojima se susreću forenzički genetičari kako u znanstvenim istraživanjima, tako i u sklopu policijskih i sudskih istražnih radnji, dovode do toga da se ovo područje znanosti konstantno unapređuje. Već odavno su iza nas vremena kada su sudski vještaci-genetičari na sudu morali obrazlagati vrijednosti DNA kao „novog znanstvenog dokaza” u svrhu otkrivanja počinitelja kaznenih djela, utvrđivanja identiteta osoba i dokazivanja srodstva.

U sudskomedicinskoj znanosti, analiza DNA jest „oblik znanstvenog dokaza”, a upravo je analiza DNA u kaznenopravnom sustavu dovela do unapređenja tehnologije glede vještačenja, a to je bilo prijeko potrebno radi otkrivanja počinitelja kaznenih djela odnosno radi pravilnog i potpunog utvrđivanja činjeničnog stanja u kaznenim postupcima. S obzirom na sofisticiranost današnjih oblika kaznenih djela, trebalo je uzvratiti najsoficiranijim znanstvenim iskoracima u forenzičkoj genetici. Navedeno osigurava očuvanje najviših vrijednosti pravne države te sprječava da itko nedužan bude osuđen. S druge strane, izvan kaznenopravnog sustava, danas je analiza DNA nezamjenjiva metodologija u svrhu utvrđivanja majčinstva i očinstva. Kako bi forenzička genetika odgovorila na sve moderne izazove, konstantno se unapređuju postupci prikupljanja bioloških tragova, izdvajanja DNA, primjene novih genetičkih biljega, ali i korištenja sofisticiranih metoda kojima se iz jedne analize može utvrditi vrsta biološkog traga, spol, približna starost, geografsko podrijetlo te fenotipska obilježja osobe. Sve navedeno ima poseban značaj u kreiranju DNA baza podataka, što postaje jedan od najučinkovitijih načina otkrivanja i prevencije kriminaliteta. Našu malu „odiseju” započeli smo prije više od sedamnaest godina objavljivanjem prve multidisciplinarnе knjige „analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu”, a koju smo već u narednoj godini modificirali u prvi udžbenik iz Forenzičke genetike pisan za sve znanstvenike u ovom dijelu Europe. Naime, slobodno možemo reći da je ovo četvrto izdanje prvog i za sada jedinog sveobuhvatnog pisanog materijala iz područja forenzičke genetike namijenjenog studentima iz područja prirodnih znanosti, biomedicine i zdravstva te interdisciplinarnih područja znanosti, koji će svoju budućnost vezati uz područje forenzičke genetike. S druge strane, ovo je materijal koji će mnogim znanstvenicima koji već grade svoje karijere u području forenzičkih znanosti, približiti osnove forenzičke genetike, modele njene primjene, ali i najnovije iskorake koji su postali sastavni dio svakodnevnog rada ovog dinamičkog područja znanosti.

U svaku knjigu pa i u ovu, uloženo je jako puno ljubavi, energije i vremena, sve s ciljem kako bi se područje forenzičke genetike približilo svim zainteresiranima. Od srca zahvaljujemo svim autorima, recenzentima te nakladniku koji su omogućili da ovo izdanje ugleda svjetlo dana u predviđenom roku. Unaprijed se radujemo svakom odjeku naše knjige, a čitateljima želimo da ih ona inspirira u svim njihovim daljnjim stručnim i znanstvenim aktivnostima.

U Zagrebu i Sarajevu, 29. siječnja 2025.

prof. dr. sc. Damir Marjanović
prof. dr. sc. Dragan Primorac
prof. dr. sc. Adna Ašić

Životopisi autora

prof. dr. sc. Damir Marjanović



Profesor Damir Marjanović ravnatelj je Instituta za antropologiju u Zagrebu na kojem je trenutačno izabran za višeg znanstvenog suradnika. Ujedno je redoviti profesor na Internacionalnom Burch Sveučilištu, Sarajevo, redoviti profesor na Sveučilištu u Sarajevu, Bosna i Hercegovina, naslovni redoviti profesor na Sveučilištu u Rijeci, gostujući profesor na Sveučilištu u Splitu, Hrvatska, te na više sveučilišta u regiji, ali i Kini. Bio je dugogodišnji voditelj Laboratorija za forenzičku genetiku na Institutu za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Sarajevo, na kojem je izabran za znanstvenog savjetnika još 2012. godine.

Također ga je bio angažirala EU i OESC (Kosovo) kao ekspertnog konzultanta u području forenzičke genetike, Europska agencija za obnovu (Srbija) i Međunarodna komisija za nestale osobe (ICMP – Bosna i Hercegovina). Povremeno su ga angažirali i Institut Ruder Bošković i znanstvena tvrka Genos (Hrvatska).

Njegovo glavno znanstveno područje interesa je forenzička, populacijska i molekularna genetika te molekularna antropologija. Autor je i koautor 17 knjiga i/ili poglavlja u knjigama, više od 100 znanstvenih i preglednih članaka i sažetaka u časopisima CC, WoS, SCOPUS, te više od 270 znanstvenih radova i sažetaka u drugim časopisima i znanstvenim publikacijama. Citiran je više od 4200 puta (siječanj 2025. godine). Također, bio je pozvan predavač na više od 60 različitih međunarodnih i nacionalnih znanstvenih događaja diljem svijeta. Bio je voditelj više nacionalnih i internacionalnih znanstvenih i strukturnih projekata, te angažirani recenzent za veliki broj eminentnih znanstvenih časopisa.

Od 2012. do 2013. godine bio je ministar obrazovanja i nauke Kantona Sarajevo, Bosna i Hercegovina, a od 2018. je delegat u Domu naroda Parlamenta Federacije Bosne i Hercegovine i zastupnik u Skupštini Kantona Sarajevo.

Godine 2011. nagrađen je kao najbolji znanstvenik godine u Bosni i Hercegovini, a njegova knjiga *Preci u nama: Genetičko blago Bosne i Hercegovine* proglašena je najboljom sveučilišnom knjigom u Bosni i Hercegovini za 2021.

prof. dr. sc. Dragan Primorac



Prof. dr. sc. Dragan Primorac sveučilišni je profesor, liječnik (specijalist pedijatrije, subspecijalist medicinske genetike) i stalni sudski vještak. Na popisu je 2% znanstvenika s najvećim utjecajem citiranosti, kako u karijeri tako i za 2023. godinu. Prvi je nositelj titule „Global Penn State Ambassador” u povijesti tog Sveučilišta osnovanog 1855. godine. Donedavno je predsjednik Odbora za međunarodne odnose Američke Akademije za forenzičke znanosti (AAFS), a trenutačno obavlja dužnost člana upravnog odbora Forensic Science Foundation, pri Američkoj Akademiji za forenzičke znanosti. Osnivač je i predsjednik „International Society of Applied Biological Science (ISABS)”, jedne od najuglednijih međunarodnih znanstvenih organizacija

iz područja personalizirane medicine te kliničke i forenzičke genetike u čijem radu je sudjelovalo deset dobitnika Nobelove nagrade. Predsjednik je Upravnog vijeća Specijalne bolnice Sveta Katarina, Hrvatskog društva za humanu genetiku i Hrvatskog društva za (preciznu) personaliziranu medicinu.

Profesor je na Penn State University, University of New Haven, kineskom Xi'an Jiaotong University, College of Medicine and Forensics te Medicinskim fakultetima Sveučilišta u Splitu, Osijeku i Rijeci. Ukupno je objavio oko 300 znanstvenih radova, kongresnih priopćenja te 30-ak knjiga i poglavlja u knjigama, a do sada je citiran više od 10.000 puta (*Google Scholar*, na dan 13. siječnja 2025. godine).

Jedan je od utemeljitelja analize DNA u svrhu identifikacije skeletnih ostataka pronađenih u masovnim grobnicama. Suosnivač je Laboratorija za kliničku i sudsku genetiku KB Split, a bio je i dugogodišnji suradnik Vladinog Ureda za zatočene i nestale. Dvije godine bio je glavni koordinator međunarodnog projekta u koji je uključeno šest europskih država s ciljem implementacije i valorizacije novih DNA sustava u svrhu identifikacija osoba. Jedan je od pionira uvođenja integriranog koncepta personalizirane medicine u kliničku praksu.

Osnivač je Sveučilišnog odjela za forenzičke znanosti, Sveučilišta u Splitu, a zbog velikog doprinosa u razvoju forenzičkih znanosti proglašen je počasnim pročelnikom tog Odjela. Odlukom Senata indijskog National Forensic Science University, zbog posebnih zasluga u razvoju forenzičkih znanosti, kao prvom Europljaninu dodijeljeno mu je počasno zvanje profesor emeritus.

Dobitnik je niza međunarodnih i domaćih priznanja, a među njima i Young Investigator Award (American Society for Bone and Mineral Research), Michael Geisman Fellowship Award (Osteogenesis Imperfecta Foundation), Nagrade grada Splita koju dijeli s prof. dr. Šimunom Anđelinovićem, Nagrade za životno djelo (Institut za forenzičke znanosti, Sveučilišta New Haven), Nagrada talijanske regije Veneto za posebna postignuća

i promicanje znanosti u EU, itd. Američka akademija za forenzične znanosti, dodijelila mu je jednu od najprestižnijih nagrada „Mary E. Cowan Outstanding Service Award” zbog izvrsnosti u radu, međunarodne prepoznatljivosti i golemog doprinosa razvoju forenzičnih znanosti u svijetu.

Zbog doprinosa u razvoju hrvatske i svjetske znanosti odlikovan je ordenom „Reda Danice hrvatske s likom Ruđera Boškovića”, a za sveukupni dosadašnji rad te iznimno uspješno promicanje međunarodnog položaja i ugleda Republike Hrvatske na području znanosti, obrazovanja i politike odlikovan je ordenom „Red Ante Starčevića”. Dobitnik je državne nagrade za znanost, a zbog zasluga oko utemeljenja Kampusu Sveučilišta u Splitu, dobio je najviše sveučilišno priznanje – Povelju Sveučilišta. Zbog iznimnog doprinosa u razvoju znanosti i obrazovanja, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku i Sveučilište u Mostaru dodijelili su mu počasne doktorate znanosti.

prof. dr. sc. Adna Ašić



Adna Ašić rođena je 1991. godine u Banjoj Luci, Bosna i Hercegovina. Visokoškolsko obrazovanje završila je u Sarajevu, gdje je doktorirala 2018. godine na Internacionalnom Burč Sveučilištu na Odsjeku za genetiku i bioinženjering na temu „Uvođenje koncepta personalizirane medicine u kliničku praksu: Populacijska studija markera trombofilije i farmakogenetičkih markera varfarina u Bosni i Hercegovini”, pod mentorstvom prof. dr. Damira Marjanovića i prof. dr. Dragana Primorca. Zaposlena je kao istraživačica na znanstveno-istraživačkom institutu Verlab za biomedicinski inženjering, medicinske uređaje i vještačku inteligenciju, gdje ima zvanje znanstvene suradnice u oblasti prirodnih nauka. Pri Verlab institutu je aktivna kao

projekt menadžerica prilikom dizajna, pripreme i implementacije znanstveno-istraživačkih i istraživačko-razvojnih projekata, te je voditeljica modula Verlab Sport, pionirskog poduhvata kombiniranog modela testiranja sportaša u Bosni i Hercegovini kroz analizu psihofizičkog statusa i genetičkih predispozicija sportaša za optimizaciju treninga i smanjenja opasnosti od sportskih povreda. Ima desetogodišnje iskustvo u visokoškolskom sistemu, a trenutačno je u zvanju izvanredne profesorice za Oblast Genetika na Internacionalnom Burč Sveučilištu, gdje predaje predmete *Genetika*, *Populacijska genetika*, *Metodologija znanstveno-istraživačkog rada*, te Master kolegij Odabrane teme iz bioinformatike, koji je samostalno osmislila i implementirala. Završila je brojne edukacije u oblastima pedagoškog pristupa radu u visokom obrazovanju, znanstvene komunikacije i prezentacije, te metodologije podizanja javne svijesti o društveno značajnim temama. Kao projekt menadžerica, gostujuća predavačica i istraživačica je ostvarila suradnje sa sveučilištima i laboratorijima u Hrvatskoj, Njemačkoj, Latviji, Poljskoj, Španjolskoj, Rumuniji, Nizozemskoj i Turskoj. Oblasti istraživačkog interesa su joj: genetička varijacija kod čovjeka, personalizirana medicina i farmakogenetika, te migracije populacija. Trenutačno obavlja dužnost predsjednice Generalne skupštine Društva za medicinski i biološki inženjering u Bosni i Hercegovini (DMBIUBIH) i članica je Udruženja genetičara u Bosni i Hercegovini (GENuBiH). Radi na implementaciji više lokalnih i EU projekata, uključujući jednu COST Akciju, dva Erasmus+ i jedan Horizon Europe projekt. Objavila je preko 40 CC i SCI indeksiranih radova i koautorica je na dvije knjige – sveučilišna udžbenika. Bila je mentorica jedne doktorske disertacije i šest magistarskih radova, te je redovna recenzentica za različite SCI i Scopus indeksirane časopise. Posebno je zainteresirana za promociju značaja ravnopravnosti žena u društvu, a pogotovo u STEM disciplinama, u skladu s čime je voditeljica Radne grupe za ravnopravnost spolova i promicanje inkluzivnosti u europskoj znanstvenoj zajednici, unutar projekta kojeg implementira COST Asocijacija.

Životopisi pomoćnih urednika

doc. dr. sc. Petar Projić



Petar Projić je znanstvenik/istraživač u tvrtki Međunarodni Centar za primijenjena biološka istraživanja (ICABS) d.o.o. od 2023. godine, s dugogodišnjim iskustvom u radu s različitim metodama analize DNA. Znanstveni je suradnik (područje prirodnih znanosti, polje: biologija), Prirodoslovno-matematičkog fakultet Sveučilišta u Zagrebu od 2015. godine. Doktor znanosti iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja biologije, znanstvene grane genetike, evolucije i filogenije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Bio je znanstveni suradnik na Institutu za antropologiju Zagreb od 2019. do 2023. godine, voditelj laboratorija za analizu animalne DNA u Genos DNA laboratoriju, asistent na Institutu „Ruđer Bošković”, stručni suradnik na projektu „DNA identifikacija poginulih i nestalih u Domovinskom ratu” u laboratoriju za kliničku i sudsku genetiku na Kliničkom Zavodu za patologiju, sudsku medicinu i citologiju, KB Split. Suradnik je u dodiplomskoj nastavi na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) u Zagrebu, predavanja i vježbe u sklopu kolegija „Uvod u forenzičnu biologiju”. Područje znanstveno-istraživačkog interesa je precizna (personalizirana) medicina, sekvenciranje sljedeće generacije (NGS) u kliničkoj praksi, forenzična i populacijska genetika, molekularna antropologija te prenatalna dijagnostika. Objavio je 30-ak znanstvenih radova u CC časopisima, 50-ak priopćenja na domaćim i inozemnim skupovima i osam poglavlja u knjigama. Pomoćnik je urednika na nekoliko znanstvenih i stručnih knjiga/udžbenika *Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective*, Second Edition i knjiga sažetaka bienalnih ISABS kongresa (International Society for Applied Sciences). Sudjelovao je na 15-ak međunarodnih i domaćih znanstvenih projekata. Trenutno sudjeluje na projektu „Biokemijski i genetički mehanizmi u nastajanju ozljeda prednjeg križnog ligamenta: Novi koncept za prevenciju ozljeda”. Član je organizacijskog odbora ISABS Conference on Forensic and Anthropological Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine.

doc. dr. sc. Vedrana Škaro



Vedrana Škaro je tijekom dugogodišnjeg rada stekla iskustvo vezano uz analizu DNA koja se provodi kapilarnom elektroforezom, pirosekvenciranjem te sekvenciranjem nove generacije, a s primjenom u području forenzike i molekularne genetike. U više navrata vodila je uspostavljanje novih laboratorija uključujući validaciju i optimizaciju brojnih protokola analize DNA. Bila je predstavica Uprave za kvalitetu te stekla certifikat auditora za provođenje internih audita, u skladu s normom ISO 19011:2011 te certifikat za tečaj *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025)*. Sudjelovala je u provođenju brojnih nacionalnih i međunarodnih projekata. Više od dvadeset godina uključena je kao vanjski suradnik u izvođenju preddiplomske, diplomske i poslijediplomske nastave na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti u Splitu, Medicinskom fakultetu u Osijeku i Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Mentorica je dva diplomska rada te jednog učeničkog rada za školski projekt koji je nagrađen s *ISABS Future Scientist Award*. Komentorica jednog diplomskog rada i jednog učeničkog rada za državno natjecanje iz biologije. Voditeljica je pet stručnih praksi. Od 2011. do 2014. godine bila je tajnica ISABS-a, a od 2019. godine je rizičarka Hrvatskog društva za personaliziranu (preciznu) medicinu. Sudjelovala je u brojnim nacionalnim i međunarodnim radionicama i seminarima kao i znanstvenim skupovima na kojima je imala usmene i poster prezentacije. Koautorica je na više poglavlja u šest knjiga, četiri udžbenika, preko 20 znanstvenih radova citiranih u *Current Contents*, preko 10 radova u drugim časopisima, 40 sažetaka u zbornicima skupova. Prema Google Scholar podatcima od 13. siječnja 2025. godine ukupan broj citata objavljenih znanstvenih radova je 2125.

Životopisi suradnika

Amra Džuho, MSc



Amra Džuho je magistar genetike i bioinženjeringa s tezom posvećenom istraživanju varijacija u glavnom histokompatibilnom kompleksu (MHC) kod pacijenata oboljelih od COVID-19. Master studije je završila na Internacionalnom Burč Sveučilištu u Sarajevu. Posjeduje značajno iskustvo u molekularnoj dijagnostici, sekvenciranju nove generacije (NGS), te primjeni umjetne inteligencije u medicini. Trenutno obavlja dužnost višeg stručnog suradnika u Verlab Institutu i zamjenice izvršnog direktora Društva za medicinski i biološki inženjering BiH. Njeno istraživanje i profesionalni angažman usmjereni su na genetsku varijabilnost, bioinformatiku i digitalizaciju u zdravstvu. Aktivno sudjeluje u pripremi i realizaciji različitih lokalnih i međunarodnih projekata s ciljem edukacije mladih i uvođenja inovacija u društvo.

dr. sc. Dubravka Havaš Auguštin



Dubravka Havaš Auguštin znanstvena je suradnica i voditeljica Laboratorija za molekularnu genetiku i mikrobnu ekologiju Centra za primijenjenu bioantropologiju na Institutu za antropologiju u Zagrebu. Na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila je studij molekularne biologije te je doktorirala u području populacijske genetike. Izabrana je u zvanje znanstvene suradnice iz područja prirodnih znanosti, polja biologije. Iskustvo u forenzici stekla je u radu u Laboratoriju za analizu DNA u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić”. Njezin je primarni znanstvenoistraživački interes vezan za genetičku raznolikost i strukturu populacija šireg područja Hrvatske i Europe te je objavila brojne radove na temelju rezultata analiza mitohondrijske DNA, kromosoma Y i drevne DNA. U novije vrijeme bavi se genetičkom podlogom kompleksnih bolesti kao i istraživanjima mikrobioma i njegove povezanosti sa zdravljem. Sudjelovala je u brojnim domaćim i inozemnim istraživačkim projektima, kao što su FP7, NIH i Horizon Europe. Na vodećim europskim sveučilištima kontinuirano se usavršavala iz brojnih metoda i tehnika analiza u molekularnoj biologiji, kao što su analize molekularnih markera, drevne DNA i sekvenciranje sljedeće generacije na Illumina platformi.

doc. dr. sc. Jelena Šarac



Jelena Šarac viša je znanstvena suradnica na Institutu za antropologiju i naslovna docentica iz područja prirodnih znanosti, polja biologije na Fakultetu za biotehnologiju i razvoj lijekova Sveučilišta u Rijeci gdje drži kolegij „Populacijska genetika”. Na Institutu vrši funkciju voditeljice Laboratorija za molekularnu antropologiju, te zamjenice voditelja Centra za primijenjenu bioantropologiju. Njezin znanstveni interes su višegodišnje analize genetičke raznolikosti i strukture populacija istočnoga Jadrana te šireg područja Hrvatske i Europe na temelju molekularno-genetičkih biljega moderne i drevne DNA (mitohondrijske DNA i kromosoma Y) te proučavanje mikroevolucijskih, povijesnih i kulturnih procesa koji su oblikovali gensku zalihu navedenih populacija. Objavila je više od 40 znanstvenih radova i koautorica je na više znanstvenih i stručnih knjiga. Bila je suradnica na više međunarodnih (FP7, Horizon 2020, Horizon Europe, NIH) i nacionalnih (HRZZ, bilateralne suradnje) znanstvenih projekata, te je trenutno voditeljica tima Instituta za antropologiju u međunarodnom Horizon Europe projektu „Evidence Driven Indoor Air Quality Improvement (EDIAQI)“, gdje se bavi metagenomikom. Osim samog članstva u Međunarodnom društvu za primijenjene biološke znanosti (International Society of Applied Biological Sciences, ISABS), aktivno sudjeluje u organizaciji bienalnih međunarodnih ISABS konferencija.

Josip Crnjac, MSc



Josip Crnjac rođen je 1984. godine u Mostaru. Srednjoškolsko obrazovanje završio je u franjevačkoj gimnaziji „fra Dominika Mandića” u Širokom Brijegu, te diplomirao na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu 2009. godine. Volontirao je na projektu „Identifikacije žrtava Domovinskog rata”, a od 2011. zaposlen je na Sveučilišnom odjelu za forenzične znanosti. Kao asistent i predavač sudjelovao je u nastavi više kolegija iz područja forenzične biologije, genetike i istraživanja mjesta događaja. Prošao je brojne edukacije, napredne tečajeve analize krvnih mrlja u SAD-u i forenzične entomologije u Poljskoj. Upisan je na doktorski studij „Translacijska istraživanja u biomedicini”, a istraživanje je proveo u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić”. Stekao je certifikate iz područja analize DNA i rada u CODIS sustavu. Sudjelovao je u razvoju novih kolegija te popularizaciji znanosti. Autor je 13 znanstvenih radova i više kongresnih sažetaka. Trenutno je zaposlen kao voditelj Laboratorija za forenzičnu genetiku i biologiju i obavlja dužnost zamjenika pročelnika Sveučilišnog odjela za forenzične znanosti u Splitu te aktivno sudjeluje u domaćim i međunarodnim projektima.

dr. sc. Lana Salihefendić



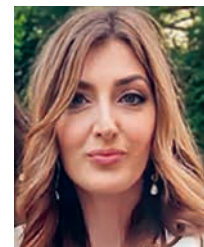
Lana Salihefendić rođena je u Sarajevu 1990. godine. Godine 2009. upisuje Prirodno-matematički fakultet Sveučilišta u Sarajevu i isti završava 2013. godine. Iste godine upisuje master studij, koji završava 2014. godine. Prvo iskustvo u molekularno-dijagnostičkoj praksi stiže u Kliničkom centru Sveučilišta u Sarajevu. Angažman u ALEA Genetičkom Centru počinje 2017. godine, gdje radi i danas. Doktorski studij upisuje 2019. godine na Burch Sveučilištu, te ga uspješno okončava 2022. Završni doktorski rad branila je iz područja personalizirane medicine, koja joj je i uža oblast istraživanja. Autorica i koautorica je 19 znanstvenih radova, te je kao istraživačica radila na tri znanstveno-istraživačka projekta. Živi i radi u Sarajevu.

prof. dr. sc. Larisa Bešić



Larisa Bešić je znanstveni istraživač i sveučilišni profesor s doktoratom iz genetike i bioinženjeringa te velikim iskustvom u primjeni biostatistike i implementaciji etičkih smjernica u znanstveno-istraživačkom radu. Kao vanredni profesor na Internacionalnom Burch sveučilištu, u svom nastavnom radu obuhvaća oblasti genetike, molekularne biologije i biostatistike. Njena istraživačka aktivnost uključuje rad na međunarodnim znanstvenim projektima i publikacije u renomiranim časopisima. Aktivno doprinosi jačanju etičkih standarda u nauci kao član etičkih odbora na nivou fakulteta i sveučilišta. Pored akademskog angažmana, posjeduje iskustvo u industriji, gdje je angažirana kao stručnjak za biostatistiku, s fokusom na analizu podataka i razvoj inovativnih metodologija za obradu istraživačkih rezultata.

izv. prof. dr. sc. Natalija Novokmet



Natalija Novokmet zaposlena je na radnom mjestu više znanstvene suradnice iz područja biomedicine i zdravstva, pomoćnica je ravnatelja na Institutu za antropologiju u Zagrebu te naslovna izvanredna profesorica na Prirodoslovno matematičkom fakultetu u Zagrebu. Srednjoškolsko obrazovanje stekla je u Centru za odgoj i usmjereno obrazovanje u Dubrovniku. Diplomirala je inženjerski smjer biologije (1996.) na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Završila je profesorski smjer biologije u okviru programa pedagoško-psihološke izobrazbe, Pedagogijskih znanosti Filozofskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (2000.). Magistrirala je u znanstvenom polju biologije (Biološka antropologija) (2007.), a doktorirala u znanstvenom području prirodnih znanosti, znanstvenom polju biologija, znanstvenoj grani genetika, evolucija i filogenija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (2011.). Mentorica je tri obranjena diplomatska rada i četiri disertacije. Sudjelovala je u radu šest međunarodnih i sedam domaćih znanstveno-istraživačkih projekata (FP7, NIH, IRI, HORIZON, HRZZ, MZORH), jednom infrastrukturnom projektu i jednom COST programu projektne suradnje. Rezultate svojih istraživanja objavila je u 36 znanstvenih radova te 40 priopćenja u autorstvu ili koautorstvu na znanstvenim i stručnim domaćim i međunarodnim skupovima. Područje znanstvenog interesa su analize genetičke raznolikosti i strukture populacija na temelju molekularno-genetičkih biljega i forenzičkih parametara, zatim istraživanje rizičnih faktora za razvoj nezaraznih bolesti, te kohortne studije rođenih i rani biološki rast i razvoj.

doc. dr. sc. Rijad Konjhodžić



Rijad Konjhodžić rođen je 1976. godine u Sarajevu. Diplomirao je na La Roche Sveučilištu 1998. godine, sa diplomama iz biologije i kemije. Doktorirao je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu 2014. godine. Osnivač je laboratorija za molekularnu dijagnostiku na Kliničkom centru Sveučilišta u Sarajevu, prvo na Institutu za Mikrobiologiju, a nakon toga i na Organizacionoj jedinici Kliničke Patologije. Također, prvi je koordinator DNK laboratorija Međunarodne komisije za nestale osobe (*International Commission On Missing Persons – ICMP*) i jedan od najodgovornijih za uspostavu protokola identifikacije nestalih bazirane na DNA. Od 2017. godine direktor je i suvlasnik Alea Genetičkog Centra. Zakleti je sudski vještak iz kriminalistike, područje analize DNA. Docent je na Fakultetu zdravstvenih studija na Sveučilištu u Sarajevu i autor većeg broja stručnih i znanstvenih radova.

1.

UVOD

prof. dr. sc. Damir Marjanović
prof. dr. sc. Dragan Primorac
prof. dr. sc. Adna Ašić

UVOD

Jedna od definicija pojma znanost jest da je to sveukupnost znanja, koje uključuje sistematiziranu opservaciju, eksperimentiranje i na kraju zaključivanje na znanstveno zasnovanim činjenicama (Waite, 1998). I pored svoje kompleksnosti, ona jasno ostavlja prostora da se informacije i podatci dobiveni znanstvenim procesom ne moraju skladištiti u amorfnj „hrpi dosadnih podataka”.

Današnji razvoj znanosti to i ne dozvoljava. Sve veći broj osoba koje budućnost traže u ovim vodama, uz često korištenje rezultata ostvarenih u nekom eksperimentu, unutar onoga što možemo nazvati svakodnevnim životom, uvjetovao je da znanost otvori svoja vrata širem dijelu društva, a samim tim je uvjetovao da i svoje osnovne postulate mora predstaviti na zanimljiviji, afirmativniji, konkretniji i prihvatljiviji način, o čemu smo iz prve ruke svjedočili tijekom pandemije COVID-19.

U tome posebno prednjače znanstvene grane koje su nastale sintezom više disciplina koje se na prvi pogled čine dosta udaljene jedna od druge i u sebi sublimiraju spoznaje iz dva ili više, ponekada i dijametralno suprotnih miljea. Tako su nastale moderne znanstvene grane, poput biotehnologije, koja predstavlja skup raznovrsnih oblika proizvodnje gdje kao sirovina služe najčešće organski materijali, a prerada se zasniva na djelovanju živih bića, njihovih dijelova i produkata (Berberović, 2005a). Ova grana izuzetno je dobar primjer uspješnog fenomena koji u samom nazivu naslućuje objedinjavanje u prvi mah nepomirljivih suparnika: biologije i tehnologije. Biotehnoške teorijske postavke naišle su na izuzetan spektar aplikacija u širokom rasponu znanstvenih disciplina (uključujući i forenzičku genetiku), ali i u drugim sferama ljudskog života.

Forenzička genetika svakako nije tako sveobuhvatna kao biotehnologija, ali definitivno je mlada i „drska” znanstvena disciplina, koja svoje mjesto u svijetu znanosti prvenstveno gradi na svakodnevnoj primjeni u širokom spektru društvenih aktivnosti. Ima sve predispozicije da u narednim desetljećima nastavi svoju

ekspanziju baziranu na akumulaciji spoznaja iz drugih znanstvenih disciplina, kako onih s prirodnjačkim, tako i onih s društvenim pedigreeom. Njena „bipolarnost” još je više izražena u odnosu na biotehnologiju, jer prva odrednica u njenom nazivu (forenzička) zadire u sustav kompleksnih znanstvenih postavki koje se povezuju kroz zajedničku primjenu u sudskim, policijskim i civilnim istragama, dok druga riječ (genetika) opisuje danas najkontroverzniju znanost u kojoj mnogi, kroz analizu i shvaćanje molekularne osnove života, traže odgovore opstanka *Homo sapiens* na planeti Zemlji. Slobodno se može zaključiti da je forenzička genetika jedan od klasičnih primjera znanosti 21. stoljeća, koja je davno prestala biti individualni sport i koja svoje postojanje ostvaruje isključivo kroz multidisciplinarni znanstveni, eksperimentalni, dedukcijski i induksijski pristup. Želi li se forenzička genetika sagledati, makar i djelomično, moraju se upoznati osnove i jedne i druge komponente, i to, po mogućnosti, kroz moder-niji stil pisanja znanstvene knjige, tj. sveučilišnog udžbenika.

1.1. TEMELJI FORENZIČKE ZNANOSTI

Trenutni trendovi u znanosti favoriziraju profesije koje su zasnovane na širokom spektru raznovrsnih spoznaja, fleksibilnosti i mogućnosti prilagodbe ubrzanim promjenama u znanstvenim i stručnim trendovima. Forenzička znanost odličan je primjer područja koje, bez ikakve sumnje, rapidno evoluirala (Houck i Siegel, 2006). Pored toga, forenzička znanost posljednjih je godina doživjela izuzetnu popularnost i izvan znanstvenih i stručnih krugova. Svoju medijsku ekspanziju, između ostalog, može zahvaliti i velikom broju televizijskih serijala koji su na hollywoodski način ispričali priču o funkcioniranju suvremenih forenzičkih laboratorija. Ono što svakako raduje jest činjenica da su se u tim slobodnim prezentacijama, a kroz stalne konzultacije s ekspertima, kreatori maksimalno trudili ispoštovati znanstvene forenzičke postavke, pa makar i u svom pojednostavljenom obliku. Ipak, ne treba čuditi činjenica da je veliki broj forenzičkih eksperata, gledajući te serije, više puta mogao primijetiti da se neke ekspertize i neki rezultati, bez obzira na „galopirajući” razvoj forenzičke znanosti u svim pravcima, još uvijek, mogu realizirati „samo na filmu”.

1.1.1. Što je forenzička znanost?

Jedna od najjednostavnijih definicija pridjeva „forenzičko” može se naći u Oxford rječniku engleskog jezika (Waite, 1998). Ova je riječ prema tom izvoru determinirana kao pridjev koji se često upotrebljava na sudu i označava „uplitanje” znano-

sti u rješavanje pravnih problema (Waite, 1998). Iz ovoga se može zaključiti da forenzičku znanost ili kolokvijalno forenzika, treba prihvatiti kao kompleksan i šarolik sustav. Takvo viđenje forenzičke znanosti opravdano je od prvoga dana i zasniva se na pružanju znanstvenih odgovora na veliki broj pitanja, prije nego se ona i konkretno postave na sudu. Ona počinje na mjestu zločina, a završava u sudnici (Walsh, 2007). Na taj način, znanost je bila u službi prava, a nadati se i pravde. S kvalitativnim i kvantitativnim povećanjem opsega pitanja na koja je trebalo odgovoriti, rasla je i forenzička znanost. Sadašnji trendovi ukazuju da će se taj rast nastaviti u gotovo svakom smislu na osnovu čega se može pretpostaviti da pred ovim područjem stoji zanimljiva i dinamična budućnost.

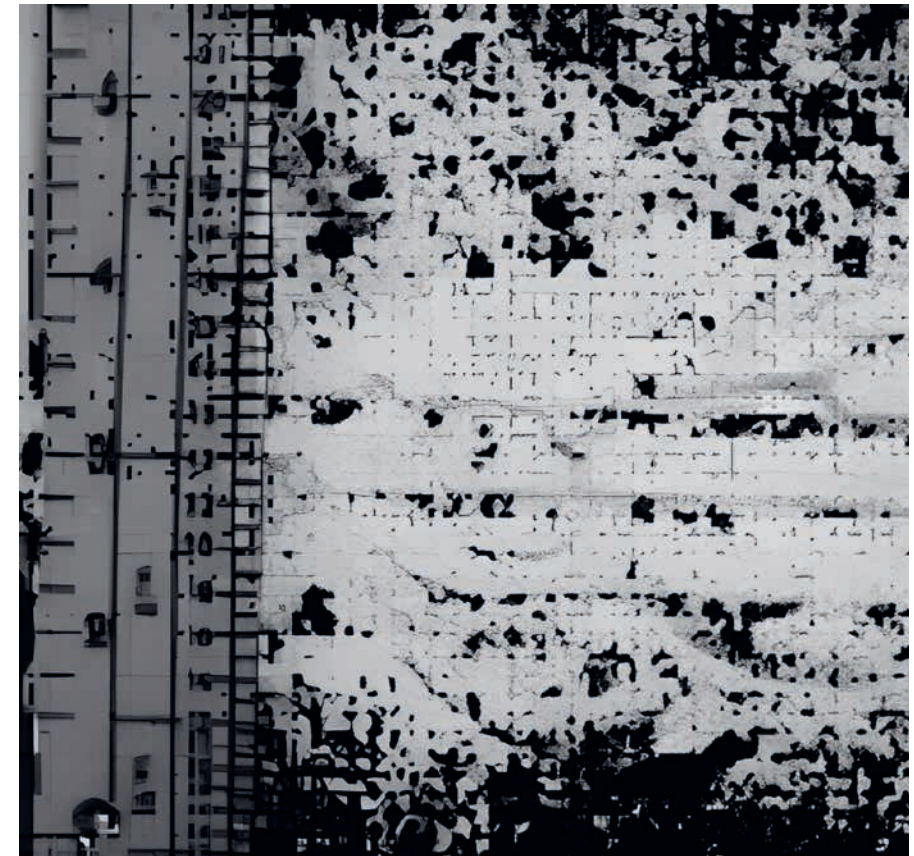
Prema svojoj definiciji, **forenzička znanost** predstavlja upotrebu znanosti u pravu (Siegel *et al.*, 2008). Ova disciplina bitno pomaže i olakšava u istragama i u donošenju presuda u kriminalističkim i civilnim slučajevima. Ona pojašnjava i opisuje povezanost ljudi, lokaliteta i predmeta uključenih u kriminalne aktivnosti. Analizira li se sam njen naziv i korijen riječi, može se dobiti jasnija predstava o svrsi njenoga postojanja. Naime, riječ forenzička ima izravan korijen od latinskog pridjeva *forensis* (javan, pogodan za sud javnosti) koji je, pak, izveden iz imenice *forum*, koja se u prenesenom značenju može prihvatiti kao javnost (Berberović, 2005b). U Starom Rimu, forumom je opisivano mjesto na kojem se sastajao Senat i predstavljao je javno mjesto gdje su se prezentirala i raspravljala politička i egzistencijalna pitanja. S druge strane, po predanju, rimske vlasti bi, kada bi pro-našle neku mrtvu osobu za koju ne bi znale uzroke smrti, njeno tijelo ostavljale na glavnom trgu (lat. *Forum Forensis Romanum*), tražeći od građana da pregledom tijela identificiraju ili utvrde način na koji je žrtva stradala (Modly *et al.*, 2008). Ovaj pojam i danas predstavlja isto i najčešće se povezuje s debatama i diskusijama vođenim u znanstvenoj i sveučilišnoj zajednici.

Opiše li se znanost jednom od mnogobrojnih definicija kao kolekciju sistematiziranih metodologija i objektivnih spoznaja koje se koriste u shvaćanju svijeta koji nas okružuje, onda dobivamo jasnu sliku. Znanost istovremeno obuhvaća cjelokupni sustav sređenih i povezanih objektivnih znanja o sebi i stvarnosti koja nas okružuje i proces prikupljanja i usvajanja takvih spoznaja. Dakle, statistički gledano, znanost je organizirani skup sređenih egzaktnih spoznaja o duhovnom i materijalnom svijetu; dinamički – ona je proces stjecanja (produkcije) i osvajanja (reprodukcije) tih podataka i znanja. Tako i forenzičku znanost možemo opisati kao profesiju znanstvenika koji pružaju znanstveno utemeljene odgovore na pitanja postavljena na sudu ili u sklopu policijskih i civilnih istraga, a u vidu pisanih i usmenih izvještaja i vještačenja (Walsh, 2007). S druge strane, forenziku, u slobodnom prijevodu, možemo okarakterizirati kao profesiju znanstvenika koji kroz svoje izvještaje i vještačenja odgovara na pitanja postavljena od strane suda (Houck i Siegel, 2006).

1.1.2. Područje forenzičke znanosti

Kao i svaka kompleksna pojava, forenzička znanost može se izdiferencirati na nekoliko osnovnih disciplina, tj. područja. Ta diferencijacija ne treba biti prihvaćena hijerarhijski po principu nadređenosti jedne drugoj, nego po principu stručnog i znanstvenog koegzistiranja različitih pristupa koji opstaju na njihovoj interakciji i razmjeni informacija. Postoji više različitih modela i pristupa u ovoj diferencijaciji. Neki od tih modela su bitno različiti, pa čak i kontradiktorni. Upravo zbog toga, ali i zbog lakše preglednosti, u ovoj je knjizi prikazana jedna vrsta „sinergičnog” modela. Bitno je napomenuti da je osnovna intencija u prezentiranju ovakvog tipa diferencijacije isključivo prezentacija širokoga spektra znanstvenog opusa forenzičke znanosti, a ne nametanje neke nove tipizacije pojedinih „forenzičkih grana”.

Kriminalistika se ponekad koristi i kao sinonim za forenzičku znanost, iako kriminalistika (lat. *crimen* – zločin) sublimira teoriju i aplikaciju znanosti isključivo o kaznenim djelima. Upravo zbog toga nije rijedak primjer da se znanstvenici i ostali zaposleni koji rade u forenzičkim laboratorijima, tj. forenzičari često nazivaju kriminalistima, što nije u potpunosti točno. Prema svojoj definiciji, kriminalistika je disciplina koja sistematski istražuje znanstvene metode, pravila i iskustva u neposrednom sprečavanju, otkrivanju i razjašnjavanju pojava kaznenih djela i utvrđivanju njihovih počinitelja (Pavišić i Modly, 1999). Cilj kriminalistike kao znanosti je da, na što učinkovitiji način, spriječi kaznena djela i otkrije njihove izvršitelje. Ta činjenica ukazuje na široki i složeni sadržaj ove discipline, ali isključivo vezan za njenu upotrebu u kaznenim, a ne građanskim slučajevima. Korijen ove riječi može se naći u njemačkom jeziku (njem. *Kriminalistik*) i ona se koristi da bi ujedinila različite znanstvene i tehnološke metode koje se koriste u kaznenim istragama (Houck i Siegel, 2006). Ipak, u recentnoj postavci stvari, kriminalistika, tj. kriminalistička tehnika kao njena glavna grana, prvenstveno je usmjerena na prikupljanje dokaza koje realiziraju kriminalistički tehničari te na njihovu laboratorijsku analizu koju realiziraju sudski eksperti, tj. forenzičari. To prikupljanje i ispitivanje tragova može biti različito determinirano, a bazirano je upravo na različitoj prirodi pronađenih tragova. Sama analiza tragova obuhvaća njihovu identifikaciju (utvrđivanje kemijske i fizičke prirode traga), klasifikaciju (svrstavanje traga u određenu skupinu tragova) i individualizaciju (utvrđivanje konkretnog izvora traga). Ponekad je u istragama dovoljno realizirati samo identifikaciju traga, no u većini slučajeva, a posebno u onima koji se zasnivaju na primjeni analize deoksiribonukleinske kiseline (eng. *deoxyribonucleic acid*, *DNA*) u sklopu forenzičko-genetičkih istraga, individualizacija traga je neophodan korak.



SLIKA 1.1. Analiza tragova guma jedna je od osnovnih kriminalističkih metoda koja se primjenjuje u širokom spektru istraga.

Danas se pod pojmom kriminalističke tehnike podrazumijeva kompleksna grana kriminalistike koja se bavi pronalaženjem, proučavanjem, prilagođavanjem i usavršavanjem najpogodnijih znanstveno-tehničkih metoda i sredstava za suzbijanje kriminaliteta iz područja tehničkih i prirodnih znanosti, a radi osiguranja, fiksiranja i tumačenja tragova u dokazne svrhe (Modly, 2008). Ona obuhvaća kriminalističku balistiku (istražuje materijalne dokaze u vezi s upotrebom vatrenog oružja), daktiloskopiju (analiziranje papilarnih linija), ispitivanje prometnih nezgoda, ispitivanje fizičkih tragova (npr. tragova guma, slika 1.1.), ispitivanje autentičnosti dokumenata i predmeta (slika 1.2.) i slično.



SLIKA 1.2. Ispitivanje autentičnosti sumnjivih novčanica predstavlja analizu koja se često koristi. Liberalizacija granica među zemljama otvorila je mogućnost lakšeg putovanja, ali i protoka lažnih novčanica (dijelovi slike preuzeti s <http://www.felixfinance.com>, pristup 26.1.2025.).

Forenzička patologija zasniva se na radu medicinski obrazovanih stručnjaka (liječnika, sudskih medicinara) koji su usko specijalizirani za ono što se kod nas u praksi naziva sudska medicina. Oni koriste svoja znanja iz područja kliničke i forenzičke patologije da bi, najčešće kroz autopsiju ili indirektnu analizu dostupnih dokumenata, odgovorili na pitanje pod kojim je uvjetima nastupila smrt osobe. Njihova intervencija je neophodna kada se radi o sumnjivim smrtnim slučajevima, pod nerazjašnjenim okolnostima (slika 1.3.) ili kada je potrebno napraviti sudsko-medicinsko vještačenje kod oštećene osobe. U posljednje vrijeme, traženje odgovora na ovo pitanje zahtijeva intenzivan timski rad stručnjaka različitih područja, pa forenzički patolozi intenzivno surađuju s toksikolozima, antropolozima, entomolozima i radiolozima (Houck i Siegel, 2006). Njihov posao često je vezan i uz posjećivanje mjesta zločina u cilju davanja preliminarnih smjernica u vezi s istraživanjem ubojstava.



SLIKA 1.3. Jedan od osnovnih ciljeva u forenzičko-patološkim analizama jest utvrđivanje uzroka smrti.

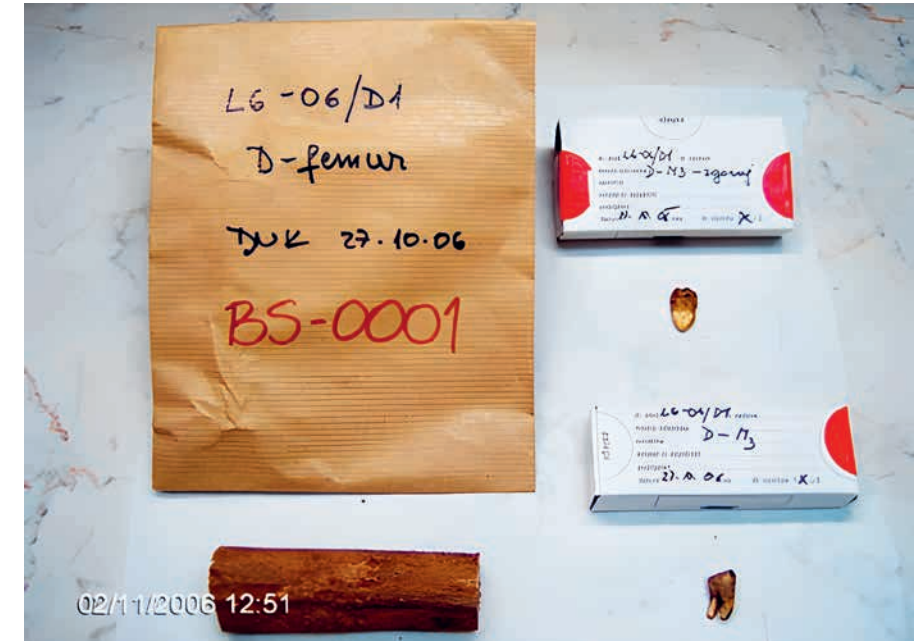
Forenzička antropologija podrazumijeva obradu različitih zbivanja bioantropološkim metodama, a u cilju rekonstrukcije tijeka događaja i identifikacije njihovih sudionika u sklopu sudskih, ali i policijskih istraga (Berberović, 2005b). Ipak, najčešća pitanja na koja forenzički antropolog treba odgovoriti su: jesu li pronađeni skeletni ostatci ljudskoga porijekla, te, ako pripadaju čovjeku, da se odrede spol, starost, visina, konstitucija i ostale biološke, ali po mogućnosti i socio-ekonomske karakteristike. U tu svrhu ona pribavlja i analizira što više antemortalnih i postmortalnih podataka, tj. podataka koji se vežu za jednu osobu (ljudsku individu) prije i poslije njene smrti, u cilju utvrđivanja stvarnoga identiteta osobe od koje potječu pronađeni skeletni ostaci (Houck i Siegel, 2006). U slobodnoj interpretaciji, forenzički antropolozi trude se nepoznatim skeletnim ostacima, sa što većom sigurnošću, „vratiti ime i prezime”. U pojedinim slučajevima, ako je to moguće, forenzičkog antropologa zanima i determinacija uzroka i način smrti, ali, za razliku od forenzičkih patologa koji isti problem rješavaju analizom na recentnijim skeletnim ostacima ispitujući promjene na



SLIKA 1.4. Slika masovne grobnice nastale krajem Drugog svjetskoga rata u Sloveniji. Prvi korak bio je utvrđivanje točnog broja osoba čiji su ostatci pronađeni u njoj i sklapanje pojedinačnih skeleta, što su radili forenzički antropolozi (slika preuzeta iz Marjanović *et al.*, 2007).

mekim tkivima, forenzički antropolozi primarno su fokusirani na ispitivanje skeletnih, raspadnutih ili spaljenih humanih ostataka (Cattaneo, 2007). Može se zaključiti da je danas rad forenzičkih antropologa nezamjenjiv u identifikacijama žrtava masovnih katastrofa, nesreća, terorističkih napada i ratnih sukoba (slika 1.4.). U tim aktivnostima, oni usko surađuju s forenzičkim patolozima, stomatolozima, genetičarima i na taj način izuzetno uspješno vraćaju identitet humanim skeletnim ostacima. Na prostorima Bosne i Hercegovine, ali i cijelog područja Jugoistočne Europe, posljednjih desetljeća forenzička antropologija s forenzičkom genetikom, omogućila je identifikaciju ljudskih ostataka žrtava rata, čiji se identitet nije mogao utvrditi klasičnim načinom, kao što je vizualno prepoznavanje, otisci prstiju, specijalna tjelesna obilježja (ožiljci, tetovaže), itd.

Forenzička stomatologija ima širok spektar primjene u okviru forenzičke znanosti, a posebno kod identificiranja žrtava na osnovu njihovog zubnog (dentalnog) statusa. Prema Sopheru, ova disciplina zasniva se na četiri osnovna načela (Sopher, 1976):



SLIKA 1.5. Zubi i koštani fragment prikupljeni s pronađenog skeleta i spremni za analizu DNA. Zubi su se često koristili u procesu DNA identifikacije žrtava rata na području država nekadašnje Jugoslavije kao polazni uzorci za analizu DNA. Nažalost, nepostojanje uređene zubne kartoteke u BiH nije dozvolilo da se osnovni principi forenzičke stomatologije koriste u svom punom kapacitetu.

- identifikaciji ljudskih ostataka dentalnim tehnikama
- identifikaciji počinitelja ugriza na temelju analize ugriznih rana
- utvrđivanju odgovornosti u liječničkoj pogrešci doktora stomatologije i
- medicinsko-pravnim aspektima pri traumama oralnih tkiva (Brkić, 2000).

Prvo od ovih načela najčešće je korišteno. Na osnovu toga, rad forenzičkih stomatologa prvenstveno se zasniva na komparaciji antemortalnih i postmortalnih podataka, o čemu će biti više govora nešto kasnije. Nažalost, veliko ograničenje u njihovom radu, posebno na našim prostorima, predstavlja neuredna i nepotpuna zubna kartoteka, zbog čega je teško sa sigurnošću pristupiti identifikaciji ljudskih ostataka na osnovu ovih parametara. Taj problem bio je izuzetno izražen u procesima identifikacije žrtava rata u bivšoj Jugoslaviji, pa su zubi primarno služili kao polazni trag za analizu DNA (slika 1.5.).

Forenzička arheologija može se definirati kao primjena arheoloških tehnika i metoda u kazneno-pravnim i građansko-pravnim istragama. Njena upotreba primarno se zasniva na znanju i iskustvu arheologa u činjenicama vezanim uz istraživanje mjesta zločina. Forenzički arheolog može odgovoriti na pitanja u četiri bitna područja forenzičke istrage:

- lociranje skrivenih skeletnih ostataka, tj. lociranje skrivenih grobnica (u najširem smislu te riječi)
- pravilno dokumentiranje i prikupljanje skeletnih ostataka, ali i ostalih tragova pronađenih na ispitivanom lokalitetu
- pravilna ekshumacija, odnosno iskopavanje, skeletnih ostataka i iskopavanje ostalih tragova
- prikupljanje dodatnih podataka vezanih uz lokalitet istraživanja koji kasnije mogu pomoći ostalim ekspertima, a posebno forenzičkim genetičarima, kao polazne informacije u njihovim analizama (Nawrocki, 2006).

Ovo posljednje područje odigralo je bitnu ulogu u pojedinim analizama skeletnih ostataka u ovoj regiji, jer su na osnovu ovih ulaznih informacija, forenzički genetičari, mogli pretpostaviti koji tip inhibitora analize DNA mogu očekivati u skeletnim ostacima, s obzirom na sastav tla u kojem su se kosti ili zubi nalazili. Na osnovu toga su mogli prilagoditi procedure analize, posebno izolacije DNA iz kostiju, u cilju eliminiranja ovih inhibitora. To je u najvećem broju slučajeva rezultiralo uspješnijim i bržim generiranjem DNA profila iz takvih uzoraka. Uzevši u obzir navedeno, ne čudi ekspanzija primjene ovog područja u širokom spektru istraga.

Forenzičko inženjerstvo podrazumijeva primjenu osnovnih principa inženjerstva u pripremanju analiza i izvještaja, tj. odgovora na pitanja postavljena u sklopu forenzičkih istraga, i to u više pravaca (Noon, 1992). Jedan od njih obuhvaća ispitivanje građevinskog materijala, konstrukcija, dizajna i drugih karakteristika u utvrđivanju uzroka urušavanja određenih građevinskih konstrukcija (zgrada, mostova, energetskih postrojenja i sl.). S druge strane, forenzičko inženjerstvo ima bitnu ulogu i u analizama koje se provode u istragama prometnih nezgoda u smislu ispitivanja ukupne ispravnosti vozila i pojedinih njegovih komponenti. U posljednje vrijeme, eksperti iz ovog područja daju bitan doprinos u rasvjetljavanju uzroka i posljedica terorističkih napada. Bez obzira o kojem se „tipu“ forenzičkog inženjerstva radilo, ono podrazumijeva angažman stručnjaka građevinskog, strojarškog, elektrotehničkog i drugih usmjerenja u odgovaranju na pitanja o uzrocima kolabiranja velikih građevinskih konstrukcija (slika 1.6.) ili o uvjetima pod kojima je došlo do otkazivanja pojedinih dijelova letjelica i automobila što, nažalost, po pravilu dovodi do nesreća koje mogu rezultirati velikim brojem žrtava.



SLIKA 1.6. Zgrada „Oslobodjenja” koja je potpuno uništena tijekom rata u Sarajevu. Urušavanje ove zgrade uzrokovano je granatiranjem i naknadnim požarima koji su izbili na građevini, a nisu bili gašeni. Stručnjaci forenzičkog inženjerstva na ovakvim primjerima mogu dobiti bitne informacije o ponašanju pojedinih građevinskih materijala u ekstremnim uvjetima (slika preuzeta s <http://www.oslobodjenje.ba>, pristup 26.1.2025.).



SLIKA 1.7. Forenzička toksikologija predstavlja sintezu disciplina poput analitičke i kliničke kemije te farmacije, u cilju potpomaganja istraga koje uključuju moguće korištenje otrova ili drugih kemijskih supstanci u različitim kaznenim djelima (slika preuzeta i prilagođena s <https://www.azolifesciences.com/article/RNA-based-Methods-for-Body-Fluid-and-Cell-Type-Identification.aspx>, pristup 14.1.2025.).

Forenzička toksikologija najčešće se definira kao primjena spoznaja iz toksikologije, farmakologije, analitičke i kliničke kemije u forenzičkim istragama trovanja, zloupotrebe droga i sličnim slučajevima. Ova disciplina može se podijeliti u tri osnovne poddiscipline:

- *postmortem* forenzička toksikologija (toksikološko ispitivanje posmrtnih ostataka u sklopu forenzičkih istraga)
- forenzička toksikologija živih pojedinaca (toksikološko ispitivanje provedeno na polaznim uzorcima prikupljenim od živih pojedinaca u sklopu forenzičkih istraga) i
- forenzičko testiranje droga (Levine, 2010).

U osnovi, toksikološka analiza uključuje kemijske analize tjelesnih tekućina i drugih uzoraka i tkiva s ciljem utvrđivanja postojanja ili nepostojanja različitih kemijskih supstanci u njima (slika 1.7.). Iskusan toksikolog je u mogućnosti odgovoriti u kojoj količini je u organizmu bila prisutna ispitivana supstanca i kakav je učinak ta supstanca mogla imati na ispitivanu osobu. Stoga forenzički toksikolog često i intenzivno surađuje s forenzičkim patologom, ali i drugim forenzičkim ekspertima.

U povijesti ljudskog roda, duga je lista osoba koje su ubijene ili su izvršile samoubojstvo primjenom različitih otrovnih supstanci. S druge strane, još je duža lista onih za koje se pretpostavlja, tvrdi, vjeruje ili sumnja da su njihove nerazjašnjene smrti povezane s trovanjem. Spisak korištenih otrova izuzetno je šarolik i još jednom dokazuje bezgraničnu ljudsku maštu kada je u pitanju eliminacija suparnika. U drugoj polovini 20. i početkom 21. stoljeća, pojavila se tendencija upotrebe otrovnih supstanci koje se teško detektiraju, kako prilikom njihovog „podmetanja” žrtvi, tako i prilikom forenzičko-toksikoloških ispitivanja uzroka smrti te osobe. Izuzetno zanimljiv slučaj koji se dogodio u prvom desetljeću ovog stoljeća, široj javnosti je prezentirao učinkovitu otrovnu supstancu, koja ranije nije bila korištena i koja, do tada, u najvećem broju slučajeva, nije ni bila obuhvaćena forenzičko-toksikološkim testovima u cilju dokazivanja njenog prisustva – polonij 210.

Polonij je radioaktivni kemijski element otkriven krajem 19. stoljeća od strane Marie Curie, koji nema stabilne izotope. Jedan od izotopa je polonij 210, čije je vrijeme poluraspada 138 dana. Može se naći u prirodi (u tlu i zraku), pa i u ljudskom tijelu u izuzetno malim količinama. Postoje istraživanja koja su još prije više od pola stoljeća ukazala da je polonij 210 prirodni sastojak duhana (Radford i Hunt, 1964). Ipak, da bi se ovaj radioaktivni izotop proizveo u većim, upotrebljivim količinama, stabilni produkt se mora bombardirati neutronima i ta se reakcija može odvijati samo u nuklearnom reaktoru. Ovaj element se u ljudskom tijelu ne može detektirati standardnim vanjskim skeniranjem tijela radioaktivnim detektorom. Potrebno je testirati feces ili urin ispitanika na prisustvo alfa radijacije. Alfa čestice koje emitira polonij 210 narušavaju strukturu stanice, fragmentiraju staničnu jezgru, narušavaju strukturu DNA i uzrokuju smrt stanice (Harrison *et al.*, 2007). Precizan opis simptoma trovanja ovim elementom ne postoji, no, na osnovu do sada malog broja opisanih slučajeva, stručnjaci su zaključili da uzrokuje velike poremećaje unutarnjeg metabolizma, trbušne infekcije, promjene na koži, opadanje kose i na kraju može dovesti do smrti. U povijesti forenzičke toksikologije, do sada je znanstveno potvrđen samo jedan slučaj trovanja polonijem 210 (Litvinenko slučaj), mada postoje indicije, koje nisu službeno dokazane i potvrđene, da je

polonij 210 odnio još žrtava (francuska znanstvenica Irene Joliot Curie, kojoj je kapsula s polonijem 210 eksplodirala u laboratoriju, palestinski političar Yasser Arafat, čiji su post mortem rezultati testiranja na polonij 210 bili nedovoljno jasni, te izraelski znanstvenik Dror Sadeh, koji je također bio izložen elementu u laboratoriju u kojem je radio).

Alexander Valterovich Litvinenko, kontroverzni bivši oficir sovjetske (KGB), a kasnije i ruske (FSB), tajne službe pao je u nemilost svojih nadređenih, prvenstveno zbog medijskih istupa u kojima je otkrivao činjenice koje su javno diskreditirale instituciju u kojoj je radio i ukazivale na veliki broj tajnih, i vjerojatno nezakonitih, aktivnosti koje je tajna služba navodno provodila. Zbog tih optužbi je 1999. i 2000. godine bio više puta uhićen, ali i oslobođen, u Rusiji, koju ubrzo nakon toga napušta, da bi se skrasio u Londonu 2001. U tom periodu započinje karijeru novinara i piše dvije knjige koje tadašnju vlast u Rusiji ne prikazuju u najboljem svjetlu. Pored toga, navodno radi kao konzultant za britansku tajnu službu (MI5 i MI6).

1. studenog 2006. godine, Litvinenkovo zdravlje se naglo pogoršalo. Brzo je prebačen u bolnicu i njegovo oboljenje se na početku tretiralo kao „misteriozna bolest“. Zdravstveno stanje mu je bilo gore iz dana u dan, što se jasno manifestiralo na njegov metabolizam i bilo je vidljivo golim okom (slika 1.8.). Nakon velikog broja toksikoloških analiza, toksikolozi zaposleni u britanskoj Agenciji za zaštitu zdravlja (engl. Health Protection Agency) su u Litvinenkovom tijelu dokazali signifikantno prisustvo radioaktivnog elementa polonija 210. Ta činjenica ukazala je na pretpostavku da je bivši ruski agent vjerojatno otrovan upotrebom ovog radioaktivnog



SLIKA 1.8. Forenzički toksikolozi su dokazali prisustvo polonija 210 za koji se pretpostavlja da je uzrok smrti Alexandera Valterovicha Litvinenka. a) Litvinenko prije trovanja; b) Litvinenko nakon trovanja (slika preuzeta s http://en.wikipedia.org/wiki/Alexander_Litvinenko#Poisoning_and_death, pristup 30.1.2025. godine).

elementa, mada to nikada nije potvrđeno od britanskih službenika (Dunkerley, 2011). Nakon njegove smrti, provedene su dvije odvojene policijske istrage u Velikoj Britaniji i Rusiji. Pored mnogo kontroverzi, pretpostavki, špekulacija koje su uobičajene za ovakve slučajeve, jedno u čemu se slažu eksperti iz obje države je da je Litvinenko otrovan polonijem 210, najvjerojatnije na način da mu je 1. studenog 2006. godine određena količina ovog radioaktivnog elementa dodana u čaj koji je popio.

Forenzička psihijatrija i forenzička psihologija pripadaju grupi znanstvenih disciplina koje proučavaju ponašanje organizma (engl. *behavioral sciences*), u ovom slučaju čovjeka, tj. interakciju čovjeka i njegove okoline. Svakako, forenzičku psihologiju i psihijatriju ljudsko ponašanje zanima s aspekta primjene znanstvenih spoznaja iz psihijatrije i psihologije u sklopu forenzičkih istraga i sudskih procesa (Turvey *et al.*, 2012). Ove dvije discipline usko su povezane i izuzetno slične, no postoji jasna razlika između forenzičkog psihijatra i forenzičkog psihologa. Tako forenzički psiholog primarno procjenjuje mentalno stanje ispitivane osobe, sposobnost osumnjičenog da sudjeluje u suđenju, vrši interpretaciju poligrafskih rezultata, vrši evaluaciju prilikom dodjele skrbnitstva nad djecom, itd. (Gregory, 2010). S druge strane, forenzički psihijatar u sklopu sudskih procesa primarno ispituje i dijagnosticira mentalno oboljenje ispitanika i eventualno propisuje mjere koje se trebaju poduzeti prema ispitaniku (Turvey *et al.*, 2012). Stručnjaci iz ovog područja pružaju i informacije koje pomažu u kreiranju psihološkog profila pojedinih osoba, pa čak i počinitelja kriminalnih radnji koji još nisu poznati, kada razotkrivanje njihovih psiholoških karakteristika može dovesti do uhićenja (Houck i Siegel, 2006). Često te informacije mogu bitno pomoći u predviđanju budućih aktivnosti ispitivanih subjekata.

Forenzička biologija najčešće se predstavlja kao aplikacija znanstvenih spoznaja iz područja biologije u kazneno-pravnom i građansko-pravnom istragama (Gunn, 2019). S obzirom na ovako „široku“ definiciju, često se forenzička genetika, pa čak i forenzička antropologija i forenzička stomatologija prikazuju kao grane forenzičke biologije. Ipak, moderniji pristup fokusira forenzičku biologiju na polja forenzičke botanike, mikrobiologije i entomologije, kao i animalne forenzike, te djelomično humane anatomije i fiziologije (Gunn, 2019).

Slično forenzičkoj biologiji, i **forenzička kemija** obuhvaća primjenu znanstvenih spoznaja, samo ovaj put iz kemije, u forenzičkim, a najčešće u kriminalističkim istragama. S obzirom na visok stupanj sličnosti metoda na kojima se ova grana

forenzičkih znanosti zasniva, eksperti iz ovog područja usko surađuju s toksikolozima, patolozima, antropolozima i drugim stručnjacima okupljenim u forenzičkom timu.

I na kraju, tu je **forenzička genetika**, koja je bila usko vezana i prihvaćana kao jedan od segmenata forenzičke biologije, ali njena upotrebna vrijednost, pouzdanost i multidisciplinarnost kojom povezuje različita područja, kao što su forenzička antropologija, patologija, odontologija, ipak su je promovirali u zasebnu cjelinu o kojoj će biti više riječi u narednim poglavljima.

1.1.3. Klasične kriminalističke metode identifikacije osoba i individualizacije humanih tragova

Utvrđivanje biološkog porijekla tragova pronađenih na mjestu zločina i identifikacija osoba, odnosno, potvrđivanje identiteta živih osoba ili posmrtnih ljudskih ostataka, jedan je od temeljnih zadataka koji se rješava primjenom određenih metoda u okviru forenzičkih istraga. Na ovome mjestu bitno je pojasniti određenu nepreciznost koja se može javiti u korištenju pojma identifikacija, tj. u nepreciznoj upotrebi pojmova individualizacija i identifikacija u forenzičkom (kriminalističkom) smislu. Naime, unutar same forenzičke znanstvene zajednice postoji određeno neslaganje vezano uz odnos pojmova identifikacija-individualizacija, a u posljednje vrijeme i identifikacija-klasifikacija-individualizacija-unikatnost. Dok jedni ne prihvaćaju koncept mogućnosti individualizacije uopće (Koehler i Saks, 2010), drugi govore o stupnju njegove gradacije (Kaye, 2009).

Kako je već navedeno, po prihvaćenom konceptu u ovoj knjizi, pojam forenzička identifikacija predstavlja utvrđivanje fizičkih i kemijskih karakteristika ispitivanog traga. Također, koristeći tu logiku, utvrđivanje identiteta pronađenih skeletnih ostataka ili pak utvrđivanje individualnog porijekla nekog biološkog traga predstavlja, ustvari, forenzičku individualizaciju. Dakle, kada se u preliminarnim analizama potvrdi da „trag koji je asociirao na krv „stvarno predstavlja krv humanoga porijekla, onda je taj trag identificiran. S druge strane, kada se utvrdi identitet osobe koja je ostavila taj trag krvi, onda se može izjaviti da je taj trag individualiziran. Ovaj pristup nije usmjeren ka presuđivanju tko je u pravu, a tko nije, u navedenim raspravama, jer obje strane iznose izvrsnu argumentaciju koja ide u njihovu korist, nego se bira jedan koncept koji se čini jednostavnijim za konačnu interpretaciju rezultata u forenzičkoj genetici.

Međutim, u forenzičkom žargonu, pa čak i znanstvenim knjigama i člancima, posebno u smislu utvrđivanja identiteta pronađenih skeletnih uzoraka, često se koristi pojam identifikacija, odnosno DNA identifikacija (engl. *DNA identification*). Stoga, da bismo izbjegli svaku nedoumicu, u ovoj knjizi će se za utvrđivanje

identiteta posmrtnih ljudskih ostataka i osoba koristiti pojam „identifikacija“, dok će se za utvrđivanje individualnog porijekla nekoga humanoga traga, tj. za utvrđivanje da određeni trag (otisak prsta, dlaka, krv i dr.) potječe od neke osobe, koristiti pojam „individualizacija“.

Ovisno o prirodi pronađenih tragova, koriste se različite metode koje se sastoje od nekoliko osnovnih sukcesivnih koraka, od kojih je najvažnija individualizacija, odnosno povezivanje traga s osobom, po mogućnosti samo s jednom. U daljem tekstu ukratko će biti elaborirane osnovne metode identifikacije ljudi i individualizacije tragova humanog porijekla. Intencija nije ulaziti u detalje svake od ovih kompleksnih metoda, već molekularne biologe i genetičare koji se žele usmjeriti u području forenzičke genetike upoznati s onim čime još kriminalistička znanost raspolaže u rješavanju zajedničkih problema. Na taj se način želi izbjeći uvriježeno mišljenje u pojedinim krugovima da su neke od klasičnih metoda prevladane i na neki način inferiorne u odnosu na analizu DNA. Naprotiv, ovim se želi naglasiti da je analiza DNA, bez obzira koliko moćna bila, samo jedno od oruđa koje se koristi u lepezi različitih metoda u rješavanju policijskih i pravnih istraga.

1.1.3.1. Identifikacija i individualizacija primjenom analize fenotipskih biljega

Pred kraj 19. stoljeća, talijanski doktor Cesare Lombroso postavio je hipotezu o čovjeku kriminalcu kao regresivnom koraku evolucije, prema kojemu je on korak nazad prema svijetu čovjekolikih majmuna. To je bio uvod u pokušaj antropološkog određivanja biološkog profila kriminalca na osnovu oblika glave, ušiju, lubanje itd. Ova ideja o „rođenjem predodređenim kriminalcima“ je 1883. godine pokrenula veliki projekt koji je koordinirao francuski znanstvenik Alphonse Bertillon, koji je radio u službi francuske policije. Svoja istraživanja fokusirao je na područje antropometrije, a u svrhu kreiranja identifikacijskog sustava zasnovanog na analiziranju fenotipskih karakteristika. Razvio je kompleksan sustav zasnovan na mjerenju velikog broja antropometrijskih mjera, ustanovljenih s fotografija osuđenika, u određivanju individualnih bioloških profila kriminalaca (slika 1.9., Bertillon, 1896). Sustav se zasnivao prvenstveno na mjerenju i usporedbi sljedećih fenotipskih karakteristika:

- 1) dužina i širina glave
- 2) dužina srednjeg i malog prsta lijeve šake
- 3) dužina lijevog stopala
- 4) dužina lijeve podlaktice
- 5) dužina desnog uha



SLIKA 1.9. Sustav koji je razvio francuski znanstvenik Bertillon zasnivao se na preciznom mjerjenju pojedinih antropometrijskih parametara u cilju potvrđivanja jedinstvenog identiteta svake osobe, a intenzivno je primjenjivan krajem 19. i početkom 20. stoljeća. Bitno je utjecao i na razvoj forenzičke fotografije kao nezaobilazne metode u forenzičkim istragama (dijelovi slike preuzeti s http://www.estt.ipt.pt/download/disciplina/2635__Bertillon.pdf, pristup 26.1.2025.).

- 6) ukupna tjelesna visina
- 7) dimenzije ispružene ruke
- 8) sjedeća tjelesna visina, točnije visina od klupe do vrha glave osobe koja sjedi.

Pored navedenog, analizirane su i ostale fenotipske karakteristike poput ožiljaka, neobičajenih tjelesnih obilježja (tetovaže, madeži, promjene na koži), boje očiju, kose i brade, te oblik nosa. Procijenio je da se detaljnom analizom 14 fenotipskih karakteristika, vjerojatnost postojanja dviju osoba s identičnim mjerama, svodi na 1 u 286 435 456.

Ovaj sustav bio je jako raširen i popularan u tom periodu, ne samo u Europi nego i u SAD-u i koristio se prvenstveno za praćenje zatvorenika. Naime, veliki broj zatvorenika koji je već služio kaznu u nekom zatvoru, kada bi ga uhvatili i osudili za neko drugo djelo u nekoj drugoj državi bi, u cilju ublažavanja kazne, poricao da je ikada prije bio u zatvoru. Uvođenjem Bertillonovog sustava, koji je omogućavao precizno, uniformirano i pouzdano kreiranje „fenotipskog profila” osuđenika, ova tvrdnja se pregledom arhive mogla i provjeriti. Međutim, 1903. godine cijeli je model doživio krah na slučaju dva zatvorenika, Willa i Williama Westa, koji su imali potpuno isti set svih mjera, a razlikovali su se jedino po otiscima prstiju, koje je Bertillon uporno odbijao uvrstiti u svoj originalni sustav. Iako je cijeli sustav na kraju u potpunosti odbačen, Bertillon se ipak smatra jednim od najznačajnijih ranih znanstvenika u području forenzičke znanosti, jer je optimizirao i unificirao metodu fotografiranja osumnjičenih/osuđenih osoba. U cilju dobivanja potpuno objektivne slike izumio je tzv. metrički uniformirano fotografiranje, koje podrazumijeva fotografiranje pod točno kontroliranim uvjetima, a sve s ciljem uspješnog naknadnog rekonstruiranja dimenzija objekta fotografiranja. Također, Bertillon se smatra ocem općeprihvaćene policijske fotografije koja, u najvećem broju slučajeva, podrazumijeva dvije fotografije uhapšenog, jedna frontalna, a druga iz profila (slika 1.10.).



SLIKA 1.10. Al Capone, Benito Mussolini i Alphonse Bertillon snimljeni u tehničar mugshot policijske fotografije (slike preuzete s <http://en.wikipedia.org/>, pristup 26.1.2025.).

Čini se da je najpoznatiji slučaj po kojem je Bertillonova klasifikacija postala poznata široj javnosti bio upravo onaj koji je uzrokovao njeno „stavlanje van upotrebe” početkom prošlog stoljeća. Iako pojedini autori u potpunosti dovode u pitanje autentičnost velikog broja detalja vezanih uz ovaj slučaj i prikazuju ga kao pretjerano naglašenu i djelomično modificiranu priču ranijih autora (Wilder i Wentworth, 1918), a u cilju promoviranja upotrebe otisaka prstiju (Cole, 2002), deskriptivnost i informativnost cijele priče vezane uz ovaj slučaj ne gubi na vrijednosti. Naime, 1903. godine, zatvorenik Will West, prilikom njegovog inicijalnog fotografiranja u zatvoru u Leavenworth, tvrdio je da nikada prije nije bio osuđivan. Sumnjičavi zatvorski činovnik (M. W. McClaughry), primijenivši usporedbu dosjea napravljenih na osnovu Bertillonovog sustava klasifikacije, utvrdio je da već postoji zatvorenik pod imenom William West sa skoro identičnim „fenotipskim profilom”, ali da je on osuđen još 1901. godine na doživotnu robiju zbog ubojstva i da se već nalazi u istom zatvoru. Utvrđeni antropometrijski profili ove dvije osobe su se skoro u potpunosti poklapale (Bathke, 1990). Tek je naknadna analiza otisaka prstiju (provedena 1905. godine), koju je Bertillon poznao, ali ju je osporavao i



SLIKA 1.11. Will West (a) i William West (b) snimljeni u tehnici mugshot policijske fotografije i otisci prstiju (dijelovi slike preuzeti iz Lynch, 2003).

smatrao tek pomoćnim oruđem u utvrđivanju identiteta, pokazala da su Will West i William West uistinu dvije različite osobe, za koje se pretpostavlja da su bile u bliskome srodstvu, mada ni do danas ova tvrdnja, kao i stupanj njihovog potencijalnog srodstva, nije dokazana (slika 1.11.).

Zanimljivo je da je otac M. W. McClaughrya, poznati R. W. McClaughry, bio upravitelj zatvora u Leavenworthu. Pored toga što je bio izuzetno cijenjena osoba u svojoj struci, znalo se da je ujedno i veliki pobornik Bertillonovog sustava. No, nakon ovog slučaja nije se nimalo dvoumio i bio je jedan od prvih službenika koji je inzistirao na instaliranju opreme za analizu otisaka prstiju u zatvoru u Leavenworthu. To se dogodilo 1904. godine i ta je oprema korištena upravo za dokazivanje različitih identiteta Willa i Williama Westa. Ovaj slučaj dokazao je da Bertillonov sustav klasifikacije uistinu funkcionira, ali da bi trebao biti proširen primjenom daktiloskopske analize, protiv koje se Bertillon tako zdušno borio. Međutim, nedugo nakon ove epizode, ovaj model klasifikacije je u potpunosti napušten.

1.1.3.2. Identifikacija i individualizacija putem otiska prsta

Otisak prstiju (engl. *fingerprint*) već je dugi niz godina glavni biljeg koji se koristi u forenzičkoj znanosti za identifikaciju i individualizaciju (Houck i Siegel, 2006). Svoju pravu vrijednost daktiloskopija je dosegla kada je Ivan Vučetić uveo sustavni model istraživanja i klasifikacije otisaka prstiju i realizirao prvu kriminalističku individualizaciju na osnovu otisaka prstiju koje je na mjestu zločina ostavila Francisca Rojas. Sustav klasifikacije otisaka prstiju koji je još i danas u upotrebi, razvio je početkom 20. stoljeća Edward Henry (Houck i Siegel, 2006) i već dulje od jednog stoljeća uspješno se primjenjuje u forenzičkim istragama. Ipak, ovaj sustav se sve više zamjenjuje automatiziranim sustavom identifikacije otiska prsta, tzv. AFIS-om (engl. *automated fingerprint identification system*), koji djelomično obuhvaća parametre analize koje je Henry uspostavio.

Dermatoglifi su crteži koje epidermis tvori na jagodicama prstiju ruku i nogu te na dlanovima (slika 1.12.) i tabanima. Prisutni su ne samo kod ljudi, nego i kod svih primata. Zanimljivo je da su kod repatih primata (npr. paukoliki majmun) primijećene slične tvorevine na repu. Njihova je individualnost veoma brzo primijećena i poznata već stoljećima, tako da postoje izvori koji ukazuju na činjenicu da se još 200 godina pr.n.e. u Kini otisak prsta u glinenom pečatu koristio kao svojevrsan potpis na ugovorima. U proteklih više od 100 godina koristi se u forenzičkim i populacijsko-genetičkim studijama. Polovinom dvadesetog stoljeća, Cummins i Midlo daju detaljnu klasifikaciju otisaka prstiju, ali

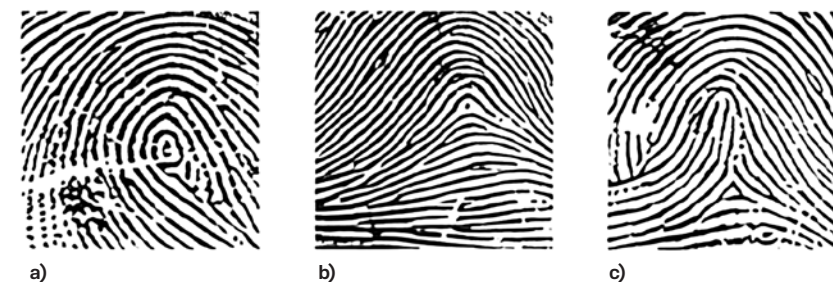


SLIKA 1.12. Postojanje otiska dlana univerzalno je svojstvo svake ljudske individue. S druge strane, specifični otisak dlana jedinstven je za svaku osobu.

usporedo s tim detaljno opisuju njihovu asimetriju, osnove embriologije i nasljeđivanja te uočene spolne varijacije. Također, ovi znanstvenici jasno determiniraju metodu uzimanja otisaka prstiju (Houck i Siegel, 2006).

Dermatoglifi se razvijaju između 7. i 21. tjedna prenatalnog razvoja, i to iz zametnih listića mezoderma i ektoderma. Ono što ih čini izuzetnim individualnim biljegom jest činjenica da se nakon toga, osim u slučajevima ozbiljnih i dubokih povreda, oni ne mijenjaju tijekom cijeloga života, te da ni jednojajčani blizanci nemaju identičan motiv papilarnih linija. Upravo ta činjenica im i danas daje prednost nad analizom DNA u slučajevima individualizacije jednojajčanih blizanaca.

Prilikom ispitivanja dermatoglifa, mogu se analizirati njihova kvantitativna i kvalitativna svojstva. Kvantitativna svojstva su diferencirana u osnovne tri grupe: gustoća crteža (broj triradiusa na pojedinom prstu), veličina crteža (broj grebena na vršku pojedinog prsta između triradiusa i središta crteža) i ukupan



SLIKA 1.13. Osnovna kvalitativna svojstva papilarnih linija a) petlja (vrtlog), b) luk, c) spirala. Aproximativna frekvencija pojavljivanja navedenih kvalitativnih svojstava iznosi: petlje 60%, spirale 30%, lukovi 5%, a ostale rijetke konfiguracije 5%.

broj grebena. Broj i širina grebena nasljeđuju se po poligenom modelu bez dominacije, što znači da se ta svojstva teže mijenjaju, manje su podložna genetskom otklonu (driftu) i mikroevolucijskim promjenama, te pokazuju osnovnu strukturu populacije. Kvalitativna svojstva odnose se na detekciju crteža i njihovu determinaciju u lukove, vrtloge te ulnarne ili radijalne petlje (slika 1.13.).

Dermatoglifi se također mogu koristiti kao kriterij za sličnost ili različitost među populacijama, odnosno za proračun tzv. bioloških udaljenosti, što omogućuje praćenje čitavog niza antropoloških i populacijsko-genetičkih fenomena

Metode analize dermatoglifa koje se koriste u forenzici često se opisuju pod pojmom daktiloskopija. Daktiloskopija je, po svojoj definiciji suvremena i najsigurnija metoda utvrđivanja identiteta osoba na temelju papilarnih linija. Daktiloskopski karton (engl. *fingerprint card*, slika 1.14.) je specijalni, manje-više uniformni obrazac namijenjen za potrebe daktiloskopske registracije (Korajlić *et al.*, 2012).

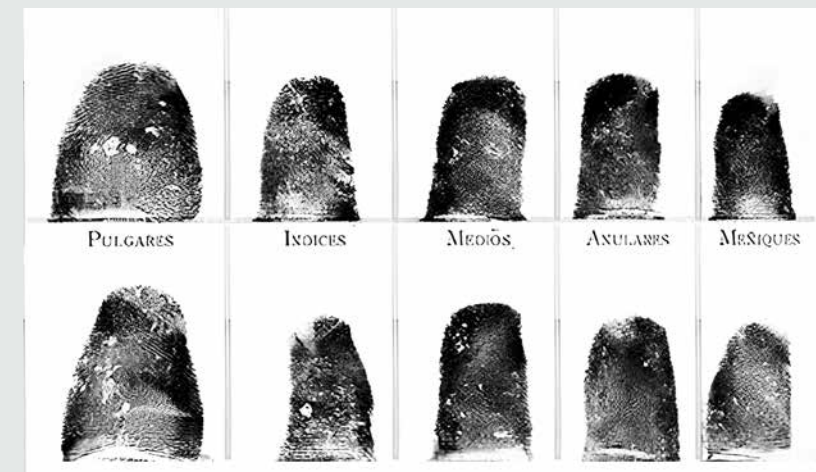
Da bi se dobili upotrebljivi tragovi, potrebno je poznavati metode fiksiranja tragova, načina pakiranja, sredstava za pakiranje i osnovne uvjete čuvanja ovih tragova (Bojanić i Milosavljević, 2008). Osnovna podjela ovih tragova je na vidljive i nevidljive (latentne). Vidljivi se lako daju analizirati, dok se nevidljivi tragovi moraju tretirati određenim reagensima kako bi se vizualizirali. Sredstva koja se koriste za detekciju ovih tragova mogu se zasnivati na adsorpciji sredstava za izazivanje na ostatke voštanih materija, masti i vlage u papilarnim linijama ili na kemijskim reakcijama detekcijskim kemikalijama s ostatcima znoja u tragu. U te svrhe najčešće se koriste daktiloskopski prašci (argenotorat, crni grafitni prašak, magnetni prašak i dr.). U velikom broju zemalja, uključujući i zemlje regije, postoje sustavi za automatsku analizu otisaka prstiju koji se služe standardiziranim procedurama i obrascima u svojoj bazi podataka, a u cilju što brže i točnije pretrage te baze.

APPLICANT		TYPE OR PRINT ALL INFORMATION IN BLACK		FBI	
SIGNATURE OF PERSON FINGERPRINTED		LAST NAME	AKA	FIRST NAME	MIDDLE NAME
RESIDENCE OF HEADQUARTERS		DATE OF BIRTH	DOB		
DATE		CITIZENSHIP	TYPE	SEX	HAIR
SIGNATURE OF OFFICIAL TAKING FINGERPRINTS		DATE	TIME	PLACE	ROOM
EMPLOYER AND ADDRESS (if applicable)		CLASS	LEAVE BLANK		
TRADE OR PROFESSION		SOCIAL SECURITY NO.	CLASS	LEAVE BLANK	
		IDENTIFICATION NO.	CLASS	LEAVE BLANK	
		IDENTIFICATION NO.	CLASS	LEAVE BLANK	
1. R. THUMB		2. R. INDEX			
3. R. MIDDLE		4. R. RING			
5. R. LITTLE		6. L. THUMB			
7. L. INDEX		8. L. MIDDLE			
9. L. RING		10. L. LITTLE			
LEFT FOUR FINGERS TAKEN SEPARATELY		RIGHT FOUR FINGERS TAKEN SEPARATELY			

SLIKA 1.14. Ogladni popunjeni daktiloskopski karton (engl. FBI Fingerprint Card) kakav koristi Federalni istražni ured (eng. Federal Bureau of Investigation, FBI), obavještajna i sigurnosna služba Sjedinjenih Država i njihova glavna savezna agencija za provođenje zakona. (dijelovi slike preuzeti s <http://www.highered.nysed.gov/tcert/ospra/samplefpcard.html>, 19.1.2025.).

Otisci prstiju su svoju prvu službenu forenzičku primjenu doživjeli krajem 19. stoljeća, točnije 1892. godine. Argentinka Francisca Rojas prijavila je Pedra Ramóna Velázquezu da je počinio ubojstvo njene djece, šestogodišnjeg sina i četverogodišnje kćeri. Kao motiv za ovaj zločin navela je osvetu zbog toga što je prethodnog dana odbila seksualni odnos s njim. Navodno se ubojstvo dogodilo u njenoj kući, točnije u spavaćoj sobi. Gospođa Rojas tvrdila je da je vidjela Velázquezu kako bježi iz njene kuće. Osumnjičeni je uhapšen i ispitan, navodno, primjenom poprilično grubih metoda, koje bi se danas smatrale zlostavljanjem, a sve u cilju

dobivanja priznanja da je on počinitelj ovog zločina. Međutim, i pod takvim pritiskom, Velázquez je odbijao priznati zločin. Zaintrigiran ovim slučajem, Ivan Vučetić, argentinski antropolog hrvatskog porijekla, koji je radio kao policijski službenik, odlučio je primijeniti, u tadašnje doba novu, neispitanu metodu analize otiska prstiju. Na vratima spavaće sobe pronađen je krvavi otisak prsta (palca) koji se u potpunosti poklapao s otiskom palca gospođe Rojas (slika 1.15.). Pod pritiskom ovog dokaza, gospođa Rojas priznala je da je ona počinila ubojstvo svoje djece, da bi se mogla udati za svog tadašnjeg partnera koji ih nije volio. Osuđena je na doživotni zatvor i tako je postala prva osoba koja je osuđena temeljem primjene otiska prsta.



SLIKA 1.15. Otisci prstiju uzeti od Francisce Rojas, koji su omogućili prvu pozitivnu individualizaciju primjenom metode otiska prstiju. Ovu analizu je napravio znanstvenik Ivan Vučetić, koji je prvi primijenio Galtonovu metodu opisanu u knjizi *Finger Print* (dijelovi slike preuzeti s <http://www.nlm.nih.gov>, 19.1.2025.).

Kratak pregled najvažnijih događaja vezanih uz primjenu otisaka prstiju

- 1684.** Engleski liječnik i botaničar N. Grew je publicirao prvi znanstveni rad o brazdastim strukturama kože.
- 1685.** G. Bidlo i M. Malpighi su objavili knjigu anatomije u kojoj opisuju brazdaste strukture na prstima.
- 1788.** Njemački anatom J.C. Andreas Mayer objavljuje da su otisci prstiju unikatni za svaku osobu.

- 1858. W.J. Herchel je inicirao opsežno ispitivanje otisaka prstiju u Indiji.
- 1880. H. Faulds publicira bitan znanstveni članak u časopisu „Nature“, opisujući koncept identifikacije na osnovu otisaka prsta, no nažalost, taj koncept je tada odbacila policija Velike Britanije.
- 1892. F. Galton objavljuje knjigu pod nazivom Finger Prints.
- 1892. I. Vučetić, Argentinac hrvatskog porijekla, realizira prvu kriminalističku individualizaciju primjenom otiska prsta. On dokazuje da je Francisca Rojas ostavila svoje otiske prsta na mjestu ubojstva, i time dokazuje njen zločin (slika 1.15).
- 1897. Otvoren je prvi ured za istraživanje otisaka prstiju u Kalkuti, Indija.
- 1901. Scotland Yard formira ured za ispitivanje otisaka prstiju.
- 1902. Izvedena je prva upotreba otisaka prstiju u SAD-u u civilne svrhe.
- 1903. Usporedbom otisaka prstiju napravljena je distinkcija između Willa Westa i Williama Westa, koji su po tada važećem sustavu individualizacije zatvorenika (Bertillonov sustav) bili identificirani kao ista osoba. Ovaj slučaj je doveo do odbacivanja ovog sustava individualizacije kao pouzdanog.
- 1911. Thomas Jennings je prva osoba koja je u SAD-u na osnovu analize otisaka prstiju osuđena za ubojstvo Charlesa Hillera.
- 1924. FBI započinje pohranjivanje otisaka prstiju.
- 1980. FBI započinje kompjutorsku pretragu FBI baze podataka otisaka prstiju.
- 1999. Početak rada Integriranog automatiziranog sustava identifikacije otisaka prstiju tj. IAFIS-a (engl. Integrated Automated Fingerprint Identification System), najveće svjetske forenzičke baze podataka otisaka prstiju.

1.1.3.3. Identifikacija putem zubnog kartona

Uža specijalnost znanstvenika iz područja forenzičke stomatologije je identifikacija ljudskih individua na osnovu njihovog **zubnog statusa**. Osnivačem ove metode identifikacije ljudi smatra se Amerikanac Paul Rever, koji je još krajem 18. stoljeća postavio njene osnovne premise. Ipak, prva masovna identifikacija humanih ostataka primjenom ove metode realizirana je stotinjak godina kasnije, 1897. godine u Parizu prilikom identifikacije 117 žrtava nastradalih u požaru koji je zahvatio jednu od velikih pariških zatvorenih tržnica.

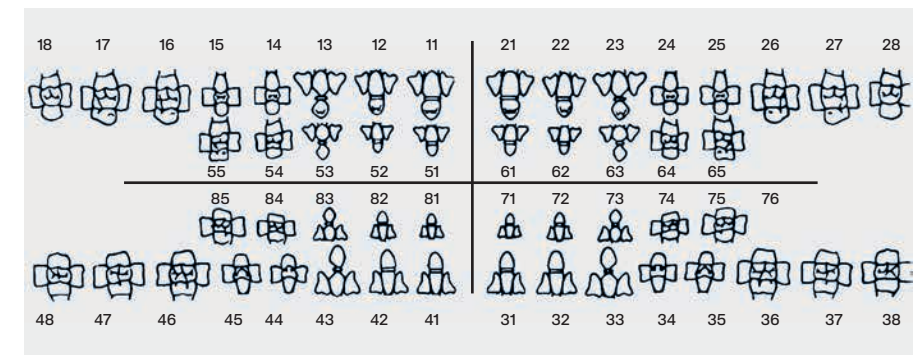
Zubalo čovjeka je polifiodontno, što znači da se tijekom rasta i razvoja pojavljuju dva osnovna oblika: mliječno zubalo (lat. *dentis decidui*) i trajno zubalo (lat. *dentis permanentes*). Mliječnih zuba ima ukupno 20, dok trajnu denticiju čine ukupno 32 zuba (Brkić, 2000).

Identifikacija putem zubnog statusa najčešće se provodi na osnovi usporedbe dostupnih antemortalnih i postmortalnih podataka. Da bi se to realiziralo, bilo je neophodno optimizirati univerzalni pristup u nomenklaturi, tj. šifriranju svakoga zuba. Postoji više načina označavanja zuba i svaki od njih ima svoje prednosti i mane. Pod utjecajem informatizacije i upotrebe računala u kliničkoj i znanstvenoj stomatologiji, Svjetska stomatološka organizacija je prije 50-ak godina pripremila jedinstven dvobrojni sustav primjenjiv. Od nastanka pretrpio je određene optimizacije, pa je primjena danas znatno kompleksnija, ali i informativnija.

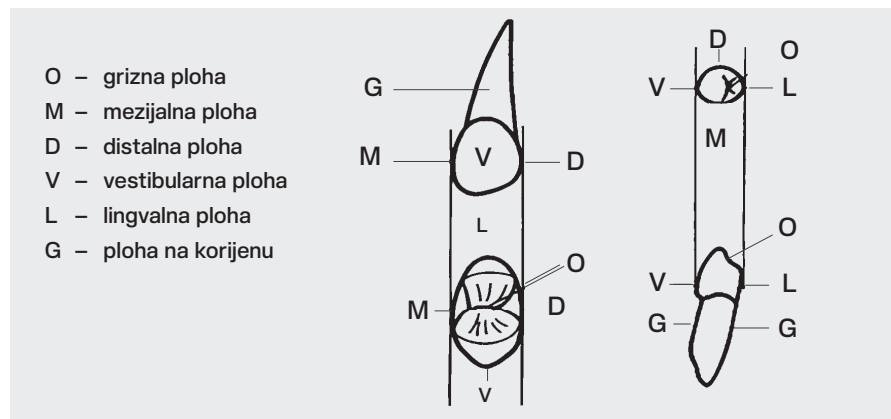
Prema tom sustavu, trajni zubi obilježeni su brojevima od 1 do 8 u svakom kvadrantu. Prvi broj (1-4) označava kvadrant, krećući se u smjeru kazaljke na satu i počevši od kvadranta gore lijevo u usnoj šupljini, a drugi broj označava zub. Mliječni zubi se također označavaju arapskim brojevima (1-5), ali brojevi koji obilježavaju kvadrant usne šupljine počinju brojem 5 (gore lijevo), 6 (gore desno), 7 (dolje desno) i 8 (dolje lijevo). Cijeli prostor usne šupljine podijeljen je na sekstante i označava se od 03 do 08, dok se cijela usna šupljina označava s 00, gornja čeljust 01 te donja čeljust 02. Međutim, u modernim dentalnim obrascima, mogu se primijeniti i druge, relativno slične metode (slika 1.16.).

Svaki zub ima nekoliko anatomskih dijelova i svaki od njih ima svoju slovnu oznaku: O – grizna ploha, M – mezijalna ploha, D – distalna ploha, V – vestibularna ploha, L – lingvalna ploha i G – ploha na korijenu (slika 1.17.).

Najčešće metode kojima se koriste forenzički eksperti iz ovog područja jesu rendgenski snimak (slika 1.18.) i uzimanje otiska zubala. Upotrebom npr. Rendgenskih zraka stvara se kompletna slika zubnog stanja ispitivane osobe, ali se također može utvrditi i rekonstruirati tijek svih, za života urađenih, intervencija na zubima i na ostalim dijelovima vilice. Komparativna analiza ovih podataka uzima u obzir brojno stanje zuba i kvalitativno-kvantitativne promjene na njima. Često se na osnovu analize odnosa razvoja sjekutića, očajnika, pretkutnjaka i



SLIKA 1.16. Standardna shema za obilježavanje zuba i zubnih ploha (dijelovi slike preuzeti iz Brkić, 2000).



SLIKA 1.17. Kratice za označavanje zubnih ploha (dijelovi slike preuzeti iz Brkić, 2000).

kutnjaka mogu rekonstruirati značajni individualni podatci ispitivane osobe, te se na taj način može značajno pomoći pri kreiranju individualnog profila žrtve.

Sve što se zabilježi, mora se unijeti u predviđeni obrazac. Prema preporukama Svjetske stomatološke organizacije i Međunarodne organizacije kriminalističke policije (eng. *International Criminal Police Organization*, INTERPOL, najveća svjetska policijska organizacija koja olakšava policijsku suradnju i kontrolu kriminala diljem svijeta), predloženi su obrasci (formulari) za identifikaciju žrtava (engl. *INTERPOL Disaster Victim Identification (DVI) Form*)



SLIKA 1.18. Rendgenski snimak kompletne zubne čeljusti (slika preuzeta s <http://www.quarkt.com/>, pristup 30.1.2025. godine).

Data Post-Mortem

Data Ante-Mortem

SLIKA 1.19. Obrasci za identifikaciju žrtava kakve koristi Međunarodna organizacija kriminalističke policije (eng. *International Criminal Police Organization*, INTERPOL). F1 (žuti) služi za upisivanje dentalnih obilježja prije smrti. F2 (ružičasti) služi za upisivanje svih dentalnih obilježja nakon smrti (dijelovi slike preuzeti s <http://www.quarkt.com/>, pristup 26.1.2025.).

prepoznatljive žute i ružičaste boje, označeni kao F1, odnosno F2. U obrasce žute boje upisuju se sva dentalna obilježja prije smrti, dok se u obrasce ružičaste boje upisuju sva dentalna obilježja nakon smrti (slika 1.19.).

Poznavanje dentalne anatomije, ali i fiziologije, veoma je značajno jer se na osnovu stanja zuba, tj. na osnovu morfoloških promjena na njima mogu analizirati određene navike ispitivane osobe, npr. tipovi hrane koju je konzumirala. Zanimljivo je da je na osnovu analize mikrostrukture zuba, kao i na osnovu njihove biokemijske analize, moguće s visokim stupnjem sigurnosti pretpostaviti u kojoj regiji je osoba rođena ili živjela. Jako zanimljiva istraživanja iz ovog područja realizirana su i na skeletnim ostatcima neandertalca (*Homo neanderthalensis*) i dala su zanimljive rezultate vezane uz njihove migracije.

Osnovni problem koji se nameće u primjeni ovoga tipa identifikacije je neadekvatna organiziranost zubnih kartona, posebno u zemljama naše regije. U tim slučajevima, napravljeni zubni karton arhivira se i po potrebi upotrebljava za komparacije drugih parametara i karakteristika, kao što su tehnike intervencija provedenih na zubima, postojanje kamenca na njima i sl.

1.1.3.4. Identifikacija i individualizacija skeletnih ostataka

Forenzički antropolozi, kao jedan od svojih primarnih ciljeva, izdvajaju identifikaciju osoba na osnovu analize pronađenih **skeletnih ostataka**. Slučajevi kojima se sudski antropolog bavi mogu se najčešće svrstati u dvije osnovne kategorije: analizu potpuno nepoznatih ostataka i analizu ostataka za koje postoje pretpostavke identiteta (Brkić *et al.*, 2004).

Prilikom identifikacije ljudskih ostataka, posebno u identifikaciji žrtava masovnih katastrofa, nesreća ili ratnih sukoba, veliku ulogu može odigrati analiza predmeta pronađenih uz ljudske osteološke ostatke (osobni dokumenti, nakit, odjeća – slika 1.20.) ili iskaz očevidaca. U tim slučajevima antropolog pred sobom ima drugu kategoriju slučaja u kojoj za osnovni cilj ima potvrditi ili odbaciti mogućnost identifikacije. Ipak, ovakve analize predmeta same po sebi nikako se ne smiju uzeti kao jedini parametri identifikacije, jer nisu rijetke situacije kada različiti svjedoci identificiraju da je isti predmet pripadao različitim nestalim osobama, ali ni situacije da su ljudi u ratu razmjenjivali odjeću i druge osobne predmete. Stoga se ovaj pristup može koristiti samo u kontekstu rezultata drugih analiza (analize skeletnih ostataka, dentalnih analiza i na kraju analize DNA). Sudsko-antropološka analiza može se definirati kao algoritam sastavljen od otvorenih sukcesivnih pitanja u kojem odgovor na svako prethodno pitanje usmjerava stručnjaka na pravac koji bi trebao pratiti u narednim fazama analize.



SLIKA 1.20. Knjiga sa slikama pronađenih stvari koje je Međunarodna komisija za nestale osobe (eng. *International Commission on Missing Persons, ICMP*) pripremila da bi pospješila identifikaciju žrtava rata u Bosni i Hercegovini (slika preuzeta s <http://www.ic-mp.org>, pristup 30.1.2025. godine).

Prva dva pitanja sa kojima se antropolozi susreću su: jesu li pronađeni tragovi uopće kosti i, ako jesu, potječu li od čovjeka. Ova nedoumica posebno dolazi do izražaja kada pronađeni skeletni ostatci ne sadrže cijele kosti, već nedefinirane koštane fragmente. Ljudske i životinjske kosti imaju svojstva koja se mogu razlikovati po morfološkim karakteristikama (veličini zglobnih ploha, razvijenosti mišićnih hvatišta, debljini kompaktne kortikalne kosti i sl.), radiološkim karakteristikama (trabekularnosti spužvastih kostiju, postojanju ili nepostojanju jasne granice između korteksa i trabekule i sl.) i mikroskopskim karakteristikama (tkivna i stanična anatomska svojstva). Nije rijetkost da potvrđivanje vrste od koje potječu takvi tragovi zahtijeva detaljnu mikroskopsku analizu stanične anatomije, a na kraju i analizu DNA.

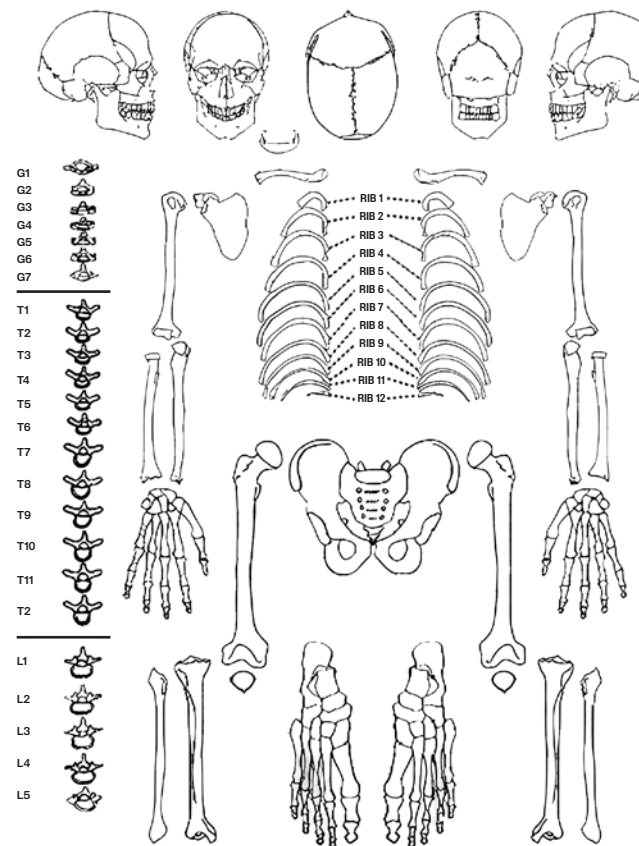
Ako se potvrdi ljudsko porijeklo kostiju, utvrđuje se radi li se o recentnim ili arheološkim skeletnim ostacima. U toj analizi, važnu ulogu igraju položaj tijela pri ukopu, materijalni ostatci pronađeni uz tijelo i vizualni pregled osteološkog materijala, koji obuhvaća analizu parametara kao što su stupanj uništenosti vanjskog korteksa, boja i postojanje/nepostojanje masnog sloja na površini kosti, stupanj izbjeljivanja kosti, itd. Svakako, najprikladnija i najpreciznija metoda je analiza radioaktivnih izotopa ugljika, tzv. ^{14}C metoda datiranja, iako se ona češće koristi u svrhe utvrđivanja aproksimativne starosti arheoloških koštanih uzoraka. U ovoj fazi ispitivanja, posebno ako se radi o masovnim grobnicama, značajnu ulogu imaju forenzički arheolozi.

Sljedeći korak je utvrđivanje broja osoba u prikupljenom uzorku. Naime, posebno u slučajevima analiza masovnih grobnica, često se u jednom uzorku prikupljenom na terenu nalaze ostatci više osoba. Metoda se bazira na analizi broja pojedinih koštanih elemenata, primjerice, ako su u uzorku prisutna tri femura, može se pretpostaviti da se radi o ostacima najmanje dvije osobe.

Nakon navedenih preliminarnih testova slijedi jako važan korak generiranja biološkog profila, primarno temeljem sastavljenog skeleta žrtve. U najvećem broju slučajeva, na osnovu skeleta moguće je odrediti spol žrtve, pretpostaviti biološku starost u trenutku smrti, visinu, konstituciju, pa čak i rasnu pripadnost. Ovaj korak uveliko ovisi o uspješnoj rekonstrukciji skeleta žrtve. Masovne grobnice, kao što je ranije navedeno, predstavljaju jedan od najboljih primjera na kojima se mogu uočiti svi izazovi rekonstrukcije skeleta. One mogu ponuditi različite opcije. Ako se radi o masovnoj grobnici u kojoj su tijela slagana po određenom redoslijedu, onda sastavljanje svakog tijela ponaosob ne predstavlja veliki problem. Međutim, broj takvih masovnih grobnica je izuzetno mali. Češći su primjeri da su žrtve bile samo „odlagane” bez ikakvog reda na određenom lokalitetu, pa su se tijekom vremena kosti različitih osoba izmiješale, te je potrebno pomno analizirati svaki koštani uzorak u cilju njegovog povezivanja s pravim tijelom. Najveći problem predstavljaju tzv. sekundarne grobnice koje podrazumijevaju

grobnice u kojima su locirana tijela inicijalno pokopana na nekome drugom mjestu i koja su iz određenih razloga naknadno premještena na novu lokaciju. Rat u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini je za posljedicu imao prvo sustavno kreiranje tercijarnih masovnih grobnica u povijesti ratovanja. U takvim se grobnicama često mogu naći samo skeletni fragmenti i nepotpuni individualni ostatci, što bitno otežava njihovu ponovnu integraciju u individualni skelet.

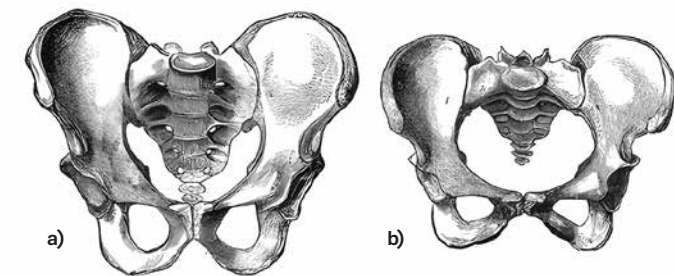
U slučajevima kada je skelet uspješno rekonstruiran primjenjuju se različite antropometrijske, točnije, osteometrijske metode, kojima se pokušavaju odrediti neke individualne osobine žrtve, ali i neke grupne karakteristike koje bi pomogle u utvrđivanju njenog porijekla određenoj populaciji (slika 1.21.).



SLIKA 1.21. Shema ljudskog skeleta preuzeta iz *Post-mortem Victim Identification* obrasca, čijim se popunjavanjem pokušavaju istovremeno rekonstruirati osnovni podatci o osobi koji bi se mogli upotrijebiti u njejoj uspješnoj identifikaciji.

Određivanje spola prvi je korak k uspješnom kreiranju biološkog profila i ono se realizira prvenstveno na osnovu analize zdjeličnog obruča (ako je prisutan) koji se bitno razlikuju kod žena i muškaraca. Naime, zdjelična kost kod žena znatno je šira nego kod muškaraca, gornji veliki sjedni urez (lat. *incisura ischiadica maior*) kod žena je znatno širi i obično zatvara kut od 60 stupnjeva, dok je kod muškaraca uži i zatvara upola manji kut od 30 stupnjeva, aurikularna zglobova ploha je veća i plosnatija kod muškaraca, itd. (slika 1.22.). Mnogi antropolozi navode i lubanju kao ključni skeletni element u uspješnoj determinaciji spola žrtve. Prema Nacionalnoj forenzičkoj bazi podataka SAD-a, za određivanje spola na temelju lubanje potrebno je analizirati 34 standardne mjere (Houck i Siegel, 2006). U toj analizi koriste se kompleksni statistički pristupi prilikom procesiranja dobivenih informacija, a u posljednjih dvadesetak godina razvijeni su visokospecijalizirani softveri koji se koriste u te svrhe. Sudski antropolog koji je imao iskustva s određenom populacijom vrlo vjerojatno može pravilno odrediti spol osobe na osnovu lubanje u 80-90% slučajeva (Zečević, 2004). Polazna premisa ovakve analize zasniva se na činjenici da muškarci imaju veću i robusniju lubanju s većim mastoideusima i s jače izraženim mišićnim hvatištima, posebno u nuhalnom području. Ostali parametri koji se promatraju jesu zakošenost i zaobljenost čela, veličina i oblik orbita, jagodičnih kostiju, mandibula itd.

Detaljna kvalitativno-kvantitativna analiza dugih kostiju također može dati solidne rezultate u određivanju spola osobe. Generalni je zaključak da su duge kosti muškarca duže, robusnije i šire. Danas se koriste mnoge formule za izračunavanje graničnih vrijednosti dužine pojedinih dugih kostiju koje se mogu pripisati muškom ili ženskom spolu. Međutim, ovaj se princip nikako ne može promatrati kao univerzalno rješenje jer je ovaj parametar izuzetno varijabilan između različitih populacija, a primijećeni fenomen „akceleracije rasta” kroz generacije je svakako jedan od bitnih elemenata koji treba uzeti u obzir u ovim kalkulacijama. Na kraju, bitno je spomenuti da određivanje spola kod skeletnih ostataka djece s jedne, i kod odraslih osoba s druge strane, zahtijeva primjenu različitih kriterija.



SLIKA 1.22. Komparativna analiza zdjelične kosti (a) muškarca i (b) žene.

Drugo pitanje nakon određivanja spola jest koliko je stara bila osoba u doba smrti. Odgovor na ovo pitanje može biti samo procjena koja je manje ili više precizna. Ova analiza također zahtijeva komparaciju s dostupnim podacima za konkretnu populaciju. Najčešći pristup je da se žrtva svrsta u jednu od sljedećih skupina (klasa): fetalna (smrt nastupila prije rođenja), beba (0-3 godine), dijete (3-12 godina), adolescent (12-20 godina), mlađa odrasla osoba (20-35 godina), odrasla osoba (35-50 godina) i starija odrasla osoba (preko 50 godina). To se najčešće radi na osnovu analize dimenzija cijeloga skeleta i njegovih pojedinih dijelova, analize kronologije razvoja zuba, analize dužine dugih kostiju, pojavljivajanja i nivoa fuzije različitih epifiza (Greulich i Pyle, 1959) kod djece i adolescenata ili analize morfoloških karakteristika pubične simfize (Brooks i Suchey, 1990), statusa rebara, promjena na aurikularnoj plohi bočne kosti (Lovejoy, 1985), itd.

Nakon toga, u kreiranju individualnog antropološkog profila pronađenih skeletnih ostataka, slijedi aproksimacija ukupne visine (na temelju dimenzija dugih kostiju), određivanje populacijske pripadnosti (detaljna analiza lubanje) te pronalaženje individualnih obilježja (lomovi pojedinih kostiju, tragovi operativnih zahvata, degenerativni procesi i sl.). Ipak, u posljednjih 20-ak godina, svaka od ovih analiza koristi se zajedno sa svim dostupnim informacijama i uz analizu DNA.

Identifikacija žrtava masovnih katastrofa (rata, avionskih nesreća, prirodnih nepogoda...) otežana je jer je često veliki broj tijela pokopan u zajedničkim grobnicama, a *antemortem* podatci nisu uvijek dostupni (Gunby, 1994). Razvoj novih tehnologija analize autosomne i mitohondrijske DNA pružio je forenzičarima novo oruđe za identifikaciju. Štoviše, analiza DNA postala je metoda koja se koristi za potvrdu ili opovrgavanje rezultata prethodnih analiza, čak i u slučajevima kada je stupanj prepoznatljivosti i mogućnosti identificiranja tijela relativno dobar. Usljed brzog raspadanja tijela pronađenih u ratu ili masovnim katastrofama, forenzičari se za identifikaciju žrtava sve češće služe isključivo analizom DNA iz koštanih ili zubnih ostataka (Gaensslen i Lee, 1990). Uzorci kostiju dulje će se održati zbog svoje trajnosti. Nekoliko autora naglašava kako su za veći postotak uspješne identifikacije od velike važnosti metode izolacije DNA koje prethode samoj amplifikaciji DNA (Burgi, 1997; Fisher *et al.*, 1993; Hochmeister *et al.*, 1991; Ortner *et al.*, 1992). Nadalje, naglašava se kako je analiza mtDNA najbolji izbor ukoliko se radi s visoko degradiranim materijalom. Međutim, korištenjem izmijenjenih standardnih postupaka izolacije DNA te višekratnim pročišćavanjem izolirane DNA (repurifikacija), utvrđeno je da uspješnost identifikacije putem genomske DNA može biti iznad 96% (Alonso *et al.*, 2001; Anđelinović *et al.*, 2005; Keys *et al.*, 1996; Primorac 1999; Primorac *et al.*, 1996). Također je primijećeno da analize zubnih ostataka u usporedbi s rezultatima analiza dugačkih kostiju daju bolje rezultate u 20% do 30% svih analiziranih slučajeva (Primorac, 1999).

Identifikacija žrtava masovnih grobnica iz Drugog svjetskog rata (Škofja Loka, Slovenija)

U proljeće 2007. godine, ekshumirane su dvije masovne grobnice na lokalitetu Lovrenske Grape, u blizini grada Škofja Loka, Slovenija. Locirane su na osnovu izjava svjedoka, prema kojima su u većoj masovnoj grobnici (u kojoj se nalazilo 20 skeleta) počivali ostaci lokalnih stanovnika koji su pogubljeni po završetku Drugog svjetskog rata po nalogu pripadnika tadašnjeg Odjeljenja za zaštitu naroda (OZNA – sigurnosno-obavještajna služba SFRJ Jugoslavije), dok su u manjoj grobnici (u kojoj se nalazilo 7 skeleta) počivali ostaci njemačkih vojnika koji su pogubili zarobljenike iz veće masovne grobnice. Naime, prema zabilježenim svjedočenjima pripadnici OZNA-e naredili su njemačkim vojnicima da iskopaju obje grobnice, strijeljaju zarobljenike i da ih pokopaju u većoj grobnici, a zatim su sami strijeljali njemačke vojnike i pokopali ih u manjoj grobnici.

Par bitnih činjenica upućivalo je na istinitost ovih tvrdnji. U prvoj grobnici tijela su bila uredno poslagana i zakopana. dok su u manjoj grobnici tijela bila samo nabacana. Također, u manjoj grobnici pronađeni su ostaci njemačkih uniformi. Na kraju, analizom DNA, koja je realizirana u Institutu za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju u Sarajevu, identificirano je čak šest osoba iz veće grobnice, ali nijedna iz manje, što je bilo očekivano jer su referentni uzorci sakupljeni samo od potencijalnih srodnika Slovenaca. Svi navedeni podatci ukratko prikazuju neophodnu sinergiju svih dostupnih podataka u cilju identifikacije žrtava masovnih katastrofa i ratnih događanja (Marjanović *et al.*, 2007). Stoga je važno da su u realizaciji ovoga projekta zajedno sudjelovali bosanskohercegovački i slovenski forenzički genetičari, arheolozi i antropolozi.

Osim u forenzičke, analiza kostiju i skeletnih ostataka može se primijeniti i u razne druge svrhe, a jedna od zanimljivijih je istraživanje evolucijskog razvoja vrste prilikom kojeg se rezultati analize kostiju neandertalaca pronađenih tijekom arheoloških istraživanja uspoređuju s rezultatima analize kostiju modernog čovjeka (*Homo sapiens*). Ispod navodimo kratak pregled najinteresantnijih studija na ovu temu.

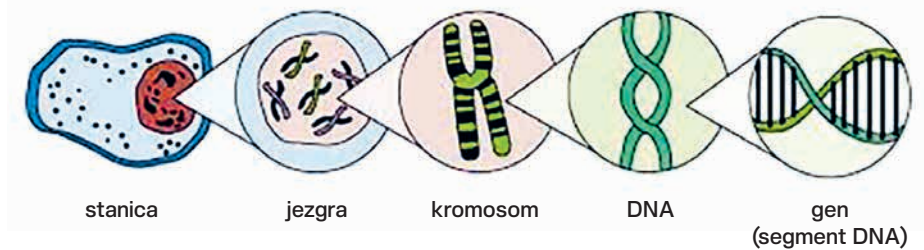
Metodom geometrijske morfometrije, analizirane su kvantitativne razlike između sljepoočnih kostiju kod neandertalaca i modernog čovjeka, i to na uzorku od 270 kostiju modernog čovjeka i 12 uzoraka za koje se vjeruje da potječu od neandertalaca. Ova metoda je bila uspješna u klasifikaciji ove dvije grupe uzoraka

i njihovom jasnom razdvajanju na osnovu niza izmjerenih razlika (Harvati, 2003). Kasnije su se studije bazirale na bedrenu kost i podlakticu (De Groote, 2011a, 2011b). Analizom zakrivljenosti bedrene kosti kod skeletnih ostataka neandertalaca i *H. sapiens*a iz doba gornjeg paleolitika, te modernog čovjeka, iz recentnih populacija, ali i iz arheoloških nalazišta, pronađena je značajno veća zakrivljenost bedrene kosti kod uzoraka neandertalaca. Ovi rezultati upućuju na zaključak da su neandertalci bili fizički aktivniji od modernog čovjeka, kao i da bi ove razlike mogle biti uvjetovane evolutivnim silama, poput genetskog drifta i prirodne selekcije (De Groote, 2011a). Druga studija usporedila je dvije velike kosti podlaktice, ulnu (lakatnu kost) i radius (palačnu kost), koristeći iste uzorke kao u prethodnoj studiji. Morfologija podlaktice kod neandertalca pokazala je da je u pitanju struktura koja je rezultirala iz adaptacije na hladnoću, kao i da su njihove podlaktice jače u pokretima pronacije i supinacije u odnosu na modernog čovjeka (De Groote, 2011b). Na kraju, 2018. godine je u blizini Vicenze u Italiji pronađen mliječni očajnik, koji je po morfologiji i rasporedu gustoće cakline klasificiran kao zub neandertalskog djeteta, što je potvrđeno analizom mtDNA. S obzirom na nedostatak arheoloških i drugih podataka o mliječnim zubima predaka modernog čovjeka, ova studija ne samo da je dokazala prisustvo neandertalaca na području sjeveroistočne Italije, nego je doprinijela uspješnom pohranjivanju novih podataka o anatomiji neandertalaca u usporedbi s modernim čovjekom (Romandini et al., 2020).

1.2. OSNOVNI MODELI MOLEKULARNE GENETIKE

1.2.1. Stanica

Sva živa bića građena su od stanica, koje istodobno predstavljaju najmanje strukturne i funkcionalne jedinice našeg organizma (slika 1.23.) (Bajrović *et al.*, 2005). U prirodi ne postoje stanice koje bi se mogle smatrati tipičnim, budući da su u raznim organizmima, organima i tkivima specijalizirane u odnosu na funkciju i imaju svoje osobitosti. S obzirom na opći stupanj organizacije, razlikuju se dvije osnovne kategorije stanica: *prokariotska (protocit)* i *eukariotska (eucit)*. Prokariotske stanice imaju jednostavniju organizacijsku strukturu. One nemaju organiziranu jezgru, već je jezgrin materijal raspršen u citoplazmi i naziva se *nukleoid*. U prokariotskim stanicama ne postoje ni citoplazmatske organele, kao što su mitohondriji, kloroplasti i dr. Organizmi s prokariotskim stanicama nazivaju se *prokarioti*, a ovoj grupi pripadaju bakterije, aktinomicete i cijanobakterije. Prokarioti se razmnožavaju jednostavnim dijeljenjem stanice na dvije jedinice. U uspo-



SLIKA 1.23. Stanica kao osnovna funkcionalna i građevna jedinica svih organizama je i skladište nasljednog materijala koji se nalazi u jezgri i mitohondriju (preuzeto i prilagođeno s <http://www.cancermoonshotlund.com/index.php/6-what-are-genes-dna-and-proteins/>, pristup 26.1.2025.).

redbi s prokariotskim organizmima, stanična organizacija eukariota je na znatno složenijem stupnju. Stanica eukariota ima tri jasno izdvojene cjeline: citoplazma, jezgra i membrana (Tablica 1.1.). Ovaj tip stanične organizacije je manje-više zajednička i opća karakteristika svih protista i višestaničnih biljaka i životinja.

Oblik i veličina stanica su veoma različiti, ne samo u jednom organizmu, već i unutar istog tkiva. Postoje stanice promjenjivog (ameba, leukociti) i relativno stalnog oblika (cilijati, eritrociti, spermatozoidi, epitelne stanice, živčane stanice, itd.). Po obliku, stanice mogu biti loptaste, polikutne, prizmatične, vretenaste, zvjezdaste, nitaste, itd. Oblik stanice zavisi od površinskog napona i viskoznosti citoplazme, a također i od mehaničkog djelovanja okolnih stanica.

Obujam i veličina stanica također su veoma različiti. I kod biljaka i kod životinja postoje veoma krupne stanice koje se mogu vidjeti golim okom. Takve su, naprimjer, veoma krupne stanice lubenice ili gigantske stanice žumanjka jaja nekih ptica. Isto tako, veoma su krupne živčane stanice, čija veličina dostiže i desetke centimetara. Prosječna veličina većine stanica relativno je stalna i ne ovisi o veličini tijela nekog organizma. Naprimjer, stanica jetre goveda i miša gotovo su identične veličine. Veličina stanica mijenja se sa starošću organizma, što ovisi o njegovom fiziološkom stanju i vanjskim uvjetima. Među pojedinim grupama organizama postoje značajne razlike u veličini stanica. Kod biljaka, najkrupnije stanice imaju jednosupnice, a kod životinja insekti i vodozemci.

Broj stanica koje ulaze u sastav pojedinih tkiva veoma je različit. Tako, broj eritrocita u krvi čovjeka premašuje 23 milijarde. Postoje organizmi čije je tijelo sastavljeno od nekoliko stotina stanica, a također i organizmi sastavljeni iz samo jedne stanice, kakvi su jednostanične alge, bakterije, neke gljive i praživotinje. Pretpostavlja se da je ljudski organizam građen od oko 200 različitih vrsta stanica dok je ukupan broj stanica prosječne muške osobe 36 bilijuna, a ženske oko 28 bilijuna. Osnovna genetička informacija smještena je u jezgri, dok se u citoplazmi

TABLICA 1.1. Osnovne organizacijske i funkcionalne strukture ljudske stanice.

Membrana	Fosfolipidni dvosloj
	Citosol
Citoplazma	Endoplazmatska mrežica
	Ribosomi
	Mitochondriji
	Golgijev aparat
	Lizosomi
	Centrosomi
	Jezgra
	Jezgrin sok
	Jezgrica
	Kromosomi

nalaze brojne stanične strukture koje održavaju stanicu na životu. Jedna od tih struktura, važna za proizvodnju stanične energije, su *mitochondriji*. S forenzičkog stajališta, mitochondriji su važni jer sadrže mitochondrijsku DNA (mtDNA), koja se nasljeđuje izravno putem majčinske linije (o mtDNA bit će više riječi u poglavlju posvećenom toj temi). Pretpostavlja se da ljudska stanica sadrži 100 – 10 000 mitochondrija, ovisno o energetske potrebe pojedine stanice, gdje svaka od njih posjeduje više cirkularnih kopija mtDNA koja, pak, sadrži 16 569 bp (baznih parova ili parova baza). Upravo ova činjenica predstavlja jedan od osnovnih dokaza simbiogenetske teorije evolucije. Naime, mitochondrij i mtDNA posjeduju značajan broj karakteristika koji se vežu za prokariotske organizme i na taj način upravo sugeriraju da je ovaj organel nastao od davno adsorbiranog prokariotskog organizma, što je bio jedan od bitnih trenutaka za razvoj prvo jednostaničnih, a zatim i višestaničnih eukariotskih organizama.

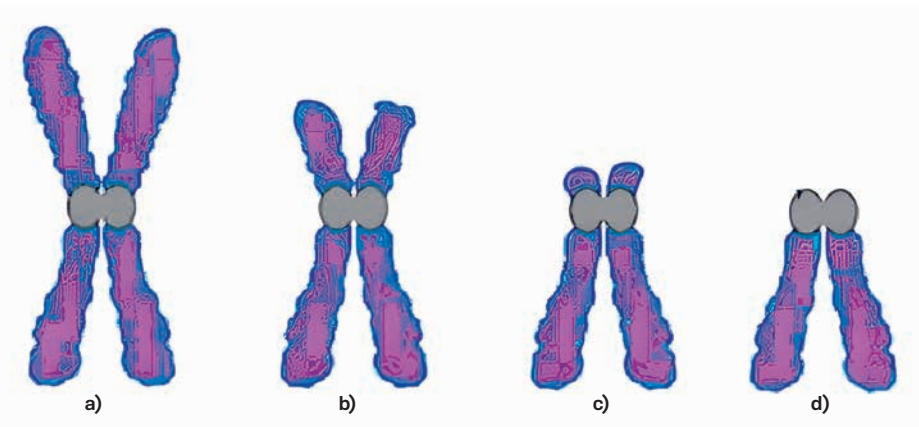
1.2.2. Kromosomi

Kromosomi su najvažnije komponente jezgre, jer su nositelji nasljednih jedinica - gena, koji svojom aktivnošću određuju i reguliraju metaboličke i ostale životne procese u stanicama. Tijekom staničnog ciklusa mijenjaju svoju morfologiju,

ali održavaju svoju individualnost. Odlikuju se sposobnošću za autoreprodukciju i prilikom diobe jezgre dijele se i oni, što uvjetuje njihov kontinuitet kroz stanične generacije.

Broj kromosoma u stanicama raznih vrsta živih bića manje ili više je različit, ali je za svaku vrstu određen i stalan. Skup svih kromosoma u stanici označava se kao kromosomska garnitura. Razlikuju se dva tipa kromosomskih garnitura: haploidna i diploidna. U organizmima sa spolnim razmnožavanjem, gamete imaju haploidni broj kromosoma (n), a somatske stanice imaju diploidni broj kromosoma ($2n$), jer sadrže dvije haploidne garniture, porijeklom od dva roditelja. Prema tome, diploidnu kromosomsku garnituru čini ustvari n parova homolognih parova (homologan = istosmislen, odgovarajući, s istim odnosima). U svakom paru homolognih kromosoma, jedan potječe od oca, a drugi od majke. Osim što je različita u raznih vrsta, veličina kromosoma je također različita i u istoj garnituri. Kao i broj, i veličina kromosoma je konstantna i specifična za svaku vrstu organizma. Dužina kromosoma varira između $0,5 \mu\text{m}$ i $40 \mu\text{m}$, a debljina između $0,2 \mu\text{m}$ i $2 \mu\text{m}$. Izuzetak čine tzv. gigantski kromosomi, npr. u stanicama pljuvačnih žlijezda nekih insekata, koji mogu imati 20 puta veću dužinu nego tipični interfazni kromosomi (Johansen *et al.*, 2009).

I oblik kromosoma također je različit u raznih vrsta organizama, a različit je i u istoj kromosomskoj garnituri. Međutim, kao i broj i veličina, tako je i forma kromosoma konstantna i specifična za svaku vrstu organizma. Ovisno o fizičkom stanju, odnosno fazi stanične diobe, kromosomi najčešće imaju izgled kratkog konca ili štapića. Oni su u metafazi maksimalno kondenzirani i poprimaju svoj



SLIKA 1.24. Diferencijacija metafaznih kromosoma na osnovu položaja centromere: a) metacentrični, b) submetacentrični, c) akrocentrični, d) telocentrični.

karakteristični izgled. Tada se najintenzivnije boje i izražavaju svoje najznačajnije morfološke karakteristike. Na tijelu svakog kromosoma r postoji jedno suženje (konstrukcija), koje se naziva primarno suženje. Na tom mjestu nalazi se specifična kromosomska struktura, *centromera* s kinetohorima, koji služe za pričvršćivanje kromosoma za diobeno vreteno u toku stanične diobe. Osnovna uloga centromere je vezana uz kretanje kromosoma k polovima diobenog vretena. Od položaja centromere ovisi i oblik kromosoma u staničnoj diobi. Po tom kriteriju, kromosomi mogu biti jednokraki (s terminalnom centromerom) i dvokraki (s centromerom u ostalim regijama) (slika 1.24.).

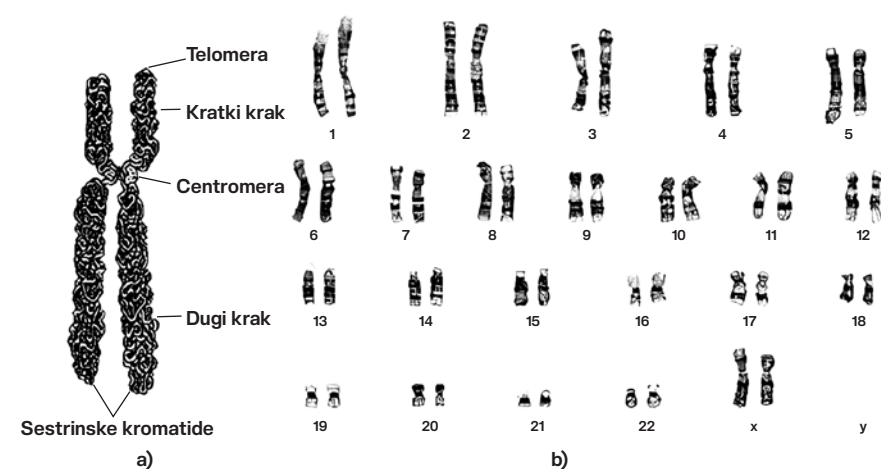
Osim primarnog suženja, kromosomi mogu pokazivati i druge konstrukcije na jednom ili na oba kraka. Ova suženja nazivaju se sekundarnim. Kod nekih kromosoma ona odvajaju mali vršni segment (dio) kromosoma koji se naziva satelit, a njegovi se nositelji nazivaju satelitski kromosomi i imaju ulogu organizatora jezgri.

Terminalni dijelovi kromosoma se po svom ponašanju razlikuju od njegovih ostalih dijelova, iako ne pokazuju nikakve vidljive morfološke diferencijacije. Ti su krajevi označeni kao *telomere*. Primarna uloga telomera stoji u vezi s kinetikom i polaritetom kromosoma za vrijeme stanične diobe, a istraživanja također ukazuju na to da se ova regija bitno skraćuje i troši tijekom godina. Skraćivanje telomera je prirodan proces uzrokovan modelom replikacije linearne DNA u kromosomima i aktivnošću enzima telomeraze. U slučaju normalne aktivnosti telomeraze u zdravim stanicama, telomere će se skraćivati sa svakom staničnom diobom. Nakon 50-ak dioba stanica se zbog prekratkih telomera na krajevima kromosoma više ne može dijeliti. To se naziva stanično starenje tj. senescencija. S druge strane, maligne stanice imaju pretjerano aktivan enzim telomerazu koji onda ne dopušta skraćivanje telomera. Kao posljedica toga, stanice postaju besmrtni i mogu se dijeliti u nedogled, što su osnovne karakteristike malignih stanica (Alberts *et al.*, 2022).

Osnovnu komponentu kromosoma čini *kromonema*, smještena u unutrašnjosti kromosomskog matriksa. Kromoneme predstavljaju specifičnu dvojnospiralu nukleoproteinskih niti, od kojih se sastoje obje kromatide. Kromonema je po dužini diferencirana na specifične segmente, koji se nazivaju kromomere.

Glavne kemijske komponente kromosoma su nukleinske kiseline i proteini. Na ove komponente, od cjelokupne kromosomske mase, otpada 70-90%. Osim DNA i proteina, kromosomi sadrže različite količine RNA i nehistskih proteina. Količina DNA i kiselih proteina veoma varira ovisno o metaboličkoj aktivnosti stanica. Unutrašnja struktura kromosoma je vrlo složena. Ona se danas intenzivno proučava raznim sredstvima i metodama, što omogućava da se dobije potpunija slika kromosoma kao strukturne i funkcionalne jedinice jezgre.

Riječ kromosom izvedenica je od dviju grčkih riječi - *chromos*, što znači boja, i *soma* što znači tijelo. Od ukupno 46 kromosoma koji se nalaze u tjele-



SLIKA 1.25. a) Shematski prikaz metafaznog kromosoma. b) Kariogram osobe ženskog spola.

snim stanicama svake osobe (slika 1.25.), 23 je naslijeđeno od majke, a 23 od oca. Točnije, pri stvaranju nove jedinke, 23 kromosoma dolazi iz jajne stanice, a 23 iz spermija. Kromosomi se u jezgri nalaze u parovima, te se u čovjeka nalaze ukupno 23 para kromosoma. Jedan od tih parova čine tzv. *spolni kromosomi* (X, Y) koji su važni u određivanju spola svake jedinke i međusobno se razlikuju. Preostala 22 para nazivaju se *autosomi* koji su homologni u oba spola. Isključujući moguće kromosomske anomalije, općenito vrijedi pravilo da dva kromosoma X (XX) određuju ženski, a kombinacija kromosoma X i Y (XY) muški spol. Ovdje je važno napomenuti da sve tjelesne stanice (npr. koštane stanice, stanice kože, bijele krvne stanice, itd.) sadrže po 46 kromosoma (23 para), dok spolne stanice (spermiji i jajašce) sadrže upola manje, točnije 23 kromosoma. S obzirom na postojanje veoma značajnih gena unutar mitohondrijske DNA, ispitivanje njihove funkcije i posljedica mutacija u ovim genima je također izuzetno intenzivno.

Fizički položaj gena, ali i ciljanih DNA biljega na kromosomu, zove se *lokus*. Dva autosoma koja čine par odgovaraju jedan drugom kako po strukturi tako i po funkciji. Zato se takva dva kromosoma, koja su slična po građi i nose moguće alternacije identičnih gena (genetičkih biljega), nazivaju *homologni kromosomi*. Nadalje, varijante gena koji na homolognim kromosomima zauzimaju isti položaj ili lokus i koji na različite načine određuju isto genetičko svojstvo nazivaju se *aleli*. Aleli su zapravo modaliteti istoga gena ili DNA biljega s razlikom u sekvenci.

Sljedeći pojmovi koji se vrlo često koriste u genetici pa tako i u sudskoj medicini jesu *homozigot* i *heterozigot*. *Homozigot* predstavlja genotip (genski prikaz) koji ima identične alele, odnosno iste genske varijante na određenom lokusu na

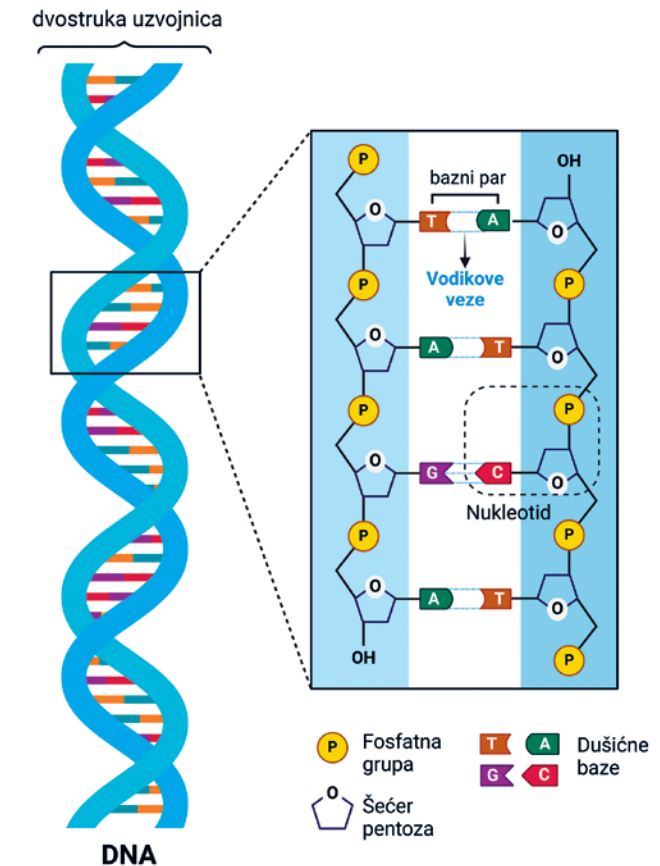
U analizi kromosoma koristi se nekoliko relativno sličnih termina koji se ponekad pogrešno interpretiraju. Stoga nije zgorega zapamtiti da je:

- Kariotip - kromosomski komplement koji karakterizira jedinku;
- Idiogram - dijagramski prikaz kromosomske garniture;
- Kariogram - prikaz kariotipa jedne stanice u kome su metafazni i prometafazni homologni kromosomski parovi složeni na osnovu veličine i morfologije;
- Sestrinske kromatide – genetički identične kromatide metafaznoga kromosoma;
- Nesestrinske kromatide – par kromatida od kojih jedna potječe od prvog, a druga od drugog kromosoma u homolognom paru;
- Kromatin – građevni materijal kromosoma, tj. građevni kompleks koji se sastoji od DNA, proteina i RNA;
- Kromonema – kromatinsko vlakno promjera oko 300 nm nastalo kondenzacijom niže strukture zvane solenoid;
- Kromatida – struktura promjera oko 700 nm, koja karakterizira metafazni kromosom i koja je nastala kondenzacijom kromoneme (Ibrulj et al., 2008).

paru homolognih kromosoma. Nasuprot tome, *heterozigot* označava osobu ili genotip koji ima dva različita alela na određenom lokusu na paru homolognih kromosoma.

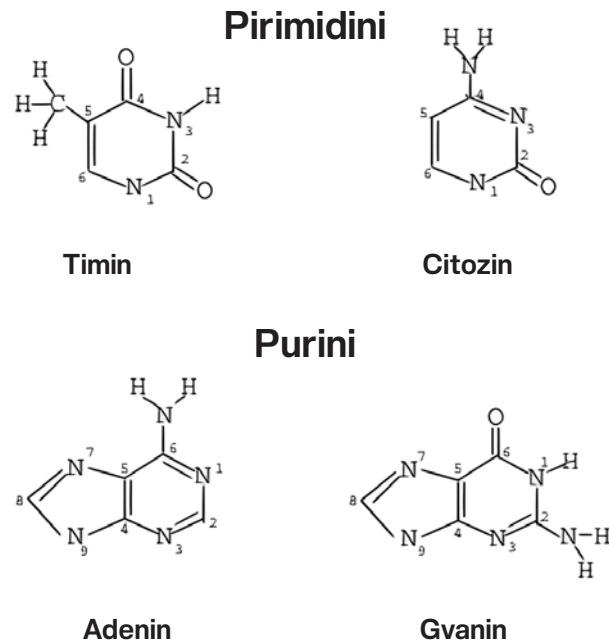
1.2.3. Deoksiribonukleinska kiselina (DNA)

Sve poznate pojave i procesi biološkog nasljeđivanja počivaju na osobitostima strukture i funkcije *nukleinskih kiselina*. To su složene organske tvari velikih lančanih molekula – polimerne makromolekule – sastavljene od niza karika (monomera), koje se nazivaju *nukleotidi*. Molekule nukleinskih kiselina sadrže mnoštvo nukleotida (tj. one su *polinukleotidi*); u jednoj molekuli može ih biti i na desetine tisuća, što nukleinske kiseline svrstava u kategoriju najkrupnijih bioloških makromolekula. *Nukleotidi* nisu jednostavne građe; svaki od njih se sastoji od tri komponente: (1) *dušična baza*, (2) *šećer (pentoza)* i (3) *fosfatna skupina* – ostatak fosforne kiseline, nastao njenom ugradnjom u ovaj složeni spoj, dajući mu kiselinski karakter (slika 1.26.). Prema strukturi nukleotida, odnosno građi i funkciji polimera koje oni tvore, razlikujemo dva osnovna tipa njihovih sjedinjenja; to su *deoksiribonukleinska (DNA)* i *ribonukleinska (RNA)*.



SLIKA 1.26. Shematski prikaz molekularne strukture deoksiribonukleinske kiseline.

DNA je primarni genetički materijal. Ona je osnovni nositelj „genetičke informacije” (gena) u sveukupnom živom svijetu, a izuzeci u tom pogledu (npr. neki virusi), kod kojih tu ulogu ima RNA, prava su rijetkost. S druge strane, najznačajnija uloga RNA je u procesima ostvarivanja funkcije gena (prevođenja i realizacije genetičke poruke). DNA se uglavnom nalazi u jezgri (u kromosomima) i reproduciбилnim strukturama izvan jezgre (mitohondriji, plastidi), a RNA u citoplazmi. DNA se sastoji iz dva paralelna polinukleotidna lanca, koja se međusobno i oko (zamišljene) zajedničke osi uvijaju u dvostruku spiralu (uzvojnica). Prema tome, svaka molekula DNA, ustvari, sadrži dva polimerna polulanca, čije su monomeri deoksiribonukleotidi. Takva prostorna struktura molekule DNA slikovito se može predočiti u vidu spiralno savitljivih ljestvi, sastavljenih od dvije uzdužne paralelne vrpce, spojene nizom paralelnih prečki (slika 1.26.).



SLIKA 1.27. Dušične baze u molekuli DNA određuju prirodu svakoga nukleotida. Kemijska struktura baza određuje i njihove međusobne afinitete, što se manifestira kroz formiranje komplementarnih parova citozin-gvanin (kroz tri vodikove veze) i adenin-timin (dvije vodikove veze).

Osobitost svakog nukleotida određuje prisutna dušična baza jer se ona javlja u četiri različite varijante dok su njegove ostale dvije komponente uvijek istovjetne: pentozni šećer *deoksiriboza* i *fosfatna skupina*. Od dušičnih baza u nukleotidima DNA se alternativno nalaze *purini*: *adenin (A)* i *gvanin (G)* i *pirimidini*: *citozin (C)* i *timin (T)*, po kojima se i cijele strukture označavaju kao adeninski, gvaninski, citozinski i timinski nukleotidi (slika 1.27.). Unutar molekule nukleotida središnji položaj ima šećer, a pošto se za njega dušična baza veže bočno (prema komplementarnom polulancu), kostur polinukleotidnog lanca čini naizmjenični slijed karika: deoksiriboza – fosfatna skupina – deoksiriboza – fosfatna skupina – itd. Jedan zavoj spirale čini dio polulanac od 10 parova pentoza – fosfatna skupina ($3,4 \text{ nm} = 3,4 \times 10^{-6} \text{ mm}$). Ovakva dva polulanca nukleotida međusobno su spojena paralelnim „prečkama” – vodikovim vezama preko komplementarnih dušičnih baza. Adenin uvijek veže s timinom, a gvanin s citozinom, s četiri moguće varijante veza među polulancima DNA: A–T i T–A, te G–C i C–G (slika

1.27.). Ova komplementarnost dosljedna je cijelom dužinom polimera, DNA. Imajući u vidu tu pravilnost, redosljed nukleotida u jednom polulancu precizno je uvjetovan i određen komplementarnim nizom njegovog para. Prema toj genetičkoj konstanti, ukupni broj molekula adenina u svakom lancu DNA (pa i u stanici i organizmu) jednak je broju molekula timina, a gvanina ima onoliko koliko i citozina, što je definirano u Chargaffovom pravilu.

Stalnost ukupne količine DNA po stanici je jedna od osnovnih genetičkih karakteristika svake vrste organizma, što se odnosi i na međusobni omjer A–T i G–C nukleotidnih parova. Opisana struktura i organizacija genetičkog materijala na molekulskom nivou omogućava njegove tri najbitnije i specifične biološke funkcije, a to su: (1) *autokataliza (autoreprodukcija* – proizvodnja vlastitih kopija), (2) *heterokataliza (kontrola procesa metabolizma* – proizvodnja drugih supstanci) i (3) *mutabilnost* (promjenjivost).

Autoreprodukcija DNA zasniva se na njenoj *autokatalitičkoj sposobnosti* samoponavljanja, tj. da kontrolira produkciju vlastitih kopija. Pritom novonastali lanci imaju izvorni raspored nukleotida, odnosno gena. Nakon podjele dvolančane molekule DNA na dva polulanca (tijekom stanične diobe), svaki od njih, od slobodnih nukleotida, „nadoknađuje” komplementarni polinukleotidni lanac. Tako se svaka novonastala molekula DNA sastoji od jednog izvornog roditeljskog i jednog novosintetiziranog komplementarnog polulanca (para).

Genetička kontrola procesa metabolizma, a preko toga i svih individualnih svojstava, počiva na kontroli sinteze bjelančevina (proteina). Ova *heterokatalitička funkcija* genetičkog materijala i bjelančevina - kao njegovih „diriginiranih” posrednika - omogućava kontrolu svih ostalih struktura i funkcija stanice i organizma, u procesu ontogeneze (razvoja organizma) i formiranja individualnih osobina (razvoja fenotipa).

DNA čovjeka sadrži oko $3,2 \times 10^9$ nukleotida, tj. baznih parova, po haploidnoj stanici (tj. jajna stanica ili spermij). S obzirom na činjenicu da svaka osoba naslijedi polovicu genetičkog materijala od oca, a polovicu od majke (ne računajući njenu mitohondrijsku DNA koja se nasljeđuje isključivo majčinskom linijom), testiranjem DNA može se utvrditi genetička povezanost između ispitanih osoba. Sljedeća važna osobina DNA je da je izuzetno stabilna molekula i da se tijekom vremena u *in vitro* uvjetima redosljed njenih sastavnih jedinica ne mijenja, pa se pravilno pohranjeni uzorak može iskoristiti za usporedbu njegovoga DNA profila s profilom nekog drugog uzorka uzetim i nakon nekoliko godina. Zbog svega navedenog, jasna je velika uloga analize DNA u forenzičkoj znanosti, te će se stoga u daljnjem tekstu posvetiti više pozornosti toj tzv. molekuli života i svemu onome što je čini tako jedinstvenom.

Kao što je ranije rečeno, jezgrina DNA predstavlja genetički materijal koji nosi nasljednu poruku, zapisanu u genima. Drugim riječima, geni su aktivni

segmenti koji se nalaze na točno određenim mjestima lanaca DNA. Zahvaljujući normalnom funkcioniranju gena, svaka jedinka ima određene parametre rasta i razvoja organizma. Na temelju navedenog očito je da je DNA središnja molekula života koja, kao primarni (osnovni) nositelj nasljedne informacije, kontrolira rast i razvoj svakog živog bića.

- Alberts BA, Heald R, Johnson A, *et al.* Molecular biology of the cell, 7th edition. New York City, NY: W. W. Norton & Company; 2022.
- Alonso A, Anđelinović S, Martin P, *et al.* DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat Med J* 2001; 42: 260-266.
- Anđelinović Š, *et al.* Mjesto događaja i analiza tragova nađenih u kriminalističkoj obradbi. U: Primorac D, *et al.* DNA analiza u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Anđelinović Š, Sutlović D, Erceg Ivković I, *et al.* Twelve-year Experience in Identification of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J* 2005; 46: 530-539.
- Bajrović K, Čaušević A, Hadžiselimović R. Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju. Sarajevo: INGEB; 2005.
- Bathke AC. The Bertillon System of Identification. *F.D.I.A.I News* 1990: 5-8.
- Berberović Lj. Biotehnologija i njena primjena. U: Bajrović K, Čaušević A, Hadžiselimović R. Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju. Sarajevo: INGEB; 2005a.
- Berberović Lj. Bioantropologija – Odabrane uvodne teme. Sarajevo: Blicdruk; 2005b.
- Bertillon A. Bertillon System of Identification. Copyright by R.W. McClaughry; 1896.
- Bojanić N, Milosavljević M. Praktikum za kriminalistiku 5 (forenziku). Sarajevo: Fakultet kriminalističkih nauka; 2008.
- Brkić H, *et al.* Osnove medicinske kriminalistike. U: Zečević D, *et al.* Sudska medicina i deontologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.
- Brkić H. Forenzička stomatologija. Zagreb: Školska knjiga; 2000.
- Brooks S, Suchey SI. Skeletal Age Determination Based on the Os Pubis. A Comparison of the Assadi-Nemeskeri and Suchey-Brooks Methods. *Hum Evol* 1990; 5: 227-238.
- Burgi SB. First European-American Intensive Course in PCR Based Clinical and Forensic Testing. Laboratory manual; Split: Laboratorija za kliničku i forenzičku genetiku; 1997.
- Cattaneo C. Forensic anthropology: developments of a classical discipline in the new millennium. *Forensic Sci Int.* 2007; 165(2-3): 185-193.
- Cole S. Suspect Identities: A History of Criminal Investigation and Fingerprinting. Cambridge, Harvard University Press; 2002.
- De Groote I. Femoral curvature in Neanderthals and modern humans: a 3D geometric morphometric analysis. *J Hum Evol* 2011; 60(5): 540-548.
- De Groote I. The Neanderthal lower arm. *J Hum Evol* 2011; 61(4): 396-410.
- Dunkerley W. The Phony Litvinenko Murder. New Britain, CT, Omnicom Press; 2011.
- Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, *et al.* Extraction, Evaluation and Amplification of DNA from Decalcified and Un-decalcified United States Civil War Bone. *J Forensic Sci* 1993; 38: 60-68.

- Gaensslen RE, Lee CH. Genetic Markers in Human Bone Tissue. *Forensic Sci Rev* 1990; 2: 126-146.
- Gregory RJ. Psychological testing: History, principles, and applications (5th edition). Boston, MA: Allyn & Bacon; 2010.
- Greulich WW, Pyle SI. Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist. Stanford, CA: Stanford University Press; 1959.
- Gunby P. Medical Team Seeks to Identify Human Remains from Mass Graves of War in Former Yugoslavia. *JAMA* 1994; 272: 1804-1806.
- Gunn A. Essential Forensic Biology. Chichester: John Wiley & Sons; 2019.
- Harrison J, Leggett R, Lloyd D, Phipps A, Scott B. Polonium-210 as a poison. *J Radiol Prot* 2007; 27: 17-40.
- Harvati K. Quantitative analysis of Neanderthal temporal bone morphology using three-dimensional geometric morphometrics. *Am J Phys Anthropol* 2003; 120(4): 323-338.
- Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R. Typing of Deoxyribonucleic acid (DNA) Extracted from Compact Bone from Human Remains. *J Forensic Sci* 1991; 36: 1649-1661.
- Houck MM, Siegel JA. Fundamentals of Forensic Science. London: Elsevier Academic Press; 2006.
- Ibrulj S, Haverić S, Haverić A. Citogenetičke metode: Primjena u medicini. Sarajevo: INGEB; 2008.
- Johansen KM, Cai W, Deng H, *et al.* Polytene chromosome squash methods for studying transcription and epigenetic chromatin modification in *Drosophila* using antibodies. *Methods*. 2009; 48(4): 387-397.
- Kaye DH. Probability, Individualization and Uniqueness in Forensic Science Evidence: Listening to the Academies. *75 Brook L Rev* 2010; 1163.
- Keys KM, Budowle B, Andelinović S, Definis Gojanović M, Drmić I, Marcikić M, Primorac D. Northern and Southern Croatian Population Data on Seven PCR-based Loci. *Forensic Sci Int* 1996; 81: 191-199.
- Koehler JJ, Saks MJ. Individualization Claims in Forensic Science: Still Unwarranted. *75 Brook L Rev* 2010; 1187.
- Korajlić N *et al.* Istraživanje krivičnih djela. Sarajevo: Pravni fakultet Univerziteta u Sarajevu; 2012.
- Levine B. Principles of Forensic Toxicology. Washington DC: American Association for Clinical Chemistry; 2010.
- Lovejoy CO, Meindl RS, Pryzbeck TR, Mensforth RP. Chronological Metamorphosis of the Auricular Surface of the Illium: A New Method for the Determination of Age at Death. *Am J Phys Anthropol* 1985; 68: 15-28.
- Lynch M. God's signature: DNA profiling, the new gold standard in forensic science. *Endeavour* 2003; 27: 93-97.

- Marjanović D, Durmić-Pašić A, Bakal N, *et al.* DNA Identification of Skeletal Remains from the Second World War Mass Graves Uncovered in Slovenia. *Croat Med J* 2007; 48: 513-519.
- Modly D, Mršić G, Šuperina M, Korajlić N. Rječnik kriminalistike. Zagreb: Strukovna riječ kriminalista; 2008.
- Nawrocki S. An Outline of Forensic Archeology. Indianapolis, IN: University of Indianapolis Archeology & Forensics Laboratory; 1996.
- Noon RK. Introduction to Forensic Engineering. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; 1992.
- Ortner DJ, Tuross N, Stix AI. New Approaches to the Study of Disease in Archeological New World Populations. *Hum Biol* 1992; 64: 337-360.
- Pavišić B, Modly D. Kriminalistika. Rijeka: Pravni fakultet Sveučilišta u Rijeci; 1999.
- Primorac D, Andelinović S, Definis-Gojanović M, *et al.* Identification of War Victims from Mass Graves in Croatia, Bosnia and Herzegovina by the Use Of Standard Forensic Methods and DNA Typing. *J Forensic Sci* 1996; 41: 891-894.
- Primorac D. Identification of Human Remains from Mass Graves Found in Croatia and Bosnia and Herzegovina. Proceedings of the 10th International Symposium on Human Identification, Orlando, FL: Promega Corporation; 1999.
- Radford EP, Hunt VR. Polonium-210: A Volatile Radioelement in Cigarettes. *Science* 1964; 143: 3603: 247-249.
- Romandini M, Oxilia G, Bortolini E, *et al.* A late Neanderthal tooth from northeastern Italy. *J Hum Evol* 2020; 147: 102867.
- Siegel JA *et al.* The Encyclopedia of Forensic Science (1st edition). London: Elsevier Academic Press; 2000.
- Sopher IM. Forensic Dentistry. Rockville, MA: Thomas; 1976.
- Turvey BE. Criminal Profiling: An Introduction to Behavioral Evidence Analysis, 4th Edition. San Diego, CA: Academic Press; 2012.
- Waite M. The Little Oxford Dictionary (7th Edition). Oxford: Oxford University Press; 1998.
- Walsh S. Current and Future Trends in Forensic Molecular Biology. U: Rapley R, Whitehouse D. Molecular Forensics. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2007.
- Wilder HH, Wentworth B. Personal identification: Methods for the identification of individuals, living or dead. Norfolk: RG Badger; 1918.
- Zečević D. Sudska medicina i deontologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2004.

2.

POVIJESNI RAZVOJ FORENZIČKE GENETIKE

prof. dr. sc. Damir Marjanović

prof. dr. sc. Dragan Primorac

prof. dr. sc. Adna Ašić

POVIJESNI RAZVOJ FORENZIČKE GENETIKE

Pola stoljeća nakon revolucionarnog otkrića molekularne strukture DNA kao osnovnog nositelja nasljedne informacije, ova molekula promovirana je u najčešće spominjanu i korištenu organsku supstancu u širokom rasponu znanstvenih disciplina (Marjanović *et al.*, 2005a, 2005c). Jedna od najčešće upotrebljivanih metoda vezanih uz analizu pojedinih regija DNA je forenzičko testiranje DNA, poznato još kao i *DNA fingerprinting* ili *DNA profiliranje* (engl. *DNA typing*), ovisno o metodi analize.

Profiliranje DNA u forenzičke svrhe bazira se na fundamentalnim principima i koristi skoro iste tehnike koje se rutinski primjenjuju u medicinskoj dijagnostici kao i u različitim populacijsko-genetičkim istraživanjima. Ove molekularne metode baziraju se na analizi osnovnog svojstva svih živih bića – molekularnoj raznolikosti. Također, fundamentalna karakteristika ovih metoda je da se na osnovi malih količina DNA prisutnih u promatranom biološkom tragu može, s visokim stupnjem sigurnosti, utvrditi genetički identitet osobe koja je taj trag ostavila za sobom.

Profiliranje DNA u forenzici doživjelo je promociju u znanosti prije 20 godina u radovima engleskog genetičara Aleca Jeffreysa. Opisao je postojanje sljedova DNA, jasno lociranih u genomu čovjeka, koji se ponavljaju u sukcesivnom nizu. Također, potvrdio je da broj tih repetitivnih jedinica može individualno varirati u promatranom populacijskom uzorku. Usavršavanjem metoda ispitivanja varijacija dužine ovih repetitivnih DNA sekvenci, Jeffreys je kreirao mogućnost masovnog provođenja DNA testiranja ljudi. Upravo ta masovnost, kao i izrazito visok stupanj aplikabilnosti najnovijih spoznaja, koje su uvelike nadišle početne postulate analize DNA, doveli su do razvoja nove znanstvene discipline koja se opisuje pod nazivom forenzička genetika.

Forenzička genetika područje je genetike koje izučava primjenu genetičkih spoznaja u sudskim, kazneno-pravnim postupcima. Latinski korijeni riječi

(lat. *forensis* – javan, pogodan za sud javnosti) sami po sebi dovoljno pojašnjavaju model njene primjene u društvu. Ova znanstvena disciplina podrazumijeva obradu pojedinih tragova i rezultata dobivenih genetičkim metodama, a u cilju rekonstrukcije tijeka događaja i precizne individualizacije sudionika tih događaja, najčešće u sklopu sudskih, policijskih, ali i drugih istraga. Prvenstveno se bazira na analizi dostupnih tragova, a u cilju stvaranja međusobnih veza između počinitelja, sredstva, mjesta i predmeta izvršenja ili pak utvrđivanja identiteta žrtve. Bitno je napomenuti da forenzička genetika, tj. njeni temelji, datiraju prije prve službene upotrebe forenzičke analize DNA iz 1985. Naime, i prije toga, a posebno u svrhe testiranja spornog očinstva, korišteni su različiti genetički sustavi kao što su analiza HLA (engl. *human leukocyte antigen*) sustav ili ABO sustav krvnih grupa. Također, ne smiju se zanemariti ni testovi očinstva koji su provedeni komparativnom analizom fenotipskih karakteristika i to onih čija se ekspresija, prema tadašnjim spoznajama, bazirala isključivo na varijanti određenog genetičkoga biljega. Svakako, ovo područje iz tog doba, barem na nivou svoje primjene, teško je usporedivo s njenim trenutnim opsegom, ali i u tom periodu definitivno su dosegnute neke od fundamentalnih spoznaja koje i danas predstavljaju stup moderne forenzičke genetike.



SLIKA 2.1. Povezanost forenzičke genetike s drugim znanstvenim disciplinama.

Forenzička genetika zasniva se na kompleksnoj interakciji velikog broja područja kao što su biologija, biotehnologija, genetika (posebno populacijska i molekularna), biokemija, matematika, biostatistika, medicina, tehnologija, pravo, etika i druge (slika 2.1.). Ona uistinu predstavlja presjek svih tih disciplina koji se razvija i raste usporedo s promjenama u ovim područjima.

Analiza DNA danas nesumnjivo ima nezamjenjivu ulogu u sveukupnim forenzičkim disciplinama. U posljednjih dvadesetak godina, širom svijeta, upravo tom metodom rasvijetljeni su brojni sudsko-medicinski slučajevi (Jeffreys *et al.*, 1985a, 1985b). Nedvojbeno je da je analiza DNA postala „novi oblik znanstvenog dokaza” koji javnost i struka neprekidno procjenjuju. Danas je ova tehnologija opće prihvaćena u većini pravnih sustava. Nekoliko je glavnih područja primjene analize DNA u sudskoj medicini: istraživanje kaznenih djela, utvrđivanje identiteta osoba i dokazivanje očinstva. Tako se u Sjedinjenim Američkim Državama svakodnevno naručuju genetički testovi za potrebe sudskih procesa. Podatak koji se može naći u informativnim medijima, a koji je vezan uz prostore Hrvatske i Bosne i Hercegovine kaže da skoro svako peto testirano očinstvo daje negativan rezultat, najbolje govori o važnosti analize DNA za širu zajednicu. Kroz „Innocence project”, pokrenut u Sjedinjenim Američkim Državama s ciljem oslobađanja pogrešno optuženih osoba, zahvaljujući prvenstveno analizi DNA u proteklih trideset godina oslobođeno je preko 200 osoba¹, od kojih su neke bile osuđene na smrtnu kaznu.

Ova metoda odigrala je izuzetno važnu ulogu i na našim prostorima kroz projekte identificiranja žrtava rata, kako u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini (1992. – 1995.), tako i u njenom najbližem susjedstvu. Primjenom ovog moćnog „molekularnog oruđa” vraćena su imena tisućama posmrtnih ostataka, a njihovim obiteljima pružena je mogućnost da barem dostojanstveno pokopaju svoje najbliže. Bitno je spomenuti da je ovaj projekt otvorio mogućnost identifikacije žrtava Drugog svjetskog rata s ovih prostora (Marjanović *et al.*, 2007, 2009), ali i za analizu arheoloških uzoraka koji se povezuju s važnim povijesnim ličnostima i arheološkim lokalitetima na ovim prostorima (Marjanović *et al.*, 2011a, 2012).

Razvoj jedne znanstvene discipline, kakva je forenzička genetika, nije isključivo uvjetovan zbivanjima i promjenama unutar njenog interesnog opusa. Potrebno je uzeti u obzir sva ključna i značajna događanja koja su prethodila njenom nastanku, kao i sve što je iz drugih znanstvenih područja utjecalo na njen razvoj, bilo izravno ili posredno. Ni cijela knjiga, a pogotovo jedno poglavlje, nije dovoljno da se obuhvate sve relevantne činjenice, nekoliko njih svakako zaslužuje biti izdvojeno u ovom kratkom pregledu.

Još od vremena starih Grka postojala je potreba tumačenja nastanka bolesti koje su se kao po nekim jasnim obrascima ponavljale u pojedinim obiteljima. Osim iskustvenih spoznaja, koje su same po sebi važne, no nedovoljne, principi tadašnjeg razumijevanja genetike temeljili su se na opažanju. Pojavom austrijskog

¹ Na dan 3.8.2024. godine, ukupan broj osoba koji su kroz ovaj projekt bili oslobođeni iznosio je preko 240 (<http://www.innocenceproject.org/>, pristup 3.8.2024.).



SLIKA 2.2. Oni koji su „započeli priču o DNA“: G. Mendel i W. Bateson (slika preuzeta s <http://en.wikipedia.org>, pristup 19.1.2025.).

svećenika Gregora Mendela (slika 2.2.), postavljeni su temelji genetike kakvu poznajemo danas. Mendel je, radeći s vrtnim graškom, formulirao osnovne principe nasljeđivanja. Iako je prve rezultate objavio 1866. godine (Mendel, 1866), bili su zaboravljeni sve do 1900. kada su ih drugi znanstvenici (de Vries, Correns, von Tschermak) ponovno potvrdili u tri različita laboratorija. William Bateson shvatio je vrijednost ovih radova i proveo promociju Mendelovih rezultata 1906. godine, a uz to skovao termine gen i genetika (slika 2.2.) i potvrdio Mendelove zaključke u svojim eksperimentima na životinjama (Schwartz, 2007). Utemeljenost i jedinstvenost Mendelovih principa očituje se kroz činjenicu da danas, više od 150 godina nakon objavljivanja, oni vrijede u svome izvornom obliku. U prilog tome ide i činjenica da ni izuzetno dinamičan razvoj genetike koji je gotovo na mjesečnom nivou uvjetovao promjene nekih važnih postulata nije utjecao na Mendelove postulate. Ni primjedbe pojedinih statističara koji ukazuju na preveliku točnost rezultata eksperimenata ove intrigantne osobe ne mogu dovesti u pitanje njegovu titulu oca moderne genetike, što dodatno naglašava trajnu vrijednost njegovih otkrića.

Tridesetak godina nakon prikupljanja relevantnih informacija genetika je bila spremna za sljedeći korak – izolaciju i purifikaciju DNA koje je prvi put realizirao Andrei Nikolaevitch Belozersky. Brzo nakon toga uslijedilo je važno otkriće. Godine 1944. Oswald Avery sa suradnicima okarakterizirao je gene kao nositelje nasljednih osobina građene od osnovne nasljedne tvari – DNA. To je utabalo put ka konačnoj demistifikaciji molekularne strukture DNA koju su prvi put prikazali



SLIKA 2.3. Oni koji su „otkrili tajnu DNA“: J. Watson i F. Crick s modelom čuvenog dvostrukog heliksa (slika preuzeta s <http://www.chemheritage.org>, pristup 19.1.2025.).

nobelovci James Watson i Francis Crick (slika 2.3.) 1953. godine i time postavili temelje razvoju moderne molekularne genetike (Watson i Crick, 1953; Zergollen *et al.*, 1994). Spoznaja o broju kromosoma kod čovjeka uslijedila je 1956. godine kada je potvrđeno da je kompletan ljudski genetički materijal smješten u 23 para ili ukupno 46 kromosoma (Tjio i Levan, 1956). Nedugo nakon toga Koenberg je u svojim radovima otkrio i opisao prvi put DNA polimerazu (1958). Dvadeset godina poslije Botstein je sa suradnicima utemeljio metodu analize polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism, RFLP*), opisavši mogućnosti upotrebe restrikcijskih endonukleaza, te je pokazao da postoje male varijacije u nasljednom materijalu koje se razlikuju od osobe do osobe. Konačno, nakon što su 1980. Wyman i White prvi opisali postojanje kratkih, visoko varijabilnih DNA biljega, Alec Jeffreys (slika 2.4.) je 1984. godine pokazao da određene regije DNA nazvane varijabilni broj uzastopnih ponavljanja (engl. *variable number of tandem repeat, VNTR*) sadrže ponavljajuće sekvence koje se razlikuju od osobe do osobe i koje je godinu dana poslije službeno upotrijebio na sudu. Upravo ta spoznaja bila je ključna u rješavanju prvog forenzičkog slučaja korištenjem analize DNA. Naime, nakon ubojstva dvije djevojke, Lynde Mann i Dawn Ashworth, 1983. i 1986. godine policija je organizirala testiranje više od 5000 muškaraca i u konačnici pronašla krivca (Wambaugh, 1989).

Otkriće postupka lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) i njeno usavršavanje tijekom 80-ih godina prošloga stoljeća (Mullis



SLIKA 2.4. Osnovu za „dramatičnu” ekspanziju forenzičke genetike u proteklih nekoliko desetljeća postavila su dva znanstvenika koji nisu bili forenzičari po primarnom zanimanju. a) Kary Mullis je definirao lančanu reakciju polimerazom dok je b) sir Alec Jeffrey sredinom 80-ih godina 20. st. realizirao prvu službenu analizu DNA čiji su rezultati bili potvrđeni u sklopu sudskog procesa.

sa suradnicima, slika 2.4.) zasigurno je značajno odredilo budućnost analize DNA, kako u kliničkoj, tako i u forenzičkoj medicini (objavljeno kao Mullis *et al.*, 1986). Otkrićem ove tehnologije postalo je moguće analizirati biološke uzorke koji sadrže minimalne količine DNA. Svjedoci smo revolucionarnog otkrića strukture ljudskog genoma 2001. godine do kojeg su došle dvije odvojene skupine istraživača, i to Međunarodni konzorcij za sekvenciranje humanog genoma pod vodstvom Erica Landera, i druga pod vodstvom Craiga Ventera iz *Celera Genomics* (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Cilj obje grupe bio je utvrditi potpuni slijed svih nukleotida ljudskog genoma koji sadrži oko 3×10^9 parova baza. Pravo iznenađenje uslijedilo je kad se otkrilo da ljudski genom ima svega 20 000 do 25 000, a ne kako se ranije predviđalo, oko 100 000 gena. Međutim, zbog alternativnog prekrajanja (engl. *alternative splicing*) izvjesno je da pojedinačni geni stvaraju više od jedne iRNA, što objašnjava zbog čega relativno mali broj gena kodira više od 100 000 proteina. Ono što je posebno iznenadilo istraživače jest činjenica da svega nešto više od 1% ukupne DNA sadrži sekvence koje kodiraju proteine.

Upravo su ova fundamentalna genetička otkrića diktirala i trend njihove primjene, koji je uvjetovao razvoj same forenzičke genetike. Početkom dvadesetog stoljeća, tijekom istraživanja s ciljem pronalaska mogućnosti za masovnu primjenu transfuzije krvi, Landsteiner opisuje biljege ABO sustava, čija je geneza pod isključivom kontrolom navedenih unutarnjih faktora (Polak, 1966). Metoda određivanja krvnih grupa zasniva se na principu fiziološke izoaglutinacije – reakcije između seruma jedne i crvenih krvnih zrnaca (eritrocita) druge grupe, pronašla je svoju široku primjenu u medicini, ali i u populacijskoj i forenzičkoj genetici. Naime, dvadesetak godina poslije, znanstvenici su postali svjesni sustava nasljeđivanja krvnih grupa, kao i mogućnosti njihove upotrebe u utvrđivanju bioloških (genetičkih) relacija između pojedinaca. Iako je snaga isključi-

vanja (engl. *power of exclusion*) genetičke relacije ispitivanih osoba primjenom ovih testova bila izuzetno mala (oko 30%), njihova je primjena postavila temelje onome što se danas može nazvati moderno testiranje spornog roditeljstva i forenzičko-genetičke analize. Nekoliko desetljeća kasnije, otkrićem novih seroloških testova Rh, Kell, and Duffy sustava krvnih grupa te njihovom simultanom primjenom s ABO testom, ta snaga isključivanja je povećana na 40%.

Početkom 70-tih godina dvadesetog stoljeća granice genetičkog testiranja proširene su s tipizacije krvi na tipizaciju tkiva. Molekularne osnove ovoga testiranja zasnivale su se na upotrebi sustava humanog leukocitnog antigena (engl. *human leukocyte antigen, HLA*). HLA tipizacija (engl. *HLA typing*) je analiza proteina koji dominira u svim komponentama krvi, osim u eritrocitima. S druge strane, njihova izuzetno visoka koncentracija i raznolikost zabilježena je u leukocitima. HLA antigeni su esencijalni elementi imuniteta svake osobe. Dijele se u tri osnovne klase antigena od kojih klasa I (A, B, C) i klasa II (DP, DQ, DR) imaju središnju ulogu u otkrivanju prisutnosti stranih antigena u organizmu (Hadžiselimović i Pojskić, 2005). Zajedno s genima koji kontroliraju ovih šest osnovnih antigena postoji veliki broj drugih gena koji su uključeni u regulaciju funkcioniranja HLA kompleksa. Pored uloge u zaštiti organizma od oboljenja, ovaj kompleks ima važnu ulogu u reprodukciji, odgovoru organizma na karcinogenezu, autoimunom odgovoru i odbacivanju/prihvatanju organa u postupku transplantacije organa. Postoji mnogo HLA tipova koji su pokazali izuzetno visok stupanj individualne varijacije i koji je „genetički kontroliran” prvenstveno od strane ovog genskog kompleksa lociranog na šestom kromosomu. Upravo zbog toga pokazali su se kao izuzetno dobro oruđe u procesu testiranja spornog očinstva. Snaga isključivanja primjenom HLA tipizacije povećana je do 80%, a u kombinaciji sa serološkim testovima ta je granica pomaknuta i do 90% (Silver, 1989). Ipak, primjena ove metode ima određenih ograničenja. Primjerice, količina krvi potrebne za analizu, a koja ne smije biti starija od nekoliko dana, može biti za testiranje beba u prvoj godini života.

Konačno, sredinom 80-ih godina testiranje spornog očinstva te utvrđivanje porijekla bioloških tragova u forenzičkim analizama, počelo se realizirati procesuiranjem primarnog nositelja nasljednih osobina, tj. DNA molekule. RFLP analiza koja se tada primjenjivala dala je znatno bolje rezultate od prethodnih seroloških i HLA testova. Pokazalo se da su fragmenti DNA znatno varijabilniji od HLA kompleksa, što ih je učinilo idealnim za utvrđivanje bioloških relacija među osobama, ali i biološkim tragovima. Ova metoda, o kojoj će biti više govora u sljedećim poglavljima, omogućila je da u slučajevima testiranja očinstva snaga isključivanja dosegne vrijednost iznad 99%, no njena primjena i dalje je bila izuzetno ograničena zbog duljine postupka i mogućnosti analize primarno velikih bioloških tragova (tragovi s velikom količinom DNA).

Početak 90-ih godina 20. stoljeća molekularno-genetičke tehnike temeljene na PCR-u imale su široku primjenu u testiranju spornog očinstva i forenzičkoj analizi DNA. Osnovna prednost ove metode je mogućnost da se iz vrlo malih bioloških tragova (tragova s malom količinom DNA), opetovanim i ciljanim umnožavanjem dobiju milijarde kopija ciljanog fragmenta. Ova analiza znatno unaprijeđena s dva dodatna koraka, uvođenjem *Taq* polimeraze i kratkih uzastopnih ponavljanja (engl. *short tandem repeats*, STR) molekularnih biljega, no o tome će, također, biti mnogo više riječi u sljedećim poglavljima. Konačno, primjena ove metode povećala je snagu isključivanja kod testiranja očinstva na minimalno 99,999%, a u upotrebu je uvela i analizu iznimno malih količina DNA koja je često vrlo degradirana. Upravo ova otkrića omogućila su identificiranje žrtava rata iz masovnih grobnica koje je povijesno prvi put izvršeno od strane hrvatskih znanstvenika u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini (Anđelinović *et al.*, 2005; Marjanović *et al.*, 2007; Primorac *et al.*, 1996, 2024).

Iznimno brzi razvoj osnovnih biotehnoških metoda omogućio je da forenzička analiza DNA u samo 20-ak godina pređe put od ekskluzivnog i vrlo kompleksnog do rutinskog postupka. Ubrzo nakon što je princip PCRa postao poznat, već početkom 1986. godine izrađen je prvi automatski PCR uređaj (engl. *PCR thermocycler*) u kojem su se odvijali svi ciklusi postupka umnožavanja DNA.

Iste godine je prvi je put opisano automatsko sekvenciranje, a tvrtka Applied Biosystems je na tržište izbacila prvi genetički analizator, model 370A. Šest godina poslije ista tvrtka predstavila je i prvi kapilarni sustav elektroforeze koji će kroz 30-ak godina u potpunosti potisnuti genetičke analizatore bazirane na klasičnoj vertikalnoj poliakrilamidnoj gel elektroforezi. Analiza STR lokusa prvi je put uvedena 1993. godine, a samo dvije godine kasnije i službeno je bio proizveden prvi ABI 310 kapilarni genetički analizator, kao i *TaqGold* polimeraza koja je i danas najkorišteniji enzim u procesu forenzičke analize DNA. U ovom periodu razvijaju se prvi multipleks STR sustavi, koji omogućavaju istovremenu analizu više STR lokusa (trenutno se rutinski proizvode sustavi za amplifikaciju 27 STR i više lokusa u jednoj reakciji), kao i *fast*-PCR uređajite višekapilarni genetički analizatori koji omogućavaju jednostavnu i istovremenu elektroforezu više uzoraka za izuzetno brzo procesiranje. Brzina analize postala je neophodno posebna u laboratorijima koji se primarno zasnivaju na procesiranju uzoraka za DNA baze podataka. Početkom ovog stoljeća zabilježena je i ekspanzija upotrebe novih biljega kao što su plimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), koji su kasnije omogućili napredak čip biotehnologije i povećali učestalost analize i uporabnu vrijednost mitohondrijske DNA, kao i molekularnih biljega vezanih uz spolne kromosome. Modifikacija postojećih STR genetičkih biljega i kreiranje miniSTR koncepta omogućilo je analizu izuzetno malih količina visokodegradirane DNA koja se često može naći u pojedinim tragovima. U posljednjem desetljeću

izuzetno zanimljivim pokazao se i pravac tzv. DNA fenotipizacije, tj. predviđanja osnovnih fenotipskih karakteristika osobe koja je ostavila određeni biološki trag, primarno na osnovu analize SNP biljega, o čemu će biti riječi u poglavlju 10.

Također, pozornost svjetske znanstvene javnosti pobudila su istraživanja genoma neandertalca koja su dala zanimljive rezultate (Green *et al.*, 2006, 2008; Noonan *et al.*, 2006). Njihova osnovna namjera bila je sekvenciranje što većeg dijela genoma ove vrste za koju se sa sigurnošću zna da je jednom dijelila planet Zemlju zajedno s vrstom *Homo sapiens*. Cilj tog sekvenciranja bio je utvrđivanje sličnosti i različitosti genoma ovih dviju vrsta te ispitivanja moguće razmjene genetičkog materijala među njima. I pored određenih sumnji vezanih uz točnost dobivenih rezultata (Wall i Kim, 2007), ova istraživanja otvorila su mnoga pitanja o stvarnim mogućnostima primijenjenih molekularno-genetičkih metoda.

Razvoj forenzičke genetike uistinu je dinamičan i gotovo svakog se mjeseca pojavi neki novi proizvod koji znatno pojednostavljuje već postojeće postupke ili nudi sasvim nova rješenja u području forenzičke analize DNA.

Skoro svaka znanstvena disciplina ima svoje heroje koji su bitno utjecali na njen daljnji razvoj. Forenzička genetika jedna je od rijetkih disciplina u kojoj su i antiheroji ostavili značajan trag kroz podizanje svijesti javnosti o neophodnosti analize DNA i o potrebi za ulaganjem u ovo obećavajuće oruđe. Stoga niti jedna knjiga iz područja forenzičke genetike ne bi trebala zaobići sljedeća tri slučaja.

Slučaj #1 – Colin Pitchfork: Kada čovjek „uđe u povijest“ na osnovu svojih djela, to svakako znači da je učinio nešto po čemu će ga generacije pamtili. Colin Pitchfork prva je osoba osuđena na osnovu rezultata analize DNA. U selu Enderby, okrug Narborough (Leicestershire, UK), 1983. godine silovana je i ubijena 15-godišnja Lynda Mann. Tri godine poslije u istom selu brutalno je silovana i ubijena njena vršnjakinja Dawn Ashworth. Nakon kraće istrage, lokalni mladić po imenu Richard Buckland priznao je ubojstvo druge djevojke, no dokazi niti u jednom slučaju nisu upućivali na njega. Primjenom u to vrijeme revolucionarne nove tehnike – analize DNA – ispitano je preko 5.000 muškaraca, lokalnih stanovnika (dobrovoljnih donora krvi ili brisa sluznice usne šupljine), no nisu dobiveni pozitivni rezultati. Godinu dana kasnije, pod nerazjašnjenim i pomalo kontroverznim okolnostima, došlo se do uzorka krvi Colina Pitchforka, čiji se DNA genotip u potpunosti poklapao s DNA genotipom dobivenim iz tragova sperme pronađenih na oba mjesta zločina. Zanimljivo je da je, prema policijskom zapisniku, Pitchforkov uzorak bio analiziran već u prvim skupinama osumnjičenih osoba, ali nije zabilježeno poklapanje. Misterija je razriješena kada je dokazano da je Pitchforkov poznanik Ian Kelly, uz falsificirani dokument, u toj prvoj analizi podmetnuo svoj biološki trag umjesto Pitchforkovog.

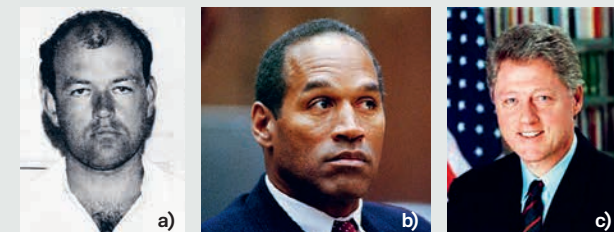
Colin Pitchfork je osuđen na doživotni zatvor, ali je 2021. godine pušten na uvjetnu slobodu radi uzornog ponašanja i resocijalizacije kroz koju je uspješno prošao. Samo dva mjeseca nakon puštanja na slobodu, Pitchfork je primijećen kako se približava i pokušava ostvariti komunikaciju s mladim djevojkama čime je prekršio uvjetni otpust, te je zbog toga vraćen u zatvor. Iako mu je u lipnju 2023. godine ponovno odobren uvjetni otpust, odluka je osporena u prosincu 2023. godine. No, početkom 2024. godine, ubojica je uspješno podnio zahtjev za preispitivanje odluke nakon čega se provode saslušanja o tome hoće li biti pušten na uvjetnu slobodu, što nailazi na veliko protivljenje javnosti, posebno obitelji njegovih žrtava. U kontekstu ovog slučaja, zanimljiva je i činjenica da je već u svojoj prvoj službenoj primjeni analiza DNA ne samo poslala pravog počinitelja u zatvor, nego i oslobodila nedužnog Bucklanda svih optužbi, ali i poslala u zatvor Lana Kellyja, osobu koja je prva pokušala učiniti podmetanje tragova namijenjenih za analizu DNA.

Slučaj #2 – O.J. Simpson: O.J. Simpson bio je pravi superstar, idol svih mladih ljudi u Sjedinjenim Državama SAD-u, a posebno mladih Afroamerikanaca koji su kroz njegovu karijeru vidjeli mogućnost bijega od siromaštva i neimaštine. Međutim, uspješni profesionalni igrač američkog nogometa, a poslije i glumac, 1994. godine optužen je za dvostruko ubojstvo svoje bivše žene (Nicole Brown Simpson) i njenog prijatelja (Ronald Goldman). Nakon maratonski dugog sudskog postupka koji je izazvao veliki interes američke javnosti, ali i velike podjele rasne prirode u samom američkom društvu (žrtve ubojstva bili su bijelci), elitni odvetnički tim koji je branio Simpsona uspio je baciti sumnju na proceduru prikupljanja i procesiranja uzoraka metodom analize DNA. Točnije, metoda je opisana kao izuzetno dobra i moćna, ali je sumnja pala na profesionalnost ljudi koji su je provodili. Eksperti koje je angažirao odvetnički tim, a kojeg je predvodio glasoviti znanstvenik dr. Henry Lee, uspjeli su ukazati na propuste koji su uočeni, i to: a) prilikom prikupljanja tragova s mjesta zločina i od O.J. Simpsona (prikupljanje više bioloških tragova istim rukavicama, predugo i bezrazložno zadržavanje nespornog traga krvi osumnjičenog od strane policijskog eksperta, koji je prikupljeni trag držao skoro cijeli dan u svojoj laboratorijskoj kuti, prije nego ga je predao kao dokaz); b) propuste u ranije provedenim analizama laboratorija koje su provele analizu DNA u ovom slučaju (odnosno, greške koje su laboratoriji imali prilikom testiranja kvalitete rada 1988. i 1989.); c) nelogičnosti u vezi s tragovima krvi pronađenim na pojedinim predmetima (tragovi krvi na čarapama za koje se tvrdilo da je O.J. Simpson imao na sebi tijekom ubojstva, a koje su pronađene u njegovom stanu, simetrično su raspoređeni tako da su, prema mišljenju Henryja Leeja mogli nastati samo naknadnim nanošenjem na čarape ili u slučaju da je O.J. imao rupu na nozi, u pojedinim tragovima krvi pronađenim na mjestu zločina detektirano je prisustvo antikoagulansa EDTA koji se nikako prirodnim putem ne može naći u ljudskoj krvi); d) nepouzdanosti svjedoka

(pozivajući se na 5. amandman, detektiv Mark Fuhrman bio je prisiljen ne ponoviti, a samim tim i ne pobiti svoje prethodno vještačenje, vezano uz rukavicu pronađenu na Simpsonovom imanju, a na kojoj su se nalazili tragovi krvi žrtava, jer ga je odvetnički tim, imputirajući mu rasističke izjave iz prošlosti, uspio diskreditirati kao svjedoka i dovesti pred opciju samooptuživanja za rasističke ispade). Kao rezultat svega ovoga, godinu dana poslije, porota je Simpsona proglasila nevinim. Zanimljivo je da je u parničnom postupku koji su naknadno pokrenuli roditelji Rona Goldmana, Simpson osuđen i presuđeno je da obiteljima žrtava mora isplatiti 33,5 miliona dolara. Simpson je umro u tijeku pisanja ovog izdanja, 10. travnja 2024. godine, službeno bez zatvorske kazne za dvostruko ubojstvo. Tijekom cijelog prvog suđenja, američka javnost bila je bombardirana velikim brojem informacija o tome što je analiza DNA i o njevoj važnosti u forenzičkim istragama, tako da su neposredno nakon toga tvrtke koje su proizvodile laboratorijske potrepštine za forenzičku analizu DNA imale pristup skoro neograničenim fondovima za razvoj novih metoda i uređaja. To je rezultiralo značajnim napretkom i razvojem u području forenzičke genetike i njoj srodnih znanstvenih disciplina, a posebno je doprinijelo standardizaciji protokola za prikupljanje, arhiviranje i procesuiranje DNA dokaza.

Slučaj #3 – Bill Clinton: „I have never had sexual relations with Monica Lewinsky“, rekao je predsjednik Sjedinjenih Američkih Država Bill Clinton 1998. godine i, kako je kasnije dokazano, slagao. Opet je forenzička analiza DNA odnijela veliku pobjedu i definitivno pobjegla iz „znanstvene, stručne i javne anonimnosti“. Dokazala je da je niti najmoćniji čovjek na svijetu, a to predsjednik Sjedinjenih Država sigurno je, ne može prevariti, niti potkupiti. Tragovi sperme koji su na „misteriozan način“ dospjeli na čuvenu plavu haljinu gospođice Lewinsky definitivno su pripadali Billu Clintonu i to je okončalo još jedan proces koji je katapultirao analizu DNA u visoko društvo.

Da nije bilo ovih slučajeva možda ne bi bilo ni narednih poglavlja ove knjige pa onda nije nikakvo čudo da se oni nađu u jednom udžbeniku forenzičke genetike (slika 2.5.).



SLIKA 2.5. Možda nisu priznati znanstvenici, ali definitivno zaslužuju da im se slike nađu u jednom ovakvom udžbeniku: a) Colin Pitchfork, b) O.J. Simpson, c) Bill Clinton.

- Andelinović S, Sutlović D, Erceg Ivkosić I, *et al.* Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat Med J.* 2005; 46(4): 530-539.
- Green RE, Krause J, Ptak SE, *et al.* Analysis of one million base pairs of Neanderthal DNA. *Nature* 2006; 16: 330-336.
- Green RE, Malaspina A-S, Krause J, *et al.* A complete Neanderthal mitochondrial genome sequence determined by high-throughput sequencing. *Cell* 2008; 134: 416-426.
- Hadžiselimović R i Pojskić N. Uvod u humanu imunogenetiku. Sarajevo, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, 2005.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable „Minisatellite” Regions in Human DNA. *Nature* 1985a; 314: 67-73.
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual Specific „Fingerprints” of Human DNA. *Nature* 1985b; 316: 76-79.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860-921.
- Marjanović D, Durmić Pašić A, Kovačević L, *et al.* DNA Identification of Skeletal Remains of Communist Armed Forces Victims During and After World War II: Combined Y-Chromosome Short Tandem Repeat (STR) and MiniSTR Approach. *Croat Med J* 2009; 50(3): 296-304.
- Marjanović D, Durmić-Pašić A, Bakal N, *et al.* DNA Identification of Skeletal Remains from the Second World War Mass Graves Uncovered in Slovenia. *Croat Med J* 2007; 48: 513-519.
- Marjanović D, Konjhdžić R, Butorac SS, *et al.* Forensic DNA databases in Western Balkan region: retrospectives, perspectives, and initiatives. *Croat Med J* 2011a; 52: 235-244.
- Marjanović D, Kovačević L, Čakar J, *et al.* DNA Analysis of Skeletal Remains from Bosnian Medieval Royal Tombs. 21st International Meeting on Forensic Medicine Alpe-Adria-Panonia, Sarajevo, BiH 2012, Abstract book 11.
- Marjanović D. Sekvenciranje DNK fragmenata. U: Bajrović K, Čaušević A, Hadžiselimović R. Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sarajevo: INGEB, 2005a.
- Marjanović D., Dobrača I., Drobnič K. Prikupljanje, prezervacija i transport uzoraka za DNK analizu, Sarajevo: INGEB, 2005c.
- Marjanović D, Durmić-Pašić A, Bakal N, *et al.* DNA identification of skeletal remains from the World War II mass graves uncovered in Slovenia. *Croat Med J.* 2007; 48(4): 513-519.
- Mendel JG. Versuche über Pflanzenhybriden. *Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brünn*, Bd. IV für das Jahr 1865, Abhandlungen, 3-47. Prevod na engleski jezik: Bateson W. Experiments in plant hybridization. *Journal of the Royal Horticultural Society* 1901, 26, 1-32.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-273.

- Noonan JP, Coop G, Kudaravalli S, *et al.* Sequencing and analysis of Neanderthal genomic DNA. *Science* 2006; 314: 1113-1118.
- Polak A. Krvne grupe ABO sustava - Transfuzija krvi. Beograd, Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, 1966.
- Primorac D, Andelinović Š, Definis-Gojanović M, *et al.* Identification of skeletal remains in Croatia and Bosnia and Herzegovina, including the homeland war - a 30-year review. *Croat Med J.* 2024; 65(3): 239-248. doi:10.3325/cmj.2024.65.239
- Primorac D, Andelinović S, Definis-Gojanović M, *et al.* Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia, and Herzegovina by use of standard forensic methods and DNA typing. *J Forensic Sci.* 1996; 41(5): 891-894.
- Schwartz JH. Recognizing William Bateson's contributions. *Science.* 2007; 315(5815): 1077.
- Silver H. Paternity testing. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27(5): 391-408.
- Tjio JH i Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956, 42, 1-6.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, *et al.* The sequence of the Human Genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351.
- Wall JD i Kim SK. Inconsistencies in Neanderthal Genomic DNA Sequences. *PLoS Genet* 2007; 3(10): e175.
- Wambaugh J. *The Blooding*. New York, NY, Bantam Books, 1989.
- Watson JD i Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737-738.
- Zergollern LJ, *et al.* *Medicinska genetika, II dio*, Zagreb, Školska knjiga, 1994.

3.

VARIJABILNOST DNA I MOLEKULARNI BILJEZI U FORENZIČKOJ GENETICI

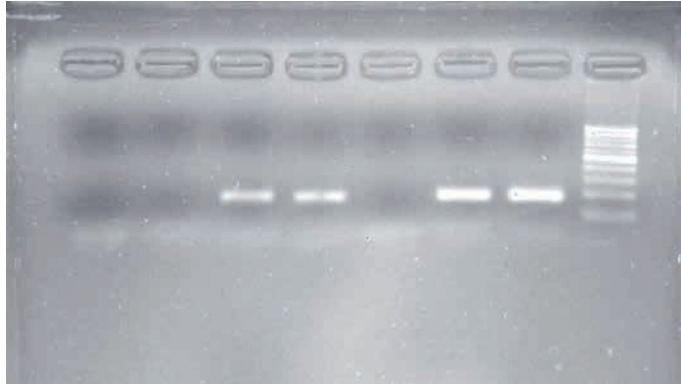
prof. dr. sc. Damir Marjanović
prof. dr. sc. Dragan Primorac
doc. dr. sc. Vedrana Škaro

VARIJABILNOST DNA I MOLEKULARNI BILJEZI U FORENZIČKOJ GENETICI

Analiza DNA u forenzičkoj genetici temelji se na spoznaji da je samo 0,1% DNA različito između dvije osobe, s izuzetkom jednojajčanih blizanaca koji su identični cijelom dužinom svojih DNA molekula. Taj mali dio DNA sadrži veliki broj genetičkih biljega, tzv. *polimorfizama* (grčki *poly* - mnogo; morphe- oblik), odnosno razlika u genetičkoj informaciji među pojedincima pa zato možemo s gotovo potpunom sigurnošću tvrditi da svako od nas ima jasno uočljivu jedinstvenu genetičku građu. Upravo se na činjenici da smo svi dovoljno genetički različiti temelji analiza tragova pronađenih na mjestu događaja, identifikacija žrtava, utvrđivanje počinitelja silovanja ili rutinsko utvrđivanje očinstva.

Genetički biljeg može biti gen ili drugi segment DNA sekvence, poznate genske lokacije te se može koristiti kao parametar identifikacije pojedinaca ili nasljeđivanja genetičkog materijala (slika 3.1.). Genetički se biljeg kao termin koristi za dio DNA čija su svojstva i pozicija (lokus) jasno određeni i na osnovi kojih se živi sustavi međusobno razlikuju (Primorac, Marjanović *et al.*, 2008).

Forenzička genetika zasniva se na analizi tih različitosti i sličnosti, a u cilju potvrđivanja toga da pronađeni biološki materijal potječe ili ne potječe od istraživane osobe ili, da neka osoba jest ili nije u srodstvu s nekom drugom osobom. U ranim forenzičko-genetičkim analizama bili su primjenjivani VNTR biljezi koji su krajem prošlog stoljeća u potpunosti potisnuti ekspanzijom primjene STR biljega. Usporedo s tim, posebno u identifikaciji žrtava rata, često je upotrebljavana analiza mitohondrijske DNA, tj. analiza njenih hipervarijabilnih regija dok su najnovija istraživanja u ovom području usmjerena k ispitivanju mogućnosti primjene SNP biljega. Iz tih razloga, u ovome poglavlju svaki od tih biljega bit će šire elaboriran, u ovisnosti o značaju i udjelu njihove današnje primjene u području forenzičke genetike.



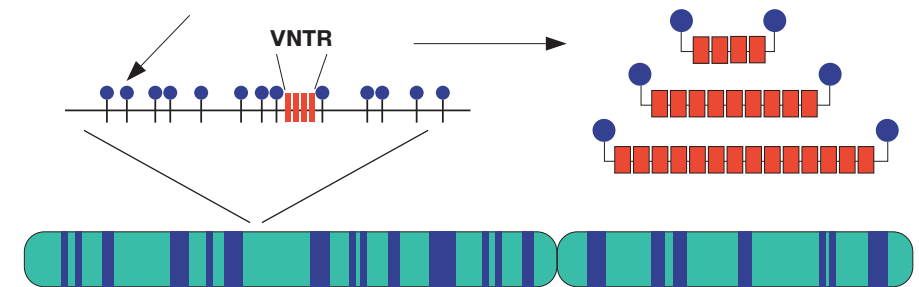
SLIKA 3.1. Analiza molekularnih markera može ponuditi izuzetno interesantne rezultate. Na slici su prikazani rezultati analize markera na genu *CYP3A4* pomoću alelno specifičnog PCR-a (engl. *allele-specific PCR, AS-PCR*), koja za cilj ima detekciju eventualne promjene sekvence gena u vidu SNP genetičkog biljega.

3.1. VNTR BILJEZI

Poznato je da većina molekule DNA ne sadrži gene, odnosno da nekodirajući dio zauzima veću frakciju DNA molekule, čak i do 98,5%. Taj nekodirajući genetički materijal karakterizira prisutnost velikog broja polimorfnih biljega. Eukariotski genom doslovno je protkan velikim brojem repetitivnih (ponavljajućih) DNA sekvenci, koje mogu varirati po veličini i po broju njihovog ponavljanja u okviru determiniranih alelnih varijanti, kao i po kompleksnosti ponavljajuće sekvence. Ovi genetički biljezi izuzetno su polimorfni i informativni u procesima genetičke individualizacije živih sustava. U ranijim eksperimentima (Britten i Kohne, 1968; Primrose, 1998), repetitivni polimorfni biljezi najčešće su bili detektirani u blizini manjih satelitnih bendova pa su tada bili i označeni kao *satelitna DNA*, a taj se termin i danas često koristi u literaturi. Također, identificiran je veliki broj ovih biljega lociranih u blizini kromosomske centromere. Na osnovi dužine repetitivne sekvence dijelimo ih na minisatelite (10-100 bp) i mikrosatelite (2-10 bp).

VNTR polimorfni biljezi tipični su minisatelitni markeri (slika 3.2.). Ukupna veličina ovih biljega kreće se od 500, pa do 10 000 bp dok im veličina repetitivne jedinice najčešće varira od 15 do 35 bp (National Research Council - NRC, 1996). Većina ovih polimorfnih biljega smještena je u nekodirajućem dijelu DNA, te nisu pod utjecajem prirodne selekcije, što ih čini odličnim biljezima za genetičku identifikaciju bioloških sustava. Ovi biljezi izuzetno su informativni, a broj različitih alelnih varijanti na njima može biti veći od 100. Također, VNTR lokusi imaju relativno visoku stopu mutacije (NRC, 1996) koja uzrokuje promjene

Lokacija djelovanja restriktaze

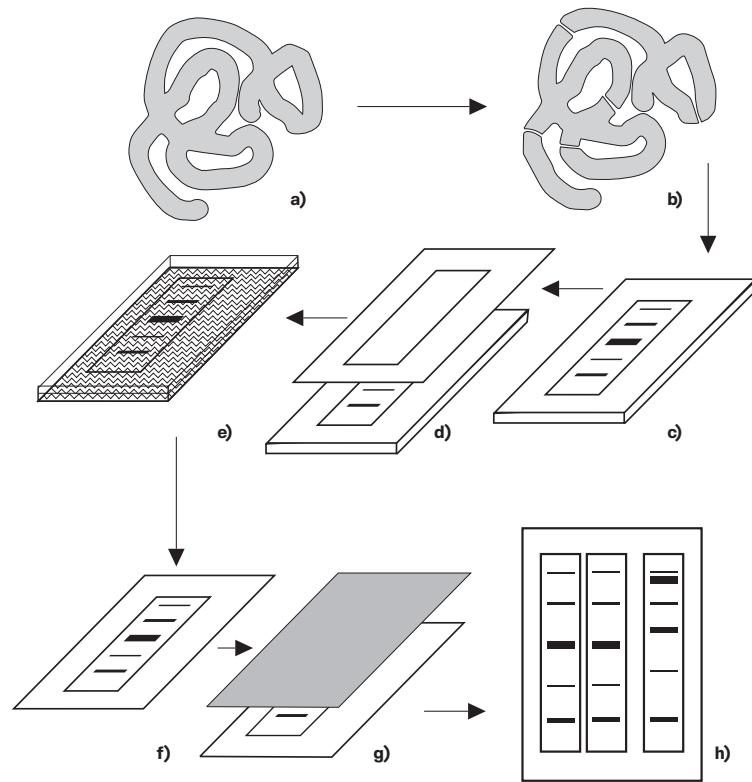


SLIKA 3.2. Shematski prikaz VNTR biljega. Analiza ovih biljega uglavnom je bila bazirana na primjeni RFLP metode. S obzirom na to da se radilo o analizi relativno velikih biljega s dužim repetitivnim sekvencama, ni RFLP metoda, a niti VNTR biljezi nisu bili optimalno rješenje za analizu DNA forenzičkih tragova.

u broju ponavljajućih sekvenci unutar promatranog biljega. Upravo je to rezultiralo velikim brojem alelnih varijanti koje se mogu detektirati na njima. Iz svih navedenih razloga, ovi biljezi su obilježili prvo desetljeće forenzičke analize DNA. Prva Analiza DNA koju je 1985. godine realizirao Jeffrey zasnivala se na upotrebi ovog tipa biljega. Sve do sredine 90-ih godina dvadesetoga stoljeća, VNTR biljezi koristili su se u rutinskim forenzičkim analizama DNA.

3.1.1. RFLP analiza minisatelitnih biljega

Tehnika koja se koristila u njihovoj detekciji nazivala se VNTR profiliranje (NRC, 1996) i zasnivala se na dobro poznatoj RFLP metodi (slika 3-3). Izolirana DNA prvo se cijepa specifičnim restrikcijskim enzimima na veliki broj fragmenata. Neki od tih fragmenata sadrže VNTR lokuse koji se dalje analiziraju. Tako fragmentirana DNA postavi se na, najčešće, agarozni ili poliakrilamidni gel elektroforetski sustav na kojem migrira. To rezultira njenim razdvajanjem pojedinih DNA fragmenata prema veličini. Veći fragmenti pređu kraći, a manji fragmenti prelaze dulji put. Nakon toga uzorci se denaturiraju u jednolančanu DNA te se jednostavnom metodom otiska (engl. *blotting*) prenose na najlonsku membranu. Dodaje se radioaktivno obilježena proba, koja je komplementarna DNA sekvenci koja okružuje istraživani VNTR biljeg, kao i sam biljeg. Nakon hibridizacije membrana se ispere te stavi na fotografski film, gdje se radioaktivno obilježeni biljezi „preslikaju” u vidu tamnih točaka. Te točke predstavljaju alelne varijante istraživane osobe na analiziranom VNTR lokusu. Ova se metoda iz tih razloga često označava i kao autoradiografska metoda (slika 3.3.). Usporedno s uzorcima, RFLP metodom moraju biti procesirani i standardi koji sadrže sve



SLIKA 3.3. Shematski prikaz RFLP metode: (a) izolirana DNA tretira se odabranim restriktivnim enzimom (b), dobiveni fragmenti razdvajaju se horizontalnom gel elektroforezom (c), (d) prijenos fragmentirane DNA na membranu – Southernova metoda otiska, (e) radioaktivno obilježavanje DNA fragmenata, (f) ispiranje membrane, (g) prenošenje dobivenih vrpca na fotografski film (h) očitavanje rezultata (dijelovi slike preuzeti i prilagođeni s <http://homepage.smc.edu/>, pristup 23.8.2024.).

ranije utvrđene alelne varijante na promatranom VNTR lokusu. Ti standardi nazivaju se alelne ljestvice (engl. *allelic ladder*) i bez njih bilo bi nemoguće jasno odrediti veličinu pojedine alelne varijante.

Nakon RFLP analize jednog VNTR lokusa, membrana bi se isprala i cijeli bi se postupak ponovio za drugi biljeg, što znači da ovom metodom nije bilo moguće istovremeno analizirati više VNTR lokusa. Stoga se kasnije pokušalo s analizom VNTR biljega PCR metodom koja je dala tada značajne rezultate. FBI koji je bio pionirska institucija u procesima primjene i standardizacije forenzičke analize DNA, još je 1988. godine započeo rutinsku primjenu RFLP metode u analizama bioloških tragova. Međutim, usavršavanjem PCR metoda i pojavljivanjem prvog STR multipleks sustava, ovaj pristup postupno je mijenjan, da bi službeno od

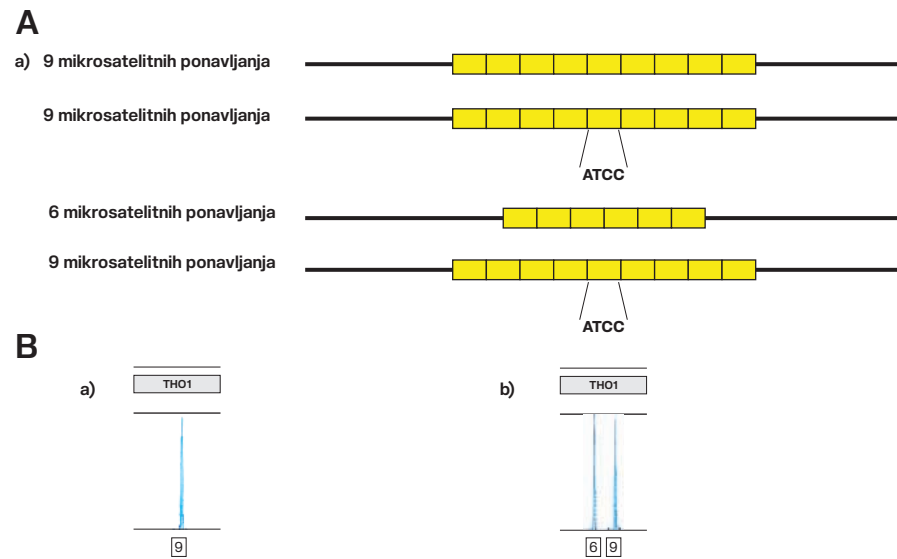
1999. godine FBI u potpunosti napustio RFLP testiranje forenzičkih uzoraka. Tako su, čini se, VNTR lokusi ustupili mjesto novijim mikrosatelitskim STR biljezima.

Osnovni nedostatak ove metode u tehničkom smislu bila je kompleksnost i dugotrajnost procesa analize, što je značajno ograničavalo broj uzoraka koji se mogu procesirati u vremenskoj jedinici. S druge strane, možda još značajniji ograničavajući faktor je količina DNA prisutna u tragu koja je mogla biti detektirana ovom metodom i primjenom VNTR biljega. S obzirom na njihovu veličinu, za uspješno genotipiziranje, uzorak je morao sadržavati relativno velike količine dobro očuvane DNA (u usporedbi s količinama i stupnjem degradacije koje se danas mogu analizirati). Stoga, veliki broj tragova koji se danas uspješno analiziraju primjenom PCR tehnologije i upotrebom STR biljega ne bi bilo moguće analizirati primjenom RFLP-VNTR modela. Na kraju, jedna od važnih stavki bila je i relativno visoka cijena jedne ovakve analize, kako zbog specifične aparature potrebne za nju, tako i zbog značajnog utroška potrebnih reagensa i potrošnog materijala u procesu analize. Ipak, povijesno, značaj ove metode nikako ne smije biti zaboravljen. Krajem 80-tih i početkom 90-tih godina prošlog stoljeća, postojao je značajan broj VNTR biljega koji su bili analizirani primjenom RFLP metode. Najčešćih šest biljega (D1S7, D2S44, D4S139, D10S28, D14S13 i D1S79) pokazivali su zavidan stupanj heterozigotnosti (od 0,799 do 0,943), kao i broja alelnih varijanti (od 9 do 38), stoga i ne čudi što su relativno dugo bili primjenjivani na području Sjeverne Amerike (Budowle *et al.*, 2000).

3.2. STR BILJEZI

Kako je već spomenuto, eukariotski genom sadrži veliki broj biljega čija se polimorfnost zasniva na različitom broju ponavljanja poznatog motiva baza. Otkriće i utvrđivanje osnovnih parametara STR biljega, kratkih uzastopnih ponavljanja, dovelo je do njihovog jasnog definiranja kao molekularnih polimorfizama koji se danas široko primjenjuju u forenzičkoj genetici (Butler, 2005).

Za razliku od minisatelitnih biljega, npr. VNTR-ova, STR biljezi sastoje se od iznimno kratkih ponavljajućih sekvenci dužine 2-7 (a prema pojedinim izvorima 2-10) baznih parova koji se na određenom lokusu ponavljaju određeni broj puta (slika 3.4.). Broj ponavljanja varira od osobe do osobe. Međutim, nije neuobičajeno da dvije osobe imaju iste alelne varijante na promatranom STR lokusu, pa čak i da se poklapaju na dva ili tri STR lokusa, ali najmanja teoretska vjerojatnost da postoje dvije osobe s identičnim alelnim varijantama na, npr. 15 STR lokusa, zastupljenih u komercijalnom multipleks STR sustavu PowerPlex® 16 za kavkazoidno stanovništvo iznosi 1 u $1,83 \times 10^{17}$ osoba (Sprecher *et al.*, 2000).



SLIKA 3.4. Shematski prikaz tetranukleotidnog STR lokusa TH01. a) Ako je broj ponavljajućih nizova isti u objema alelnim varijantama, onda se radi o homozigotu koji je vidljiv kao jedan signal; b) ako je broj ponavljajućih nizova različit u dvjema varijantama, onda se radi o heterozigotu i rezultat je vidljiv kao dva signala. B) Elektroferogramski prikaz rezultata analize DNA a) homozigota i b) heterozigota (dijelovi slike preuzeti iz Primorac, Marjanović *et al.*, 2008).

Prava vrijednost ovih biljega je jednostavnost i brzina procesa analize, kao i mogućnost istovremenog promatranja većeg broja STR biljega u takozvanim multipleks STR sustavima, što je omogućilo izuzetno visok stupanj individualizacije prilikom identificiranja tragova. U posljednje vrijeme, ove sekvence su, pored svoje široke primjene u analizi forenzičkoj DNA, postale veoma privlačne kao predmet humano-genetičkih istraživanja s medicinskog aspekta jer se pokazalo da su određeni trinukleotidni STR lokusi, u slučajevima njihove hiperekspanzije, povezani s izvjesnim genopatijama. Ipak, bitno je napomenuti da se ovi trinukleotidi iz etičkih razloga ne koriste u svrhu individualizacije.

3.2.1. Struktura i nomenklatura STR molekularnih biljega

Biljezi u čijim se ponavljajućim sekvencama nalaze četiri baze (tetranukleotidni STR lokusi) najbolje su istraživani i najčešće analizirani biljezi u svrhu individualne i populacijske raznolikosti. No, svoju praktičnu primjenu pronašli su i pojedini tri- i pentanukleotidni biljezi. Ne tako rijetko, posebno u analizi tragova animalnog porijekla, koriste se i dinukleotidi, no njihova primjena u profiliranju

humane DNA je znatno rjeđa. Komercijalni multipleks sustavi često omogućavaju istovremenu analizu tetra i penta lokusa. Tako se dobivaju rezultati s visokom razinom indeksa isključenja.

Poželjne osobine jednog STR lokusa su:

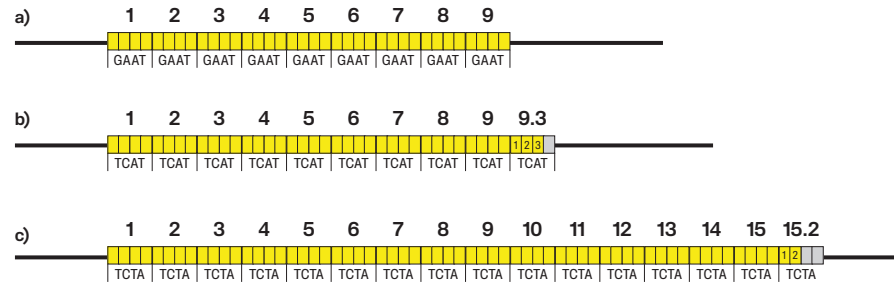
- izražena heterozigotnost
- mala molekularna težina
- jasno definirane repetitivne jedinice (ponavljajući nizovi)
- jasno determinirane alelne varijante
- jednostavna i pouzdana amplifikacija.

Postoji više tipova STR lokusa (Urquhart, 1994):

1. strukturalno jednostavni (engl. *simple consisting*) koji sadrže jedan tip ponavljajućeg niza (npr. D5S818, D13SS317, D16S539, TPOX, CSF1PO itd.)
2. strukturalno jednostavni uz prisutnost nekonzistentnih alelnih varijanti (engl. *simple with nonconsensus alleles*), koji također imaju jedan tip ponavljajućeg niza (npr. TH01, D18S51, D7S820 itd.)
3. strukturalno složeni (engl. *compound consisting*), s dva ili više tipova ponavljajućeg niza (poput GABRB15)
4. strukturalno složeni uz prisutnost nekonzistentnih alelnih varijanti (engl. *compound with nonconsensus alleles*), s dva ili više tipova ponavljajućeg niza (npr. D3S1358, D8S1179, FGA, vWA itd.)
5. kompleksni (engl. *complex repeats*) s više ponavljajućih nizova s prisutnim insercijskim sekvencama DNA (npr. D21S11)
6. hipervarijabilni (engl. *hypervariable repeats*; npr. SE33), koji imaju više ponavljajućih nizova i nekonzistentnih alelnih varijanti te su jako kompleksni za analizu.

Na slici 3.5. prikazani su najčešći tipovi STR lokusa koji su uključeni u standardni Kombinirani sustav indeksiranja DNA CODIS (engl. *Combined DNA Indexing System, CODIS*), o kojem će biti više riječi u drugim dijelovima ovog poglavlja.

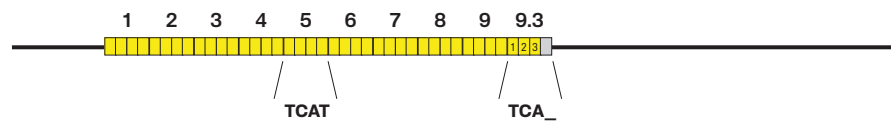
U listopadu 1993. godine, DNA komisija Međunarodnog društva za forenzičku hemogenetiku ((engl. *International Society of Forensic Haemogenetics, ISHF*) preporučila je, a 1997. godine i dopunila, nomenklaturu STR lokusa i alelnih varijanti koja je i danas u upotrebi. Inače, ovo tijelo danas je poznato pod nazivom Međunarodno društvo za forenzičku genetiku (engl. *International Society of Forensic Genetics, ISFG*). U imenu STR lokusa sadržan je broj kromosoma na



SLIKA 3.5. Shematski prikaz najčešćih tipova STR lokusa koji se pojavljuju u standardnom CODIS (engl. *Combined DNA Indexing System*) setu lokusa: a) strukturno jednostavni – alelna varijanta 9 na TPOX lokusu; b) strukturno jednostavni uz prisutnost nekonzistentnih alelnih varijanti – alelna varijanta 9.3 na TH01 lokusu; i c) strukturno složeni uz prisutnost nekonzistentnih alelnih varijanti – alelna varijanta 15.2 na vWA lokusu. Sekvence ponavljajućih motiva bazirane su na podacima preuzetim s www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/images (dijelovi slike preuzeti iz Primorac, Marjanović *et al.*, 2008).

kojemu je pronađen, npr. D21S11 znači da se radi o DNA biljegu (D) smještenom na 21. kromosomu (21) koji je prisutan u samo jednoj kopiji, na samo jednom mjestu u genomu (engl. *single-copy* - S) i to je 11. otkriveni i kategorizirani biljeg na 21. kromosomu (11). Umjesto slova S koje se koristi kada se biljeg pojavljuje samo na jednom mjestu, slovo Z je oznaka ako se isti biljeg pojavljuje na više mjesta u genomu.

Nomenklatura alelnih varijanti bazira se na broju ponavljajućih sekvenci sadržanih u njoj. Ako alelna varijanta sadrži devet ponavljajućih nizova, onda se ona označava brojem 9. Ako alelna varijanta nema uobičajeni ponavljajući motiv, tj. ako je u njoj sadržan matematički cijeli broj, npr. 9, ponavljajućih nizova, te još jedan dio tog niza u vidu npr. 3 baze, onda se alelna varijanta označava s *n.m*, u ovom slučaju s 9.3, gdje je *n* (9) broj potpunih ponavljajućih nizova, a *m* (3) broj baza nekompletnog ponavljajućeg niza kojeg alelna varijanta sadrži (slika 3.6.). Alelne varijante koje sadrže nekompletni dio repetitivne sekvence nazivaju se mikrovarijante.



SLIKA 3.6. Shematski prikaz alelne varijante nepotpunog ponavljajućeg niza – alelna varijanta 9.3 na TH01 lokusu (dijelovi slike preuzeti iz Primorac, Marjanović *et al.*, 2008).

Pored toga, ista komisija uvela je i standardizaciju opisa izabranih repetitivnih sekvenci. Naime, u pojedinim izvorima za iste lokuse navode se različite repetitivne sekvence. To nastaje kao rezultat uzimanja različitih lanaca DNA molekule kao parametra za određivanje repetitivne sekvence. Npr. za poznati STR lokus TH01, koji ulazi u sastav CODIS seta lokusa, pojedini autori navodili su kao repetitivnu sekvencu TCAT (Kimpton *et al.*, 1993), dok su drugi navodili AATG (Edwards *et al.*, 1991).

Da bi se izbjegli takvi nesporazumi, donesena su sljedeća pravila:

1. Ako se STR lokus nalazi u protein kodirajućoj regiji, za motiv repetitivne sekvence uzima se redosljed baza na kodirajućem lancu.
2. Za STR lokuse koji se nalaze u nekodirajućoj regiji, osnovni motiv repetitivne sekvence jest onaj koji je naveden prilikom prvog publiciranja podataka o tom lokusu ili, ako nije službeno objavljen, prilikom prvog unosa tog lokusa u službenu bazu podataka (GenBank).
3. Ako je prije donošenja ovih pravila već ustanovljena repetitivna sekvenca na neki drugi način, onda se ona ne treba mijenjati da ne bi došlo do zabune u interpretaciji rezultata.

Slične su preporuke pripremljene i usvojene za utvrđivanje motiva, ali i alelnih varijanti repetitivnih sekvenci:

1. Motiv repetitivne sekvence određuje se na osnovi prvog 5' nukleotida u njoj.
2. Nepotpuni motiv repetitivne sekvence uključuje cijeli broj potpunih repetitivnih jedinica i broj baza u nepotpunoj jedinici (primjer je opisan ranije).
3. Službena alelna ljestvica (engl. *allelic ladder*) koristi se za imenovanje alelnih varijanti na danom lokusu.

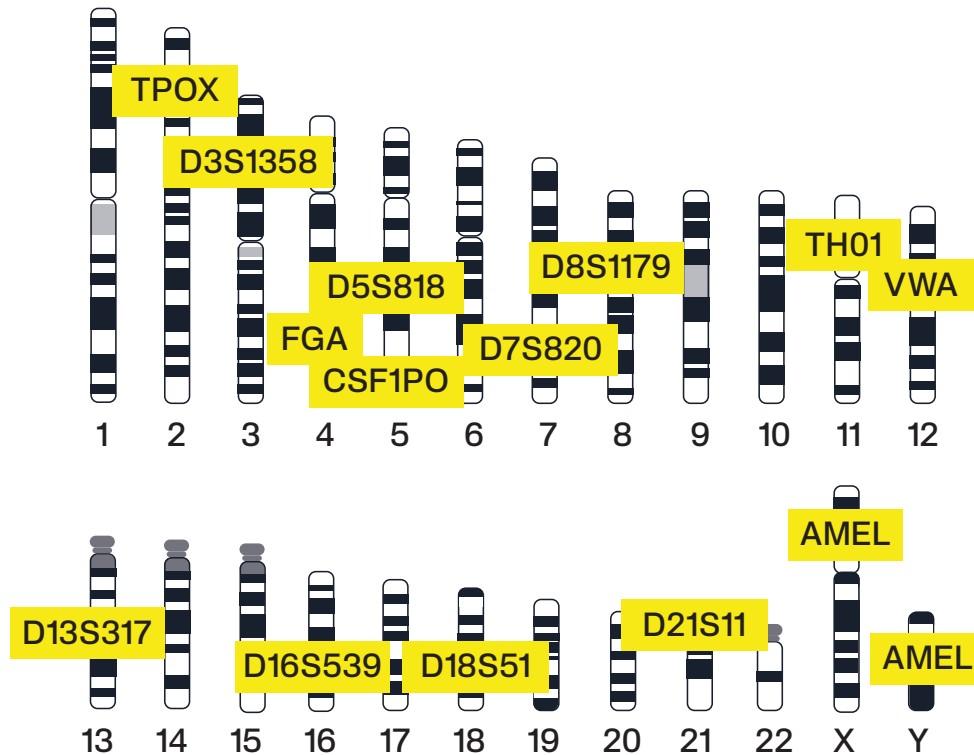
3.2.2. Standardni STR sustav lokusa

Usporedno s uvođenjem i razvojem primjene STR lokusa kao rutinske metode u forenzičkoj analizi DNA bioloških tragova, težilo se standardizaciji ovih analiza. Osnovni cilj tog procesa podrazumijevao je uspješnu međusobnu razmjenu podataka. Naime, već u ranoj fazi primjene forenzičke analize DNA, a poučeni iskustvom primjene prethodnih metoda individualizacije (npr. analiza otiska prsta), shvatilo se da najvažnija snaga ove metode počiva upravo na mogućnosti kreiranja baza podataka i međusobne razmjene informacija među njima. To je, kao osnovnu premisu podrazumijevalo korištenje istih genetičkih biljega u što većem broju analitičkih laboratorija. Identični genetički STR biljezi korišteni u

različitim laboratorijima, ali pod standardiziranim uvjetima, bili su jedino jamstvo da će rezultati dobiveni u laboratoriju u Kanadi, biti usporedivi s rezultatima dobivenim u SAD-u, Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj ili u bilo kojem drugom dijelu svijeta. Stoga su se pojavili određeni sustavi lokusa koje su predložile službene institucije, kao što su FBI, INTERPOL, Europska mreža forenzičkih instituta (engl. *European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI*) i drugi.

3.2.2.1. CODIS lokusi

Prvu službenu DNA bazu podataka, zasnovanu na upotrebi STR lokusa, kreirao je FBI sredinom 90-tih godina prošlog stoljeća (FBI, 2004). Ova baza podataka nazvana je Kombinirani sustav indeksiranja DNA (engl. *Combined DNA Index-*



SLIKA 3.7. Shematski prikaz kromosomskih pozicija 13 CODIS STR biljega (dijelovi slike preuzeti s <https://bioclimate.commonscs.cuny.edu/analyzing-dna/variable-number-tandem-repeats/>, pristup 23.8.2024.).

ing System, CODIS) i bit će detaljnije elaborirana u poglavlju vezanom za forenzičke baze DNA podataka. Primjena osnovnog seta od 13 STR tetranukleotidnih lokusa (D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA, D8S1179, TPOX i FGA) je neophodan tehnički preduvjet za unošenje određenog DNA profila u CODIS bazu. Točnije, 1997. godine, nakon višestrukog istraživanja 17 kandidiranih STR lokusa, odabrano je njih 13 koji su nazvani set CODIS lokusa. Na priloženoj slici (slika 3.7.) prikazane su genomske (kromosomske) lokacije za svaki od odabranih lokusa, čijom se kombinacijom, u jedinstvenom DNA profilu, vjerojatnost da postoje dvije nesrodne osobe s identičnim DNA profilom smanjuje na vrijednosti mjerene u broječanom intervalu od 10^{17} .

Ovaj set lokusa službeno je propisan kao neophodan u analizi DNA isključivo u SAD-u, no obzirom da se radi o najvećem tržištu kojem su se maksimalno prilagođavale kompanije za proizvodnju komercijalnih PCR setova, CODIS STR lokusi su ubrzo prihvaćeni kao osnovni set za uspostavu baze DNA podataka i u većini drugih država. Zanimljivo je da je tijekom 2011. i 2012. godine, inicirano izmjenama standardnog seta lokusa u Europi i INTERPOL-ovoj bazi podataka, započeta ozbiljna rasprava o potrebi i mogućnosti proširenja postojećeg CODIS seta lokusa (Hares, 2012). Vodeći stručnjaci Američkog Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (engl. *National Institute of Standards and Technology, NIST*) u svojim predavanjima¹ potvrdili su da će se postojeći CODIS set lokusa u skoroj budućnosti proširiti.

To se ostvarilo samo tri godine kasnije, odnosno 2015. godine, kada je set od 13 lokusa preimenovan u osnovni set CODIS lokusa (engl. *core CODIS STR loci*) te proširen na ukupno 20 STR lokusa (engl. *expanded CODIS STR loci*). Uz ranije korištenih 13 lokusa, dodani su: D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S433 i D22S1045. Ideja o proširenju došla je od CODIS radne grupe (engl. *FBI CODIS Core Loci Working Group*), s ciljem da se smanji broj slučajnih poklapanja, poveća međunarodna kompatibilnost rezultata i poboljša moć diskriminacije za kriminalne i slučajeve koji uključuju nestale osobe, gdje je analiza srodstva posebno važna. Prilikom odabira novih lokusa za kreiranje proširenog seta, prednost je dana lokusima koji su već korišteni u drugim zemljama, osim SAD-a, kao i lokusima koji su već korišteni u multipleks setovima. Važan preduvjet za proširenje CODIS seta lokusa na 20 biljega bio je upravo razvoj i validacija multipleks sustava koji su rutinski sadržavali veći broj lokusa, što je značilo da su tehničke i tehnološke pretpostavke već bile ispunjene za ovaj pothvat. DNA

¹ Predavanje održano na *The Copenhagen Forensic Genetic Summer School* (lipanj 2012. godine, Kopenhagen, Danska).

laboratoriji dobili su 24 mjeseca za prilagodbu i prelazak na nova pravila, tako da je minimum od 20 CODIS lokusa za unošenje profila u Američki Nacionalni sustav DNA indeksa (engl. *National DNA Index System, NDIS*) na snazi od 1. siječnja 2017. godine (Hares, 2015; Moretti *et al.*, 2016).

3.2.2.2. INTERPOL-ov standardni set lokusa (ISSOL)

INTERPOL je svoju bazu DNA podataka, poznatu pod nazivom *DNA Gateway* uspostavio 2002. godine. Na kraju 2023. godine, broj unesenih profila iznosio je 280 000, a svoj doprinos dalo je 87 zemalja članica INTERPOL-a.² Važno je naglasiti da zemlje članice INTERPOL-a zadržavaju isključivo pravo na podatke o identitetu vlasnika DNA profila te da se u bazu podataka profili unose koristeći neinformativan alfanumerički kod. Zemlje članice također mogu odabrati s kojim drugim članicama INTERPOL-a žele dijeliti svoje podatke. Ideja INTERPOL-ove baze podataka jest da policija u bazu unosi DNA profil osumnjičenih ili nestalih osoba, nepoznatih posmrtnih ostataka ili profila generiranih koristeći dokaze s mjesta zločina i da dobije rezultate pretraživanja u roku od nekoliko minuta te suradnju nastavi s nadležnim organima zemalja članica.

U cilju uspješne razmjene podataka INTERPOL je prvenstveno preporučio set od sedam lokusa kao osnovni set standardnih lokusa (engl. *INTERPOL Standard Set of Loci, ISSOL*), koji je 2010. godine, na osnovi preporuke ENFSI-a proširen na 12. Pored ovih 12, postoji i set od 16 dodatnih lokusa koji se mogu koristiti (Tablica 3.1.). Stoga, da bi se unio u INTERPOL bazu podataka DNA profil mora biti analiziran na najmanje šest od ponuđenih 12 osnovnih i 16 dodatnih STR lokusa (INTERPOL, 2009).

TABLICA 3.1. Tablični prikaz osnovnih i dodatnih STR lokusa preporučenih od strane INTERPOL-a.

Preporučeni osnovni set standardnih lokusa (ISSOL)							
VWA	TH01	D21S11	FGA	D8S1179	D3S1358	D18S51	AMELOGENIN
D1S1656	D2S441	D10S1248	D12S391	D22S1045			
Dodatni lokusi							
TPOX	CSF1PO	D13S317	D7S820	D5S818	D16S539	D2S1338	D19S433
PENTA D	PENTA E	FES	FI3AI	FI3B	SE33	CD4	GABA

² Podatak preuzet sa <https://www.interpol.int/How-we-work/Forensics/DNA> (pristup 1.1.2024.).

3.2.2.3. Europski standardni set lokusa (ESS)

S obzirom na potrebu razmjene podataka između nacionalnih baza DNA podataka u Europi (o čemu će biti više govora u poglavlju o bazama DNA podataka), ENFSI, točnije DNA radna skupina u okviru ENFSI-ja gotovo svake godine donosi preporuke vezane uz primjenu forenzičke analize DNA u europskim zemljama. Određeni broj tih preporuka odnosi se i na set STR lokusa koji bi se trebao koristiti u procesu forenzičke analize DNA bioloških tragova. Tako je 2001. godine ova radna skupina odredila europski standardni set (engl. *European Standard Set, ESS*) koji se sastojao od sedam lokusa (TH01, vWA, FGA, D21S11, D3S1358, D8S1179 i D18S51) i koji se u potpunosti poklapao s predloženim ISSOL standardom. Ova odluka potvrđena je u Europskom vijeću 2001. godine (European Council, 2001).

S obzirom na trend povezivanja baza DNA podataka u Europi, zaključeno je da se ovaj set lokusa mora proširiti dodatnim lokusima, u cilju ispunjavanja pretpostavljenih forenzičko-statističkih parametara vezanih uz individualizaciju traga i unikatnost DNA profila. Stoga je u prvoj fazi proširivanja, odlukom iz 2009. godine, dodano još pet lokusa, i to četiri tetranukleotida (D10S1248, D2S441, D1S1656 i D12S391) i jedan trinukleotid (D22S1045), a ostavlja se mogućnost da se u budućnosti u ESS uključe još neki od STR biljega (Butler, 2012). Međutim, na osnovi zadnjeg izvještaja s kraja 2022. godine, ovaj set od 12 lokusa i dalje je bio na snazi kao službeni ESS set (ENFSI, 2022). Tako se sada novi ESS standard u potpunosti poklapa s novim ISSOL standardom lokusa.

3.2.2.4. *Alu* ponavljajući biljezi

Ovi ponavljajući biljezi pripadaju grupi neretroviralnih retrotranspozona koji za svoje kretanje i umnožavanje u genomu domaćina koriste RNA oblik. Kod čovjeka, ovo su najčešći i najinformativniji biljezi od svih ponavljajućih sekvenci koje generalno čine oko 50% ukupnog ljudskog genoma. Neretroviralni retrotranspozoni dijele se na duge raspršene nuklearne elemente (engl. *long interspersed nuclear elements, LINE*) i kratke raspršene nuklearne elemente (engl. *short interspersed nuclear elements, SINE*) biljege. Grupi LINE biljega pripadaju ponavljajući elementi poput L1 i mogu biti korisni u analizi bolesti kod čovjeka, ali i u filogenetici. *Alu* ponavljajući biljezi pripadaju grupi SINE biljega te prema nekim literaturnim izvorima zauzimaju i do 10% ukupnog nuklearnog genoma kod čovjeka. *Alu* elementi su bialelni (ponavljajući element je prisutan ili nije prisutan), od svakog roditelja se nasljeđuje po jedna kopija. Informativni su i jednostavni za analizu što ih u ovoj grupi čini najčešće korištenim elementima u svrhu analize DNA. *Alu* elementi se sastoje od dvije sekvence duge po 150 bp, što znači da je jedan element oko 300 bp dug i jasno ponavljajuće prirode (Mastana,

2007; Rubicz i Melton, 2007). *Alu* elementi mogu imati utjecaj na strukturu i ekspresiju gena, pa stoga mogu biti povezani s različitim patološkim stanjima. Na osnovi razlika u ponavljajućoj sekvenci, podijeljeni su u manje porodice elementa, gdje svaka grupa označava određenu fazu povijesti i evolucije vrste *Homo sapiens*. Zbog svega navedenog, *Alu* markeri se ne koriste samo u forenzičkoj genetici, nego su značajni i u populacijskoj genetici i filogenetskim istraživanjima (Salem *et al.*, 2003).

Osobine koje čine *Alu* elemente popularnim DNA biljezima su sljedeće:

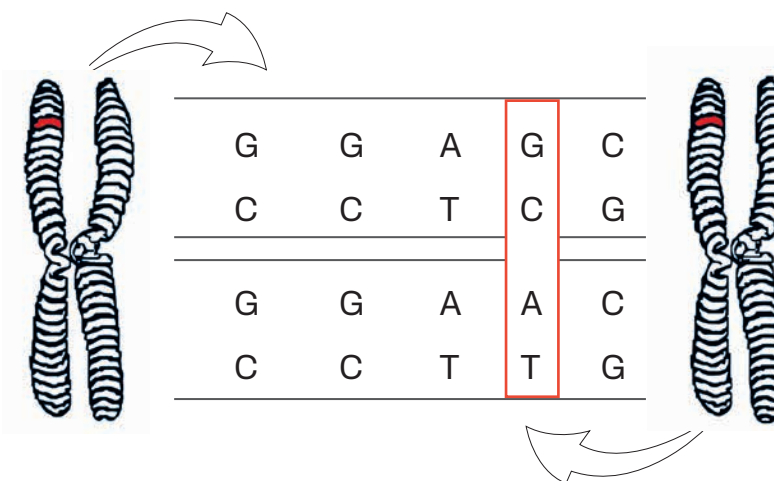
- Insercija *Alu* biljega na određenu lokaciju unutar genoma je jedinstvena, što znači da su sve osobe koje nose isti biljeg, isti naslijedile od zajedničkog pretka.
- *Alu* biljezi stabilni su jer ne postoji učinkovit mehanizam za njihovo uklanjanje iz genoma, kada se pojave na određenoj lokaciji. U rijetkim slučajevima dogodi li se takva delecija, ostatak će prepoznatljive sekvence u dijelu genoma koji okružuje poziciju nekadašnjeg *Alu* biljega, na osnovu čega će ta pozicija biti lako prepoznata.
- *Alu* elementi su specifični za čovjeka (Comas *et al.*, 2001).

Alu biljezi su veoma korisni u analizi strukture modernih populacija. Jedna takva studija ponudila je zanimljive rezultate u provinciji Jujuy u sjeverozapadnoj Argentini, gdje je ekipa istraživača analizirala prisutnost osam *Alu* biljega kod 226 osoba iz pet regija s različitim nadmorskih visina (od 700 do 3300 metara iznad razine mora). Rezultati istraživanja pokazali su da populacije na višim nadmorskim visinama imaju manju heterozigotnost u odnosu na one koje nastanjuju niže nadmorske visine. Također, gustoća naseljavanja je, očekivano, bila niža na višim nadmorskim visinama, što je doprinijelo jačem utjecaju genetičkog drifta na te populacije i, samim tim, dodatno smanjilo heterozigotnost ovih populacija. Uz to, populacije s viših nadmorskih visina imale su manji upliv migranata i niži nivo egzogamije (egzogamija je praksa da članovi populacije sklapaju brakove i imaju djecu s osobama izvan svoje populacije). Sama struktura populacije se mijenjala s nadmorskom visinom: populacija na višim visinama je gotovo 100 % pokazala domorodačko američko porijeklo, dok su populacije s nižih nadmorskih visina imale značajan postotak migranata afričkog i europskog porijekla, što implicira da su migranti, koji su se doseljavali u ovu regiju, običavali ostati na nižim nadmorskim visinama. Na kraju, u ovoj studiji potvrdilo se pravilo populacijske genetike:

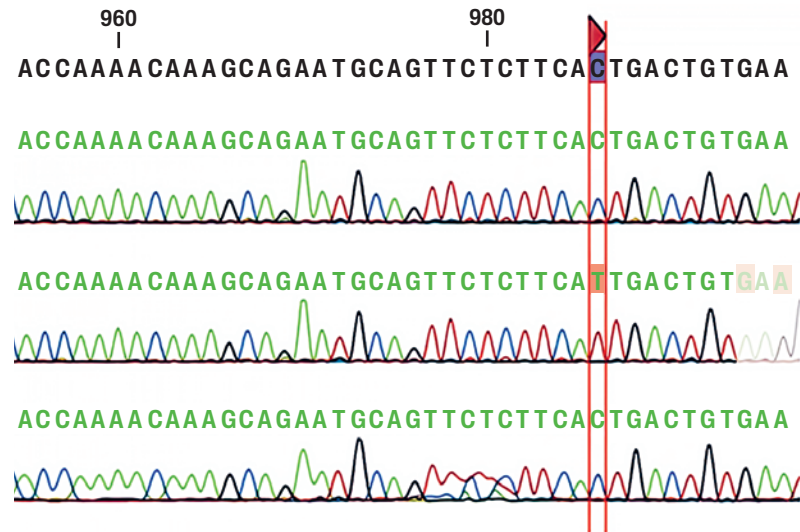
što su geografski bliže (ili, u ovom slučaju, i što je manja razlika u nadmorskim visinama) dvije populacije, genetička udaljenost između njih će biti manja. Ova studija naglasila je koliko je značajno u obzir uzeti geografska i antropološka znanja (povijest migracija, specifičan teren ili klimu ili kulturu) prilikom analize genetičkih podataka, kako bi se dobila potpuna slika o strukturi i povijest jedne populacije (Gomez-Perez *et al.*, 2011; Relethford, 2012).

3.3. SNP BILJEZI

Jedan od novijih pristupa koji u zadnjim desetljećima pronalazi svoju primjenu u forenzičkoj analizi DNA je upotreba polimorfizma jednoga nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, *SNP* kao molekularnog biljega (slika 3.8.). Točkaste ili jednonukleotidne varijacije najučestaliji su oblici DNA polimorfizama koje se javljaju unutar ljudskog genoma. Ove značajke nukleinskih kiselina doživjele su potpunu afirmaciju, ne samo u populacijsko-genetičkim studijama, već i u medicinskoj dijagnostici i testiranju identiteta, posebno s otkrićem mogućnosti primjene novih tehnika.



SLIKA 3.8. Polimorfizam jednoga nukleotida (engl. *Single nucleotide polymorphism*, *SNP*), shematski prikaz zamjene jedne baze u uobičajenom slijedu nukleotida promatrane regije DNA (dijelovi slike preuzeti iz Primorac, Marjanović *et al.*, 2008).



SLIKA 3.9. Shema detekcije SNP polimorfizma analitičkim metodama sekvenciranja DNA.

Ovaj polimorfizam zasniva se prvenstveno na zamjeni samo jedne baze u standardnom redoslijedu promatrane sekvence. Iako su manje polimorfni u odnosu na danas široko primjenjivane STR biljege (slika 3.9.), njihovo pojavljivanje na skoro svakih 1 000 bp čini ih izuzetno informativnim.

Dostupnost referentnih humanih sekvenci, proizašla kao rezultat dvije paralelne studije, odnosno The Human Genome Project s jedne te Celera Genomics s druge strane (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001), omogućila je znanstvenicima da učinkovitije istražuju genomsku varijabilnost među humanim individuama, ali i populacijama. Na samom početku, rezultati proizašli iz The Human Genome Project-a implicirali su da se genomi bilo koje dvije osobe razlikuju za manje od 0,1%, i da je ta varijabilnost zapravo najčešće detektirana na nivou SNP-ova (Lander *et al.*, 2001). Stoga ne čudi što su ovi genetički biljezi postali fokus istraživanja koja su za cilj imala istraživanje varijabilnosti humanog genoma. Jedan od osnovnih pokretača ovih studija bila je i činjenica da SNP-ovi pokazuju vrlo stabilnu učestalost kroz generacije te njihova jasna detektabilnost primjenom niza različitih molekularnih, maseno-spektrometrijskih te metodologija baziranih na mikročipovima (Gunderson *et al.*, 2006; Ragoussis *et al.*, 2006; van Uum *et al.*, 2012).

Kako je već navedeno, izvor cjelokupne genetičke varijabilnosti leži u mutacijskim procesima koji se javljaju u različitim stopama u različitim dijelovima genoma. Dakle, sveobuhvatna varijabilnost genoma inicijalno, zapravo, počiva na

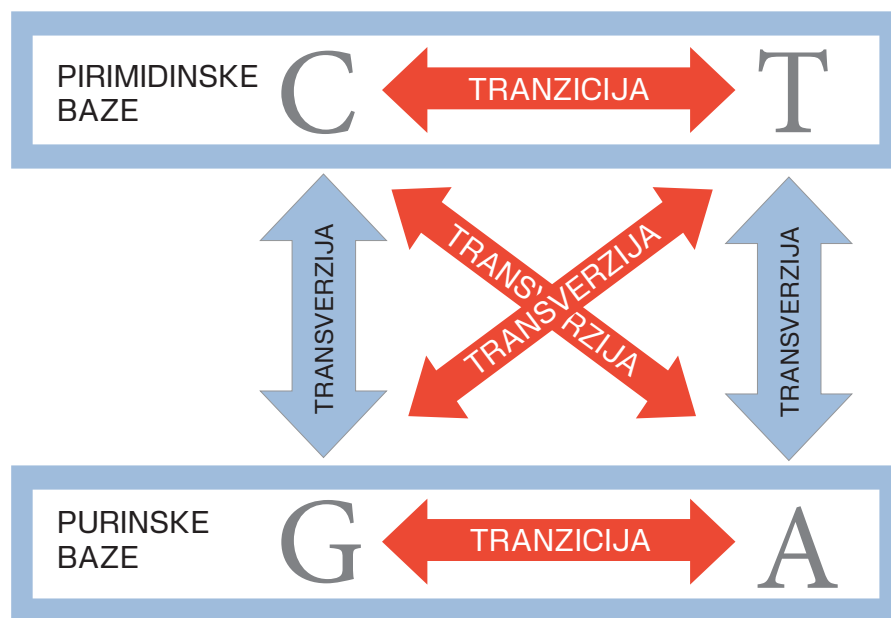
pojednim oblicima mutacija. Polimorfizam se definira kao varijacija, promjena, ili, mutacija sekvenci DNA na određenoj, specifičnoj lokaciji (Griffin i Smith, 2000). Postoji mnogo tipova polimorfizama ili varijacija u sekvenci DNA koji nastaju kao posljedica različitih mutacijskih mehanizama te shodno tome imaju različite karakteristike. Najveći broj polimorfizama u humanom genomu odnosi se na SNP genetičke biljege (Altshuler *et al.*, 2000). SNP-ovi nastaju insercijom, delecijom ili kao posljedica točkastih mutacija kada je u procesu promjene u pitanju samo jedan nukleotid. Učestalost mutacija kreće se u rasponu od 10^{-7} do 10^{-9} na nivou cjelokupnog genoma. Ove stope mutacije približno su ekvivalentne stopi od 10^{-4} do 10^{-6} po genu u jednoj generaciji. S obzirom da diploidni humani genom nosi $6,4 \times 10^9$ nukleotida, kontinuirana stopa mutiranja u prosjeku iznosi oko 200 u diploidnom genomu (u zigotu) u jednoj generaciji.

S obzirom na promjene jednog nukleotida, genom čovjeka se za 1,23% razlikuje od genoma najbližeg srodnika, čimpanze (Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, 2005). Nadalje, prosječna razlika između dvije osobe iz različitih dijelova svijeta može biti jedan nukleotid razlike na 1 000 bp ili manje, ovisno o genskom lokusu, s jedne strane, te populacija iz kojih su uspoređene osobe, s druge strane. Ovdje je važno napomenuti da su mikrosateliti kratki (najčešće 2-7 bp za ponavljajuću jedinicu) i osnovna karakteristika im je da se uzastopno ponavljaju u genomu (Butler, 2005). Broj ponavljajućih motiva može se promijeniti zbog mutacije unutar kopije repetitivnog motiva. Kod nekih mikrosatelita to se događa čak jedanput u 1 000 mejoza. Mikrosateliti su značajno polimorfni nego SNP genetički biljezi. Zbog svoje izuzetne primjenjivosti u različitim znanstvenim i stručnim analizama, ovi fragmenti DNA detaljno su ispitani, odnosno, iscrpno analizirani i sekvencirani te i dalje čine osnovu analize DNA ljudi.

SNP-ovi su, međutim, našli svoju primjenu u širokom dijapazonu genetičkih disciplina (Brookes, 1999; Louhelainen, 2016; Mehta *et al.*, 2017). Prve ozbiljne i opsežne analize SNP-ova započete su i realizirane paralelno s unapređenjem tehnologije, a posebno nakon završetka projekta sekvenciranja genoma čovjeka, kada je prvi put iznesena pretpostavka da se u humanom genomu nalazi više od 10 miliona SNP-ova (Jiang i Zhao, 2006; Nurk *et al.*, 2022). Publiciran je primjer diploidne sekvence jedne individue u kojoj je pronađeno više od 4,1 milijun DNA polimorfizama (Levy *et al.*, 2007). Prema ranijim rezultatima International HapMap Consortium projekta, 78% svih genetičkih varijacija u genomu predstavljaju SNP-ovi, odnosno oko 3,1 milijun SNP-ova, koji su analizirani kod 270 osoba u četiri geografski različito rasprostranjene populacije (International HapMap Consortium, 2007). Noviji projekt, 1000 Genomes Project, je svoje finalne rezultate iz faze III objavio 2015. godine i time predstavio podatke bazirane na sekvenciranju cijelih genoma 2 504 osobe iz 26 populacija. Identificirano je 88 milijuna varijanti, uključujući 84,7 milijuna SNP-ova,

3,6 milijuna kratkih InDel varijacija i 60 000 strukturnih varijacija (po definiciji, radi se o varijacijama koje obuhvaćaju najmanje 50 bp) (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

Dva najčešća tipa SNP-ova su tranzicije (promjena iz purina u purin ili iz pirimidina u pirimidin, npr. A>G ili T>C) i transverzije (iz purina u pirimidin ili obratno, npr. T>A, T>G ili C>G). Zanimljivo je da tranzicije T>C i A>G predstavljaju dvije trećine cjelokupnih SNP-ova (slika 3.10.). Najveći dio SNP-ova sastavni je dio nekodirajućeg dijela genoma, tako da se smatra da su selektivno neutralni. Ipak, bitno je spomenuti da postoji određeni broj SNP-ova smještenih u kodirajućoj regiji genoma (cSNP) i oni mogu utjecati na razvoj različitih multifaktorijskih oboljenja. Procjenjuje se da se broj cSNP-ova kreće između 10 000 i 50 000. Polimorfizmi ovih genetičkih biljega mogu dovesti do promjene u redosljedu aminokiselina u proteinskom produktu, pa se onda nazivaju nesinonimne supstitucije ili pogrešne mutacije (engl. *missense mutation*) (Botstein i Risch, 2003; Glazier *et al.*, 2002; Lohmueller *et al.*, 2003; Rhee i Lee, 2007; Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007).



SLIKA 3.10. Tranzicije i transverzije. Za svaku bazu postoje dvije moguće transverzije i samo jedna tranzicija, ali tranzicije su duplo češće u genomu čovjeka u odnosu na transverzije.

Potencijalna primjena SNP molekularnih biljega u forenzičkoj genetici nosi sa sobom određene prednosti, ali i mane, u usporedbi s mikrosatelitnim multipleks sustavima (Tablica 3.2.). Prednosti su sljedeće:

- Veličina SNP amplikona često je manja od 100 bp, što otvara mogućnost za učinkovitiju analizu visoko degradirane DNA.
- Molekularna priroda SNP-ova dozvoljava da znatno veći broj ovih molekularnih biljega, u usporedbi s STR-ova, može biti istovremeno analiziran.
- SNP-ovi su pogodniji od mikrosatelitnih biljega za daljnju automatizaciju i pojednostavljivanje procesa analize.
- Manji je broj tragova (npr. *stuttera*³) kod SNP analize, a koji u pojedinim slučajevima mogu uvjetovati pogrešnu interpretaciju alelnih varijanti na mikrosatelitnim lokusima.

S druge strane, postoji veći broj ograničavajućih faktora upotrebe SNP biljega u forenzičkoj genetici (Tablica 3.1.), od čega se izdvajaju dva za sada, čini se, najbitnija. SNP-ovi nisu niti približno informativni kao STR markeri, u mjeri da se njihova upotrebna vrijednost procjenjuje na nekih 20% upotrebne vrijednosti prosječnog STR lokusa. Vezano uz to, istovremena analiza između 50 i 100 SNP biljega je neophodna kako bi se dostigao stupanj informativnosti DNA profila generiranog koristeći 15 STR biljega (Sanchez *et al.*, 2006). Drugi problem je nemogućnost ili, bolje rečeno, nesigurnost u analizi miješanih tragova koji su izuzetno česti u forenzičkoj genetici. Naime, većina SNP-ova bazira se samo na dvije alelne varijante A ili B, stoga su mogući genotipovi AA, BB ili AB. Kada se detektira genotip AB, ova metoda ne daje velike mogućnosti utvrđivanja radi li se uistinu o heterozigotu ili je riječ o smjesi dva traga s genotipovima AA i BB.

Na osnovi upotrebne vrijednosti u području forenzičke genetike, svi SNP biljezi mogu biti svrstani u četiri osnovne kategorije (Butler, 2012):

1. identifikacijski (engl. *identity SNPs, individual identification SNPs*) – koriste se u svrhu individualizacije istraživanog traga
2. rodoslovni (engl. *lineage SNPs, lineage informative SNPs*) – koriste se u svrhu istraživanja srodnosti osoba
3. ancedorski (engl. *ancestry SNPs, ancestry informative SNPs*) – koriste se u svrhu određivanja/predikcije porijekla predaka

³ *Stutter* je nusproizvod amplifikacije STR lokusa uslijed klizanja lanca tj. nepravilnog poravnavanja lanaca tijekom njihovog spajanja, zbog prisutnosti ponavljajućih sekvenci. Pri tome se stvara manji produkt koji je obično za jednu ili više ponavljajućih jedinica manji ili veći od primarnog alela.

TABLICA 3.2. Komparativna analiza podobnosti STR i SNP biljega za primjenu u forenzičkoj DNA.

Karakteristike	STR biljezi	SNP biljezi
Frekvencija pojavljivanja u humanom genomu	1 u svakih 15 kb	1 u svakih 1 kb
Informativnost	Visoka	Niska (20-30% informativnosti STR lokusa)
Mutacije	oko 1 u 1 000	oko 1 u 100 000 000
Tip biljega	di-, tri-, tetra- i pentanukleotidi	bi-alelni biljezi
Broj alelnih varijanti po biljegu	tipično više od pet (najčešće 5-20)	tipično dvije (uz pojedine trialelne SNP-ove)
Metode detekcije	gel / kapilarna elektroforeza	izravno sekvenciranje, masena spektrometrija, metoda hibridizacije na mikročipu
Mogućnosti multipleks analize	>10 biljega (primjenom višebojne fluorescentne detekcije)	>1 000 biljega (primjenom mikročip tehnologije)
Veličina amplicona	75-400 bp	može biti manje od 100 bp
Mogućnost biogeografske predikcije porijekla osobe	limitirana	određeni ciljani SNP-ovi se mogu koristiti u ove svrhe
Fenotipska informacija	ne	moguća predikcija boje kose, kože, očiju i sl.
Osnovna prednost u forenzičkoj aplikaciji	visoka informativnost i mogućnost analize miješanih tragova	potencijalno bolje performanse u analizi visoko degradiranih tragova, predikcija fenotipa, niska stopa mutacije povoljna za analize srodstva
Osnovna ograničenja u forenzičkoj aplikaciji	moguća pogrešna interpretacija rezultata uslijed različitih PCR tragova	nestandardizirana procedura, potreban veliki broj genetičkih biljega u simultanoj upotrebi radi dosezanja potrebne informativnosti, nemogućnost razlikovanja donora u miješanim tragovima

4. fenotipski (engl. *phenotype SNPs*, *phenotype informative SNPs*) – koriste se u svrhu predikcije određenih fenotipskih karakteristika osobe koja je ostavila biološki trag.

Postoji više tehnologija koje se koriste u analizi SNP biljega. Tradicionalno najpoznatije metode su:

- reverzna točkasta metoda otiska (engl. *reverse dot blot*) – hibridizacija na najlonskoj membrani nakon nanošenja uzorka na membranu u obliku jedne točke, nakon čega slijedi kolorimetrijsko očitavanje rezultata;
- denaturirajuća tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *denaturing high-performance liquid chromatography*, *DHPLC*) – dva amplicona (jedan poznate i jedan nepoznate alelne varijante) miješaju se i registriraju kroz broj detektiranih signala;
- sequenom MassARRAY metoda zasniva se na amplifikaciji koristeći nukleotide izmijenjene mase, što se može detektirati pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije;
- PCR s početnicama specifičnim za ciljani polimorfizam (engl. *allele-specific primers*) izvodi se na način da se dizajniraju početnice koje će omogućiti amplifikaciju isključivo onih molekula DNA koje sadrže ciljani polimorfizam, tako da prisutnost ili odsutnost amplicona otkriva genotip ispitivanog uzorka;
- RFLP metoda također može biti upotrebljiva za određivanje SNP genotipa ukoliko analizirana promjena dovodi do nastanka ili gubitka restriksijske sekvence za određenu endonukleazu;
- Taqman 5' nukleaza test zasniva se na upotrebi dvije fluorescentne boje od kojih se jedna koristi kao indikator (engl. *reporter*), a druga kao prigušivač signala i (engl. *quencher*), što će biti detaljnije opisano u narednim poglavljima;
- SNaPshot analiza je sekvenciranje zasnovano na produženju početnice za jedan nukleotid (engl. *single-base extension*, *SBE*) – početnica čiji je 3' kraj neposredno uz SNP produžava za jedan nukleotid pomoću *Taq* polimeraze, a dodaju se fluorescentno označeni ddNTP-ovi koji su komplementarni polimorfnoj bazi. Identitet dodanog nukleotida može se strojno prepoznati, te se na osnovu toga donosi zaključak o sekvenci komplementarnog lanca.

Pored ovih metoda koje se tradicionalno koriste kada je SNP analiza potrebna u svrhe forenzičke genetike, brojne su nove tehnologije razvijene u zadnjih desetak godina, koje se koriste i za SNP genotipizaciju. Tu se izdvajaju metode sekvenciranja (Sanger i sekvenciranje sljedeće generacije) te metoda matičnog niza (engl. *array matrix*) i čip tehnologije, o kojima će biti više riječi u šestom poglavlju.

Ovdje bismo skrenuli pozornost na dva komercijalna seta za analizu SNP-ova koji su bili posebno popularni u zadnjih nekoliko godina. Prvi je 52-pleks sustav, nekomercijalni set za istovremenu amplifikaciju 52 autosomalna SNP biljega u jednoj PCR reakciji, nakon čega se pristupa dvjema SBE reakcijama, gdje jedna reakcija priprema 23, a druga 29 pozicija koje se onda detektiraju kapilarnom elektroforezom. SNP-ovi iz ovog panela visoko su polimorfni kod osoba europskog, azijskog i afričkog porijekla, dok dužina PCR produkata varira od 59 do 115 bp. Stoga ovaj test daje puno bolje rezultate od standardne STR analize u slučajevima visoko degradiranih uzoraka ili uzoraka s malim brojem DNA kopija (engl. *low-copy-number, LCN*) (Fondevila *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2006). Drugi set je komercijalni GenPlex™ HID System, koji sadrži 48 SNP pozicija iz prethodnog 52-pleks sustava, uz amelogenin lokus za određivanje biološkog spola ispitivane osobe. Eksperimentalna metoda zasniva se na PCR umnožavanju ciljanih genomskih regija te genotipizaciji koristeći biotin kao biljeg za razlikovanje genotipova (Phillips *et al.*, 2007). Komparativna analiza usporedila je ovaj set sa standardnim STR sustavima i pokazala da je GenPlex™ HID System bio informativniji (Tomas *et al.*, 2011). Nedostatci SNP setova ogledaju se primarno u kompleksnim eksperimentalnim metodama za koje često ne postoji adekvatna oprema i/ili ekspertiza u DNA laboratorijima koje uglavnom rade koristeći STR biljege. Uz to, povećana je opasnost gubitka alela ili umjetne detekcije nepostojećih alela, pogotovo u slučajevima kada se radi s veoma malom količinom početne DNA (ispod 250 pg), a ponajviše zbog toga što SNP sustavi rade istovremeno umnožavanje nekoliko desetaka biljega, što je samo po sebi tehnički izazov (Musgrave-Brown *et al.*, 2007).

U posljednjih 20-ak godina, zabilježen je značajan priliv populacijskih podataka vezanih uz SNP biljege locirane na nerekombinirajućoj regiji kromosoma Y (International Society of Genetic Genealogy, 2020; Y Chromosome Consortium, 2002). Lavinu istraživanja u tom pravcu pokrenuli su radovi koji datiraju iz sredine 80-ih godina (Casanova *et al.*, 1985). Većinu ranije korištenih biljega (RFLP pozicije i STR lokusi) u posljednjim godinama potisnuli su SNP-ovi (Y Chromosome Consortium, 2002). Povijesnu prekretnicu u ovom području označilo je uvođenje DHPLC metode za analizu binarnih biljega vezanih uz nerekombinantnu regiju kromosoma Y (engl. *Non-recombining Region of the chromosome Y, NRY*) (Underhill *et al.*, 1997). Ova metoda omogućila je da se, kroz par studija (Hammer *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2000; Underhill *et al.*, 2000), u vrlo kratkom periodu locira preko 200 SNP-ova i malih insercijskih-delecijskih (InDel) pozicija na kromosomu Y (Y Chromosome Consortium, 2002). Takve polimorfizme karakterizira niska stopa paralelnih mutacija, što ih čini izuzetno pogodnim za identificiranje i praćenje muške linije i tisućama godina unazad. U cilju formiranja što fleksibilnijeg sustava nomenklature, kao i konstrukcije

sveobuhvatnog stabla NRY binarnih haplogrupa, Konzorcij za kromosom Y (engl. *Y Chromosome Consortium, YCC*), kojeg su osnovali vodeći eksperti za analizu kromosoma Y, 2002. godine predložio je univerzalni sustav koji je danas opće prihvaćen (Y Chromosome Consortium, 2002), iako YCC kao tijelo ne postoji od 2012. godine, a svi njihovi podaci i dalje su dostupni putem znanstvenih publikacija, kao i znanstvene inicijative koja je naslijedila YCC, a to je Međunarodno društvo za genetičku genealogiju (engl. *International Society of Genetic Genealogy, ISOGG*) (International Society of Genetic Genealogy, 2020). Prema YCC sustavu, NRY binarne haplogrupe, koje se u odgovarajućoj literaturi često označavaju samo kao haplogrupe ili Y haplogrupe, definirane su kao haplotipovi, određeni pojedinim binarnim molekularnim biljegom. Oni su stabilniji, ali, kako je već navedeno, i manje deskriptivni od haplotipova determiniranih STR biljezima (Jobling i Tyler-Smith, 2003).

Jedan od primarnih pravaca razvoja postupaka testiranja ovih biljega usmjeren je k dodatnoj analizi mitohondrijske DNA (Parsons i Coble, 2001). Naime, mtDNA ima tri osnovne karakteristike koje joj daju status izuzetno pogodne molekule za korištenje u DNA identifikaciji žrtava masovnih katastrofa: 1) uspješno izoliranje iz degradiranih uzoraka, 2) visok stupanj informativnosti kada se kao referentni uzorci javljaju samo oni koji dolaze s majčine strane i 3) njena primjena kada je mogućnost upotrebe nuklearnih molekularnih biljega potpuno onemogućena (Coble *et al.*, 2004). Ipak, njena upotreba nailazi na problem izuzetno male diskriminatorne moći. Pristup analizi velikog broja SNP biljega pozicioniranih ne samo na hipervarijabilnoj regiji, nego širom mitohondrijskog genoma, bitno utječe na uvećanje njene diskriminatorne značajke, a samim time daje i potpuno novu dimenziju primjeni mtDNA u forenzičkoj genetici. Više o mtDNA navedeno je na kraju ovog poglavlja, kao i u petom poglavlju.

Na kraju, treba spomenuti i sve izraženiju tendenciju upotrebe autosomnih SNP biljega, koji se u posljednje vrijeme sve češće koriste kao dodatni biljezi u testiranju spornoga očitstva te u analizama tragova koje karakterizira prisutnost malih količina visoko degradirane DNA, kako je već ranije navedeno.

Veliki broj populacijsko-genetičkih studija temeljenih na analizama Y-SNP molekularnih biljega je implementiran i uspješno objavljen. Ove studije izazvale su veliko zanimanje znanstvene, ali i šire javnosti, a taj trend nije zaobišao ni našu regiju.

Prve studije napravljene na uzorku hrvatske, a nedugo zatim i bosansko-hercegovačke humane populacije, dale su zanimljive rezultate koji su ponekada u medijima bili, u najmanju ruku, senzacionalistički i neprecizno interpretirani. Sam, pomalo nesretan termin koji je prihvaćen u široj javnosti, „genetičko porije-

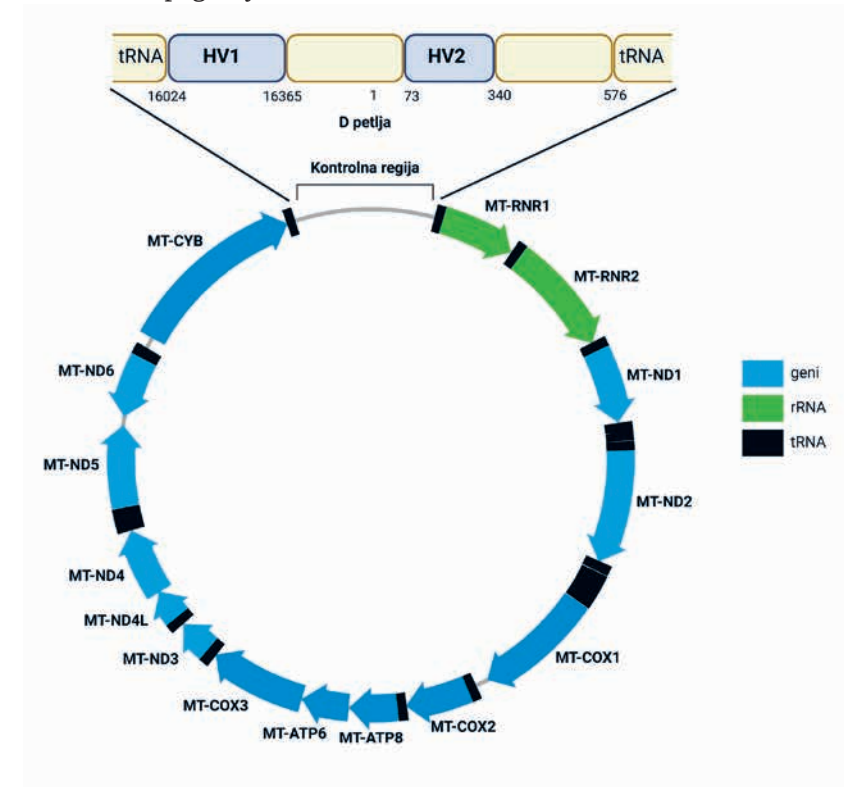
klo naroda”, ostavljao je prostora za eventualne špekulacije i neprecizne interpretacije. Određeni izvori su pokušavali determinirati genetičke distance među pojedinim narodima, što u zemljama naše regije može, nažalost, biti zloupotrijebljeno u dnevnopolitičke svrhe. Stoga je neophodno da se još jednom potvrdi da ove studije nisu dokazale nikakve „interplanetarne” razlike naroda koji žive u BiH. Analiza Y-SNP biljega ponudila je samo jedan okvirni scenarij mogućeg naseljavanja prostora Bosne i Hercegovine i utvrdila tri osnovna povijesna događaja koja su ostavila bitan trag u genofondu današnjeg stanovništva ove zemlje. To je zadnje ledeno doba (kada je regija Zapadnog Balkana bila jedna od refugijuma u kojem je tadašnji *Homo sapiens* uspio „prezimiti”), migracije iz pravca Bliskog Istoka koje su započele u doba neolitika, te migracije iz pravca Euroazije koje su se odvijale u više valova, a njihovi značajniji početci sežu unazad 2 000-3 000 godina. Y-SNP biljezi zapravo dozvoljavaju da se u genetičkom smislu ponudi određena rekonstrukcija onoga što je bilo nekad na osnovu onoga što imamo danas. Potvrdu ili negiranje ovoga scenarija treba tražiti i u spoznajama antropologije, etnologije, arheologije, povijesti i drugih znanstvenih disciplina (Semino *et al.*, 2000; Marjanović *et al.*, 2005b; Battaglia *et al.*, 2009). Kasnija istraživanja iste tematike koristeći Y-STR biljege i računalno predviđanje Y haplogrupa na osnovu tih rezultata rađena su na uzorku od 480 odraslih muškaraca iz BiH i dobrim dijelom su potvrdila ranije zaključke, ali su također ponudili preciznije rezultate i detekciju rijetkih Y haplogrupa, čije je postojanje u BiH ranije bilo nepoznato. Ovime smo dobili potvrdu značaja ažuriranja populacijsko-genetičkih studija na većem uzorku, kao i korištenjem različitih metoda analize (Babić Jordamović *et al.*, 2021a, 2021b).

3.4. HIPERVARIJABILNA REGIJA mtDNA

Za razliku od ranije elaboriranih molekularnih biljega u ovome poglavlju, koji su locirani u nuklearnom (jezgrinom) dijelu genoma, hipervarijabilne regije 1 i 2 (HV1 i HV2) dio su mitohondrijske DNA. Duljina mtDNA je 16 569 bp, kružnog je oblika i ne sadrži intronske sljedove (Konjodžić, 2013). Visokopromjenjive regije HV1 i HV2 posebno su značajne za forenzičke analize, a to su. Ove hipervarijabilne regije smještene su u nekodirajućem dijelu mtDNA molekule koja se naziva kontrolna regija (engl. *control region* – CR) ili D-petlja (engl. *D-loop*) – slika 3.11.). Ova regija duga je oko 1122 bp i, za razliku od kodirajućeg dijela mtDNA, njeni dijelovi izuzetno su varijabilni unutar humanih populacija. Prema revidiranoj referentnoj sekvenci za mapiranje mitohondrijskog genoma (engl. *revised Cambridge Reference Sequence, rCRS*), kontrolna regija obuhvaća početni

i krajnji segment molekule, tako da kontrolna regija obuhvaća segment od 16 024. do 16 569. baze pa se nastavlja od 1. do 576. baze. HV1 je pozicionirana je od 16 024. do 16 365. baze dok je HV2 lociran od 73. do 340. baze. Ipak, ove granice nisu jasno definirane tako da se u različitim izvorima mogu pronaći i različiti podaci o točnoj poziciji ovih regija.

Zbog visoke varijabilnosti sekvenciranja HV1 i HV2 regija mtDNA najviše se upotrebljava u forenzičkim i populacijskim studijama. No, pojedini aleli ovih regija relativno su česti u pojedinim populacijama, a diskriminativnost metode bitno se smanjuje ako su u istraživanom uzorku prisutni učestali aleli. Zbog toga se sve više istražuju SNP biljezi kodirajućeg i nekodirajućeg dijela mtDNA. Na pojedinim se mjestima ove točkaste mutacije pojavljuju učestalije, a istovremena analiza većeg broja SNP lokusa može znatno povećati diskriminativnost. Baze podataka o SNP mutacijama također su javno dostupne. Osnovni parametri upotrebe mtDNA u forenzičkoj analizi DNA bit će detaljnije objašnjeni u petom poglavlju dok će statističko tumačenje rezultata analize mtDNA u forenzici biti objašnjeno u sedmom poglavlju.



SLIKA 3.11. Shematski prikaz pozicije kontrolne regije mtDNA.

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; 526(7571): 68-74.
- Altshuler D, Pollara VJ, Cowles CR, *et al.* An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing. *Nature* 2000; 407: 513-516.
- Babić Jordamović N, Kojović T, Dogan S, *et al.* Contemporary population genetics data for 23 Y-STR loci in the general Bosnian-Herzegovinian population. *Genetics & Applications* 2021; 5(1): 51-63.
- Babić Jordamović N, Kojović T, Dogan S, *et al.* Haplogroup Prediction Using Y-Chromosomal Short Tandem Repeats in the General Population of Bosnia and Herzegovina. *Front. Genet.* 2021; 12: 671467.
- Battaglia V, Fornarino S, Al-Zahery N, *et al.* Y-Chromosomal Evidence of the Cultural Diffusion of Agriculture in Southeast Europe. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009; 17(6): 820-830.
- Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for Mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nature Genetics* 2003; 33: 228-237.
- Britten RJ, Kohne DE. Repeated Sequences in DNA. *Science* 1968; 161: 529-540.
- Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999; 234: 177-186.
- Budowle B, *et al.* DNA Typing Protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis. Natick, MA: Eaton Publishing; 2000.
- Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers (2nd edition). London: Elsevier Academic Press; 2005.
- Butler JM. Forensic DNA Typing: Methodology, Technology and Genetics of STR Markers (2nd edition). London: Elsevier Academic Press; 2012.
- Casanova M, Leroy P, Boucekkine C, *et al.* A Human Y-linked DNA Polymorphism and its Potential for Estimating Genetic and Evolutionary Distance. *Science* 1985; 230: 1403-1406.
- Coble MD, Just R, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, Parsons TJ. Single Nucleotide Polymorphisms Over the Entire mtDNA Genome that Increase the Power of Forensic Testing in Caucasians. *Int. J. Legal Med.* 2004; 118: 137-146.
- Comas D, Plaza S, Calafell F, Sajantila A, Bertranpetit J. Recent insertion of an Alu element within a polymorphic human-specific Alu insertion. *Mol. Biol. Evol.* 2001; 18(1): 85-88.
- Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparisons with the human genome. *Nature* 2005; 437: 69-87.
- Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *Am J Hum Genet* 1991; 49: 746-756.
- European Council. Resolution of 25 June 2001 on the exchange of DNA analysis results. Brisel: European Council; 2001.

- European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) Best Practice Manual for Human Forensic Biology and DNA Profiling. Wiesbaden: ENFSI; 2022. Pristupljeno 2.1.2024. godine na <https://enfsi.eu/wp-content/uploads/2022/12/ENFSI-DNA-BPM-03.pdf>.
- Federal Bureau of Investigation. The FBI's Combined DNA Index System Program. Quantico, VA: FBI; 2004.
- Fondevila M, Phillips C, Naveran N, *et al.* Case report: identification of skeletal remains using short-amplicon marker analysis of severely degraded DNA extracted from a decomposed and charred femur. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008; 2(3): 212-218.
- Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002; 298(5602): 2345-2349.
- Gómez-Pérez L, Alfonso-Sánchez MA, Dipierri JE, *et al.* Microevolutionary processes due to landscape features in the province of Jujuy (Argentina). *Am. J. Hum. Biol.* 2011; 23(2): 177-184.
- Griffin TJ, Smith LM. Genetic identification by mass spectrometric analysis of single-nucleotide polymorphisms: ternary encoding of genotypes. *Anal. Chem.* 2000; 72(14): 3298-3302.
- Gunderson KL, Steemers FJ, Ren H, *et al.* Whole-genome genotyping. *Methods Enzymol.* 2006; 410: 359-376.
- Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, *et al.* Hierarchical Patterns of Global Human Y Chromosome Diversity. *Mol. Biol. Evol.* 2001; 18: 1189-1203.
- Hares D. Expanding the CODIS Core Loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012; 6: e52-e54.
- Hares DR. Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015; 17: 33-34.
- International HapMap Consortium. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 2007; 449(7164): 851-861.
- International Criminal Police Organization (Interpol). Interpol Handbook on DNA Data Exchange and Practice: 2nd Edition. Lion: Interpol; 2009.
- International Society of Genetic Genealogy. Y-DNA Haplogroup Tree 2019, Version: 15.73, Date: 11 July 2020. Pristupljeno 3.1.2024. godine na <http://www.isogg.org/tree/>.
- Jiang C, Zhao Z. Mutational spectrum in the recent human genome inferred by single nucleotide polymorphisms. *Genomics* 2006; 88: 527-534.
- Jobling MA, Tyler-Smith C. The Human Y Chromosome: an Evolution Marker Comes of Age. *Nature Rev. Genet.* 2003; 4: 598-612.
- Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams S. Automated DNA Profiling Employing Multiplex Amplification of Short Tandem Repeat Loci. *PCR Method Appl* 1993; 3: 13-22.

- Konjhodžić R. Identifikacija polimorfizama kontrolne regije mitohondrijske DNK u populaciji Bosne i Hercegovine i razvoj protokola za njihovu forenzičku primjenu. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2013.
- Lander ES, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822): 860-921.
- Levy S, Sutton G, Ng PC, *et al.* The Diploid Genome Sequence of an Individual Human. *PLoS Biol.* 2007; (10): 254.
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* 2003; 33: 177-182.
- Louhelainen J. SNP Arrays. *Microarrays (Basel)*. 2016; 5(4): 27.
- Marjanović D, Fornarino S, Montagna S, *et al.* The peopling of modern Bosnia-Herzegovina: Y-chromosome haplogroups in the three main ethnic groups. *Ann. Hum. Genet.* 2005b; 69(Pt 6): 757-763.
- Mastana, S. Molecular Anthropology: Population and Forensic Genetic Applications. *The Anthropologist Special Issue*; 2007: 3: 373-383.
- Mehta B, Daniel R, Phillips C, McNevin D. Forensically relevant SNaPshot® assays for human DNA SNP analysis: a review. *Int. J. Legal Med.* 2017; 131(1): 21-37.
- Moretti TR, Moreno LI, Smerick JB, *et al.* Population data on the expanded CODIS core STR loci for eleven populations of significance for forensic DNA analyses in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016; 25: 175-181.
- Musgrave-Brown E, Ballard D, Balogh K, *et al.* Forensic validation of the SNPforID 52-plex assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007; 1(2): 186-190.
- National Research Council. *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
- Nurk S, Koren S, Rhie A, *et al.* The complete sequence of a human genome. *Science* 2022; 376(6588): 44-53.
- Parsons TJ, Coble MD. Increasing the Forensic Discrimination of Mitochondrial DNA Testing Through Analysis of the Entire Mitochondrial DNA Genome. *Croat. Med. J.* 2001; 42: 304-309.
- Phillips C, Fang R, Ballard D, *et al.* Evaluation of the Genplex SNP typing system and a 49plex forensic marker panel. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007; 1(2): 180-185.
- Primorac D, *et al.* *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Primorac D, Schanfield M. *Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective*, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023.
- Primrose SB. *Principles of Genome Analysis: A Guide to Mapping and Sequencing DNA from Different Organisms (2nd Edition)*. Malden: Blackwell Science; 1998.
- Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet.* 2006; 2(7): e100.

- Relethford JH. Chapter 9: Human Population Structure and History (pp. 237-256). U: Relethford JH, *Human Population Genetics*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2012.
- Rhee H, Lee JS. PADB: Published association database. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 348.
- Rubicz R, Melton P, Crawford M. Molecular markers in anthropological genetic studies. *Anthropol. Genet.* 2006: 141-186.
- Salem AH, Kilroy GE, Watkins WS, Jorde LB, Batzer MA. Recently integrated Alu elements and human genomic diversity. *Mol. Biol. Evol.* 2003; 20(8): 1349-1361.
- Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, *et al.* A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 2006; 27(9): 1713-1724.
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, *et al.* The Genetic Legacy of Paleolithic *Homo sapiens sapiens* in Extant Europeans: A Y Chromosome Perspective. *Science* 2000; 290(5494): 1155-1159.
- Shen P, Wang F, Underhill PA, *et al.* Population Genetic Implications from Sequence Variation in Four Y Chromosome Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 7354-7359.
- Silva-Pinheiro P, Minczuk M. The potential of mitochondrial genome engineering. *Nat. Rev. Genet.* 2022; 23(4): 199-214.
- Sprecher C, *et al.* The PowerPlex™ 16 System. *Profiles in DNA* 2000; 4: 3-6.
- Tomas C, Axler-DiPerte G, Budimlija ZM, *et al.* Autosomal SNP typing of forensic samples with the GenPlex™ HID System: results of a collaborative study. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011; 5(5): 369-375.
- Underhill PA, Jin L, Lin AA, *et al.* Detection of Numerous Biallelic Polymorphisms by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. *Genome Res.* 1997; 7: 996-1005.
- Underhill PA, Shen P, Lin AA, *et al.* Y Chromosome Sequence Variation and the History of Human Population. *Nat. Genet.* 2000; 26: 358-361.
- Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P. Variation in Short Tandem Repeat Sequences: A Survey of Twelve Microsatellite Loci for Use as Forensic Identification Markers. *Int. J. Leg. Med.* 1994; 107: 13-20.
- van Uum CM, Stevens SJ, Dreesen JC, *et al.* SNP array-based copy number and genotype analyses for preimplantation genetic diagnosis of human unbalanced translocations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2012; 20(9): 938-944.
- Venter JC, *et al.* The sequence of the Human Genome. *Science* 2001; 291: 1304-51.
- Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007; 447(7145): 661-678.
- Y Chromosome Consortium. A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 2002; 12(2): 339-348.

4.

OSNOVNI MODELI I FAZE PROCESA ANALIZE DNA

prof. dr. sc. Damir Marjanović
prof. dr. sc. Dragan Primorac
prof. dr. sc. Adna Ašić
doc. dr. sc. Vedrana Škaro

OSNOVNI MODELI I FAZE PROCESA ANALIZE DNA

4.1. BIOLOŠKI TRAGOVİ

U dostupnoj literaturi postoji veliki broj definicija pojma biološki trag. Jedna od najšire prihvaćenih definicija biološki trag opisuje kao vidljiv ili nevidljiv biološki materijal pronađen na mjestu počinjenja kaznenog djela koja je nastala kao posljedica samog kaznenog djela ili događaja (Drobnič, 2004). U najširem smislu riječi, biološki trag može se definirati kao svaki trag ljudskog, životinjskog, biljnog ili mikrobiološkog porijekla pronađen na mjestu zločina. Jedna od osnovnih činjenica o kojoj treba voditi računa jest da pod djelovanjem različitih čimbenika prilikom otkrivanja i prikupljanja, većina bioloških tragova može promijeniti svoj prvobitni oblik, agregatno stanje, boju i druga svojstva (Drobnič, 2004).

U forenzičke laboratorije dostavljaju se različite vrste tragova radi ispitivanja. Tragovi koji se mogu ispitati primjenom neke od metoda analize DNA (s izuzetkom mitohondrijske DNA), ograničeni su na one koji sadržavaju staničnu jezgru. U tom smislu, iz sljedećih bioloških izvora moguće je uspješno izdvojiti i analizirati DNA:

- krv i krvne stanice
- sperma i spermiji
- tkiva i organi
- kosti i zubi
- dlake (s epitelnim stanicama na korijenu), perut i nokti
- slina, mokraća, feces i druge tjelesne izlučevine koje mogu sadržavati stanice epitela tjelesnih šupljina kojima prolaze
- epitelne stanice prisutne na odjevnim predmetima, oružju, namještaju i drugim površinama.

Ostale vrste bioloških tragova, kao što su čisti znoj (ako nema u primjesi epitelnih stanica – što je rijetkost), suze, serum, tj. svi tragovi koji nemaju staničnu jezgru, ne mogu se ispitati standardnom analizom DNA. Ljudska DNA može se izolirati i iz materijala kao što su želučani sok i stanice fecesa (izmeta), pa čak i iz tijela insekata koji se hrane krvlju čovjeka. Međutim, bitno je napomenuti da je iz ovih izvora katkad teško dobiti dovoljnu količinu DNA u uzorcima za ispitivanje. Iako se iz nabrojanih tragova mogu dobiti dobri rezultati analize DNA potrebno je također napomenuti da se, u mnogim slučajevima kvaliteta i/ili količina uzorka pokaže nedovoljnom za analizu.

Uspješnost detekcije DNA profila analizom određenog traga primarno ovisi o tri osnovna čimbenika:

- **Količini uzorka:** metode analize DNA, posebno PCR-om, vrlo su osjetljive, ali i ta osjetljivost ima granice. Današnjim standardnim metodama moguće je generiranje DNA profila čak iz samo 125 pg DNA, što otprilike odgovara količini DNA izoliranoj iz oko 20 stanica. Međutim, miniSTR pristup pomaknuo je ovu granicu na još niže vrijednosti. Treba imati na umu da, za rutinsku analizu DNA, većina laboratorija traži značajno veću količinu DNA kako bi uspješno generirala visokokvalitetni DNA profil, a često se ta granica postavlja i na 80 stanica, recimo u slučaju analize uzorka sluznice usne šupljine (bukalne sluznice) (Kanokwongnuwut *et al.*, 2021).
- **Stupnju razgradnje (degradiranosti) DNA:** dugotrajno stajanje čak i velike krvne mrlje u nepovoljnim vanjskim uvjetima može uzrokovati takvu razgradnju DNA ili kontaminaciju traga bakterijama da trag postane nepogodan za daljnje analize.
- **Čistoći uzorka:** katkad nečistoća, masti, neke boje u tkaninama i slični inhibitori pojedinih faza analize DNA (uglavnom PCR umnožavanja) mogu ozbiljno ugroziti provođenje analize DNA.

Izravan prijenos DNA s jedne osobe na drugu ili na neki predmet može se upotrijebiti kao veza osumnjičenog s mjestom zločina. Prema Lee-ju (Lee *et al.*, 1991; Lee, 1996) takav izravan prijenos može obuhvaćati ostavljanje DNA:

- osumnjičenog na tijelo ili odjeću žrtve
- osumnjičenog na predmete s mjesta zločina
- osumnjičenog na konkretno mjesto zločina
- žrtve na tijelo ili odjeću osumnjičenog
- žrtve na predmet
- žrtve na konkretno mjesto zločina

- svjedoka na žrtvu ili osumnjičenog
- svjedoka na predmet ili na mjesto zločina.

Osim konkretnog povezivanja osumnjičenog s mjestom zločina, ili nekim predmetima korištenim u izvršenju određenog kaznenog djela, s osumnjičenim ili žrtvom, DNA ekspertiza može poslužiti i kao metoda isključivanja potencijalno osumnjičenog, a može i jasno ukazati na konkretnog počinitelja kada se u istrazi pojavi više osumnjičenih. Česte primjere ovakvih situacija pronalazimo u sklopu istraga silovanja, i to prilikom analize tragova sperme na odjeći, predmetima, vaginalnom i analnom brisu ili u analizi abortiranog embrionalnog tkiva čije je začće nastalo kao rezultat inkriminiraneradne. S druge strane, pohranjivanje kriminalističkih tragova biološkog porijekla zahtijeva sve bolje poznavanje tehnika, metoda i sredstava iz područja kriminalističke traseologije. Da bi se trag mogao pohraniti, prethodno ga je potrebno pronaći. Pronalaženje i osiguravanje tragova na mjestu događaja, posebice kod krvnih i seksualnih delikata, gdje prevladavaju biološki tragovi koji su skloni brzim promjenama, uvijek se provodi po hitnom postupku. Uspješna kriminalistička istraga zahtijeva i primjenu ispravnih postupaka u pronalaženju, prikupljanju i pohranjivanju tragova.

Prema njihovoj primarnoj upotrebnoj vrijednosti, svi biološki tragovi dijele se u dvije skupine: sporne i nesporne. **Sporni** su svi oni tragovi, bez obzira na njihovo biološko porijeklo, koji su pronađeni na mjestu zločina, a za koje se u trenutku pronalaska ne može sa sigurnošću potvrditi od koga potječu. Čest sinonim koji se koristi u literaturi prilikom opisa ovakvih tragova, a prvenstveno u opisivanju baza DNA podataka, je **forenzički tragovi**.

Nesporni uzorci su svi oni koji su prikupljeni od osoba u različite svrhe (provjeravanje mogućnosti da je ispitivana osoba donor nekog spornog traga, testiranje spornog očinstva, utvrđivanje identiteta nestalih osoba itd.). Prilikom prikupljanja ovih uzoraka, jasno se zna identitet osobe od koje se trag uzima. Trenutno, najčešći uzorak koji se prikuplja kao nesporni je uzorak krvi, a također se koristi i bris bukalne sluznice.

4.2. PRIKUPLJANJE I POHRANJIVANJE UZORAKA

Prikupljanje DNA dokaza s mjesta zločina mora biti provedeno po precizno standardiziranom postupku s jasno definiranim odrednicama koje se obavezno i dosljedno poštuju. To je jedini način na koji se može osigurati kvalitetna detekcija DNA profila prihvatljivih u sudskim postupcima. Razvoj modernih metoda omogućio

je analiziranje količinski deficijentne i visokodegradirane DNA u biološkim tragovima. S druge strane, obvezao je na izuzetne mjere opreza prilikom kontakta i manipuliranja tim tragovima, zbog sprečavanja moguće kontaminacije samog traga, ali i zbog sprečavanja izlaganja osobe koja prikuplja trag eventualnim biološki štetnim materijalima. Prikupljanje, pakiranje i transport ovakvih bioloških tragova su početne, ali najčešće i ključne faze uspješnog provođenja DNA ekspertize.

Biološki tragovi su specifični jer mogu biti zarazni, te se mogu prenijeti na osobu koja ih prikuplja. Potrebno je izbjeći svako sekundarno onečišćenje bioloških tragova, bilo stanicama koje sadržavaju DNA sakupljača tragova (stanice površinskog dijela kože i slično) ili kontaminacijom uzorak-uzorak. Primjer može biti neadekvatna pohrana dvaju uzoraka zajedno u jednoj vreći. Na taj je način logično očekivati da će provedena osjetljiva analiza DNA i njeni rezultati biti upitni. Preporučljivo je da sakupljač bioloških tragova nosi dvostruke sterilne rukavice, gdje donje služe kao zaštita od kontakta sa zaraznim materijalom, a gornje se mijenjaju pri uzimanju biološkog uzorka po pravilu „jedan uzorak, jedan par rukavica”.

Svaki predmet koji se označi i utvrdi kao dokazni materijal u određenom pravnom, (najčešće) kaznenom postupku, mora biti označen, fotografiran i evidentiran, tj. svaki biološki trag mora imati dokumentaciju koja detaljno opisuje tzv. **lanac posjedovanja (nadzora) traga** (engl. *chain of custody*). Na osnovi te dokumentacije jasno se može odgovoriti na pitanje tko, gdje, kada i kako je posjedovao i za koju analizu je upotrebljavao trag pronađen na mjestu zločina. Koliko je važan ovaj postupak pokazuje i podatak da je najveći postotak strategija osporavanja forenzičkih DNA dokaza na sudu zasnovan upravo na preispitivanju i dokazivanju nepravilnosti u lancu posjedovanja traga (Butler, 2012). Stoga je bitno znati da pravilno dokumentiranje biološkog traga, koje određuje njegovu daljnju sudbinu kao traga (ne)prikladnog za prihvaćanje na sudu, upravo počinje prilikom prikupljanja bioloških tragova. Stoga nije pretjerano tvrditi da je pravilno prikupljanje biološkog traga za forenzičku analizu DNA ujedno i najznačajniji korak same forenzičke analize DNA.

Metoda prikupljanja pojedinačnog traga ovisi o njegovoj prirodi i osnovnim svojstvima, o čemu smo detaljnije pisali u poglavlju 12. Uspješnost procesa analize DNA predmetnog biološkog traga ovisi o potpunom poštivanju propisanog postupka njegovog prikupljanja te da bi bilo nužno da sve stručne osobe koje imaju pristup ovakvim tragovima prođu odgovarajuću, certificiranu edukaciju.

U cilju pravilnog prikupljanja bioloških tragova za analizu DNA, njihovog pakiranja i transporta, mora se pratiti par jednostavnih uputstava (Marjanović *et al.*, 2005c).

- Svaki biološki trag koji se nalazi u tekućem ili vlažnom stanju prvo mora biti dobro osušen pa tek onda zapakiran i prenesen do mjesta njegove daljnje analize.
- Biološki trag nikada ne smije biti trajno zapakiran u plastični (PVC) omot (ambalažu). Ovakav način pakiranja može se koristiti samo za kratkotrajni prijenos traga do mjesta njegovog sušenja. Takav prijenos mora vrlo kratko trajati da bi se izbjeglo ubrzavanje procesa degradacije (progresivne destrukcije) traga.
- U procesu prikupljanja bioloških tragova neophodna je upotreba jednokratnih (lateks, bez pudera) rukavica. Rukavice se moraju mijenjati u prikupljanju više tragova po principu: jedan par rukavica – jedan biološki trag. Na taj se način izbjegava moguća kontaminacija prikupljenog biološkog materijala.
- Tijekom prikupljanja bioloških tragova preporučljivo je (najavljuje se kao obavezno), nošenje maske za lice, koja pokriva usta i nos. U pojedinim slučajevima neophodno je i nošenje jednodijelnog kombinezona i kape s ciljem sprečavanja potencijalne kontaminacije bilo kojim biološkim tragom, ali i osobne zaštite kriminalističkih tehničara i forenzičara od mogućih izvora zaraze.
- U slučaju neposjedovanja maske (iz objektivnih ili subjektivnih razloga), moguća kontaminacija prikupljenih tragova može se dobrim dijelom izbjeći eliminacijom govora, kašljanja ili kihanja i udaljavanjem drugih (iako službenih) osoba tijekom prikupljanja uzoraka.
- Prilikom prikupljanja većeg broja bioloških tragova na jednoj lokaciji, mora se voditi računa da se svaki trag obrađuje individualno, tj. da se svaki od njih prikuplja posebnim, sterilnim materijalom i da se obavezno odvojeno pakira.
- Prilikom slanja bioloških tragova u laboratorij, poželjno je da se dostavi, ako je to moguće, i predmet (ili dio predmeta) s kojega je trag prikupljen (odjeća, sitniji predmeti i sl.).
- Ambalažu u koju se upakira prikupljeni trag, neophodno je jasno i čitko označiti razumljivim oznakama, koje će biti preciznije opisane i evidentirane u pratećoj dokumentaciji. Oznake na ambalaži i oznake u pratećoj dokumentaciji moraju se međusobno podudarati.
- Tijekom prikupljanja uzoraka poželjno je korištenje priručnoga kompletaza prikupljanje uzoraka.

Postoji više modela priručnih kompleta za prikupljanje uzoraka. Njih najčešće serijski proizvode specijalizirane tvrtke te njihov sadržaj varira ovisno o proizvođaču i zahtjevima naručitelja. Ovi kompleti moraju biti sastavni dio forenzičkog pribora, jer omogućavaju lakše i jednostavnije prikupljanje bioloških tragova namijenjenih analizi DNA. Ujedno, mogu poslužiti i za preliminarno prikupljanje tragova utvrđenih od strane službenih osoba koje se prve zateknu na mjestu

kriminalne radnje, posebno u uvjetima kada postoji opasnost da se tragovi mogu trajno izgubiti ili da se može narušiti njihovo primarno stanje (uslijed meteoroloških promjena, dodatne kontaminacije i sl.). Stoga se preporučuje, i ustaljena je praksa u mnogim zemljama, da svaka policijska patrola ima po jedan komplet u svom službenom automobilu.

Najjednostavniji komplet za prikupljanje uzoraka sastoji se od:

- sterilnih vatiranih štapića
- ampula sa sterilnom destiliranom vodom
- malih kartonskih kutija, oblikom prilagođenih za transport svježih prikupljenih uzoraka
- pečatnih naljepnica, koje služe za oznaku intaktnosti traga tijekom njegovog transporta
- kratkog uputstva za upotrebu.

U komplet mogu biti ubačene i sterilne rukavice ili se dodati kao vanjski dio ovog priručnog pribora za prikupljanje tragova (slika 4.1.). Bez obzira na sadržaj, svaki komplet mora biti hermetički zatvoren, najčešće u plastificiranom omotu, i tako zaštićen od potencijalne vanjske kontaminacije. Sadržaj pojedinih elemenata ovog kompleta varira ovisno o potrebi, a kao najčešći standard koristi se pet odvojeno pakiranih pari štapića, nekoliko pečatnih naljepnica, pet ampula sa sterilnom destiliranom vodom (opcionalno kapsule s izotoničnom otopinom) te pet kartonskih kutija. Tako je omogućeno optimalno prikupljanje, pakiranje i transport pet različitih bioloških tragova pronađenih na mjestu zločina.



SLIKA 4.1. Jedan od modela priručnih kompleta za prikupljanje forenzičkih uzoraka (preuzeto i prilagođeno s <https://tritechforensics.com/blood-specimen-collection-kit/>, pristup 11.1.2025. godine.)

4.3. IDENTIFIKACIJA VRSTE BIOLOŠKOG TRAGA

Forenzički biološki tragovi mogu se pojaviti u različitim oblicima i stanjima. Skoro svaki trag mora se promatrati kao individualni fenomen i pomno ispitati prije nego se krene u analizu njegove DNA. S ciljem odabira odgovarajuće metode izolacije DNA, neophodno je jasno utvrditi o kakvom je tragu riječ. Naime, nije rijetko da se u laboratorij dostavljaju tragovi koje su policijski stručnjaci prikupili na mjestu zločina, a za koje se nije utvrdilo jesu li su uopće tragovi biološkog porijekla i, ako jesu, o kojim tragovima je riječ. Takvi tragovi u svom opisu (u pratećoj dokumentaciji), najčešće se opisuju kao tragovi koji asociraju na krv (slika 4.2.), spermu, pljuvačku, ljudsku dlaku itd.

Ponekad tragovi nisu vidljivi golim okom te se samo može pretpostaviti njihovo postojanje. Npr. u slučajevima silovanja, često se ispituju dijelovi odjeće kao predmeti na kojima se potencijalno mogu pronaći tragovi sperme, pljuvačke ili epitelnih stanica počinitelja. S obzirom da bi bilo izuzetno skupo, komplicirano i dugotrajno da se cijeli komad odjeće reže na male fragmente i svaki zasebno procesira, neophodno je prvenstveno njegovo preliminarno vještačenje, radi potvrđivanja i lociranja potencijalnih bioloških tragova i utvrđivanja njihovog biološkog porijekla. Slični postupci rade se i za one predmete i lokalitete za koje se vjeruje da su nakon nekog zločina očišćeni u cilju skrivanja tragova (najčešće krvi).

Stoga se u laboratorijima, prije provođenja same analize DNA, biološki tragovi testiraju s ciljem utvrđivanja, tj. identifikacije vrste biološkog traga. Sa stajališta očekivanih rezultata sve ove metode možemo podijeliti u dvije osnovne skupine: preliminarne metode ili metode pretpostavke (*engl. presumptive test*) i potvrdne (specifične) metode.



SLIKA 4.2. Prikupljanje sasušene krvi na bijeloj površini.

Metode pretpostavke su brzi, jednostavni i relativno jeftini postupci koji najčešće služe kao testovi probira (eng. *screening*). Oni preliminarno identificiraju (pretpostavljaju) vjerojatnu prisutnost određene tvari i obično su osjetljivije nego potvrdne metode. No, s druge strane, nije neuobičajeno da se primjenom preliminarnih metoda dobiju i lažno pozitivni rezultati. Također, ove se metode izuzetno često koriste na mjestu zločina, posebno ako se radi o nevidljivim tragovima tjelesnih tekućina, koje treba točno locirati i identificirati prije prikupljanja. Mogu se koristiti i u laboratorijima, ali kao početne faze identifikacije traga.

Potvrdne metode imaju ulogu konačne identifikacije (potvrde) prisutnosti neke tvari u tragu. One su temeljene na jedinstvenoj karakteristici te tvari, koja se ne ponavlja u prirodi niti u jednom drugom spoju. Slabije su osjetljivosti nego preliminarnne metode, no visoko su specifične i ne daju lažno pozitivne rezultate. Provode se u laboratorijima, a u rijetkim prilikama mogu se provesti na mjestu zločina.

4.3.1. Testiranje i identifikacija tjelesnih tekućina

Sa stajališta forenzičke biologije, tjelesne tekućine dijele se na dvije osnovne skupine: krvi i izlučevine (sperma, pljuvačka, mokraćna, vaginalni iscjedak). Postoji veliki broj metoda koje se koriste u identifikaciji ovih tipova bioloških tragova.

4.3.1.1. Testiranje i identifikacija tragova krvi

Krv je tekuće tkivo, točnije crvena, neprozirna gusta tekućina specifičnog mirisa i slanog okusa. Ukupna količina krvi u čovjeku iznosi otprilike 8% njegove težine, dok ukupni volumen krvi u ljudskom tijelu varira i kreće se oko 5 litara. Krv se sastoji od tekuće komponente - plazme (koju čine voda, organske tvari, anorganske soli i glukoza) i stanica, a to su crvena krvna zrnca (eritrociti), bijela krvna zrnca (leukociti) i pločaste krvne stanice (trombociti). U forenzičkoj znanosti, ispitivanje krvi diferencira se u dva osnovna pravca: biološki (serološki) koji se temelji na identifikaciji i individualizaciji traga krvi i fizički (vizualni) koji ispituje oblik krvnih tragova, a s ciljem rekonstrukcije događaja na mjestu zločina. Postoji veliki broj preliminarnih i potvrdnih metoda koje određuju je li biološki trag koji asocira na krv stvarno krv i je li ta krv ljudskog porijekla.

Preliminarne metode za testiranje tragova krvi prvenstveno se temelje na dokazivanju prisutnosti hemoglobina, a u tu svrhu najčešće se koriste kolorimetrijski testovi. Kolorimetrijski test podrazumijeva upotrebu kromogena (kemikalije koja u specifičnim uvjetima mijenja boju) i oksidirajućeg agensa (vodikovog peroksida), a cijelu reakciju katalizira hemoglobin. Naime, u reakciji kromogena i vodikovog peroksida, a u prisutnosti hemoglobina, nastaje obojeni kromogen,

a odvaja se voda. Kao krajnji rezultat ovog testa, ako dođe do obojenja, može se navesti pretpostavka da testirani biološki trag može predstavljati trag krvi. Sam model ili izvedba reakcije, najčešće se odvija tako da se trag prikupi vatiranim štapićem, doda se kromogen, a zatim kap vodikovog peroksida i očita se rezultat. Bitno je napomenuti da postoji veliki broj reagensa i bioloških tragova koji mogu dati lažno pozitivne reakcije, npr. biljni materijali iz krumpira, jabuke, ili, pak, tragovi hrđe ili ostalih metala koji su oksidansi. Najpoznatiji preliminarni testovi koji se trenutno koriste u forenzičkim laboratorijima su:

- Benzidinski test
- Fenoltaleinski test – Kastle-Meyer test
- *O*-Toluidinski test
- Tetrametilbenzidinski test. TMB
- Leukomalalit zeleni test (engl. *Leucomalachite green test*, LMG).

Među ovim testovima najpoznatiji je Kastle-Meyer ili fenoltaleinski test, prilikom kojeg se bezbojni fenoltalein nakapa na trag te se kao katalizator dodaje vodikov peroksid. U slučaju uspješne reakcije peroksidazom, odnosno prisutnosti krvi, doći će do promjene boje u ružičastu, ovisno o količini krvi u tragu.

Najbrža metoda, iako ne i najpouzdanija s obzirom na veliku mogućnost lažno pozitivnih testova, je detekcija krvi posebno dizajniranim trakicama koje otkrivaju prisutnost hemoglobina (slika 4.3.). Ova metoda zasnovana na prisutnosti TMB-a i vodikovog peroksida na testnim trakicama koristi se isključivo kao preliminarna metoda. Osnovna prednost upotrebe komercijalnih testnih setova (npr. Hemastix trakica) je jednostavna, brza i osjetljiva reakcija, ali ograničavajući čimbenici su nespecifičnost reakcije i nerijetko pojavljivanje lažno pozitivnih rezultata.



SLIKA 4.3. Popularne Hemastix trakice koje se koriste u brzom i jednostavnom testiranju tragova krvi. Princip testiranja je jednostavan: destiliranom vodom se navlaži testni dio trakice (žute boje) i odstrani se višak vode. Testni dio se zatim prisloni na trag koji asocira na krv. Nakon kraćeg vremenskog intervala (30-60 sekundi), očitavaju se rezultati. Ako je došlo do promjene boje (u zelene nijanse) potvrđena je prisutnost krvi. Intenzitet nastalog obojenja služi za procjenu

količine prisutnog željeza, tj. hemoglobina ili krvi. Nedostatak ove metode je što nije previše osjetljiva i nerijetko može dati lažno pozitivne rezultate. (preuzeto i prilagođeno s <https://lynnpeavey.com/product/hemastix/>, pristup 7.8.2024.)

Uz kolorimetriju, kao preliminarne metode testiranja tragova krvi koriste se i postupci zasnovani na kemiluminiscenciji i fluorescenciji. Kemiluminiscencija podrazumijeva emitiranje svjetla kao krajnji rezultat kemijske reakcije, dok fluorescencija predstavlja sposobnost emitiranja svjetla tijekom izloženosti traga (supstance) svjetlosnim izvorima kratke valne dužine. Ovi su testovi značajno osjetljiviji nego kolorimetrijski testovi i značajno su efikasniji u detekciji starih i latentnih (nevidljivih) tragova. Također, primjenom ovih metoda ne dolazi do interferiranja reagensa s molekulom DNA, pa samim tim ne utječu na daljnji tijek procesiranja traga namijenjenog za forenzičku analizu DNA. Također se koristi i metoda alternativnog izvora svjetla, gdje se u trag usmjerava ultraljubičasto, vidljivo ili infracrveno svjetlo, kako bi se mrlja od krvi jasno pokazala na podlozi ili površini na kojoj nije vidljiva golim okom.

Jedna od najraširenijih i, zahvaljujući velikom broju CSI (engl. crime scene investigation) filmova i serija, najpopularnijih metoda jest analiza tragova luminolom. Ovaj kemiluminiscentni test omogućava brzu analizu velikih površina i mogućnost detekcije krvi koja je razrijeđena i do 10 milijuna puta. Prvenstveno se koristi u analizi tragova krvi koji iz određenih razloga nisu vidljivi golim okom (jako mali tragovi na većim površinama, tragovi koji su se pranjem pokušali prikriti itd.).



SLIKA 4.4. Bluestar® Forensic set za detekciju tragova krvi. Komercijalni setovi bazirani na reakciji luminolom izuzetno su pojednostavnili i poboljšali princip detekcije izuzetno malih tragova krvi (preuzeto i prilagođeno sa <https://www.bluestar-forensic.com/es/manuales-de-usuario-bluestar-forensic/>, pristup 7.8.2024.).

Luminol reagira sa željezom iz hemoglobina i kao rezultat nastaje ljubičasto obojenje vidljivo golim okom u uvjetima prigušene svjetlosti. Obojenje je prisutno nekoliko minuta i može se fotografirati. Na ovaj način preliminarnim testiranjem (engl. *presumptive test*) ukazuje se na prisustvo/odsustvo traga koji bi se dalje mogao analizirati (Gunn, 2006). Tretiranje uzoraka luminolom ne ostavlja posljedice na nasljedni materijal i ne inhibira niti jednu od faza analize DNA (Butler, 2005). Važno je naglasiti da su lažno pozitivni rezultati mogući, posebno u prisutnosti soli bakra. Danas se može naći veliki broj komercijalnih setova (npr. Bluestar® Forensic - slika 4.4., Bluestar, Monte Carlo, Monaco) koji su metodu korištenja „otopine luminola” izuzetno pojednostavnili. Luminol metoda, kako se i može zaključiti, koristi se najčešće kada se analiziraju mali ili veliki, ali nevidljivi tragovi krvi. Kada je riječ o jasno vidljivim tragovima koji bi potencijalno mogli predstavljati trag krvi postoji veliki broj jednostavnijih, bržih i jeftinijih metoda u njihovom preliminarnom testiranju.

Potvrđne metode testiranja tragova krvi (nazivaju se još i laboratorijske metode) koriste se s ciljem dokazivanja prisutnosti krvi i one su visoko specifične i ne daju lažno pozitivne reakcije. Ove metode mogu se podijeliti u sljedeće grupe:

- metode tvorbe kristala
- spektroskopske metode
- elektroforetske metode
- tankoslojna kromatografija (engl. *Thin layer chromatography*, TLC).

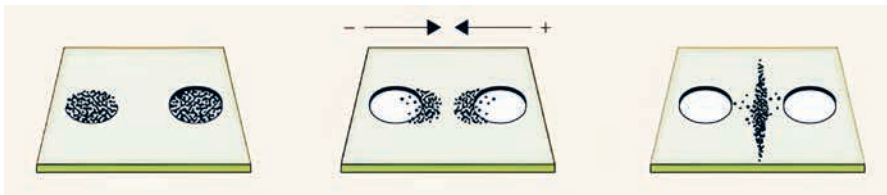
Teichmann i Takayama test su dvije najduže korištene potvrđne metode za testiranje krvi. Prvu je još 1853. godine opisao Ludwig Karl Teichmann, poljski znanstvenik, a drugom metodu je 1912. godine opisao japanski znanstvenik Masao Takayama. Oba se testa temelje na tvorbi kristala hemina ili hemokromogena prilikom dodavanja i zagrijavanja određenih otopina, stoga se često nazivaju i kristalni ili mikrokristalni testovi. Teichmann je primijetio da, kada se krvi dodaje ohlađena octena kiselina u prisutnosti soli, uz lagano zagrijavanje dolazi do stvaranja kristala (Milosavljević, 2012). S druge strane, Takayama je primijetio isto svojstvo hemoglobina kada mu se doda alkalni pirimidin i šećer uz lagano zagrijavanje. U literaturi nisu navedeni primjeri lažno pozitivnih rezultata za ove testove, ali je primijećeno da Teichmann test može rezultirati lažno negativnim rezultatima ako se trag krvi nalazi na materijalu poput kože. Također su zabilježeni lažno negativni rezultati Takayama testa za pojedine starije tragove krvi. S obzirom na kompleksnost cijelog postupka, oba ova testa se danas relativno rijetko koriste.

Na kraju, glavno pitanje prije slanja biološkog traga krvi na forenzičku analizu DNA jest - je li trag ljudskog ili životinjskog porijekla. Da bi se dobio odgovor na to pitanje, mogu se koristiti prethodno spomenute metode zasnovane na:

- kromatografiji ili elektroforezi
- spektrofotometriji
- imunološkim analizama.

Elektroforetska metoda počiva na difuziji antitijela i antigena na elektroforetskoj gel ploči. Ekstrakt ispitivane krvne mrlje i ljudskog antiseruma postavse u odvojene jažice na gelu. Kada se gel tretira električnim nabojem, u zoni precipitacije potencijalno se detektiraju smjese ljudskih antigena (ako je ispitivana krv ljudskog porijekla) i antitijela.

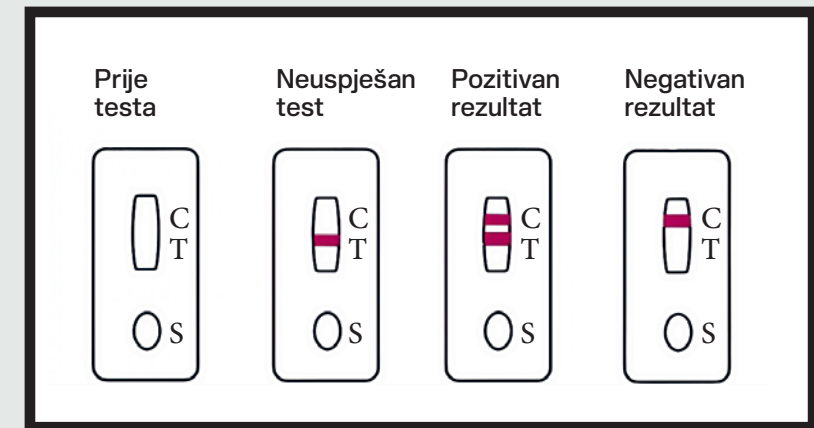
S druge strane, najčešće korišteni difuzno-reaktivni test je tzv. Ouchterlony test (tehnika imunoelktroforeze) koji se zasniva na reakciji antigen-antitijelo između ljudske krvi i ljudskog antiseruma (slika 4.5.). Ljudski antiserum proizvodi se injektiranjem ljudske krvi u drugi životinjski, najčešće zečji organizam. Zečji organizam, tj. njegov imunološki sustav, reagira na stranu krv proizvodnjom antitijela. Kada se tako tretirana zečja krvi osuši, iz nje se izolira serum koji se može koristiti za detekciju ljudske krvi jer sadrži antitijela koja će reagirati isključivo na krv ljudskog porijekla. Na sličan način može se proizvesti i antiserum specifičan za druge životinjske vrste (Houck, Siegel, 2006).



SLIKA 4.5. Shematski prikaz Ouchterlony testa. Antigen i antitijelo su u početku odvojeni u zasebnim jažicama. U sljedećoj fazi, antigen i antitijelo putuju jedno prema drugom da bi se na kraju jasno formirala precipitacijska linija.

Jedan od najčešće korištenih komercijalnih testova za dokazivanje ljudskog porijekla ispitivanog traga krvi je RSID™-Blood (engl. rapid stain identification of human blood), koji predstavlja imunokromatografsku metodu. Za pozitivnu reakciju dovoljan je 1 µl krvi, a lažno pozitivni rezultati nisu zabilježeni prilikom testiranja s drugim ljudskim tjelesnim tekućinama, kao ni s uzorcima krvi drugih

životinja, uključujući primata. Princip detekcije zasniva se na reakciji glikoforina A iz krvi s monoklonalnim antitijelima. Imunokompleks nanesen na testnu trakicu migrira do testne zone na kojoj se nalaze imobilizirana antitijela. U slučaju pozitivne reakcije pojavi se ružičasta testna linija. Da bi se rezultat smatrao pouzdanim, uz pozitivnu testnu liniju ružičasta treba biti i kontrolna linija. Kontrolna linija dokazuje funkcionalnost reakcije, a testna linija dokazuje prisutnost ljudske krvi. U slučaju odsutnosti ljudske krvi očitava se samo kontrolna linija (slika 4.6.) (*Independent Forensics*, 2016a).



SLIKA 4.6. Shematski prikaz RSID™-Blood testa za detekciju prisutnosti tragova ljudske krvi s tri moguća ishoda testiranja: bez detekcije krvi, s detekcijom krvi ili neuspješan test koji se mora ponoviti (dijelovi slike preuzeti iz *Independent Forensics*, 2016a).

4.3.1.2. Testiranje i identifikacija tragova sperme

Sperma je složena gusta tekućina koja potječe iz različitih dijelova muškog spolnog organa i koju muška osoba ejakulira kao rezultat seksualne stimulacije. Predstavlja smjesu spolnih muških stanica (spermija), aminokiselina, šećera, soli i drugih spojeva koje proizvodi spolno zrela muška osoba. Spermiji nastaju u testisima, dok sama sperma nastaje u prostati. Ukupni volumen ejakulata varira od 2 do 6 ml i prosječno sadrži 100-150 milijuna spermatozoida po 1 ml (Houck, Siegel, 2006). Spermij predstavlja zanimljivu biološku konstrukciju dužine oko 55 µm koja se sastoji od glave (koja nosi DNA), vrata i pokretnog repa koji mu omogućava kretanje. Biološka uloga spermija je da prenese genetičku informaciju (točnije, jedan njen dio) s oca na potomstvo.

Trag sperme najčešće se javlja u forenzičkim istragama djela povezanih sa silovanjem, seksualnim uznemiravanjem i bludnim radnjama. Ovi tragovi mogu biti na odjeći, na i u tijelu žrtve ili drugim predmetima pronađenim na mjestu zločina.

Preliminarne metode testiranja tragova sperme zasnivaju se na analizi prisutnosti enzima kisele fosfataze. Naime, sperma sadrži kiselu fosfatazu, koji je u prirodi vrlo čest enzim, a koji se u spermi javlja u izuzetno visokim koncentracijama. Upravo te visoke koncentracije osnova su velikog broja komercijalnih testova za dokazivanje prisutnosti sperme u nekom biološkom tragu. Jedan od najčešće upotrebljavanih testova u tu svrhu je *Bentamine Fast Blue B* test koji se primjenjuje na alfa-naftil fosfatnom supstratu. Sterilni filter papir se navlaži destiliranom vodom i njime se tretira ispitivani trag. Zatim se doda *Bentamine Fast Blue B* reagens i, ako se pojavi purpurno-ljubičasta boja, test je dao pozitivne rezultate na prisutnost sperme (slika 4.7.), a ako se obojenje ne pojavi u roku od dvije minute, sperma nije detektirana u ispitivanom tragu (Houck i Siegel, 2006). Ako se radi o starijem tragu, intenzitet obojenja može biti slabiji, a ponekad može doći i do lažno negativne reakcije, jer aktivnost kisele fosfataze opada s vremenom. S druge strane, mogu se javiti i lažno pozitivne reakcije, jer kisela fosfataza nije prisutna isključivo u spermi, pa se u većim koncentracijama može naći čak i u vaginalnom sekretu.

S druge strane, sperma također može biti vizualizirana i posebnim lampama (valna dužina od 450 nm), bez obzira radi li se o svijetlom ili tamnom materijalu na kojem se mrlja nalazi. Ovakva se analiza radi u mraku i osnovna prednost joj je da se relativno velika površina može izuzetno brzo analizirati. Također predstavlja preliminarnu metodu testiranja tragova sperme.

Još jedna od metoda za dokazivanje prisutnosti tragova sperme zasniva se na ispitivanju prisutnosti p30, specifičnog antigena prostate (engl. *prostate-specific*



SLIKA 4.7. Pojavljivanje i detekcija ljubičaste boje na testiranom uzorku predstavlja pozitivnu reakciju na prisutnost sperme.

antigen, PSA). U ovoj analizi ranije se koristio standardni ELISA test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), koji se zasniva na antitijelo-antigen reakciji, koja je izuzetno osjetljiva (granična koncentracija p30 koja se može detektirati ovom metodom se kreće oko 0,005 ng/ml) (Gunn, 2006). Danas sve više laboratorija upotrebljava jednostavne i brze komercijalne imunokromatografske testove. Ovaj test danas se sve češće svrstava u preliminarne testove za detekciju sperme, jer se PSA može pronaći i u drugim materijalima, kao što su urin i mlijeko kod žena, dok je ranije bio smatran potvrđnim testom. Jedan od takvih testova je *PSA Check Test* (slika 4.8.), a u pitanju je imunokromatografski test koji se temelji na detekciji ljudskog PSA. Anti-ljudska PSA antitijela vezana su za membranu na koju se nanosi uzorak, a očitavanje rezultata radi se kao kod ostalih imunokromatografskih testova. Kada su u pitanju potvrđni testovi, oni se često baziraju na detekciji i vizualizaciji samih spermija. Sa stajališta analize DNA, najzanimljiviji i jedini iskoristivi dio sperme za dobivanje DNA profila upravo su spermiji. Dosadašnja iskustva pokazala su da prisutnost sperme ne znači uvijek da će se za analizirani trag moći utvrditi i DNA profil. Naime, odsustvo spermija (aspermija) ili njihovo relativno mala prisutnost (oligospermija) mogu uvjetovati odsutnost ili nedovoljnu prisutnost DNA u analiziranom tragu sperme, što je uobičajeno kod muškaraca smanjene plodnosti ili muškaraca koji su se podvrgli vazektomiji. Najpoznatija metoda detekcije spermija je svakako *Christmas Tree Staining - CTS* metoda kojom se vrh glave spermatozoida boji u ružičastu, dno glave spermatozoida u tamnocrvenu, srednji dio glave u plavu, a rep u žučkasto-zelenu boju (slika 4.9.). Uzorak traga sperme navlaži se destiliranom vodom i nanese na predmetno mikroskopsko staklo. Zatim se tretira CTS reagensima, a rezultati se analiziraju upotrebom mikroskopa, pod povećanjem od 400 do 1000 puta.



SLIKA 4.8. Komercijalni test za potvrđno analiziranje tragova sperme detekcijom p30, specifičnog antigena prostate.

SLIKA 4.9. Rezultati bojenja primjenom Christmas Tree Staining – CTS metode (preuzeto i prilagođeno s https://dfs.dc.gov/sites/default/files/dc/sites/dfs/page_content/attachments/FBS07%20Sperm%20Search.pdf, pristup 24.8.2024.).

Drugi potvrdni test za prisutnost sperme je *RSID™ Semen*, koji je adekvatan za testiranje tragova prikupljenih s različitih površina i koristi samo 1 µl uzorka, a cijeli postupak traje oko 10 minuta. Sama metoda slična je onoj kod *RSID™ Blood* testa, a ovdje se koriste monoklonska antitijela specifična za semenogelin kod čovjeka. Očitanje rezultata radi se po istom principu, a i ovaj test daje negativne rezultate kad se primijeni na uzorke drugih životinja. Također, lažno pozitivni rezultati nisu zabilježeni s drugim tjelesnim tekućinama, a posebno je važno naglasiti da nema nespecifične reakcije sa ženskim urinom, mlijekom ili vaginalnim iscjetkom (Independent Forensics, 2011a).

Prilikom analize tragova sperme izuzetno bitan parametar je i vrijeme koje je prošlo od ejakulacije. Naime, prisutnost sperme u vagini u pojedinim uvjetima može se dokazati i nakon 26 sati, dok prisutnost same glave spermija može biti detektirano i nakon 3 dana. Taj period nešto je dulji kada se radi o cerviksu. Očuvani spermiji mogu biti pronađeni i nakon 65 sati u rektumu, dok je njen vijek trajanja znatno kraći kada se radi o ustima i u prosjeku ne prelazi 6 sati (Marjanović *et al.*, 2005c).

Jedan od poznatijih komercijalnih testova za preliminarnu analizu tragova sperme je Phosphatesmo KM test (slika 4.10.). To je metoda koja se temelji na detekciji sjemene kisele fosfataze. Vrlo je jednostavan za upotrebu. Trag se namoči vodom ili u fiziološkoj otopini i nakon jedne minute vlažni trag se stavi na testnu trakicu. U prisutnosti kisele fosfataze u tragu, testna trakica oboji se u ljubičastu boju. Intenzitet obojenja može dati opći uvid o procijenjenoj koncentraciji prisutne kisele fosfataze.



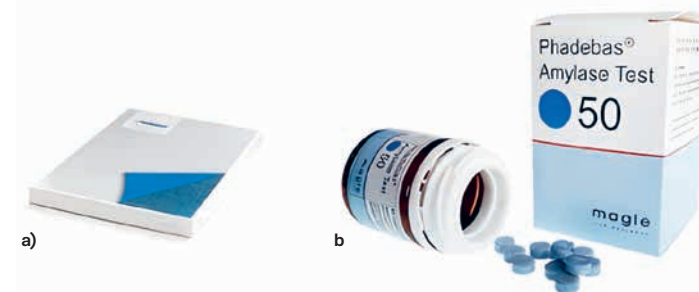
SLIKA 4.10. Komercijalni test za preliminarno analiziranje tragova sperme detekcijom sjemene kisele fosfataze (preuzeto i prilagođeno s <https://shop.narcotictests.com/products/forensic-products/phosphatesmo-km-test-25-tube/details>, pristup 7.8.2024.).

4.3.1.3. Testiranje i identifikacija tragova pljuvačke

Pljuvačka se sastoji od glikoproteina, različitih hidrolaza, vode i manjeg broja stanica. Često se javlja kao biološki trag pronađen na mjestu zločina. Može se pronaći na opušcima cigareta, žvakaćim gumama, poštanskim markicama, kuvertama, grličima boca, čašama, ugrizima na tijelu žrtve itd. (Abaz *et al.*, 2002; Shaler, 2020). Detekcija pljuvačke (sline) svodi se na dokazivanje prisutnosti enzima α -amilaze, koji je karakterističan za ljudske i životinjske tragove, dok se β -amilaza može naći u biljnim tragovima.

Osnovni problem u forenzičkoj detekciji prisutnosti pljuvačke jest činjenica da se amilaza može naći i u velikom broju drugih tjelesnih tekućina tako da specifičnost samog testa nije ni približno visoka kao kod tragova krvi i sperme. Drugi problem jest činjenica da pojedini ljudi nemaju enzim amilazu te se mogu dobiti lažno negativni rezultati. Zbog toga su postojeće preliminarne metode za testiranje prisutnosti ove tjelesne tekućine izuzetno nespecifične metode, dok potvrdne metode trenutno ne postoje.

Najpoznatija preliminarna metoda za detekciju α -amilaze je tzv. škrob-jodni test. Otopina škroba i joda daje plavo obojenje, ali kada amilaza razgradi škrob to se obojenje gubi. Na tom principu zasnivaju se najpoznatiji komercijalni testovi za testiranje prisutnosti pljuvačke, *Phadebas Forensic Press Test* i *Phadebas Forensic Tube Test* (slika 4.11.). Prvi se zasniva na upotrebi papira tretiranog reagensima, a koji se nanosi na mjesto koje se ispituje i koji se u slučaju prisutnosti amilaze boji u plavo. Drugi se, pak, zasniva na otapanju tableta u sterilnim tubicama u koje se zatim stavljaju navlaženi dijelovi ispitivanog traga i prati pojava obojenja. U oba slučaja, ako se pojavi obojenje, dokazana je prisutnost α -amilaze, i pretpostavljena je prisutnost pljuvačke. Svakako, važan je faktor intenzitet obojenja i vrijeme koje je potrebno za njegovo pojavljivanje, stoga se ova analiza uvijek radi uz upotrebu pozitivnih i negativnih kontrola.



SLIKA 4.11. a) Phadebas Forensic Press Test i b) Phadebas Forensic Tube Test referencu (preuzeto i prilagođeno s (a) https://www.seidden.com/Phadebas_ing.htm i (b) <https://latentforensics.com/products/phadebas-forensic-a4>, pristup 7.8.2024.).

RSID™-Saliva test razvijen je kao novija metoda i zasniva se, također, na detekciji α -amilaze. Ovaj test može se raditi koristeći veoma male tragove pljuvačke, počevši od 10 nl. Test se temelji na imunokromatografskoj metodi pomoću monoklonskih antitijela. Unakrsna reakcija i lažno pozitivni rezultati nisu zabilježeni s uzorcima poput krvi, sperme, menstrualne krvi, urina ili vaginalnog iscjetka, ali je moguće dobiti lažno pozitivne rezultate u slučaju reakcije s ljudskim mlijekom ili fekalnim materijama, kao i slučaju testiranja pljuvačke gorile. Iako je reakcija s pljuvačkom oko 40 puta jača, ovaj test ipak je ispravnije nazvati preliminarnim, a ne potvrdnim testom (Independent Forensics, 2016b).

Općenito govoreći, trag pljuvačke najčešće sadrži ogromne količine epitelnih stanica koje potječu od bukalne sluznice, i kao takav je izuzetno prikladan za analizu DNA.

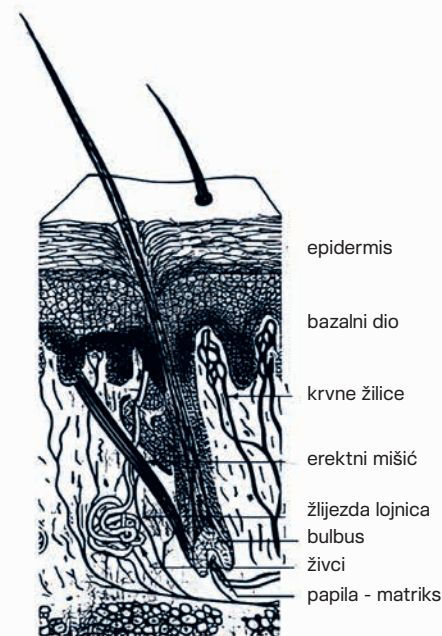
4.3.1.4. Testiranje i identifikacija tragova urina

Urin je tekućina koja nastaje kao rezultat izlučivanja bubrega i sastoji se od uree, amonijevih iona, kreatinina i mokraćne kiseline. Testiranje njegove prisutnosti najčešće se temelji na utvrđivanju postojanja uree (upotrebom ureaze) ili kreatinina (upotrebom pikrinske kiseline). Ipak, ove metode pripadaju skupini metoda za preliminarno testiranje jer se u nešto manjim koncentracijama i urea i kreatinin mogu naći i u drugim tjelesnim tekućinama. Tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography, TLC*) može se koristiti za specifičniju detekciju uree, kreatinina i ostalih komponenti urina. Također, urin karakterizira i izuzetno niska koncentracija prisutnih epitelnih stanica, pa analiza DNA ovih tragova mora biti optimizirana za potencijalnu prisutnost izuzetno malih količina.

RSID™-Urine test je baziran na inovativnoj metodi detekcije Tamm-Horsfallvog proteina (THP) također poznatog pod nazivom uromodulin, koji je najčešći protein u urinu, a luči se u količini od 80-200 mg dnevno. Ovo je još jedan imunokromatografski test koji koristi zečja monoklonska anti-THP antitijela i funkcionira na istom principu kao ostali slični testovi, s vremenom testiranja od 15 minuta. Iako je THP prisutan samo u urinu, ovaj test nije specifičan isključivo na ljudski THP, pa su lažno pozitivni rezultati mogući na urin drugih životinja. Također, eksperimentalnu granicu detekcije nemoguće je odrediti, jer nivo THP-a varira i može se razlikovati i do tri puta između osoba. Stoga je ovo još jedan preliminarni test za detekciju urina (Independent Forensics, 2011b).

4.3.2. Testiranje i identifikacija tragova dlake

Dlake su najčešći biološki trag na mjestu zločina, ali ujedno predstavljaju i trag koji je izuzetno kompleksan za analizu i čiji se rezultati analize nerijetko pogrešno



SLIKA 4.12. Shematski prikaz dlake – dubinski prikaz kroz kožu.

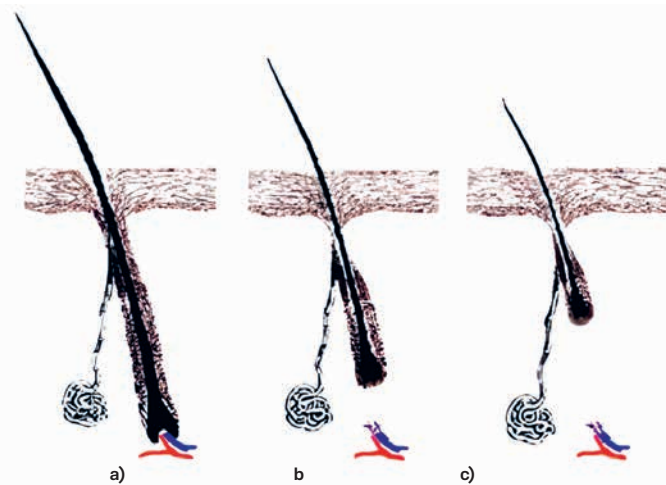
prezentiraju i tumače. Epitet dobrog forenzičkog dokaza opravdavaju činjenicom da se radi o izuzetno stabilnom biološkom tragu koji može opstati nepromijenjen dugi vremenski period, da nosi veliki broj morfoloških i biokemijskih informacija te da je proces njihove osnovne analize jednostavan i jeftin. Status dlake, kao za analizu zahvalnog traga, potkrijepila je i primjena analize DNA, kako stanične tako i mitohondrijske (Houck, Siegel, 2006).

Dlake su biološke strukture svojstvene isključivo sisavcima. Dlaka, prvenstveno kosa, kod čovjeka je odavno prerasla svoju zaštitnu ulogu i danas predstavlja kulturni, statusni ili spolni simbol, a nerijetko služi i kao sredstvo umjetničke ekspresije. Dlake rastu iz kože, točnije iz epidermisa (slika 4.12.). Na ljudskom tijelu, u obliku sitnih dlačica pojavljuju se već u periodu između 3. i 4. mjeseca trudnoće, da bi već u 5. mjesecu pokrile cijelo tijelo (Bojanić, Milosavljević, 2008). Svakako te slabašne primarne tvorevine u kasnijim stadijima ljudskoga razvoja prelaze u kompleksne strukture koje se sastoje od korijena, stabla i vrška. Tjelesna, kožna struktura unutar koje dlaka raste naziva se folikul dlake (Houck, Siegel, 2006). Folikul je cilindrično udubljenje sa šupljinom na dnu. Upravo takva struktura omogućuje komunikaciju dlake sa živcem, mišićem i žlijezdama lojnicama, a ponekada znojnicama, kroz koju se ostvaruju pokreti dlake (uspravljanje dlake kada je hladno), prijenos podražaja (bol kada se iščupa dlaka) te omašči-

vanje keratinske strukture stabla dlake (daje joj gipkost i smanjuje mogućnost pucanja). Dlaka je primarno izgrađena od proteinske supstance keratina. Unutar samog folikula ona je mekana i gipka, no po izlasku iz njega dlaka se suši i postaje tvrđa. Tada se povećava i njena keratinizacija.

Dlake na različitim dijelovima tijela traju različito dugo. Naime, dlake obrva i trepavica opadaju svakih 3-5 mjeseci, dok dlake kose traju 2-4 godine. Ljudska kosa može se u potpunosti obnoviti u razdoblju od 5-6 godina.

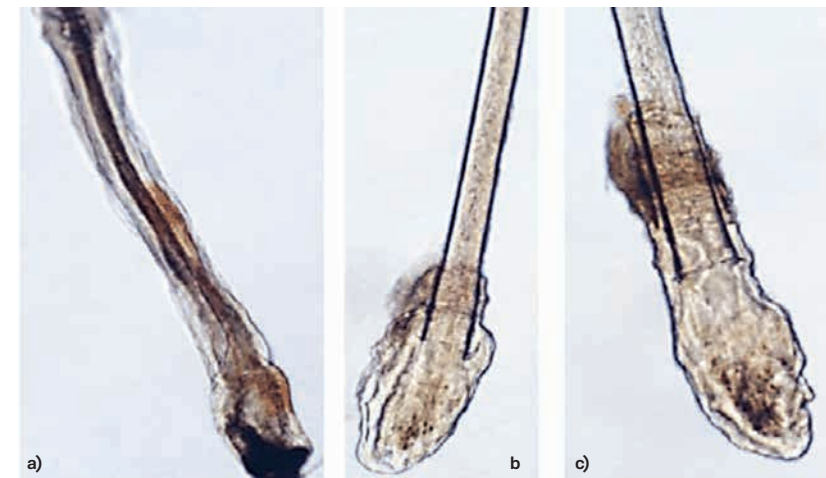
Ono što je bitno za analizu dlaka, posebno kada se radi o mogućnosti procesiranja dlake primjenom analize DNA, jest da dlake imaju tri osnovne faze rasta (slike 4.13. i 4.14.). Anagen je faza aktivnog rasta u okviru koje folikul proizvodi nove stanice, potiskuje ih prema uskom otvoru (engl. *shaft*) i tako ugrađuje nove stanice u strukturu dlake. Nakon 2 do 7 godina folikul prelazi u stanje katagena, tzv. tranzicijsko stanje tijekom kojeg bitno smanjuje svoju aktivnost i u roku od par tjedana u potpunosti prestaje s proizvodnjom novih stanica. Korijen se kondenzira i tvori bulbus. Nakon toga slijedi telogen faza ili faza mirovanja folikula. U potpunosti prestaje proizvodnja novih stanica, korijen je u potpunosti kondenziran u bulbus, zatvoren je otvor na dnu folikula i prestala je svaka fizička veza sa živcem dlake. Dlaka ima još samo mehaničku vezu sa cilindrom folikula. Lako ispada i prirodnim putem, a takvo ispadanje ne uzrokuje bol. Pretpostavlja se da je kod zdrave odrasle osobe oko 80-90 % dlaka u anagen, 2% u katagen i 10-18% u telogen fazi razvoja. Značaj činjenice u kojoj se fazi nalazi dlaka za njenu analizu DNA, prvenstveno za analizu DNA jezgrine, prikazan je u navedenom primjeru.



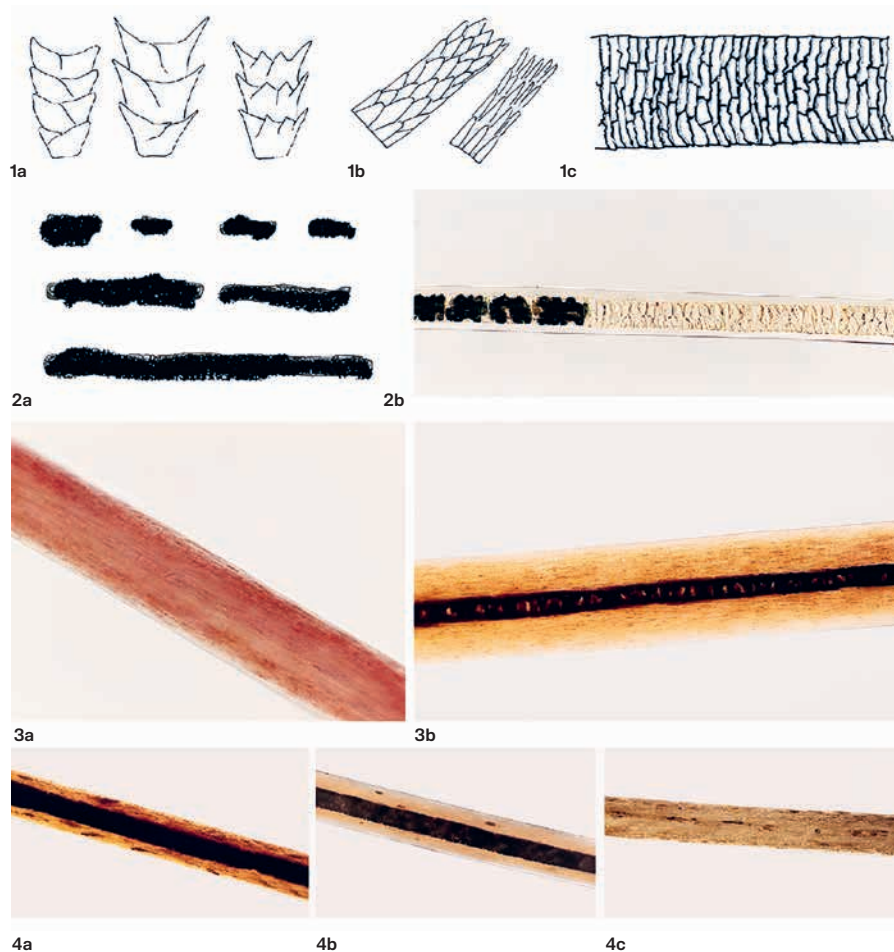
SLIKA 4.13. Shematski prikaz osnovnih faza rasta dlake: a) anagen, b) katagen, c) telogen.

Standardna, vizualna analiza dlake, s ciljem određivanja njenih morfoloških svojstava, ostvaruje se mikroskopski, a osnovni morfološko-anatomske parametri koji se promatraju temelje se na opažanju ukupnog izgleda dlake, boje, debljine, sastava, poprečnog presjeka, pigmentacije, oblika ljuskica na kutikuli, odnosa širine korteksa i medule, oblika medule, rasporeda jajolikih tjelašaca itd. (slika 4.15.). U tu svrhu, potrebno je analizirati 50-100 referentnih uzoraka sa četiri različita predjela glave, jer jedna osoba na osnovi navedenih karakteristika može imati šest različitih tipova dlake. Svaki od ovih parametara zasebno, ali i zajedno, traži odgovore na niz pitanja: je li trag dlaka ili biljno vlakno, je li dlaka ljudskog ili životinjskog porijekla, s kojeg je dijela tijela, je li ispala prirodnim putem ili je iščupana, može li dlaka potjecati od ispitivane osobe itd. Svakako, krajnje pitanje je pripada li dlaka pronađena na mjestu zločina osumnjičenoj osobi. Kao odgovor na ovo pitanje može se ponuditi određeni stupanj vjerojatnosti, koji, između ostalog, ovisi i o znanju i sposobnosti stručnjaka koji radi analizu. Bez obzira na postignuti stupanj vjerojatnosti, ova analiza nikada ne može dovesti do isključive individualizacije. Stoga je važno još jednom napomenuti da se jedino analizom DNA može postići potpuna individualizacija biološkog traga dlake.

Uz svoju ulogu u individualizaciji biološkog porijekla traga, dlaka je jako koristan polazni uzorak u forenzičkoj toksikologiji. Naime, ona može u sebi akumulirati i zadržati različite kemikalije i mjesecima nakon njenog uzorkovanja, otpadanja s tijela ili smrti osobe. Stoga se često koristi u istragama povezanima s uzimanjem narkotika, trovanjima i slično.



SLIKA 4.14. Mikroskopski prikaz osnovnih faza rasta dlake: a) anagen, b) telogen, c) katagen (dijelovi slike preuzeti s https://www.researchgate.net/figure/a-Anagen-hair-b-Telogen-hair-c-Catagen-hair-d-Anagen-dysplastic-hair-e_fig2_300852952, pristup 20.1.2025. godine).



SLIKA 4.15. Osnovni parametri koji se koriste u morfološkoj analizi dlake: 1a) krunasti oblik ljuskice se najčešće pronalazi kod manjih glodavaca, slijepih miševa, a jako rijetko kod ljudi; 1b) iglasti (spinozni) oblik ljuskice najčešće se pronalazi kod mačaka i drugih životinja i nikada se ne može pronaći kod čovjeka; 1c) crijepasti (preklapajući) oblik ljuskice najčešće se nalazi na ljudskim dlakama, ali je prisutan i kod drugih životinja; 2a) medula, kada je prisutna u ljudskoj dlaci, može biti kontinuirana, fragmentirana ili u tragovima; 2b) celularni ili vakuolarni oblik medule je najčešći oblik medule u životinjskim dlakama; 3a) pigmentacijski model karakterističan za ljudsku dlaku – pigment ravnomjerno raspoređen po cijeloj dlaci; 3b) pigmentacijski model karakterističan za životinjsku dlaku – pigment pozicioniran oko medule; 4a) raspored jajolikih tjelašaca u goveđoj dlaci; 4b) raspored jajolikih tjelašaca u psečoj dlaci; 4c) raspored jajolikih tjelašaca u ljudskoj dlaci (dijelovi slike preuzeti iz Deedrick, Koch, 2004).

Dlake su trag koji se često može naći na mjestu zločina. Prema podatcima iz dostupne literature oko 80% tako pronađenih dlaka nije prikladna za standardno testiranje jezgrine (nuklearne) DNA, pretežno zbog odsutnosti tragova epitelnih stanica ovoja s korijena, tj. činjenice da se korijen nalazi u telogen fazi. Naime, česta je zabluda da je za generiranje standardnog DNA profila na uzorcima dlaka dovoljna prisutnost samo korijena dlake. Nuklearni DNA profil ne može se generirati procesiranjem stanica dlake koje su završile svoj životni ciklus i čija se jezgra već raspala, nego iz stanica koje imaju očuvanu jezgru, a u ovom slučaju se to odnosi na stanice epitelnog tkiva koje tvore epitelni ovoj oko korijena dlake. Već je opisano da dlake koje se nalaze u telogenu lako ispadaju, pa stoga i ne čudi da se na mjestu zločina, osim ako nije bilo nasilnog čupanja dlaka, najčešće mogu pronaći baš dlake u ovom stadiju rasta. S obzirom na to da su jezgra njihovih stanica u visokom stupnju degradacije, standardna analiza DNA nije opcija za njihovo procesiranje. U tom se slučaju jedino može primijeniti testiranje mitohondrijske DNA. Ipak, u posljednje vrijeme primjenom miniSTR setova (o kojima će biti nešto više riječi kasnije), pokušavaju se generirati i nuklearni DNA profili iz ovih, izuzetno zahtjevnih tragova.

4.4. METODE IZOLACIJE DNA

Nakon što se uzorak koji sadrži biološke tragove dostavi u DNA laboratorij, dokumentira i identificira biološki tip traga, slijedi njegova priprema za analizu DNA, tj. u najvećem broju slučajeva, za generiranje upotrebljivog DNA profila. Prvi korak u tom procesu je izolacija ukupne genomske DNA. Ona se u stanici ne nalazi u čistom obliku, već je udružena i okružena brojnim drugim molekulama, kao što su npr. proteini, masti te mnoge druge, sa stajališta analize DNA, „kontaminirajuće” tvari, tj. tvari koje inhibiraju i otežavaju proces analize ciljanih genetičkih biljega. Pored tvari koje ulaze u sastav stanice, u forenzičkim tragovima često su prisutne i tvari koje su naknadno u njih dospjele. Krvna mrlja koja je pronađena na tlu, pored svih onih tvari koje su karakteristične za krv, sadrži i tvari koje su se pomiješale s tom kapljicom krvi onog trenutka kada je ona dodirнула tlo ili neki predmet. U tom trenutku, ovaj biološki trag dodatno je onečišćen česticama prašine i drugih nečistoća, kao i bakterijama iz okoline. Što trag duže ostane na nekom mjestu, to u sebe apsorbira više različitih tvari iz okoline, koje mogu nepovoljno utjecati na daljnje faze analize DNA, osobito na najosjetljiviju među njima – PCR postupak. Ovo se posebno odnosi na koštane tragove koji se uglavnom analiziraju nakon nekoliko godina ili čak desetljeća.

Stoga postupak izolacije DNA ne podrazumijeva samo njeno izdvajanje iz njenog biološkog okruženja, nego i njeno pročišćavanje od svih moguće prisutnih kontaminirajućih tvari.

Pri izolaciji DNA, stanice se razaraju, te se oslobađa sadržaj u kojem se nalaze molekule ugljikohidrata, proteina, masti i dr. Prilikom prekida stanične cjelovitosti u svrhu izolacije DNA, ona se u početku oslobađa iz jezgre i kromosomskog kompleksa, i odmah se u sljedećem koraku oslobađa i od veće količine proteina pomoću upotrebe posebnih enzima. Iako danas postoji veliki broj različitih metoda za izolaciju DNA, sve se one temelje nekoliko osnovnih koraka:

- liza (razgradnja) stanice
- pročišćavanje DNA, tj. uklanjanje kontaminirajućih tvari i PCR inhibitora
- prikupljanje (kolekcija) uzorka DNA u željenom volumenu i koncentraciji.

U rutinskom se radu koristi nekoliko metoda izolacije DNA, no prije navođenja tih metoda važno je ukazati na neke važne činjenice:

- Veliki broj slučajeva koji dolaze u laboratorij na analizu sadrži minimalne količine DNA i svaka nepotrebna manipulacija može izravno utjecati na kvalitetu i kvantitetu DNA.
- Sve osobe uključene u proces analize DNA moraju biti upoznate s mogućnošću kontaminacije postojeće DNA nekom drugom DNA.
- Neke od tvari koje se koriste pri izdvajanju DNA potencijalno su štetne za DNA ako se pravovremeno i u potpunosti ne uklone.
- Uzorci ili izolirana DNA moraju biti pohranjeni po strogo propisanim uvjetima, koji obuhvaćaju kako tehničke postupke, tako i postupke osiguravanja tajnosti uzorka.

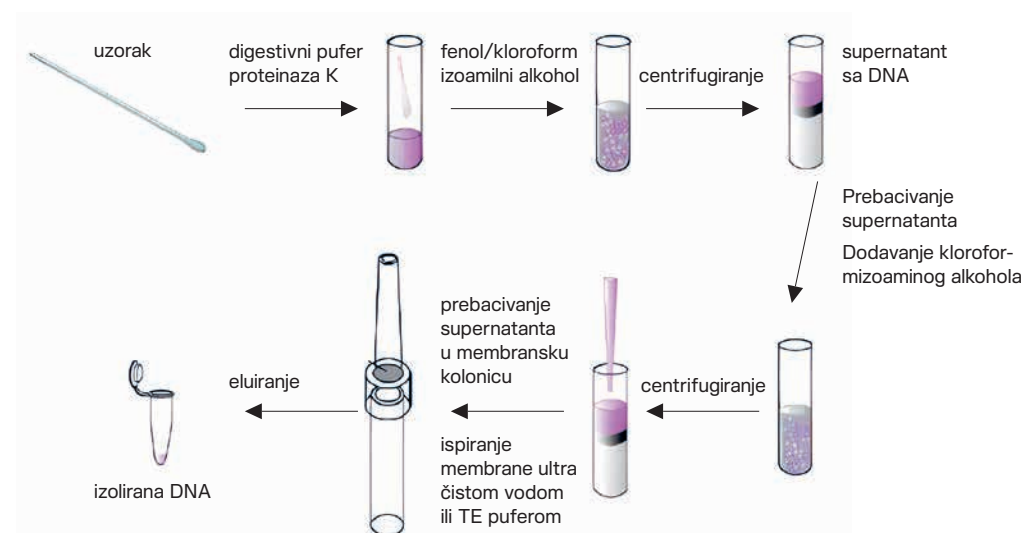
4.4.1. Izolacija DNA pomoću organskih otapala

Metodom koja se zasniva na primjeni organskih otapala (u laboratorijima poznata pod nazivom fenol-kloroform izolacija), odstranjuje se velika količina proteina i ostalih molekula koje se oslobađaju pri izdvajanju DNA iz stanica. Izdvojena DNA ostaje relativno dobro očuvana i pročišćena. Na kraju postupka, DNA se taloži ili koncentrira u za to posebno namijenjenim tubicama.

Ova metoda dosegla je najviši stupanj univerzalnosti, tj. primjenjivosti. Naime, skoro neznatne modifikacije osnovnog protokola, ona se može primijeniti na najširem rasponu uzoraka. Sam protokol organske ekstrakcije može biti modificiran u svim svojim fazama, ali se njegova osnova ponavlja kroz svaku

od tih varijanti (slika 4.16.). U prvoj fazi procesa dodaju se različite količine digestivnog pufera. Količina dodanog pufera ovisi o prirodni i količini procesiranoga uzorka. Sastav digestivnog pufera može varirati, ali se on prvenstveno temelji na prisutnosti kemikalija poput TRIS-HCl-a, NaCl-a, SDS-a i EDTA-a. Molaritet i udio pojedinih komponenti u konačnom sastavu ovoga pufera je opcionalan, ali to variranje nije značajnije izraženo. Uloga digestivnog pufera svodi se na stvaranje uvjeta u kojima će dodani enzim proteinaza K moći djelovati, tj. obaviti svoju funkciju digestije proteina. Ovim putem dolazi do razgradnje membranskih kompleksa unutar stanica i cjelokupna genomska DNA „slobodno pliva” u novonastaloj suspenziji. Prvo centrifugiranjem, a zatim kombiniranim fenol-kloroform tretmanom dolazi se do otopine koja sadrži „čistu DNA”. Poznato je da otopina fenol-kloroform-isoamil-alkohol zapravo uklanja proteine i masti, a nakon toga dodan kloroform uklanja višak fenola i ostalih prljavština koji ostanu na dnu epruvete u kojoj se postupak provodi.

Zatim se pristupa precipitaciji DNA. Ovisno o količini, ali i očekivanoj kvaliteti DNA, za korak precipitacije može se koristiti alkoholna ili membranska metoda. Prva metoda bazira se na izmjeničnom ispiranju apsolutnim i 70 % alkoholom (različitih temperatura), a ponekad i na kratkoj inkubaciji na -20°C . Prikladna je za veliki broj uzoraka, prvenstveno onih gdje se očekuju dovoljne količine relativno očuvane DNA. Druga metoda, bazira se na ispiranju „DNA otopine”, nastale u fenol-kloroform fazi, kroz ultra-membranu. Promjer pora



SLIKA 4.16. Shematski prikaz fenol-kloroform izolacije DNA s primjenom ultra-membranskog sustava u fazi precipitacije i eluiranja izolirane DNA.

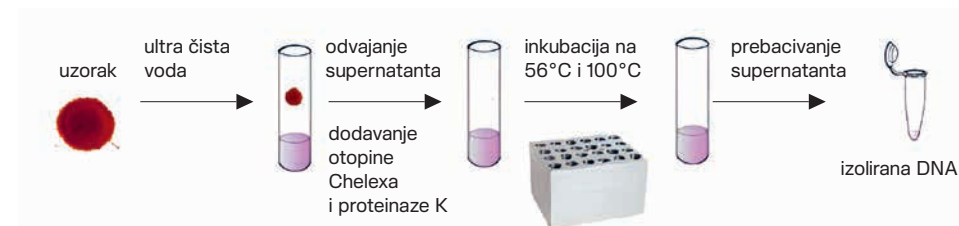
ove membrane je takav da na sebi zadržava DNA, a tekuća faza prolazi kroz nju. Nakon toga, dodaje se ili TE pufer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH = 8,0) ili ultra čista voda (bez DNA, DNaza, RNaza i proteaza, za molekularno-biološku primjenu) na suprotnu stranu membrane. Na taj način se DNA ispire u tubicu. Ova metoda koristi se relativno često u forenzičko-genetičkim laboratorijima jer daje dobre rezultate kod uzoraka koji sadrže male količine DNA.

Ipak, kao i svaka molekularno-genetička metoda i fenol-kloroform metoda izolacije DNA ima svoje nedostatke. Jedan od osnovnih nedostataka je da se radi o upotrebi izuzetno agresivnih kemikalija koje mogu negativno utjecati na zdravlje osobe koja ih često koristi. Naime, i fenol i kloroform, uz to što su izuzetno neugodnog i intenzivnog mirisa, potencijalni su mutageni, kancerogeni i teratogeni faktori koji mogu imati i kumulativni učinak. Stoga pohranjivanje ovih kemikalija zahtijeva posebne uvjete (posebni sigurnosni ormari za pohranjivanje s kontroliranim temperaturnim režimom i sustavom ventilacije), a smiju se upotrebljavati samo u posebnim laminarima ili digestorima sa sustavom cirkulacije zraka. Drugi nedostatak jest da je sam postupak relativno dugačak i najčešće zahtijeva korak inkubacije u trajanju od 6-8 sati, što značajno produljuje vrijeme potrebno za analizu DNA. Nadalje, postupak se odvija u više koraka u kojima se, najčešće, supernatant s DNA nastao prilikom centrifugiranja prebacuje u čiste tubice, te se prilikom tog transfera gubi određena količina izolirane DNA. Također, tijekom tog prebacivanja povećava se mogućnost laboratorijske pogreške koja može rezultirati eventualnom zamjenom uzoraka, posebno kad se istovremeno procesira veći broj tragova.

I uz navedene nedostatke, veliki broj laboratorija i dalje u svojim standardnim postupcima često koristi ovu metodu, koja je u području forenzičke genetike ipak u posljednje vrijeme potisnuta primjenom cjenovno pristupačnih i jednostavnih komercijalnih setova za izolaciju DNA.

4.4.2. Izolacija DNA Chelex® 100 metodom

Ovo je brza, jeftina i jednostavna metoda, vrlo učinkovita pri izolaciji visoko koncentrirane DNA iz uzoraka u kojima se ne očekuje prisutnost PCR inhibitora. Temelji se na zagrijavanju uzorka u prisutnosti komercijalne tvari pod nazivom Chelex® 100. Prvi put je proizvedena (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) i upotrijebljena 1991. godine i od tada je postala izuzetno popularna u forenzičkoj genetici (Walsh *et al.*, 1991). Chelex se sastoji od stiren-divinilbenzen kopolimera koji sadrže iminodiacetatne ione koji za sebe, po principu magnetnih sila, vežu različite polivalentne metalne ione, a među njima i Mg^{2+} . U sljedećem koraku eliminiraju se sve tvari vezane za Chelex® 100 i na taj način postiže se dvostruki učinak (slika 4.17.). S jedne strane, uklanjaju se ioni koji



SLIKA 4.17. Shematski prikaz Chelex® izolacije DNA.

mogu biti potencijalni inhibitori PCR reakcije (bakar, željezo itd.) a, s druge se uklanjaju i Mg^{2+} ioni čime je onemogućena aktivaciju DNA nukleaza, pa se time dodatno štiti izolirana DNA.

U većini protokola prethodno isprani uzorci (koristi se ultra čista voda), u koje je dodano 5-10 % otopine Chelexa® kratkotrajno se inkubiraju (maksimalno do 30 minuta) na temperaturi od 56°C s ciljem pospješivanja lize stanica. U ovom koraku često se dodaje i proteinaza K koja dodatno ubrzava taj proces. Nakon toga slijedi kratkotrajno (oko 10 minuta) izlaganje temperaturi od 100°C, čime se u potpunosti denaturira stanični lipoproteinski kompleks. U sljedećem koraku, uzorak se centrifugira i izdvaja se pročišćeni supernatant u kojem se nalazi izolirana, čista DNA koja je spremna za sljedeću fazu analize.

Osnovna prednost ove metode je da cijeli postupak traje samo jedan sat, sve se odvija u jednoj tubici, čime se bitno smanjuje mogućnost međusobne kontaminacije uzoraka, veoma je cjenovno pristupačna i ne koristi toksične kemikalije. Ipak, ova metoda nije najpogodnija za tragove koje karakterizira prisutnost većih količina PCR inhibitora.

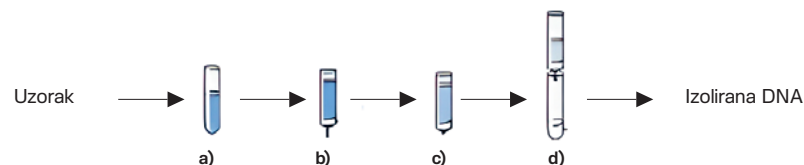
4.4.3. Izolacija DNA Qiagen metodom

Qiagen® sustav jedan je od najjednostavnijih setova za izolaciju DNA. Proizvodi se u više varijanti prilagođenih za različite vrste uzoraka. Izuzetno je uspješan u pročišćavanju genomske i mitohondrijske DNA iz količinski malih tragova. Metoda kombinira princip selektivnog vezivanja DNA molekule na silika membranu i ispiranja te membrane različitim puferima, prvo s ciljem pročišćavanja DNA molekula vezanih za membranu, a zatim i njihovog eluiranja u tubicu.

Qiagen metoda odvija se u četiri osnovna koraka (slika 4.18.):

- liza staničnog lipoproteinskog kompleksa i oslobađanje DNA, koja se postiže inkubacijom traga zajedno s enzimom proteinaza K na temperaturama od 56 i 70°C

- vezanje DNA molekula za silika membranu pod utjecajem centrifugalnih sila
- ispiranje kontaminirajućih tvari kombiniranim djelovanjem centrifugalnih sila i komercijalnih pufera za ispiranje
- eluiranje DNA molekula u čistu tubicu kombiniranim djelovanjem centrifugalne sile i komercijalnog pufera za eluiranje ili *ultra čiste* vode.



SLIKA 4.18. Četiri osnovna koraka Qiagen metode izolacije DNA: a) digestija, b) vezanje DNA za membranu, c) ispiranje, d) eluiranje DNA.

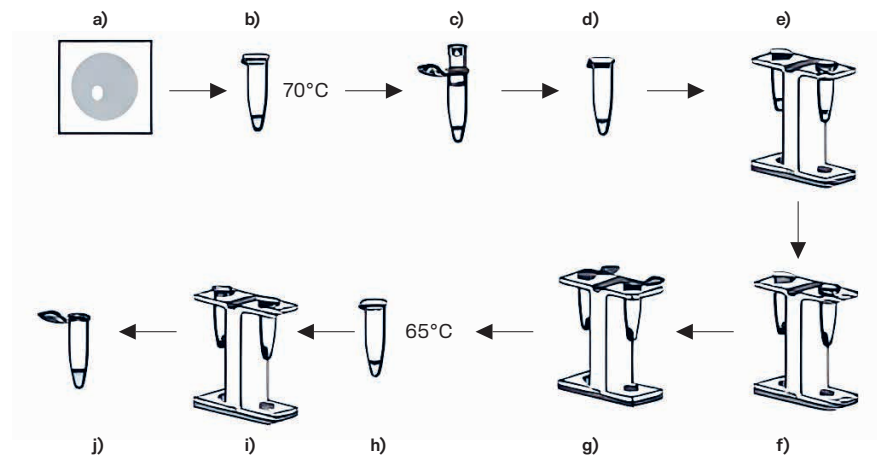
Uz svaki kupljeni set reagensa za izolaciju dolazi i knjižica postupaka optimiziranih za velik broj različitih vrsta uzoraka (puna krvi, krvne mrlje, opušci, dlake, tragovi sperme, kosti itd.). S druge strane, metoda je nešto duža u odnosu na Chelex i podrazumijeva promjenu tubica, što prilikom procesiranja velikog broja uzoraka i opadanja usredotočenosti DNA analitičara može povećati mogućnost međusobne kontaminacije. Uz razvoj setova za izolaciju DNA iz standardnih forenzičkih uzoraka tvrtka Qiagen istovremeno je radila na razvoju koncepta izolacije DNA i iz nešto neobičnijih i, za forenzičku analizu DNA, izuzetno zahtjevnih tragova. Tako su npr. razvili set optimiziran za izolaciju ukupne DNA prisutne u uzorku fecesa (stolice). Primjenom ovog seta (QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit), točnije dodatnim reagensima u obliku tablete (InhibitEX tablete) i nešto izmijenjenim digestivnim puferom u prvom koraku digestije, uspješno se adsorbiraju tvari prisutne u fecesu koje inhibiraju PCR fazu i tvari koje dodatno degradiraju prisutni genetički materijal. Ostatak postupaka sličan je standardnom Qiagen postupku izolacije (slika 4.19.).

Prema informacijama dostupnim na svojoj mrežnoj stranici, Qiagen trenutno nudi više od stotinu različitih setova za izolaciju DNA, uključujući setova za različite vrste DNA (kromosomska, plazmidna DNA), organizama (bakterijska, biljna, životinjska), vrsta uzoraka (krv, tkivo) te veličine (poput seta za izolaciju fragmenata dužine nekoliko tisuća parova baza iz prethodno pripremljenih gelova. Također, Qiagen je većinu svojih setova za izolaciju modificirao na način da se mogu upotrijebiti u procesu automatske izolacije DNA, o kojoj će biti više riječi u šestom poglavlju.¹

¹ Informacije preuzete s Qiagen-ove web stranice na <https://www.qiagen.com/us/product-categories/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/page-2>, pristup 5.8.2024. godine.



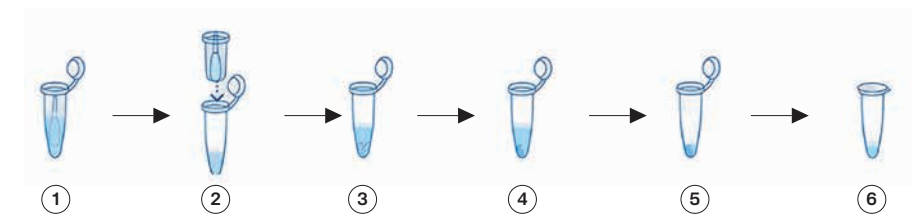
SLIKA 4.19. Qiagen metoda izolacije DNA iz uzorka fecesa: a) liza u ASL puferu s adsorpcijskim reagensima, b) uklanjanje inhibitora, c) digestija, d) vezanje DNA za membranu, e) ispiranje, f) eluiranje genomske DNA.



SLIKA 4.20. Shematski prikaz metode DNA izolacije primjenom sustava Promega DNA IQ™. Dio forenzičkog traga izdvoji se i prebaci u plastičnu tubicu (a) u koju se doda pufer za liziranje i sve zajedno se inkubira na 70°C u trajanju od 30 minuta (b). Nakon inkubacije, cijeli volumen reakcije prebaci se u IQ kolonicu i kratko centrifugira (c), nakon čega se kolonica odstrani i dodaju se paramagnetne čestice te se kratko inkubira na sobnoj temperaturi (d). U sljedećoj fazi, tubica se vorteksira i postavi na magnetni stalak te se oprezno ukloni tekućina bez dodirivanja odvojenih magnetnih čestica (e). Čestice se ispiru jednom puferom za liziranje i tri puta puferom za ispiranje koji se pažljivo odstrani. Poslije ispiranja, tubice se ostave otvorene da se čestice osuše (g), a nakon toga se doda pufer za eluiranje DNA i sve se inkubira na 65°C u trajanju od 5 minuta (h). Na kraju se uzorak vorteksira i stavi na magnetni stalak (i), pažljivo se pipetom odstrani tekućina u kojoj se nalazi DNA i prebaci u čistu tubicu (j).

4.4.4. Promega DNA IQ™ System

Ovaj set za izolaciju DNA dizajniran je isključivo za upotrebu u forenzičkoj analizi DNA i posebno je prilagođen procesu testiranja očinstva, a izolirana DNA je prikladna za upotrebu u svrhu STR profiliranja. Temelji se na magnetnoj separaciji, tj. kombiniranoj upotrebi različitih reagensa i paramagnetnih čestica kojima se uklanjaju PCR inhibitori (slika 4.20.) (Mandrekar *et al.*, 2001). Primjenjuje se na širokom spektru tragova od različitih tipova mrlja, opušaka, dlaka, preko tekućih uzoraka, pa čak i skeletnih ostataka. Kod pojedinih tragova koje karakterizira prisutnost malih količina degradirane DNA (npr. dlaka, kontakti uzorci) prije primjene samog postupka potreban je predtretman inkubacije s proteinazom K. U svojoj posljednjoj verziji ovaj set je optimiziran za upotrebu na automatskim robotskim sustavima za izolaciju DNA Biomek® 4000 (Beckman Coulter), Freedom EVO (Tecan) i MicroLab STAR (Hamilton), o kojima će biti više riječi u poglavlju 6.



SLIKA 4.21. Postupak izolacije DNA korištenjem PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit odvija se u šest faza: 1) liza biološkog traga; 2) uklanjanje supstrata; 3) vezanje DNA za magnetne čestice; 4) ispiranje PCR inhibitora; 5-6) eluiranje DNA i transfer u čistu tubicu.

4.4.5. PrepFiler™ Forensic DNA Extraction Kit

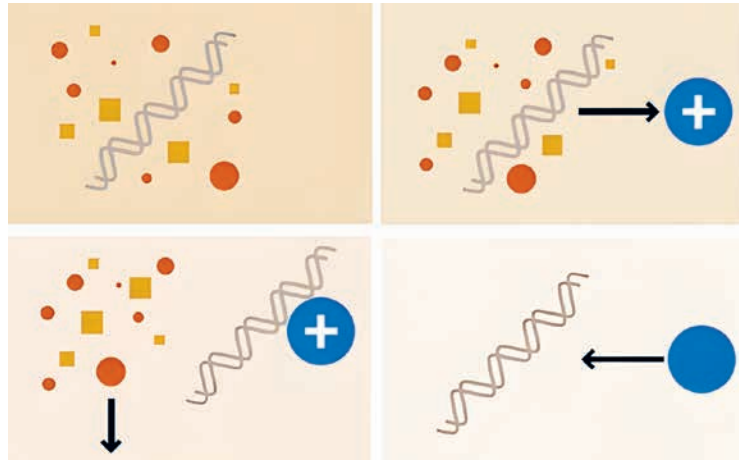
Ovaj set za izolaciju DNA tvrtke Applied Biosystems optimiziran je za upotrebu u forenzičkoj analizi DNA i za testiranje očinstva. Temelji se na korištenju magnetnih čestica, tj. kombiniranoj upotrebi različitih reagensa i magnetnih čestica koje vežu DNA, dok se ispiranjem uklanjaju PCR inhibitori. Na kraju se izolirana DNA eluira s magnetnih čestica (slika 4.21.). Primjenjuje se na širokom spektru tragova, no aktualna verzija nije optimizirana za primjenu na velikom broju uzoraka.

4.4.6. Invitrogen ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit

Tvrtka Invitrogen (koja je trenutno dio grupacije Thermo Fisher) također je proizvela sustav za uspješnu izolaciju DNA iz velikog broja različitih uzoraka. Naime, ChargeSwitch® tehnologija zasniva se na upotrebi magnetnih kuglica čiji se ionski afinitet mijenja ovisno o pH pufera u kojem su kuglice uronjene (slika 4.22.). Ako je pH nizak, CST® kuglice su pozitivno nabijene i privlače sve negativno nabijene tvari (prvenstveno DNA). U tom slučaju, proteini i druge kontaminirajuće tvari ne vežu se za kuglice i uklanjaju se ispiranjem. Upotrebom pufera za eluiranje s niskim udjelom soli pH se podiže na 8,5 čime se neutralizira naboj na površini kuglica. Time se pročišćena DNA oslobađa u taj pufer i spremna je za daljnje primjene. Ovaj set za izolaciju dolazi u dvije varijante, jedna je za forenzičke uzorke, a druga za uzorke bukalne sluznice. Ova vrsta izolacije DNA prilagođena je i automatskom (robotskom) sustavu rada i to koristeći Hamilton MICROLAB® STARlet osmokanalni uređaj.

4.4.7. Ostale metode izolacije DNA

Postoji još velik broj drugih metoda izolacije DNA, kako onih koje se temelje na primjeni tipičnih laboratorijskih postupaka (isoljavanje, ispiranje), tako i onih



SLIKA 4.22. Osnovni princip Invitrogen ChargeSwitch® tehnologije: a) liza stanice uz dodavanje CST® kuglice; b) snižavanjem pH pufera ispod 6,5 kuglice postaju pozitivno nabijene i privlače negativno nabijenu DNA; c) ispiranjem uklanjaju se proteini i inhibitori; d) povećanjem pH pufera na oko 8,5 kuglice gube naboj i DNA se može eluirati.

temeljenih na upotrebi nekog od mnogobrojnih komercijalnih setova za izolaciju DNA.

Jedna od najjednostavnijih i najbržih je tzv. **metoda ispiranja**, koja se primjenjuje pri analizi nespornih tragova (bukalne sluznice ili krvne mrlje) prikupljenih na FTA™ kartici, a sastoji se od sukcesivnog ispiranja *DNA-free* vodom, centrifugiranja i trešnje izdvojenih dijelova kartice. Inače, FTA™ papir promoviran je krajem 80-tih godina prošlog stoljeća i nastao je kao rezultat istraživanja stručnjaka iz Australije (Flinders University, Australija) (Burgoyne *et al.*, 1994). Ovaj tip papira predviđen je za dugoročno pohranjivanje uzoraka poput krvnih mrlja ili čak uzoraka bukalne sluznice. Radi se o celuloznom proizvodu koji je tretiran kemikalijama koje imaju dvojako svojstvo: sprečavanje daljnje degradacije DNA i sprečavanje razvoja bakterija na papiru i uzorku. Upravo to tretiranje omogućilo je da se uzorci prikupljeni na ovom mediju mogu dugotrajno čuvati u standardnim uvjetima. Kada krvna mrlja dotakne FTA™ papir počinje liza stanica i DNA se veže za papirnatu matriks. Za izolaciju DNA iz ovog mediju koristi se jednostavan postupak koji se temelji samo na ispiranju ultra čistom vodom. U prvom koraku se sa isječaka papira trešnjom u vodi skidaju PCR inhibitori, da bi se u drugom koraku, koji se odvija pri povišenoj temperaturi, DNA eluirala i pripremila za daljnje faze analize. Isječci krvnih mrlja na FTA papiru mogu se uspješno procesirati i standardnim Chelex® protokolom za DNA izolaciju.

Jedna od važnih karakteristika ove izuzetno jeftine metode je njena masovna upotreba u automatiziranoj izolaciji DNA nespornih tragova (npr. u kreiranju DNA baze podataka). Ovakav pristup omogućava istovremeno procesiranje velikog broja uzoraka za uspješnu i brzu analizu tragova, prvenstveno onih koji se pohranjuju u nacionalne baze podataka. Jedan od ograničavajućih faktora u masovnoj automatiziranoj primjeni ove metode jest to što isječci pod utjecajem statičkog elektriciteta imaju tendenciju ispadanja iz plastičnih tubica tako da se povećava mogućnost međusobne kontaminacije (engl. *cross-contamination*).

Metoda isoljavanja zasnovana je na svojstvu proteina da su manje topivi pri većim koncentracijama soli što omogućava njihovu separaciju. Koncentracija soli potrebna da bi protein precipitirao iz otopine razlikuje se od proteina do proteina. Kako različiti proteini imaju različit sastav aminokiselina, različite molekule proteina precipitiraju pri različitim koncentracijama otopine soli. Neželjeni proteini mogu se ukloniti iz otopine isoljavanjem (engl. *salting-out*) ukoliko je topivost proteina pri različitim koncentracijama otopine soli poznata. Nakon uklanjanja precipitata filtracijom ili centrifugiranjem, željeni protein može se precipitirati postizanjem koncentracije soli na razinu na kojoj željeni protein postaje netopiv.

Metoda isoljavanja po Milleru (Miller *et al.*, 1988) najčešće je korištena, a uključuje isoljavanje staničnih proteina postiže se dehidriranjem i precipitiranjem zasićenom otopinom NaCl. Kad se u otopinu doda visoka koncentracija soli, ioni soli privlače molekule vode, smanjujući broj molekula vode dostupnih za interakciju s nabijenim dijelovima proteina. To rezultira pojačanim interakcijama između proteina i njihovim nakupljanjem. Nakon centrifugiranja precipitirani proteini ostaju u talogu, a supernatant s DNA prebacuje se u čistu tubicu te precipitira dodavanjem apsolutnog etanola. Precipitirana DNA prebacuje se u čistu tubicu i otopi u TE puferu. Količina DNA izolirane ovom metodom usporediva je s količinom dobivenom fenol-kloroform ekstrakcijom. Prednosti protokola isoljavanja proteina su da DNA visoke molekularne težine može biti kvalitetno pripremljena bez toksičnih organskih otapala. DNA je također dovoljno stabilna za čuvanje u zamrzivaču duže razdoblje, bez znatne daljnje degradacije. S druge strane, ovaj protokol nešto je duži te produljuje samu analizu i može se primjenjivati za uzorke bukalne sluznice, žvakaće gume, opušaka te sve tragove pljuvačke koji sadrže veće količine DNA. Nije pretjerano pogodan za tragove koje treba temeljito pročistiti od prirodno ili umjetno prisutnih inhibitora.

Diferencijalna izolacija metoda je koja se temelji na modificiranom fenol-kloroform protokolu (Butler, 2005), a omogućava selektivnu lizu i izolaciju DNA iz smjese spermatozoida i epitelnih stanica. Veliki broj tragova pronađen u slučajevima silovanja predstavlja smjesu tragova napadača i žrtve (vaginalni bris, analni bris,

tragovi sperme na tijelu žrtve...). Primjenom standardnih protokola u analizi ovih tragova dobivaju se tzv. miješani profili (o kojima će biti više riječi u slijedećim poglavljima), koji su relativno neprikladni za statističku interpretaciju na sudu. Stoga je razvijena metoda koja se nakon prvog zajedničkog koraka usmjerava u pravcu razdvajanja muške (sperma) i ženske (drugi materijal) frakcije u procesiranoj smjesi tragova. U prvoj fazi centrifugiranjem se odvaja ženska frakcija. Supernatant sadrži DNA iz ženskih epitelnih stanica ili muških stanica koje nisu spermiji, a muška faza iz traga sperme dobiva se daljnjom inkubacijom preostalog taloga u kojem se nalaze spermiji. Oni se uz standardni digestivni pufer i proteinazu K dodatno tretiraju ditiotreitolum (DTT) koji prekida disulfidne veze u proteinskom dijelu nuklearne membrane spermija. Postupak relativno uspješno razdvaja ove dvije frakcije, ali često se u pojedinim tragovima, a zbog izuzetne dominacije ženske frakcije, njen DNA profil može pojaviti i kontaminirati DNA muški profil i u frakciji sperme. Sam je postupak relativno složen, traje duže od ostalih metoda i zahtijeva izuzetnu stručnost i sposobnost osobe koja je primjenjuje.

4.5. METODE KVANTIFIKACIJE DNA

Rezultat analize DNA uvelike ovisi o njezinoj kvaliteti i količini, tj. o njenoj prisutnosti u tragu. U procesu forenzičko-genetičke analize DNA glavna faza je PCR. Budući da je za optimizaciju PCR metode potrebna točno određena količina izolirane DNA, iznimno je važno metodama kvantifikacije utvrditi njenu pravu količinu, ali i porijeklo, tj. ima li je dovoljno, u kakvom je stanju i potječe li izolirana DNA iz ljudskog izvora. Isto tako, jedan od ključnih parametara za uspješan rad PCR metode je čistoća uzorka. Naime, uzorci koji stižu na obradu često su kontaminirani bakterijskom DNA ili sadrže veće količine inhibitora PCR reakcija.

4.5.1. Spektrofotometrijsko određivanje količine DNA u uzorku

Spektrofotometrijsko određivanje količine DNA temelji se na mjerenju transmisije svjetla kroz tekućinu pri valnim dužinama najčešće u intervalu od 220 do 300 nm na temelju čega se može utvrditi približna koncentracija postojeće DNA, ali i drugih primjesa u uzorku. DNA molekula bilježi maksimalnu absorbanciju na valnoj duljini od 260 nm, za razliku od ugljikohidrata, koji to rade na 230 nm te proteina s maksimalnom absorbancijom na 280 nm (Primorac *et al.*, 2008). Mjerenje se odvija na nekom od dostupnih uređaja tako da se uzorak stavi u specifičnu, čistu staklenu kivetu i uspoređuje se (ručno ili automatski) s rezultatima koje je uređaj utvrdio za odabrane standarde. Danas postoji veliki broj spektrofotometrijskih uređaja, čija je upotreba izuzetno ubrzana i pojednostavljena (slika 4.23.).



SLIKA 4.23. Spektrofotometrijski uređaj Genova Life Science Analyser – jedan je od uobičajenih sustava koji se koriste u spektrofotometrijskoj analizi DNA, RNK i proteina (preuzeto i prilagođeno s https://www.thomassci.com/Instruments/Spectrophotometers/_/GENOVA-LIFE-SCIENCE-ANALYZER, pristup 7.8.2024.).



SLIKA 4.24. BioSpec-nano tvrtke Shimadzu jedan je od najpoznatijih spektrofotometara kojemu je za kvantifikaciju dostatna kap DNA izolata (preuzeto i prilagođeno s <https://ssi.shimadzu.com/products/uv-vis/uv-vis-nir-spectroscopy/biospec-nano/index.html>, pristup 7.8.2024.).

Ova metoda široko je zastupljena u molekularnoj biologiji, posebno u znanstvenim studijama koje se temelje na obradi referentnih uzoraka krvi s velikim količinama prisutne DNA. Ograničena mogućnost analize malih količina DNA, neselektivnost ove metode tj. činjenica da se na ovaj način bilježi ukupno prisutna DNA bez obzira na njeno porijeklo te „lažno pojačavanje” rezultata pojedinim tvarima (npr. kiselinom koja se često javlja u analizi koštanih uzoraka kao posljedica njene apsorpcije iz tla), određuje je kao izuzetno neprikladnu u procesu forenzičke analize DNA.

Neki od nedostataka ove metode nadvladani su upotrebom novijih uređaja temeljenih na spektrofotometriji ili fluorometriji. Jedan od njih je NanoDrop spektrofotometar, koji danas proizvodi više tvrtki diljem svijeta, a koji koristi isti princip, odnosno apsorpciju svjetla iz UV spektra, ali bez upotrebe kiveta i razrjeđivanja uzorka. Nanosi se 1-2 μ l nerazrijeđenog uzorka, a rezultati se generiraju automatski tako da daju točne absorbancije i njihove odnose koji se koriste da se odredi koncentracija i čistoća uzorka (slika 4.24.).

Fluorometri su uređaji koji se koriste za mjerenje parametara fluorescencije vidljivog dijela spektra, odnosno intenziteta i valne duljine emitiranog spektra nakon ekscitacije uzorka određenim dijelom spektra. Na temelju ovog rezultata moguće je odrediti vrstu uzorka ili, u slučaju analize DNA kada je vrsta uzorka već poznata, koncentraciju i kvalitetu uzorka prije daljnje analize (slika 4.25.). Ovi uređaji danas također koriste minimalnu količinu nerazrijeđenoga uzorka kojeg je potrebno prethodno fluorescentno označiti korištenjem određenih reagensa iz komercijalno dostupnog seta. Rezultati mjerenja dostupni su kroz par sekundi.

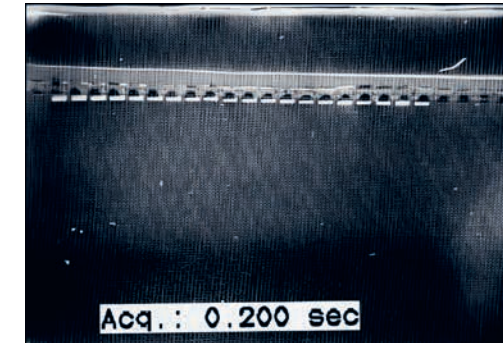


SLIKA 4.25. Qubit™ 3 Fluorometer proizvođača Invitrogen jedan je od popularnijih uređaja na tržištu. Osim jednostavne upotrebe, karakteriziraju ga male dimenzije i lakoća prenošenja u slučaju potrebe (preuzeto i prilagođeno s <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/qubit-3-0-fluorometer/15387293>, pristup 7.8.2024.).

4.5.2. Vizualizacija DNA metodom agarozne gel elektroforeze

S ciljem preliminarne detekcije i kvantifikacije DNA prisutne u ispitivanom uzorku, može se koristiti i vizualizacija na agaroznom gelu kao izuzetno jednostavna i brza metoda (slika 4-26). Gel elektroforeza predstavlja skup tehnika koje se primjenjuju za separaciju bioloških molekula, na temelju njihovih fizičkih osobina, kao što su veličina ili izoelektrična točka molekule. Najčešće se primjenjuje u analitičke svrhe, za separaciju i analizu DNA fragmenata različite veličine. Snaga električnog polja potiče migraciju fragmenata DNA kroz gel koji je zapravo porozni matriks koji svojom konstitucijom omogućava razdvajanje tih fragmenata. U većini slučajeva, gel predstavlja umreženi polimer čija kompozicija i poroznost omogućavaju separaciju fragmenata pod utjecajem električnog polja. Molekule DNA putuju prema pozitivnoj elektrodi (anodi) zbog negativnog naboja koji prirodno nose. Fragmenti veće molekularne mase kroz gel migriraju sporije dok fragmenti manje molekularne mase migriraju brže, što je osnovna ideja ove metode.

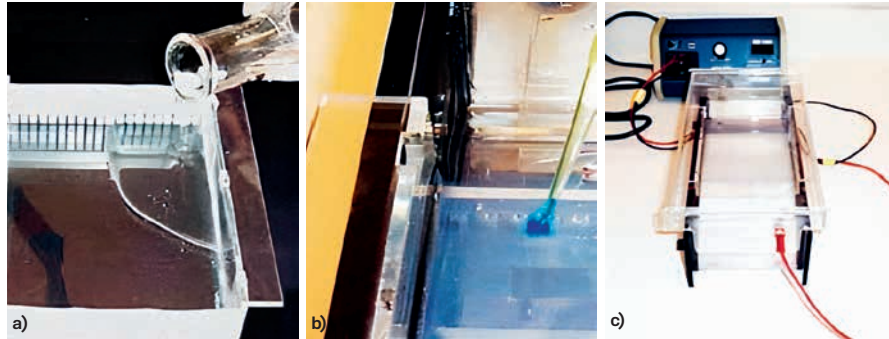
Nakon završene elektroforeze, razdvojeni DNA fragmenti mogu se vizualizirati primjenom fluorescentnih boja ili boja koje vizualiziraju DNA na vidljivom svjetlu, kao što su etidij-bromid (koji se danas rijetko upotrebljava jer je mutagen i kancerogen pa se danas češće upotrebljavaju alternative kao što je SYBR green), odnosno Coomassie Brilliant Blue (slika 4.26.). Njihova veličina izražava se u baznim parovima (bp), kilobazama (kb) ili nukleotidima, ovisno o tome nalazi li se na gelu jednolančana ili dvolančana DNA molekula, a određuje se usporedbom uzorka s markerom molekularne mase (DNA ljestvica) koji sadrži fragmente DNA poznate veličine i služi kao referentni sustav.



SLIKA 4.26. Rezultati kvantitativne analize DNA dobivene organskom ekstrakcijom iz tragova pune krvi.

Različiti su tipovi gelova koji se koriste za elektroforezu DNA. Najčešće su primjenjivani agarozni gel za razdvajanje velikih fragmenata DNA (do 50 000 bp) te poliakrilamidni gel za razdvajanje manjih fragmenata. U forenzičko-genetičkoj praksi u procesu analize uspješnosti procesa DNA ekstrakcije znatno se češće koristi horizontalna agarozna gel elektroforeza, dok se vertikalna poliakrilamidna elektroforeza primarno koristi u procesu detekcije rezultata PCR-a.

Laboratorijska agarozna prirodni je polimer izoliran iz morskih algi koji se koristi za pripremanje širokog spektra gelova za razdvajanje i vizualizaciju DNA. Promjer pora koje se javljaju u agaroznom gelu iznosi oko 200 nm. Agarozni gel jednostavno se priprema miješanjem i zagrijavanjem određene količine agaroze u prahu s određenom količinom elektroforetskog pufera (slika 4.27.). Najčešći elektroforetski pufer koji se koristi u pripremanju gela, a zatim i u procesu elektroforeze jest Tris-borat-EDTA (TBE). Nakon djelomičnog hlađenja gela u njega se dodaje boja kojom se vizualizira DNA (većina laboratorija je ranije u tu svrhu koristila etidij-bromid, dok se danas češće koriste druge fluorescentne ili boje za vizualizaciju pod dnevnim svjetlom, koje su potencijalno manje opasne po zdravlje), iako se ona može naknadno dodati i u pufer. Gel se zatim izlijeva u za to predviđene i pripremljene posude („kadicе”) koje mogu biti različitih dimenzija i postavljaju se „češljici” koji služe za formiranje jažica. Nakon potpunog hlađenja gela i polimerizacije agaroze, u jažice se stavljaju uzorci pomiješani s puferom (engl. *loading dye buffer, LDB*), koji sadrži boju (bromofenol plava) radi vizualnog praćenja migracije uzoraka kroz gel tijekom elektroforeze te glicerol koji olakšava nanošenje uzoraka u jažice jer povećava njihovu težinu. Uz uzorke na gelu se obavezno mora nalaziti i već spomenuti referentni marker, koji služi za određivanje veličine detektiranih DNA fragmenata.



SLIKA 4.27. Postupak postavljanja agarozne gel elektroforeze: a) pripremanje agaroznog gela u kadici, b) nanošenje uzoraka u jažice na gelu, c) postavljanje gela u zatvoreni strujni krug.

Važna činjenica na koju se mora obratiti pozornost prilikom pripremanja gela je koncentracija agaroze u gelu. Ona je uvjetovana veličinom fragmenata koji se apliciraju na gel, pa sukladno tome, možemo razlikovati 0,4% gel za razdvajanje DNA fragmenata u rasponu veličina 2000-30 000 bp, 0,75% za 1000-15 000 bp, 1,00% za 500-10 000 bp i 2,00% za 100-2 500 bp. Odgovarajuće koncentracije agaroze u gelu u skladu s veličinom fragmenata DNA koja se aplicira na gel omogućavaju njihovu dobru rezoluciju. Odabir točne koncentracije može se razlikovati od okvirnih vrijednosti koje su ovdje navedene, ovisno o iskustvu osobe koja postavlja gel i uobičajene prakse laboratorija u kojem se provodi postupak.

Nakon elektroforeze, čija duljina može varirati od nekoliko minuta do nekoliko sati, gel se postavlja na UV transiluminator koji emitira UV svjetlosne valne duljine od 260 nm, kojom se detektira boja koja je interkalirana između lanaca ispitivanog DNA fragmenta. Na osnovu detektiranih intenziteta svjetlosti pojedinih vrpca (engl. *bands*) i usporedbe sa standardom, dobivaju se aproksimativni rezultati o količini prisutne DNA u uzorku.

Prednosti ove metode svakako su jednostavnost i brzina. No s druge strane, ova metoda uglavnom nije precizna i samo okvirno može pomoći u određivanju raspoložive DNA izdvojene iz nekog uzorka (Primorac *et al.*, 2008). Ona ne pruža informacije o tome radi li se o ljudskoj ili nekoj drugoj (mikrobnoj, životinjskoj i sl.) DNA. Također, metoda utvrđivanja intenziteta, posebno u laboratorijima koji ne koriste specijalizirane softvere za ovaj korak, može biti izuzetno subjektivna, a samim time i neprecizna te ne pruža nikakvu predodžbu o potencijalno prisutnim PCR inhibitorima i nije dovoljno osjetljiva. Često se zna dogoditi da se u uzorcima u kojima ovom metodom nije detektirana prisutnost DNA daljnjim procesiranjem dobiju odlični i čisti DNA profili.

4.5.3. Kvantifikacija DNA metodom hibridizacije

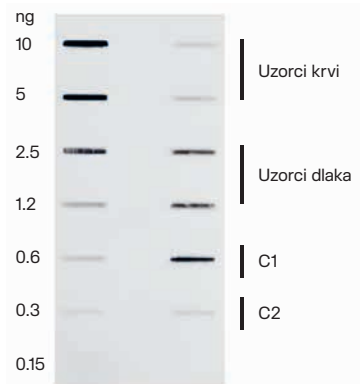
Donedavno, jedna od najraširenijih metoda kvantificiranja izolirane DNA u forenzičkoj genetici bila je komercijalna metoda koja se temelji na hibridizaciji DNA iz biološkog traga tj. uzorka s probom (DNA fragment poznate sekvence obilježen izotopom, biotinom ili fluorescentnom bojom) na nitroceluloznoj ili najlonskoj membrani. Ovom se metodom mogu utvrditi iznimno male količine DNA. Izdvojena iz uzorka prvo se nanosi i imobilizira na membrani, te se nakon toga veže s komplementarnom DNA probom dužine oko 40 bp specifičnom za ljudsku DNA, ali i za DNA viših primata (čimpanzi i gorila). Dobiveni rezultati uspoređuju se s pozitivnom kontrolom za koju postoje poznate koncentracije DNA.

4.5.3.1. QuantiBlot Human DNA Quantitation Kit

Jedan od najčešće korištenih komercijalnih setova za kvantifikaciju DNA iz forenzičkih tragova metodom hibridizacije je QuantiBlot® Human DNA Quantitation Kit (Applied Biosystems). Temelji se na hibridizacijskoj probi (sekvenci) komplementarnoj s primat-specifičnom alfa-satelitnom sekvencom 17. ljudskog kromosoma, lociranoj na lokusu D17Z1. Izuzetno je osjetljiv i uspješno detektira količine DNA i do 150 pg (pikogram = 10^{-12} grama).

Sam postupak odvija se u nekoliko koraka. U prvom koraku nanošenja, uzorak se miješa s otopinom za nanošenje uzorka te se pod djelovanjem vakuumske sila snažno veže za najlonsku membranu. Ovaj korak se odvija pomoću hibridizacijskog bloka. Nakon toga slijedi predhibridizacija u kojoj se membrana tretira hibridizacijskom otopinom uz trešnju na temperaturi od 50°C. Slijedi faza hibridizacije tijekom koje se dodaje proba D17Z1 i membrana se i dalje inkubira na 50°C, a zatim se ispiri otopinom. U sljedećem koraku ispiranja nastavlja se započeti postupak da bi se nakon toga pristupilo samoj detekciji rezultata, što podrazumijeva sukcesivno višestruko bojenje i ispiranje membrane, nakon čega se očitavaju rezultati. Detekcija se vrši metodom kemiluminiscencije ili kolorimetrijom, a sama detekcija temelji se na komparativnoj analizi intenziteta obojenja tretiranih uzoraka i standarda DNA poznate koncentracije (od 0,15 do 10 ng/5 ul), na temelju čega se vrši procjena koncentracije DNA u analiziranim uzorcima (slika 4.28.).

Ipak, sam proces je kompleksan, oduzima mnogo vremena i traži maksimalnu koncentraciju i pažljivost analitičara koji ga provodi. Također, dokazano je da ponekad uzorci koji su negativno reagirali u ovom tipu kvantifikacije budu naknadno uspješno analizirani. Ta činjenica sugerira da je kvantifikacija primarno potrebna zbog optimizacije koncentracije DNA za PCR reakciju, a ne odlučivanja o nastavku ili terminaciji samog procesa.



SLIKA 4.28. Shematski prikaz modela očitavanja rezultata kvantifikacije primjenom QuantiBlot® Human DNA Quantitation kita. U prvom stupcu različita su razrijeđenja DNA standarda poznate koncentracije prema kojima se radi vizualna usporedba uzoraka kako bi se odredila njihova koncentracija. C1 i C2 predstavljaju kontrolne uzorke poznate koncentracije (kalibratori) i to C1 = 3,5 ng/ 5 µl (0,7 ng/µl), C2 = 0,5 ng/5 µl (0,1 ng/µl). Utvrđena koncentracija uzoraka krvi je 1.2 ng/5 µl (0.24 ng/µl), a dlaka 2.5 ng/2 µL (1.25 ng/µl).

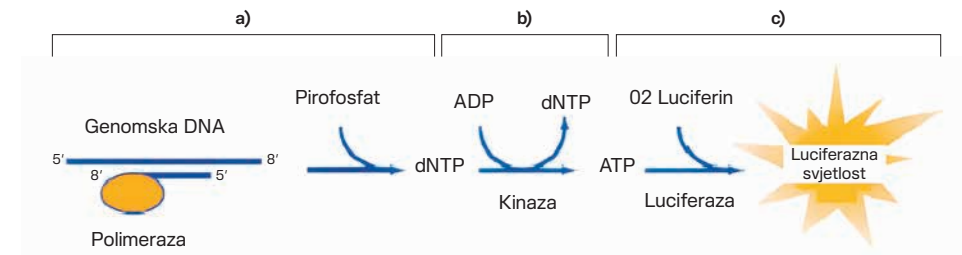
4.5.3.2. AluQuant™ Human DNA Quantitation System

Ova se metoda koristi za utvrđivanje koncentracije DNA prije same PCR reakcije. Za razliku od prethodne ne zahtijeva poseban korak imobiliziranja uzorka i hibridizacije na membrani, kao ni dodatnog ispiranja. Posebno napravljene probe vežu se na visokoponavljajuće *Alu* sekvence (500 000 do 1 000 000 kopija) specifične za ljudsku DNA, ali nakon što se DNA denaturira. Temelji se na vizualnom mjerenju količine adenosin trifosfata (engl. *adenosine triphosphate*, *ATP*) nastalog nakon niza enzimskih reakcija. Količina ATP-a koja ovisi o količini prisutne DNA.

Prva enzimska reakcija je pirofosforilacija u kojoj se nastali pirofosfat koristi za stvaranje deoksinukleozid trifosfata (engl. *deoxynucleoside triphosphate*, *dNTP*). dNTP se koristi za stvaranje ATP pomoću enzima kinaze i dodatnih molekula ADP-a. U drugoj reakciji, luciferaza koristi ATP za stvaranje proporcionalne i mjerljive količine svjetlosti (slika 4.29.). Dakle, količina DNA utvrđuje se indirektno (luminometrom) preko izmjerene količine svjetlosti koja nastaje oslobađanjem iz energijom bogatih spojeva. Za kvantifikaciju prisutne DNA neophodno je uvijek u analizi koristiti i standarde s poznatim koncentracijama DNA. Apsolutna količina DNA u testnom uzorku uspoređuje se sa svjetlosnim signalom izmjerenim iz standarda. Ovom se metodom uspješno može utvrditi koncentracija DNA koja iznosi od 0.02 ng/µl nadalje. Iako veoma efikasna i jednostavna, ova metoda nije naišla na širu primjenu, vjerojatno uslijed brzog razvoja izuzetno senzitivnih, jednostavnih i pouzdanih rtPCR kvantifikacijskih kitova, o kojima će detaljnije biti riječ u nastavku ovog poglavlja.

4.5.4. qPCR kvantifikacija

Upotrebom kvantitativne PCR reakcije u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real-time PCR*, qPCR), uspješno se kvantificira ljudska DNA, a ujedno je moguće



SLIKA 4.29. Shematski prikaz AluQuant™ principa: a) pirofosforilacija, b) stvaranje ATP-a, c) mjerenje količine oslobođenog ATP-a mjerenjem svjetlosti nastale aktivnošću enzima luciferaze.

odrediti prisutnost inhibitora i stupanj inhibicije. Princip mjerenja zasniva se na detekciji i kvantifikaciji fluorescencije koja je proporcionalna broju kopija PCR produkta tijekom eksponencijalne faze same reakcije (Primorac *et al.*, 2008). Ova metoda jednostavna je i relativno vremenski kratka, te je pronašla široku primjenu u forenzičkoj analizi DNA i u potpunosti potisnula ranije korištene metode.

Trenutno je na tržištu dostupno više komercijalnih setova za qPCR, a najzastupljeniji su: Quantifiler™ Human DNA Identification Kit, Quantifiler™ Y Male Human DNA Identification Kit, Quantifiler™ Duo DNA Identification Kit, Quantifiler™ Trio DNA Identification Kit (svi od Applied Biosystems), kao i Plexor® HY System, PowerQuant® System (oba od Promega korporacije), Investigator Quantiplex Pro Kit i Investigator Quantiplex Pro FLX Kit (oba od Qiagen).

4.5.4.1. Quantifiler™ Trio DNA Identification Kit

Ovaj multipleks qPCR kit dizajniran je za istovremenu kvantifikaciju ukupne ljudske i muške ljudske DNA u analiziranom uzorku i u potpunosti je baziran na TaqMan tehnologiji. Izuzetno je osjetljiv i njime se mogu detektirati uzorci DNA koncentracije između 0,005 ng/µl do > 50 ng/µl.

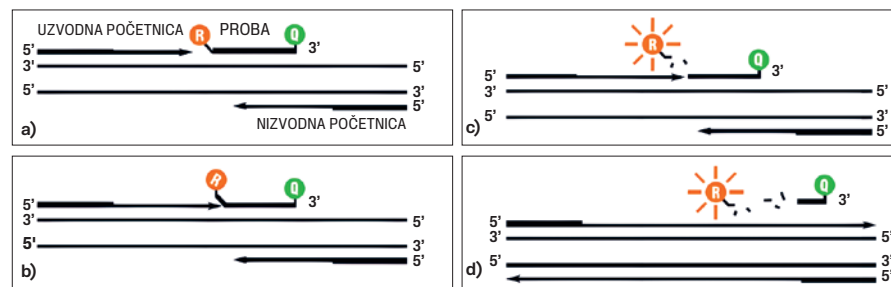
TaqMan™ tehnologija, poznata i pod sinonimom 5' nukleazni test (engl. *5' nuclease assay*) (Butler, 2005), zasniva se na specifičnim probama koje imaju visok afinitet za vezanje nakon denaturacije DNA molekule za jedan od lanaca. Probe su označene fluoroforom koji se služi kao indikator (engl. *reporter*) i molekulom koja služi kao prigušivač fluorescentnog signala (engl. *quencher*). Probe su ustvari sekvence koje hibridiziraju za točno određenu regiju DNA koja se nalazi između dvije prethodno definirane početnice. Uobičajeno je da same probe zahtijevaju nešto višu temperaturu vezivanja za DNA (engl. *annealing*) nego početnice tako da probe hibridiziraju kada je već započela polimerizacija tj produžavanje (engl. *extension*) početnica. Reporterska boja (engl. *reporter dye* – *R*) vezana je za 5'

kraj probe, dok je nefluorescirajuća „prigušujuća“ molekula (engl. *nonfluorescent quencher –NFQ*), vezana za njen 3' kraj. Kad je proba intaktna, R-boja se nalazi blizu Q-molekule te se pojavljuje izrazito mala (uglavnom nedetektibilna) ili nikakva fluorescencija R-boje uslijed supresije energetske transferom između R-boje i Q-molekule. Tijekom polimerizacije DNA, sintezom novog lanca NA polimeraza uklanjaju se sve probe koje su vezane za ciljnu sekvencu. Tom prilikom R-boja i Q-molekula prestaju biti u neposrednoj blizini zbog čega Q-molekula ne može više suprimirati R-boju te ona počinje fluorescirati. (slika 4.30.). Fluorescencija je proporcionalna s količinom DNA (Butler, 2005).

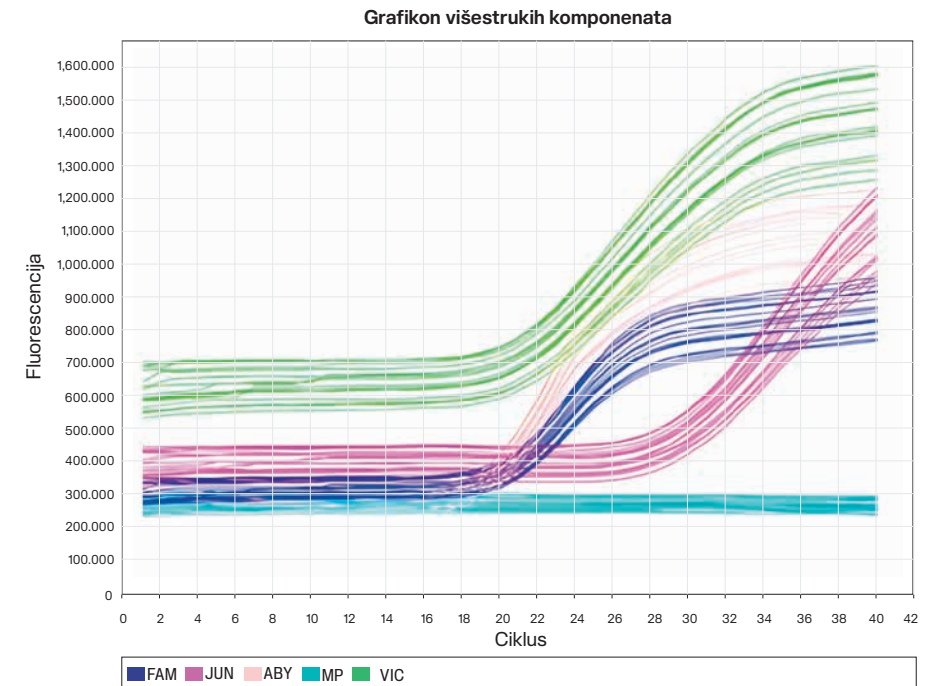
Ukupno detektirana količina DNA prati se kroz C_t parametar tj. prag ciklusa (engl. *cycle threshold*) koji se često označava i kao C_q . C_t predstavlja granicu detekcije fluorescencije tj. označava broj ciklusa u kojem počinje detekcija fluorescencije. Ako se za neki uzorak to dogodilo npr. u 32. ciklusu, to znači da on ima mnogo više DNA nego uzorak kod kojeg C_t iznosi 36.

Quantifiler™ Trio DNA Identification Kit koristi tri specifične ljudske regije kao ciljne sekvence, i to dvije autosomne (veliku – 214 bp – i malu – 80 bp – autosomnu ciljnu regiju) i treću ciljnu sekvencu za ljudsku mušku DNA (kromosom Y, 75 bp). Dizajn seta je takav da se može detektirati muška DNA čak i kad je njen udio u miješanom muško-ženskom uzorku minimalan (odnos 4000:1 u korist ženske DNA). Ovaj kit je specifičan za ljudsku i DNA drugih primata.

Prilikom postavljanja reakcije u svaki se uzorak dodaje i interna PCR kontrola (engl. *Internal PCR Control, IPC*), čijom se analizom mogu detektirati potencijalno prisutni PCR inhibitori. Naime, ako tijekom reakcije izostane amplifikacija i ciljanog fragmenta u uzorku i IPC-a, onda to automatski ne znači odsustvo DNA u analiziranom uzorku već, vjerojatnije, da su u uzorku prisutni inhibitori koji onemogućavaju uspješnu PCR reakciju.



SLIKA 4.30. Shematski prikaz TaqMan™ metode: a) R-boja (engl. reporter) i Q-molekula (engl. quencher) su vezani za 5' i 3' kraj TaqMan probe; b) dok je proba intaktna, R-boja je prigušena; c) tijekom svakog PCR ciklusa oslobađa se R-boja; d) jednom oslobođena R-boja emitira fluorescenciju.



SLIKA 4.31. Računalni prikaz podataka dobivenih primjenom Quantifiler™ Trio DNA Identification kita. Kako bi se rezultati različitih regija mogli razlikovati, probe koje se koriste za pojedine regije obilježene su različitim fluoroforima. Velika autosomna regija obilježava se sa ABY™, mala autosomna regija sa VIC™, Y regija sa FAM™, IPC sa JUN™, a pasivna referenca sa MP.

Kako bi se rezultati različitih regija mogli razlikovati, probe koje se koriste za pojedine regije obilježene su različitim fluoroforima. Velika autosomna regija obilježava se s ABY™, mala autosomna regija sa VIC™, Y regija sa FAM™, IPC sa JUN™, a pasivna referenca sa MP (slika 4.31.).

Ipak, i dalje veliki broj laboratorija koristi ili je godinama aktivno koristio starije Applied Biosystems setove za istu namjenu, posebno Quantifiler™ Human DNA Identification Kit i Quantifiler™ Y Male Human DNA Identification Kit. Prvi služi za kvantifikaciju ljudske DNA neovisno o spolu (proba je hTERT lokus koji proizvodi reverznu transkriptazu telomeraze) dok drugi određuje količinu isključivo za muške ljudske DNA uzorke, a proba je SRY lokus. Quantifiler™ Duo DNA Identification Kit koristi dvije specifične ljudske regije kao ciljne sekvence, i to RPPH1 (ribonukleaza P RNA komponentu H1) kao ciljnu sekvencu za ukupnu ljudsku DNA te SRY (spolno determinirajuća regija kromosoma Y) kao ciljnu sekvencu za ljudsku mušku DNA, a veličina ovih regija je 140 bp, odnosno 130

bp. Jedan od razloga zbog kojeg su ova dva starija seta za kvantifikaciju dugo bila u upotrebi je to što su osim za upotrebu na Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System uređaju bili optimizirani i za rad na nešto starijim uređajima ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System i Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System. Quantifiler™ Duo DNA Identification Kit, i Quantifiler™ Trio DNA Identification Kit su optimizirani za 7500 Real-Time PCR System. Za Quantifiler™ Trio DNA Identification Kit je također podržana i njegova upotreba na QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System uređaju.

4.5.4.2. Quantifiler™ HP (Human Plus) DNA Quantification Kit

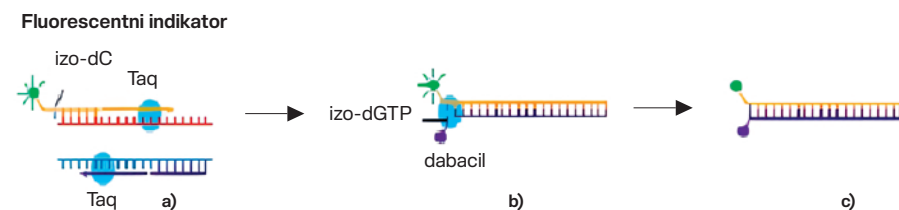
Ovaj set za kvantifikaciju vrlo je sličan prethodno predstavljenom Quantifiler™ Trio DNA Identification Kit-u, s glavnom razlikom da ne može razlikovati mušku DNA, odnosno nema ciljnu regiju na kromosomu Y.

Quantifiler™ HP DNA Quantification Kit jedan je od novijih i „pojačanih” Applied Biosystems setova, koji je trenutno među popularnijim metodama qPCR kvantifikacije DNA. Cjelokupan proces traje oko sat vremena, a test je veoma osjetljiv i funkcionalan na širokom rasponu mogućih DNA koncentracija (od 0,005 ng/μl do >50 ng/μl). Detekcija je specifična za DNA čovjeka i drugih primata, a ciljne regije su velika i mala autosomna regija, obje prisutne u više kopija na različitim kromosomima unutar genoma čovjeka. Korištenje IPC kontrole i pasivne reference omogućava pouzdane i reproducibilne rezultate, te istovremenu kvalitativnu i kvantitativnu analizu dostupnog uzorka DNA, čime se laboratorij adekvatno priprema za sljedeći korak, što je u forenzičkim laboratorijima gotovo uvijek STR profiliranje. Dodatna prednost je što funkcionira na različitim vrstama uzoraka, uključujući bris bukalne sluznice, krv, sperm, tkivo i druge.

4.5.4.3. Plexor® HY System

Plexor® HY System četverbojni je multipleks qPCR sustav koji se zasniva na simultanoj kvantifikaciji ukupne autosomne ljudske i muške humane DNA (D’Costa *et al.*, 2007). Za razliku od ranije opisanih setova, akumulacija amplifikiranog produkta mjeri se smanjivanjem fluorescencije, koja je proporcionalna količini PCR produkta (slika 4.32.).

Plava boja (fluorescein) koristi se za detekciju ukupne ljudske DNA, a ciljna sekvenca od 99 bp locirana je na kromosomu 17. Narančasta boja (CAL Fluor® Orange 560) služi za detekciju ljudske muške DNA, a ciljna sekvenca (133 bp) locirana je na kromosomu Y. Crvena boja (CAL Fluor® Red 610) koristi se za detekciju IPC, koja se dodaje u svaku reakciju, a služi za praćenje inhibicije amplifikacije. Ovaj amplifikirani produkt dug je 150 bp. Uz to, ovaj sustav koristi i „IC5



SLIKA 4.32. Shematski prikaz Plexor® qPCR procesa: a) vezanje i ekstenzija početnica; b) ugradnja dabcil-izo-dGTP; c) prigušivanje fluorescencije.

boju kao pasivnu referencu, koja je sastavni dio mješavine početnice/IPC, a služi za normalizaciju signala ostalih boja.

Plexor® tehnologija zasniva se na interakciji dva modificirana nukleotida. Naime, jedna PCR početnica posjeduje modificirani C nukleotid (iso-dC) koji je na svom 5' kraju fluorescentno označen. Druga PCR početnica je neoznačena. Reakcijski pufer sadrži deoksinukleotide i iso-dGTP modificiran s dabcilom, prigušivačem fluorescentnog signala. (engl. *quencher*) Dabcil-izo-dGTP se tijekom PCR-a ugrađuje nasuprot iso-dC ostatku fluorescentno obilježene početnice. Ugradnja dabcil-izo-dGTP na ovom mjestu rezultira prigušivanjem fluorescentne boje na komplementarnom lancu, a smanjenje fluorescencije omogućuje kvantifikaciju tijekom amplifikacije. Dakle, akumuliranje PCR produkta praćeno je smanjivanjem fluorescencije i na osnovu toga se određuje C_t uzorka.

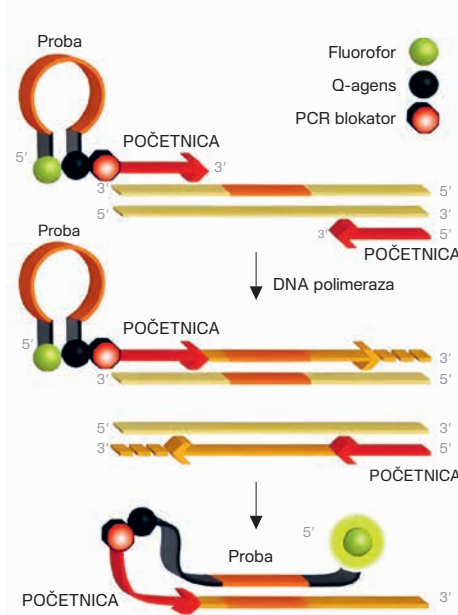
Detekcija rezultata također se temelji na analizi C_t parametra, samo za razliku od prethodno opisanog Quantifiler modela, detektira se opadanje signala, odnosno suprimiranje fluorescencije.

4.5.4.4. PowerQuant® System

Ovaj set za kvantifikaciju, također proizvod Promega korporacije, predstavlja unaprijeđenu verziju prethodnih Plexor® reagensa. Sustav se temelji na detekciji četiri regije, dvije autosomne i dvije Y vezane te koristi set od pet fluorescentnih boja. Na ovaj način omogućava se vrlo precizna kvantifikacija DNA, kao i diferencijacija ukupne ljudske i specifično muške ljudske DNA. Dodatna prednost je to što se set može koristiti na različitim *real-time* PCR uređajima. Osim izvrsne osjetljivosti od 0,5 pg/μl ljudske DNA, set je optimiziran za uspješnu detekciju PCR inhibitora što je važno jer njihova prisutnost može rezultirati dobivanjem lažno negativnih rezultata. Stoga se ovaj set prodaje pod sloganom „zero means zero”, odnosno, „nula znači nula”, tj. ukoliko nema amplifikacije, lako se može zaključiti je li to zbog prisutnih PCR inhibitora ili u uzorku zaista nema DNA.

4.5.4.5. Investigator® Quantiplex® Pro sustavi

U Investigator® Quantiplex® Pro sustave za qPCR pripadaju Quantiplex Pro Quantiplex Pro FLX i Quantiplex Pro RGQ. Koriste se za detekciju ljudske i muške DNA i paralelnu procjenu stupnja degradiranosti što je bitno za forenzičke uzorke. Međusobno se razlikuju u nekim karakteristikama, poput ciljanih regija, načina pripreme ili brzine izvođenja reakcije. Investigator Quantiplex Pro Kit i Quantiplex Pro Quantiplex Pro FLX razlikuju se samo u maksimalnom volumenu DNA u reakciji (maksimalni volumen DNA za prvi kit je 2 µl, a FLX verzija ima mogućnost volumena 2-18 µl DNA). Oba seta prikladna su u analizi STR i SNP biljega. Koriste tri ciljne regije u genomu čovjeka, i to malu autosomnu od 91 bp, veliku autosomnu od 353 bp i Y vezanu (81 bp) za diferencijaciju muške i ženske frakcije, čak i u odnosima od 1:400 000. Investigator Quantiplex ProRGQ Kit veoma je sličan jer ima istu malu i veliku ciljnu regiju autosoma razlika je što sa Y također ima 2 ciljne regije - malu od 81 i veliku od 359 bp. S obzirom da su setovi posebno uspješni u detekciji degradiranosti DNA uzorka, nameću se također kao metoda kvantifikacije idealna za primjenu u antropologiji i arheologiji (analiza posmrtnih ostataka nestalih osoba, analize masovnih nesreća, prirodnih nepogoda ili analiza arheoloških uzoraka).



SLIKA 4.33. Shematski prikaz primjene modela „škorpionske početnice” u kvantifikaciji humane DNA

Sam sustav detekcije se zasniva na inoviranom pristupu, upotrebom tzv. „škorpionskog modela” početnica i brzog PCR-a (engl. *fast PCR*). Naime, „škorpion početnice” su bifunkcionalni molekularni sustavi koji su kovalentno vezani za probu. Fluorofore i „prigušivač” (engl. *quencher*) su također vezani za probu i Q-agens je u interakciji sa fluoroforom i suprimira fluorescenciju. Tokom PCR-a, kada se proba veže za ciljani region DNA, fluorofor i Q-agens se oslobađaju, prestaje suprimacija Q agensa i javlja se fluorescencija koja se detektuje (slika 4.33.).

4.6. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction, PCR*) je metoda koja je izazvala revoluciju na polju molekularne genetike i biologije uopće. Polazna količina DNA, koja je desetljećima predstavljala ograničavajući faktor u molekularno-genetičkim istraživanjima, ovom je metodom svedena na potrebu prisutnosti samo jedne dobro očuvane molekule, a mukotrni postupci izolacije DNA i iščitavanja dijelova genoma postali su jednostavniji. Za ovakav znanstveni napredak zaslužni su Kary Mullis i njegovi tadašnji suradnici iz Odjela za humanu genetiku Cetus korporacije. U časopisu *Science* (1985.) objavljen je znanstveni rad u kojem prvi put opisuju tehniku specifičnog umnožavanja fragmenta DNA *in vitro* uz katalizu enzimom DNA polimeraze izolirane iz bakterije *Escherichia coli* (Saiki *et al.*, 1985). Tri godine kasnije, isti tim znanstvenika objavljuje rad u kojem umjesto navedene polimeraze *E. coli* uvode termostabilnu DNA polimerazu izoliranu iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* (*Taq*) (Saiki *et al.*, 1988). Unatoč brojnim modifikacijama, raznovrsnim primjenama i automatizaciji procesa lančane reakcije polimerazom, osnovne odrednice ove tehnike utemeljene 1985. i 1988. nisu se do danas značajno promijenile.

4.6.1. Osnovne postavke i biokemijski model PCR-a

Osnovne postavke na kojima se temelji PCR su sljedeće:

- U prirodnom stanju DNA je dvostruki heliks koji se sastoji od dva antiparalelna polinukleotidna lanca međusobno povezana vodikovim vezama.
- Nukleotidi jednog polinukleotidnog lanca međusobno su povezani kovalentnom vezom između dezoksiriboze jednog nukleotida i fosfatne grupe susjednog nukleotida, a vodikove veze koje održavaju dva polinukleotidna lanca zajedno uvijek se formiraju između komplementarnih baza, tj. A-adenin se uvijek veže za T-timin, a C-citozin za G-gvanin.

- Vodikove su veze energetski slabe i lako se remete zagrijavanjem (denaturacija), dok su kovalentne veze stabilne i pri zagrijavanju se održavaju, dok hlađenje dovodi do ponovnog uspostavljanja vodikovih veza između komplementarnih baza (renaturacija) (Durmić, 2005).

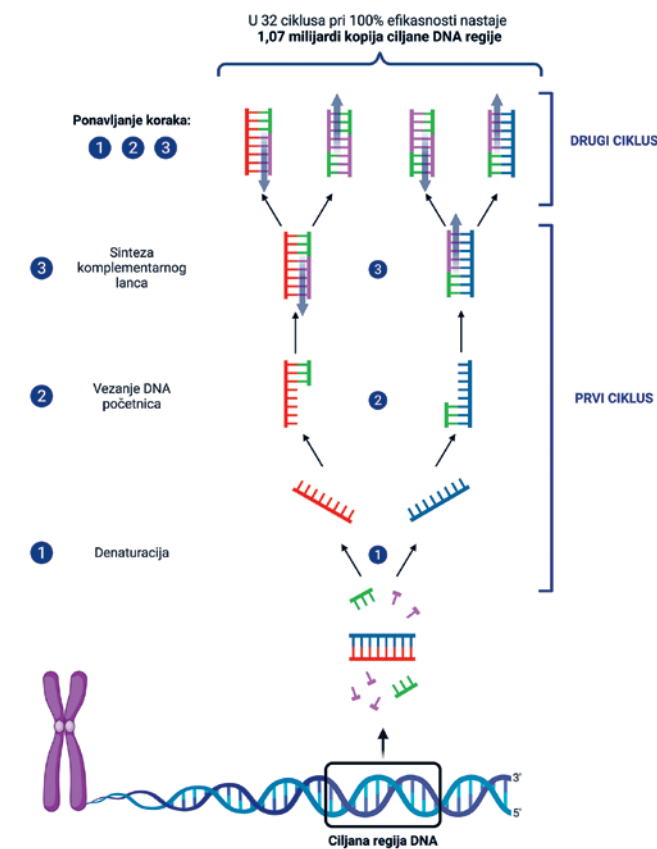
Na osnovi navedenog je kreiran osnovni model PCR reakcije koji se sastoji od tri osnovna koraka (slika 4.34.):

- Denaturacija - razdvajanje polinukleotidnih lanaca na temperaturi od oko 95°C.
- Hibridizacija, vezivanje početnica (engl. *annealing*) - povezivanje umjetno sintetiziranih i fluorescentno označenih DNA početnica koje jasno lociraju mjesta, tj. DNA fragmente koji će biti umnoženi.
- Produljivanje lanca (engl. *extension*, *elongation*) - vezivanje komplementarnih baza na slobodna mjesta zahtijeva prisutnost denaturiranog kalupa DNA, DNA početnica i aktivnost *Taq* polimeraze.

Ovaj model u idealnim uvjetima omogućava da se samo od jedne kopije DNA, kroz 32 ciklusa (u roku od oko dva do tri sata), u kojem bi se sukcesivno smjenjivale nabrojane faze, dobije $1,07 \times 10^9$ kopija DNA.

Dakle, lančana reakcija polimerazom enzimski je proces pomoću kojeg se umnožava (amplificira) određeni segment DNA pri čemu se, nakon 30-ak ciklusa proizvedu milijarde kopija DNA koje su potpuno istovjetne početnom slijedu. Tako nastali PCR produkt, koji se u literaturi često naziva i amplikon (engl. *amplicon*), prikladan je za daljnju analizu, koja u forenzičkoj genetici najčešće rezultira generiranjem DNA profila. Volumeni PCR reakcija variraju od 5 do 50 μ l. U forenzičkoj genetici, najčešći volumen jedne reakcije koji sugeriraju proizvođači je 25 μ l, iako mnogi laboratoriji bitno smanjuju taj parametar, tako da nije neuobičajeno da u znanstvenim i stručnim radovima iz ovog područja dominiraju volumeni od 5 do 10 μ l. PCR se odvija u laboratorijskim uređajima poznatim pod nazivom *PCR thermocycler*, o kojima će više riječi biti u šestom poglavlju.

Sama PCR metoda, i to posebno u forenzičkoj analizi DNA, u posljednjih nekoliko godina znatno je pojednostavljena. Na tržištu je dostupan veliki broj komercijalnih multipleks PCR setova u kojima se sve osnovne komponente potrebne za samu reakciju nalaze u složenim puferima, tako da se pri samom postavljanju reakcije prate izuzetno jednostavni, ranije optimizirani i provjereni protokoli za koje se garantiraju izuzetno dobri rezultati. Također, primjenom ovih komercijalnih PCR sustava moguće je istovremeno analizirati više od 15 (ili čak preko 30) ciljanih genetičkih biljega, uglavnom STR-ova, a u posljednje vrijeme i SNP-ova.



SLIKA 4.34. Shematski prikaz lančane reakcije polimerazom.

Osnovni reagensi koji se koriste u svakoj od reakcija su:

- Početnice (engl. *primer*) – kratke oligonukleotidne sekvence koje se dodaju u PCR reakciju u visokim koncentracijama i koje određuju ciljnu DNA regiju koja će se amplificirati. Za svaku regiju se koristi par početnica, uzvodna i nizvodna (engl. *forward*, F' i reverse, R) sintetiziranih u 5'®3' smjeru.
- DNA kalup – polazni uzorak kojem se želi amplificirati i analizirati određena regija.
- Termostabilna polimeraza – enzim koji ugrađuje nukleotide jednog lanca. Ovaj enzim mora biti termostabilan da bi podnio visoke temperature u fazi denaturacije i najčešće se izolira iz mikroorganizma *Thermus aquaticus* koji živi u vrućim izvorima.
- Slobodni dNTP-ovi – slobodni nukleotidi koji služe za ugradnju u kopije ciljnog fragmenta u procesu njegove amplifikacije.

Osnovno pravilo u forenzičkoj genetici je da se prilikom postavljanja PCR reakcije obavezno moraju uključiti i kontrole PCR reakcije (Primorac *et al.*, 2008). Postoje dva osnovna tipa kontrola: pozitivna i negativna. Pozitivna kontrola u kojoj se kao DNA kalup koristi uzorak poznatog DNA profila i koncentracije služi za potvrdu uspješnosti PCR reakcije. Na taj se način potvrđuje ispravnost korištenih kemikalija, protokola, pipeta, PCR uređaja i drugih materijala korištenih u postavljanju reakcije. S druge strane, negativnom kontrolom, koja podrazumijeva da se umjesto DNA kalupa u reakciju dodaje ultra čista voda, provjerava se čistoća upotrijebljenih kemikalija, kao i preciznost analitičara prilikom postavljanja same reakcije. Na taj se način potvrđuje da nije došlo do kontaminacije reagensa s DNA i do međusobne kontaminacije uzoraka.

Jedan uobičajeni forenzički PCR protokol (za Promega PowerPlex® 21 kit, za uzorke brisa bukalne sluznice) izgleda ovako:

96°C 1 minuta

25 ciklusa sljedeća tri koraka:

94°C 10 sekundi

59°C 1 minuta

72°C 30 sekundi

60°C 20 minuta

4°C čuvanje uzoraka (Promega, 2021)

4.6.2. Optimizacija osnovnih parametara primjene lančane reakcije polimerazom u forenzičkoj genetici

U prvim godinama primjene PCR tehnologije osnovni je izazov bio osigurati stabilnu reakciju u kojoj će se svi parametri koji su u nju uključeni aktivirati u točno određenom trenutku. Nakon uvođenja *Taq* polimeraze u cijeli proces (Saiki *et al.*, 1988) značajno se dobilo na efikasnosti, ali je i dalje ostao problem njene aktivacije. Naime, optimalna temperatura za aktivnost ovog enzima iznosi 72°C, ali je ona aktivna, naravno u nešto slabijem omjeru, i na sobnoj temperaturi. Kao rezultat te aktivnosti dolazilo bi do nespecifičnog međusobnog povezivanja početnica i stvaranja dimera početnica (engl. *primer dimer*). Stoga su se prilikom postavljanja ovih reakcija svi reagensi pohranjivali u hladnim uvjetima, tj. postavljanje PCR reakcije se odvijalo „na ledu”. To je značajno ograničavalo i kompliciralo sam postupak te povećavalo mogućnost greške i kontaminacije uzorka.

S ciljem rješavanja ovog problema razvijena je „*hot start*” PCR tehnologija. Osnovna vodilja razvoja bila je kasnija aktivacija *Taq* polimeraze, što bi spriječilo njenu aktivnost prije prvog ciklusa i faze ekstenzije. Prvi modeli temeljili su se na kasnijem dodavanju ovog enzima u samu reakciju, ali to u procesiranju velikoga broja uzoraka predstavlja značajan problem u smislu produžavanja postupka, ali i povećanja vjerojatnosti kontaminacije. Kao odlično rješenje pokazala se modificirana *Taq* polimeraza koju je proizvela kompanija Applied Biosystems.

AmpliAq Gold DNA polimeraza kemijski je modificiran enzim koji ostaje neaktivan sve dok se ne zagrije na temperaturi od 95°C. Princip ove deaktivacije i kasnije reaktivacije zasniva se na činjenici da se blokada enzima gubi kada pH reakcije padne ispod 7,0. Jedan od reagensa u PCR puferu je i Tris-HCl koji na temperaturi od 25°C ima pH od 8,3 i kojem se sa svakim stupnjem zagrijavanja temperature pH snižava za otprilike 0,02, pa na temperaturi od 95°C njegova pH vrijednost iznosi oko 6,9. Stoga protokoli koji koriste ovaj enzim moraju imati period predinkubacije na temperaturi od 95°C u trajanju od 10-ak minuta. Taj dodatni period ujedno pojačava i fazu denaturacije DNA kalupa (Butler, 2005). U posljednjih par godina jedan od trendova u optimizaciji procesa forenzičke analize DNA, točnije njegove PCR faze, je da se izbjegava odvojeno dodavanje DNA polimeraze, već se ona industrijski ugrađuje u sastav pufera zajedno s ostalim komponentama. Stoga tri najveća proizvođača (Promega, Applied Biosystems i Qiagen) ovih komercijalnih PCR setova za identifikaciju ljudi (engl. *Human Identification kits*, HID kits) ujedno proizvode i svoje DNA polimeraze, koje su sastavni dio navedenih pufera.

Važan čimbenik u postavljanju PCR reakcije je i točno određivanje broja ciklusa i trajanja denaturacije, hibridizacije i ekstenzije unutar njega. Optimalan broj ciklusa za forenzičke uzorke iznosi 28-32, ali različiti protokoli nerijetko podrazumijevaju smanjivanje ili povećavanje tog broja. Dobar primjer je i produženi protokol (povećan broj ciklusa) koji se koristi za analizu uzoraka koje karakterizira prisutnost izuzetno malih količina DNA (engl. *low copy number DNA*, LCN DNA).

4.7. DETEKCIJA PCR REZULTATA

Nakon amplifikacije slijedi faza detekcije koja se odvija na nekom od analitičkih uređaja, te se upotrebom različitih softvera, u određenim fazama procesa, generiraju konačni genetički profili. Detekcija, kao finalna faza procesa utvrđivanja genetičkog identiteta osobe ili biološkog traga automatizirana je metoda izuzetno podložna promjenama i učestalim inovacijama, koje će detaljnije biti opisane u šestom poglavlju. Te promjene prate trendove napretka u informatičkoj tehnologiji, dizajnu instrumenata i težnji k potpunoj automatizaciji procesa.

Radi mogućnosti usporedbe rezultata, kao i certificiranja laboratorija neophodno je, u skladu s materijalnim mogućnostima, pratiti taj razvoj.

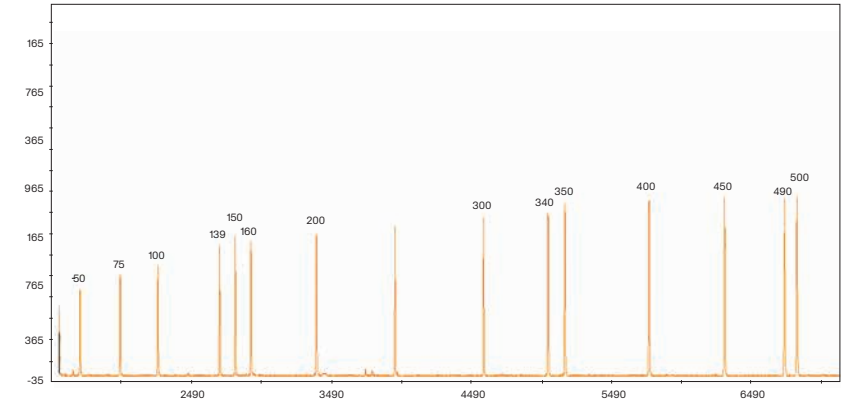
U forenzičkim analizama DNA detekcija PCR rezultata uglavnom se može razdvojiti u dva osnovna pravca: detekcija alelnih varijanti na STR lokusima i sekvenciranje DNA.

4.7.1. Detekcija alelnih varijanti na STR lokusima

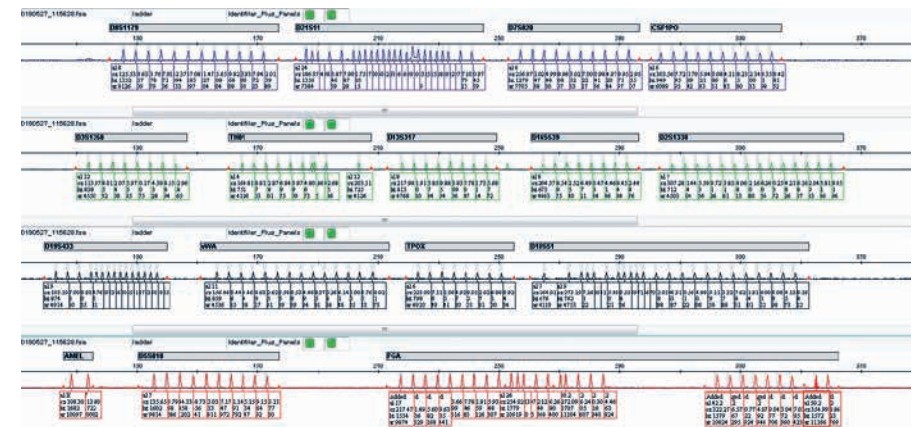
Analiza STR molekularnih biljega ne temelji se na utvrđivanju redoslijeda baza unutar odabrane sekvence DNA. Sljedovi baza u ovim molekularnim biljezima dobro su poznati i nema potrebe da se prilikom svake analize iznova potvrđuju, stoga analiza ovih biljega podrazumijeva utvrđivanje broja ponavljanja određene, ranije opisane, kratke uzastopno ponavljajuće jedinice. Zbog toga se ne vrši označavanje pojedinačne baze fluoroforom za, već se označava početnica za odabrani STR lokus. U komercijalnim setova više lokusa može biti obilježeno istom fluorescentnom bojom, ali osnovni je preduvjet da su oni dovoljno udaljeni jedan od drugog, tj. da prilikom njihove detekcije ne može doći do preklapanja alelnih varijanti, što bi izazvalo nedoumicu o njihovoj pripadnosti promatranim STR biljezima. Početnice za alelne varijante koje bi se potencijalno preklapale stoga se označavaju različitim fluoroforima. Alelna varijanta zastupljena na danom lokusu fluorescira i tu fluorescenciju detektira složena kamera analitičkog uređaja (Marjanović, 2005a).

Fluorescentno obilježavanje za razlikovanje pojedinih alelnih varijanti na jednom ili više lokusa metodom elektroforetske separacije s vremenom je u potpunosti zamijenilo ranije korišteno radioaktivno obilježavanje (najčešće izotopi fosfora kao što je ^{32}P) te bojenje srebrom. STR setovi koriste četiri ili pet, a u novije vrijeme šest ili čak osam boja kojima se obilježavaju odabrani biljezi i standard.

Prilikom pripreme amplificiranih uzoraka za detekciju i krajnje generiranje DNA profila, u svaki od uzoraka dodaje se interni standard veličine (engl. *internal size standard*), koji je neophodan za određivanje veličine fragmenta (engl. *sizing*) detektirane alelne varijante (slika 4.35). Različiti komercijalni setovi koriste i različite standarde veličine, a to su zapravo umjetno sintetizirani jednolančani DNA fragmenti veličine od 35 bp pa sve do 500-600 bp. Interni standard veličine dodaje se također i u alelnu ljestvicu (engl. *allelic ladder*, slika 4.36.) koja služi kao referentni sustav alela i analizira se zajedno s uzorcima. To je umjetno sintetizirani set najčešćih alela za svaki ispitivani lokus. Aleli ljestvice najčešće se odabiru iz populacijskih studija uzimajući u obzir da trebaju odražavati tipičnu genetsku raznolikost. Alelna ljestvica generira se korištenjem identičnih početnica koje se koriste u analizi uzoraka i na taj način omogućavaju kreiranje „biblioteke” skoro svih alelnih varijanti koje se mogu očekivati da budu detektirane u ispitivanim

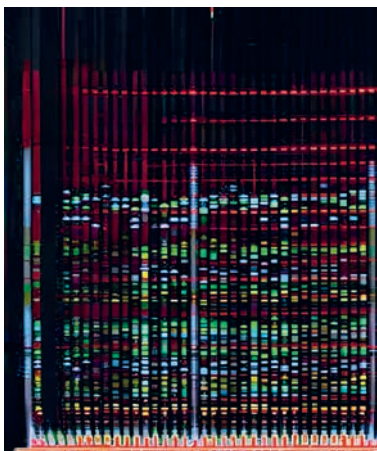


SLIKA 4.35. Interni standard veličine (engl. internal size standard) zastupljen u komercijalnom multipleks STR sustavu PowerPlex® 16 System (Promega), nakon softverske obrade rezultata analize.



SLIKA 4.36. Alelna ljestvica (engl. allelic ladder) zastupljena u komercijalnom multiplex STR sustavu AmfISTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems), nakon softverske obrade rezultata.

uzorcima. Softverskom analizom detektirane alelne varijante u uzorcima mogu se prema veličini usporediti s odgovarajućim alelom u alelnoj ljestvici i zatim biti jasno određene i imenovane. Alelna ljestvica omogućava standardizaciju pa se može nazvati i alelnim standardom. Budući da se uvjeti analize DNA mogu razlikovati, standardizacija je bitna. Referentni alelni standard stoga osigurava dosljedne i usporedive rezultate u različitim laboratorijima.



SLIKA 4.37. Slika gela generirana na ABI 377 instrumentu. Ova slika predstavlja polazne sirove podatke za generiranje profila uzoraka koji su postavljeni na analizu automatskom vertikalnom gel elektroforezom.

Nakon pripreme, uzorci i alelna ljestvica postavljaju se u analitički uređaj koji na kraju procesa generira sirove podatke (engl. *raw data* – slika 4.37.). Ti sirovi podaci softverski se obrađuju i ta obrada se, u pojednostavljenom algoritmu, sastoji od nekoliko koraka:

- prvo se utvrđuju veličine fragmenata standarda koji je tijekom pripreme dodan u alelnu ljestvicu i u uzorke
- na osnovu veličina tih fragmenata određuju se veličine alelnih varijanti u alelnoj ljestvici, koje se, na osnovu toga (i ranije determiniranih parametara zapisanih u softverskom algoritmu) imenuju
- nakon toga se na isti način određuje veličina detektiranih alelnih varijanti u analiziranim uzorcima
- na kraju se tako definirane alelne varijante uzorka uspoređuju s odgovarajućim alelnim varijantama alelne ljestvice i imenuju.

Važno je napomenuti da je danas cijela ova metoda u potpunosti automatizirana i da se velikom brzinom, skoro simultano, odvija upotrebom samo jednog softvera kao što je *GeneMapper™ ID-X* (Applied Biosystems) ili *GeneMarker®* (SoftGenetics). To značajno pojednostavljuje i ubrzava proces analize u odnosu na ranije periode kada su se za ovakve analize koristila dva ili tri odvojena softvera, ili još raniji period kada su ove analize bile rađene ručno.

Dakle, može se još jednom naglasiti: signali (engl. *peaks*) determinirani softverskom obradom ne predstavljaju pojedinačne baze nego alelne varijante, koje su pokazatelji koliko se puta poznata repetitivna jedinična sekvenca ponavlja, tj. za koliko se osnovnih repetitivnih motiva pojedine alelne varijante međusobno

razlikuju. Samim time riječ sekvenciranje, koje se često u laboratorijskom žargonu koristi za ovaj postupak, nije toliko prikladna kao termini detekcija ili, još bolje, profiliranje (Marjanović, 2005a).

4.7.1.1. DNA profil

Jedno od osnovnih pitanja koje se nameće jest: što je DNA profil? Svaki sudski vještak koji je barem jednom vještačio na sudu sigurno se susreo s tim pitanjem. Iako naizgled pomalo banalno, pogrešan odgovor na ovo pitanje može baciti sjenu i na najbolje rezultate analize DNA.

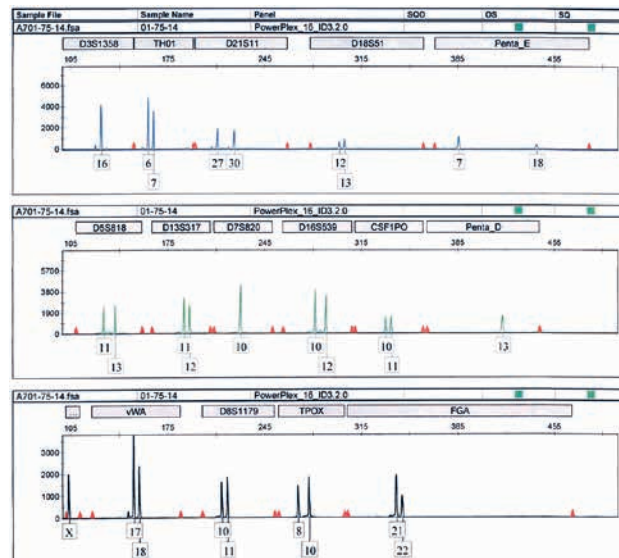
U prethodnom su dijelu elaborirani STR biljezi, signali, lokusi, alelne ljestvice, standardi, ali svi ti podatci tužitelju, sucu, odvjetniku ili stranci koja sudjeluje u testiranju spornog očitstva ništa ne znače – njih zanima krajnji rezultat, a krajnji rezultat uspješne analize DNA je DNA profil.

Kao krajnji rezultat detekcije alelnih varijanti na analiziranim STR lokusima dobiva se elektroferogram, čiji krajnji izgled može varirati ovisno o tome koji su lokusi analizirani, jesu li analizirani autosomni (slika 4.38.) ili spolni biljezi (slika 4.39.), koliko je boja korišteno u njihovoj detekciji i sl. Elektroferogram predstavlja kombinaciju računalno detektiranih alelnih varijanti (jasno pozicionirani signali) koje se kroz softversku obradu prvo detektiraju, a zatim imenuju. Svaki od signala označen je brojem koji označava koliko se puta ponavlja repetitivna jedinica analiziranog STR lokusa.

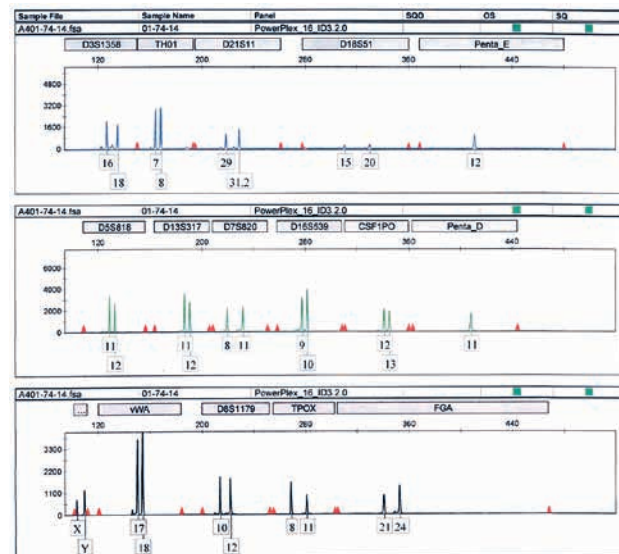
Analiza elektroferograma precizan je i jednostavan postupak. Iskusni stručnjak već na prvi pogled može ocijeniti je li je elektroforeza pravilno protekla, je li je bilo previše ili premalo DNA u uzorku, je li uzorak smjesa tragova, je li je generirani DNA profil kompletan ili parcijalan itd.

Prilikom analize DNA profila potrebno je uzeti u obzir nekoliko osnovnih tehničkih informacija. Treba napomenuti da se ne radi o literaturom propisanim zakonitostima, već o slobodnije interpretiranim naputcima koji mogu pomoći u što lakšem shvaćanju i analiziranju elektroferograma.

- Na temelju elektroferograma za autosomne STR lokuse jedina stvar koja se može jasno, nedvojbeno utvrditi o fenotipskom i fiziološkom stanju ispitivane osobe je spol. Naime, svaki STR sustav sadrži tzv. amelogenin, tj. spolno determinirajući biljeg na osnovi kojeg se jasno utvrđuje genetički spol pojedinca. Naime, amelogenin je gen koji je odgovoran za sintezu proteina koji je osnovna komponenta matriksa zubne cakline, a lociran je na spolnim kromosomima. Varijanta koja se nalazi na kromosomu X je kraća, zbog delecije veličine 6 bp. Ova razlika u dužini polimorfizma koristi se u determinaciji spola pri generiranju DNA profila. Detektiranje XY kombi-



SLIKA 4.38. Elektroferogram: DNA profil ženske osobe generiran primjenom autosomalnog PowerPlex® 16 kita.



SLIKA 4.39. Elektroferogram: DNA profil muške osobe generiran primjenom autosomalnog PowerPlex® 16 kita.

nacije ukazuje da se radi o DNA profilu muške osobe dok detektiranje XX kombinacije ukazuje da se radi o DNA profilu ženske osobe. Ovaj podatak izuzetno je bitan jer nije neuobičajeno da se vode velike diskusije u kojima protivnici masovnije upotrebe analize DNA navode pretpostavku da se na osnovi ovakvog profila mogu definirati zdravstveno stanje, trenutno fiziološko stanje, pa čak i etnička pripadnost pojedinca. U izuzetno rijetkim situacijama, uslijed pojave tri alelne varijante na pojedinim lokusima (npr. D21S11), moglo bi se pretpostaviti da se radi eventualno o osobi koja boluje od nekog genetičkog poremećaja (u ovom slučaju, Down sindroma), ali to nije pouzdan način za detekciju ove bolesti, jer moguće je da se kod osobe koja nema sindrom jave tri alelne varijante na jednom lokusu, dok je s druge strane, moguće da osoba s nekim genetičkim sindromom ili bolesti ima sasvim uobičajen DNA profil. Dakle, ova metoda i biljezi koji se koriste u procesu forenzičke analize se, za sada, ne mogu efikasno koristiti u dijagnostičke svrhe. Napominjemo, većina ovih biljega svakako se nalazi u nekodirajućem dijelu DNA molekule, te nisu transkripcijski aktivni.

- Heterozigot na jednom STR lokusu detektira se s dva signala, a homozigot s jednim. Ovo se odnosi isključivo na analizu elektroferograma autosomnih STR lokusa, kao i X vezanih STR lokusa kod žena. Na Y STR elektroferogramima nema heterozigota, jer oni predstavljaju haplotipove, tj. rezultate samo jednog kromosoma, a ne para kromosoma.
- Cjeloviti DNA profil podrazumijeva jasno detektirane sve alelne varijante na svim analiziranim STR lokusima, unutar čega se sa sigurnošću može potvrditi svaki homozigot i heterozigot.
- Parcijalni DNA profil podrazumijeva nepostojanje dijela alelnih varijanti kod pojedinih analiziranih STR lokusa.
- Prilikom analize elektroferograma i detekcije pojedinih alelnih varijanti, izuzetno je važno jasno razlikovati signale koji stvarno predstavljaju alelne varijante i one koji predstavljaju artefakte prethodnih faza analize. Stoga se svaki sumnjivi signal mora detaljno ispitati analiziranjem visine, širine, pozicije, oblika itd. Jedan od najčešćih parametara koji je jako bitan jest relativna fluorescentna jedinica (engl. *relative fluorescence units*, RFU). Ovom jedinicom označava se relativna visina detektiranog signala. Prilikom analiza veliki broj laboratorija postavlja graničnu vrijednost (engl. *threshold*), tj. vrijednost ispod koje softver neće detektirati niti jedan pik. Granična vrijednost za određeni komercijalni set preporučena je od strane proizvođača, u skladu s provedenom validacijom, a najčešće se radi o vrijednostima od 50 ili 100 RFU.
- Ipak, važno je napomenuti da u analizi tragova koje karakterizira prisutnost malih količina visokodegradirane DNA ili miješanih tragova, pojedini labora-

toriji ovu granicu pomiču prema nižim vrijednostima, ali je gotovo nikada ne spuštaju ispod 50 RFU. Ovo je i dalje jedno od otvorenih pitanja u forenzičkoj genetici i predstavlja izvor velikog broja rasprava, ali vodeći eksperti sugeriraju da svaki laboratorij jasno definira svoj pristup po ovom pitanju te da ne odstupa od njega.

- Pojavljivanje više od dva signala na jednom STR lokusu nekog DNA može ukazivati na prisutnost više osoba u jednome tragu, PCR artefakt kao rezultat degradirane DNA, postojanje tri alela (engl. *three-allele pattern*), izuzetno jaki *stutteri* (nusproizvodi amplifikacije koji su obično za jednu ili više ponavljajućih jedinica manji ili veći od primarnog alela), „probijanje” signala (engl. *dye pull up*; fenomen kada se fluorescentni signal jedne boje „preslikava” u kanal druge boje zbog preklapanja spektralnih svojstava fluorescentnih boja) itd. U svakom slučaju, u analizi ovakvih DNA profila mora se biti jako oprezan.

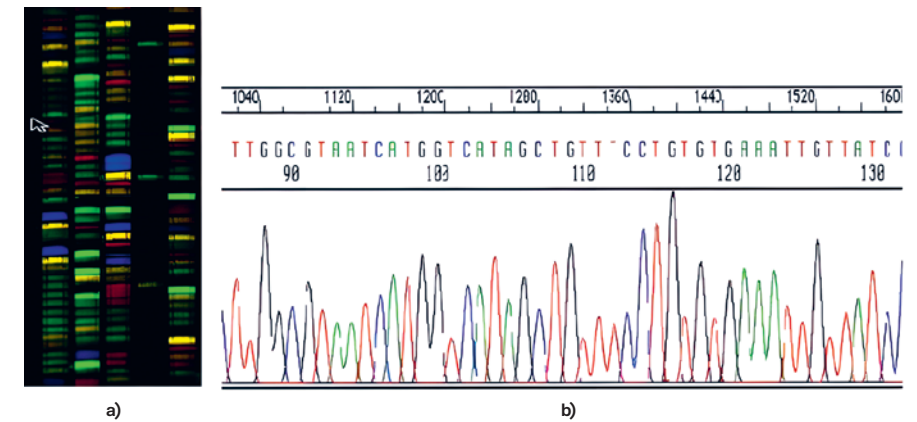
4.7.2. DNA sekvenciranje

DNA sekvenciranje je proces utvrđivanja redoslijeda baza unutar lanca DNA i predstavlja jednu od osnovnih metoda genetičkog inženjerstva. Poznavanje DNA sekvence preduvjet je bilo kakvoj manipulaciji ciljanim segmentom nasljednog materijala. Primjera radi, računalno pretraživanje sekvenci svih poznatih restriksijskih (endonukleaznih) mjesta može rezultirati kreiranjem cjelovite i precizne restriksijske mape. Postoji više tehnika sekvenciranja koje se međusobno razlikuju po svojim osnovnim principima (Marjanović, 2005a):

- Maxam-Gilbertova (M-G) metoda
- Sangerova metoda
- automatsko sekvenciranje.

Jednostavnost, brzina i širok spektar primjene promovirali su metodu automatskog sekvenciranja u trenutno najčešće korišteni oblik analize sekvenci DNA (slika 4.40.). Manualno sekvenciranje DNA fragmenata, predstavljeno kroz prva dva pristupa (M-G i Sanger) podrazumijeva četiri odvojene reakcije, podijeljene u četiri odvojene linije prvenstveno na poliakrilamidnom gelu i autoradiografsko detektiranje. Te predispozicije okarakterizirale su ove metode kao izuzetno duge, komplicirane i zahtjevne sa stajališta potrebe forenzičke analize DNA da procesira što veći broj uzoraka u što kraćem vremenskom razdoblju, pa se danas više ne koriste.

Polazni preduvjet za uspješno automatsko sekvenciranje je simultanost detekcije obilježenih fragmenata i procesa elektroforeze. Prednost pri automatskoj detekciji imaju fluorescentno obilježeni u odnosu na radioaktivne obilježene biljege.



SLIKA 4.40. Rezultati automatskog sekvenciranja. Svaka baza na gelu obojena je drugom bojom. Podatci prikazani na slici gela predstavljaju polazne, sirove rezultate (a), koji se softverskom obradom očitavaju u konkretne sekvence (b).

Ipak, bez obzira o kojoj generaciji automatskog sekvenciranja se radilo, osnove svake od njih počivaju na Sangerovoj metodi. U prvoj generaciji, fluorescentni biljezi bili su vezani za početnice. Vezanjem četiri različite, fluorescentne boje koje se razlikuju u spektrima fluorescencije za početnicu, moguće je analizirati produkte elektroforeze sve četiri reakcije terminacije lanca (engl. *chain terminator*) u samo jednoj liniji gela. DNA fragmenti detektiraju se na temelju njihove fluorescencije tijekom prolaska kroz polje djelovanja detektora. Horizontalnim skeniranjem detektora moguće je simultano detektirati više odvojenih sekvenci, jednu sekvencu po liniji.

Druga generacija fluorescentne tehnike za terminaciju lanca koristi fluorescentno obilježene dideoksi nukleotida (ddNTP) pri čemu svaki ddNTP ima fluorofor različite boje te fluorescira u različitom spektru. S obzirom da ddNTP-u nedostaje 3'OH skupina u šećeru deoksiribozi (3'OH skupina potrebna je za vezanje sljedećeg nukleotida u lanac), njegovom ugradnjom daljnje vezanje nukleotida onemogućen je, te je stoga sinteza lanca zaustavljena.

Osnovna prednost ove metode je što se provodi u jednoj, a ne u četiri odvojene reakcije. I kod ove metode krajnja detekcija odvija se tijekom elektroforeze, prilikom prolaska obilježene sekvence kroz polje djelovanja detektora.

Ono što je bitno napomenuti jest činjenica da se ovaj pristup testiranja nasljednog materijala u forenzičkoj analizi DNA prvenstveno koristi u procesu ispitivanja mtDNA i njenih hipervarijabilnih regija, o čemu ćemo više pisati u narednom poglavlju.

4.8. PRIMJENA AUTOSOMNIH VIŠELOKUSNIH PCR-SUSTAVA U FORENZIČKOJ GENETICI

Iako je u početku primjena ove metode u forenzičkoj genetici bila ograničena, pa čak i osporavana, nezamjenjivost PCR analize već je desetljećima univerzalno prihvaćena, iz više razloga:

- mogućnost analize vrlo malih tragova (teoretski, jedna stanica je dovoljna za generiranje DNA profila)
- mogućnost analize iznimno fragmentirane DNA, pa čak i fragmenti od samo nekoliko stotina baznih parova mogu poslužiti kao kalup za amplifikaciju
- istovremena amplifikacija većeg broja molekularnih biljega
- izbjegavanje amplifikacije DNA koja nije ljudskog porijekla
- postojanje velikog broja komercijalnih PCR amplifikacijskih sustava.

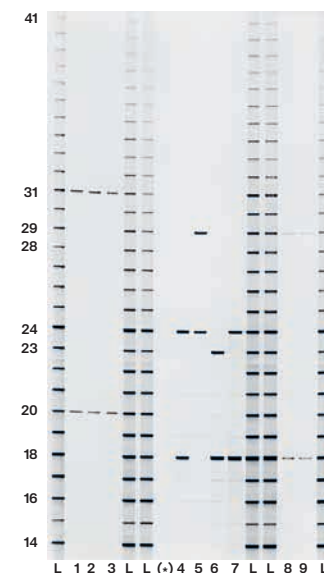
S druge strane, PCR amplifikacija relativno je osjetljiva na prisutnost različitog spektra inhibitora koji je mogu ometati i izuzetno je podložna eventualnoj kontaminaciji drugim ljudskim materijalom, pa se sama reakcija mora odvijati u strogo kontroliranim uvjetima, što bitno povećava troškove uspostavljanja DNA forenzičkih laboratorija.

4.8.1. Rani PCR sustavi

Nedugo nakon prvih forenzičko-genetičkih analiza, ustanovljeno je da do tada standardni RFLP pristup koji se koristio u analizi VNTR biljega ima bitna ograničenja, od nemogućnosti istovremene analize više biljega, preko relativno velike količine DNA koja mora biti prisutna u tragu, do kompleksnog i dugotrajnog postupka analize. Usavršavanje PCR tehnologije i sve veća potreba za forenzičko-genetičkim ekspertizama te težnja za standardizacijom cijelog postupka, doveli su do pojave prvih komercijalnih PCR setova koji su uspostavili temelje daljnjeg razvoja PCR tehnologije u ovom području.

4.8.1.1 AmpliFLP™ D1S80 PCR Amplification Kit

Ovaj monolokusni sustav, obično zvan D1S80, predstavljao je analizu jednog, ali genetički vrlo polimorfnog, VNTR lokusa D1S80. Osnovna ponavljajuća sekvenca koja se koristi prilikom analize D1S80 lokusa duga je 16 bp, a broj takvih ponavljajućih sekvenci varira od 14 do 41 (tj. od 350 do 1000 bp). Razlikovanje detektiranih alela temeljilo se na različitom broju ponavljanja ovih sekvenci, a korištenje ovog



SLIKA 4.41. Analiza alelnih varijanti na D1S80 lokusu primjenom fluorescentne detekcije na poliakrilamidnoj gel elektroforezi. Uzorci 1-3 imaju isti genotip (20,31) kao i uzorci 4 i 7 (18,24) te uzorci 8 i 9 (18,29) dok uzorci 5 (24,29) i 6 (18,23), u ovom konkretnom prikazu, imaju profile koji se ne poklapaju niti sa jednim drugim uzorkom analiziranim na ovom gelu.

seta u rutinsku je upotrebu uvelo i numeričko prikazivanje konačnih rezultata analize. Tako se osoba koja sadrži 18 repetitivnih jedinica na jednom i 22 repetitivne jedinice na drugom homolognom lokusu, prikazivala kao osoba s genotipom 18, 22 na lokusu D1S80. S obzirom na to da se u ovom sustavu analizira samo jedan genski lokus, snaga diskriminacije (engl. *discrimination power*) nije bila velika, no ovaj se sustav, posebno u kombinaciji s drugim sustavima, pokazao kao dovoljno informativan za rane forenzičko-genetičke analize. Analiza ovog biljega podrazumijevala je bojenje gela srebrnim nitratom, a nešto kasnije razvijen je i model detekcije alelnih varijanti na poliakrilamidnoj gel elektroforezi (slika 4.41.). FBI ga je aktivno koristio sve do 1999. godine, zajedno s DQA1 i PolyMarker sustavima sadržanim u AmpliType PM® + HLA DQA1 PCR Amplification and Typing Kit-u.

4.8.1.2. AmpliType PM® + HLA DQA1 PCR Amplification and Typing Kit

Iako nije riječ o VNTR ili STR molekularnim biljezima, ovaj PCR sustav ostat će zapamćen kao prvi komercijalni PCR sustav korišten u forenzici. U prvobitnoj verziji analizirao se samo HLA DQA1 lokus, koji je poznati dio ljudskog histokompatibilnog sustava. Cetus korporacija (Emeryville, CA) razvila je set za analizu. **AmpliType DQA1** bio je sustav za tipizaciju koji sadrži probe pomoću kojih se otkriva varijabilnost DNA sekvence koja se prije detektirala pomoću antitijela. Navedeni izvorni sustav u početku je sadržavao šest alela. Sa stajališta forenzičke genetike ovaj je sustav imao određene ograničavajuće karakteristike. Naime, prilikom

TABLICA 4.1. Karakteristike genskih lokusa zastupljenih u AmpliType® PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit.

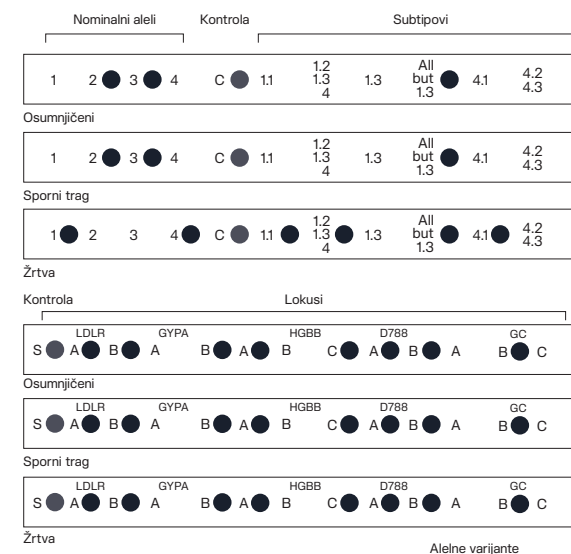
Genski lokus	HLA DQA1	LDLR	GYPA	HBGG	D7S8	GC
Kromosomska lokacija	6p21.3	19p13.1-13.3	4q28-31	11p15.5	7q22-31.1	4q11-13
Veličina PCR produkta (bp)	239 / 242	214	190	172	151	138
Broj alela	7	2	2	3	2	3
Funkcija / puni naziv lokusa	HLA tipizacija	Low density lipoprotein receptor	Glycophorin A	Hemoglobin G gamma-globin	-	Group-specific component

testiranja dokaznog materijala, u približno 16% slučajeva dvije su osobe imale isti genotip, pa je bilo potrebno razviti nove PCR modele za tipizaciju. Slijedom te ideje, razvijen je **AmpliType PM® + HLA DQA1 PCR Amplification and Typing Kit**, koji se temelji na kombinaciji PCR i *dot blot* analize (slika 4.42.). Predstavljao je sintezu dva sustava, AmpliType DQA1 i AmpliType PolyMarker® (*LDLR*, *GYPA*, *HBGG*, *D7S8* i *GC*, tablica 4.1.). Ovom metodom dodatno je povećan broj analiziranih biljega (u ovom slučaju gena), a svakako najveći joj je doprinos to što je povećala snagu diskriminacije pri testiranju.

4.8.2. Komercijalni multipleks PCR sustavi za analizu autosomnih STR lokusa

Danas je na tržištu prisutan veći broj komercijalnih setova koji su dizajnirani tako da se u jednoj PCR reakciji može analizirati više autosomnih STR lokusa, pri čemu su vodeće tvrtke razvile sustave za istovremenu detekciju više od 25 lokusa u jednoj reakciji. Tri najveća proizvođača ovih setova su Promega Corporation (Madison, WI), Applied Biosystems (Foster City, CA) i Qiagen (Hilden, Njemačka).

Cijela priča za razvoj ovih komercijalnih kitova započela je 1993. godine s prvim Promeginim TH01, TPOX i CSF1PO monopleks sustavima, ali je pravi uzlet



SLIKA 4.42. Rezultati dobiveni primjenom sustava (a) AmpliType DQA1 i (b) AmpliType PolyMarker®. Komparativnom analizom rezultata prikazanih na ovoj slici može se zaključiti da sporni trag potječe od osumnjičenog.

doživjela u kasnim 90-im godinama dvadesetog stoljeća s razvojem ABI sustava AmpF/STR™ Blue (3 lokusa) i AmpF/STR™ Green I (3 lokusa + amelogenin) te Promeginih CTTv (4 lokusa), FFFI (4 lokusa) i GammaSTR (4 lokusa).

Ubrzo nakon toga slijedi razvoj novih tipova iz Promegine serije PowerPlex®:

- 1997./1998.** GenePrint® PowerPlex® 1.1 i PowerPlex® 1.2 (8 STR.-lokusa + amelogenin)
- 1999.** PowerPlex® 2.1 (9 lokusa) 2000. - PowerPlex® 16 (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2002.** PowerPlex® ES (8 STR lokusa + amelogenin)
- 2003.** PowerPlex® Y (12 Y-STR lokusa)
- 2009.** PowerPlex® 16 HS (15 STR lokusa + amelogenin) 2009. - Power Plex® ESX 16 (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2009.** PowerPlex® ESI 16 (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2009.** PowerPlex® ESX 17 (16 STR lokusa + amelogenin)
- 2009.** PowerPlex® ESI 16 (16 STR lokusa + amelogenin)
- 2010.** PowerPlex® CS7 (7 STR lokusa)
- 2011.** PowerPlex® S5 Mini STR-System (4 mini STR lokusa + amelogenin)

- 2011. PowerPlex® 18D (17 STR lokusa + amelogenin)
- 2012. PowerPlex® Y23 System (23 Y-STR lokusa)
- 2012. PowerPlex® 21 (20 STR lokusa + amelogenin)
- 2012. PowerPlex® Fusion (22 autosomna STR lokusa + 1 Y-STR lokus + amelogenin)
- 2015. PowerPlex® Fusion 6C (23 autosomna STR lokusa + 3 Y-STR lokusa + amelogenin)2020. – VersaPlex™ 27PY (23 autosomna STR lokusa + 3 Y vezana lokusa + amelogenin)
- 2023. PowerPlex® 35GY (23 autosomna STR lokusa + 11 Y-STR lokusa + amelogenin + 2 indikatora kvalitete QIS i QIL)
- 2023. PowerPlex® 18E (16 autosomnih lokusa + 1 Y-STR lokus + amelogenin + 2 indikatora kvalitete QIS i QIL)

S druge strane, tvrtka Applied Biosystems razvijala je svoju AmpF/STR™ liniju STR setova:

- 1997. AmpF/STR™ Profiler™ (9 STR lokusa + amelogenin)
- 1997. AmpF/STR™ Profiler Plus™ (9 STR lokusa + amelogenin)
- 1998. AmpF/STR™ Cofiler™ (6 STR lokusa + amelogenin)
- 1999. AmpF/STR™ SGM Plus™ (10 STR lokusa + amelogenin)
- 2001. AmpF/STR™ Identifiler™ (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2002. AmpF/STR™ SEfiler™ (11 STR lokusa + amelogenin)
- 2004. AmpFLSTR™ Yfiler™ (17 Y-STR lokusa)
- 2007. AmpFLSTR™ MiniFiler™ (8 mini STR lokusa + amelogenin)
- 2007. SEFiler Plus (11 STR lokusa + amelogenin)
- 2009. AmpF/STR™ Identifiler™ Direct (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. AmpF/STR™ Identifiler™ Plus (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. AmpF/STR™ NGM (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. AmpF/STR™ NGM SElect (16 STR lokusa + amelogenin)
- 2012. GlobalFiler™ (21 autosomni STR lokus + 2 Y vezana lokusa + amelogenin)
- 2012. GlobalFiler™ Express (21 autosomni STR lokus + 2 Y vezana lokusa + amelogenin)
- 2016. Yfiler™ Plus (17 Y-STR lokusa)
- 2016./2017. VeriFiler™ Express (23 autosomna STR lokusa + Y indel + amelogenin)
- 2017./2018. VeriFiler™ Plus (23 autosomna STR lokusa + Y indel + amelogenin + 2 biljega za internu kontrolu IQCS i IQCL)
- 2017. NGM Detect™ (16 autosomnih STR lokusa + Y indel + amelogenin + 2 biljega za internu kontrolu IQCS i IQCL)

Od 2010. godine, na tržištu proizvodnje komercijalnih STR sustava pojavila se i treća tvrtka (Qiagen) koja je u relativno kratkom vremenskom razdoblju proizvela veliki broj kitova, od kojih treba izdvojiti:

- 2010. Investigator Triplex DSF (6 miniSTR lokusa + amelogenin)
- 2010. Investigator Hexaplex ESS (6 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. Investigator HDplex (12 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. Investigator IDplex (12 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. Investigator Nonaplex (13 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. Investigator ESSplex (15 STR lokusa + amelogenin)
- 2010. Investigator ESSplex SE (16 STR lokusa + amelogenin + interne PCR kontrole QS1 i QS2)
- 2015. Investigator Argus X-12 QS (12 X-STR lokusa + 1 autosomni STR lokus + amelogenin + interna PCR kontrola QS1)
- 2016. Investigator 24plex QS (21 autosomna STR lokusa + amelogenin + 1 Y-STR lokus + interne PCR kontrole QS1 i QS2)
- 2016. Investigator 24plex GO! (21 autosomna STR lokusa + amelogenin + 1 Y-STR lokus + interne PCR kontrole QS1 i QS2)
- 2021. Investigator 26plex QS (23 autosomna lokusa + amelogenin + 1 Y-STR lokus + interne PCR kontrole QS1 i QS2)
- 2022. Investigator Argus Y-28 QS (27 Y-STR lokusa + interne PCR kontrole QS1 i QS2)

Bitno je napomenuti da su za sve tri tvrtke navedeni samo osnovni PCR setovi. Na popisu su i varijante pojedinih multipleksnih sustava koje su Promega, Applied Biosystem i Qiagen proizvodili (ili još proizvode), a koji su predstavljali tehnička poboljšanja svojih ranih verzija. Osnovni motiv u razvoju multipleks sustava bio je napraviti što jednostavniji i upotrebljiviji set, koji će prihvatiti većina forenzičko-genetičkih laboratorija. Uz osnovno povećanje broja lokusa, moralo se voditi računa i o odabiru najbolje kombinacije lokusa, kako sa tehničkog, tako i sa statističkog aspekta. Prilikom odabira lokusa koji će se potencijalno uključiti u komercijalni multipleksni sustav prednost se uvijek davala STR lokusima koji:

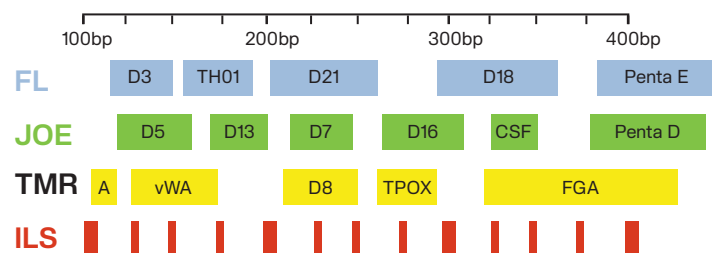
- imaju snagu diskriminacije veću od 0,9 i uočenu heterozigotnost veću od 70%
- imaju jasno izdvojenu i samostalnu kromosomsku lokaciju te nisu genetički povezani s drugim lokusima
- se mogu jasno multiplicirati u kombinaciji s drugim biljezima
- imaju nisku stopu mutacije
- imaju alele čija dužina se kreće između 90 i 500 bp (Primorac *et al.*, 2008).

Nakon 1998. godine, kada je FBI uveo CODIS sustav koji je definirao 13 osnovnih STR lokusa koji se moraju koristiti u svakoj analizi čiji se rezultat želi ugraditi u nacionalnu DNA bazu podataka, dva su seta postala najtraženija i najkorištenija u forenzičkim analizama DNA: PowerPlex® 16 i AmpF/STR™ Identifiler™, a uz njih i Investigator IDplex kit. Slična se stvar dogodila kada je ENFSI 2009. odlučio proširiti dotadašnji ESS set lokusa s pet novih, pa su od 2010. godine, posebno na europskom tržištu, izuzetno traženi postali setovi PowerPlex® ESX i ESI, AmpF/STR™ NGM i Investigator ESSplex. Sličan trend nastavio se do danas, kao što će biti jasno iz detaljnijeg pregleda dostupnih PCR kitova (u nastavku ovog poglavlja).

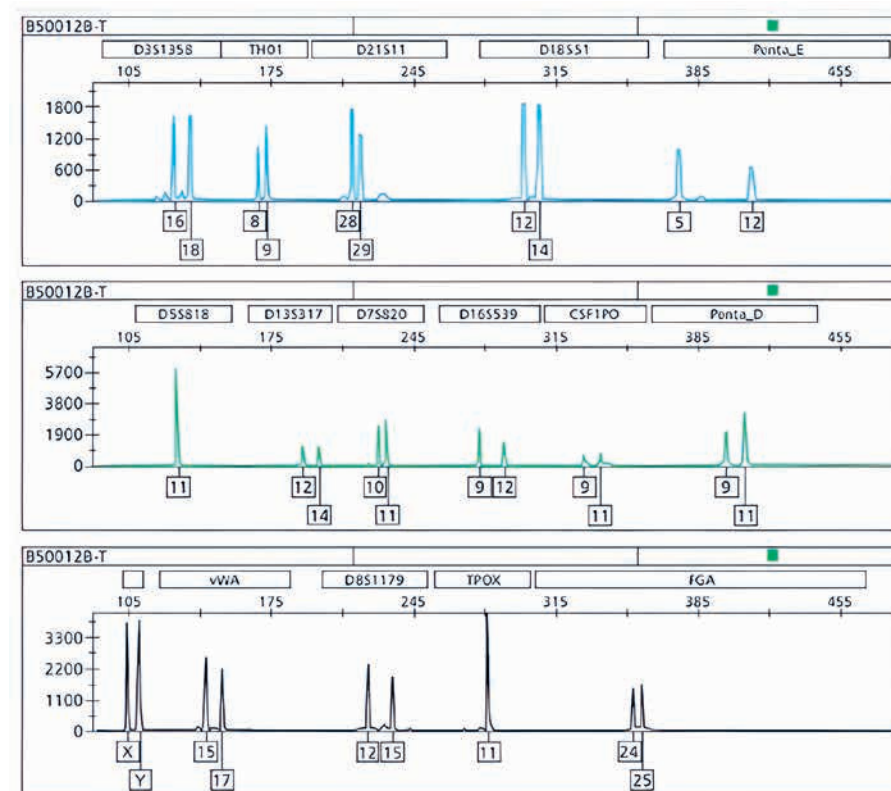
4.8.2.1. PowerPlex® 16 sustav

PowerPlex® 16 dozvoljava koamplifikaciju i trobojnu detekciju 16 lokusa (15 STR lokusa i amelogenin). Svaki od ovih lokusa jasno je lociran u genomu i određena mu je repetitivna jedinica. Uključeno je 13 STR tetranukleotidnih (tzv. standardnih CODIS lokusa) i dva pentanukleotidna lokusa. Preamplifikacijska komponenta mu se bazira na puferu (Gold ST★R 10X Buffer), koji sadrži sve komponente neophodne za realizaciju PCR faze (uključujući i *Taq* polimerazu koja se u ranijim verzijama ovog sustava odvojeno dodavala) i tri seta početnica (slika 4.43.):

- početnice za lokuse Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, obilježene fluoroscinom (FL - plava boja)
- početnice za lokuse FGA, TPOX, D8S1179, VWA, Amelogenin, obilježene karboksi-tetrametilrodaminom (TMR - žuta boja)
- početnice za lokuse Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, obilježene 6-karboksi-4',5'-dihloro-2',7'-dimetoksi fluorescinom (JOE - zelena boja).



SLIKA 4.43. Prikaz raspona veličina fragmenata (engl. size range) internog standarda i STR biljega PowerPlex® 16 seta i njihovog rasporeda u bojama koje su korištene za označavanje i detekciju.



SLIKA 4.44. Računalni prikaz obrađenih rezultata analize DNA (elektroferogram) nakon korištenja PowerPlex® 16 sustava analiziranog na ABI 310 genetičkom analizatoru.

Prilikom dizajniranja pojedinačnih DNA proba, koristi se propisana receptura koja preporučuje ukupni volumen reakcije od 25 µl, od čega, u standardnoj PCR analizi, oko 10% otpada na volumen DNA uzorka dobivenog u procesu izolacije.

Postamplifikacijski dio ovog seta sadrži sve reagense neophodne za automatsku detekciju i analizu dobivenih rezultata. Interni standard (engl. *Internal Lane Standard*, ILS) neophodan je za analizu veličine fragmenata (engl. *sizing analysis*). Sastoji se od 22 umjetno sintetizirana jednolančana DNA fragmenta u rasponu od 60-600 bp. Svaki je fragment označen karboksirodaminom i detektira se crvenom bojom. Upotrebom ovoga standarda određuje se relativna migracijska pozicija svakoga fragmenta koja ovisi samo o dužini tog fragmenta, a ne i o njegovoj sekvenci. PowerPlex® 16 Allelic Ladder Mix je alelni standard koji je mješavina velikog broja DNA fragmenata i sadrži sve ranije opisane alelne

varijante u različitim populacijama na lokusima koji se analiziraju. Kombiniranjem upotrebom ILS-a i alelnog standarda te primjenom odgovarajućih softvera, svaka alelna varijanta automatski dobiva svoju brojnu oznaku.

Već je ranije spomenuto, ali nije naodmet ponoviti, da vjerojatnost postojanja dvije nesrodne osobe s identičnim alelnim varijantama na 15 STR lokusa, zastupljenih u PowerPlex® 16 kitu (slika 4.44.) kreću se uobičajeno u rang od 10^{-19} do 10^{-17} . To dovoljno govori o stupnju diskriminacije i individualizacije koji pruža primjena ovog kompleksa reagensa.

4.8.2.2. PowerPlex® ESX / ESI

PowerPlex® ESX 16 i ESI 16 sustavi dozvoljavaju koamplifikaciju i četverbojnu trobojnu detekciju 16 lokusa (15 STR lokusa i amelogenin), dok je u verzijama **PowerPlex® ESX 17 i ESI 17** broj STR lokusa povećan na 17, jer pored 15 standardnih uključuje i analizu izuzetno informativnog SE33 lokusa. Svi STR biljezi uključeni u ove setove su tetranukleotidi, osim D22S1045 koji je trinukleotidni genetički biljeg. Standardni PowerPlex® ESX i ESI 16 sustavi predstavljaju zanimljivu kombinaciju STR lokusa. Naime, u ove setove uključeno je osam tzv. CODIS STR lokusa (D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D16S539), dva lokusa koja su bila u sastavu Identifilera (D2S441, D19S433), pet ESS genetičkih biljega (D10S1248, D22S1045, D1S1656, D12S391, D2S1338) i amelogenin kao genetički biljeg za spol. U detekciji STR biljega koriste se četiri boje, i to plava (FL), zelena (JOE), žuta/crna (TMR-ET) i crvena (CXR-ET). Za razliku od prethodnih sustava iz PowerPlex® serije, Pplex_ILS500 interni standard veličine detektira se u narančastom spektru i uključuje 21 fragment veličine od 60 do 500 bp.

Osnovna prednost ESX i ESI serije sustava u odnosu na prethodne iz PowerPlex® serije predstavlja veći broj STR biljega koji su po svojoj veličini manji od 200 bp i tako pripadaju skupini mini STR biljega, prikladnih za analizu degradirane DNA, zatim novi PCR pufer koji je manje osjetljiv na prisutnost PCR inhibitora, te uključivanje novih ESS visokoinformativnih STR lokusa, uz standardne CODIS lokuse.

Zanimljivo je da je Promega istovremeno na tržište stavila dvije verzije seta. U ESX verziji, novi ESS lokusi svrstani su u miniSTR model (ispod 200 bp), dok su ostali lokusi izvedeni u standardnom STR modelu. S druge strane, u ESI verziji seta, miniSTR model namijenjen je CODIS STR biljezima dok su ESS lokusi, te D2S441 i D19S433 izvedeni u standardnom STR modelu. Osnovna ideja ovog koncepta je da se za isti uzorak u kojem je DNA jako degradirana kroz dvije reakcije upotrebom ova dva sustava dobiju rezultati barem na miniSTR lokusima te da se spajanjem rezultata tih odvojenih reakcija na istom uzorku dobije DNA profil na što većem broju lokusa.

Najvažnije prednosti korištenja nove serije PowerPlex® ESX i ESI multipleks STR sustava su mogućnost analize malih količina degradirane DNA, kao i tragova koje karakterizira povišena prisutnost PCR inhibitora. Arheološki koštani uzorcipripadaju toj skupini tragova. Stoga, nije neuobičajeno da su upravo ova dva multipleks STR sustava bila odabrana za inicijalne studije arheoloških koštanih uzoraka pronađenih u srednjovjekovnim grobnicama s ovih prostora. Od velikog broja rezultata, zanimljivo je izdvojiti DNA profile dobivene iz skeletnih ostataka pronađenih na arheološkim lokalitetima Zgošće i Bobovca u Bosni i Hercegovini primjenom ove serije multipleks STR sustava.

Naime, u razdoblju od 2011. do 2012. godine intenzivirane su analize DNA skeletnih ostataka s ovih povijesno bitnih lokacija. Bobovac je srednjovjekovni bosanski kraljevski grad, a Zgošća je lokalitet za koji se s visokom sigurnošću može tvrditi da predstavlja originalnu lokaciju nadaleko poznatog Zgoščanskog stečka, koji je 1913. prilikom otvaranja Zemaljskog muzeja u Sarajevu prenesen s originalne lokacije u atrij muzeja. U sklopu ovog projekta analizirano je više skeletnih ostataka, od čega treba izdvojiti skeletne ostatke za koje se tvrdi da najvjerojatnije pripadaju preposljednjem bosanskom kralju Stjepanu Tomašu, pokopanom na Bobovcu, te skeletne ostatke nepoznate osobe za koju se tvrdi da je bila sahranjena ispod Zgoščanskog stečka i za koju se pretpostavlja da bi mogla biti u bliskom srodstvu sa srednjovjekovnim bosanskim vladarima. Primjenom PowerPlex® ESI multipleks sustava, generirani su parcijalni, ali izuzetno informativni DNA profili. Štoviše, na osnovu ovih DNA profila, kao i DNA profila dobivenih iz ostalih skeletnih ostataka pronađenih na ovim lokalitetima, postavljena je preliminarna hipoteza o potencijalnom srodstvu ovih osoba.

Činjenica da je analiza skeletnih ostataka metodom datiranja radioaktivnim izotopom ugljika ^{14}C pokazala da kostur s Bobovca potječe s početka 15. stoljeća, a da kostur iz Zgošće potječe vjerojatno iz prve polovine 13. stoljeća, dodatno ukazuju na visoku učinkovitost ovih STR sustava u analizi arheoloških koštanih uzoraka. Bitno je napomenuti da je ovaj projekt realiziran u suradnji bosanskohercegovačkih povjesničara, arheologa, antropologa, novinara i genetičara (Marjanović *et al.*, 2011b, 2012).

4.8.2.3. PowerPlex® 21

PowerPlex® 21 sustav je multipleks STR set koji koristi kombinaciju 5 boja i amplificira 20 STR lokusa (D1S1656, D2S1338, D3S1358, D5S818, D6S1043, D7S820, D8S1179, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, CSF1PO, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX i vWA) i amelogenin. Početnice za navedene lokuse obilježene su koristeći boje: FL (plava), JOE (zelena), TMR-ET (žuta) i

CXR-ET (crvena). Umnoženi uzorci identificirani su veličinom pomoću internog standarda (ILS500, WEN boja) koji je zamijenio CC5 ILS500, prvobitno korišten s ovim kitom. WEN boja ima jače emitiranje i bolju fotostabilnost u usporedbi s CC5 bojom. WEN ILS500 sadrži 21 standardni jednolančani DNA fragment za analizu veličine fragmenata. Prema informacijama proizvođač set dizajniran je s većom tolerancijom na inhibitore, što je od velikog značaja za izazovne uzorke zbog veće uspješnosti i manjeg gubitka lokusa. PowerPlex® 21 zahtijeva PCR reakciju koja traje približno 90 minuta.

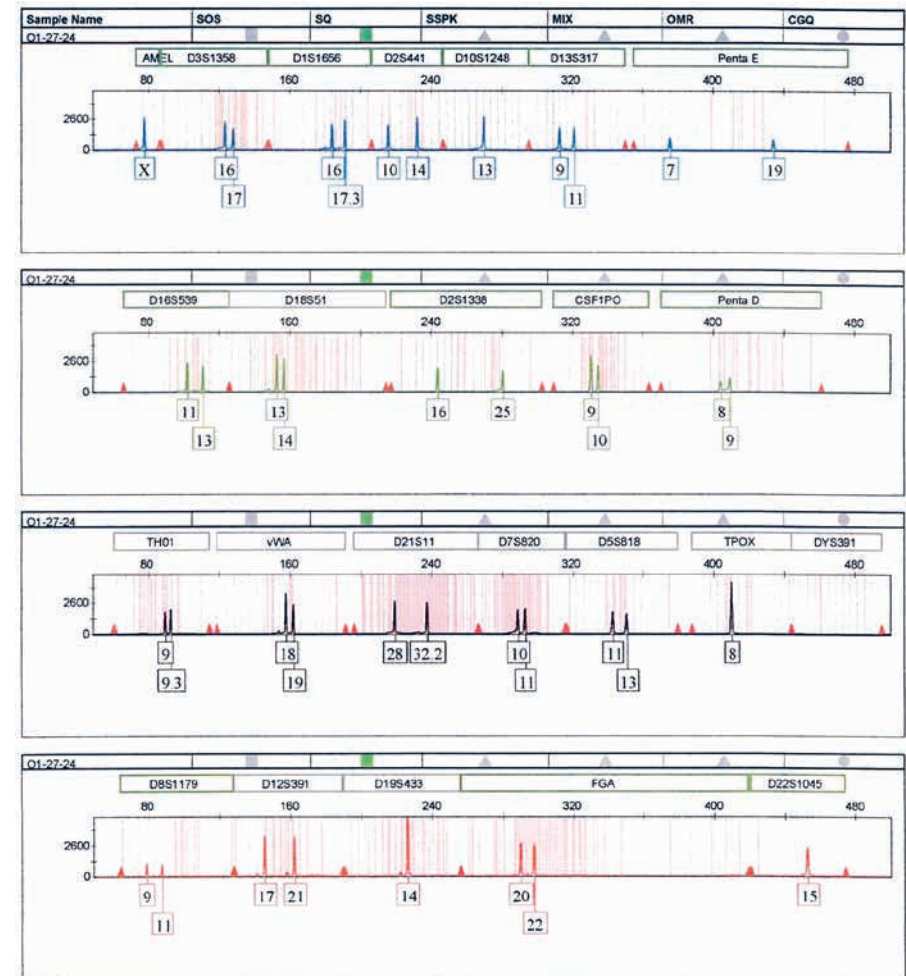
Velika prednost ovog kita je visoka snaga diskriminacije. U validacijskoj studiji, više od 95% alela je genotipizirano sa svega 50 pg DNA u reakciji (Ensenberger *et al.*, 2014). Ista studija navodi da je kumulativna vjerojatnost uključivanja za ovaj set 7×10^{-27} dok je kumulativna vjerojatnost uključivanja za PowerPlex® 16 kit bila 3×10^{-19} .

4.8.2.4. PowerPlex® Fusion / Fusion 6C

PowerPlex® Fusion sustav omogućava koamplifikaciju amelogenina i 23 STR lokusa koristeći 5 boja, uključujući 13 CODIS lokusa, 12 ESS lokusa, kao i muški specifični DYS391 lokus, koji je uključen kako bi se identificirali muškarci koji nemaju Y alel amelogenina. Dodatno, Penta D, Penta E, D2S1338 i D19S433 lokusi uključeni su kako bi se povećala snaga diskriminacije, kao i omogućila upotreba baza podataka koje sadrže profile s ovim lokusima (slike 4.45. i 4.46.). S druge strane, **PowerPlex® Fusion 6C System** koristi čak 6 boja za obilježavanje fragmenata i omogućava direktnu amplifikaciju 27 lokusa, uključujući 23 autosomna STR-a, 3 Y-STR-a (DYS570, DYS576 i DYS391) i amelogenin. Od 23 autosomna lokusa, 18 su prošireni CODIS lokusi (CSF1PO, FGA, TH01, vWA, D1S1656, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433 i D21S11), dok su Penta D, Penta E, D22S1045, TPOX i SE33 lokusi uključeni u set radi poboljšanja diskriminacijske moći. Y vezani biljezi su DYS391, DYS570 i DYS576, pri čemu su posljednja dva visokomutirajući Y-STR-ovi. Ne uključujući amelogenin ili Y-STR biljege, moć isključivanja za PowerPlex® Fusion je $1,38 \times 10^{-28}$, a za PowerPlex® Fusion 6C je $9,09 \times 10^{-31}$.

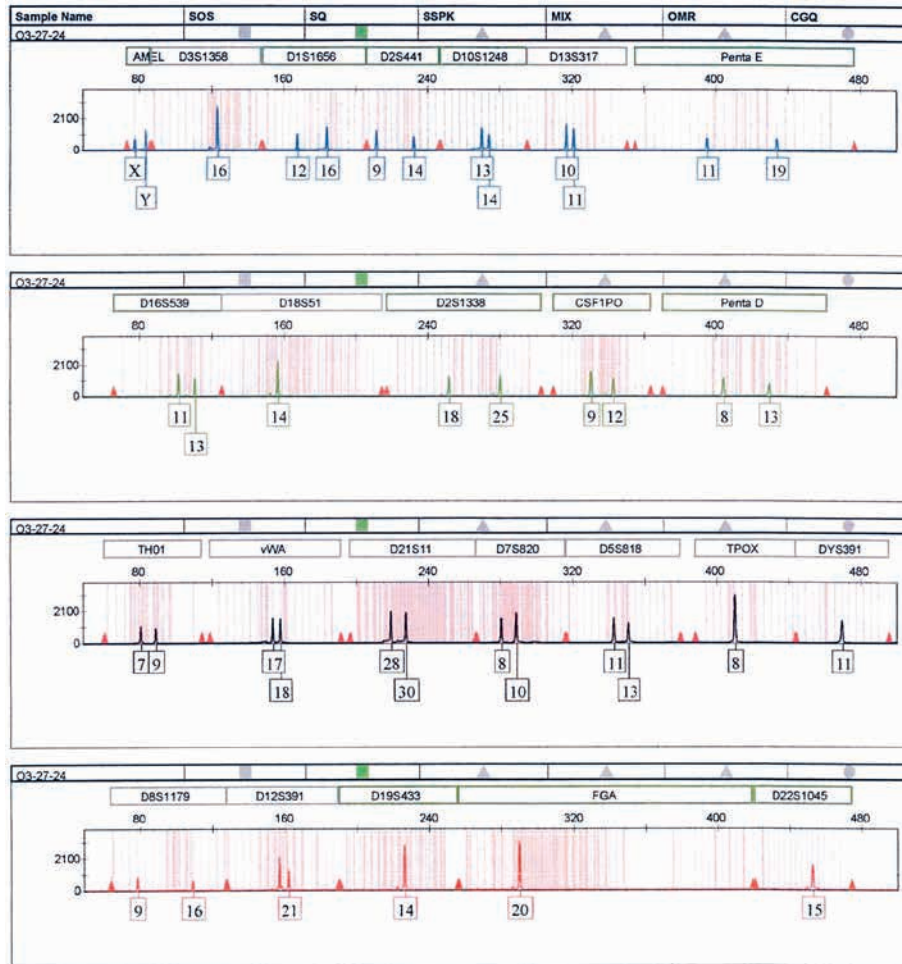
4.8.2.5. PowerPlex® 35GY

PowerPlex® 35GY System je prvi set tvrtke Promega koji koristi 8 fluorescentnih boja za obilježavanje fragmenata. Zahvaljujući ovoj inovaciji, set koristi povećan broj biljega, i to 23 autosomna STR-a, 11 Y-STR-ova i amelogenin, a uz to i dva indikatora kvalitete (QIS i QIL). Set je dizajniran tako da prati tehnološke inova-



SLIKA 4.45. DNA profil ženske osobe generiran korištenjem PowerPlex® Fusion System amplifikacijskog kita, nakon obrade podataka.

cije na tržištu po pitanju instrumenata i optimiziranja upotrebu s novim Spectrum CE i Spectrum Compact CE uređajima. Uz mogućnost ubrzane PCR amplifikacije za kvalitetne i nesporne uzorke iz baze podataka, set je dodatno optimiziran za izazovne i degradirane uzorke DNA, budući da čak 15 autosomnih STR lokusa ima ampliton kraći od 250 bp i pripada u kategoriji miniSTR sekvenci. Popis analiziranih lokusa vidljiv je na slici 4.47. Osam korištenih boja su sljedeće: FL (plava), JOE (zeleni), AQA (tirkizna), TMR (žuta), CXR (crvena), TOM (ljubičasta), WEN (narančasta) i CCO (smeđa, za označavanje internog standarda veličine).

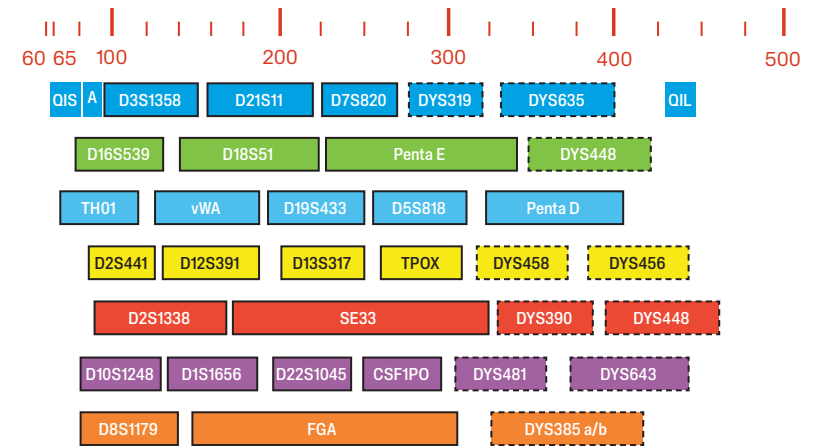


SLIKA 4.46. DNA profil muške osobe generiran korištenjem PowerPlex® Fusion System amplifikacijskog kita, nakon obrade podataka.

4.8.2.6. AmpFISTR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit

AmpF/STR™ Identifiler™ PCR Amplification Kit je također multipleksni STR set kojim se istovremeno može analizirati 15 tetranukleotidnih STR lokusa. Sadrži 13 CODIS lokusa, uz dva dodatna D2S1338 i D19S433. Ovaj sustav se bazira na postojanju četiri seta početnica:

- lokusi D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO obilježeni su plavom bojom 6-FAM



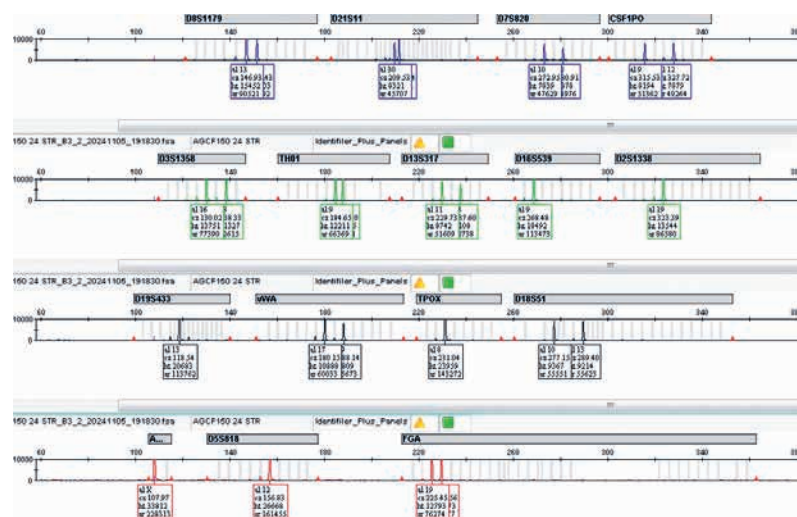
SLIKA 4.47. Spisak markera iz PowerPlex® 35GY System-a, uključujući njihove dužine u bp. Autosomalni markeri su predstavljeni punim okvirima, dok su Y-STR-ovi označeni isprekidanim okvirima (dijelovi slike preuzeti iz Graham *et al.*, 2024).

- lokusi D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338 obilježeni su zelenom bojom VIC
- lokusi D19S433, TPOX, vWA, D18S51 obilježeni su žutom bojom NED
- Amelogenin, D5S818, FGA obilježeni su crvenom bojom PET.

U usporedbi s Promeginim sustavima, osim što se koriste kemijski drugačije boje, Identifileru je dodana peta narančasta boja LIZ kojom je obilježen interni standard veličina koji se sastoji od fragmenata dužine do 500 bp. Vjerojatnost da postoje dvije nesrodne osobe s identičnim alelnim varijantama na 15 STR lokusa, zastupljenih u Identifiler kitu, npr. za bjelačko stanovništvo SAD-a, iznosi $5,01 \times 10^{-19}$ (slike 4.48. i 4.49.).

4.8.2.7. AmpFISTR™ NGM / NGM SElect PCR Amplification Kit

AmpFISTR® NGM PCR Amplification Kit dozvoljava koamplifikaciju i četverbojnu detekciju 16 lokusa (15 STR lokusa i amelogenin) dok je u verziji **AmpFISTR® NGM Select** ovim STR biljezima dodan polimorfni lokus SE33. Set predstavlja proširenu verziju sustava AmpF/STR™ SGM Plus i obuhvaća njegovih 10 standardnih lokusa (D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D16S539, D2S1338, D19S433) te pet preporučenih ESS lokusa D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, od čega su prva tri u kategoriji miniSTRmodelu. Jedini trinukleotidni biljeg u ovim setovima je D22S1045 dok su ostali tetranukleotidi.



SLIKA 4.48. Prikaz kompjuterski obrađenih rezultata analize DNA (elektroferogram) nakon korištenja AmpFISTR™ Identifier™ PCR Amplification sustava, ženska osoba.



SLIKA 4.49. Prikaz kompjuterski obrađenih rezultata analize DNA (elektroferogram) nakon korištenja AmpFISTR™ Identifier™ PCR Amplification sustava, muška osoba.

U detekciji STR biljega koriste se četiri boje, i to plava (6-FAM), zelena (VIC), žuta (NED) i crvena (PET). Interni standard za veličinu 500 LIZ detektira se u narančastom spektru i sadrži 16 fragmenata u rasponu od 35 do 500 bp. U odnosu na svoje prethodnike iz Applied Biosystems serije multipleks STR sustava, osnovna prednost ovog sustava jest veći broj STR biljega koji su po svojoj veličini manji od 200 bp i tako pripadaju skupini miniSTR biljega prikladnih za analizu degradirane DNA. Još jedna prednost jest i nova formulacija PCR pufera, koji bi trebao biti manje osjetljiv na prisutnost PCR inhibitora, te uključivanje ESS visokoinformativnih STR lokusa u kombinaciji sa CODIS STR lokusima zastupljenim u prethodnim multiplekssustavima.

4.8.2.8. GlobalFiler™ PCR Amplification Kit

GlobalFiler™ PCR Amplification Kit je prvi 6-bojni fluorescentni STR set tvrtke Applied Biosystems koji omogućava amplifikaciju 24 lokusa (amelogenin, 21 autosomni STR lokus (D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338), jedan Y-STR (DYS391) i jedan Y indel). Detekcija različitih lokusa omogućava se korištenjem boja 6-FAM (plava), VIC (zelena), NED (žuta), TAZ (crvena) i SID (ljubičasta). Veličina fragmenata DNA određuje se pomoću specifičnih softvera kao što su GeneScan®, GeneMapper™ ID-X, GeneMarker®HID, koristeći interni standard veličina 600 LIZ u narančastom spektru boje. Amplifikacija se može završiti za otprilike 80 minuta, a puni profili mogu se dobiti sa 125 pg ulazne DNA.

Velika prednost ovog seta je 10 miniSTR lokusa s dužinom amplicona ispod 220 bp. Prema informacijama proizvođača, tih 10 miniSTR lokusa ima vrlo visoku snagu diskriminacije od $9,2 \times 10^{-12}$, što je vrlo korisno pri radu s visoko degradiranim uzorcima. Snaga diskriminacije svih STR lokusa GlobalFiler™ seta je također vrlo visoka, jer je vjerojatnost da će dvije nasumično odabrane osobe iz bjelačke populacije u SAD-u imati identičan genotip $3,71 \times 10^{-26}$ (Ludeman *et al.*, 2018).

4.8.2.9. VeriFiler™ Plus / VeriFiler™ Express PCR Amplification Kit

VeriFiler™ Plus kit, s 11 miniSTR lokusa, posebno je dizajniran za izazovne tipove uzoraka kao što su kontakti tragovi, inhibirani ili degradirani uzorci jer je poboljšana osjetljivost i mogućnost prevladavanja inhibicije. Uz navedeno, interni sustav kontrole kvalitete (engl. *Internal Quality Control, IQC*) procjenjuje prisutnost inhibitora u uzorku, kako bi omogućio razlikovanje između degradiranih i inhibiranih uzoraka, što može pomoći forenzičkim analitičarima da donesu bolje odluke o daljnjoj obradi problematičnih uzoraka. IQC sustav također potvrđuje

PCR amplifikaciju. Iako je optimiziran za forenzičke uzorke, podržana je i direktna amplifikacija referentnih uzoraka iz jednog izvora. **VeriFiler™ Express kit** nudi superiornu snagu diskriminacije i visok protok uzoraka, s efikasnom obradom uzoraka iz jednog izvora u samo dva sata.

Oba kita temelje se na multipleks sustavu za istovremenu analizu 25 biljega, koji se donekle razlikuju između ova dva sustava.

4.8.2.10. Investigator IDplex kit

Investigator IDplex kit je multiplekSTR set kojim se istovremeno može analizirati 15 tetranukleotidnih STR lokusa, uključujući 13 CODIS biljega te dva dodatna lokusa (D2S1338 i D19S433). Ovaj sustav čine početnice obojenih jednom od četiri boje, i to:

- lokusi Amelogenin, TH01, D3S1358, vWA, D21S11 obilježeni su plavom bojom 6-FAM
- lokusi TPOX, D7S820, D19S433, D5S818, D2S1338 obilježeni su zelenom bojom BTG
- lokusi D16S539, CSF1PO, D13S317, FGA obilježeni su žutom bojom BTY
- lokusi D18S51, D8S1179 su obilježeni crvenom bojom BTR.

DNA size standard 550, pandan je internim standardima veličina LIZ ili ILS, iz već spomenutih multipleks sustava, a sastoji se od 26 sintetiziranih jednolančanih DNA fragmenta, u rasponu 60-550 bp. Svaki je fragment označen BTO fluorescentnom bojom i detektira se u narančastom spektru. Generirani DNA profil sadrži detektirane alelne varijante na 15 STR lokusa i spolnom biljegu amelogeninu.

4.8.2.11. Investigator ESSplex / ESSplex SE sustavi

Investigator ESSplex kit obuhvaća 15 polimorfnih STR lokusa prema preporuci Europske mreže forenzičkih instituta (engl. *The European Network of Forensic Science Institutes, ENFSI*), a to su D1S1656, D2S441, D2S1338, D3S1358, D8S1179, D10S1248, D12S391, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, D22S1045, FGA, TH01 i vWA, te amelogenin kao lokus za određivanje spola. U detekciji STR biljega koriste se četiri boje i to plava (6-FAM), zelena (BTG), žuta (BTY) i crvena (BTR). *DNA Size Standard 550* se detektira u narančastom spektru (BTO boja) i sadrži 26 fragmenata u rasponu 60-550 bp. Ovaj set izuzetno je osjetljiv (uspješno analizirani uzorci s <1 ng DNA) te omogućava analizu degradirane DNA, uzoraka s prisutnim povećanim koncentracijama PCR inhibitora i forenzičko-statistički je informativan. Unaprijeđena verzija naziva se **Investigator ESSplex SE**,

a karakteristična je po tome što pored navedenih lokusa, u PCR reakciji istovremeno analizira i SE33.

4.8.2.12. Investigator 24plex QS / 24plex GO! sustavi

Investigator 24plex QS set omogućava amplifikaciju 22 autosomna STR biljega, uključujući sve CODIS i ESS lokuse, kao i polimorfni SE33, Y-STR DYS391 i amelogenin lokus, pri tome koristeći pet Qiagenovih fluorescentnih boja. Ovaj set za identifikaciju uključuje inovativni senzor kvalitete, koji omogućava generiranje dodatnih podataka od značaja za kontrolu kvalitete i testove performansi. **Investigator 24plex GO!** set je modifikacija originalnog seta, a direktnu amplifikaciju iz referentnih uzoraka bez prethodne ekstrakcije DNA.

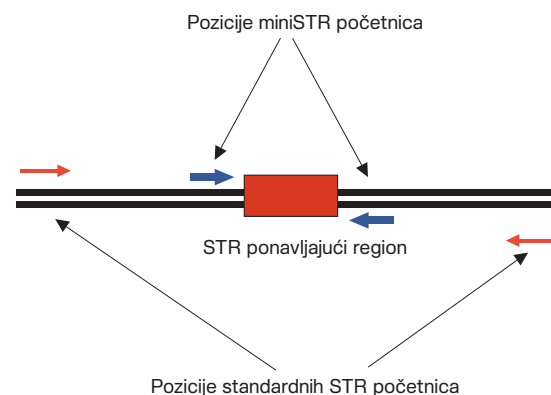
Ovi sustavi koriste tehnologiju brzog PCR umnožavanja kako bi pružili pouzdane rezultate za približno 45-60 minuta. Optimizirani su za lakše rukovanje, povećanu brzinu i osjetljivost. Testiranje seta u prisutnosti različitih koncentracija inhibitora pokazuju superiornu otpornost na njih. To omogućava pouzdane, visokokvalitetne rezultate iz forenzičkih, ali i iz direktne amplifikacije tipičnih referentnih uzoraka kao što su krv ili epitelne stanice na FTA kartici. Preporučena količina DNA pod standardnim uvjetima za Investigator 24plex QS kit je 0,5 ng. Interna validacija pokazala je robusne i uravnotežene rezultate s 0,2 do 2 ng DNA, te pouzdane rezultate s manje od 0,1 ng DNA.

Inovativni senzori kvalitete pružaju dodatne informacije o kvaliteti uzorka i uspjehu PCR-a, osim samog profila uzorka. Uz amplifikaciju dva senzora kvalitete kao pozitivne kontrole, moguće je odrediti: je li amplifikacija bila uspješna, je li DNA bila prisutna u uzorku, je li uzorak bio degradiran te jesu li inhibitori u uzorku utjecali na uspješnost PCR-a.

Dva biljega za spol, amelogenin i DYS391, optimizirana su za proizvodnju malih fragmenta, čime se određivanje spola čini izuzetno pouzdanim. To znači da više neće biti neuspjeha u određivanju spola ni s degradiranim ili inhibiranim uzorcima, čak i kod populacija s tzv. *null* mutacijama u amelogeninu zbog kojih se aleli ne bi umnožili.

4.8.3. MiniSTR sustavi

Analiza degradiranih uzoraka predstavlja velik izazov u području forenzičke genetike. Novi pristup u ovom području dao je dobre rezultate, a radi se o tzv. **miniSTR** molekularnim biljezima, koji predstavljaju izmijenjenu verziju već postojećih standardnih STR DNA sekvenci, čija se modifikacija primarno zasniva na pomicanju, tj. približavanju početnica ovih lokusa njihovom polimorfnom dijelu (Coble, Butler, 2005; slika 4.50.). Na taj način smanjuje se ukupna molekularna



SLIKA 4.50. Princip miniSTR tehnologije – pomicanje početnica prema varijabilnoj regiji.

težina, tj. veličina ovih biljega izražena u baznim parovima i otvara se mogućnost njihove primjene u slučajevima analize jako kratkih fragmenata DNA tj. kada je DNA iznimno degradirana. Svoju primjenu već su doživjeli u analizi i identificiranju žrtava terorističkih napada na New York, tj. identifikaciji žrtava iz Svjetskog trgovačkog centra, ali i u identifikaciji žrtava Drugog svjetskog rata (Marjanović *et al.*, 2009).

Već nekoliko godina na tržištu postoje miniSTR sustavi kojima se namjerava omogućiti istovremena analiza određenog broja ovih biljega. Noviji pristup ovom problemu podrazumijeva kombinaciju standardnih i miniSTR lokusa u istom sustavu, kako bi se omogućila analiza što šireg spektra uzoraka koristeći iste reagense. Ono što je važno napomenuti jest da isključivo miniSTR sustavi ne moraju predstavljati multipleks STR sustave u pravom smislu te riječi, jer bi to podrazumijevalo mogućnost analize isključivo više od 10 miniSTR lokusa istovremeno (u jednoj reakciji). Upravo ta činjenica jedan je od ograničavajućih faktora primjene miniSTR sustava, s obzirom na njihovu reduciranu forenzičko-statističku informativnost u procesu individualizacije biološkog traga.

Najpoznatiji miniSTR sustav je **AmpFISTR™ MiniFiler™ PCR Amplification and Typing Kit** (Applied Biosystems) koji se temelji na četverbojnoj detekciji 8 STR lokusa (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO, FGA) i amelogenina. Svi su lokusi pozicionirani u rasponu 70-283 bp. Dosadašnja primjena ovog seta pokazala je da se prihvatljivi rezultati i DNA profili dobivaju i za znatno manjom količinom DNA od 100 pg, kao i u slučajevima veće prisutnosti pojedinih PCR inhibitora.

PowerPlex® S5 System je STR sustav koji se zasniva na dvobojnoj detekciji 4 STR lokusa (D18S51, D8S1179, FGA i TH01) i amelogenina. U tu svrhu koriste se

dvije boje: plava (FL) i zelena (JOE). Kao interni standard veličina upotrebljava se ranije opisani ILS koji se detektira u crvenom dijelu spektra, veličine 60-600 bp. On se ustvari ne može smatrati pravim miniSTR sustavom jer je lokus D8S1179 i manji dio FGA lokusa pozicioniran u rasponu između 200 i 260 bp. Ipak, s obzirom da je većina lokusa u ovom STR sustavu ipak u kategoriji miniSTR-a, može se smatrati kombinacijom miniSTR i STR genetičkih biljega u kojoj miniSTR dio dominira.

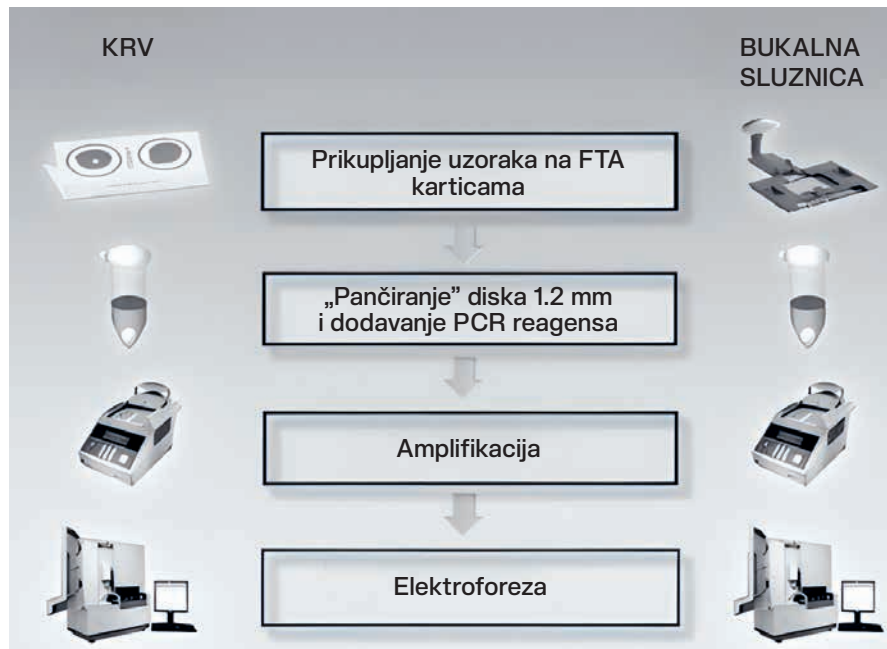
Zanimljivo je da je ovaj miniSTR sustav prvenstveno zamišljen kao brzi test probira, tzv. *PCR screening test*, kojim se utvrđuje količina i kvaliteta izolirane DNA te se na osnovu dobivenih rezultata određuje optimizirani protokol za PCR fazu primjenom standardnog STR multipleks sustava. No, prethodna istraživanja pokazala su da se, u kombinaciji s drugim miniSTR sustavom, uspješno može koristiti u analizi zahtjevnih bioloških tragova, poput starijih skeletnih ostataka.

Tijekom 2010. godine, kompanija Qiagen kreirala je dva miniSTR kita, **Investigator Triplex DSF** i **Investigator Triplex AFS QS**. Prvim sustavom omogućena je detekcija 3 STR lokusa: D3S1358, SE33 i FGA, u plavom (6-FAM) i zelenom (HEX) spektru dok je drugim sustavom omogućena detekcija dva STR lokusa (FGA i SE33) zajedno s amelogeninom. Iste godine, pojavio se i miniSTR sustav **Investigator Hexaplex ESS** kojim je omogućena detekcija svih ESS lokusa (D1S1656, D2S441, D10S1248, D12S391, D22S1045), zajedno s TH01 i amelogeninom, i to u tri boje: plava (6-FAM), zelena (BTG) i žuta (BTY). Kao interni standard veličina za ovaj STR sustav korišten je ranije opisani *DNA Size Standard 550* koji se detektira u narančastom spektru. Svi lokusi stavljeni su u raspon veličine do 225 bp.

Kao što je već spomenuto, u posljednjih nekoliko godina nisu proizvedeni novi, isključivo miniSTR setovi. Umjesto toga, tri vodeće kompanije odabrale su povećati broj lokusa analiziranih u jednoj reakciji, najviše zahvaljujući korištenju većeg broja fluorescentnih boja za označavanje, pa su na tržištu ponudile kitove koji simultano analiziraju različite vrste biljega, uključujući tipične autosomne STR biljege, Y-STR-ove, ali i miniSTR lokuse. Na taj se način postiže ciljanje većeg udjela tržišta i mogućnost primjene jednog komercijalnog seta za što više svrha. Dobar primjer ovakvog pristupa su Promegini PowerPlex® ESI i ESX sustavi, koji su trenutno najpopularniji za analizu starog i degradiranog materijala, a o kojima je ranije bilo riječi.

4.8.4. Direktni amplifikacijski STR sustavi

U posljednje vrijeme, a s ciljem brže, jednostavnije i jeftinije analize nespornih tragova, prvenstveno prikupljenih s namjenom kreiranja forenzičkih bazaDNA podataka, optimiziraju se postupci koji u potpunosti zaobilaze korak izolacije



SLIKA 4.51. Model direktnog PCR-a u kojem se za određeni tip uzoraka u potpunosti preskače korak izolacije DNA.

DNA iz ovog tipa tragova. Naime, model **direktnog PCR-a** podrazumijeva direktnu amplifikaciju STR biljega iz uzoraka prikupljenih nekom od različitih vrsta kolektora (slika 4.51.). Ovaj postupak nije primjenjiv na izazovne uzorke i u principu se ne koristi za forenzičke uzorke prikupljene na mjestu zločina. Dva najčešća početna tipa uzoraka su tragovi krvi prikupljeni na FTA® karticama ili uzorci brisa bukalne sluznice.

Većina setova novijeg datuma proizvodnje optimizirana je za ovaj način procesiranja uzoraka ili se lako može izmijeniti i koristiti, stoga je većina tih kitova već spomenuta, poput Applied Biosystems sustava AmpF/STR™ Identifier™ Direct PCR Amplification Kit, AmpF/STR™ NGM Select Express Kit, VeriFiler™ Express PCR Amplification Kit, te Qiagenovog Investigator 24plex GO! sustava. Kada je u pitanju Promega, tu su PowerPlex® sustavi 21, Fusion i Fusion 6C. **PowerPlex® 18D System** trebalo bi dodatno spomenuti kao kit koji omogućava direktnu amplifikaciju 18 STR lokusa, uključujući 13 CODIS lokusa, kao i Penta E, Penta D, D2S1338, D19S433 i amelogenin, kroz direktnu amplifikaciju uzoraka prikupljenih na FTA® karticama za manje od sat i pol vremena.

4.9. NAJČEŠĆI IZAZOVI U PROCESU FORENZIČKE ANALIZE DNA

Proces forenzičke analize DNA uistinu može pružiti zanimljive i važne rezultate i kao takav predstavlja jako znanstveno oruđe. Ipak, ovaj proces, kao i svaka molekularno-genetička metoda, ima svojih izazova, tzv. uskih grla, koji ga bitno kompliciraju i koji mogu, u najmanju ruku, predstavljati izazov u interpretaciji dobivenih rezultata. No, za razliku od mnogih drugih disciplina, forenzička genetika se ne susreće s izazovima vezanim uz optimizaciju pojedinih laboratorijskih postupaka i protokola, već i s izazovima u osiguravanju adekvatnih laboratorijskih standarda, kao i u prezentaciji rezultata analize DNA na sudu.

4.9.1. Analiza tragova koje karakterizira prisutnost malih količina DNA

Forenzička genetika u posljednjim godinama bilježi velike uspjehe, kako u pravcu razvoja novih tehnika, tako i u smislu njihove konkretne primjene. Upravo taj razvoj dopustio je da se granice mogućnosti generiranja DNA profila pomiču skoro svaki dan. Optimizacija postupaka izolacije DNA i PCR protokola omogućila je da se danas uspješno analiziraju i na sudu interpretiraju rezultati za tragove koje karakterizira prisutnost izuzetno malih količina DNA. U posljednje vrijeme sve je više tragova poput arheoloških skeletnih ostataka ili kontaktnih tragova epitelnih stanica (engl. *touch DNA samples*), koji se uspješno mogu analizirati primjenom modificiranih protokola pojedinih faza forenzičke analize DNA.

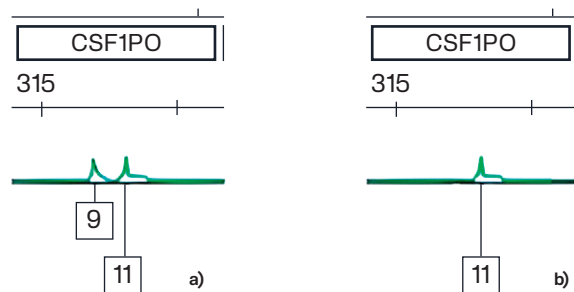
Uobičajene i za analizu poželjne količine DNA u uzorcima kreću se između 500 i 2500 pg. Količine DNA koje je moguće izolirati iz bioloških tragova nerijetko mogu biti vrlo male, čak i ispod 100 pg (Goodwin *et al.*, 2007). Prema najčešće korištenoj definiciji, uzorci s malom količinom DNA (engl. *low copy-number DNA*, *LCNDNA*) smatraju se oni s koncentracijom DNA ispod 100 pg (po nekim autorima i 200 pg) u ukupnom volumenu PCR reakcije (Gill *et al.*, 2000). U literaturi se često za ove koncentracije DNA koristi i termin LTDNA (engl. *low-template DNA*). Iako se LCN DNA i LTDNA mogu smatrati sinonimima, LCN opcija se najčešće koristi za opis optimiziranih postupaka za ovaj tip tragova dok se LTDNA koristi za opis samih uzoraka koje karakterizira prisutnost malih količina (koncentracija) DNA (Butler, 2012). LTDNA se kao termin često upotrebljava i za opisivanje modela PCR faze koji sadrži više od 28 ciklusa, kao i u opisivanju DNA profila u kojem je detektiran disbalans pikova (Butler, 2012). No, kako god ga koristili, forenzički genetičari znaju da sama analiza ovih tragova, kao i interpretacija LTDNA rezultata uistinu predstavlja velik izazov kojem se mora pristupiti izuzetno pažljivo.

Najčešći problemi koji se mogu primijetiti u DNA profilima LCN uzoraka su:

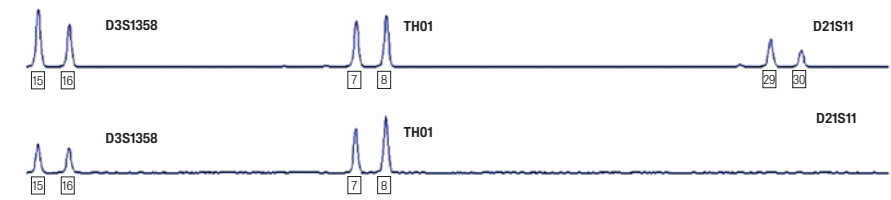
- umjetno izostajanje detekcije alela, ispadanje alela (engl. *allele drop-out*)
- umjetno detektiranje nepostojećih dodatnih alelnih varijanti, umetanje alela (engl. *allele drop-in*)
- umjetno izostajanje detekcije alelnih varijanti na cijelom lokusu, ispadanje lokusa (engl. *locus drop-out*)
- povećan rizik kontaminacije
- povećani lažni aleli, „duplikati” alela (engl. *stutter*)
- neizbalansiranost visine pikova (engl. *peak imbalance*) (Gill *et al.*, 2000; Goodwin *et al.*, 2007).

Ispadanje alela javlja se u situacijama amplifikacije malih količina DNA kalupa i nastaje kao posljedica stohastičke fluktuacije koja podrazumijeva nejednaku zastupljenost alela prisutnih u heterozigotu na određenom genetičkom biljevu (Gill *et al.*, 2000). U slučajevima LCN analize, PCR početnice nerijetko nisu u mogućnosti „pronaći” i inicirati hibridizaciju cijelog stvarnog alelnog seta individualnog DNA profila. Stoga se često može detektirati gubitak signala za jedan alel, što uzrokuje nemogućnost njegovog detektiranja (slika 4.52.). U pojedinim slučajevima iz istih razloga može doći i do nemogućnosti nedetektiranja alelnih varijanti na cijelom lokusu (**ispadanje lokusa**, slika 4.53.). Umetanje alela također je stohastički efekt kada se na lokusu detektira alel koji u stvarnosti ne postoji u ispitivanom genotipu (slika 4.54.). Ovaj PCR artefakt je neponovljiv i obično se ne javlja prilikom ponavljanja PCR reakcije za isti uzorak.

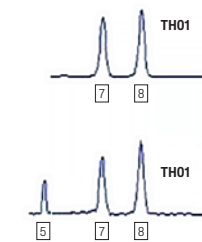
Pod pojmom kontaminacija podrazumijeva se slučajni transfer strane DNA na ispitivani uzorak. Tri najčešća načina kontaminacije uzoraka u forenzičkoj genetici su:



SLIKA 4.52. Ispadanje alela (engl. *allele drop-out*): a) detektirani heterozigot na lokusu CSF1PO (genotip 9;11); b) detektirano ispadanje alela 9 na lokusu CSF1PO (genotip 11;-).



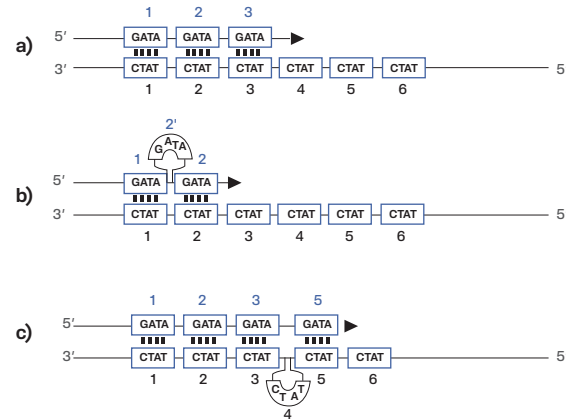
SLIKA 4.53. Ispadanje lokusa (engl. *locus drop-out*): a) detektirani heterozigot na lokusu D21S11 (genotip 29;30); b) detektirano ispadanje oba alela na lokusu D21S11 (genotip -;-).



SLIKA 4.54. Umetanje alela (engl. *allele drop-in*): a) detektirani heterozigot na lokusu TH01 (genotip 7;8); b) detektirano umetanje alela 5 na lokusu TH01.

- unos genomske DNA iz okoliša, što obično rezultira miješanim profilima
- miješanje između samih uzoraka tijekom njihove pripreme
- ostaci amplificirane DNA iz prethodne PCR reakcije.

Prvi izvor kontaminacije ovisi o procesu prikupljanja uzoraka. U ovom slučaju, ona se može izbjeći pravilnom upotrebom odgovarajućih kompleta za prikupljanje tragova. Kontaminaciju iz preostala dva izvora moguće je eliminirati primjenom odgovarajućih laboratorijskih postupaka i radom u prostorijama s odgovarajućom namjenom. Kao test prisutnosti kontaminacije koriste se negativne kontrole, koje ne sadrže DNA. Pri pripremi za PCR reakciju u negativne kontrole dodaje se ultra čista voda. Ukoliko su PCR produkti prisutni u negativnoj kontroli to je znak kontaminacije. Praksa je da se prije nastavka rada ispita njeno porijeklo te poduzmu sve mjere kako bi bila eliminirana. Validirani laboratoriji imaju i baze podataka s DNA profilima zaposlenika i osoba koje prikupljaju uzorke, koji se uspoređuju s generiranim DNA profilima ispitivanih uzoraka, kako bi se isključila mogućnost kontaminacije od strane laboratorijskog osoblja. Uočeno je i postojanje kontaminacije laboratorijskog pribora za jednokratnu upotrebu, do koje može doći u procesu proizvodnje. Najvjerojatnije je nemoguće u potpunosti izbjeći pojavu laboratorijske kontaminacije uzoraka. Međutim, pojavljivanje kontaminacije prevenira se i izbjegava primjenom negativnih kontrola, uspoređivanjem



SLIKA 4.55. Primarni mehanizam nastanka stutter alela: a) normalna (očekivana) replikacija; b) insercija u novosintetiziranom lancu; c) delecija jedne ponavljajuće sekvence (slika preuzeta i prilagođena iz Butler, 2005).

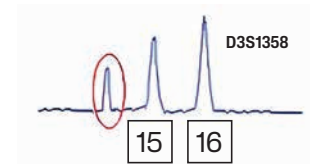
DNA profila zaposlenih s generiranim profilima, kao i osiguravanjem fizičke odvojenosti preamplifikacijskih i postamplifikacijskih faza rada (Butler, 2005).

Pri uobičajenoj amplifikaciji STR biljega pojavljuju se i nezaobilazni produkti koji, ako se javljaju u izraženim oblicima, posebno u LCN analizi, mogu dovesti do pogrešne interpretacije elektroferograma. Jedan od često prisutnih nusprodukata su *stutter* aleli, odnosno mali signali, nekoliko baza, točnije, za jednu repetitivnu sekvencu kraći ili duži od stvarnih STR signala. Oni nastaju u PCR procesu prilikom kopiranja STR lokusa DNA polimerazom. Naime, pri ekstenziji početnica može doći do pogreške u sparivanju i jedna regija kompleksa početnica-DNA kalup može ostati nesparena, tj. dolazi do preskakanja jedne ponavljajuće sekvence na polinukleotidnom lancu kalupa ili početnica. Ovo rezultira nastankom PCR produkta za jednu ponavljajuću sekvencu kraćeg ili dužeg od primarnog STR alela (slika 4.55.). Ukoliko ova sekvencija isklizne iz novosintetiziranog lanca dolazi do insercije u sljedećem krugu amplifikacije pa se javlja PCR produkt za jedno ponavljanje dulje od početne matrice. Ako jedna ponavljajuća sekvencija isklizne iz lanca same matrice nastaje PCR produkt za jednu ponavljajuću sekvencu kraći od te matrice koji se zove *stutter*.

Veličina *stutter* alela ovisi o veličini postojećeg alela i može dovesti do pogrešne interpretacije rezultata, posebno kad se radi s LCN uzorcima ili miješanim DNA profilima. Visina *stutter* alela za standardne, tetranukleotidne, ponavljajuće sekvence obično je ispod 15% visine odgovarajućeg pika (slike 4.56 i 4.57.), pri standardnim uvjetima amplifikacije. Formiranje *stutter* alela ovisi i o dužini biljega, o sekvenci STR-ova i brzini djelovanja DNA polimeraze. Što je duži ponavljajući



SLIKA 4.56. Uobičajena pojava *stutter* alela.



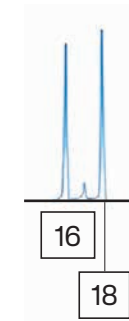
SLIKA 4.57. Pojava uvećanog *stutter* alela.

motiv biljega, manja je mogućnost formiranja *stutter* alela, tj. oni su rjeđi i manji kod pentanukleotida u odnosu na tetra, tri i dinukleotide. Manje uobičajene tetranukleotidne kombinacije u STR biljezima rezultiraju padom broja *stutter* alela. Duži aleli imaju u postotku veće *stutter* alela od kraćih na istom lokusu. Postoje i razlike između različitih lokusa. Upotrebom sporije DNA polimeraze ili prevelike količine polazne DNA u reakciji formira se i veći broj *stutter* alela (Butler, 2005).

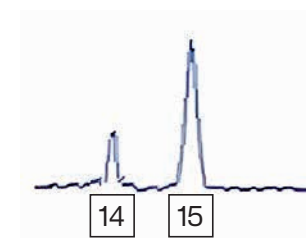
Neuravnoteženost visine signala detektira se u heterozigotu i nastaje u LCN analizi kad je jedna alelna varijanta znatno manje amplificirana u odnosu na drugu. Ovaj stohastički efekt u literaturi se često opisuje i kao preferencijalna amplifikacija jednog alela u odnosu na drugi. Signali u heterozigotu nisu identične visine, no odstupanja u njihovoj visini nisu tako velika (slika 4.58). Odstupanja u visini signala do 60% već se mogu okarakterizirati kao neuravnoteženost visine signala (slika 4.59).

Postoji više modela (strategija) koje se koriste u analizi LTDNA uzoraka, a s ciljem uspješnog generiranja i interpretiranja DNA profila (Butler, 2012).

Povećavanje broja PCR ciklusa najčešći je i najjednostavniji pristup u analizi LTDNA. Na taj se način stvara više PCR kopija odabranih STR biljega, ali se ujedno povećava i mogućnost detekcije umetnutog alela kao PCR tragova.



SLIKA 4.58. Očekivani odnos visina pikova u heterozigotu.



SLIKA 4.59. Pojava neuravnoteženosti visine pikova u detektiranom heterozigotu.

Postamplifikacijsko pročišćavanje uzoraka, odnosno uklanjanje soli prije postavljanja uzoraka na genetički analizator, znatno olakšava injektiranje uzoraka, ali ujedno povećava troškove same analize, mogućnost kontaminacije uzorka i nerijetko rezultira ispadanjem alela i detekcijom lažnih homozigota. Slični rezultati i problemi javljaju se kod povećanja količine PCR produkta koji se postavlja na genetički analizator.

Smanjivanje ukupnog PCR volumena izuzetno se često koristi. Naime, najčešći preporučeni volumen PCR reakcije iznosi 25 μ l. No, veliki broj laboratorija, kako zbog uštede kemikalija, tako i zbog uspješne analize LTDNA uzoraka, ovaj volumen smanjuje i do 5 μ l. To svakako povećava koncentraciju PCR produkta, ali ujedno povećava i koncentraciju PCR inhibitora koji mogu onemogućiti umnožavanje DNA i dobivanje cjelovitog DNA profila. S druge strane, rad s izuzetno malim volumenima prilikom postavljanja PCR-a implicira izuzetnu vještinu i osposobljenost laboratorijskog osoblja.

Ugniježdeni PCR (engl. nested PCR) predstavlja dvije odvojene PCR reakcije na istom uzorku. Nakon prve PCR reakcije, dobiveni PCR produkt koristi se kao kalup u drugoj PCR reakciji. To definitivno rezultira povećanjem kopija PCR produkta, ali značajno povećava mogućnost kontaminacije (prilikom postavljanja druge PCR reakcije).

Optimizacija pojedinih PCR parametara (povećavanje udjela *Taq* polimeraze uz produžavanje trajanja faze elongacije, pomicanje pozicija početnica i sl.) može dati bolje rezultate, koje, nažalost, često prate PCR artefakti poput ispadanja ili umetanja alela, lažne detekcije homozigota i sl.

4.9.2. Analiza miješanih tragova

Jedna od važnih karakteristika analize DNA svakako je i mogućnost utvrđivanja DNA profila miješanih tragova te potencijalna mogućnost njihove analize. Takvo što nije bilo moguće nijednom ranije primjenjivanom metodom. Miješani tragovi su oni u kojima se dvije ili više osobe javljaju kao potencijalni donori, tj. biološki izvori tog traga (Primorac *et al.*, 2008). Za razliku od DNA profila „uobičajenih bioloških tragova”, DNA profili miješanih tragova najčešće podrazumijevaju pojavljivanje više od dva signala na analiziranim lokusima, i/ili očiglednu neravnotežu unutar lokusa koji imaju dva ili jedan signala. Prema Claytonu (Clayton *et al.*, 1998), postoji šest osnovnih koraka u interpretaciji rezultata analize DNA miješanih tragova: 1) identificiranje prisutnosti miješanoga traga, 2) precizno utvrđivanje svih alelnih varijanti prisutnih u mješavini, 3) utvrđivanje broja potencijalnih

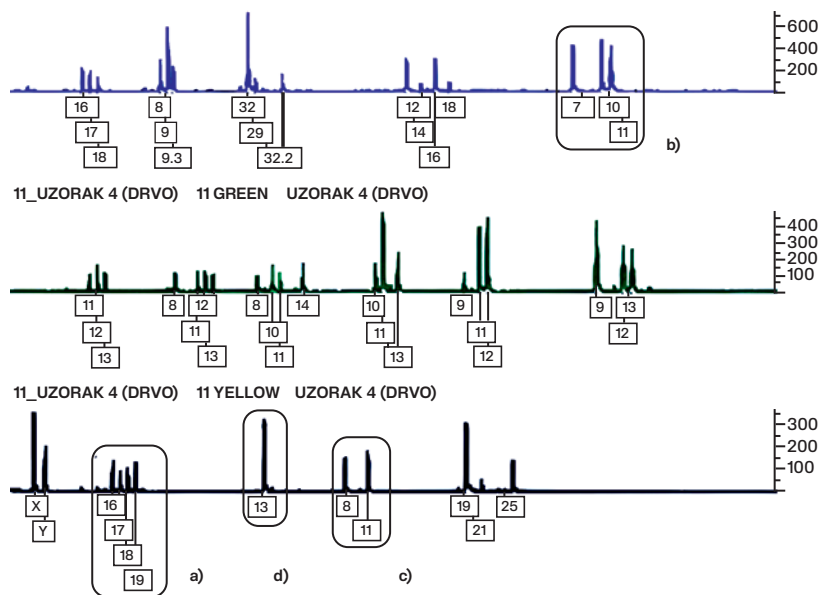
donora traga, 4) utvrđivanje kvantitativnog omjera zastupljenosti pojedinačnih bioloških tragova svakog od donora koji tvore mješavinu, 5) utvrđivanje svih mogućih genotipskih kombinacija i 6) usporedba sa referentnim nespornim uzorcima.

Miješani tragovi nisu rijetka pojava u forenzici, posebice u slučajevima silovanja, kada se kod velikog broja tragova (vaginalni bris, tragovi sperme na donjem rublju, tragovi sperme s tijela žrtve itd.) radi o miješanim tragovima s počiniteljem kao jednim i žrtvom kao drugim donorom). Analiza ovih tragova podrazumijeva dodatne statističke analize kojima se prvenstveno pokušava jasno diferencirati svaki pojedini trag koji sudjeluje u smjesi. Ovakvu analizu olakšava situacija kada je broj donora u smjesi najmanji mogući (dva donora), kada je njihova kvantitativna zastupljenost različita, tj. kada se jasno može razdvojiti dominantna i slabije zastupljena frakcija i kada donori imaju što veći broj nepreklapajućih alelnih varijanti na jednom lokusu. Kada se radi o dva donora koja na istom lokusu imaju dva heterozigota s nepreklapajućim alelnim varijantama (slika 4.60.), i ako se još radi o kvantitativno različito zastupljenim frakcijama, onda je analiza miješanih tragova, prvenstveno na osnovi analize tzv. područja signala (engl. *peak area*), relativno jednostavna (Evet, Weir, 1998). S druge strane, ako ima više frakcija i ako su sve one manje-više podjednako zastupljene, analiza takvog traga bitno je kompliciranija.

Prilikom interpretacije rezultata mogu se jasno razlučiti dva osnovna principa. Prvi od njih usmjeren je na opći zaključak da se ispitanik ne može isključiti kao potencijalni donor. Ovaj se pristup najčešće koristi u slučajevima kada su frakcije podjednako zastupljene i kada se ne može jasno utvrditi svaki pojedinačni donor. Tada se na osnovu usporedbe DNA profila ispitanika i DNA profila smjese najčešće može samo govoriti o (ne)mogućnosti isključivanja ispitanika. Drugi se pristup koristi u slučajevima kada sudionici u miješanom uzorku mogu biti jasno razdvojeni, tj. kada je s visokim stupnjem sigurnosti moguće utvrditi koji aleli pripadaju kojem donoru. Tada se mogu primijeniti različiti statistički pristupi kojima se računaju različite razine vjerojatnosti, a koji kao krajnji rezultat daju broj koji pokazuje kolika je vjerojatnost da je ispitanik jedan od donora smjese ili kolika je vjerojatnost da on to nije. Analiza miješanih tragova može se realizirati i primjenom odgovarajućeg softvera (npr. GeneMapper™ ID, FSS-i3™, TrueAllele® i DNAMIX).

Što se pak same statističke obrade podataka tiče, tri su osnovna principa:

- izračun vjerojatnosti podudaranja (engl. *matching probability*) dominantnog i/ili sekundarnog donora u smjesi
- računanje vjerojatnosti isključivanja (engl. *exclusion probability*)
- računanje omjera vjerojatnosti (engl. *likelihood ratio, LR*) (Butler, 2012).



SLIKA 4.60. Prikaz računalno obrađenih rezultata analize DNA miješanog traga s dva nejednako zastupljena donora nakon korištenja sustava PowerPlex® 16. Oba donora imaju heterozigote s nepreklapajućim alelnim varijantama (16,19 – dominantna frakcija i 17,18 – slabije zastupljena frakcija), što je omogućilo detekciju četiri signala; b) jedan donor je heterozigot 7,11 (dominantna frakcija), a drugi donor je homozigot 10,10 (slabije zastupljena frakcija), što omogućuje detekciju tri signala na ovom lokusu; c) oba donora imaju istovjetne heterozigotne kombinacije (8,11 i 8,11), što uvjetuje pojavljivanje dva signala na istom lokusu; d) oba donora imaju istovjetnu homozigotnu kombinaciju (13,13), što omogućuje detekciju jednog signala na istom lokusu (dijelovi slike preuzeti iz Primorac *et al.*, 2008).

Osnovne karakteristike ovih statističkih parametara bit će detaljnije elaborirane u jednom od narednih poglavlja koje će pojasniti statističke osnove prilikom interpretacije rezultata.

4.9.3. Degradirana DNA

Degradirana DNA podrazumijeva fragmentaciju DNA molekule, tj. njeno cijepanje na relativno kratke sekvence. Postoji veliki broj čimbenika koji pospješuju proces degradacije DNA u biološkim tragovima: voda, kisik, UV zračenje i aktivnost enzima nukleaza. Naime, proces degradacije DNA prisutne u biološkim tragovima ne može biti u potpunosti zaustavljen, ali se pravilnim pakiranjem i pohranjivanjem značajno može usporiti. S druge strane, nepravilno pakiranje,

pohranjivanje i manipulacija traga može značajno ubrzati i proces degradacije DNA u njima, a samim time može značajno otežati, pa čak i onemogućiti dobivanje DNA profila iz tih tragova.

Osnovna strategija u analizi degradirane DNA primjena je miniSTR pristupa. Također, u posljednjih par godina primjetna je tendencija vodećih tvrtki iz područja forenzičke genetike da u nove multipleks STR sustave uključe što veći broj miniSTR lokusa u kombinaciji sa standardnim STR genetičkim biljezima, kao što je prethodno objašnjeno. Stoga se može zaključiti da su multipleks STR sustavi nove generacije značajno uspješniji u analizi uzoraka koje karakterizira prisutnost degradirane DNA.

4.9.4. Mikrovarijante

Aleli koji sadrže određene oblike varijacije sekvence u repetitivnoj jedinici u odnosu na alele koji se uobičajeno detektiraju unutar ljudske populacije i koji se najčešće nalaze u sastavu komercijalnih alelnih ljestvica, nazivaju se mikrovarijante. One se najčešće minimalno razlikuju od uobičajenih alelnih varijanti i ta se razlika bazira na inserciji, deleciji ili zamjeni jedne ili više baza u repetitivnoj jedinici. S obzirom na to da mikrovarijante u pravilu nisu sadržane u alelnoj ljestvici, prilikom njihove analize dobivaju se signali, tj. aleli, izvan alelne ljestvice (engl. *off-ladder alleles*).

Jedna od najčešćih mikrovarijanti, posebno u bjelačkoj ljudskoj populaciji, je alel 9.3 na lokusu TH01. Ona sadrži 9 cijelih ponavljanja tetranukleotidne sekvence (AATG) i jedno trinukleotidno ponavljanje (ATG). Zaključno, ova mikrovarijanta razlikuje se od alela 10 samo za jednu bazu, tj. samo za jedan adenin. Ispitivanja su pokazala da što je kompleksnija struktura repetitivnog motiva, veća je frekvencija pojavljivanja mikrovarijanti na STR lokusima (Crouse *et al.*, 1999). Tako je frekvencija pojavljivanja mikrovarijanti znatno veća na lokusima FGA, D21S11 i D18S51, nego na TPOX ili CSF1PO.

Za utvrđivanje mikrovarijante nije dovoljno samo dobiti *off-ladder* alel pri generiranju DNA profila, nego je neophodno i dodatno sekvencirati tu regiju kako bi se utvrdilo radi li se o mikrovarijanti ili, nekom artefaktu nastalom u lančanoj reakciji polimerazom. Radi jednostavnijeg pristupa, mnogi se autori slažu da je dovoljno ponoviti PCR reakciju tog uzorka, po mogućnosti koristeći drugi komercijalni set istim STR lokusom, i, u slučaju ponovljene pojave mikrovarijante, pogotovo ako je u istoj populaciji bila ranije uočena, zadržati taj rezultat kao ispravan.

Utvrđivanje mikrovarijante u nekom profilu značajno povećava njegovu diskriminatornu vrijednost, kako u forenzičkim analizama DNA, tako i u testiranju spornog roditeljstva ili srodstva, jer je frekvencija takvih alela jako niska, pa se smanjuje mogućnost postojanja dvije nesrodne osobe sa identičnim DNA profilom.

4.9.5. Mutacije

STR lokusi su molekularni biljezi koji su, kao i svi ostali segmenti DNA molekule, podložni promjenama svoje molekularne (genetičke) strukture, tj. mutacijama. Pojavljivanje mutacija najčešće predstavlja izazov u analizama spornog roditeljstva, testiranju srodstva i, ne tako rijetko, predstavlja izvor rasprava u znanstvenim krugovima.

Najveći broj mutacija unutar STR biljega svodi se na gubitak ili dodavanje jedne ukupne repetitivne jedinice. Takve mutacije nazivaju se jednostupanjske mutacije (engl. *one-step mutation*). Međutim, u pojedinim slučajevima na isti način može doći do promjene alelne varijante i za dvije repetitivne jedinice, pa se generiraju i dvostupanjske mutacije (engl. *two-step mutation*). Veliki broj istraživanja upravo se temeljio na ispitivanju učestalosti mutacija na pojedinim lokusima, te se tako došlo do statističke vrijednosti označene kao stopa mutacije za pojedine lokuse u spolnim stanicama, koje generalno imaju bitno višu frekvenciju mutacije u odnosu na somatske stanice. Prosječna stopa mutacije za CODIS lokuse je varijabilna, ali kreće se u intervalu ispod 0,1%. Ispitivanja su pokazala da su lokusi s najmanjom stopom mutacije CSF1PO, TH01, TPOX, D5S818 i D8S1179, dok su D21S11, FGA, D7S820, D16S539 i D18S51 lokusi na kojima su znatno češće zabilježene mutacije.

Kako je već rečeno, na mutacije se ozbiljno mora računati u procesu testiranja očinstva ili majčinstva, ali i u procesu DNA identifikacije žrtava masovnih katastrofa. O statističkim analizama bit će više riječi u narednim poglavljima.

Forenzička analiza DNA sa svakim novim slučajem može ponuditi novi izazov. Slučaj koji će biti opisan u nastavku ponudio je nešto zanimljivo.

Tijekom 2003. godine, 15-godišnja djevojka prijavila je da je silovana, a kao silovatelja je identificirala svog oca. Nakon napada pobjegla je od kuće, a policiju je kontaktirala tek nakon 24 sata. Policijski stručnjaci prikupili su odjeću koju je djevojka imala tijekom napada i na donjem rublju locirali su trag sperme. Forenzičkom analizom DNA, utvrđeno je da trag predstavlja smjesu tragova koja vrlo vjerojatno potječe od epitelnih stanica i vaginalnog iscjetka žrtve te tragova sperme osumnjičenoga. Preliminarno testiranje traga na prisutnost kisele fosfataze dalo je pozitivne rezultate. Komparativnom analizom DNA profila ovog spornog traga s DNA profilom žrtve i osumnjičenog moglo se uočiti da su žrtva i osumnjičeni najvjerojatnija kombinacija donora ovog traga. Ipak, trebalo je to statistički dokazati. S obzirom na to da se radi o srođnicima u liniji roditelj-dijete, logično je bilo da se ni na jednom lokusu neće naći četiri alela, jer otac djetetu, da bi mu bio biološki otac, mora uvijek dati jedan alel, pa je njihovom kombinacijom alelnih varijanti moguće

maksimalno očekivati tri-, bi- ili monoalelni obrazac na lokusima. To bitno otežava statističku analizu miješanih tragova. Ipak, DNA stručnjaci su u ovom slučaju primijetili neočekivanu olakšavajuću okolnost. Na D21S11 lokusu otac je imao heterozigotnu kombinaciju 29, 30, dok je kći imala također heterozigotnu kombinaciju 31, 32.2. Budući da su na svim ostalim lokusima dijelili po minimalno jedan alel, logičan je bio zaključak da je na D21S11 lokusu došlo do jednostupanjske mutacije 30→31, ili, što je manje vjerojatno, do dvostupanjske mutacije 29i→31. Upravo ova mutacija (koja uistinu predstavlja otežavajuću okolnost pri testiranju spornog očinstva), zapravo je olakšala analizu ove smjese jer je pomogla definirati polazne tačke za statističko razdvajanje pojedinačnih profila u detektiranoj smjesi tragova (Marjanović *et al.*, 2006).

4.9.6. Izazovi akreditacije laboratorija

Više je puta do sada u ovoj knjizi naglašeno da je forenzička genetika znanstvena disciplina čiji se rezultati intenzivno koriste u širokom spektru svakodnevnih aktivnosti ključnih za širu društvenu zajednicu. Ako se sudski procesi izdvoje kao samo jedan od zanimljivijih pravaca upotrebe tih rezultata, onda se može shvatiti od kolike je važnosti dosezanje i očuvanje povjerenja tužitelja, odvjetnika, sudaca, ali i svakog čovjeka kao člana društva u rezultate forenzičke analize DNA. S obzirom na navedeno, stručnjaci iz ovog područja još su na samom početku primjene molekularne genetike u forenzičkim istragama shvatili da je standardizacija postupaka, laboratorijske opreme i uvjeta u kojima se provode ove analize, kao i edukacija stručnjaka koji ih provode od ključnog značaja za opstanak i daljnji razvoj forenzičke genetike.

Izuzetno čest pojam koji se koristi na sudu je **dobra laboratorijska praksa**. Upravo iza tog pojma mogu se skrivati zamke neobjektivnosti jer, bez jasnih definicija što dobra laboratorijska praksa predstavlja, subjektivna interpretacija tog pojma može dovesti u nedoumicu suce koji na osnovu nečijeg DNA profila trebaju tu osobu poslati u zatvor na dulje vremensko razdoblje. Stoga, bitno je znati da se dobra laboratorijska praksa oslanja na dvije važne aktivnosti:

- **osiguravanje kvalitete** (engl. *quality assurance, QA*) – provođenje aktivnosti koje za osnovni cilj imaju uspostavljanje i provođenje svih postupaka u suglasnosti s postojećim, propisanim laboratorijskim standardima i
- **kontrola kvalitete** (engl. *quality control, QC*) – tehnike kojima osoblje jednog laboratorija provjerava poštuju li se svi propisani laboratorijski standardi (Butler, 2012).

Međunarodna organizacija za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization, ISO*) kreirala je 2006. godine standard ISO 17025 pod punim naslovom „Opći zahtjevi za kompetentnost ispitnih i kalibracijskih laboratorija”². Svi laboratoriji koji provode DNA testiranje danas teže dosegnuti taj standard. Naime, vodeće svjetske stručne organizacije iz ovog područja poput europskih ENFSI-ja ili američkog SWGDAM-a preporučuju ISO 17025 kao obavezan standard koji moraju ispunjavati laboratoriji koji provode forenzičko-genetičke analize. Dodatno, Rezolucija EU iz 2009. godine državama članicama je naložila da do kraja 2013. godine moraju biti akreditirane po ovom standardu.³

ENFSI DNA radna skupina kreirala je dokument u vidu preporuke, kojim upute sadržane u ISO 17025 dodatno precizira u smislu specifičnosti forenzičko-genetičkih analiza (ENFSI, 2010). Uz navedeno, u svom drugom dokumentu vezanom za uspostavljanje i funkcioniranje nacionalnih DNA baza podataka, ENFSI izričito naglašava da samo laboratoriji koji imaju ISO 17025 (ili odgovarajući nacionalni standard) mogu sudjelovati u pohranjivanju DNA profila u nacionalne baze podataka (ENFSI, 2012).

S ciljem ispunjavanja svih uvjeta dobre laboratorijske prakse, vodeći forenzički genetičari svijeta prepoznali su i preporučili različite QA/QC razine:

- državna (nacionalna) agencija (ili bilo koje drugo službeno tijelo) koja propisuje i vrši završnu superviziju provođenja forenzičko-genetičkih standarda u službenim laboratorijima
- laboratorijski supervizori zaduženi za interno osiguravanje i kontrolu kvalitete;
- službena akreditacija laboratorija
- obavezno periodično provođenje testova stručnosti (engl. *proficiency test*) koje koordiniraju službena međunarodna tijela izvan laboratorija (u Europi je najpoznatiji GEDNAP test koji se preporučuje čak i od strane ENFSI-ja)
- obavezna validacija postupaka, protokola, opreme, kemikalija i zaposlenika laboratorija
- uspostavljanje standardnih operativnih postupaka (engl. *Standard Operating Procedures, SOPs*) koje jasno opisuju pravila ponašanja u laboratoriju koja se moraju strogo poštovati (Butler, 2012).

² ISO/IEC standard je u najnovijoj verziji dostupan kao 17025:2018, <https://www.iso.org/ISO-IEC-17025-testing-and-calibration-laboratories.html>, pristupljeno 10.8.2024. godine.

³ Council framework Decision 2009/905/JHA of 30 November 2009 on Accreditation of forensic service providers carrying out laboratory activities, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TX-?uri=CELEX%3A32009F0905>, pristupljeno 10.8.2024. godine.

Centar za forenzička ispitivanja istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić” koji djeluje u sklopu Ministarstva unutarnjih poslova RH akreditiran je sukladno zahtjevima norme HRN EN ISO/IEC 17025:2017 te ima 42 akreditirane metode vještačenja.

4.9.7. Izazovi u interpretaciji rezultata na sudu

Rezultati forenzičke analize DNA u najvećem broju slučajeva prezentiraju se u vidu izvještaja ili nalaza koji se pojašnjavaju na sudu. Pripremanje tih izvještaja (pismeno vještačenje), kao i njihova završna prezentacija (usmeno vještačenje) u sudnici, često predstavljaju veliki izazov. Naime, forenzički genetičari rad u laboratoriju doživljavaju kao rad u prirodnom okruženju, a znanstvene formulacije rezultata kao uobičajeni način komunikacije. S druge strane, krajnji korisnici rezultata forenzičke analize DNA u najvećem broju slučajeva su suci, odvjetnici, tužitelji, policijski stručnjaci, odnosno osobe koje najčešće nemaju veliko predznanje iz područja molekularne genetike i koje zahtijevaju krajnju formulaciju rezultata koja će biti sve, samo ne tipično znanstvena.

Prethodne studije ukazale su na osnovne razlike znanstvenika, s jedne, i pravnika s druge strane, koje su uvjetovane osnovnim obilježjima zajednice unutar koje rade. Znanstvenik istinu prepoznaje kao nešto što se treba otkriti i što služi napretku same znanosti, i u tom pravcu ima vrlo otvorenu, neograničenu komunikaciju sa svima dok su procesi koji se odvijaju unutar znanstvene zajednice nepristrani i sustavni (sagledaju se obje strane iste priče, pa čak i kada činjenice ne odgovaraju preliminarnoj hipotezi). Na kraju, osnovna ideja znanosti jest da rezultati istraživanja posluže za dobrobit zajednice. S druge strane, pravna struka istinu prepoznaje kao nešto što treba poslužiti interesu klijenta. Komunikacija je privilegiranog tipa, dok su procesi istrage usmjereni ovisno o specifičnoj poziciji onoga tko ju provodi (potencira se samo jedna strana priče, tj. strana koja ide klijentu u korist). Na kraju, završna ideja je da se služi klijentu, tj. da se ponude bolji dokazi i nadmudri suprotna strana (Bowen, 2010).

Ove razlike uvjetuju da finalni izvještaji i vještačenja forenzičkih genetičara često budu nejasna pravnicima, što može dovesti do određenih nejasnoća, ali često i do pogrešnog tumačenja prezentiranih rezultata. Naravno, ne postoji precizan obrazac kako i na koji način treba prezentirati rezultate na sudu, no iz iskustva prezentiranih u prijašnjim studijama drugih autora, kao i iz osobnih iskustava nekih od autora ove knjige, u nastavku će se navesti nekoliko osnovnih izazova s kojima se moguće susresti u ovoj, možda i najvažnijoj, fazi forenzičko-genetičke analize – prezentaciji rezultata.

Pisani izvještaj (nalaz vještačenja) treba biti jasno, kratko i koncizno napisan. S ciljem kreiranja osnovnih elemenata nalaza poželjno je napraviti sljedeće:

- Navesti na osnovu čijeg rješenja (naredbe) je provedena analiza, odnosno jasno se mora navesti koja je institucija (osoba), kada i kojim dokumentom zatražila analizu DNA.
- Kratko opisati biološke tragove koji su dostavljeni u laboratorij. U opisivanju bioloških tragova postoje dva osnovna pristupa: a) detaljno opisivanje dostavljenog materijala i pakiranja u kojem je materijal dostavljen, b) navođenje oznaka na dostavljenom pakiranju i pratećoj dokumentaciji bez detaljnog opisa samog materijala. Oba pristupa imaju mana i prednosti. U prvom pristupu najveći problem predstavlja određena doza subjektivnosti prilikom opisivanja istog predmeta od strane više osoba, tako da se prilikom vještačenja na sudu mogu pojaviti dva različita opisa istog predmeta, što može pobuditi sumnju da se ne radi o istom tragu, tj. da analiza nije napravljena na tragu koji je prikupljen. U drugom je pristupu osnovna mana da, ako je predmet pogrešno opisan u trenutku prikupljanja traga s mjesta zločina, onda se metodom pozivanja na taj opis u svakom dokumentu ta greška ponavlja. U svakom slučaju, nedoumica se može izbjeći fotografiranjem dostavljenog materijala i pohranjivanjem fotodokumentacije u bazu podataka, i to u dokument vezan za konkretan slučaj.
- Kratko opisati uzorak koji je izdvojen i dalje procesiran. U ovom opisu treba navesti na koji je način formiran neki uzorak, npr. ako je dostavljen nož kojim je izvršeno potencijalno ubojstvo i s vidljivim i u laboratoriju dokazanim tragovima ljudske krvi na oštrici, onda treba opisati na koji način i s koje pozicije su prikupljeni tragovi (recimo, je li uzet bris traga ljudske krvi s oštrice ako se želi utvrditi čija je krv, ili bris potencijalno prisutnih ljudskih tragova s drške noža ako se želi utvrditi tko je mogao držati nož).
- Kratko opisati metode koje su korištene u analizi. Opis metoda ne treba biti detaljan, dovoljno je navesti osnovne nazive metoda ili nazive komercijalnih sustava koji su korišteni u analizi traga, kako u prethodnoj identifikaciji tipa traga, tako i u samoj forenzičko-genetičkoj analizi traga.
- Tablično prikazati rezultate analize, tj. dobivene DNA profile. Tablica mora sadržavati imena svih analiziranih lokusa i detektiranih alelnih varijanti na njima. Pojedine legislative traže od vještaka da uz svoj nalaz dostavi sve dokumente koji su proistekli iz konkretnog vještačenja, a na osnovu kojih je napravljen završni nalaz. Stoga se preporučuje da se uz nalaz obavezno dostave i elektroferogrami DNA profila prikazanih u tablicama, ili bar da se da do znanja da se isti nalaze u spisu slučaja i da po potrebi mogu biti dostavljeni.
- Koncizno napisati zaključke do kojih se došlo na osnovi rezultata. U zaključcima se treba navesti ono što je vidljivo iz tablice i svaka tvrdnja (koja se odnosi na uočeno podudaranje DNA profila ili uočenu biološku povezanost

osoba na osnovu njihovih profila DNA) potkrijepiti statističkim izračunom prikladnog forenzičko-genetičkog parametra.

Usmena prezentacija rezultata forenzičke analize DNA na sudu razlikuje se od slučaja do slučaja, ali i od suda do suda. Ne postoji neka forma koje se treba strogo držati, no postoji par sugestija i „nepisanih pravila” koji mogu dobro doći forenzičkom genetičaru prilikom pripreme vještačenja.

Stoga, kada je u pitanju realizacija vještačenja na sudu, pojedini eksperti (Bowen, 2010) sugeriraju sljedeće:

- Ne raspravljati o slučaju izvan suda.
- Izbjegavati zauzimanje pozicije tužiteljstva ili obrane.
- Izbjegavati obrambeni ili napadački stav prilikom odgovora na postavljena pitanja.
- Prestati pričati prilikom prekida od strane suca, tužitelja ili odvjetnika?
- Zatražiti dopuštenje ako odgovor na pitanje podrazumijeva duže objašnjenje.
- Ne izbjegavati odgovor na pitanje ako će on ići u korist „suprotnoj strani”.
- Ne odgovarati na pitanja koja nisu postavljena.
- Ne nagađati.
- Izbjegavati generaliziranje odgovora.
- Biti siguran da je odgovor na postavljeno pitanje dobro shvaćen.

Najčešće pogreške prilikom vještačenja koje jedan vještak može napraviti su:

- Pokušati odgovoriti na pitanja na koja ne zna točan odgovor.
- Bojati se da će ga odgovori poput „ne znam” ili „to pitanje nije iz mogeg užeg područja” prikazati u lošem svjetlu kao nedovoljno kvalificiranog vještaka.
- Braniti stavove svog vještačenja, čak i kada tijekom svjedočenja shvati da je napravio pogrešku.
- Izbjegavati točne odgovore na pitanja koji bi njegove rezultate mogli relativizirati.
- Zauzeti jednu stranu tijekom vještačenja.
- Odgovarati na pitanja o činjenicama iz faza postupka koje su se događale prije ili poslije faze u kojoj je sam sudjelovao i o kojima nema nikakvih podataka.
- Prihvatiti pitanja koja dovode u pitanje rezultate njegove analize kao „napad” odvjetnika, tužitelja i suca na njega kao osobu.

Ovdje su izdvojena najčešća pitanja koja se forenzičkom genetičaru postavljaju na sudu, a do kojih se došlo kroz podatke iz literature (Butler, 2012) i dugogodišnje iskustvo autora ove knjige:

- Koje je Vaše ime i prezime?
- Gdje i na kojoj poziciji ste trenutno zaposleni?
- Koja je Vaša trenutna pozicija i opis poslova koje radite u instituciji?
- Kakvo je Vaše iskustvo u obavljanju forenzičko-genetičkih analiza i koja je Vaš znanstvena i obrazovna pozadina?
- Jeste li prethodno vještačili na sudovima ili provodili forenzičke analize DNA, i ako jeste, koliko puta i na kojim sudovima?
- Što je DNA i gdje se nalazi u ljudskom tijelu?
- Što je DNA profil?
- Postoje li dvije različite osobe sa identičnim DNA profilom?
- Objasnite ukratko koji tip analize ste koristili u svom vještačenju.
- Što je STR?
- Što je PCR?
- Jesu li postupci koje ste Vi koristili prihvaćeni kao standardni postupci u forenzičkoj genetici?
- Jeste li poštovali pravila struke?
- Možete li na osnovu analize DNA utvrditi kada je nastao neki biološki trag?
- Možete li na osnovu analize DNA utvrditi kako je nastao neki biološki trag?
- Znači li prisutnost nečijeg biološkog traga na opisanom predmetu, koje ste utvrdili na osnovu DNA profila, automatski da je ta osoba imala izravan kontakt s tim predmetom?
- Znači li prisutnost nečijeg DNA profila na mjestu zločina ili na oružju zločina automatski da je ta ista osoba počinila taj zločin ili uopće bila na mjestu zločina?
- Šta je lanac posjedovanja traga (engl. chain of custody)?
- Koliko je važno poštivanje lanca posjedovanja traga vezano za rezultate vaše analize?
- Što znači da je vjerojatnost očinstva 99,9999%? Zašto onda nije 100%?
- Što je LR?
- Objasnite što znači rezultat 1 na 10ⁿ?
- Koja je vjerojatnost pogreške rezultata analize DNA ?
- Kako ste znali koji je sporni, a koji nesporni biološki trag?

- Abaz J, Walsh SJ, Curran JM, *et al.* Comparison of Variables Affecting the Recovery of DNA from Common Drinking Containers. *Forensic Sci. Int.* 2002; 126(3): 233-240. doi: 10.1016/s0379-0738(02)00089-0
- Bojanić N, Milosavljević M. *Praktikum za kriminalistiku 5 (forenziku)*. Sarajevo: Fakultet kriminalističkih nauka; 2008.
- Bowen, RT. *Ethics and the practice of forensic science*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.
- Burgoyne L, *et al.* *Safe Collection, Storage and Analysis of DNA from Blood*. Proceedings from the 5th International Symposium on Human Identification. Madison, WI, Promega Corp. 1994: 163.
- Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers (2nd edition)*. London: Elsevier Academic Press; 2005.
- Butler JM. *Forensic DNA Typing: Methodology, Technology and Genetics of STR Markers (2nd edition)*. London: Elsevier Academic Press; 2012.
- Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R, Gill P. Analysis and interpretation of mixed stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci. Int.* 1998; 91(1): 55-70. doi: 10.1016/s0379-0738(97)00175-8
- Coble MD, Butler JM. Characterization of New MiniSTR loci to Aid Analysis of Degraded DNA. *J Forensic Sci.* 2005; 50(1): 43-53.
- Crouse CA, Rogers S, Amriott E, Gibson S, Masibay A. Analysis and Interpretation of Short Tandem Repeat Microvariants and Three-Banded Allele Patterns Using Multiple Allele Detection Systems. *J. Forensic Sci.* 1999; 44(1): 87-94.
- D'Costa L, Millman J, Matte M, Richard M, Bowie K, Frappier R. The Plexor HY System: Not Solely a Quantitation Technique. *Profiles in DNA.* 2007; 2: 6-9.
- Deedrick DW, Koch S. *Microscopy of Hair Part 1: A Practical Guide and Manual for Human Hairs*. *Forensic Science Communications.* 2004; 6(1).
- Drobnič K. *Biološke sledi*. U: Maver D. *Kriminalistika: uvod, taktika, tehnika*. Ljubljana: Uradni list RS; 2004.
- Durmić A. *Polimerazna lančana reakcija*. U: Bajrović K, Jevrić-Čaušević A, Hadžiselimović R. *Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju*. Sarajevo: INGEB; 2005.
- ENFSI DNA Working Group. *DNA-Database Management Review and Recommendations*. ENFSI; 2012.
- ENFSI DNA Working Group. *Recommended Minimum Criteria for the Validation of Various Aspects of the DNA Profiling Process*. ENFSI; 2010.
- Ensenberger MG, Hill CR, McLaren RS, Sprecher CJ, Storts DR. Developmental validation of the PowerPlex® 21 System. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014; 9: 169-178. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.12.005
- Evett IW, Weir BS. *Interpreting DNA Evidence: Statistical Genetics for Forensic Scientists*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc.; 1998.

- Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J. An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Sci. Int.* 2000; 112(1): 17-40. doi: 10.1016/s0379-0738(00)00158-4
- Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *An Introduction to Forensic Genetics*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 2007.
- Gunn A. *Essential Forensic Biology*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.; 2006.
- Houck MM, Siegel JA. *Fundamentals of Forensic Science*. London: Elsevier Academic Press; 2006.
- Independent Forensics. *Rapid Stain Identification Of Human Blood (RSID™-Blood) Technical Information and Protocol Sheet for Dual buffer System, cat# 0300*. Lombard, IL: Independent Forensics; 2016a.
- Independent Forensics. *Rapid Stain Identification Of Human Saliva (RSID™-Saliva) Technical Information and Protocol Sheet for Use with Universal Buffer, Reduced Incubation Time, cat# 0130*. Lombard, IL: Independent Forensics; 2016b.
- Independent Forensics. *Rapid Stain Identification Of Human Semen (RSID™-Semen) Technical Information and Protocol Sheet for Use with Universal Buffer, cat# 0230*. Lombard, IL: Independent Forensics; 2011a.
- Independent Forensics. *Rapid Stain Identification Of Human Urine (RSID™-Urine) Technical Information and Protocol Sheet, cat# 0400*. Lombard, IL: Independent Forensics; 2011b.
- Kanokwongnuwut P, Martin B, Taylor D, Kirkbride KP, Linacre A. How many cells are required for successful DNA profiling? *Forensic Sci. Int. Genet.* 2021; 51: 102453. doi: 10.1016/j.fsigen.2020.102453
- Lee HC, Gaensslen RE, Bigbee PD, Kearney JJ. Guidelines for the Collection and Preservation of DNA Evidence. *J. Forensic Identification.* 1991; 41(5): 344-356.
- Lee HC. Collection and Preservation of DNA Evidence. *Proceedings of the 7th International Symposium on Human Identification*. Madison, WI, Promega Corp. 1996: 39-45.
- Ludeman MJ, Zhong C, Mulero JJ, *et al.* Developmental validation of GlobalFiler™ PCR amplification kit: a 6-dye multiplex assay designed for amplification of casework samples. *Int. J. Legal Med.* 2018; 132(6): 1555-1573. doi: 10.1007/s00414-018-1817-5
- Mandrekar PV, Krenke BE, Tereba A. DNA IQ™: The Intelligent Way to Purify DNA. *Profiles in DNA.* 2001; 4: 16.
- Marjanović D, Bakal N, Drobnič K, Hadžiselimović R. Use of PowerPlex® 16 and PowerPlex® Y Systems to Analyze a Complex Forensic DNA Mixture from an Incestuous Rape Case. *Profiles in DNA.* 2006; 9(1): 14-15.
- Marjanović D, Dobrača I, Drobnič K. Prikupljanje, prezervacija i transport uzoraka za DNK analizu. Sarajevo: INGEB; 2005c.

- Marjanović D, Durmić-Pašić A, Kovačević L, *et al.* DNA Identification of Skeletal Remains of Communist Armed Forces Victims During and After World War II: Combined Y-Chromosome Short Tandem Repeat (STR) and MiniSTR Approach. *Croat. Med. J.* 2009; 50(3): 296-304. doi: 10.3325/cmj.2009.50.296
- Marjanović D, Kovačević L, Čakar J, Džehverović M, Musemić Dž., Bajrović K. DNA Analysis of Ancient Skeletal Remains from Old Bosnian Graves. 7th ISABS Conference in Forensic Genetic, Anthropologic and Medical Genetics and Mayo Clinic Lectures in Translational Medicine. Bol, Croatia, International Society for Applied Biological Sciences. 2011b; 60.
- Marjanović D, Kovačević L, Čakar J, *et al.* DNA Analysis of Skeletal Remains from Bosnian Medieval Royal Tombs. 21st International Meeting on Forensic Medicine Alpe-Adria-Panonia. Sarajevo, BiH, Univerzitet u Sarajevu. 2012; 11.
- Marjanović D. Sekvenciranje DNK fragmenata. U: Bajrović K, Jevrić-Čaušević A, Hadžiselimović R. *Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju*. Sarajevo: INGEB; 2005a.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215. doi: 10.1093/nar/16.3.1215
- Milosavljević M. *Forenzička biologija*. Sarajevo: Blicdruk; 2012.
- Primorac D, *et al.* *Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu*. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Promega Corporation. *Technical Manual: PowerPlex® 21 System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers*. Madison, WI: Promega Corporation; 2021.
- Qiagen. *Qiagen Genomic DNA Handbook*. Hilden, Njemačka: Qiagen; 2005.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487-491. doi: 10.1126/science.2448875
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, *et al.* Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction Site analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-1354. doi: 10.1126/science.2999980
- Shaler RC. *Modern Forensic Biology*. U: Hall AB, Saferstein R. *Forensic Science Handbook Volume I (3rd edition)*. New Jersey: Prentice Hall; 2020.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-based Typing for Forensic material. *Biotechniques* 1991; 10(4): 506-513.

5.

PRIMJENA ANALIZE RODOSLOVNIH BILJEGA I KROMOSOMA X U FORENZIČKOJ GENETICI

doc. dr. sc. Rijad Konjhodžić

dr. sc. Lana Salihefendić

prof. dr. sc. Damir Marjanović

prof. dr. sc. Dragan Primorac

prof. dr. sc. Adna Ašić

doc. dr. sc. Jelena Šarac

doc. dr. sc. Vedrana Škaro

PRIMJENA ANALIZE RODOSLOVNIH BILJEGA I KROMOSOMA X U FORENZIČKOJ GENETICI

Za razliku od autosomnih biljega koji uslijed nasljeđivanja alelnih varijanti i od majke i od oca jasno variraju kroz generacije, Y vezani i biljezi mitohondrijske DNA prolaze kroz generacijske barijere gotovo bez rekombinacije (izuzetci su objašnjeni u ovom poglavlju), stoga je mutacija jedini izvor varijacije na ovim biljezima. Upravo iz tih razloga ovi se biljezi često u populacijskoj, humanoj, ali i forenzičkoj genetici koriste za praćenje roditeljskih linija, i to mitohondrijska DNA za ispitivanje majčinske, dok se kromosom Y koristi za ispitivanje očinske linije. Stoga se ovi biljezi nazivaju rodoslovni biljezi (engl. *lineage markers*).

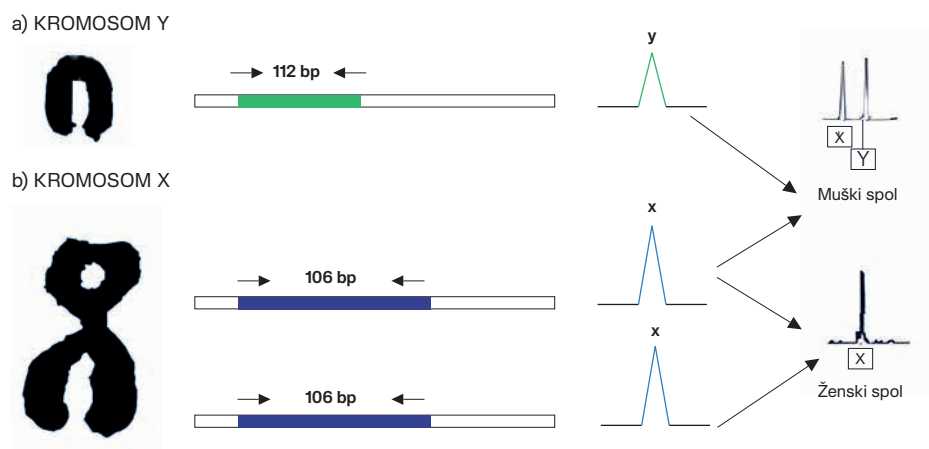
U opisu DNA profila ili DNA sekvenci vezanih uz ove biljege, koristi se pojam haplotip jer se radi o samo jednom (pojedinačnom) alelu, genetičkom entitetu, po ispitaniku, a ne o alelnom paru kao kod autosomnih biljega. S obzirom na to da se i kromosom Y i mitohondrijska DNA prenose konzervirani kroz generacije i da se podrazumijeva da svi muški srodnici po očevoj liniji imaju identičan Y haplotip, a da svi srodnici po ženskoj liniji imaju identičan mtDNA haplotip, njihova upotreba u forenzičkoj genetici ima i određene limite, nije informativna koliko upotreba autosomnih STR lokusa i zahtijeva poseban model statističke analize.

Ipak, zbog svojih genetičkih osobitosti, ovi biljezi mogu poslužiti kao izuzetno jako i učinkovito oruđe, posebno kao potpora rezultatima dobivenim analizom autosomnih biljega, u procesima forenzičke analize DNA.

5.1. ANALIZA KROMOSOMA Y U FORENZIČKOJ GENETICI

Analiza spolnih kromosoma važna je u slučaju potrebe određivanja spola i već u startu isključuje oko pola populacije. Kod svih organizama s kromosomskom determinacijom spola po modelu XX/XY, općepoznato je da se pojam spolni kromosom odnosi na kromosomske entitete genoma neke osobe i vrste koji su odgo-

vorni za kromosomsku determinaciju spola. U komercijalnim setovima, kao što je predstavljeno u prethodnom poglavlju, biljeg koji se do sada najčešće analizirao prilikom utvrđivanja spola, nalazi se u intronu 1 gena amelogenina. To je gen koji je odgovoran za sintezu proteina, osnovne komponente matriksa zubne caklina i lociran je na oba spolna kromosoma i kod oba spola. Varijanta dijela introna 1 koja se nalazi na kromosomu X, je zbog delecije od 6 bp kraća od varijante na kromosomu Y, stoga se nakon umnožavanja ciljanih dijelova navedenog gena PCR metodom detektira pojavljivanje DNA fragmenata različitih dužina. Na slici 5.1. detaljno su prikazani principi utvrđivanja spola ovom metodom. Kod muškaraca se povremeno događa ispadanje Y-specifičnog alela amelogenina zbog intersticijske delecije Yp11.2 regije koja uključuje lokus amelogenina na kromosomu Y (AMELY). To može dovesti do pogrešne identifikacije spola (ženske umjesto muške osobe), što može imati ozbiljne posljedice u postupcima osobne identifikacije i kriminalističkim istragama. Stoga se za analizu spola upotrebljava i drugi, pouzdaniji biljeg SRY, koji se može uključiti u neke komercijalne setove (Drobnič, 2006).



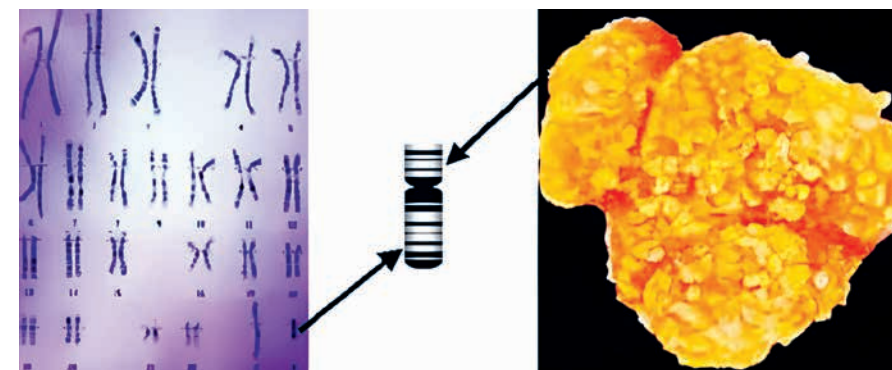
SLIKA 5.1. Razlika u građi amelogenina (AMEL-a) kod muškarca i žene. Pri umnožavanju AMEL-a kod muškarca, dobiva se fragment dužine 112 bp, dok se kod žene dobije DNA fragmet dužine 106 bp. u slučaju A) određen je muški spol s obzirom na postojanje kromosoma X i Y. Naime, kod muškarca se pri PCR amplifikaciji pojave dva fragmenta veličine 112 bp (zeleno) i 106 bp (plavo). Isto se vidi i nakon računalne analize umnoženih DNA fragmenata pojavljivanjem dva signala različitih veličina. U slučaju B), postojanjem dva kromosoma X, određen je ženski spol. U ovom slučaju, nakon PCR amplifikacije pojave se dva fragmenta identične dužine (106 bp), što nakon računalne obrade umnoženih DNA fragmenata rezultira pojavljivanjem jednog signala. (dijelovi slike preuzeti iz Primorac *et al.*, 2008).

5.1.1. Citogenetička struktura i geni kromosoma Y

„Nerekombinantna pustinja” i „genima siromašni kromosom” primjeri su različitih opisa koje je kromosom Y (slika 5.2.) dobio od završetka prvog projekta sekvenciranja ljudskog genoma (Quintana-Murci i Fellous, 2001). Ovi nazivi nagovještavaju znanstvenu činjenicu da, u usporedbi s drugim humanim kromosomima, kromosom Y ima deficitaran broj gena, a približno 50% njegove sekvence sastoji se od ponavljajućih (repetitivnih) elemenata. Štoviše, geni na kromosomu Y, u evolutivnom smislu, kontinuirano iščezavaju najvjerojatnije kao posljedica manjka rekombinacijskih procesa, što u krajnjem slučaju dovodi do njegove dalje degeneracije. Ta hipoteza ide u prilog ideji da kromosom Y danas ustvari predstavlja ostatak nekadašnjeg kromosomskog pretka koji je bio zajednički za kromosomom Y i X (Graves, 1995).

Citogenetička istraživanja bazirana na pruganju kromosoma omogućila su identifikaciju različitih Y regija: pseudoautosomne regije (podijeljene u dvije regije, PAR1 i PAR2), te eukromatsku i heterokromatsku regiju.

PAR1 lociran je na terminalnoj regiji kraćeg kraka, a PAR2 na vrhu dužeg kraka kromosoma Y. Pseudoautosomalna regija, posebno PAR1, mjesta su gdje kromosom Y u mejozi može ostvariti potencijalnu komunikaciju s kromosomom X. Prema tome, geni smješteni na ovoj kromosomskoj poziciji nasljeđuju se na isti način kao i geni na autosomima, što se naziva pseudoautosomnim nasljeđivanjem. Rekombinacija između ovih homolognih sekvenci može biti jedan od glavnih uzroka detektiranih X-Y translokacija.



SLIKA 5.2. Humani kromosom Y: a) pozicija kromosoma Y u humanom muškom kariogramu, b) shematski prikaz diferencijalno obojenog (G-pruganje, engl. *G-banding*) kromosoma Y, c) prikaz trodimenzionalne strukture.

Eukromatska regija nalazi se distalno od PAR1 i sastoji se od paracentromerne regije kraćeg kraka, centromere i paracentromerne regije dužeg kraka. Heterokromatska regija obuhvaća distalni Y_q . Za ovu regiju smatra se da je genetički inertna i polimorfna s obzirom na to da se uglavnom sastoji od dvije porodice visokorepetitivne sekvence, DYZ1 i DYZ2 koje nadalje sadrže po oko 2000 i 5000 kopija svake. Budući da su PAR1 i PAR2 zastupljeni u 5% cjelokupnog kromosoma, većina kromosoma Y (95%) je sačinjena od tzv. „nerekombinantnog Y” (NRY), koji uključuje eukromatinsku i heterokromatinsku regiju kompleksa. Budući da se smatra da je heterokromatinska regija genetički inertna, eukromatinska regija, iako ima brojne visokorepetitivne sekvence, sadrži gene odgovorne za važne biološke funkcije.

Suglasno kriterijima Denverske konvencije, humani kromosom Y pripada skupini G, odnosno kategoriji najkraćih kromosoma u ljudskoj garnituri, u kojoj su još i kromosomi 21 i 22. Prema danas najčešće korištenoj verziji ljudskog genoma GRCH38, sadrži oko 57 milijuna bp, dok zadnja publikacija, odnosno Telomere-2-Telomere (T2T) konzorcijum, koji je sekvencirao kompletan kromosom Y, barata brojkom od oko 62,5 milijuna bp. U svakom slučaju, kromosom Y čini samo oko 2% ukupnog humanog genoma (Rhie *et al.*, 2023).

Kromosom Y može pružiti važne informacije ako je u pitanju određivanje nasljednih linija nekog specifičnog muškarca. To je moguće jer kromosom Y sadrži visokopolimorfne regije (Jobling *et al.*, 1999). Ljudski kromosom Y prisutan je kod muškaraca u jednoj kopiji, nasljeđuje se po ocu, te, kako smo već rekli,

TABLICA 5.1. Amplikonski geni na kromosomu Y, broj detektiranih kopija i funkcija (National Center for Biotechnology Information, 2024; Rhie *et al.*, 2023). Radi lakše pretrage, nazive gena ostavili smo na engleskom jeziku.

Gen	Broj kopija	Puni naziv
BPY2	4	Basic charge Y-linked 2
CDY	26	Chromodomain Y-linked
DAZ	4	Deleted in azoospermia
HSFY	8	Heat shock transcription factor Y-linked
PRY	8	PTPN13-like Y-linked
RBMV	34	RNA binding motif protein Y-linked
TSPY	66	Testis-specific protein Y-linked
VCY	2	Variable charge Y-linked
XKRY	8	XK-related, Y-linked (pseudogen)

95% njegovog kompleksa ne podliježe rekombinaciji. Iako je analiza kromosoma Y bila daleko kompleksnija nego kod bilo kojeg drugog ljudskog kromosoma, identificirane su u NRY regiji različite transkripcijske jedinice ili familije blisko srodnih transkripcijskih jedinica, uključujući (1) gene s izraženom ekspresijom u mnogim tkivima i koji imaju homolog na kromosomu X, te (2) geni čija je ekspresija specifična za razvoj i funkciju testisa i nemaju homolog na kromosomu X (Lahn i Page, 1997).

Prema prošlogodišnjim podacima, kromosom Y ima ukupno 693 identificirana gena, od čega 106 gena služi za proizvodnju proteina. Kada su u pitanju amplikonski geni, prisutni u više kopija na Y i bez homologa na kromosomu X, identificirano je devet takvih grupa (Tablica 5.1.). Zanimljivo je da su u pitanju geni čija je ekspresija ograničena na testise i koji usmjeravaju u pravcu razvoja muškog spola, a jedini gen važan u tom procesu, a koji nije prisutan u multiplim kopijama je *SRY* (Rhie *et al.*, 2023).

5.1.2. Primjena kromosoma Y u forenzičkoj i populacijskoj genetici

U forenzičkim analizama, kromosom Y ima važnu ulogu u slučajevima silovanja, posebno u onima koja uključuju više od jednog muškarca, a osobito kada se javljaju miješani tragovi u kojima dominira frakcija ženske žrtve (Prinz, 1999). Y-STR biljezi također mogu biti korisni u slučajevima dokazivanja očinstva ili daljnjeg srodstva po muškoj liniji, kada su djeca muškog spola te u procesu identifikacije kada su prisutni srodnici samo s očeve strane. Osim toga, kako je već navedeno u jednom od prethodnih poglavlja, kromosom Y se sve više koristi u utvrđivanju migracije pojedinih naroda tijekom prošlosti, jer kromosom Y ne podliježe rekombinaciji prilikom generacijskog prenošenja genetičkog materijala (Semino *et al.*, 2000). Zapravo, otkako je objavljen prvi polimorfizam na kromosomu Y (Casanova *et al.*, 1985), prošlo je više od dva desetljeća prije nego su binarni biljezi pozicionirani na NRY regiji našli svoju širu primjenu u filogenetičkim studijama praćenja humanih migracijskih puteva konstrukcijom filogenetičkog stabla (Hammer *et al.*, 2001; Karafet *et al.*, 2008).

Pored toga što su neka od tih istraživanja ponudila izuzetno zanimljive modele i scenarije ljudske povijesti na našim prostorima (Marjanović *et al.*, 2005a, 2005b; Babić Jordamović *et al.*, 2021), ona su promovirala i upotrebnu vrijednost SNP biljega, koji se zasnivaju na zamjeni, inserciji ili deleciji samo jednog baznog para. Nadalje, analiza Y-STR-a ima važnu ulogu u, doduše, rijetkim, ali važnim slučajevima kada u muškaraca postoji delecija 6 bp gena za amelogenin (Kastelić *et al.*, 2009). Podsjećanja radi, NRY binarni polimorfizmi (SNP-ovi i indel-i) su determinanta pripadnosti određenoj haplogrupi, dok mikrosatelitni STR biljezi kromosoma Y čine haplotip analizirane NRY regije.

S gledišta sudske prakse, bitno je naglasiti da utvrđivanje i eventualno podudaranje Y-STR DNA profila dva traga, bez obzira o koliko se analiziranih molekularnih biljega radilo, ne predstavlja potpunu individualizaciju. Kako se kromosom Y nasljeđuje po muškoj liniji, tj. s oca na sina, identičan profil imaju sve muške osobe povezane „očinskom rodbinskom linijom”. Stoga, najčešći stav prilikom interpretacije rezultata na sudu, a u slučaju podudaranja Y-STR profila uzoraka, jest da se navedena osoba ne može isključiti kao potencijalni biološki izvor analiziranog traga. Uz to se najčešće prilaže relativna frekvencija pojavljivanja utvrđenog Y-STR profila, tj. haplotipa u konkretnoj, regionalnoj ili svjetskoj populaciji. Određeni autori sugeriraju statističke metode koje su izuzetno slične onima koje se koriste u prikazivanju rezultata analize mitohondrijske DNA.

5.1.2.1. Minimalni haplotip

Početak 21. stoljeća, istraživanje Y-STR biljega bilo je na vrhuncu i često su opisivani i identificirani novi biljezi, tako da danas možemo govoriti o nekoliko stotina biljega. Osnovno pitanje koje se nameće je koliko minimalno Y-STR biljega treba upotrebljavati u analizi da bi se dobili statistički značajni rezultati. Prvi prijedlog došao je prije 25 godina (Schneider *et al.*, 1999), kada su autori savjetovali korištenje 8 lokusa u tzv. minimalnom haplotipu, a to su DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 i DY385 a/b. DY385 se nalazi unutar duplicirane regije kromosoma Y, što rezultira dvjema razlikovnim kopijama DY385a i DY385b, stoga je minimalni haplotip predstavljen s 9 alelnih varijanti. Pet godina poslije, SWAGDAM (engl. *U.S. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) je preporučio da se minimalni haplotip proširi za još dva dodatna lokusa DYS438 i DYS439, čime je minimalni haplotip sada proširen na 10 lokusa, koji daju haplotip na 11 alelnih varijanti. Ove upute su i danas važeće.

Set od osam biljega i danas je prihvaćen kao minimum za unošenje rezultata u svjetsku referentnu bazu podataka STR haplotipova kromosoma Y (YHRD, engl. *Y-Chromosome STR Haplotype Reference Database*, YHRD), u koju su uključeni i rezultati hrvatske, bosanskohercegovačke, slovenske i drugih regionalnih populacija. Prema podacima iz kolovoza 2024. godine, YHRD sadrži 349 750 minimalnih haplotipova, kao i 309 090 haplotipova s 12 Y-STR biljega, 289 405 haplotipa sa 17 biljega, 103 280 haplotipova s 23 biljega te 106 444 haplotipa s 27 Y-STR biljega.¹

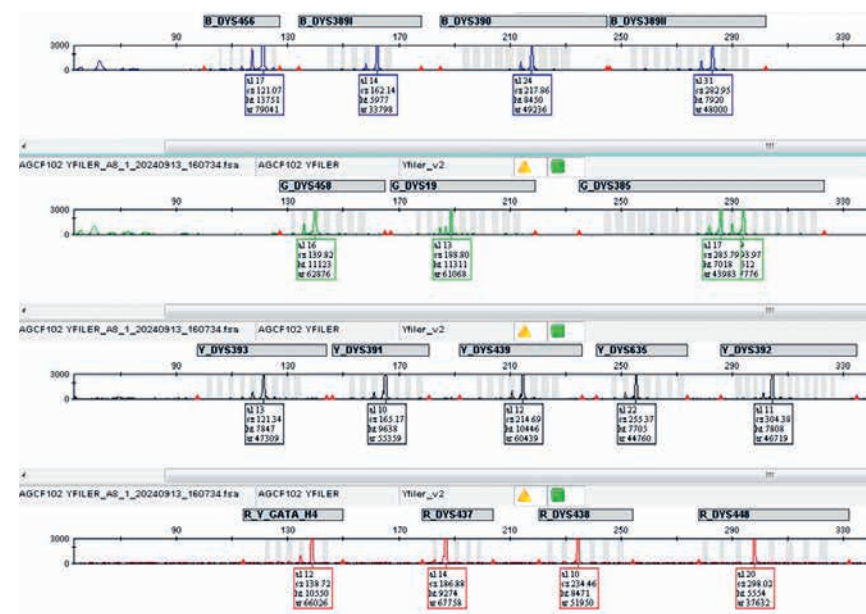
5.1.2.2. Komercijalni Y-STR multipleks sustavi

Jedan od pokazatelja koliko je ozbiljno i bitno analiziranje kromosoma Y u forenzičkoj analizi DNA je i veliki broj komercijalnih multipleksnih sustava dostupnih na tržištu. Od nešto starijih komercijalnih setova, izdajamo razvoj sljedećih:

- **PowerPlex® Y** je multipleks Y-STR kit koji je proizvela Promega 2003. godine. Njegovom primjenom moguće je analizirati 12 Y-STR lokusa.
- **PowerPlex® Y23** multipleks Y-STR kit koji je proizvela Promega 2012. godine. Njegovom primjenom moguće je analizirati 23 Y-STR lokusa (slika 5.3.).
- **AmpFISTR™ Yfiler™ PCR Amplification Kit** je multipleks Y-STR kit koji je proizvela tvrtka Applied Biosystems 2004. godine. Njegovom primjenom moguće je analizirati 17 Y-STR lokusa (slika 5.4.).

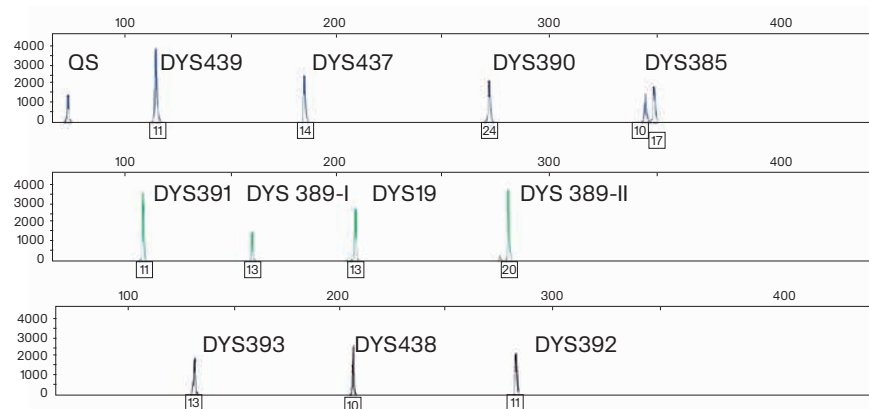
Investigator™ Argus Y-12 QS Kit multipleks Y-STR kit koji je proizvela kompanija Qiagen 2010. godine koristi se za analizu 17 Y-STR lokusa.

Kada su u pitanju noviji komercijalni sustavi za analizu Y-STR lokusa, **AmpFISTR™ Yfiler™ Plus PCR Amplification Kit** je multipleks set koji istovremeno analizira 27 lokusa, tako da mu je snaga diskriminacije značajno veća. Također,



SLIKA 5.3. AmpFISTR™ Yfiler™ PCR Amplification Kit Y-STR DNA profil.

¹ Podatci su preuzeti sa <https://yhrd.org/pages/resources/stats>, pristup 11.8.2024. godine.



SLIKA 5.4. Investigator™ Argus Y-12 QS Y STR profil.

za razliku od većine do sada poznatih komercijalnih Y-STR setova, za detekciju koristi 6 boja. Njegove su primjene prvenstveno u slučajevima seksualnog napada i analizi miješanih tragova, kao i u studijama biogeografskog porijekla, identifikaciji nestalih osoba i identifikaciji žrtava masovnih katastrofa, kao i u utvrđivanju srodnika po muškoj liniji. Još jedan benefit korištenja ovog seta je izravna amplifikacija, bez izolacije DNA. Na kraju, važno je naglasiti da je set posebno optimiziran za upotrebu u svrhe forenzičko-genetičke analize jer sadrži 7 brzomutirajućih Y-STR lokusa, za lakše razlikovanje bliskih srodnika po muškoj liniji, te 11 Y-STR-ova koji se mogu svrstati u miniSTR kategoriju (dužina amplikona ispod 220 bp), za analizu izazovnih ili degradiranih uzoraka.

COrDIS Ystr kit je multipleks set za 18 polimorfnih Y-STR biljega tvrtke GORDIZ. Također se može koristiti za izravnu amplifikaciju, bez prethodne izolacije DNA iz uzorka, koristeći COrDIS Sprint reagens za lizu. Biljezi uključeni u set su: DYS391, DYS389I, DYS19, DYS437, DYS389II, DYS393, DYS392, DYS447, DYS576, DYS438, DYS390, DYS449, DYS448, DYS456, DYS439, DYS385 a/b i DYS635.

Novi Qiagenov set naziva **Investigator™ Argus Y-28 QS Kit** omogućava multipleks amplifikaciju 27 Y-STR biljega iz različitih muških uzoraka, muško-muške i muško-ženske smjese, kao i izravnu PCR amplifikaciju iz nespornih uzoraka. Zbog izbora biljega, od kojih je šest brzomutirajućih, set nudi izvrsnu snagu diskriminacije. Set koristi tehnologiju koja omogućava brzu PCR amplifikaciju za oko 90 minuta te pruža poboljšanu stabilnost i otpornost na inhibitore. Optimiziran je da poboljša razlučivost tragova i smjesa iz seksualnih napada koji sadrže male količine muške DNA i velike količine ženske DNA. Preporučena količina

DNA pod standardnim uvjetima je 0,5 ng. Interna validacija pokazala je robusne i uravnotežene rezultate s 0,1 do 2 ng DNA, i pouzdane rezultate s <0,1 ng DNA.

Na kraju rasprave o kromosomu Y, navodimo jednu statističku napomenu. Analizom fragmenata dobivenih korištenjem početnica specifičnih za DYS385 lokus dobiva se elektroferogramska slika identična onoj kod heterozigotnih STR-ova (dva signala kod muških osoba). To je posljedica postojanja identičnih mjesta vezanja početnica (engl. *primer-binding sites*), i takvi rezultati ne prate statistička pravila izračunavanja signifikantnosti podudaranja kao heterozigotni aleli na autosomnim STR-ovima, već se svaka kombinacija uzima kao nezavisan identitet. Ovo se ne događa samo s lokusom DYS385 (iako se na njemu najčešće vidi, jer je jedan od sveprisutnih u komercijalnim Y-STR sustavima), nego se isto može vidjeti na lokusima DYS527 i DYF404S1 (Butler *et al.*, 2005).

5.2 ANALIZA MITOHONDRIJSKE DNA

Kako je već navedeno, humani genom sastoji se od dvije, manje-više, nezavisne komponente. Prvu predstavlja kompleksni genom jezgre (nuklearni genom), koji čini 99,9995% ukupnog genoma, dok drugu predstavlja jednostavni, klonalno naslijeđeni, mitohondrijski genom, koji obuhvaća preostali, manji, ali ipak značajan dio humanog genoma. Mitohondrijska DNA (mtDNA) smještena je u mitohondrijima, staničnim organelima poznatim po svojoj funkciji oksidativne fosforilacije.

Kao generatori energije, mitohondriji sudjeluju u proizvodnji adenozin trifosfata (ATP) putem oksidativno fosforilacijskih mehanizama, koji predstavljaju osnovno „energetsko gorivo” svakog eukariotskog organizma. Osnovne karakteristike mitohondrija, kao i mitohondrijske DNA, ukazuju da ovi organeli vode porijeklo od endosimbiotskih bakterija. Naime, ovu teoriju prvi je put postulirala Lynn Margulis (Margulis, 1981) te je i danas općeprihvaćena u znanstvenim krugovima. Aproximativno, prije 1,5 milijardi godina, endosimbiotske bakterije stupile su u simbiozu s proto-eukariotskim stanicama, kojima su time osigurale „energetsko gorivo”, a zauzvrat dobile optimalnu sredinu, tj. medij za opstanak.

Da je zaista bilo tako pokazuju i osobine mtDNA koje su jako slične onima kod recentnih bakterija:

- mtDNA je cirkularna molekula.
- Nema histonski kompleks.
- Replicira se neovisno od nuklearnog genoma.
- Nema introne, niti repetitivne motive (s izuzetkom dinukleotidnog CA ponavljajućeg slijeda na regiji HV3).
- Kao rezultat transkripcije nastaje policistronski transkript.

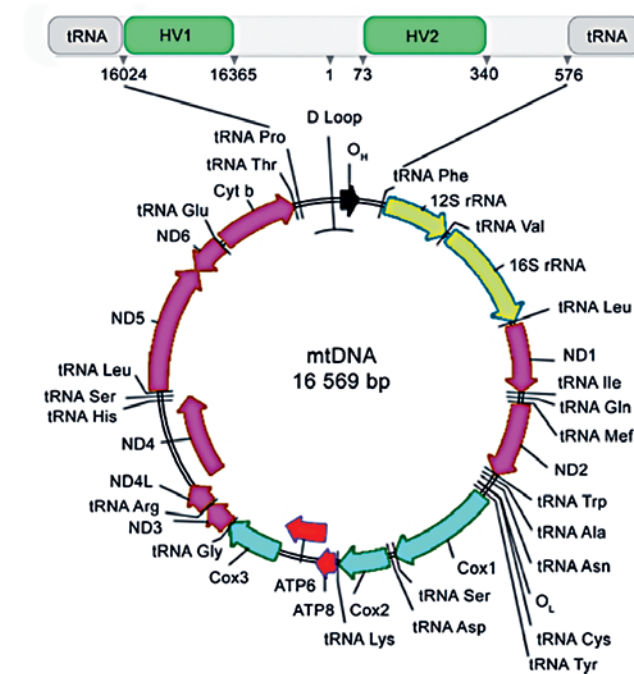
Transkripcija počinje na samo dva promotora, po jedan na svakom od lanaca, i nastavlja duž cijelog cirkularnog genoma, stvarajući jednolančanu RNA molekulu. U tablici 5.2. prikazani su mtDNA i nuDNA kodoni koji kodiraju sintezu različitih aminokiselina, te oni koji predstavljaju STOP kodon u *mitogenomu*, i STOP kodon u nuklearnom genomu.

TABLICA 5.2. Komparativna analiza različitih kodona kod nuDNA i mtDNA.

Kodon	Nuklearni kod	mtDNA kod
UGA	STOP	Triptofan
AGA, AGG	Arginin	STOP
AUA, AUU	Izoleucin	Metionin

Unutar jedne eukariotske stanice nalazi se različit broj mitohondrija (ovisno o potrebi stanice za energijom), a u njima velik broj istovjetnih kopija mtDNA. Procjenjuje se da normalna oocita sadrži oko 100 000 kopija. Somatske stanice, ovisno o tipu stanice i tkiva sadrže od dvjestotinjak do više od 1700 kopija. Upravo ta brojnost molekula mtDNA u pojedinoj eukariotskoj stanici povećava vjerojatnost njene uspješne izolacije i iz uzoraka u kojima se DNA zbog vanjskih uvjeta s vremenom ubrzano raspada.

Humani mitohondriji sadrže cirkularni genom od 16 569 parova baza. Funkcija, mutacije, populacijska varijabilnost i nasljedni poremećaji mitohondrijskog genoma detaljno su istraženi i poznate su specifične delecije, duplikacije i brojne točkaste mutacije koje dovode do različitih specifičnih patofizioloških sindroma. U njen sastav ulazi 37 gena, od kojih većina kontrolira upravo proces oksidativne fosforilacije, produkciju energije i njeno pohranjivanje u formi ATP-a, te sintezu mitohondrijskih proteina. Mitohondrijski geni kodiraju 13 informativnih RNA (iRNA), 22 transportne RNA (tRNA), te dvije ribosomalne RNA (rRNA) molekule. S obzirom da se radi o dvolančanoj molekuli, jedan lanac je teški (engl. *heavy* - H), bogat je gvaninom, te sadrži 12 iRNA kodirajućih gena, te ukupno 14 tRNA i rRNA kodirajućih gena. Drugi lanac je laki (engl. *light* - L) i bogat je citozinom (slika 5.5.). Analiza inicijalne sekvence humanog genoma, ukazala je da nuklearni genom sadrži preko 400 000 baza (400 kb) mtDNA sekvence, što je 25 puta veća sekvenca nego sama mtDNA molekula. Ova pojava se u stručnoj literaturi još naziva nuklearna mtDNA insercija, što je uobičajena pojava kod svih primata, i upravo je to potencijalni izvor prepreka u istraživanjima tzv. drevne mtDNA (engl. *ancient mtDNA*). Slijed nukleotida u humanoj mitohondrijskoj DNA određen



SLIKA 5.5. Shema mitohondrijskog genoma čovjeka. Uvećana je kontrolna regija s dvije hipervarijabilne regije (HV1 i HV2).

je 1981. godine (Anderson *et al.*, 1981), kada je generirana Andersonova ili referentna Cambridge sekvenca (engl. *Cambridge Reference Sequence*, CRS) sekvenca koja se koristila kao referenca za sve buduće analize mtDNA. Andrews i autori su 1999. revidirali CRS, te se od tada obilježava kao revidirana CRS (engl. *revised Cambridge Reference Sequence*, rCRS) (Andrews *et al.*, 1999). Naime, kada je prvi put sekvenciran mitohondrijski genom, s obzirom na relativno primitivnu tehniku sekvenciranja, „rupe” u utvrđenoj sekvenci koja potječe od placentnog materijala osobe kavkazoidnog porijekla bile su popunjavane malim sekvencama koje su vodile porijeklo od govedeg biološkog materijala. Ponovna analiza utvrdila je 11 razlika, no, srećom za forenzičku zajednicu, niti jedna od tih razlika nije bila utvrđena u kontrolnoj regiji i njenim korištenim HV1 i HV2 regijama. Bitno je naglasiti da je do sada korištena (rCRS, a za koju se sada već zna da pripada mladoj, europskoj haplogrupi H2a2a1, bila konstantan izvor pogrešaka u interpretaciji rezultata, prije svega identifikaciji ancestralne i generirane mutacije, što je vodilo k nevjerodostojnim rezultatima u medicinskim i forenzičkim analizama. Shodno tome, sugerirana je nova, filogenetički validna

referenca, nazvana rekonstruirana *Sapiens* referentna sekvenca (engl. *Reconstructed Sapiens Reference Sequence*, RSRS) (Behar *et al.*, 2012), koja se od sada, zapravo, koristi kao referentna za komparativnu analizu u procesu poravnanja sekvenci.

Nekodirajući dio mtDNA ima visoku stopu mutiranja, gotovo 10 puta veću nego što je to slučaj kod jezgrine DNA. Nekodirajuću regiju mtDNA čine dva, a po novijoj literaturi, tri hipervarijabilna segmenta: HVS 1-3, a nukleotidne pozicije koje ih graniče su: 16024-16356 (HV1), 73-340 (HV2) i 438-574 (HV3). Ova nekodirajuća regija mitohondrijskog genoma naziva se još **D petlja** (engl. *displacement loop*, *D-loop*) ili kontrolna regija (engl. *control region* – *CR*), o kojoj je već bilo riječi u ranijim poglavljima. Stopa mutiranja D petlje je u rasponu od 2,8 do 5 puta veća nego u kodirajućem dijelu mtDNA. Jedna od bitnih osobina mtDNA molekule je izostanak rekombinacije. Naime, kada se pojavi mutacija, ona se prenosi iz generacije u generaciju bez procesa popravka ili pak rekombinacije unutar mitogenoma.

5.2.1. Nasljeđivanje mitohondrijske DNA

Svaka osoba u sebi nosi istovjetnu kopiju mtDNA svoje majke, pa samim tim majke svoje majke, i tako, u odsustvu mutacija, u nedogled kroz generacije majčinom linijom. Humani mitohondrijski genom podložan je nasumičnim mutacijama, koje se potom prenose na sljedeće generacije. Upravo te mutacije, detektirane u mtDNA molekuli, predstavljaju „obiteljski genetički identitet”, koji je doprinio sve većoj primjeni mtDNA u forenzičkoj analizi DNA, ali isto tako i u praćenju migracijskih tokova u različitim periodima ljudske prošlosti. To, ujedno, čini jedan od osnova arheogenetike kao nove discipline koja primjenjuje znanja iz molekularne genetike u svrhu istraživanja, između ostalog, i čovjekove prošlosti (Rennfrew *et al.*, 2000).

Dakle, osnovna karakteristika nasljeđivanja mtDNA je nasljeđivanje po majčinoj liniji: sva braća i sestre imaju slijed nukleotida mtDNA identičan onom njihovih majki. Razlog za takvu vrstu nasljeđivanja na prvi je pogled prilično jednostavan: jajna stanica ima nekoliko tisuća mitohondrija i stotine tisuća kopija mtDNA, a spermij svega nekoliko mitohondrija. S obzirom na razliku u veličini citoplazme jajne stanice, u odnosu na spermatozoid (kao i zapreminsku razliku samih stanica), nije iznenađujuće da zigot praktično cijelu svoju citoplazmu dobiva od jajne stanice, a to uključuje sve organele u njoj. Iako se i dalje vode debate o tome ulazi li citoplazma s mitohondrijima iz spermatozoida u oplodenu jajnu stanicu, znanstvenici su suglasni u tome da se očeva mitohondrijska DNA ne nasljeđuje, bilo zbog toga što ne dolazi do jajne stanice ili do toga što selektivni mehanizam uništava mitohondrije iz spermatozoida nakon oplodnje. Ova, generalno prihvaćena teorija, potvrđena je nizom eksperimenata koji su pokazali da se primjenom

metoda koji se koriste u rutinskoj obradi uzoraka ne može dokazati postojanje očinske mtDNA u stanicama djece (Parsons *et al.*, 1997).

5.2.2. Značenje analize mtDNA u sudskoj medicini

Sve do sada navedene osobine, a naročito priroda nasljeđivanja majčinom linijom, čine mtDNA unikatnim i učinkovitim oruđem za sve učestaliju primjenu u forenzičkoj analizi DNA. Postoje određene prednosti zbog kojih je analiza mtDNA zaživjela kao metoda u praksi, iako se analiza STR sekvenci već bila pokazala djelotvornom i točnom (Primorac i Schanfield, 2000). Jedna od glavnih prednosti analize mtDNA je njena brojnost u svakoj stanici s aerobnim metabolizmom. Osim toga, dijelovi mtDNA koji se istražuju dugi su svega tristotinjak parova baza, što povećava vjerojatnost uspješnog „preživljavanja” ciljnog dijela molekule u uvjetima kojima mogu biti izloženi uzorci koji trebaju biti analizirani.

Druga osobina mitohondrijske DNA koja je ponekad presudna u odabiru metode identifikacije jest način nasljeđivanja. Budući da se DNA nasljeđuje samo po majčinskoj liniji, moguće je prilikom identifikacije posmrtnih ostataka kao referentni uzorak koristiti i srodnike koji su u obiteljskom stablu relativno daleko od osobe čiji se identitet želi utvrditi, bilo horizontalno (rođaci koji imaju zajedničku baku ili čak prabaku), bilo vertikalno (baka, majčina braća ili sestre, ...). Prilikom identifikacije osoba pomoću nuklearne DNA, nije moguće uključiti rođake izvan prvog nasljednog reda (roditelji i djeca) zbog segregacije homolognih gena. Svakako da metoda analize mtDNA omogućuje proširenje kruga osoba koje mogu dati referentni uzorak za analizu. Iako je analiza mtDNA znatno složenija i skuplja od analize STR sekvenci u nuklearnoj DNA, razvoj novih metoda, a posebno uvođenje NGS platformi u svakodnevni laboratorijski rad (detaljnije u nastavku poglavlja), učinio je ovu analizu mnogo pristupačnijom i jednostavnijom.

Jedan od osnovnih nedostataka analize mtDNA u identifikacijama jest ograničena mogućnost pozitivne identifikacije. Analizom samo hipervarijabilnih regija može se u slučaju podudarnosti teško sa sigurnošću utvrditi pozitivna identifikacija, a najviša vjerojatnost koja se postiže kreće se oko 0.995. Razlog za to je činjenica da se, iako je varijabilnost ovih regija velika, radi o vezanim DNA regijama, te se sve mutacije nasljeđuju zajedno kao jedan lokus. Novija mogućnost povećavanja snage diskriminacije i vjerojatnosti pozitivnog nalaza je analiza većeg broja polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP), te naravno, sekvenciranjem čitavog mitohondrijskog genoma, čime se mogućnost razlučivanja i vjerojatnost podudarnosti dovodi do maksimuma. Ovo su noviji pristupi, koji su već ušli u laboratorijsku praksu, uglavnom u istraživačke svrhe, ali se može očekivati upotreba sekvenciranja cijelog mitogenoma bar za slučajeve u kojima se to smatra neophodnim.

U slučaju nepodudaranja, osobu se kao potencijalni izvor uzorka može odbaciti s potpunom sigurnošću. Povećavanjem broja analiziranih uzoraka i zaživljavanjem međunarodne standardne baze podataka o humanoj mtDNA u forenzičke (a ne samo populacijsko-genetičke) svrhe, bit će moguće točnije računati vjerojatnosti pozitivne identifikacije u slučaju podudarnosti, iako se izračunavane vrijednosti vjerojatno neće bitno povećavati.

Uzimajući u obzir sve njene specifičnosti, ne čudi nedostatak komercijalnih sustava za analizu mtDNA na tržištu. Od slučaja do slučaja ovisi koji dio ili koje će pozicije mitogenoma biti analizirane, stoga se većina tih analiza danas provodi pomoću metodologije koju laboratorije razvijaju u svoje svrhe, ali prateći preporučene protokole, poput onih koje su izdali AFDIL (engl. *Armed Forces DNA Identification Laboratory*) ili Myriad Genetics.

Zbog velike osjetljivosti prilikom umnožavanja mtDNA uzorka PCR metodom, metoda analize mtDNA je puno osjetljivija na kontaminaciju uzorka. Ovo je još jedan praktični nedostatak metode koji se može umanjiti striktnim pridržavanjem laboratorijskih protokola, ali nikada potpuno ukloniti.

Uzorci koji se mogu istraživati primjenom analize mtDNA u načelu su isti kao i uzorci za druge analize DNA, odnosno, uz rijetke iznimke, svi biološki uzorci. Prilikom identifikacije nepoznatih posmrtnih ostataka, ovisno o vremenu koje je proteklo od smrti i u kojem su na tijelo djelovali činitelji koji djeluju na degradaciju DNA i o intenzitetu tih činitelja, moguće je upotrijebiti različita tkiva. Sa svježih tijela moguće je uzeti bilo koje tkivo kao uzorak. Ipak, vrijednost analize mtDNA najviše dolazi do izražaja kod posmrtnih ostataka u kojima je DNA vrlo degradirana, te je nemoguće izolirati kvalitetan materijal za analizu nuklearne DNA. S mjesta zločina ili s tijela žrtve uzimaju se i analiziraju svi uzorci humanog porijekla koji mogu dolaziti od počinitelja. Radi se često o uobičajenim uzorcima, kao što su sjemena tekućina, krv, dlake, uzorak ispod noktiju žrtve, ali ponekad i o uzorcima kao što su perut, otisak prsta i slični.

Postupci u analizi mtDNA u prvih su nekoliko koraka identični kao i u drugim analizama DNA u sudskoj medicini. Do sada je uvijek važno pravilo da se nakon potvrđivanja ustanovljene sekvence analizom oba lanca DNA, sekvenca uspoređuje s rCRS utvrđuju, se razlike koje se označavaju. Npr. ako je primijećeno da ustanovljena sekvenca na poziciji 16126 ima C, u odnosu na rCRS koja na toj poziciji ima T, to se označi kao 16126C. U slučaju nepodudaranja haplotipova mtDNA, odbacuje se osoba koja je izvor referentnog uzorka kao mogući izvor upitnog uzorka, odnosno srodnik neidentificirane osobe. U slučaju podudaranja, potrebno je provjeriti nalazi li se sekvencirani alel u bazi podataka, te izračunati značaj te podudarnosti. Ovaj je proces danas izuzetno brz i precizan jer se u njemu koriste optimizirani softveri, te se, kako je u ranijem tekstu naznačeno, kao referentna sekvenca koristi RSRS.

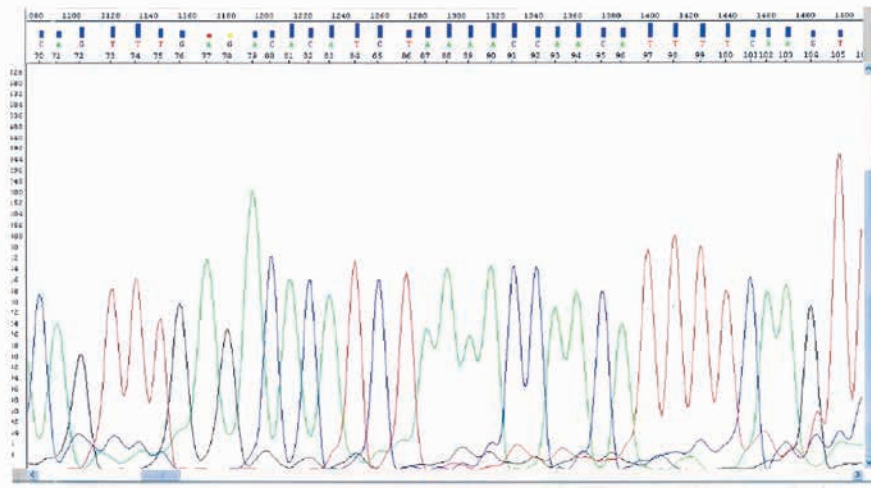
5.2.3. Instrumentalne metode analize mitohondrijske DNA

Broj komercijalnih setova za STR analizu nuklearne DNA uveliko premašuje broj bilo kakvih gotovih rješenja za analizu mtDNA, pa samim tim i znanstvena, i, posljedično, zakonska regulativa je striktnija i opširnija. To naravno ne znači da ne postoje jasne smjernice za forenzičku upotrebu mtDNA (Irwin *et al.*, 2007; Syndercombe-Court, 2021).

5.2.3.1. Sangerovo sekvenciranje mtDNA

Ova instrumentalna analiza još uvijek je zlatni standard analize mtDNA, tim više što se i druge analize naslanjaju na podatke koji su dobiveni njome. Metoda je prvobitno dizajnirana za primjenu na gel elektroforezi, ali danas se skoro isključivo radi na automatiziranim sekvencerima. Prvi su se pojavili sekvenceri koji su koristili umetnute gelove (ABI 373, ABI 377), a onda su došli kapilarni sustavi koji danas dominiraju (starije generacije ABI 310, ABI 3100, ABI 3130 te novije generacije ABI 3500, ABI SeqStudio, Promega Spectrum Compact...). Današnji kapilarni sustavi koriste više kapilara odjednom (4, 8, 16...), čime su nadvladali osnovnu manu jednokapilarnih sustava, a to je mali kapacitet testiranja. Sangerovo sekvenciranje mtDNA prati uobičajena pravila sekvenciranja metodom terminacije lanca tj. korištenjem ddNTP-ova obilježenim bojama, čija je uloga terminiranje elongacijske sekvence nakon ugradnje u lanac nakon PCR umnožavanja regija od interesa dobiveni amplifikati podvrgavaju. Važno je napomenuti da se u „terminacijski PCR“ stavljaju i obični dNTP-jevi, što omogućuje randomiziranu elongaciju (zavisno o tome povezuje li se na rastući lanac dNTP ili ddNTP), a rezultat čega je skup fragmenata koji su točno za jedan bazni par veći od prethodnog, i na čijem se kraju nalazi ddNTP obilježen različitom fluorescentnom bojom za svaki nukleotid (uobičajeno je zelena za adenin, plava za gvanin, žuta, koji se na sekvenceru prikazuje kao crna, za citozin, i crvena za timin). Kako dobiveni fragmenti prolaze kroz kapilaru (gdje im brzina ovisi o veličini) i dolaze do mjesta laserske ekscitacije, oni fluoresciraju valnom duljinom boje terminirajućeg ddNTP. Na taj način dobivamo sukcesivan signal koji odgovara DNA sekvenci (slika 5.6.).

Ova instrumentalna metoda daleko je najduže i najviše upotrebljavana za analizu mtDNA. Najčešće se na opisani način amplificiraju i sekvenciraju tri hipervarijabilne regije mtDNA. Prosječna različitost nukleotida unutar spomenutih HV regija iznosi 1.7%, ili 7-14 nukleotida od 610 nukleotida HV1 i HV2 regija (HV3 se ranije sekvencirala samo u slučaju potrebe dodatne distinkcije). Danas se, međutim, najčešće sve tri HV regije rutinski rade u svrhu forenzičke analize.



SLIKA 5.6. Klasični elektroferogram koji pokazuje rezultate Sangerovog sekvenciranja dijela mtDNA.

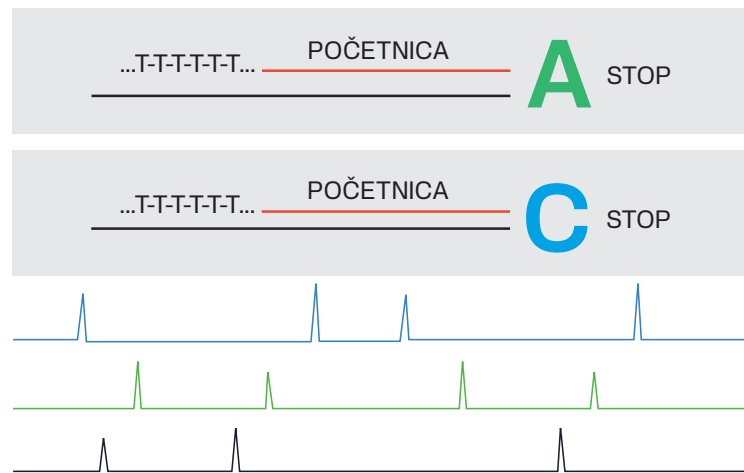
Završno sekvenciranje korištenjem ddNTP može se raditi istim početnicama kojima je rađena i inicijalna amplifikacija, što se onda naziva ugniježđeni PCR (engl. *nested PCR*), ili univerzalnim sekvencijskim početnicama. Veličina fragmenta koji se uspješno sekvencira u jednoj reakciji je u prosjeku nekih 600 jasno čitljivih bp, mada to generalno zavisi od dužine kapilare, polimeraze koja se koristi, i sličnih faktora, pa tako postoje primjeri da su jasno sekvencirani fragmenti bili puno duži. Ipak, s obzirom da većina forenzičkih protokola zahtijeva kristalno jasnu diferencijaciju signala koji predstavljaju dušične baze, kao i podudarnost sekvence dobivene s prednjim početnicama s reverznom komplementarnom sekvencom dobivenom korištenjem zadnjih početnica, može se reći da u forenzičke svrhe sekvenciramo između 200 i 300 bp u jednoj reakciji. Tako se HV1 regija često radi u dvije odvojene reakcije, radi apsolutne preciznosti interpretacije sekvence, dok je za HV2 i HV3 regije dovoljna po jedna reakcija. Naravno, broj korištenih početnica i ukupan broj reakcija na koje će podijeliti sekvenciranje uvelike ovisi i o vrsti uzorka koja se koristi, kao i od stupnja njegove degradacije. Primjera radi, već dugo je u upotrebi protokol amplifikacije cijele HV regije koji koristi parove osam mini-početnica, od kojih je svaki odgovoran za amplifikaciju fragmenta manjeg od 200 bp. Dizajniran je u svrhu analize jako degradiranih uzoraka i u praksi je pokazao povećanu osjetljivost (Gabriel *et al.*, 2001). Važno je napomenuti da je prilikom usporedne analize u forenzičkoj praksi bitno imati podatak za populaciju iz koje testirana individua dolazi jer se na taj način dobiveni rezultati stavljaju u ispravan kontekst (Konjhodžić *et al.*, 2024).

Sekvenciranje cjelokupne mtDNA povećava snagu diskriminacije ove analize, ali je čini i znatno i složenom, prvenstveno zbog broja reakcija koje je neophodno napraviti (Handžić *et al.*, 2024). Sekvenciranje cjelokupne mtDNA zahtijeva najmanje 30 parova početnica, mada je u praksi taj broj veći. Čak i s automatskim DNA sekvencerima velikog kapaciteta (s 8, 16 ili čak više kapilara), priprema i samo sekvenciranje su jako dug proces, ali i neophodan da bi se utvrdila mjesta pojavljivanja SNP-ova izvan kontrolne regije. Kada smo u stanju odrediti na kojim se mjestima SNP-ovi najčešće nalaze, možemo kreirati početnice koje amplificiraju relativno kratke fragmente na upravo tim mjestima, i sekvencirati samo njih. Sangerovo sekvenciranje je, kako već i rečeno, zlatni standard analize mtDNA, ali danas se može posegnuti i za drugim analizama određivanja manje zastupljenih varijanti SNP-ova kod osoba.

5.2.3.2. Ekstenzija za jednu bazu

U prethodnom tekstu već je opisano formiranje fragmenata kompeticijom dNTP-jeva i ddNTP-jeva potrebnih za Sangerovo sekvenciranje. No, ono što se dogodi kada se u elongacijskom PCR koraku u potpunosti izostave dNTP-jevi, i dodaju se samo terminirajući ddNTP-ovi, zapravo je pozadina analize mtDNA metodom ekstenzije za jednu bazu (engl. *single-base extension, SBE*). S obzirom da nema kompeticije između njih, kompletan lanac terminira nakon elongacije samo jednim nukleotidom. S obzirom da su ddNTP-jevi označeni fluorescirajućim bojama, na opisani način dobivamo fluorescirajući fragment koji je za točno jedan bazni par duži od dužine dizajnirane početnice. To znači da se u ovom slučaju ne mora raditi klasično kapilarno sekvenciranje, nego je dovoljno napraviti fragmentnu analizu. Fragmentna analiza je instrumentalna metoda koja se također radi na DNA sekvencerima.

U praksi to izgleda ovako: Dizajniraju se početnice veličine od 18 do 24 bp neposredno uzvodno od SNP-a koji nas interesira. U prvoj amplifikaciji korištenjem multipleks PCR-a umnožava se kompletna regija od interesa ili više njih. Nakon pročišćavanja dobivenih produkata vrši se SBE, koristeći se početnicama dizajniranim na ranije opisan način. Na taj način kreiraju se fragmenti poznate veličine, koji, prilikom fragmentne analize, fluoresciraju bojom ovisno o ddNTP-u koji se vezao na kraju (zelenom za adenin, plavom za gvanin, žutom (vidljiva kao crna) za citozin, i crvenom za timin). GC udio u početnicama za SBE trebao bi biti oko 50%. Veličina dobivenih fragmenata može se manipulirati politiminskim repovima (slika 5.7.), što omogućuje diferencijaciju po veličini, što opet omogućuje multipleksing detekcije fragmenata (Konjhodžić *et al.*, 2023). Naravno, u procesu multipleksinga SBE treba voditi računa o mogućoj međusobnoj interakciji početnica, za što se mogu koristiti i razni programi za dizajn i aplikaciju, kao



SLIKA 5.7. Dizajn i pozicioniranje početnica za SNP genotipizaciju metodom ekstenzije za jednu bazu.

npr. *Primer3*. Referentni standard veličine korišten u kapilarnoj elektroforezi ne bi trebao prelaziti 120 bp.

Prednost jednobazne ekstenzije je u tome što značajno skraćuje vrijeme analize u odnosu na klasično Sangerovo sekvenciranje, kao i vrijeme obrade podataka (rezultati fragmentne analize značajno su lakši za analizu). Mogućnost multipleksinga, pod uvjetom da je dobro optimiziran, omogućuje detekciju desetak (nekad čak i više) SNP-ova odjednom. Nedostatak ove analize jest što ona detektira samo ciljani SNP, pa su tako i varijacije vidljive samo na njima.

Dobro optimiziran SBE protokol može laboratorijima uštedjeti stotine radnih sati godišnje, kao i značajnu materijalnu uštedu. Također, daju fleksibilnost laboratoriju koji se time bavi, pa se tako može napraviti i hibridni pristup analiziranju, tako da se cjelokupne HV regije sekvenciraju standardnom Sangerovom metodom, dok se jedan broj SNP-ova koji se nalaze distribuirani kroz čitavu mtDNA tipiziraju SBE metodom, na taj način povećavajući diskriminacijsku snagu rezultata.

5.2.3.3. Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Masovno paralelno sekvenciranje, ili sekvenciranje sljedeće ili nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing, NGS*) je unijelo revoluciju u molekularne metode sekvenciranja DNA. Njegovom primjenom omogućeno je sekvenciranje velikog broja amplifikona odjednom (otuda i naziv masovno paralelno sekvenci-

ranje) i omogućava sekvenciranje kompletnih gena, ili više njih, pa čak i cijelog genoma u periodu od samo nekoliko dana od trenutka kada uzorak uđe u laboratorij. Dva su ključna koncepta NGS-a su dubina sekvenciranja i pokrivenost.

Dubina sekvenciranja odnosi se na broj čitanja određenog nukleotida tijekom procesa sekvenciranja. Izražava se kao prosjek, npr. „100x dubina” znači da je u prosjeku svaki nukleotid u sekvenciranoj regiji očitano 100 puta. Veća dubina sekvenciranja povećava povjerenje u pozivanje varijante na određenoj lokaciji. To je osobito važno kod determiniranja zastupljenosti somatskih mutacija, npr. kod karcinoma, kada se traže rijetke varijante ili kada se sekvenciraju heterogeni uzorci (poput tumorskih tkiva). U slučaju sekvenciranja, mtDNA pomaže kod utvrđivanja heteroplazmija, o čemu će više riječi biti malo kasnije.

Pokrivenost je usko povezana s dubinom sekvenciranja, ali pruža širu perspektivu. Odnosi se na udio ili postotak genoma koji je sekvenciran na određenoj dubini. Daje ideju o tome koliko je cijelog genoma učinkovito očitano i obično se izražava kao postotak. Na primjer, „95% pokrivenost” znači da je 95% ciljane regije sekvencirano barem jednom. Osigurava da je cijela (ili što je više moguće) ciljna regija, bilo da se radi o cijelom genomu, eksomu ili određenom panelu, sekvencirana.

NGS analiza zasniva se na pripremi „DNA knjižnice”, odnosno fragmentiranje DNA na ulomke slične veličine, kojima se na 5' i 3' krajeve dodaju poznate sekvence adaptera. Adapteri su jedinstvene kratke sekvence DNA (najčešće dužine od oko 80 bp), koji se vežu na krajeve fragmenata. Adapteri imaju više funkcija važnih za omogućavanje uspješne NGS reakcije: 1) dopustiti hibridizaciju na čvrstu površinu; 2) osigurati početno mjesto za početnice za amplifikaciju i sekvenciranje; i 3) omogućiti barkodiranje za multipleksiranje različitih uzoraka u istoj seriji (u svrhu identifikacije). Ovo posljednje bitno je, zato što NGS protokol nema odvojene analize za svaki uzorak kao što je to kod većine instrumentalnih metoda analize u molekularnoj biologiji, već se za potrebe sekvenciranja sve pripremljene knjižnice objedine (engl. *library pooling*), a razlikovanje knjižnica različitih uzoraka vrši se putem DNA barkodova. Postoji više NGS platformi, ali za potrebe mtDNA sekvenciranja najčešće se koriste dvije: one koje koriste sekvenciranje sintezom klastera (*Illumina*) te one koje koriste promjene u mikronaponu promjenom pH kod formiranja fosfodiesterskog mosta i oslobađanja atoma vodika (*Ion Torrent*) (Peck *et al.*, 2018; Sukser *et al.*, 2022).

Upotreba NGS u sekvenciranju mtDNA u forenzičke svrhe, kao i u bilo čemu drugom, kreira veliku količinu podataka, neusporedivo više nego ranije spomenute metode. Primjera radi, poravnavanje sekvenci se kod rezultata Sangerovog sekvenciranja može napraviti i ručno, ukoliko je neophodno. Takvo nešto je kod rezultata NGS sekvenciranja nemoguće pa to ovu metodu čini ovisnom o bioinformatičkoj obradi podataka.

Prednosti NGS-a u analizi mtDNA su mogućnost sekvenciranja cjelokupnog genoma u samo nekoliko sati, tipizirajući SNP-ove na cjelokupnom genomu odjednom (Handžić *et al.*, 2024). To omogućava najveću snagu diskriminacije za ovu vrstu forenzičke analize, rješavajući najveći problem mtDNA testiranja u forenzici.

Vjerojatno je da će u budućnosti ovakve tehnologije potpuno istisnuti sekvenciranje HV regija po Sangeru ili slične metode, ali to se još uvijek nije dogodilo, pored toga što je NGS uveliko prisutan već duže vrijeme, i što je skoro potpuno istisnuo klasično sekvenciranje u molekularnoj dijagnostici. U forenzici to ide puno sporije nego je prvobitno očekivano, zbog niza faktora. Forenzička analiza DNA visoko je regulirano područje, na granicama znanosti i prava, stoga je teško objasniti miješanje biblioteka različitih uzoraka u zajednički skup knjižnica (engl. *library pool*), ma koliko znanstvenicima razlikovanje adapterskim barkodovima bilo logično. Nadalje, uspješna NGS analiza na rutinskom nivou traži dodatnu obuku osoblja naviknutog na STR analize i Sangerovo sekvenciranje, što traži dosta vremena. Tu je i faktor cijene jer je NGS analiza skupa i teško se radi kao za potrebe samo jednog ili nekoliko uzoraka, odnosno to joj dodatno podiže cijenu nekoliko puta. Kad se sve uzme u obzir, nameće se zaključak da će se kao metode izbora analiziranja mtDNA još dugo primjenjivati Sangerovo sekvenciranje ili različite vrste fragmentne analize.

Važno je napomenuti da detaljno opisane instrumentalne metode analize nisu jedine. Automatski DNA sekvenceri, pogotovo kapilarni sekvenceri velikog kapaciteta, u rutinskoj su upotrebi tek nekih tridesetak godina, a na početku je njihova cijena znatno interferirala s njihovom masovnom primjenom. Kako je vrijeme odmicalo, cijene su postale prihvatljivije, a analiza korištenjem kapilarnih sekvencera je postala standard, ali to nije zaustavilo razvijanje alternativnih metoda instrumentalne analize prije i za vrijeme tog vremena. Opisana je lepeza alternativnih metoda, od Southern Blota, preko upotrebe specifičnih nukleotida za određene sekvence (engl. *sequence-specific oligonucleotides*, *SSO*) koje koriste percipitirajuće trake za detekciju, pa do korištenja HPLC-a kao metode detekcije. HPLC je bio posebno zanimljiva metoda zbog ogromnog kapaciteta i male cijene analize, ali se ipak pokazalo da metoda značajno gubi na osjetljivosti u usporedbi s korištenjem automatskih DNA sekvencera (Divne *et al.*, 2005; LaBerge *et al.*, 2003).

5.2.3.4. Statistička i bioinformatička obrada podataka

Važno je, za početak, osvrnuti se malo detaljnije na način na koji se rezultati mitohondrijske analize DNA prijavljuju u izvještajima. Izvještavanje rezultata forenzičke analize mtDNA vrši se u minimalnom tekstualnom obliku i to kao razlike

obrađene sekvence s rCRS. Primijećene razlike između dušičnih baza navode se iza numeričke pozicije nukleotida (npr. 16093C). Ovim formatom podrazumijeva se da su svi ostali nukleotidi u obrađenoj sekvenci identični rCRS-u. Insercije se bilježe koristeći redni broj prethodnog nukleotida s točkom i brojem '1' za prvu inserciju, '2' ukoliko postoji druga i tako dalje. Delecije se bilježe srednjom crtom '-', ili oznakama 'D', 'd' ili 'del' iza pozicije nukleotida gdje je delecija primijećena (npr. '309-', '309D', '309d') (Carracedo *et al.*, 2000).

Iako se algoritam analize i izvještavanja rezultata analize mtDNA razlikuje od prakse sa STR biljezima, ona u svojoj srži ostaje komparativna analiza. To podrazumijeva usporedbu rezultata dobivenih za uzorke čije se porijeklo može bez sumnje utvrditi (nesporni uzorak), s onim čije je porijeklo nepoznato (sporni uzorak). Razlika u analizama između mitohondrijske i nuklearne DNA u forenzičke svrhe je dvojaka: (a) mtDNA se izvještava u odnosu na rCRS i (b) statistička analiza mtDNA, zbog načina njenog nasljeđivanja, ne prati ista pravila kao analiza autosomnih STR biljega. Način statističke obrade podataka analize mtDNA u forenzičke svrhe opisan je u poglavlju 7.

Sastavni dio svakog DNA vještačenja, pa tako i vještačenja mtDNA korištenje je softverskih programa za analizu i pravilno usklađivanje sekvenci te kreiranje i upotreba baza podataka. Danas je dostupan veliki broj programa koji nam olakšavaju analizu i poravnavanje sekvenci koje se analiziraju. Programi su dostupni na mrežnim stranicama, a osim programa za analize uzoraka, postoje i oni koji pomažu u kreiranju početnica, kao i predviđanjima njihovih međusobnih interakcija kod multipleksiranja (Budowle *et al.*, 2010). „MITOWIZZ” je program koji omogućava poravnanje i usporedbe mitohondrijskih sekvenci. Nastao je u suradnji Alea Genetičkog Centra i Međunarodnog sveučilišta Burch u Sarajevu, a financiran je kroz projekt Ministarstva za visoko obrazovanje, nauku i mlade Kantona Sarajevo. Spomenuti program poravnava sekvence dijela ili cjelokupne mtDNA u txt formatu s referentnom sekvencom i prijavljuje detektirane razlike. Šira aplikacija MITOWIZZ programa lokalno otvara vrata većoj i lakšoj primjeni analize mtDNA i u forenzičke i u kliničke svrhe.

Korištenje baze podataka kao stalnog izvora referentnih uzoraka povećava učinkovitost forenzičkog DNA testiranja. Uz postojanje STR baza podataka u mnogim zemljama, također je oformljena i SWGDAM mtDNA baza podataka. Rad i ažuriranje baze pod kontrolom je FBI-ja, a pristup imaju ustanove registrirane za vršenje vještačenja u SAD-u (Isenberg *et al.*, 2004). Kroz djelovanje Europske grupe za profiliranje DNA (engl. *The European DNA Profiling Group*, EDNAP), stvorena je međunarodna mtDNA populacijska baza podataka nazvana EMPOP (engl. *EDNAP mtDNA Population Database*). EMPOP je projekt međunarodne suradnje između svih laboratorija koji se bave analizom mtDNA i DNA laboratorija Instituta za sudsku medicinu u Innsbrucku, Austrija, s ciljem da se stvori

izravno pristupačna populacijska baza podataka, koja se može koristiti u redovnom obavljanju vještačenja (Miller i Budowle, 2001).

5.2.3.5. Jezgrini pseudogeni

Dijelovi mitohondrijskog genoma prisutni su u humanom nuklearnom genomu. Ovi pseudogeni predstavljaju molekularne fosile koji su posljedica ugradnje dijela mitohondrijskoga genoma u nuklearni tijekom evolucije, premda pojedine studije spomenutu migraciju smatraju kontinuiranim procesom u realnom vremenu. Kromosom 11 nositelj je dijela genoma kontrolne regije, što pokazuje prapovijesnu transpoziciju s jednog genoma na drugi. Opisana regija na kromosomu 11 razlikuje se za otprilike 7,5% od moderne prikazane sekvence kontrolne regije i nema izvještaja o interferenciji s analizom forenzičkih uzoraka (Ricchetti *et al.*, 2004).

Ovi nuklearni fosili mogu napraviti potencijalne komplikacije u slučajevima identifikacija putem analize mtDNA. Problem može nastati ako se oni amplificiraju umjesto ciljane mtDNA regije, u slučajevima kada se koristi veliki broj PCR ciklusa kod uzoraka posebno izazovnih za analizu. U takvim uvjetima, moguće je da pseudogeni kontaminiraju pravu i ciljnu mtDNA sekvencu. Ipak, broj kopija pseudogena znatno je manji od broja kopija mtDNA, pa dokle god se pri testiranju broj PCR ciklusa drži na 40 ili ispod, oni ne predstavljaju realnu opasnost u forenzičkom testiranju.

5.2.3. Heteroplazmija

Kada su na tisuće kopija mtDNA molekula koje se javljaju u jednoj stanici identične, onda se takvo genetičko stanje mtDNA naziva homoplazmija. S druge strane, heterogenost mtDNA unutar jednog organizma referira se kao heteroplazmija. Dakle, to je pojava više od jednog haplotipa mitohondrijske DNA u istoj stanici ili organizmu. Heteroplazmije su često uzrokovane *de novo* mutacijama koje se javljaju ili u germinativnoj liniji ili u somatskim tkivima. Molekule mtDNA u stanicama repliciraju se neovisno jedna o drugoj, a ta je replikacija neovisna mejozičkoj ili mitotičkoj diobi stanice. Također, mtDNA ima mnogo viši stupanj pogreške pri replikaciji od nuklearne DNA. Zbog toga postoji mogućnost da se unutar stanice, odnosno organizma nalazi više različitih sekvenci mtDNA koje repliciraju i segregiraju neovisno. Ako bi se različite sekvence koje nastaju u stanicama prenosile nekontrolirano na potomstvo, koncept majčinskog, ili, zapravo, bilo kakvog nasljeđivanja mtDNA, ne bi mogao doći u obzir. Ipak, empirija pokazuje da je taj koncept ispravan i da najčešće zaista sva djeca od majke nasljeđuju identičnu sekvencu mtDNA.

Pojava više subpopulacija mitohondrijske DNA u organizmu (heteroplazmija), ponekad se pojavljuje kod ljudi. Učestalost pojave heteroplazmije, koja je dosadašnjim metodama utvrđena, nije velika (2-8% u različitim studijama i populacijama), a kada se utvrdi postojanje heteroplazmije u pojedinom slučaju, ono može zakomplicirati, ali i povećati vjerojatnost identifikacije metodom analize mtDNA.

Pojava heteroplazmije na dva mjesta kod iste jedinice naziva se triplazmija i pojavljuje se mnogo rjeđe. Pojava više od jedne heteroplazmije unutar 610 bp HV regija 1 i 2 testiranih u klasičnoj forenzičkoj analizi DNA izuzetno je rijetka i obično upućuje na pogreške u amplifikaciji i sekvenciranju uzoraka. Kontaminacija i/ili veliki broj amplifikacijskih ciklusa najčešći su uzroci takvih profila. Utvrđena mjesta na kojima je pojava heteroplazmij česta (žarišta, engl. *hotspot*) uključuju sljedeće pozicije u HV1 i HV2 regijama: 16093, 16129, 16153, 16189, 16192, 16293, 16309, 16337 (HV1), te 72, 152, 189, 207, 279 za HV2 (Melton, 2004).

Heteroplazmije mogu biti promatrane na nekoliko načina: osobe mogu imati više od jednog tipa mtDNA unutar istog tkiva ili mogu imati razlike u tipovima mtDNA između različitih tkiva. Heteroplazmije mogu biti sekvencijske (razlika u bazi nukleotida), koja se ogleda prisutnošću dva nukleotida na jednom lokusu prilikom sekvencijske analize ili dužinske (inercija/delecija), koja se najčešće susreće kod homopolimerične C-regije (*C-stretch*).

5.3. OSOBITOSTI KROMOSOMA X I NJEGOVA PRIMJENA U FORENZIČKOJ GENETICI

Pored rodoslovnih biljega, u fokusu interesa znanstvenika iz područja forenzičke genetike našli su se polimorfizmi kromosoma X, a među njima naročito STR biljezi (Szibor *et al.*, 2003). Stoga je ovim biljezima posvećeno nešto više prostora. Humani spolni kromosomi (gonosomi) X i Y izuzetno su zanimljivi dijelovi pripadajućeg kromosomskog seta te se bitno razlikuju po svojoj genetičkoj strukturi od autosoma. Upravo ova činjenica ukazuje na mogućnost primjene navedenih polimorfizama smještenih na spolnim kromosomima u specifičnim slučajevima testiranja srodstva, ali i identifikacijama osoba kada rezultati analiza autosomnih STR biljega nisu dostatni (Szibor, 2007).

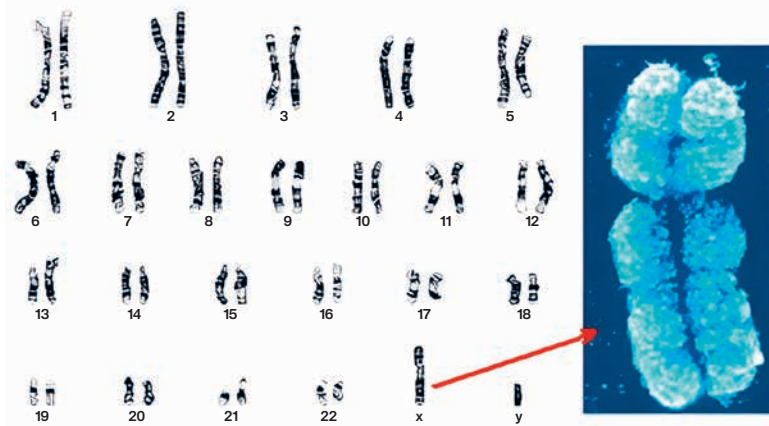
X vezani STR biljezi (X-STR) razvijeni su u vrlo upotrebljivo dodatno oruđe, koje u primjeni s autosomnim i Y-STR biljezima može pružiti neophodne informacije, osobito u slučajevima kada se radi o ženskom potomstvu, a potencijalni biološki otac iz određenog razloga nije dostupan. Svoju primjenu nalazi i kod testiranja očinstva nad ženskom djecom u odsutnosti oca i to principom procesiranja bioloških uzoraka očevih bližih srodnika (Edelmann *et al.*, 2004).

Važno je naglasiti da upotreba X-STR biljega još uvijek nije doživjela značajniju ekspanziju kao primjena Y-STR biljega te da je do sada relativno mali broj etničkih grupa bio predmetom istraživanja genetičke raznolikosti primjenom ovog novog molekularnog oruđa.

5.3.1. Osnovna citogenetička obilježja kromosoma X

Kod žena par spolnih kromosoma čine dva kromosoma X, pa se ženski spol naziva još i homogametni spol, dok kod muškaraca tu kombinaciju čine X i Y (slika 5.8.), pa je shodno tome, muški spol okarakteriziran kao heterogametni. Žene nasljeđuju po jedan kromosom X od oba roditelja dok muškarci nasljeđuju samo jedan kromosom X od majke. Generalno, ženke sisavaca imaju dva velika kromosoma X „prožeta” velikim brojem funkcionalnih DNA segmenata - gena, dok muškarci pored jednog kromosoma X posjeduju i kromosom Y koji predstavlja, kako smo već naveli, „citogenetičko utočište” nekolicini gena i nije esencijalan za život.

Teoretski gledano, ukoliko bi se dogodilo da su transkripcijski aktivni geni na oba kromosoma X, producirala bi se aproksimativno dvostruko veća količina produkata X vezanih gena (tj. proteina) nego što je količina genskih produkata kod muških jedinki. S obzirom na to da većina gena na kromosomu X nije u vezi sa determinacijom spola niti reprodukcijom, ova razlika koja bi se manifestirala kroz disbalans genskih produkata kod muškaraca i žena dovela bi do poremećaja u metaboličkim procesima kod jednog od spolova (Ross *et al.*, 2005). Međutim, kromosom X odlikuje se nizom specifičnosti koje su jedinstvene genomu sisavaca. Naime, napravi li se kratki povijesni presjek istraživanja kromosoma X, kod ženskih osoba, onda zasigurno ne može, a da se ne spomene istraživanje Barra i



SLIKA 5.8. Pozicija kromosoma X u humanom kariogramu i uvećani mikroskopski prikaz.

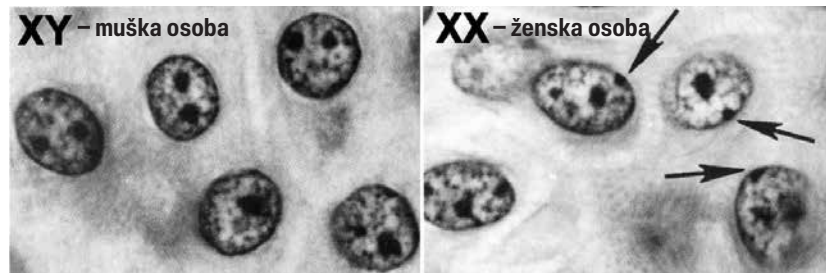
suradnika koji su prvi utvrdili značajnu spolnu razliku u morfologiji jezgre analizom preparata tjelesnih stanica sisavaca. Postulirali su postojanje tzv. spolnog kromatina koji nastaje fuzijom heterokromatinskih regija dva kromosoma X, dok se kod muških osoba fuzija između kromosoma X i Y ne događa (Barr, Bertram, 1949).

Najranija istraživanja na jetri te mliječnim žlijezdama i stanicama jajnika štakora *Rattus norvegicus* pokazala su da je samo jedan od dva prisutna kromosoma X kod ženki heteropiknotičan (pozitivni heteropiknosis) i jako kondenziran. Ta konstatacija dovela je do zaključka da postoji jedan kromocentar, tzv. spolni kromatin (Ohno *et al.*, 1959) koji čini genetički aktivnim samo jedan od dva kromosoma X kod žena. Istu konstataciju potvrdila je britanska genetičarka, Mary Lyon provodeći istraživanja na boji krzna miševa vrste *Mus musculus L.* Rezultati njenog istraživanja pokazali su da:

- heteropiknotični kromosom X može biti naslijeđen ili od oca ili od majke u različitim stanicama istog organizma
- heteropiknotični kromosom X funkcionalno je neaktivan (Lyon, 1961).

Dakle, uvidjela je da se kod zdravih ženki, jedan kromosom X inaktivira i da inaktivacija bilo kojeg od dva prisutna kromosoma X u stanicama istog organizma rezultira u izražavanju mozaičnosti boje krzna kod miševa koji su heterozigoti za gen koji određuje boju krzna. Ovo je posljedica naknadno otkrivene činjenice da se inaktivacija jednog kromosoma X događa nasumično i neovisno od stanice do stanice tijekom embrionalnog razvoja, ali sve stanice potomci originalne stanice u kojoj je izvršena inaktivacija nasljeđuju epigenetičku memoriju, na osnovi koje bez izuzetka inaktiviraju taj isti kromosom X, bilo majčin ili očev. Ovo rezultira time da potomstvo ima određeni broj stanica u kojima je inaktiviran majčin kromosom X, a u određenom broju stanica inaktiviran je očev kromosom X. Po Mary Lyon uveden je stručni termin za ukupni proces inaktivacije jednog kromosoma X – lionizacija. Zapravo, inaktivacija jednog od kromosoma X u ženskom spolu predstavlja genetički regulatorni mehanizam koji vodi k ekvivalentnoj raspodjeli genetičkog materijala na kromosomu X. Mehanizam je okarakteriziran kao dozna kompenzacija i omogućava jednaku dozu ekspresije gena sadržanih na kromosomu X i kod muških i kod ženskih osoba. Na osnovu svega navedenoga, ne čudi činjenica da se danas i u znanstvenoj literaturi termin Barrovo tijelo često koristi u opisivanju neaktivnog kromosoma X (slika 5.9.).

Za razliku od somatskih stanica u kojima je X inaktivacija izrazito stabilna, inaktivacija u spolnim stanicama ciklična je s obzirom na to da oba kromosoma X trebaju biti aktivna u jajnim stanicama da bi se omogućio njihov normalni razvoj. Kod žena, jedan se kromosom X inaktivira tijekom oogenijske ili mitotičke faze, dok su u oogenezi oba kromosoma X aktivna. Stanje aktivnosti oba kromosoma X



SLIKA 5.9. Mikroskopski prikaz Barrovog tijela u ženskim, odnosno njegovo odsustvo u muškim stanicama (dijelovi slike preuzeti s https://www.mun.ca/biology/scarr/Barr_Bodies.html, pristup 26.1.2025.)

je neophodno za proces rekombinacije i uparivanja u mejotičkoj diobi, koji ne bi bio moguć ukoliko bi samo jedan kromosom X bio aktivan, a drugi heterohromatičan i jako kondenziran. Kod muškaraca, s jednim kromosomom X, u somatskim stanicama ne događa se kromosom X inaktivacija. Nasljeđivanje gena kromosoma X podliježe specifičnim pravilima koja posljedično proizlaze iz sljedećih činjenica:

- muškarci imaju samo jedan kromosom X
- gotovo svi geni na kromosomu X nemaju svoj alelni „duplikat” na kromosomu Y
- bilo koji gen pozicioniran na kromosomu X, čak i da je recesivan kod žena, kod muškaraca je funkcionalno aktivan, a to znači da dolazi do njegove ekspresije.

Geni koji se nasljeđuju po ovakvom principu nasljeđivanja okarakterizirani su kao spolno vezani, ili, preciznije, kada se opisuje kromosom X, X vezani geni.

Primjer X vezanog nasljeđivanja je hemofilija A, koja se najčešće nasljeđuje recesivno. S obzirom da muško potomstvo nasljeđuje jedan kromosom X od majke, ukoliko se dogodi da je naslijeđen mutirani gen, dolazi do poremećaja u sintezi faktora koagulacije VIII i nastanka hemofilije A. Istraživanja su pokazala da žene vrlo rijetko pate od hemofilije A, jer bi u tom slučaju mutirani gen naslijedile i od oca i od majke, što je rijetko, osobito za niskofrekventne alele.

Jedinstvene osobitosti kromosoma X zapravo su posljedica evolucije posljednjih 300 milijuna godina. Naime, znanstvena istraživanja ukazuju da su spolni kromosomi evoluirali iz para autosomnih predaka i u tom procesu evolucije na kromosomu X konzervirani su svi originalni i funkcionalni elementi ancestralnog autosomnog pretka, dok su geni na kromosomu Y iščezli i kontinuirano iščezavaju. Uzrok takvom „brisanju” gena na kromosomu Y najvjerojatnije je manjak rekombinacijskih procesa, što u krajnjem slučaju dovodi do njegove dalje degene-

racije. Primorac D, Marjanović D, Crnjac J. Molecular Reconstruction. U: Forensic Reconstruction: Theory to Practice, Lee HC, Pagliaro E. (ur.). Oxford: Oxford University Press; 2024. str. 164-189.

5.3.2. Citogenetička usporedba kromosoma čovjeka X i Y

S citogenetičke i molekularno-genetičke točke gledišta postoji veliki broj različitosti između kromosoma X i Y. Naime, kromosom X, koji je, kako je već rečeno, znatno veći (oko 156 Mb u odnosu na oko 55 Mb kod kromosoma Y), ima šest puta duži eukromatinski blok u usporedbi s istim na kromosomu Y. Kromosom Y karakterizira prisutnost heterokromatinskih blokova varijabilnih dužina, ali ipak su značajno manji u odnosu na iste na kromosomu X. Rekombinacija između muškog kromosoma X i kromosoma Y reducirana je na terminalne dijelove oba kromosoma. Samo 5% kromosoma Y potencijalno može rekombinirati genetički materijal s kromosomom X. Geni u tim malim terminalnim regijama su okarakterizirani kao pseudoautosomni, a same regije na kojima se događa kromatidna izmjena (engl. *crossing-over*) kao pseudoautosomne regije, i to 1 i 2 (PAR 1 i PAR 2). Shodno toj činjenici, geni na muškom kromosomu X koji se nalaze van okvira pseudoautosomnih regija isključivo su X vezani geni, te su u muškom genomu u samo jednoj kopiji (Ross *et al.*, 2005).

5.3.3. Geni kromosoma X i molekularno-genetičko određivanje spolova

Humani kromosom X kao spolni kromosom, čini približno 5% ukupnog genoma sisavaca (Graves, 1995). Recentne publikacije i informacije s vodećih pretraživača genoma (engl. *genome browsers*) ukazuju da je krajem 2022. godine uspješno sekvenciran kompletan kromosom X (Miga *et al.*, 2020; Nurk *et al.*, 2022), a trenutni podatci govore o 859 gena koji kodiraju za proteine, 732 nekodirajuća gena i 890 pseudogena na kromosomu X.² Gustoća gena na kromosomu X, isključujući pseudogene, spada u najnižu do sada zabilježenu na svim kromosomima. Pretpostavlja se da uzrok tome leži u činjenici da je tijekom evolucije sisavaca selekcija, zapravo, favorizirala transpoziciju određenih skupina gena s kromosoma X na autosome. Procesom selekcije vjerojatno su obuhvaćeni geni neophodni za razvoj i rast, čiji su proteinski produkti neophodni u „duploj dozi” kod muškaraca. Kromosom X sadrži najveći poznati gen u humanom genomu, distrofin (*DMD*) lociran na Xp21.1 poziciji, kojeg čini 2 220 223 bp (Gao, McNally, 2015).

² Informacije preuzete s Ensembl Genome Browser na https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/Chromosome?r=X:22174233-55024948, pristup 3.8.2024.

Genotip XO kod ljudskih jedinki manifestira se kao ženski fenotip s poremećajem koji se zove Turnerov sindrom. To navodi na činjenicu da svaka prisutnost kromosoma Y po pravilu ukazuje na mušku jedinku, odnosno da kromosom Y kod čovjeka određuje razvoj ploda prema muškom spolu. Primjer koji potvrđuje navedeno je da osobe koje pate od Klinefelterovog sindroma (XXY, XXXY, XXXXY) imaju muški fenotip, a XXX, XXXX i drugi multipli X kariotipovi izražavaju se kao ženske osobe. Naime, humani embriolozi su otkrili da tijekom prvog mjeseca razvoja embrija, gonade koje se tada razvijaju nisu ni testisi niti ovariji, već se to događa tek u periodu između šestog i sedmog tjedna razvoja embrija.

Pedesetih godina dvadesetog stoljeća, znanstvenik Eichwald utvrdio je postojanje proteina koji se nalazi samo na površini stanica muških individua, ali ne i kod ženskih. Ovaj protein nazvan je histokompatibilni Y-antigen (engl. *histocompatibility Y-antigen*, *H-Y antigen*). Smješten je na dugom kraku kromosoma Y u blizini centromere. Vjerovalo se da je njegova uloga ključna u određivanju spola (engl. *sex switch*), što bi posljedično značilo da će prisutnost proteina dovesti do razvoja testisa, a odsustvo do razvoja jajnika. Međutim, istraživanja tzv. „spolno reverznih“ (engl. *sex reversed*) osoba (XX genotip se manifestira kao muški fenotip; XY genotip se manifestira kao ženski fenotip) pokazala su da je ova teorija pogrešna. Naime, istraživanje provedeno na 20 fenotipskih muškaraca XX genotipa pokazalo je da su imali mali dio kratkog kraka kromosoma Y prislonjen uz jedan od dva kromosoma X. S druge strane, u okviru iste studije utvrđeno je nekoliko fenotipskih ženskih osoba XY genotipa koje nisu imale upravo taj dio kratkog kraka kromosoma Y. Time smo došli do i danas prihvaćenog saznanja da upravo taj dio kromosoma Y nosi testis determinirajući faktor (engl. *testis-determining factor*, *TDF*). Gen koji kodira sintezu TDF-a zove se spolno determinirajuća regija kromosoma Y ili *SRY* (engl. *sex-determining region of Y*) i on regulira razvoj spermatocita (Sanchez-Moreno *et al.*, 2008).

Bitno je naglasiti da determinacija spola nije pod kontrolom samo jednog gena. Najnovija istraživanja potvrđuju da je u određivanju spola uključeno više gena. Između ostalih, *WNT4* je gen koji je identificiran u istraživanjima determinacije spola, a studije na miševima pokazale su da sudjeluje u regulaciji razvoja ženskih spolnih organa. *FOXL2* gen također je uključen u razvoj i diferenciranje ženskog spola kao transkripcijski faktor uključen u razvoj jajnika (Fleming, Vilain, 2004).

5.3.4. X vezani STR biljezi

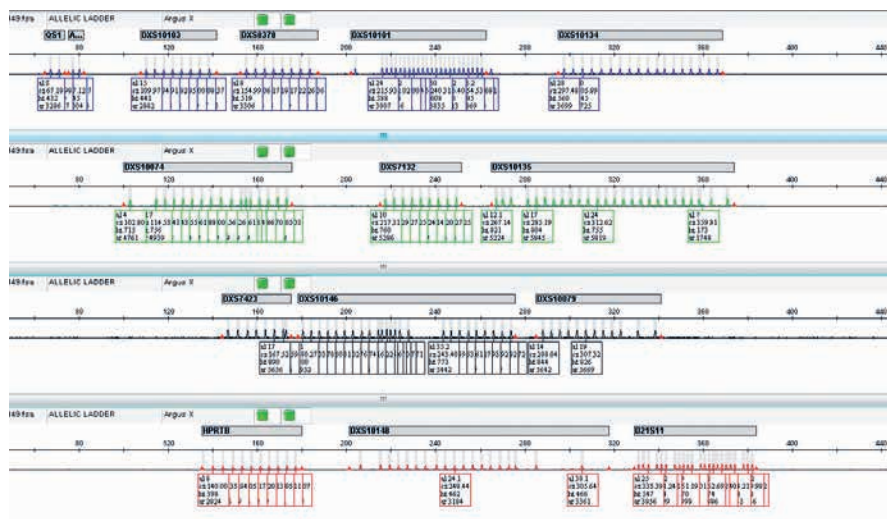
Osnovna zamisao o primjeni X vezanih STR biljega u forenzičkoj analizi DNA proizišla je zapravo iz niza istraživanja tijekom druge polovine 20. stoljeća, i to iz područja kliničke i forenzičke genetike. Do sada je dijagnosticirano mnogo poznatih bolesti, kao što su hemofilija, Duchenneova mišićna distrofija, Lesch-Nyhan

TABLICA 5.3. Pregled najčešće korištenih X-STR biljega.

X-STR biljeg	Aleli	Molekulska težina (bp)
DXS6807	11-17	251-275
DXS9895	12-17.2	139-161
DXS8378	8-14	110-134
DXS9902	6-13	152-176
DXS7132	11-17	131-155
DXS981 (STRX1)	12.3-17	178-202
DXS6800	16-22	194-218
DXS6803	9-14.3	105-128
DXS9898	8.3-15	189-214
DXS6801	8-14	131-137
DXS6789	14-25	154-198
DXS7424	9-20	147-180
DXS101	14-32	179-233
DXS6797	19-28	245-281
DXS7133	9-12	114-126
GATA172D05	5-12	104-132
DXS7130	10-18.3	168-203
GATA165B12	6-13	117-141
HPRTB	9-17	144-176
DXS8377	38-53	207-252
DXS7423	12-18	175-199
DXS10011	26-50	221-317
DXS6810	17-20	219-243
GATA31E08	8-12	224-260
DXS10134	32-44.3	240-291
DXS10146	24-46.2	178-268

sindrom, G6PD deficijencija, neraspoznavanje boja i niz drugih, a koje se nasljeđuju putem kromosoma X. Ako pogođeni muškarac ima žensko potomstvo, sve njegove kćerke nasljeđuju očev kromosom X i prenose ga na, teoretski, polovinu svojih potomaka. Posljedično, polovina njenog ženskog potomstva predstavlja nositelje tog gena, a polovina muškog potomstva eksprimira oštećeni gen, jer su hemizigoti za gene kromosoma X (Szibor, 2007).

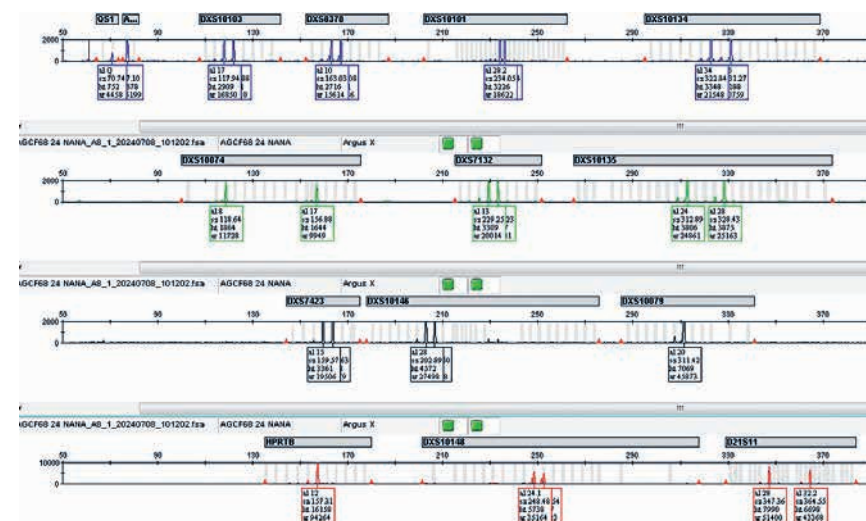
Poput autosomnih i Y-STR biljega, X-STR biljezi predstavljaju visokoinformativne DNA biljege. Međunarodno društvo za forenzičku hemogenetiku



SLIKA 5.10. Argus X-12 kit za analizu 12 X-STR markera – alelna ljestvica.

(engl. *International Society for Forensic Haemogenetics – ISFH*), predložilo je nomenklaturu za STR sekvence kromosoma X. Princip imenovanja je isti kako i kod autosomnih i Y-STR biljega, a način analize također se ne razlikuje od ostalih STR biljega. I danas se intenzivno radi na istraživanju novih X-STR biljega koji bi bili pogodni u svrhe forenzičke analize DNA. U tablici 5.3. prikazani su neki od najčešće korištenih STR biljega pozicioniranih na kromosomu X, koji su do sada sekvencirani i analizirani. Aleli unutar X-STR lokusa također se razlikuju prema broju kopija repetitivnih sekvenci unutar amplificirane regije.

Na tržištu je dostupno nekoliko razvijenih i validiranih X-STR setova. Prvi je bio Mentype® Argus X-8 PCR Amplification Kit (Biotype AG, Dresden), koji sadrži početnice za 8 X-STR biljega: DXS10135, DXS8378, DXS7132, DXS10074, HPRTB, DXS10101, DXS7423 i DXS10134. Tu je i Qiagen Investigator® Argus X-12 set (slike 5.10. i 5.11.), koji sadrži 12 X-STR lokusa grupiranih u četiri rodoslovna klastera (tri biljega po grupi), tako da se svaki set od po tri biljega, zapravo, tretira kao haplotip. Osobitost seta je značajno visoka rezistentnost na inhibitore te senzitivnost. Dodatna četiri biljega su: DXS10103, DXS10146, DXS10148 i DXS10079. Što se tiče setova s većim brojem biljega koji se analiziraju istovremeno, vrijedi spomenuti Microreader™ 19X Direct ID System koji, u skladu s nazivom, pokriva 19 X-STR biljega (DXS6795, DXS9907, DXS6803, GATA172D05, DXS6807, GATA31E08, DXS7423, DXS6810, DXS101, DXS9902, DXS7133, DXS6800, DXS981, DXS10162, DXS6809, DXS10135, HPRTB, GATA165B12 i DXS10079) plus *AMEL* za određivanje spola. Ovaj sustav ne



SLIKA 5.11. Argus X-12 kit za analizu 12 X-STR markera – DNA profil ženske osobe.

sadrži rodoslovne grupe, tako da se izračun LR-a provodi bez dodatnog koraka neophodnog u prethodna dva slučaja (Xiao *et al.*, 2021). Na kraju, vrijedi spomenuti SureID® X37 set koji sadrži 36 X-STR biljega (DXS6795, DXS7132, DXS8378, DXS10101, DXS10103, DXS10079, DXS10134, GATA172D05, HPRTB, DXS6810, DXS10135, DXS6797, DXS10074, DXS7424, DXS9902, DXS7423, DXS10148, DXS10162, DXS6809, GATA31E08, DXS6803, DXS10075, DXS6807, DXS10164, DXS6789, DXS10146, DXS981, DXS9895, DXS101, DXS6800, DXS907 i DXS8377) i *AMEL* lokus i koristi inovativni sustav od šest fluorescentnih boja za detekciju. Ovaj sustav je validiran i testiran na uzorku populacije Kine i rezultati su objavljeni prije nekoliko mjeseci (Chen *et al.*, 2024).

5.3.5. Primjene X-STR biljega u forenzičkoj analizi DNA

Novija istraživanja pokazala su da STR biljezi koji se nalaze na kromosomu X predstavljaju funkcionalan komplement u analizi autosomnih, mitohondrijskih, te Y vezanih STR biljega.

U sklopu X-STR studije u Bosni i Hercegovini (Diegoli *et al.*, 2011) istraživana su dva mini X-STR sustava koja sadrže ukupno 14 X vezanih STR biljega. Primjenom istih sustava provedena je populacijska studija na referentnom bosansko-hercegovačkom uzorku, ali isto tako praktično je dokazana mogućnost primjene X-STR biljega u različitim forenzičkim slučajevima. U Hrvatskoj su provedene populacijske studije X-STR biljega koristeći prethodno predstavljene sustave s

osam, odnosno 12 X-STR biljega (Crnjac *et al.*, 2016; Gršković *et al.*, 2013; Mršić *et al.*, 2017). U jednoj od publikacija, autori su pokazali da se analizom X-STR mogu utvrditi i aberacije povezanih s kromosomom X. Broj utvrđenih aberacija veći je što se analizira veći broj osoba. Tako je na uzorku od 995 osoba iz Hrvatske pronađeno: tri profila s XXX aneuploidijom, jedan profil s XXY aneuploidijom, te deset profila s duplikacijama na jednom lokusu (Mršić *et al.*, 2018).

Primjena X-STR biljega bitno je dobila na značaju proteklom godinama. Evidentne su krajnje specifične situacije u slučajevima testiranja srodstva (engl. *kinship testing*) u kojima se značajno nameće potencijal primjene X-STR biljega. Kao primjer, mogu se navesti slučajevi utvrđivanja spornog očinstva, bez prisutnosti potencijalnog oca, utvrđivanje majčinstva i sl. Takve situacije obrađene su u nastavku ovog poglavlja.

5.3.6 Mogućnost primjene X-STR biljega u slučajevima testiranja srodstva

5.3.6.1. Testiranje očinstva na humanim skeletnim ostatcima i njihova posthumna identifikacija

Slučajevi utvrđivanja spornog očinstva i humane identifikacije najčešće uključuju analizu DNA biološkog uzorka i majke i djeteta i potencijalnog oca. U takvim slučajevima dovoljna je samo analiza autosomnih STR biljega, bez obavezne analize dodatnih alternativnih biljega. No, postoje specifične situacije, posebno u slučajevima testiranja krvne veze otac-kći, kada je neophodno u sam proces uključiti i analizu STR biljega kromosoma X. Ovo naročito vrijedi kada se analizira DNA podvrgavaju ekshumirani skeletni ostatci ili povijesni ili prapovijesni uzorci. S obzirom na to da iskustvo s analizom DNA kostiju ukazuje na poteškoće dobivanja rezultata primjenom standardnih STR biljega, to su se u ove svrhe kao iznimno dobri pokazali upravo miniSTR biljezi, kako oni na autosomima, tako i oni na spolnim kromosomima.

5.3.6.2. Testiranje očinstva kada su potencijalni očevi bliski srodnici

U slučajevima utvrđivanja očinstva, uključujući i krvne srodnike kao moguće očeve, analiza X-STR biljega pokazuje određenu prednost nad analizom autosomnih STR biljega. Navedeno se može potkrijepiti primjerom slučaja kada su dva potencijalna oca u krvnoj vezi otac-sin, te dodatna analiza STR biljega na kromosomu X može dati bitne determinirajuće rezultate, naročito ako je žensko potomstvo u pitanju, s obzirom na već ranije spomenutu prirodu nasljeđivanja kromosoma X.

5.3.6.3. Testiranje očinstva kada potencijalni otac nije dostupan

U slučaju da je neophodno utvrditi sporno očinstvo, ali bez prisutnosti potencijalnog oca i nedostupnosti njegovog biološkog traga, analizi DNA se mogu podvrgnuti očevi bliži srodnici. Ovakvo testiranje spornog očinstva okarakterizirano je kao testiranje očinstva bez biološkog traga potencijalnog oca (engl. *deficiency paternity testing*) (Szibor, 2007). Ovakve situacije, u kojima je neophodno utvrditi srodstvo predstavljaju bazično područje primjene X-STR markera, i upravo na ovakvim primjerima može biti pokazana osnovna prednost primjene X-STR sekvenci. Kada nedostaje uzorak potencijalnog oca, kada se analiziraju X-STR biljezi u svrhu utvrđivanja spornog očinstva ženskog djeteta, ključna osoba je majka nedostupnog potencijalnog oca. Sve alelne varijante analiziranih X-STR biljega potencijalnog oca mogu se odrediti na osnovu X-STR profila majke. S druge strane, kada dvije ženske osobe imaju istog oca, nasljeđuju iste alele očevog kromosoma X. Shodno tome, analizom X-STR biljega bioloških tragova koji potječu od dvije sestre ili dpolusestre može se isključiti očinstvo, čak i u situacijama kada nijedan roditelj nije prisutan. Analiza autosomnih STR biljega ne daje takvu informativnost.

5.3.6.4. Utvrđivanje očinstva u slučaju silovanja i incesta

Učinkovito utvrđivanje očinstva moguće je ukoliko se radi o muškom fetusu analizom biljega kromosoma Y. Isključivanje očinstva nad ženskim fetusom može se realizirati samo analizom autosomnih ili X-STR biljega, koji mogu pružiti izuzetno informativne rezultate. Ipak, u slučaju incesta oca nad kćeri, rezultati analize X-STR biljega fetalnog materijala nakon izvršenog abortusa ne bi bili dovoljno informativni da bi se moglo konstatirati pozitivno očinstvo. Razlog tome leži u činjenici da bi se fetalne alelne varijante mogle podudariti sa kćerinim.

5.3.6.5. Utvrđivanje majčinstva

U pojedinim slučajevima, kao što je istraživanje potencijalnog roditeljstva, identifikacija posmrtnih ostataka i slično, neophodno je izvršiti utvrđivanje majčinstva. Za testiranje krvne veze majka-kći, potencijal primjene X-STR biljega ekvivalentan je onome kod primjene autosomnih biljega, te u takvim situacijama ne pružaju specifičnu prednost, ali mogu biti dodatno oruđe u slučaju da autosomna analiza ne daje statistički adekvatne podatke. S druge strane, prilikom testiranja srodstva u krvnoj vezi majka-sin, analiza X-STR biljega puno je učinkovitija. Vjerojatnost isključivanja identična je onoj u testiranju veze otac-kći. Osnovna prednost analize X-STR biljega proizišla iz slučajeva u kojima nije bio dostupan biološki uzorak potencijalnog oca, te se kao alternativa uzimaju na analizu očevi bliži srodnici.

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, *et al.* Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* 1981; 290: 457-465. doi: 10.1038/290457a0
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 1999; 23(2): 147. doi:10.1038/13779
- Babić Jordamović N, Kojović T, Dogan S, *et al.* Haplogroup Prediction Using Y-Chromosomal Short Tandem Repeats in the General Population of Bosnia and Herzegovina. *Front. Genet.* 2021; 12: 671467. doi:10.3389/fgene.2021.671467
- Barr ML, Bertram EG. A Morphological Distinction Between Neurons of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite During Accelerated Nucleoprotein Synthesis. *Nature* 1949; 163: 676-677.
- Behar DM, van Oven M, Rosset S, *et al.* A „Copernican” reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root [published correction appears in *Am. J. Hum. Genet.* 2012; 90(5): 936]. *Am. J. Hum. Genet.* 2012; 90(4): 675-684. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.03.002
- Budowle B, Polansky D, Fisher CL, Den Hartog BK, Kepler RB, Elling JW. Automated alignment and nomenclature for consistent treatment of polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region. *J. Forensic Sci.* 2010; 55(5): 1190-1195. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01478.x
- Butler JM, Decker AE, Kline MC, Vallone PM. Chromosomal duplications along the Y-chromosome and their potential impact on Y-STR interpretation. *J. Forensic Sci.* 2005; 50(4): 853-859.
- Casanova M, Leroy P, Boucek C, *et al.* A human Y-linked DNA polymorphism and its potential for estimating genetic and evolutionary distance. *Science* 1985; 230(4732): 1403-1406. doi: 10.1126/science.2999986
- Chen K, Tao R, Qu Y, Lu J, Ping Y, Zhang Y, Chen P, Li C. Validation and forensic application of a new 36 X-STR loci multiplex system. *Forensic Sci. Res.* 2024; owae029. doi: <https://doi.org/10.1093/fsr/owae029>
- Crnjac J, Ozretić P, Merkaš S, *et al.* Analysis of 12 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. *Leg. Med. (Tokyo).* 2016; 21: 77-84. doi: 10.1016/j.legalmed.2016.07.001
- Diegoli TM, Kovacevic L, Pojskic N, Coble MD, Marjanovic D. Population study of fourteen X chromosomal short tandem repeat loci in a population from Bosnia and Herzegovina. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011; 5(4): 350-351. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.01.007
- Divne AM, Nilsson M, Calloway C, Reynolds R, Erlich H, Allen M. Forensic casework analysis using the HVI/HVII mtDNA linear array assay. *J. Forensic Sci.* 2005; 50(3): 548-554.
- Drobnič K. A new primer set in a SRY gene for sex identification. *Progress in Forensic Genetics.* 2006; 11: 269-270.
- Fleming A, Vilain E. The endless quest for sex determination genes. *Clin. Genet.* 2005; 67(1): 15-25. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00376.x
- Gabriel MN, Huffine EF, Ryan JH, Holland MM, Parsons TJ. Improved mtDNA sequence analysis of forensic remains using a „mini-primer set” amplification strategy. *J. Forensic Sci.* 2001; 46(2): 247-253.
- Gao QQ, McNally EM. The Dystrophin Complex: Structure, Function, and Implications for Therapy. *Compr. Physiol.* 2015; 5(3): 1223-1239. doi: 10.1002/cphy.c140048
- Graves JAM. The Origin and Function of the Mammalian Y Chromosome and Y-borne Genes - an Evolving Understanding. *Bioessays.* 1995; 17: 311-320.
- Gršković B, Zidkova A, Stenzl V, Popović M, Primorac D, Mršić G. Analysis of 8 X-chromosomal markers in the population of central Croatia. *Croat. Med. J.* 2013; 54(3): 238-247. doi: 10.3325/cmj.2013.54.238
- Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, *et al.* Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol. Biol. Evol.* 2001; 18(7): 1189-1203. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003906
- Handžić N, Pećar D, Durgut S, Mulahuseinović N, Čeko I, Izmirlija M, Ašić A, Salihefendić L, Konjhodžić R. DNA polymorphisms detected in MT-ATP6 and ATP8 genes in the residents of Sarajevo Canton. *Genetics and Applications.* 2024; 8(1).
- Irwin JA, Saunier JL, Strouss KM, *et al.* Development and expansion of high-quality control region databases to improve forensic mtDNA evidence interpretation. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2007; 1(2): 154-157. doi: 10.1016/j.fsigen.2007.01.019
- Jobling MA, Heyer E, Dieltjes P, de Knijff P. Y-chromosome-specific microsatellite mutation rates re-examined using a minisatellite, MSY1. *Hum. Mol. Genet.* 1999; 8(11): 2117-2120. doi: 10.1093/hmg/8.11.2117
- Karafet TM, Mendez FL, Meilerman MB, Underhill PA, Zegura SL, Hammer MF. New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res.* 2008; 18(5): 830-838. doi: 10.1101/gr.7172008
- Kastelić V, Budowle B, Drobnič K. Validation of SRY marker for forensic casework analysis. *J. Forensic Sci.* 2009; 54(3): 551-555. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01007.x
- Konjhodžić R, Salihefendić L, Čeko I, Bubalo P, Škavić P, Ašić A, Kubat M. Sanger Sequencing of Mitochondrial HV1 region: Population Data for Bosnia and Herzegovina. *Arch. Leg. Med.* 2024; 15(1): 100449.
- Lahn BT, Page D. Functional Coherence of the Human Y Chromosome. *Science* 1997; 278: 675-680.
- Lyon MF. Gene Action in the X Chromosome of the Mouse (*Mus musculus*, L.). *Nature* 1961; 190: 372-373.
- Margulis L Symbiosis in cell evolution. New York; W.H Freeman and Company: 1981.
- Marjanovic D, Bakal N, Pojskic N, *et al.* Population data for the twelve Y-chromosome short tandem repeat loci from the sample of multinational population in Bosnia and Herzegovina. *J. Forensic Sci.* 2005; 50(1): 223-225.

- Marjanovic D, Fornarino S, Montagna S, *et al.* The peopling of modern Bosnia-Herzegovina: Y-chromosome haplogroups in the three main ethnic groups. *Ann. Hum. Genet.* 2005; 69(Pt 6): 757-763. doi: 10.1111/j.1529-8817.2005.00190.x
- Melton T. Mitochondrial DNA heteroplasmy. *Forensic Sci. Rev.* 2004; 16: 1-20.
- Miga KH, Koren S, Rhie A, *et al.* Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome. *Nature* 2020; 585(7823): 79-84. doi: 10.1038/s41586-020-2547-7
- Miller KW, Budowle B. A compendium of human mitochondrial DNA control region: development of an international standard forensic database. *Croat. Med. J.* 2001; 42(3): 315-327.
- Mršić G, Ozretić P, Crnjac J, *et al.* Analysis of 12 X-STR loci in the population of south Croatia. *Mol. Biol. Rep.* 2017; 44(1): 183-189. doi: 10.1007/s11033-017-4096-1
- Mršić G, Ozretić P, Crnjac J, *et al.* Expanded Croatian 12 X-STR loci database with an overview of anomalous profiles. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018; 34: 249-256. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.03.004
- Nurk S, Koren S, Rhie A, *et al.* The complete sequence of a human genome. *Science* 2022; 376(6588): 44-53. doi: 10.1126/science.abj6987
- Ohno S, Kaplan WD, Kinoshita R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp. Cell. Res.* 1959; 18: 415-418. doi: 10.1016/0014-4827(59)90031-x
- Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, *et al.* A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat. Genet.* 1997; 15(4): 363-368. doi: 10.1038/ng0497-363
- Primorac D, *et al.* Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Primorac D, Marjanović D, Crnjac J. *Molecular Reconstruction. U: Forensic Reconstruction: Theory to Practice*, Lee HC, Pagliaro E. (ur.). Oxford: Oxford University Press; 2024. str. 164-189.
- Primorac D, Schanfield MS. Application of Forensic DNA Testing in the Legal System. *Croat. Med. J.* 2000; 41: 32-46.
- Prinz M. Experience with Using Y Chromosome Specific STRs in Forensic Casework. Proceedings of the 10th International Symposium on Human Identification; 1999 Sep 29 - Oct 2; Orlando, FL. Madison, WI: Promega Corporation; 1999.
- Quintana-Murci L, Fellous M. The Human Y Chromosome: The Biological Role of a „Functional Wasteland”. *J. Biomed. Biotechnol.* 2001; 1(1): 18-24. doi: 10.1155/S1110724301000080
- Renfrew C, Forster P, Hurler M. The past within us. *Nat. Genet.* 2000; 26(3): 253-254. doi: 10.1038/81518
- Rhie A, Nurk S, Cechova M, *et al.* The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature.* 2023; 621(7978): 344-354. doi: 10.1038/s41586-023-06457-y
- Ricchetti M, Tekaia F, Dujon B. Continued colonization of the human genome by mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* 2004; 2(9): E273. doi: 10.1371/journal.pbio.0020273

- Sánchez-Moreno I, Coral-Vázquez R, Méndez JP, Canto P. Full-length SRY protein is essential for DNA binding. *Mol. Hum. Reprod.* 2008; 14(6): 325-330. doi: 10.1093/molehr/gan021
- Schneider PM, d'Aloja E, Dupuy BM, *et al.* Results of collaborative study regarding the standardization of the Y-linked STR system DYS385 by the European DNA Profiling (EDNAP) group. *Forensic Sci. Int.* 1999; 102(2-3): 159-165. doi: 10.1016/s0379-0738(99)00049-3
- Semino O, Passarino G, Oefner PJ, *et al.* The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: a Y chromosome perspective. *Science* 2000; 290(5494): 1155-1159. doi: 10.1126/science.290.5494.1155
- Syndercombe Court D. Mitochondrial DNA in forensic use. *Emerg. Top. Life Sci.* 2021; 5(3): 415-426. doi: 10.1042/ETLS20210204
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D. Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int. J. Legal Med.* 2003; 117(2): 67-74. doi: 10.1007/s00414-002-0352-5
- Xiao C, Yang X, Liu H, *et al.* Validation and forensic application of a new 19 X-STR loci multiplex system. *Leg. Med. (Tokyo).* 2021; 53: 101957. doi: 10.1016/j.legal-med.2021.101957

6.

TEHNOLOŠKI RAZVOJNI TRENDОВI U FORENZIČKOJ GENETICI

dr. sc. Lana Salihefendić
doc. dr. sc. Rijad Konjhodžić
prof. dr. sc. Adna Ašić
prof. dr. sc. Damir Marjanović
izv. prof. dr. sc. Natalija Novokmet

TEHNOLOŠKI RAZVOJNI TRENDОВI U FORENZIČKOJ GENETICI

U posljednja tri desetljeća analiza DNA prešla je trnovit put od alternativne, komplicirane, spore i skupe procedure, do rutinske, brze, relativno jeftine te sa stajališta pravosuđa, neizbježne metode koja proizvodi točne i svrsishodne rezultate. Stoga su temeljne razvojne težnje u forenzičkoj genetici:

- simultano, a uspješno procesirati što veći broj uzoraka
- skratiti proceduru analize na što kraće vrijeme
- pojednostavniti proces analize DNA
- smanjiti mogućnost ljudske greške
- što jednostavnije i jasnije prikazati rezultate analize DNA
- sniziti cijenu analize po uzorku i dr.

U cilju ostvarivanja zadanih ciljeva, veliki broj proizvođača doslovno se nadmeće ponuditi tržištu što savršeniji i efikasniji model za realizaciju pojedinih etapa samog procesa analize DNA. U ovom poglavlju prikazan je samo kratki osvrt na neke od njih, primarno u području tehnološkog razvoja u službi forenzičke genetike.

6.1. AUTOMATIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE DNA

Veliki broj država u posljednjih nekoliko godina pokrenuo proces kreiranja nacionalnih DNA baza. O bazama podataka bit će više govora u narednim poglavljima, ali podatak da njeno postojanje za 80% povećava efikasnost same analize DNA dovoljno govori koliko je važno da svaka država uspostavi jedan ovakav moderan sustav. Upravo su ove aktivnosti ukazale na potrebu razvijanja automatskih procedura za simultano i brzo izoliranje genomske DNA iz velikog broja uzoraka.

S obzirom na to, da su u prethodnim poglavljima detaljno elaborirane različite metode izolacije DNA, ovdje će ukratko biti prezentirani postojeći robotski sustavi bez ponovnog objašnjavanja samog procesa. Trenutno veliki broj laboratorija u svijetu koristi različite automatizirane sustave, kako za izolaciju DNA, tako i za postavljanje PCR reakcija ili detekcijske faze procesa analize DNA. Određeni autori ove robotske sustave, u slobodnom prijevodu, opisuju kao robote za manipulaciju tekućim otopinama (engl. *liquid handling robots*). Pojednostavljeno, osnova njihovog funkcioniranja zasniva se na preciznom, algoritamskom dodavanju i odstranjivanju odgovarajućih volumena uzoraka i različitih pufera iz jedne tubice u drugu. Poseban zamah u razvoju ovih metoda dogodio se masovnim uvođenjem sekvenciranja sljedeće generacije u laboratorijsku upotrebu, kao i za vrijeme COVID-19 pandemije, jednostavno s ciljem uštede vremena i manualnog rada laboratorijskog osoblja i istraživača.

Uvođenje ovih procedura bitno smanjuje mogućnost ljudske pogreške, iako se mora računati na to da stalno ponavljanje određene, pomalo dosadne procedure, može dovesti do zamora i nepažnje tehničara čak i u rukovanju poluautomatskim ili automatskim sustavima. Također, robotski DNA izolacijski sustavi savršeni su za analizu tipskih, najčešće referentnih uzoraka, koji su prikupljeni na isti način, pod manje-više istim uvjetima. Naime, u procesu prikupljanja referentnih uzoraka, koji se koriste za izradu baze podataka, bilo da se radi o nacionalnoj DNA bazi koja se koristi u forenzičke svrhe, ili o bazi u procesu DNA identifikacije žrtava prirodnih katastrofa, u cilju lakšeg procesiranja jasno je definiran tip i način prikupljanja uzoraka. Takvim pristupom se dobiva seveliki broj sličnih tragova, s približno istom količinom i kvalitetom prisutne DNA, što je osnovni preduvjet za njihovo automatsko procesiranje. Iz toga se može zaključiti da veliki automatski sustavi za izolaciju DNA gube na svojoj efikasnosti, ako se radi o laboratoriju koji obrađuje relativno mali broj uzoraka, pa stoga ne može u potpunosti iskoristiti predviđene kapacitete ovih uređaja. Na tržištu se danas može pronaći veliki broj izolacijskih DNA robotskih sustava (Beckman Coulter, Hamilton Company, MWG Biotech, QIAGEN, Tecan), ali u ovoj knjizi bit će predstavljeno samo nekoliko sustava koji su najviše zastupljeni u našoj regiji.

6.1.1. Promega Maxwell® 16 System

Maxwell® 16 System (slika 6.1.) pripada robotskim sustavima manjeg kapaciteta s kojima se može simultano procesirati (purificirati) do 16 uzoraka. Čitava procedura traje od 18 do 30 minuta, a koristi se ranije opisani Promega IQ™ set reagensija koji po principu magnetne separacije (pomoću paramagnetnih čestica, engl. *paramagnetic particles, PMPs*) odstranjuje PCR inhibitore koji su vrlo često prisutni u forenzičkim uzorcima. Prednost ovog sustava je u tome da se upotre-



SLIKA 6.1. Maxwell® 16 System za automatsku DNA izolaciju – kapacitet 16 uzoraka (preuzeto i prilagođeno s <https://www.labwrench.com/equipment/11065/promega-maxwell-16-forensic-system>, pristup 3.10.2023.).

bom različitih setova reagensija mogu istovremeno procesirati forenzički (tragovi krvi, opušci, žvakaće gume itd.) i referentni (prikupljena krvna mrlja ili bris bukalne sluznice) uzorci. Inače, ovaj sustav je nezavisan, tj. centralna stanica ne zahtijeva (ali po potrebi omogućava) povezanost s računalom i njezini parametri rada ručno se unose izravno na sustav. Novije verzije ovog sustava imaju pridodan i bar-kod čitač, koji se koristi u laboratorijima s uspostavljenim LIM sustavom praćenja uzoraka. U posljednje vrijeme, proizvođač je ponudio optimizaciju protokola za procesiranje izuzetno zahtjevnih uzoraka, poput skeletnih ostataka ili pak miješanih tragova primjenom diferencijalnog komercijalnog protokola izolacije DNA.

6.1.2. Maxwell® RSC 48 Instrument

Maxwell® RSC 48 (slika 6.2.) kompaktna je, automatizirana platforma za pročišćavanje (purifikaciju) nukleinskih kiselina. Prednost je ovog uređaja simultano procesiranje do 48 uzoraka. Ekstrakcija pomoću Maxwell® uređaja započinje s već napunjenim kasetama. Kasete sadrže reagens za pročišćavanje (purifikaciju) paramagnetne čestice, kao i elucijski pufer za završni korak ekstrakcije. Osnovna prednost navedenog uređaja ogleda se u vrlo maloj mogućnosti unakrsne kontaminacije jer nema raspršivanja tekućine tijekom procesiranja uzoraka. Također, sustav može procesirati različite tipove uzoraka: briseve bukalne sluznice, dodirne tragove, sperm, plazmu, tkivo, krv i druge. U sustav je ugrađen bar-kod čitač koji čuva identifikacijski broj uzorka, korištenog kita i LOT broj kita. Uz uređaj koristi se i računalo za postavljanje uzoraka i biranje metode s vrlo jednostavnim grafičkim sučeljem. Automatska ekstrakcija pomoću ovog



SLIKA 6.2. Maxwell RSC uređaj za ekstrakciju i pročišćavanje 48 uzoraka (preuzeto i prilagođeno sa <https://www.promegaconnections.com/freedom-to-focus-maxwell-rapid-sample-concentrator/>, pristup 3.10.2023.).

SLIKA 6.3. Qiagen EZ1 Advanced Instrument za automatsku DNA izolaciju (preuzeto i prilagođeno s <https://uk.bimedis.com/qiagen-ez1-advanced-xl-m282810>, pristup 3.10.2023.).



uređaja sastoj se i od nekoliko koraka: liziranje uzorka uz prisustvo pufera za lizu; vezivanje nukleinske kiseline za paramagnetne čestice; ispiranje vezanih ciljanih molekula od drugih staničnih komponenti te eluiranje finalnog produkta (slika 6.3.). Uređaj se koristi s Maxwell® FSC DNA IQ™ Casework Kit-om za pripremu čistih uzoraka za daljnje STR profiliranje, SNP ili NGS analizu.

6.1.3. Qiagen EZ1 Advanced Instrument

Qiagen EZ1 Advanced Instrument (slika 6.3.) robotski je sustav koji predstavlja drugu generaciju Qiagenovih izolacijskih stanica koja je započeta s Qiagen The BioRobot M48 sustavom. Javlja se u dvije verzije, standard i XL, a osnovna razlika je u broju uzoraka koje je moguće simultano procesirati. U standardnoj verziji simultano se može procesirati šest uzoraka dok je u XL verziji omogućeno simultano procesiranje 14 uzoraka. Proizvođač uz ovu stanicu nudi i veliki broj kemijskih izolacijskih kitova optimiziranih za izolaciju DNA iz širokog raspona uzoraka. Zanimljivo je da je unutar sustava uključena i UV jedinica koja dekontaminira radni prostor i aparaturu u pauzi između reakcija. Jedini ručni koraci u ovoj proceduri su postavljanje tubica s tragovima na uređaj i uklanjanje tubica s izoliranom DNA.

6.1.4. Qiagen QIASymphony® SP Instrument

Qiagen QIASymphony® SP Instrument novi je automatizirani Qiagen sustav koji koristi tehnologiju magnetnih čestica za purificiranje nukleinskih kiselina i proteina (slika 6.4.). Protokol je dizajniran za automatsko procesiranje od jednog do 96 uzoraka, bilo da se radi o referentnim ili uzorcima s mjesta zločina i to u grupama



SLIKA 6.4. Qiagen QIASymphony® SP Instrument za automatsku DNA izolaciju (preuzeto i prilagođeno s <https://www.qiagen.com/ja-us/products/diagnostics-and-clinical-research/sample-processing/qiasymphony-dsp-dna-kits-us>, pristup 3.10.2023.).

od po 24. Uređaj koristi čitač bar-koda za praćenje uzorka kroz proceduru. I ovaj sustav pročišćava (purificira) DNA u četiri standardna koraka: liziranje stanica, vezivanje DNA za magnetne čestice, ispiranje drugih komponenti i eluiranje DNA u sterilnoj vodi ili TE puferu. U forenzičke svrhe, ova platforma koristi se s QIASymphony® DNA Investigator Kit-om, a kvaliteta i količina izolirane DNA usporedivi su s ranijim metodama. Uređaj može procesirati maksimalno 120 uzoraka dnevno, odnosno 29 000 uzoraka godišnje, što je više nego dvostruko veći broj uzoraka u odnosu na EZ1 Advanced XL, koji ima kapacitet od 56 uzoraka na dan, odnosno 14 000 godišnje.

6.1.5. Applied Biosystems™ HID NIMBUS® Presto System

Automatizirani HID NIMBUS® Presto System (slika 6.5.) precizno purificira nukleinske kiseline iz liziranih uzoraka za daljnje forenzičke analize, kao što je STR profiliranje. Riječ je o zatvorenom sustavu koji je validiran samo za Applied Biosystems™ PrepFiler™ i PrepFiler™ BTA Automated forenzičke DNA ekstrakcijske kitove. Ekstrakcija pomoću ovog sustava moguća je iz različitih i vrlo zahtjevnih uzoraka, kao što su zubi, kosti i dodirni tragovi. Sustav purificira 96 uzoraka



SLIKA 6.5. HID NIMBUS® Presto System za automatsku ekstrakciju DNA (preuzeto i prilagođeno s <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Flyers/hidnp-flyer-ordering-table-global.pdf>, pristup 3.10.2023.).

za manje od 90 minuta te je ljudska pogreška svedena na minimum. PrepFiler™ kitovi za automatsku ekstrakciju koriste magnetne čestice s optimiziranom kemijom za što viši prinos DNA iz najkompleksnijih tipova uzoraka. Softver uključuje prikaz pozicije reagensa, korak po korak postavku, kratke video isječke pri postavljanju reagensa i slike završne postavke uređaja.

6.1.6. Hamilton Microlab® VANTAGE Liquid Handling System

Hamilton Microlab VANTAGE Liquid Handling System (slika 6.6.) može purificirati 384 uzorka za sat i pol vremena. Sustav zahtijeva ručno postavljanje uzoraka u tubice ili na ploče, korak lize i uklanjanje supstrata prije postavljanja lizata u automatsku platformu za purifikaciju. Automatski sustav provodi purifikaciju iz različitih tipova forenzičkih uzoraka. Uzorci purificirani VANTAGE automatskim sustavom pogodni su za daljnje STR profiliranje, te se dobivaju točni i reproducibilni rezultati koji nisu kontaminirani.

6.1.7. AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System

AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System (slika 6.7.) sustav je za automatsku izolaciju proizveden od strane tvrtke Applied Biosystems. Ovaj sustav može istovremeno procesirati do 13 uzoraka u 30 minuta koristeći PrepFiler Express komercijalni sustav za izolaciju DNA. Ovaj uređaj može se koristiti osam do deset sati bez prestanka (bez hlađenja između pojedinačnih korištenja), što ga čini pogodnim i za laboratorije koje regularno procesiraju veći broj uzoraka. Optimiziran je za upotrebu u forenzičkoj genetici kao i za procesiranje širokog spektra različitih uzoraka, a koristi poboljšanu metodu magnetne filtracije, s unaprijedom sustavom ispiranja magnetnih čestica i efikasnijim izdvajanjem DNA iz početnog uzorka. Uz sustav se mogu koristiti dvije vrste kemikalija, PrepFiler Express™ Forensic DNA Extraction Kit (za standardne uzorke, poput tjelesnih tekućina) i PrepFiler Express™ BTA Forensic DNA Extraction Kit (za zahtjevnije, forenzičke uzorke, poput kostiju, zuba ili opušaka).

6.1.8. Freedom EVO® Forensics DNA System

Freedom EVO® Forensics DNA System (slika 6.8.) kompleksna je jedinica s odvojenim računalom koja je proizvedena u više modela (75, 100, 150 i 200). Maksimalan broj uzoraka koji se može simultano procesirati iznosi 384 ili 1536, ovisno o modelu. Ovaj sustav postoji i u kombiniranim varijantama, ovisno o zahtjevima kupca te o protokolu za DNA izolaciju koji se preferira. Za razliku od prethodno opisanih radnih jedinica (engl. *workstation*) ovaj sustav, koji je

SLIKA 6.6. Hamilton Microlab VANTAGE Liquid Handling System za automatsku ekstrakciju DNA (preuzeto i prilagođeno s <https://www.hamiltoncompany.com/automated-liquid-handling/platforms/microlab-vantage-liquid-handling-system>, pristup 3.10.2023.).



SLIKA 6.7. AutoMate Express™ Forensic DNA Extraction System za automatsku DNA izolaciju – kapacitet 13 uzoraka (preuzeto i prilagođeno s <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4441763>, pristup 3.10.2023.).

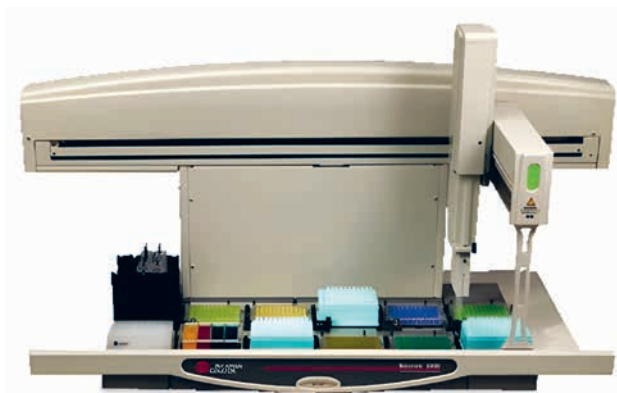


SLIKA 6.8. Freedom EVO® Forensics DNA System za automatsku DNA izolaciju – kapacitet 96 uzoraka, model prilagođen IQ proceduri izolacije (preuzeto i prilagođeno s <https://caonline.com/buy/lab-equipment-and-accessories/tecan-freedom-evo-150-8/9147979>, pristup 3.10.2023.).

proizvela njemačka tvrtka Tecan, složeniji je i karakterizira ga multifunkcionalnost. Naime, podržava principe magnetne separacije, ali i vakuumske filtracije i automatskog centrifugiranja, pa se može upotrebljavati za širok spektar uzoraka koji se mogu izolirati različitim procedurama i setovima reagensija.

6.1.9. Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation

Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation (slika 6.9.) predstavlja sustav pomoću kojeg je moguće procesirati istovremeno maksimalno 96 uzoraka. Platforma mu je izuzetno prilagodljiva, tako da ju je moguće prilagoditi i za automatsko postavljanje PCR reakcije. Kao i prethodno opisani Tecan sustav, optimiziran je za različite metode DNA izolacije.



SLIKA 6.9. Biomek® 3000 Laboratory Automation Workstation za automatsku DNA izolaciju – kapacitet 96 uzoraka (preuzeto i prilagođeno s <https://www.labwrench.com/equipment/7029/beckman-coulter-biomek-3000>, pristup 3.10.2023.).

6.1.10. iPrep™ Purification Instrument

Invitrogenov iPrep™ Purification Instrument (slika 6.10.) dizajniran je za istovremenu izolaciju DNA iz 12 uzoraka i jedne pozitivne kontrole u periodu od 18 do 20 minuta, odnosno do 192 uzorka u 8 sati rada. Uređaj koristi unaprijed pripremljene kasete s reagensima, kao što je iPrep™ ChargeSwitch® Forensic Kit and Card kasete, koja je dizajnirana specifično za forenzičke uzorke i sadrži sve potrebne kemikalije i potrošni materijal neophodan za provođenje procesa purifikacije DNA iz forenzičkog uzorka. Ovaj kit može se koristiti i na uzorcima s malom početnom količinom DNA ili uzorcima koji sadržavaju degradiranu DNA. Tehnologija ovog uređaja bazirana je na ligandu specifičnom za nukleinske kiseline, čiji se naboj mijenja s promjenom pH vrijednosti, a purifikacija se provodi u tri koraka (vezivanje, ispiranje i elucija).



SLIKA 6.10. iPrep™ Purification Instrument od Invitrogena za automatsku DNA izolaciju (preuzeto i prilagođeno s https://www.medteh.info/_fr/66/IPrep_manual.pdf, pristup 3.10.2023.).

6.2. RAZVOJ I TRENDovi PCR TEHNOLOGIJE

U prethodnim poglavljima detaljno su elaborirani osnovni parametri lančane reakcije polimerazom (PCR). Također, detaljno je opisana osnova na kojoj počiva rtPCR tehnika, koja je u posljednjim godinama odigrala bitnu ulogu, ne samo u forenzičkoj genetici, nego i u molekularnoj biologiji općenito.

Ipak, popularizacija i masovna primjena ove metode ne bi bila moguća bez tehnološkog napretka, tj. bez usavršavanja uređaja u kojima se odvija ova reakcija. Opće je prihvaćena činjenica da je Mullis, radeći za Cetus Corporation (CA, USA), 1983. prvi stvorio osnovni kostur PCR metode, iako se ne smiju zanemariti ni raniji radovi norveškog kolege Kjella Kleppea još 1971. Međutim, razvoj PCR metode u tom razdoblju bio je znatno limitiran tehnološkim nedostatcima i nemogućnošću sinteze početnica i purifikacije enzima polimeraze. Napredak tehnologije u narednih 13 godina otvorio je mogućnost da Mullis premosti postojeće nedostatke i dođe do revolucionarnog otkrića.

Pored velikog broja izazova, jedan od najvećih s kojima se Mullis susretao bio je tehnološke prirode: kako kontrolirati temperaturne uvjete odvijanja PCR reakcije. U tu svrhu, koristio je sustav vodenih kupelji koje su bile zagrijane na različitim temperaturama potrebnim za uspješno odvijanje PCR-a. Takav preliminarni i s današnje točke gledišta, primitivni PCR sustav (slika 6.11.), patio je od velikih nedostataka uslijed velikog broja nesigurnih parametara koji su se redovno morali kontrolirati (temperatura i volumen vode, povećana mogućnost kontaminacije uzoraka uslijed otvorenosti sustava itd.).

Ubrzo se uvidjelo da je za uspješnu primjenu PCR metode neophodno u vrlo kratkom roku razviti i dobar PCR uređaj. Cetusovi znanstvenici vrlo brzo razvili su prvi termocikler (engl. *PCR thermocycler*), nazvan „Mr. Cycle” koji je u svojoj verziji imao opciju automatskog dodavanja polimeraze nakon svakog ciklusa. Podsjećanja radi, u to vrijeme korišten je termo-nestabilni klenov fragment, te je



SLIKA 6.11. Izvedba preliminarnog PCR sustava koji je bio u upotrebi 80-ih godina prošlog stoljeća (preuzeto i prilagođeno s <http://www.thermofisher.com/>, pristup 28.7.2024.).



SLIKA 6.12. Prvi model zatvorenog PCR sustava proizveden 1986. godine, od milja nazvan *Baby blue* (preuzeto i prilagođeno s <https://collection.sciencemuseumgroup.org.uk/objects/co146415/prototype-polymerase-chain-reaction-pcr-machine>, pristup 28.7.2024.).



SLIKA 6.13. GeneAmp™ PCR System 9700 (preuzeto i prilagođeno s <https://www.marshallscientific.com/ABI-GeneAmp-9700-Thermal-Cycler-p/abi-97.htm>, pristup 28.7.2024.).

postupak njegovog dodavanja nakon svakog ciklusa bio neophodan. Iste godine se tvrtka Cetus udružila s tvrtkom Perkin Elmer, te je odmah po otkriću *Taq* polimeraze izradila novi model PCR uređaja. Ovaj uređaj s automatskom regulacijom izmjene temperaturnog režima proizveden je 1986. godine. Prvi model, poznat pod nazivom „*Baby blue*” (slika 6.12.), integrirao je softverski dio za kontrolu odvijanja PCR ciklusa i hardverski dio u vidu običnog termobloka. Njegov je proizvođač ovim modelom definirao osnovni izgled PCR uređaja koji se sastojao od termobloka s rupama za postavljanje tubica sa PCR miksom te sustava za njegovo kontrolirano hlađenje i zagrijavanje. Današnji, najnoviji modeli i dalje prate osnovnu hardversku konstrukciju prvog uređaja, dok se osnovne promjene događaju na razini unaprjeđenja softverske jedinice i termostabilnosti samog bloka.

Nekoliko godina kasnije, Cetus je službeno objavio suradnju s tvrtkom Hoffman-LaRoche, kojoj je potom prodao prava na patent PCR metode. Nedugo zatim, tvrtka Applied Biosystems izdvojila se iz Perkin Elmer grupe te je od Roche (današnje ime nasljednice tvrtke Hoffman-LaRoche) preuzela prava na razvoj PCR uređaja, u čemu je i postigla veliki uspjeh. Od velikog broja postojećih PCR uređaja, u ovom poglavlju knjige izdvojeni su modeli uređaja koji su danas najčešći u svjetskim forenzičkim laboratorijima.

6.2.1. Applied Biosystems PCR uređaji

Applied Biosystems trenutno je vodeća tvrtka u proizvodnji PCR i rtPCR uređaja. Ono što joj daje prednost nad drugim tvrtkama u području forenzičke genetike jest da su njezini PCR uređaji GeneAmp™ PCR System 9700 (slika 6.13.) s pozlaćenim termoblokom i 7500 Real-Time PCR System for Human Identification (slika 6.14.) službeno validirane za upotrebu u forenzičkoj analizi DNA.



SLIKA 6.14. 7500 Real-Time PCR System for Human Identification (preuzeto i prilagođeno s <https://hashah.com/principals/human-identification-solutions/>, pristup 28.7.2024.).

GeneAmp™ PCR System 9700 predstavlja moćnu „kutijicu” (dimenzija 30 x 41 x 26 cm), koja omogućava istovremeno procesiranje 96 uzoraka postavljenih u tubicama, stripovima ili pločicama (engl. *plate*), svaki volumena 0,2 ml. Prosječna duljina same reakcije za uobičajena 32 ciklusa nešto je duža od dva sata. Pozlaćeni i obložen platinom, termoblok omogućava izuzetno brzo zagrijavanje, ali i visoku stabilnost dostignute temperature. Stoga se modeli s ovakvim blokovima nameću kao obavezni u procesuiranju forenzičkih, najčešće izuzetno osjetljivih uzoraka. Ovaj uređaj predstavlja nezavisnu jedinicu jer se PCR procedura odvija izravno na njemu. Po potrebi može biti spojen na računalo, s ciljem njegovog potencijalnog povezivanja u LIM sustav. Uspješno procesira i Applied Biosystems i Promegine multipleksne kitove.

S obzirom da je proizvodnja ovog modela obustavljena, njegovi su nasljednici modeli Dual 96 Well GeneAmp™ PCR System 9700, u kojem se istovremeno mogu procesirati 192 uzorka i 9800 Fast Thermal Cycle, u kojem se primjenom najnovije tehnologije vrijeme reakcije skraćuje na 25 minuta. Validiranjem ovih uređaja za forenzičku analizu DNA dobit će se izuzetno moćna oruđa za laboratorije koje procesiraju veliki broj uzoraka.

Napredak u proizvodnji PCR uređaja svakako je uspostavljanje različitih temperaturnih zona u svrhu što jednostavnije optimizacije različitih protokola i kitova koji se koriste u forenzičkoj praksi. Jedan od takvih uređaja je Applied Biosystems™ SimpliAmp™ Thermal Cycler. SimpliAmp™ PCR je malen, točan i vrlo jednostavan za korištenje. Osnovni benefiti SimpliAmp PCR-a su svakako njegovi VeriFlex blokovi za optimizaciju temperaturnog režima s visokom preciznošću. VeriFlex blokovi omogućavaju tri različite temperaturne zone koje se mogu koristiti za optimizaciju PCR reakcije. Još jedan benefit SimpliAmp™ PCR-a svakako je inovativni zagrijani poklopac. Kada je otvoren, u uspravnoj

je poziciji za siguran pristup uzorcima. Ukoliko nije zatvoren kako treba, sam će se otvoriti, što dodatno olakšava čitav proces lančane reakcije polimerazom.

Još napredniji PCR sustav je HID VeritiPro™ Thermal Cyclers koji ima šest različitih temperaturnih zona za preciznu kontrolu temperature i brze temperaturne promjene. HID VeritiPro™ Thermal Cyclers je validiran za sljedeće kitove: GlobalFiler™, GlobalFiler™ IQC, GlobalFiler™ Express, VeriFiler™ Plus, VeriFiler™ Express, Identifiler™ Plus, Identifiler™ Direct, MiniFiler™, NGM Select™, NGM Detect™, YFiler™ i YFiler™ Plus PCR, kao i za Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 i Precision ID mtDNA Whole Genome Panel.

7500 Real-Time PCR System for Human Identification predstavlja rtPCR sustav upravo namijenjen za ono što mu je navedeno u naslovu. Ovaj sustav jedan je od najzaslužnijih za preuzimanje primata rtPCR metode nad standardnom hibridizacijskom metodom u procesu kvantifikacije DNA izolirane iz forenzičkih tragova. Sustav se sastoji od osnovnog aparata i računala na kojem su instalirani softveri kojima se kontrolira rad osnovne rtPCR jedinice, kao i oni za analizu dobivenih podataka. Prvenstveno se koristi metodom opisanom u setu AB Quantifiler™ kitova (za što je i validiran), ali uspješno se primjenjuje i u analizi rezultata dobivenih primjenom Promegina Plexor® HY kita i Investigator Quantiplex kita (Qiagen). U mogućnosti je istovremeno analizirati 96 uzoraka, a cijela procedura traje nešto dulje od dva sata. Kao i prethodni uređaj, dobio je svoju „jaču” verziju (7900HT Fast Real-Time PCR System) kojom je moguće istovremeno procesirati maksimalno čak 384 uzorka. Vrijeme jedne reakcije u verziji uređaja od 96 uzoraka smanjeno je na 35 minuta, dok u verziji uređaja od 384 uzorka iznosi 55 minuta. Ovaj model još uvijek nije službeno validiran za forenzičku genetiku, ali



SLIKA 6.15. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System for Human Identification.



SLIKA 6.16. Mastercycler® Nexus PCR system (preuzeto i prilagođeno s <https://www.labx.com/item/eppendorf-mastercycler-nexus-pcr-thermal-cycler-range/DIS-4917-8125-30-1029>, pristup 28.7.2024.).

ako se to dogodi sigurno će pronaći svoje mjesto u laboratorijima namijenjenim za analizu velikog broja uzoraka.

Applied Biosystems QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System for Human Identification (slika 6.15.) s računalom jedan je od noviteta na tržištu. Uređaj je dizajniran i za nove i za stare korisnike kojima su neophodni pouzdani i brzi rezultati. Znamo da se u forenzici real-time PCR koristi najčešće za kvantifikaciju spornih uzoraka (tragova različite prirode) te ovaj sustav nudi i HID Real-Time PCR softver za analizu forenzičke DNA kvantifikacije. Zaslone na dodir nudi pregled amplifikacijskih plotova, a sučelje je izuzetno jednostavno. Nudi multipleksiranje do šest boja, što će u budućnosti biti neophodno. Također, posjeduje VeriFlex zone i preciznu kontrolu temperature. Pored kvantifikacije DNA, ovisno o kitovima koji se koriste, može detektirati DNA koja pripada muškoj osobi te procijeniti kvantitetu i kvalitetu uzorka.

6.2.2. Eppendorf PCR uređaji

Eppendorf je svojom Mastercycler® linijom PCR i rtPCR uređaja već godinama prisutan na tržištu, posebno europskih zemalja. Izuzetno je dobro prihvaćen u velikom broju laboratorija, posebno gradijentni model, koji dozvoljava istovremeno postavljanje različitih temperaturnih režima unutar istog termo bloka, koji sadrži 25 ili 96 mjesta za 0,2 ml tubice. Stoga ga veliki broj istraživačkih molekularno-bioloških laboratorija posjeduje kao nezaobilazni dio opreme.

S obzirom na izuzetno kvalitetnu ostalu laboratorijsku opremu (centrifuge, pipete, automatske pipetne DNA izolacijske radne stanice i dr.), veliki broj laboratorija prihvaća potpunu Eppendorf liniju koja obuhvaća i PCR i rt PCR uređaje (Mastercycler® ep realplex), kao i noviji Mastercycler® nexus X2 model koji se može od osnovnog modela proširiti na 3-sustavni model nadogradiv na trokomponentni sustav koji omogućava analizu 3 × 96 uzoraka (slika 6.16.).



SLIKA 6.17. Rotor Gene Q rtPCR system (preuzeto i prilagođeno s <https://www.qiagen.com/ja-us/us/products/discovery-and-translational-research/epigenetics/dna-methylation/methylation-specific-pcr/rotor-gene-q>, pristup 28.7.2024.).

6.2.3. Rotor-Gene Q

Usporedno s usmjeravanjem forenzičko-genetičkog programa u pravcu multipleksnih STR sustava, Qiagen je predstavio i novi rtPCR model kroz seriju Rotor Gene Q modela uređaja (slika 6.17.). Inovacija ovog modela ogleda se u tome što uzorci nisu fiksirani u bloku, nego su pozicionirani u rotoru koji se nalazi u komori s protočnim zrakom. Na taj se način zaobilazi potencijalni problem tzv. temperaturnog gradijenta, tj. potencijalnog variranja temperature zbog različitih pozicija pojedinih uzoraka u različitim dijelovima bloka. Detekcija rezultata pojedinačna je i odvija se pozicioniranjem uzorka (putem rotacije) i detekcijske optike. Ovaj rtPCR sustav trenutno je kompatibilan samo sa serijom Investigator Quantiplex kvantifikacijskih sustava.

6.2.4. Ostali PCR uređaji

Od ostalih tvrtki i modela PCR uređaja treba istaknuti Roche s LightCycler® 480 Real-Time PCR System-om koji omogućava istovremenu analizu i do 384 uzorka te Bio-Rad iCycler & iQ Real-Time PCR System, koji kao samostalni uređaj ima vlastiti ekran na kojem se mogu očitati rezultati.

Neophodno je spomenuti i nešto novije i modernije uređaje, kao što je Bio-Rad CFX Opus Systems koji ima svoj bežični internet i može biti programiran da rezultate analize šalje na e-mail adresu korisnika. Za detaljniju analizu podataka, Bio-Rad CFX Opus Systems koristi CFX Maestro Software. S ovim softverom, korisnik može provoditi statističku analizu podataka (*t*-test, ANOVA) u samo nekoliko sekundi, analizu podataka koristeći različite dijagrame i plotove, kreirati i podijeliti grafikone, analizirati podatke na svom računalu, neovisno o uređaju i raditi vrlo preciznu „melt curve” analizu, odnosno, određivati genotip uzorka na osnovi njihove krivulje termalne denaturacije. CFX Opus Systems ima temperaturni gradijent, s izuzetnom temperaturnom uniformnošću i reproduciбилnošću. Sustav može provoditi pet različitih ciljeva u jednoj reakciji.

6.3. RAZVOJ METODA I TEHNOLOGIJE ANALIZE DNA BILJEGA U FORENZIČKOJ GENETICI

Od početka istraživanja u ovom području, upotrebljavan je širok raspon različitih metoda za detekciju i analizu molekule DNA temeljenih na elektroforetskoj separaciji. Najranije tehnike podrazumijevale su radioaktivno označavanje ispitivanih DNA sekvenci i autoradiografiju. Ove metode bile su izuzetno osjetljive i efikasne, ali, s druge strane, jako komplicirane, duge i skupe. Korištenje radioaktivnih izotopa podrazumijevalo je postojanje opreme za razvijanje filmova, kao i uspostavljanje specifičnih uvjeta u kojima se može rukovati radioaktivnim materijalom.

Iz tih razloga, od kasnih 80-ih godina prošlog stoljeća, metode bojanja srebrom (engl. *silver staining*) i fluorescentnog obilježavanja i detekcije ciljanih sekvenci promovirane su u vodeće principe na kojima se temelji analiza molekularnih biljega, koji se koriste u forenzičkoj genetici. Najbitnija činjenica u vezi s ovim metodama je ubrzanje samog procesa detekcije.

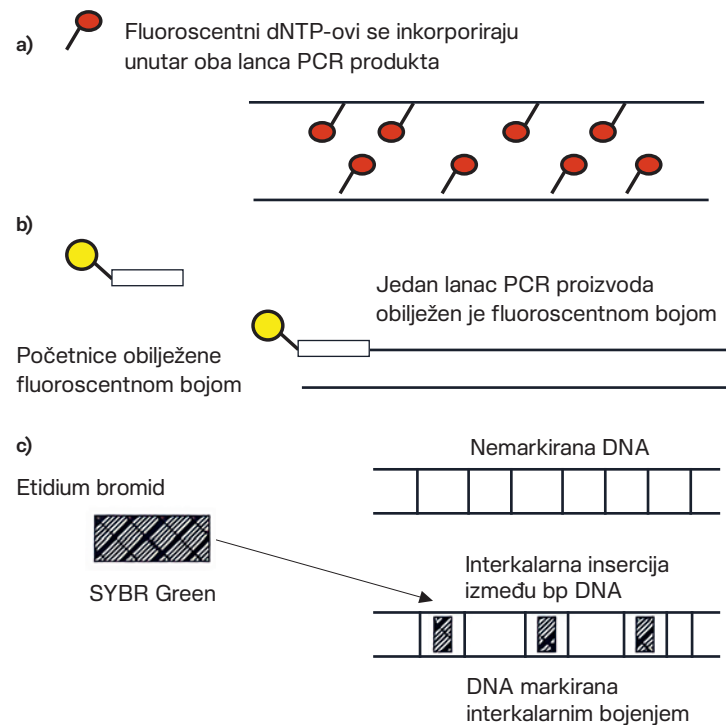
Danas su skoro svi komercijalni kitovi temeljeni na fluorescentnom obilježavanju i detekciji PCR početnica, pa je u ovom poglavlju predstavljen kratak sažetak razvoja ove tehnologije i onoga što se danas koristi u te svrhe.

6.3.1. Fluorescentno obilježavanje i detekcija

Fluorescentna detekcija omogućava istovremenu, višebojnu i jednostavnu analizu većeg broja molekularnih biljega sadržanih u komercijalnim multipleksnim kitovima. Molekule koje imaju sposobnost fluorescencije nazivaju se jednim imenom fluorofori, a mogu biti različitih oblika i veličina. One koje se koriste u forenzičkoj genetici fluoresciraju u vidljivom dijelu spektra, tj. od 400 do 600 nm. Sam princip vrlo je jednostavan: boja kojom je obilježena neka početnica pobudi se (najčešće laserskom zrakom), te emitira svjetlost (fluorescira) koju detektira kamera i zabilježi je. Dakle, foton s lasera pobudi elektron fluorofora, koji iz stanja mirovanja prelazi u stanje pobudenosti. Tada elektron reagira sa svojom okolinom i tijekom ponovnog vraćanja u stanje mirovanja emitira energiju koja se može detektirati.

Postoje tri osnovne metode obilježavanja PCR produkta (Butler, 2005):

- inkorporacija boje na 5' kraj oligonukleotidne početnice analiziranog amplicona (slika 6.18c)
- inkorporacija boje na dNTP-ove koji se ugrađuju u PCR produkt (slika 6.18b)
- interkalarna inkorporacija boje između lanaca DNA molekule (slika 6.18a).



SLIKA 6.18. Tri osnovne metode obilježavanja PCR produkta: a) upotrebe fluorescentnih dNTP-ova, b) fluorescentno obilježene početnice i c) korištenje boja kao što je etidij-bromid (dijelovi slike preuzeti iz Butler, 2005).

Prva metoda inkorporacije boje na početnicu amplikona se koristi se u analizi STR biljega. Alelne varijante na ispitivanom biljegu detektiraju se u vidu obojenoga „benda” (engl. *band*) i kasnije se softverski obrađuju i prevode u signale/pikove (engl. *peak*), koji u formi elektroferograma čine jedan DNA profil. Postoji širok raspon boja koje se koriste u ove svrhe i one su locirane u pet regija vidljivog spektra: plavi, zeleni, žuti, crveni i narančasti (Tablica 6.1.). Korištenje četiri ili pet različitih boja u obilježavanju i detekciji STR molekularnih biljega neophodno je radi distinkcije onih STR biljega koji su iste ili slične molekularne težine i koji se u ovakvoj analizi preklapaju.

Različite tvrtke koriste različite setove boja. Tako Applied Biosystems za obilježavanje STR lokusa sadržanih u njihovim komercijalnim multipleks kitovima koristi petobojni set: 6-FAM (plava), NED (žuta), VIC (zeleni), PET (crveni) i LIZ (narančasti za standard), dok Promega u svom multipleks kitu (PowerPlex® 16) koristi četverbojni set: FL (plava), JOE (zeleni), TAMRA (žuta) i CXR (crveni za standard), a za multipleksne sustave ESX i ESI koristi

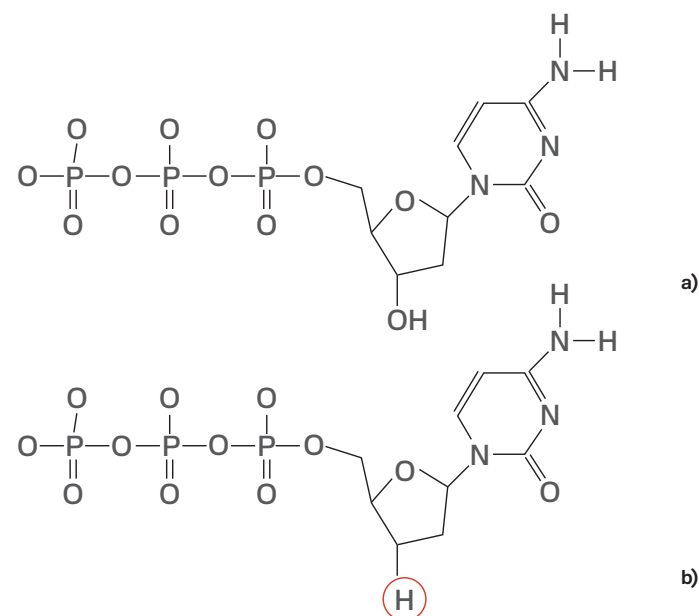
TABLICA 6.1. Raspon fluorescentnih boja koje se koriste u detekciji PCR rezultata u multipleksnim STR sustavima.

Boja	Applied Biosystems	Promega	Qiagen
Plava	6-FAM	FL	6-FAM
Zelena	VIC	JOE	BTG
Crvena	PET	CXR/CXR-ET	BTR2
Žuta	NED	TAMRA/TMR-ET	BTY
Narančasta	LIZ	LIZ	BTO

petobojni set plava (FL), zelena (JOE), žuta/crna (TMR-ET) i crvena (CXR-ET). Za razliku od prethodnih sustava iz PowerPlex serije, size standard ILS500 se detektira se u narančastom spektru (LIZ). Qiagen koristi petobojni fluorescentni sustav i to plava (6-FAM), zelena (BTG), žuta/crna (BTY) i crvena (BTR2). DNA Size Standard 550 detektira se u narančastom spektru (BTO boja) (Tablica 6.1.).

S povećanjem broja biljega koji se istovremeno analiziraju radi dobivanja što preciznijih i točnijih rezultata, povećava se i broj boja koje su u upotrebi, ovisno o proizvođaču. Tako su neke tvrtke unaprijedile set osnovnih pet boja iz tablice 6.1., pa Qiagen Investigator® 24plex QS Kit i Investigator® 24plex GO! Kit koriste šestu boju BTP (ljubičasta) (Tao *et al.*, 2022), Applied Biosystems također koristi ljubičastu boju SID dok je Promega uvela čak osam boja za upotrebu u reakcijama u svom novom PowerPlex® 35GY System setu za istovremenu analizu 35 markera. U pitanju su sljedeće boje: FL (tamnoplava), JOE (zeleni), AQA (svijetloplava), TMR (žuta), CXR (crveni), TOM (ljubičasti), WEN (narančasti) i CCO (smeđi).

S druge strane, kod detekcije i analize mitohondrijske sekvence (detaljnije opisano u poglavlju 5), svaka baza, tj. svaki nukleotid je obojen je drugom bojom i njena se analiza zasniva na principima osnovnog automatskog sekvenciranja koje, ustvari, predstavlja pojednostavljenu i automatiziranu Sangerovu metodu sekvenciranja. Ciljani DNA fragment se ovdje se amplificira uz prisustvo malih količina sva četiri modificirana nukleotida, odnosno ddNTP-a (slika 6.19.). Proces produživanja amplificiranog segmenta prestaje inkorporacijom jednoga od ddNTP-a, jer nedostatak -OH grupe onemogućava daljnju aktivnost DNA polimeraze. Druga generacija fluorescentne tehnike temelji se na upotrebi fluorescentnih biljega vezanih za chain terminator nukleotid (Prober *et al.*, 1987). Svaki od ova četiri nukleotida fluorescira u različitom spektru. Biljeg je inkorporiran u DNA molekulu pomoću *Taq* polimeraze i obavlja dvije funkcije u jednom koraku: zaustavlja daljnju sintezu DNA lanca i veže fluor na kraj molekule. Osnovna prednost ove metode je što se reakcija ne mora odvajati



SLIKA 6.19. Shematski prikaz: a) nukleotida citozina, b) dideoksinukleotida citozina.

u četiri tubice (svaka tubica za jedan od DNA nukleotida) kao kod originalne Sangerove metode. I kod ove metode, krajnja detekcija odvija se tijekom elektroforeze, prilikom prolaska obilježenog fragmenta kroz polje djelovanja detektora.

Interkalarna inkorporacija boje između lanaca DNA molekule najstarija je metoda i koristila se u ranijim analizama STR molekularnih biljega. Ovaj princip najširu primjenu pronalazi kod agarozne gel elektroforeze, koja se i danas, ali znatno rjeđe, koristi u procesu kvantifikacije izolirane DNA.

6.3.2. Razvoj DNA sekvencera i genetičkih analizatora

Usporedno s razvojem i primjenom novih metoda u području molekularne biologije, početkom 80-tih godina prošlog stoljeća započela je era ubrzanog razvoja DNA sekvencera i genetičkih analizatora. Pojava ovih laboratorijskih uređaja označila je prekretnicu, kako u molekularnoj, tako i u forenzičkoj genetici, čiji se početci upravo vežu za to razdoblje i prve radove Sir Aleca Jeffreysa iz 1985 (Jeffreys *et al.*, 1985a). Ovi uređaji omogućili su tri važne stvari: pojednostavljivanje same analize, skraćivanje efektivnog vremena neophodnog za analizu jednog uzorka i mogućnost istovremene analize relativno velikog broja uzoraka, što je upotrebu forenzičke analize DNA učinilo rutinskom.

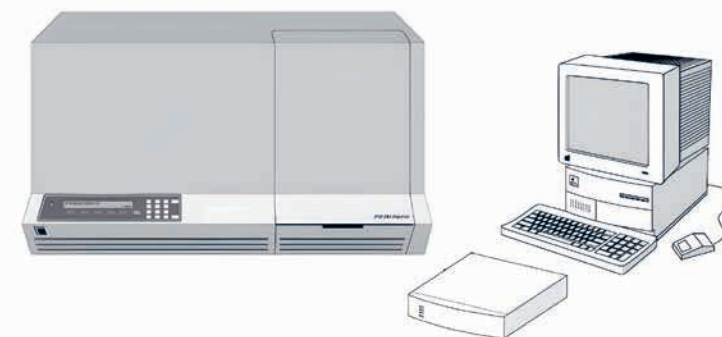
Od prvih dana pa do danas, jasno se može pratiti razvoj ovih uređaja kroz dva osnovna razdoblja. U prvom razdoblju dominirali su oni uređaji koji su bili zasnovani na vertikalnoj gel elektroforezi (ABI 373 i ABI 377), no krajem prošlog i početkom ovog stoljeća oni su, barem u području forenzičke genetike, u potpunosti potisnuti primjenom kapilarnih genetičkih analizatora (AB310, AB3100, AB3130 i noviji).

6.3.2.1. Automatski genetički gel analizatori

6.3.2.1.1. ABI PRISM® 373 DNA Sequencer

Iako ne prvi u klasi gel DNA sekvencera, ovaj je uređaj bio jedan od prvih koji je svoju primjenu pronašao u forenzičkoj genetici. Ipak, poznatiji je po tome što je služio kao platforma za razvoj njegovog nasljednika, tj. ABI 377 DNA sekvencera.

Sama tehnologija ovog uređaja bila je vrlo jednostavna i temeljila se na nanošenju pripremljenih uzoraka na tanki vertikalni poliakrilamidni gel koji je smješten između dvije staklene ploče. Kao i u svakoj elektroforezi, nanese uzorci putuju k pozitivnoj elektrodi i pri svome putovanju prolaze kroz područje za detekciju u kojem rade zajedno laser i kamera. Laser pobudi fluorescentno obilježene biljege, a kamera ih detektira i pohrani u vidu sirovih podataka na računalu. Na ovaj način, mogli su biti analizirani četverbojni STR multipleks sustavi koji su se temeljili na trobojnoj detekciji početnica, dok je četvrta boja služila za detekciju standarda veličine. Maksimalan broj uzoraka koji se istovremeno mogao analizirati na ovim sekvencerima bio je 36, dok je na njihovim XL varijantama taj broj mogao dosegnuti i 64 uzorka (slika 6.20.). Radilo se o relativno brzim uređajima koji su sve uzorke mogli analizirati u roku od dva do četiri sata (ovisno o tipu analize) (Applied Biosystems, 2001a). Računalna platforma ovih labora-



SLIKA 6.20. ABI PRISM® 373 DNA Sequencer (slika preuzeta i prilagođena iz Applied Biosystems, 2001a).

torijskih aparata bila je isključivo tipa Macintosh, au analizi STR molekularnih biljega koristili su se Data Collection i prve verzije GeneScan® softvera. Alelne varijante ručno su se determinirale na temelju usporedbe zabilježene veličine parova baza i odgovarajuće veličine parova baza alelnih varijanti iz alelne ljestvice.

Osnovni problem bio je veliki broj čimbenika prilikom pripremanja gela poput, postavljanja gela na sekvencer, pripremanja stakala za gel, kvalitete pufera, a koji su bitno mogli utjecati na kvalitetu rezultata. Razina osjetljivosti sustava za detekciju, u usporedbi s modernim kapilarnim uređajima bila je značajno manja. Točnije rečeno, brojni slabiji DNA profili koji se danas mogu detektirati, vrlo vjerojatno bili bi nedetektirani na ABI 373, dok je analiza samih rezultata bila relativno komplicirana i spora.

6.3.2.1.2. ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Ovaj uređaj predstavljao je jačeg i uspješnijeg člana obitelji uređaja za gel sekvenciranje DNA (slika 6.21.). Nastao je na platformi prethodno opisanog sekvencera i relativno je dugo bio u upotrebi. U odnosu na ABI 373 uređaj, imao je poboljšan sustav detekcije, unaprijeđene softvere, jednostavnije rukovanje i mogućnost istovremene analize čak 96 uzoraka (Applied Biosystems, 2001b). Na ovoj platformi prvi se put razvio i softver poznat kao Genotyper kojim je dotadašnje ručno kalkuliranje parova baza veličine fragmenata i usporedba detektiranih alelnih varijanti s onima koje se nalaze u priloženoj alelnoj ljestvici zamijenjeno automatskom analizom. To je značajno ubrzalo analiziranje većeg broja uzoraka.



SLIKA 6.21. ABI PRISM® 377 DNA Sequencer

Ova obilježja učinile su ga izuzetno pogodnim za analizu velikog broja uzoraka, posebno onih u kojima prisutna količina DNA nije upitna. Ipak, niži stupanj detektabilnosti ovih uređaja u odnosu na nove kapilarne sustave i kompliciranije rukovanje učinili su to da je platforma ovog uređaja, zajedno s platformom gel DNA sekvencera, u potpunosti napuštena 2006. godine. Od tada njihov proizvođač, tvrtka Applied Biosystems, ne proizvodi ove sekvencere dok je rezervne dijelove prestao proizvoditi 2011. Zanimljivo je da su u skladu s ovom promjenom sekvencera i proizvođači multipleksnih STR sustava promijenili strukturu svojih postamplifikacijskih setova za analizu multipleksnih STR sustava. Tako je u prvim verzijama Promegin PowerPlex® 16 STR sustav obuhvaćao i Blue Dextran Loading Solution, tj. kemikaliju koja se koristila prilikom detekcije na starijim genetičkim analizatorima koji podrazumijevaju analizu na vertikalnom poliakrilamidnom gelu. Ova kemikalija koristila se za vizualizaciju uzorka pri postavljanju na gel te je pojačavala njegovu samu viskoznošću, što je uvjetovalo ostanak uzorka u džepiću prije početka same elektroforeze i pomagalo u nesmetanom pravolinijskom prolasku uzorka kroz gel. Unazad nekoliko godina ova kemikalija ne nalazi se u standardnom PowerPlex® 16 setu, ali se mogla dodatno naručiti.

6.3.2.2. Automatski kapilarni genetički analizatori

6.3.2.2.1. ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer

Prva kapilarna elektroforeza opisana je krajem 80-ih godina 20. stoljeća, a prvi prototipovi uređaja, genetičkih analizatora, na tržištu pojavili su se sredinom zadnjeg desetljeća prošlog stoljeća. Iako relativno mlada, ova tehnika u potpunosti je, barem što se tiče analize PCR produkata, potisnula gel elektroforezu u molekularnoj, a posebno u forenzičkoj genetici.

Osnovne prednosti ove metode mogu se sagledati kroz automatsko iniciranje uzorka koje je vrlo precizno i brzo te otklanjanju mogućnost bilo kakve zamjene uzorka koja se lako mogla dogoditi na uređajima temeljenim na gel elektroforezi na kojima se uzorak nanosi ručno. Za razdvajanje umnoženih fragmenata jednog uzorka u kapilarnom sustavu potrebno je nešto više od 20 minuta, što je znatno kraće u odnosu na dva do četiri sata, koja su potrebna za gel elektroforetske DNA sekvencere. Rukovanje je znatno jednostavnije, a održavanje i postavljanje cijelog kapilarnog sustava je znatno brže u odnosu na gel sustave koji su se koristili na prethodnim uređajima. Mogućnost međusobnog miješanja uzoraka u samom procesu analize na uređaju je svedena na najmanju moguću mjeru.

Nedostatci ove metode su manji kapacitet analize uzoraka u odnosu na gel sekvencere i trenutno viša cijena koja zahtijeva veća izdvajanja prilikom uspostavljanja DNA laboratorija i više problema pri injektiranju uzoraka.



SLIKA 6.22. ABI PRISM® 310 genetički analizator (slika preuzeta s <http://www.astscientific.com/>, pristup 3.10.2023.).

Prvi u nizu kapilarnih sustava bio je *ABI PRISM® 310* genetički analizator (slika 6.22.) koji je službeno predstavljen u svojoj prvoj verziji još 1995. godine (Applied Biosystems, 2005b). Prema mišljenju mnogih stručnjaka, ovo je ujedno i najuspješnija, ali i najisplativija izvedba kapilarnih genetičkih analizatora i stoga se u nekim laboratorijima koristi i danas. Ovaj jednokapilarni sustav dozvoljava četverbojnu ili petobojnu detekciju. Izuzetno je jednostavan za rukovanje i prosječno trajanje analize jednog uzorka iznosi 30 minuta. Prvo je na tržište došao s Macintosh računalnom platformom, no uslijed širenja tržišta izvan SAD-a došlo je i do prelaska na PC računalne platforme. Softversko usavršavanje dovelo je do pojednostavljenja samog procesa tako da se s ovim uređajem dominantno koriste dva osnovna softvera: *Data Collection* za manipulaciju i upravljanje samim uređajem i *GeneMapper™* za ukupnu obradu sirovih podataka i generiranje DNA profila. *GeneMapper™* ustvari predstavlja sintezu GeneScan® i Genotyper softvera koji su bili prisutni na ABI 377, ali i na ranim ABI 310 uređajima. Jedna od velikih prednosti ovoga sustava jest da je izuzetno štedljiv u potrošnji uzorka tako da se jednom postavljeni i korišteni uzorci mogu koristiti više puta, što pojeftinjuje ne tako rijetku proceduru ponovne analize.

6.3.2.2.2. Ostali sustavi za detekciju molekularnih biljega

Nekoliko godina nakon pojavljivanja prvog jednokapilarnog sustava, pojavile su se njegove višekapilarne verzije kao što su 16-kapilarni ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer i njegova četverokapilarna inačica ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer koja se po potrebi može unaprijediti u 16-kapilarni sustav. Ovi uređaji povećali su kapacitet analize uzoraka, ali su značajno utjecali i na početnu cijenu uspostavljanja laboratorija. Pored toga, značajno su veći potrošači neophodnih



SLIKA 6.23. ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (slika preuzeta s http://www.hsc.edu/kw/RCF/4_Genomics/4_ABI3130GeneticAnalyzer.aspx, pristup 3.10.2023.).

reagenasa, tako da se ne preporučuju za manje laboratorije koje karakterizira manji protok uzoraka i relativno ograničeni budžet. Najmodernije varijante višekapilarnih sustava: ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer s četiri (slika 6.23.), ABI PRISM 3130-XL Genetic Analyzer s 16, ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer s 48 i ABI PRISM 3730xl Genetic Analyzer s 96 kapilara, pokazale su dobre performanse u forenzičko-genetičkoj analizi u tehničkom i softverskom smislu te su izuzetno tražene na tržištu.

Najnoviji modeli iz serije ABI PRISM® 3500 Genetic Analyzer i ABI PRISM® 3500xl Genetic Analyzer (slika 6.24.) s 8 i 24 kapilare, omogućavaju osjetljiviju i ujednačeniju detekciju čak i do šest različitih boja. U modelima namijenjenim forenzičko-genetičkom tržištu, uključen je bar-kod sustav za praćenje kvalitete i roka trajanja korištenih kemikalija, a s ciljem lakšeg ispunjavanja predviđenih standarda vezanih za korištene kemikalije u procesu forenzičko-genetičke analize. Analiza provedena 2010. godine od strane američkog NIST-a (engl. *National Institute of Standard and Technology*) ukazala je da 3500 serija genetičkih analizatora ima relativno bolje performanse (ujednačenost parametara, mogućnost šestobojne detekcije...) u odnosu na prethodne serije kapilarnih



SLIKA 6.24. ABI PRISM® 3500xl Genetic Analyzer (preuzeto i prilagođeno s <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4440471>, pristup 28.7.2024.).

genetičkih analizatora, no da je ujedno i značajno skuplja, kako po početnoj cijeni uređaja, tako i po cijeni neophodnih kemikalija.

6.3.2.3. Najnoviji trendovi u proizvodnji automatskih kapilarnih genetičkih analizatora

6.3.2.3.1. Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer for Human Identification (HID)

Od novije generacije uređaja za kapilarnu elektroforezu, neophodno je izdvojiti Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer for Human Identification (HID). Uređaj (slika 6.25.) ima četiri kapilare, što znači da će korisnik dobiti rezultate za četiri uzorka u isto vrijeme. Pogodan je za STR analizu, kao i za sekvenciranje. Za razliku od starijih modela sekvencera, ovaj sustav koristi unikatni polimer POP-1, koji se može koristiti i za fragmentalnu analizu i za sekvenciranje. Pored toga, polimer, anodni pufer i sustav kapilara nalaze se u jednoj kaseti, što skraćuje vrijeme održavanja uređaja, kao i postavljanja uzoraka. Unaprijed je pripremljena matrica (engl. *matrix*) za šest boja (DS02, DS30, DS32, DS33, DS36 i DS37), tako da su za uređaj kompatibilni kitovi koji koriste četiri, pet ili šest boja za detekciju. Za interpretaciju STR podataka, sustav koristi Applied Biosystems™ GeneMapper™ ID-X Software v1.6. Validiran je za različite STR kitove, kao što su: Applied Biosystems™ GlobalFiler™, GlobalFiler™ IQC, GlobalFiler™ Express, VeriFiler™ Plus, VeriFiler™ Express, Huaxia™, Identifiler™ Plus, MiniFiler™, NGM SElect™, NGM Detect™, YFiler™ i YFiler™ Plus PCR Amplification kitovi. Uređaj je kompatibilan s pločicama od 96 jažica te stripovima od osam jažica.



SLIKA 6.25. Applied Biosystems™ SeqStudio™ Genetic Analyzer for Human Identification (HID).

Sekvenceri s četiri kapilare namijenjeni su za manje laboratorije, koji nemaju veliki broj uzoraka na dnevnoj razini. Sanger sekvenciranje zlatni je standard tehnologija sekvenciranja, a SeqStudio™ Genetic Analyzer nudi visoku razinu točnosti kod primjene ove metode na uređaju, mogućnost sekvenciranja dugih sekvenci i fleksibilnost u primjeni, u smislu različitih vrsta aplikacija. Pored STR analize i sekvenciranja mitohondrijske DNA, ovaj uređaj pogodan je za detekciju SNP-ova, SNaPshot metodom. Za analizu sekvencijske reakcije (mitohondrijske DNA), uređaj koristi softver koji analizira čiste i mješovite baze, izmjenjuje i spašava sve podatke. Ovaj uređaj ne zahtijeva ponovnu spektralnu i spacijalnu kalibraciju svakom novom kasetom, jer se ona automatski izvodi kada se promijeni kazeta.

6.3.2.3.2. Applied Biosystems™ SeqStudio™ Flex Series Genetic Analyzer

Novi Applied Biosystems™ SeqStudio™ Flex Series Genetic Analyzer omogućava inovativan pristup, jednostavnost pri korištenju, visoku razinu kvalitete podataka i fleksibilnost u radu. Novodizajnirani 8- ili 24-kapilarni sustav podržava fragmentnu analizu i sekvenciranje za laboratorije koje imaju srednje visok protok uzoraka kroz laboratorij. Napredna tehnologija ogleđa se u tome da korisnik može kontinuirano dodavati nove ploče u uređaju bez prekida trenutnog procesa, automatski povezivati novu ploču s uređajem i na taj način pratiti svoje uzorke da bi se smanjila mogućnost ljudske pogreške, dodijeliti prioritet jednom uzorku u odnosu na drugi, promjenom redoslijeda injektiranja bez prekida ili pauze te provoditi fragmentnu analizu i sekvenciranje na istoj ploči. Sustav ima osam inkorporiranih boja i to: DS02, DS32, DS30, DS31, DS33, DS36, DS37, Z i E BDT, što će u skorijoj budućnosti biti jako važno, s obzirom da novi kitovi koji se proizvode imaju sve više lokusa, a samim tim i više boja.

6.3.2.3.3. Uređaji za kapilarnu elektroforezu tvrtke Promega

Kao jedan od noviteta svakako se trebaju izdvojiti uređaji tvrtke Promega za kapilarnu elektroforezu, počevši s kompaktnijim uređajem predviđenim za manji broj uzoraka, a to je Spectrum Compact CE System (slika 6.26.).

Dizajniran je za kemiju s četiri, pet ili šest boja, od Promege ili drugog proizvođača. Ima kapacitet od 32 uzorka i umjesto ploče koriste se stripovi od osam jažica. Ima četiri kapilare, duge 36 cm. Dizajniran je tako da štedi reagense i smanjuje otpadni materijal. Uz uređaj korisnik dobije i softver za upravljanje na daljinu, tako da je moguće unijeti informacije o uzorcima, mijenjati protokole, pratiti *run-ove* koji su trenutno u tijeku te pregledati i sačuvati podatke. Potrošni materijal koji se koristi za ovaj sustav sastoji se od anodnog i katodnog pufera,



SLIKA 6.26. Promega Spectrum Compact CE System (preuzeto i prilagođeno s <https://www.labmanager.com/promega-launches-spectrum-compact-ce-benchtop-dna-analysis-instrument-23824>, pristup 28.7.2024.).

polimera i kapilarne kasete. Sav materijal koristi 2D barkodiranje kako bi se mogle pratiti osnovne informacije o potrošnom materijalu, npr. broj injekcija koji je ostao u kapilarama, rok za korištenje pufera i tako dalje. Kompatibilan je s komercijalno dostupnim kitovima koristeći dTAMRA, dROX, dR6G i dR110, odnosno fluorescentno označene dideoksinukleotide.

Ovaj uređaj optimiziran je za veliki broj aplikacija, kao što su: *de novo* sekvenciranje, potvrda mutacija koje su pronađene sekvenciranjem sljedeće generacije (NGS-om), detekciju mutacija i sekvenciranje mitohondrijske DNA. Općenito, sav potrošni materijal i reagensi koji se koriste na uređaju su isti, bilo da se radi o fragmentnoj analizi ili sekvenciranju, osim polimera. Za sekvenciranje, uređaja koristi POP-7, dok za fragmentnu analizu koristi POP-4 polimer. Spectrum Compact Control Software omogućuje jednostavno sučelje s jasno označenim mogućnostima, kao što je postavljanje *run-a*, pufera, polimera i kapilara. Na ekranu korisnik je u mogućnosti pratiti run i gledati rezultate dok uređaj radi. Na uređaju su već instalirani pojedini protokoli koji se odmah mogu koristiti. Naravno, korisnik je u mogućnosti mijenjati protokole ili dizajnirati nove protokole. Podatci se mogu eksportirati u .fsa ili .ab1 formatu koji su kompatibilni sa softverima za analizu podataka, kao što su ProView™ Sequencing Software, GeneMarker® HID for Spectrum CE Systems, Mutation Surveyor® i GeneMapper®.

GeneMarker® HID Software za Spectrum CE Systems podržava analizu podataka sa svim dostupnim kitovima za identifikaciju. Softver sadrži module za analizu testiranja srodstva, module za automatski pregled potencijalne kontaminacije i module za usporedbu profila te se na taj način štedi vrijeme i opterećenje analize podataka. Znanstvena istraživanja pokazuju da Promega Spectrum Compact CE System ima visoku osjetljivost te da čak na oko 8 pg DNA, istraživač može dobiti djelomične DNA profile s oko 29% alela koji nisu prisutni na elektroferogramu, što ga čini osjetljivijim od pojedinih ABI uređaja.



SLIKA 6.27. Promega Spectrum CE System s osam kapilara (preuzeto i prilagođeno s www.worldwide.promega.com, pristup 3.10.2023.).

Najnoviji uređaj namijenjen za STR profiliranje je Promega Spectrum CE System (slika 6.27.). Ovaj sustav kombinira funkcionalnost STR analize jer koristi osam kapilara, s povećanom fleksibilnošću analiziranja uzoraka, jednostavnim softverom i korištenjem kit-ova s osam boja. U uređaju postoji prostor za četiri pločice s po 96 uzoraka kako bi se olakšala produktivnost i smanjio gubitak efikasnosti. Općenito, uređaj je namijenjen za laboratorije koje imaju veliki protok uzoraka. U uređaj je integriran program za prikupljanje podataka i softver za analizu za automatsku procjenu kvalitete uzoraka te se tako smanjuje vrijeme za odabir uzoraka koji se moraju ponovo analizirati. Promega Spectrum CE System prvi je sekvencer koji podržava kit-ove s osam boja kao što je i PowerPlex® 35 GY System. Novi Promegini kitovi omogućavaju amplifikaciju i detekciju više lokusa iz kompleksnijih forenzičkih uzoraka. Ukoliko laboratorij ne želi koristiti kitove za osam boja, Spectrum CE System je kompatibilan i s kitovima koji koriste četiri, pet ili šest boja. Potrošni materijal koji se koristi upakiran je na vrlo sličan način kao za Spectrum Compact CE System te su puferi, polimer i kapilara, RFID označeni za lakše praćenje potrošnje reagenasa. Spectrum Control Software omogućava jasno sučelje s različitim opcijama, kao što je postavka *run-a*, informacije o potrošnji pufera i kapilara, kao i podsjećanje na održavanje uređaja.

Kao što se može primijetiti, tvrtka Applied Biosystems drži primat u proizvodnji genetičkih analizatora, posebno onih koji se isključivo ili predominantno koriste u forenzičkoj analizi DNA. Jedan od pokušaja izvan ove tvrtke bio je i Hitachi FMBIO II i FMBIO III Fluorescence Imaging System (Butler, 2005). Ovo je bio sustav za gel elektroforezu s postelektroforetskim fluorescentnim skeniranjem gela. Omogućavao je četverbojnu detekciju i prvenstveno je bio namijenjen analizi multipleks STR sustava iz Promega linije PowerPlex® kitova, ali kao izuzetno fleksibilan sustav za njegove buduće modele bila je predviđena i upotreba AB kemikalija. Mnogi stručnjaci okarakterizirali su ga kao izuzetno obećavajući

uređaj koji je u mnogim parametrima mogao parirati, pa čak i nadmašiti tadašnje AB sustave. Ipak, njegova platforma nije doživjela značajniju ekspanziju te je 2003. godine obustavljena proizvodnja ovih uređaja.

6.4. NOVI TEHNOLOŠKI SMJEROVI U FORENZIČKOJ GENETICI

Potrebe za brzim i jednostavnim procesiranjem uzoraka, kao i ubrzani tehnološki razvoj, uvjetovali su pojavu novih ideja, kako u području molekularne biologije, tako i konkretno u području forenzičke genetike. Brzim pregledom stručne literature u posljednjem desetljeću može se primijetiti da znanstvenici i istraživački timovi svakodnevno dolaze do novih ideja o primjeni prethodno ustanovljenih molekularnih metoda analize na forenzičke uzorke i probleme. Sa stanovišta novih tehnologija postoji više zanimljivih modela koji bi u budućnosti mogli igrati bitnu ulogu u procesiranju forenzičkih tragova.

6.4.1. Primjena analize RNA i epigenetičkih promjena u forenzičkoj genetici

Kako je navedeno u prethodnom poglavlju, jedno od najčešćih pitanja tijekom sudskog procesa koja se postavljaju forenzičkom genetičaru, vezana su za vrijeme nantanka traga (starost, vrijeme pohranjivanja traga) i za njegovo točno biološko porijeklo. S tim u vezi, u ranijim godinama provedeno je nekoliko eksperimentalnih studija s ciljem uspostavljanja genetičkih sustava za utvrđivanje ovih parametara.

Studije zasnovane na primjeni rtPCR-a, tj. analiza odgovarajućih iRNA markera, omogućila je preciznu distinkciju bioloških tragova krvi i pljuvačke (Zubakov *et al.*, 2008). U skladu s time, ustanovljeni su rtPCR multipleksni sustavi pomoću kojih se može s visokom sigurnošću potvrditi prisustvo venske krvi, pljuvačke, sperme i menstrualne krvi, dok detekcija vaginalnog iscjetka još uvijek daje relativno kontroverzne rezultate zbog svog nespecifičnog sastava (Fleming *et al.*, 2010; Haas *et al.*, 2009; Juusola *et al.*, 2008; Nussbaumer *et al.*, 2007). Noviji pristupi testiranju potencijalnih tragova vaginalnog iscjetka temeljeni su na iRNA ili real-time PCR testiranju na najčešće prisutne *Lactobacillus* vrste u vaginalnom iscjetku, jer je pokazano da su Ct vrijednosti za *Lactobacillus* u vaginalnom iscjetku značajno niže u odnosu na uzorak brisa kože, spermu ili slinu (Doi *et al.*, 2014). Dokazivanje prisustva fecesa u forenzičkim tragovima također se može raditi koristeći molekularne metode detekcije *Bacteroides* gena, koji su specifični za ovu vrstu tragova i to koristeći PCR (Sinelnikov *et al.*, 2017) ili rtPCR metode (Nakanishi *et al.*, 2013). Nedavno je provedena opsežna studija različitih RNA biljega, uključujući 90 305 iRNA, 102 906 lncRNA (dugih nekodi-

rajućih RNA) i 40 204 circRNA (cirkularnih RNA) molekula, u svrhu detekcije RNA biljega specifičnih za različite tjelesne tekućine i tkiva, poput krvi (venske i menstrualne), sperme, pljuvačke, vaginalnog iscjetka i kože, s ciljem određivanja sastava transkriptoma specifičnog za različite uzorke (Liu *et al.*, 2024).

Usporedno s tim, s ciljem utvrđivanja krvi i sperme započeto je ispitivanje tzv. mikro RNA biljega, koji se mogu koristiti u analizama izuzetno malih količina prisutne RNA, jer su stabilniji od iRNA (Kayser, de Knijff, 2011), no osnovni izazov u miRNA tehnici predstavlja činjenica da nisu humano specifični. S porastom broja potencijalnih miRNA biljega, kao i kombiniranjem drugih pristupa s ovom analizom, postignut je napredak u razlikovanju tjelesnih tekućina (poput periferne i menstrualne krvi, pljuvačke, sperme i vaginalnog iscjetka), ali nijedna od ovih metoda i dalje nije validirana za službenu upotrebu (Liu *et al.*, 2021).

Također, jedan od obećavajućih modela u genetičkom određivanju tipova tkiva predstavlja koncept detekcije DNA metilacije (Frumkin *et al.*, 2010). DNA metilacija podrazumijeva dodavanje (adiciju) metilne grupe na poziciji 5-citozina, gdje je u genomu čovjeka oko 70% dinukleotida CpG metilirano. To je uobičajeni proces koji se javlja u organogenezi i staničnoj diferencijaciji viših organizama, stoga i ne čudi što se modeli metilacije razlikuju od tkiva do tkiva. Niz metoda preporučeno je za analizu DNA metilacije, među kojima se izdvaja bisulfitna konverzija i detekcija pirosekvenciranjem (Antunes *et al.*, 2015).

Na kraju, analiza varijacija broja kopija (engl. *copy-number variation*, CNV) koristeći qPCR metodu je uspješno diferencirala između tragova krvi i sperme. Dodatno, metoda je osjetljiva, specifična i uspješna kod uzoraka s visoko degradiranom DNA, što znači da je primjenjiva kod uzoraka gdje analiza RNA ili metilacije ne može biti provedena (Zubakov *et al.*, 2018).

S druge strane, prilikom određivanja starosti biološkog traga, postavljaju se dva pitanja: prije koliko vremena je trag ostavljen na mjestu zločina te u kojem dijelu dana se to dogodilo. Kao odgovor na prvo pitanje primjenjuju se eksperimentalne metode zasnovane na mjerenju stupnja degradacije RNA, konkretno u slučajevima krvnih mrlja (Anderson *et al.*, 2010) dok se u traženju odgovora na drugo pitanje ispituje mogućnost determinacije hormona melatonina i kortizola (za koje se zna da variraju u ljudskom tijelu tijekom dana) iz tragova krvi (Ackermann *et al.*, 2010). Novije metode analize baziraju se na RNA analizi, preciznije, korištenju miRNA i piRNA (Piwi interaktivna RNA) za potvrdu starosti tragova krvi prikupljenih osam godina prije provođenja studije. Koristeći dvije miRNA i dvije piRNA molekule, rezultati starosti traga bili su unutar pet godina točnosti kod 81,82% uzoraka, odnosno deset godina za 96,36% uzoraka (Fang *et al.*, 2023).

Iako je postignut veliki napredak i dalje je nužno za adekvatnu identifikaciju biološkog traga provesti istodobnu analizu više biljega, odnosno koristeći više različitih metoda, kako bi se isključili lažno pozitivni rezultati. Sve ove metode

su sa stajališta forenzičke genetike još uvijek u fazi ispitivanja i još nisu službeno validirane, no s obzirom na ubrzani razvoj forenzičke genetike vjerojatno će neke od njih u narednim godinama biti dovedene do faze rutinske primjene.

6.4.2. Nova generacija sekvenciranja

6.4.2.1. Razvoj prvih platformi

U protekla tri desetljeća tehnologija sekvenciranja DNA značajno je unaprijeđena. Zapravo, prošla je kroz niz faza modifikacije, počevši od radioaktivnog do fluorescentnog obilježavanja po pitanju kemizma, zatim gel do kapilarnih sustava elektroforeze, pa na koncu, *array* tehnologija za signalnu detekciju (Tettelin, Feldblyum, 2009). U pozadini svih ovih promjena u tehnologiji bio je jedan osnovni cilj: uložiti napore da se pronađe modul za masovnije, brže, senzitivnije i jeftinije sekvenciranje DNA, što bi omogućilo generiranje fundamentalnih informacija za znanstvena istraživanja iz molekularne genetike, naročito u području forenzičke genetike.

Razvoj tehnologija sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing*, *NGS*) inicirao je revoluciju u genomici, što je otvorilo mogućnosti realizacije projekata tzv. masovnog sekvenciranja. Napori su naročito bili usmjereni u pravcu etabliranja različitih platformi za potrebe sekvenciranja jedne molekule (engl. *single-molecule sequencing*). Ovaj pristup zapravo omogućava da se povećanjem broja DNA fragmenata, koji se mogu analizirati neovisno jedan o drugom, na odgovarajućoj platformi, postigne visoka razina protoka informacija pa se često u literaturi novi trendovi u molekularnoj biologiji referiraju kao visoko protočne (*high-throughput*) tehnologije.

Kroz relativno kratku povijest NGS-a do danas, nekoliko platformi izdvojile su se kao lideri na tržištu. Genome Sequencer FLX System (Roche) je prva NGS platforma koja se pojavila na tržištu (Margulies *et al.*, 2005) temeljena na metodi pirosekvenciranja (engl. *sequencing-by-synthesis*). S druge strane, Illumina (Solexa) Genome Analyser (slika 6.28.) platforma je koja se pojavila godinu dana poslije i koja je u komercijalnoj primjeni od 2006. godine. Unaprijeđena verzija ovog uređaja, Illumina Genome Analyser II, predstavlja kombinaciju cBot-a i paired-end modula. cBot revolucionarni je automatizirani sustav koji kreira klonalne klastere iz matrica jedne molekule DNA te ih na taj način priprema za sekvenciranje na genomskom analizatoru. Vrijeme sekvenciranja primjenom Genome Analyser II skraćeno je te finalna izlazna sekvenca može biti i do 50 Gbp. Kada pričamo o platformama koje su pokrenule trend upotrebe NGS-a u molekularnoj biologiji i šire, važno je spomenuti SOLiD System (Applied Biosystems) kao treću metodu, koja se bazira na tehnologiji sekvenciranja ligacijom (engl. *sequencing-by-ligation*).

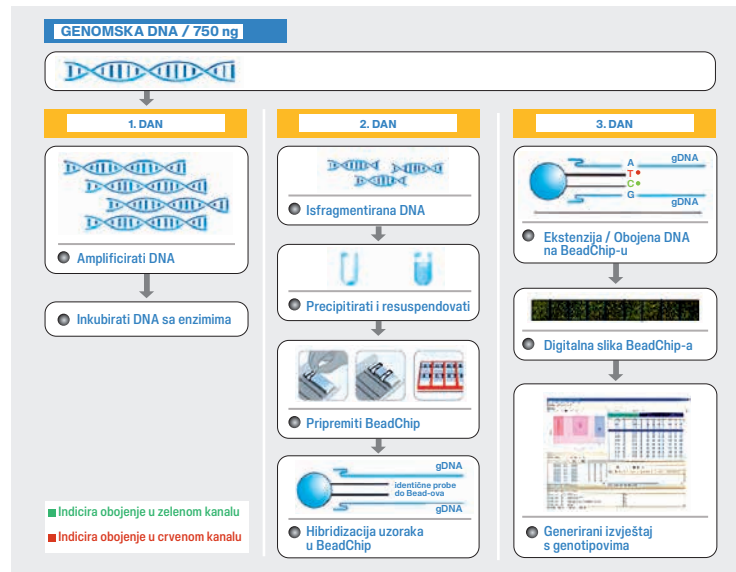


SLIKA 6.28. Primjer jednog *bead*-čipa korištenog za genotipizaciju te Illumina® genomski analizator (preuzeto i prilagođeno s www.illumina.com, pristup 3.10.2023.).

Općenito, NGS može se primijeniti u različite svrhe, a prije svega kod analiza:

- genoma - *de novo* sekvenciranje genoma, ciljano otkrivanje novih mutacija i polimorfizama
- transkriptoma - kvantifikacija ekspresije gena i alternativnog splicing-a, obilježavanje transkripta, otkrivanje novih transkribiranih SNP-ova te somatskih mutacija i profiliranje malih RNA molekula
- epigenoma - genomsko profiliranje histonskih modifikacija, analiza DNA metilacije, genomsko profiliranje nukleosomskih pozicija.

Bitno je spomenuti i prve SNP platforme za genotipizaciju. Najčešće primjenjivana, prvenstveno za populacijske studije je genotipizacija primjenom Illumina Bead Array tehnologije i to Infinium II Whole-Genome Genotyping esej koji je etabliran u svrhu ispitivanja velikoga broja SNP biljega kroz multipleksnu analizu. Infinium II Whole-Genome BeadChip dvobojna je high-throughput platforma na kojoj je moguća genotipizacija SNP biljega čiji se broj kreće u rasponu od minimalno deset tisuća do nekoliko stotina tisuća po uzorku. Illumina Bead Array tehnologija bazirana je na silikonskim kuglicama veličine tri mikrona koje se assembliraju u mikrokomoricama. Supstrat im može biti ili snop optičkih vlakana ili pak planarne silikonske pločice (slajdovi). Kuglice su obložene stotinama tisuća specifičnih oligonukleotida koji za sebe vežu DNA sekvence. Kuglice su kovalentno vezane za specifične 50-merne probe, koje su dizajnirane tako da budu komplementarne sekvenci koja graniči s lokacijom SNP-a te se tako dva alela (A, B) mogu razlikovati po obojenju, crvenom ili zelenom. Na slici 6.28. prikazan je primjer jednog takvog čipa za genotipizaciju te Illumina® genomski analizator.



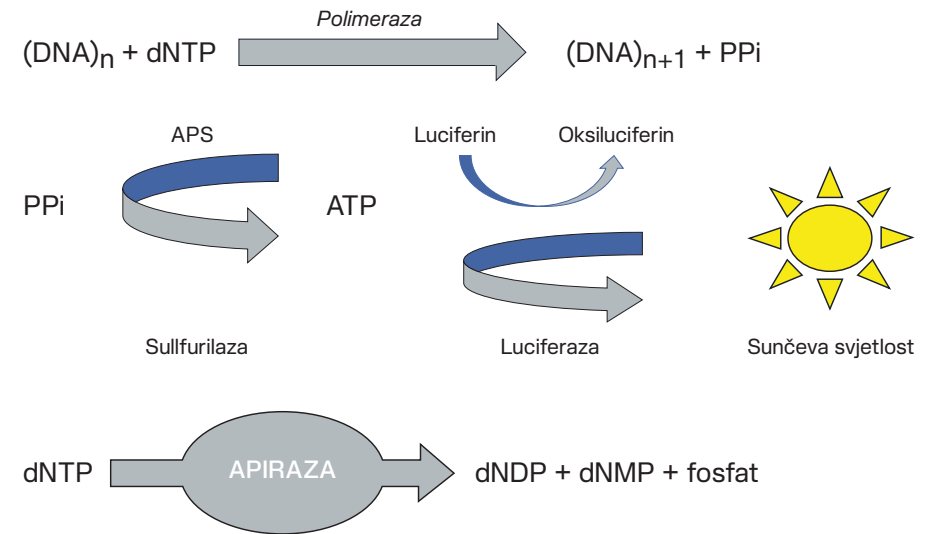
SLIKA 6.29. Radni slijed genotipizacije SNP biljega primjenom Infinium II Whole-Genome Genotyping esejja (dijelovi slike preuzeti i prilagođeni iz Raza, 2011).

Radni slijed pripreme DNA uzoraka za genotipizaciju odvija se u nekoliko faza (slika 6.29.). DNA uzorci koji se koriste za ovu vrstu analize amplificirani su. Amplificirani produkti nakon toga su fragmentirani enzimatskim procesom u kontroliranim uvjetima. Sljedeći korak je precipitacija koristeći apsolutni etanol te resuspenzija DNA. Potom se priprema čip (BeadChip) s komorama u koje je kapilarnim protokom aplicirana prethodno amplificirana i fragmentirana DNA te se ona izloži prekonočnoj inkubaciji. Tijekom inkubacije DNA se hibridizira s lokus-specifičnim 50-mernim molekulama koje se već nalaze u čipu i koje su kovalentno vezane za kuglice. Važno je spomenuti da jedan tip kuglice korespondira sa svakim alelom po SNP lokusu. Nakon hibridizacije dolazi do elongacije fluorescentno obojenih DNA produkata. Intenzitet fluorescencije kuglica detektira se putem Illumina BeadArray Reader-a te se na koncu primjenom Illumina softvera generira izvještaj o uspješnosti genotipizacije.

6.4.2.2. Novi NGS trendovi u forenzičkog genetici

6.4.2.2.1. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje omogućava brzu i točnu kvantifikaciju varijacija sekvenci. Djeluje tako da se DNA fragment amplificira i lanac DNA koji služi kao matrica je biotiniliran. Nakon denaturacije, biotinilirani jednolančani PCR amplikon



SLIKA 6.30. Shematski prikaz procesa pirosekvenciranja po koracima.

se izdvoji i hibridizira sa sekvenciskom oligonukleotidnom početnicom. Tako hibridizirana početnica (oligonukleotidna početnica) i jednolančana matrica se inkubiraju s DNA polimerazom, ATP sulfurilazom, luciferazom i apirazom, kao i supstratima adenzin-5-fosfosulfatom i luciferinom. Zatim se prvi dNTP dodaje u reakciju. DNA polimeraza katalizira dodavanje dNTP-a na sekvencijsku početnicu, ako je komplementarna bazi u lancu DNA matrice. Svaka inkorporacija nukleotida praćena je otpuštanjem pirofosfata (PP_i). ATP sulfurilaza konvertira PP_i u ATP u prisustvo adenzin-5-fosfosulfata. Dobiveni ATP provodi konverziju luciferina u oksiluciferin koji generira svjetlost u količini koja je proporcionalna količini ATP-a. Producirano svjetlo detektira se CCD kamerom i vidi se kao pik u takozvanom pirogramu. Visina svakog pika proporcionalna je broju inkorporiranih nukleotida. Apiraza kontinuirano degradira neinkorporirane nukleotide i ATP. Kada se degradacija završi, novi nukleotid dodaje se u reakciju (slika 6.30.).

Nešto kasnije, 454 Life Sciences (kasnije kupljena od Roche-a) preuzela je ovu tehnologiju i komercijalizirala je, uz nešto modifikacija. Postoje dva različita pristupa u pirosekvenciranju: 1. solidna faza gdje se DNA imobilizira i 2. tekuća faza gdje se dodaje piraza (ranije objašnjeno za što se koristi). Roche 454 je platforma za pirosekvenciranje koja koristi sustav za masivno paralelno sekvenciranje u pikolitarskom volumenu u mikrofluidnom formatu. Ukratko, DNA se

fragmentira, adapteri se vežu za fragmentiranu DNA i priprema se biblioteka koju prati vezanje biblioteka na kuglice (engl. *beads*). Kuglice stvaraju individualne odjeljke (kompartimente), koje se zovu mikroreaktori/mikrovezikule. U njima se događa klonalna amplifikacija uporabom emulzijskog PCR-a. Poslije toga, emulzija pukne i kuglice koje na sebi imaju klonalno amplificirane DNA fragmente obogaćuju se u mikrovezikulama.

6.4.2.2.2. Sekvenciranje korištenjem tehnologije reverzibilnog terminatora

Tehnologija reverzibilnog terminatora također ovisi o sekvenciranju sintezom. Razlika između ovog i tradicionalnog sekvenciranja je što tradicionalno sekvenciranje koristi ddNTP-jeve da ireverzibilno terminira ekstenziju oligonukleotidnih početnica dok tehnologija reverzibilnog terminatora koristi modificirani analog nukleotida za reverzibilnu terminaciju ekstenzije. Postoje dvije kategorije reverzibilnih terminatora: jedna kategorija pripada 3'-O-blokiranim reverzibilnim terminatorima, a druga je 3' neblokirani reverzibilni terminator.

Illumina Solexa komercijalizirala je ovu tehnologiju (Bentley *et al.*, 2008). Protočna stanica (Flow cell) koju koristi Illumina Solexa napravljena je od optičkog prozirnog stakalca koje ima osam traka na svojoj površini. Oligonukleotidna „sidra” imobilizirana su na površini „flow cell-a”. Ukratko, metodologija se sastoji od sekvenciranja fragmentirane DNA, popravke krajeva fragmenata (formiranje tupih krajeva i fosforilacija na 5' kraju) te adenilacije 3' krajeva dodavanjem jednog A nukleotida za olakšavanje ligacije s oligonukleotidnim adapterima koji nose T na 5' kraju. S obzirom da su spojeni adapteri komplementarni „flow cell-u”, „sidra” se hibridiziraju. Nakon toga formiraju se klasteri „bridge” amplifikacijom u odnosu na emulzijski PCR (Adessi *et al.*, 2000). S obzirom na klonalnu amplifikaciju, svaka matrica generira tisuće kopija (klastera) iste DNA matrice i naknadno milijune jedinstvenih klastera koji su generirani na „flow cell-u” dodavanjem DNA polimeraze i četiri fluorescentno označena reverzibilna terminatora (ddNTP-ja). Inkorporirani nukleotid identificira se detekcijom fluorescencije. Enzimskom reakcijom, fluorescentna oznaka se cijepa, što omogućava inkorporaciju sljedećeg nukleotida (Guo *et al.*, 2008).

Illumina platforme danas dominiraju na tržištu. Trenutno, Illumina proizvodi seriju različitih platformi, kao što su MiSeq, MiniSeq, HiSeq, iSeq, NextSeq i najnovija, NovaSeq. Prednosti Illuminine tehnologije su što generira veliki broj podataka u kratkom vremenskom periodu (Buermans *et al.*, 2014). Također, dužina fragmenata je veća, oko 300 bp, dok je sa Solexom prosječna dužina fragmenata bila 25 bp. Pored ovoga, Illumina osigurava točnost od 99,9% sekvenciranih podataka. Dodavanje samo jednog nukleotida po ciklusu omogućava



SLIKA 6.31. Illumina NovaSeq 6000 platforma za sekvenciranje (preuzeto i prilagođeno s <https://sapac.illumina.com/systems/ivd-instruments/novaseq-6000dx/specifications.html>, pristup 29.7.2024.).

sekvenciranje homopolimera vrlo efikasno (Mardis, 2013). Što se tiče ograničenja metode, važno je spomenuti nepravilno deblokiranje nukleotida, što može rezultirati u fragmentima različitih veličina u klasteru (Nakamura *et al.*, 2011).

NovaSeq 6000 (slika 6.31.) je najnovija Illumina platforma koja omogućava sekvenciranje kratkih fragmenata s ukupnim podacima do 6 TB. Koristi klasičnu pripremu biblioteka, generaciju klastera i sekvenciranje sintezom. Nekoliko različitih sekvencijskih kitova skupa s dvostrukim „flow cell-om” omogućavaju sekvenciranje različitih aplikacija u isto vrijeme (Modi *et al.*, 2021). S novim NovaSeq 6000 može se sekvencirati kompletan ljudski genom, kompletan egzom ili kompletan transkriptom.

Za upotrebu u forenzičkoj genetici, važno je spomenuti MiSeqFGx Forensic Genomics System koji je prvi put predstavljen u siječnju 2015. godine, i ujedno je prva validirana NGS metoda za upotrebu u forenzici. Ovaj model u mogućnosti je istovremeno amplificirati i analizirati veći broj forenzičko informativnih biljega, uključujući: 27 autosomnih STR-ova, 7 X-STR-ova, 24 biljega za Y haplotipove, 94 SNP-a, kao i 56 SNP-ova za određivanje porijekla i 22 SNP-a za DNA fenotipizaciju (Caratti *et al.*, 2015; Senst *et al.*, 2022).

6.4.2.2.3. Nanopor tehnologija

Ova tehnologija zasnovana je na ionskim kanalima. U ovisnosti od voltaže, čestice manje veličine od veličine pore cirkuliraju unutar pore. Više tvrtki nudilo je strategije za nanopor sekvenciranje. Jedna od tih je Genia i NanoTag sekvenciranje gdje se lanac DNA ekscizira u monomere te se jedan po jedan kanaliziraju kroz nanopor.

Drugi pristup puno je popularnija Oxford Nanopore metoda gdje čitav lanac DNA prolazi kroz nanopor i ovo je do sada najuspješnija nanopor tehnologija. Oxford Nanopore (MinION) metoda je komercijalizirana u 2014. godini. „Flow cell” nalazi se u srži uređaja u kojem je prisutno 2048 individualnih nanopora, podijeljenih u grupe od po 512 i kontrolira ih integrirani sklop specifičan za primjenu (engl. *application-specific integrated circuit, ASIC*). Ukratko, metodologija uključuje ligaciju adaptera na fragmente na svakom kraju. Adapteri omogućavaju „hvatanje” fragmenata i vezanje polimeraze na 5' krajevima fragmenata. Dodatno, ovi adapteri koncentriraju DNA fragmente bliže nanopori, što povećava razinu „hvatanja” fragmenata. Također, ovi adapteri (koji imaju izgled ukosnice za kosu), omogućavaju sekvenciranje dva komplementarna lanca kovalentno vežući lance DNA jedan uz drugi. Senzor detektira promjene u ionskom naboju. Rezultati se interpretiraju koristeći softver (MinKNOW) za identifikaciju nukleinske sekvence (Jain *et al.*, 2018).

Osnovna prednost ove tehnologije jest što generira duge fragmente, zbog čega se također smatra metodom treće generacije. Također, uređaj je prenosiv i omogućuje podatke u realnom vremenu (slika 6.32.). Zanimljiva činjenica jest



SLIKA 6.32. MinION uređaj za sekvenciranje se proizvodi u džepnom formatu (preuzeto s www.cshl.edu, pristup 29.7.2024.).

što je ovom uređaju dana prilika da bude korišten u svemiru (Castro-Wallace *et al.*, 2017). Najveće ograničenje ove tehnologije je visoka razina pogreške, tako da je sredinom 2016. godine na tržište pristigao R9 MinION koji ima manju stopu pogreške. Postoje i naprednije verzije nanopora, kao što su ProMethION, GridION X5, SmidgION X5 i tako dalje.

6.4.2.2.4. Ion poluprovodnička tehnologija

Ion poluprovodničko sekvenciranje je ekstenzija pirosekvencijske tehnologije. Ova tehnologija koristi čip (poluprovodnik) koji je sastavljen od milijuna mikro jažica. Mikro jažice detektiraju otpuštanje protona (H^+) tijekom sekvenciranja, što je praćeno promjenom pH vrijednosti. Ovo je prva komercijalno dostupna sekvencijska tehnologija koja ne zahtijeva skupu optiku, lasere i različito obilježene nukleotide za kompleksne sekvencijske kemije (Ansorge, 2016).

Ion Torrent napravio je Personal Genome Machine (PGM) koja generira između 10 000 i 20 000 Mbp podataka i fragmente dužine 400 bp. Metodologija obuhvaća fragmentaciju DNA, ligaciju adaptera i hibridizaciju na komplementarne sekvence vezane za partikule, praćenu emulzijskim PCR-om. Nakon klonalne amplifikacije, partikule se postavljaju na poluprovodnički čip. Svaka partikula ide u individualnu jažicu, a čip se „preplavi” različitim nukleotidima. Inkorporacijom svakog nukleotida, H^+ se otpušta, što rezultira promjenom pH vrijednosti. Ova promjena determinira sekvencu promjenom kemijskog signala u digitalni signal. Kod homopolimera intenzitet signala je visok, kao kod pirosekvenciranja (Quail *et al.*, 2012). Krajem 2012. godine, Ion Torrent napravio je napredniju platformu nazvanu Ion Proton. Ova tehnologija igra veliku ulogu u sekvenciranju genoma, egzoma i transkriptoma. Platforma ima niz aplikacija, kao što su: *de novo* sekvenciranje, analiza metilacije DNA, sekvenciranje malih RNA i analiza genske ekspresije.

Novije verzije, Ion S5 i Ion S5 XL došle su s većim brojem aplikacija i većim kapacitetom. Ove platforme zahtijevaju malu koncentraciju DNA ili RNA za identifikaciju mutacija i profila ekspresije. Pojednostavljena je i analiza podataka s Ion Reporter™ softverom. Najveći je limit niža pokrivenost u sekvenciranju genoma koji sadrže vrlo visok sadržaj AT baza. Također, sekvenciranje homopolimera može dovesti do pogrešaka u čitanju (Reuter *et al.*, 2015).

6.4.2.2.5. Treća generacija sekvenciranja

Iako druga generacija sekvenciranja nudi brojna poboljšanja u odnosu na Sangerovo sekvenciranje, njihovi limiti, pogotovo kratke dužine fragmenata čine ih slabim izborom za neke od bioloških problema kao što su determinacija

kompleksnih genomskih regija, detekcija metilacije, detekcija genskih izoformi i tako dalje. Jednomolekularno sekvenciranje u realnom vremenu (engl. *SMRT - single-molecule real-time sequencing*), razvijeno od strane tvrtke Pacific BioSciences (PacBio), nudi alternativni pristup za premošćivanje ovih limita. PacBio sekvenciranje metoda je u realnom vremenu i ne zahtijeva pauziranje u koracima čitanja (Schadt *et al.*, 2010). Ova tehnologija nudi mnogo duže fragmente i brže sekvenciranje od sekvencera druge generacije, ali ima višu stopu pogrešaka i skuplji je od sekvencera druge generacije. Jedno je vrijeme aplikacija PacBio sekvenciranja bila samo u sekvenciranju malih mikrobijalnih genoma, ali danas se proširila na sekvenciranje ljudskog genoma zahvaljujući novim bioinformatičkim alatima i poboljšanjima u tehnologiji sekvenciranja. Najveća prednost PacBio sekvenciranja svakako je dužina fragmenata, gdje maksimalna dužina fragmenata iznosi oko 60 kb.

Prednosti i mane druge (sekvenciranje sintezom) i treće (PacBio) generacije sekvencera su komplementarne, što daje motivaciju za inovativni pristup, tj. hibridno sekvenciranje, u svrhu integracije obje tehnologije (Rhoads, Au, 2015).

6.4.3. Upotreba indel biljega u forenzičkoj genetici

Insercije/delecije (engl. *insertion/deletion, indel*) su polimorfizmi koji se mogu podijeliti u grupu manjih polimorfizama (dužine 2-10 kb) ili dužih, odnosno većih strukturnih varijanti (dužine 10 kb do nekoliko Mb). Oko 11,9 Mb ljudskog genoma je implicirano u male indel varijante, što je usporedivo s veličinom genoma koji je pokriven SNP varijacijama (Mills *et al.*, 2006). Indeli mogu biti bialelni ili multialelni biljezi, gdje su gotovo svi multialelni biljezi temeljeni na uzastopno ponavljajućim sekvencama i predstavljaju VNTR i STR polimorfizme. Upravo su ovi, multialelni indeli, bili tema većine istraživanja (Mills *et al.*, 2011).

Detaljna analiza bialelnih biljega u genomu čovjeka napravljena je prije više od 20 godina, gdje je identificirano i karakterizirano preko 2000 polimorfizama ovog tipa, s 96% polimorfizama dužine između 2 i 16 bp. U ovoj su studiji također određene učestalosti alela u različitim svjetskim populacijama (Weber *et al.*, 2002). Bialelni indel polimorfizmi su adekvatni za korištenje u forenzičkoj genetici iz nekoliko razloga:

- niska stopa mutacija ($2,3 \times 10^{-9}$)
- visoka učestalost u genomu
- kratka DNA sekvencija koja sadrži indel polimorfizam
- mogućnost dizajniranja multipleks kitova
- s obzirom da se aleli razlikuju po dužini, detekcija bialelnih indela je relativno jednostavna i može se raditi koristeći kapilarnu elektroforezu

- razlike među populacijama su značajne, pa se ovi polimorfizmi mogu koristiti i za određivanje biološkog porijekla osobe (engl. *ancestral-informative markers, AIMS*) (Pereira *et al.*, 2012).

2009. godine proizveden je i tržišno predstavljen esej za identifikaciju 38 bialelnih indela u jednoj 38-pleksnoj reakciji, koristeći kombinaciju pet boja. Biljezi iz ovog kita locirani su na nekodirajućim regijama autosoma. Aleli su karakterizirani malom razlikom u dužini (2-5 bp), prosječna heterozigotnost je 0,4, a najniža učestalost svakog alela u europskim, azijskim i afričkim populacijama je 0,25. Snaga diskriminacije kada se ovaj kit koristi za identifikaciju je $> 99,999999$ (Pereira *et al.*, 2009).

Dodatno, Qiagen je razvio Investigator® DIPplex Kit, koji koristi pet boja za amplifikaciju 30 malih bialelnih indel markera i amelogenin lokus u jednoj multipleks PCR reakciji. Indel polimorfizmi iz ovog kita nalaze se u nekodirajućim regijama 19 autosoma i svaki je minimalno 10 Mb udaljen od najbližeg STR ili SNP biljega iz standardnih komercijalnih kitova za testiranje. Snaga isključivanja koristeći ovaj kit je $> 99,9999$ (Fondevila *et al.*, 2012; Neuvonen *et al.*, 2012). Zanimljivo je da su oba ova kita pokazala izvrsne performanse kod prirodno ili umjetno degradirane DNA ili kod uzoraka s manjom količinom DNA, s rezultatima koji su čak pokazali bolju senzitivnost u odnosu na popularne STR kitove (LaRue *et al.*, 2012).

- Ackermann K, Ballantyne KN, Kayser M. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *Int. J. Legal Med.* 2010; 124: 387-395. doi: 10.1007/s00414-010-0457-1
- Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod J-J, Mayer P, Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: E87. doi: 10.1093/nar/28.20.e87
- Anderson SE, Hobbs GR, Bishop CP. Multivariate analysis for estimating the age of bloodstain. *J. Forensic Sci.* 2010; 56: 186-193. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01551.x
- Ansorge WJ. Next generation DNA sequencing (II): techniques, applications. *Next Gen Seq App.* 2016; S1:005. doi: 10.4172/2469-9853.1000S1-005
- Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, McCord B. Tissue-Specific DNA Methylation Patterns in Forensic Samples Detected by Pyrosequencing®. *Method Mol Biol.* 1315, 397-409. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2715-9_27
- Applied Biosystems. ABI Prism® 310 Genetic Analyzer, User's Manual. Applied Biosystems, Waltham, MA; 2005b.
- Applied Biosystems. ABI Prism® 373 DNA Sequencer, User's Manual. Applied Biosystems, Waltham, MA; 2001a.
- Applied Biosystems. ABI Prism® 377 DNA Sequencer, User's Manual. Applied Biosystems, Waltham, MA; 2001b.
- Aumsuwan PK, Berosik S, Chege P, Sannicandro A, Samsani S, Bodeau J, Foster G, Rodriguez D, Lagier E, Chee S, Nelson S, Bornarth C. Genetic analysis instrumentation innovations built into the SeqStudio™ Flex Genetic Analyzers. *For Sci Int: Gen Supp Series.* 2022; 8, 228-231. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2022.10.044>
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature.* 2008; 456(7218): 53-59. doi: 10.1038/nature07517
- Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(10): 1932-1941. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.015
- Burgardt N, Weissenberger M. First experiences with the Spectrum Compact CE System. *Int. J. Legal Med.* 2022; 136(1), 55-72. doi: 10.1007/s00414-021-02673-1
- Butler JM. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers* (2nd edition). London: Elsevier Academic Press; 2005.
- Caratti S, Turrina S, Ferriani M, Cosentino E, De Leo D. MiSeq FGx sequencing system: A new platform for forensic genetics. *For Sci Int: Gen Supp Series.* 2015; 5, e98-e100. <https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2015.09.040>
- Castro-Wallace SL, Chiu CY, John KK, et al. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the International Space Station. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 18022. doi: 10.1038/s41598-017-18364-0
- Doi M, Gamo S, Okiura T, Nishimukai H, Asano M. A simple identification method for vaginal secretions using relative quantification of *Lactobacillus* DNA. *For Sci Int - Gen.* 2014; 12, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.05.005>
- Fang C, Zhou P, Li R, Guo J, Qiu H, Zhang J, Li M, Yu C, Meng D, Xu X, Liu X, Guan D, Yan J. Development of a novel forensic age estimation strategy for aged blood samples by combining piRNA and miRNA markers. *Int. J. Legal Med.* 2023; 137(5), 1327-1335. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03028-8>
- Fleming RI, Harbison S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2010; 4(4): 244-256. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.10.006
- Fondevila M, Phillips C, Santos C, Pereira R, Gusmão L, Carracedo A, Butler JM, Lareu MV, Vallone PM. Forensic performance of two insertion-deletion marker assays. *Int. J. Legal Med.* 2012; 126(5), 725-737. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0721-7>
- Frumkin D, Wasserstorm A, Budowle B, Davidson A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011; 5(5): 517-524. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.12.001
- Guo J, Xu N, Li Z, et al. Four-color DNA sequencing with 3'-O-modified nucleotide reversible terminators and chemically cleavable fluorescent dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(27): 9145-9150. doi: 10.1073/pnas.0804023105
- Haas C, Klessner B, Maake C, Bar W, Kratzer A. mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2009; 3(2), 80-88. doi: 10.1016/j.fsigen.2008.11.003
- Jain M, Koren S, Miga KH, et al. Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nat. Biotechnol.* 2018; 36(4): 338-345. doi: 10.1038/nbt.4060
- Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable „Minisatellite” Regions in Human DNA. *Nature.* 1985a; 314: 67-73.
- Juusola J, Ballantyne J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *Forensic Sci. Int.* 2007; 52(6), 1252-1262. doi: 10.1111/j.1556-4029.2007.00550.x
- Kayser M, de Knijff P. Improving human forensics through advances in genetics, genomics and molecular biology. *Nat. Rev. Genet.* 2011; 12(3): 179-192. doi: 10.1038/nrg2952
- LaRue BL, Ge J, King JL, Budowle B. A validation study of the Qiagen Investigator DIPplex® kit; an INDEL-based assay for human identification. *Int. J. Legal Med.* 2012; 126(4), 533-540. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0667-9>
- Liu Y, He H, Xiao ZX, Ji A, Ye J, Sun Q, Cao Y. A systematic analysis of miRNA markers and classification algorithms for forensic body fluid identification. *Brief. Bioinform.* 2021; 22(4): bbaa324. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa324>
- Liu Z, Yang J, Wang N, Liu J, Geng J, Zhu J, Cong B, Sun H, Wu R. Integrative lncRNA, circRNA, and mRNA analysis reveals expression profiles of six forensic body fluids /tissue. *Int. J. Legal Med.* 2024; 138(3), 731-742. <https://doi.org/10.1007/s00414-023-03131-w>

- Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annu. Rev. Anal. Chem.* (Palo Alto, Calif.) 2013; 6: 287-303. doi: 10.1146/annurev-anchem-062012-092628
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005; 437(7057): 376-380. doi: 10.1038/nature03959
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, Devine SE. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res.* 2006; 16(9), 1182-1190. <https://doi.org/10.1101/gr.4565806>
- Mills RE, Pittard WS, Mullaney JM, Farooq U, Creasy TH, Mahurkar AA, Kemeza DM, Strassler DS, Ponting CP, Webber C, Devine SE. Natural genetic variation caused by small insertions and deletions in the human genome. *Genome Res.* 2011; 21(6), 830-839. <https://doi.org/10.1101/gr.115907.110>
- Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M. The Illumina Sequencing Protocol and the Nova-Seq 6000 System. *Methods Mol Biol.* 2021; 2242: 15-42. doi: 10.1007/978-1-0716-1099-2_2
- Nakamura K, Oshima T, Morimoto T, et al. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(13): e90. doi: 10.1093/nar/gkr344
- Nakanishi H, Shoji H, Ohmori T, Hara M, Takada A, Adachi N, Saito K. Identification of feces by detection of *Bacteroides* genes. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2013; 7(1), 176-179. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2012.09.006>
- Neuvonen AM, Palo JU, Hedman M, Sajantila A. Discrimination power of Investigator DIPplex loci in Finnish and Somali populations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012; 6(4), e99-e102. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.09.005>
- Nussbaumer C, Gharehbaghi-Schnell E, Korschineck I. Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR. *Forensic Sci. Int.* 2006; 157(2-3): 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.10.009>
- Pereira R, Phillips C, Alves C, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. A new multiplex for human identification using insertion/deletion polymorphisms. *Electrophoresis*. 2009; 30(21), 3682-3690. <https://doi.org/10.1002/elps.200900274>
- Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, Carracedo A, Gusmão L. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PloS One*, 2012; 7(1), e29684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029684>
- Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* 1987; 238(4825): 336-341. doi: 10.1126/science.2443975
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Yong G. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012; 13: 341. doi: 10.1186/1471-2164-13-341
- Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell*. 2015; 58(4): 586-597. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004
- Rhoads A, Au, KF. PacBio Sequencing and its Applications. *Genomics, Proteomics Bioinformatics*. 2015; 13(5), 278-289. doi: 10.1016/j.gpb.2015.08.002
- Sarik H, Naughton K, Miller KWP. Validation of a High-Throughput Automated Liquid Handling DNA Extraction System to Maximize Efficiency in Forensic Casework. *Forensic Genomics*. 2021; 1(1): 1-37. <https://doi.org/10.1089/forensic.2020.0001>
- Schadt EE, Turner S, Kasarskis A. A window into third-generation sequencing. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(R2): R227-R240. doi: 10.1093/hmg/ddq416
- Senst A, Caliebe A, Scheurer E, Schulz I. Validation and beyond: Next generation sequencing of forensic casework samples including challenging tissue samples from altered human corpses using the MiSeq FGx system. *J. Forensic Sci.* 2022; 67(4), 1382-1398. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15028>
- Sinelnikov A, Kopitke E, Reich K. PCR-based tests for forensic detection of feces; use of *Bacteroides* species as indicator of fecal matter. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2017; 6, e37-e39. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.09.011>
- Tao R, Chen C, Sheng X, Xia R, Zhang X, Zhang J, Yang Z, Zhang S, Li C. Validation of the Investigator 24plex QS Kit: a 6-dye multiplex PCR assay for forensic application in the Chinese Han population. *Forensic Sci. Res.* 2019; 7(2), 172-180. <https://doi.org/10.1080/20961790.2019.1665160>
- Tettelin H, Feldblyum T. Bacterial genome sequencing. *Method Mol Biol.* 2009; 551, 231-247. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-999-4_18
- Weber JL, David D, Heil J, Fan Y, Zhao C, Marth G. Human diallelic insertion/deletion polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 71(4), 854-862. <https://doi.org/10.1086/342727>
- Zubakov D, Chamier-Ciemińska J, Kokmeijer I, Maciejewska A, Martínez P, Pawłowski R, Haas C, Kayser M. Introducing novel type of human DNA markers for forensic tissue identification: DNA copy number variation allows the detection of blood and semen. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018; 36, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.06.021>
- Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int. J. Legal Med.* 2008; 122(2): 135-142. doi: 10.1007/s00414-007-0182-6

7.

OSNOVNA BIOSTATISTIČKA PRAVILA U FORENZIČKOJ GENETICI

prof. dr. sc. Larisa Bešić
prof. dr. sc. Damir Marjanović
prof. dr. sc. Dragan Primorac
prof. dr. sc. Adna Ašić
izv. prof. dr. sc. Natalija Novokmet

OSNOVNA BIOSTATISTIČKA PRAVILA U FORENZIČKOJ GENETICI

U prijašnjim poglavljima već je napomenuto da forenzička analiza DNA, a samim time i forenzička genetika, predstavljaju izvrstan primjer sinteze znanstvenih spoznaja velikog broja znanstvenih disciplina s jedne i konkretnu primjenu tih spoznaja u svakodnevnom životu s druge strane. Da bi znanost pronašla svoj put do svakodnevne primjene, odnosno, da bi se rezultati dobiveni u forenzičkom DNA laboratoriju mogli prezentirati na sudu, u sklopu policijskih istraga ili strankama u testiranju očitstva, oni moraju biti formulirani u jasnom i razumljivom obliku, čak i onim osobama koje nemaju ni osnovno predznanje iz forenzičke genetike (Primorac, Marjanović, *et al.*, 2008). Drugim riječima, jezik molekularne biologije i populacijske genetike mora biti preveden na razumljiviji jezik opće populacije. Upravo je uspjeh u tom segmentu dao značajan doprinos u popularizaciji forenzičke genetike, koja je svoje rezultate uspješno, precizno i jednostavno uspjela prikazati na univerzalnom svjetskom jeziku, jeziku matematike. U nastavku nekoliko je osnovnih postulata koje bi svaki znanstvenik iz ovog područja, ali i osoba koja koristi rezultate analize DNA u svakodnevnom radu, trebali znati. Ovo poglavlje knjige predstavlja proširenu verziju dijela prvog poglavlja knjige Primorac, Marjanović, *et al.*, 2008.

7.1. MENDELOVI ZAKONI NASLJEĐIVANJA

U radovima Gregora Mendela, koji se često naziva i ocem moderne genetike, postavljeni su temelji genetike kakvu poznajemo danas. Mendel je, eksperimentirajući s vrtnim graškom, postavio osnovne principe nasljeđivanja. Iako je prve rezultate objavio još 1865. godine, oni su bili potpuno zaboravljeni sve do 1900. godine, kada su ih drugi znanstvenici ponovno potvrdili u tri različita laboratorija. Mendelovi zakoni nasljeđivanja određuju očekivanu raspodjelu alela kod

potomaka u različitim slučajevima sparivanja. Nasljeđivanje po Mendelu sastoji se od tri zakona:

- Monohibridno križanje: U slučaju da se otac koji je homozigot AA spari s majkom koja je homozigot BB , svi će potomci biti heterozigoti, što se označava kao AB .
- Razdvajanje/segregacija: U slučaju sparivanja dvaju heterozigotnih A_1A_2 roditelja, mogući su sljedeći genotipovi: A_1A_1 ; A_1A_2 i A_2A_2 u omjeru 1:2:1. Ovaj zakon naglašava da dolazi do razdvajanja (segregacije) članova genskih parova tijekom mejoze tako da 50% gameta nosi alel A_1 , dok drugih 50% gameta nosi alel A_2 .
- Nezavisna segregacija: U slučaju sparivanja roditelja koji imaju više od jednog lokusa koji podliježe segregaciji, onda su lokusi genetički nevezani, tj. svaki od njih nasljeđuje se neovisno o drugim lokusima. Prema ovom zakonu, razdvajanje alela jednog lokusa neovisno je o razdvajanju alela drugih lokusa tijekom mejoze.

7.2. HARDY-WEINBERGOVA RAVNOTEŽA

Gregor Mendel opisao je ponašanje alela kod sparivanja. Slično tome su Hardy i Weinberg 1908. godine, neovisno jedan o drugome, opisali ponašanje alela u populaciji. Hardy-Weinbergov zakon opisuje očekivani odnos između učestalosti alela i učestalosti genotipa na pojedinom lokusu (Wier, 1993), koji se dobije ekspanzijom binoma.

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

$$p + q = 1$$

gdje su:

p^2 – udio populacije homozigota za A_1 ;

q^2 – udio populacije homozigota za A_2 ;

$2pq$ – udio heterozigota;

p – relativna učestalost alela A_1 ;

q – relativna učestalost alela A_2 .

Po istom principu, kada se promatra odnos tri alela na jednom biljevu dobije se obrazac:

$$p^2 + 2pq + 2pr + q^2 + 2qr + r^2 = AA + AB + AC + BB + BC + CC$$

Ako je Hardy-Weinbergova ravnoteža održana, onda je učestalost alela na nekom lokusu u populaciji konstantna tijekom vremena. Međutim, odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže mogu nastati zbog nekoliko razloga, a to su:

- Neslučajno formiranje reproduktivnih parova eliminira polazne uvjete za održavanje modela genetičke ravnoteže. U ljudskim populacijama najčešće se izražava kao *inbreeding* (sparivanje genetički bliskih jedinki) i *outbreeding* (sparivanje genetički udaljenijih jedinki).
- Srođivanje (engl. *inbreeding*) zbog međusobne srodnosti roditelja može dovesti do smanjenja heterozigotnosti; nasuprot tome, *outbreeding* povećava heterozigotnost matične populacije.
- Migracija gena iz jedne u drugu populaciju mijenja učestalosti alela i utječe na Hardy-Weinbergovu ravnotežu sve dok se ne postigne nova ravnoteža.
- Mutacija ili promjena kod naslijeđenih alela utječe na učestalosti alela.
- Prirodna selekcija dovodi do povećanja ili smanjenja učestalosti nekog alela tijekom vremena. Djeca s alelom koji omogućava bolju prilagodbu okolišu imaju veću vjerojatnost za opstanak nego djeca s drugim alelima. Primjeri navedenog su deficijencija G6PD ili talasemija u malaričnim područjima.
- Izolacija narušava očekivane učestalosti pojedinih alelnih varijanti zbog ograničenja broja partnera, koji sudjeluju u reprodukciji, tj. u formiranju genskoga fonda iduće generacije potomaka.
- Genetičko odstupanje (engl. *drift*), predstavlja slučajne promjene u genskoj učestalosti unutar neke, obično manje populacije, a javlja se u slučajevima kad u formiranju genskog fonda sljedećeg naraštaja ne sudjeluje kompletna matična populacija nego samo jedan njezin dio. Pod određenim uvjetima, pojedini aleli mogu u cijelosti nestati (gubitak alela) ili biti prisutni kod svakog pojedinca unutar te populacije (fiksacija alela).

7.3. NERAVNOTEŽA VEZANOSTI GENA

Neravnoteža vezanosti gena statistička je metoda koja se koristi u forenzičkoj genetici kako bi se procijenila vjerojatnost da se aleli na određenim lokusima između pronađenog DNA profila podudaraju s onima iz profila osumnjičenika ili drugih relevantnih pojedinaca. Uravnotežena vezanost gena uzima u obzir frekvencije alela u relevantnoj populaciji, kako bi se procijenila vjerojatnost da bi se slučajno moglo dogoditi podudaranje alela u pronađenom DNA profilu i profilu osumnjičenika ili drugih pojedinaca, čak i ako nisu povezani s mjestom zločina ili žrtvom. Statističke tablice i baze podataka koje sadrže frekvencije alela na različitim lokusima koriste se u uravnoteženoj vezanosti kako bi se izračunale

vjerojatnosti podudaranja na temelju relevantnih populacijskih podataka. Uravnotežena vezanost gena može se koristiti u kontekstu Hardy-Weinbergove ravnoteže kako bi se provjerila usklađenost stvarnog opaženog genetskog stanja s očekivanim stanjem prema Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Ako se u populaciji promatraju frekvencije alela na određenom lokusu, koje nisu u skladu s Hardy-Weinbergovom ravnotežom, to može ukazivati na prisutnost nekih drugih faktora poput selekcije, mutacije migracije ili genetičkog drifta, koji utječu na promjene u genetskoj strukturi populacije. Uravnotežena vezanost može se koristiti kako bi se procijenila vjerojatnost takvih promjena i utvrdilo koliko su one vjerojatne na temelju relevantnih populacijskih podataka. Na primjer, uravnotežena vezanost može se koristiti za procjenu vjerojatnosti podudaranja alela u populaciji koja nije u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži s alelima pronađenim na mjestu zločina ili u pronađenom DNA profilu. To može biti važno u forenzičkoj genetici kako bi se razumjela genetska pozadina pronađenog materijala i procijenila vjerojatnost da je pronađeni materijal povezan s osumnjičnikom ili drugim relevantnim pojedincem.

Ova metoda koristi se za analizu slučajeva gdje postoje sumnje u odnosu između osumnjičenika i pronađenog biološkog traga, kako bi se izbjegli lažno pozitivni rezultati ili pogrešne optužbe na temelju slučajnih podudaranja DNA profila te kako bi se osigurala pouzdanost i točnost analize DNA profila u forenzičkim istraživanjima. Navedeno je važno za procjenu jačine dokaza u forenzičkoj analizi DNA profila i osiguravanje pravilne upotrebe genetskih podataka u sudskim postupcima, kao i za pravilnu interpretaciju genetskih podataka u forenzičkoj analizi (Hamilton, 2021).

7.4. KREIRANJE POPULACIJSKE BAZE PODATAKA

Osnovni je cilj kreiranja baze podataka utvrđivanje učestalosti pojedinih alelnih varijanti na ispitivanim molekularnim biljezima unutar odabrane populacije, s obzirom da se svi statistički izračuni vezani za forenzičku genetiku procjenjuju na osnovi tih alelnih frekvencija. Stoga je, ako se žele dobiti precizni rezultati koji će imati stvarnu, neospornu vrijednost na sudu, bitno utvrditi stvarno „stanje na terenu”, tj. genetičku raznolikost lokalne populacije. Danas gotovo i ne postoji populacija koja nije analizirana i genetički istražena na velikom broju biljega. Gotovo svakodnevno korištenje STR biljega u sklopu forenzičkih istraživanja ili testiranja spornoga očinstva, uvjetovalo je da su upravo populacijske studije zasnovane na istraživanju ovih biljega bile među najzastupljenijim početkom ovog stoljeća.

Prije kreiranja baza podataka za odabranu populaciju bitno je sagledati sve osobitosti same populacije: njenu veličinu, etničku strukturu, povezanost s ostalim

susjednim ili udaljenijim populacijama itd. Primjerice, populacija Republike Hrvatske nije velika, ali je strukturno izuzetno kompleksna. Sastoji se od sustava manjih i većih populacija s određenim stupnjevima njihove izolacije/otvorenosti prema okruženju. Preporuka prilikom kreiranja ovakvih populacijskih baza podataka bez obzira na veličinu je jednostavna - uvrstite u njih što više nesrodnih ispitanika. Početkom 90-ih godina, preporuka je bila da se prilikom kreiranja baze zasnovane na analizi STR lokusa uzima minimalni broj od 100 do 150 nesrodnih ispitanika iz analizirane populacije. Kasnije preporuke izmijenjene su na način da sugeriraju da se za manje populacije, kakva je hrvatska, analiziraju i uvrste profili najmanje 200 ispitanika. Svakako, prilikom kreiranja uzorka koji bi trebao biti dovoljno reprezentativan, treba voditi računa o zastupljenosti „predstavnik” svih regionalnih, etničkih i ostalih podgrupa koje postoje unutar ispitivane populacije. Upravo tu često se događaju propusti jer se na temelju populacije jednog ograničenog područja radi procjena za šire područje. Pojednostavljeno rečeno: ako se stvara baza podataka za Republiku Hrvatsku, nije dovoljno prikupiti podatke ispitanika samo iz zagrebačkog ili splitskog ili osječkog ili bilo kojeg drugog područja, već je neophodno prikupiti uzorke iz svih tih područja, poštujući etničku i svaku drugu strukturalnu populacijsku određenost. Populacijske studije koje su do sada provedene na hrvatskoj i susjednim populacijama držale su se navedenih pravila (Šarac *et al.*, 2012, 2014, 2016; Babić Jordamović *et al.*, 2021; Lasić, 2016; Marjanović *et al.*, 2005d; Marjanović *et al.*, 2006a; Marjanović *et al.*, 2006b; Pojskić *et al.*, 2013). Nakon prikupljanja uzoraka, u sljedećim fazama provodi se analiza generiranih DNA profila, utvrđivanje učestalosti pojedinih alelnih varijanti, izračunavanje odabranih statističkih parametara i na kraju korištenje dobivenih podataka u konkretnim izračunima.

Jedan od najpoznatijih časopisa iz područja forenzičke genetike je *Forensic Science International: Genetics*, u kojem je, između ostalog, objavljen značajan dio populacijsko-genetičkih studija. S vremenom su minimalni uvjeti za objavu populacijskih podataka postajali sve stroži, a posljednje upute objavljene su 2017. godine. Prema tom dokumentu, uvedeni su dodatni koraci za kontrolu kvalitete generiranih sekvenci prije prijave rada u časopis. Kada su u pitanju autosomni STR biljezi, minimalan broj uzoraka iz jedne populacije je 500 sudionika analiziranih na najmanje 15 lokusa, dok za X-STR biljege ostaje minimum od 500 uzoraka, ali na minimalno 12 X-STR lokusa. Nove upute posebno su stroge za Y-STR biljege, gdje se traži minimalno 400 uzoraka analiziranih na 23 Y-STR lokusa, osim u slučaju malih populacija koje mogu sadržavati manji broj uzoraka, a u kojem slučaju se analizira više takvih populacija na jednom geografskom području i objavljuje kao jedna studija. Y-SNP podatci prihvaćaju se isključivo uz prethodno spomenuta 23 Y-STR lokusa, kada je minimalni broj uzoraka 300 muških osoba analiziranih za sve ove biljege unutar iste studije.

Nadalje, predviđanje Y haplogrupa moguće je samo pomoću Y-SNP ili kombinacije Y-SNP i Y-STR biljega, ali ne isključivo na temelju Y-STR biljega. Što se mtDNA tiče, minimalan broj uzoraka je 100 za sekvenciranje cjelokupnog mitohondrijskog genoma, odnosno 200 za sekvenciranje isključivo kontrolne regije. Kada su u pitanju ostali SNP ili InDel biljezi, minimalan broj uzoraka je 500, uključujući genotipizaciju minimalno 30 autosomnih SNP ili InDel biljega, odnosno 20 X-SNP ili X-InDel biljega kod muškaraca. Novost su upute za podatke generirane metodama sekvenciranja nove generacije (NGS), koje traže minimalno 50 uzoraka, kao i pune FASTA sekvence i QC dokumente kontrole kvalitete kao dodatne materijale koji moraju biti poslani u časopis zajedno s populacijskim podacima (Gusmão *et al.*, 2017).

Jedan od zanimljivih izazova, koji se mogu javiti prilikom kreiranja baze podataka, jest utvrđivanje granice tzv. rijetkih alelnih frekvencija. Naime, pojavljivanje određene alelne varijante unutar ispitivanoga uzorka samo jednom može pobuditi sumnju da je njeno pojavljivanje nastalo uslijed pogreške prilikom detekcije ili upisivanja alelne varijante. Stoga, postoje različite preporuke za svrstavanje alelne varijante u populacijsku bazu podataka, tj. koliko puta varijanta mora biti detektirana da bi se uvrstila u bazu. Ovaj broj ovisi o veličini i raznolikosti populacije, ali općenito varijante koje se pojavljuju u manje od 1% ili 0,5% slučajeva unutar populacije, smatraju se rijetkima. U tom slučaju, ovisno o kontekstu ili cilju studije, neki autori preporučuju alternativne pristupe izračunavanju alelne frekvencije, kao što je množenje dobivene frekvencije tzv. faktorom korekcije (engl. *correction factor*), kako bi se procijenila prava frekvencija unutar populacije.

Tako je jedna od preporuka da se alelne varijante moraju detektirati najmanje pet puta da bi bile uključene u bazu podataka (Butler, 2005; NRC, 1996, str. 148). To ne znači da se jedna alelna varijanta, koja je detektirana manje od pet puta ne unosi u bazu podataka, nego se njena frekvencija izračunava na osnovi obrasca $5/2N$, gdje je $2N$ ukupni broj kromosoma (na kojem se nalazi ispitivani lokus) obuhvaćen u studiji. Dakle, ako je stvarna frekvencija neke alelne varijante, koja je detektirana samo jednom bila 0,0015, onda njena „forenzičko-populacijska frekvencija” iznosi 0,0075. To svakako može dovesti do male matematičke nelogičnosti u ukupnom izračunu zbroja frekvencija svih alelnih varijanti, koji u tom slučaju prelazi vrijednost 1 (ili 100%), ali ova je logika svjesno „žrtvovana” radi izbjegavanja svih nedoumica prilikom prezentacije rezultata na sudu.

Danas časopisi poput *Forensic Science International: Genetics, Journal of Forensic Science, International Journal of Legal Medicine*, ali i *Croatian Medical Journal*, često objavljuju populacijske podatke. Ovakav pristup omogućava da se usporednom analizom utvrdi postoje li statistički značajne razlike između ispitivanih populacija te da se omogući što preciznije izračunavanje pojedinih forenzičko-genetičkih parametara u širokom spektru analiza. U sklopu takvih članaka,

uz utvrđene alelne varijante, objavljuju se i rezultati pojedinih statističkih analiza kao što su: rezultati Hardy-Weinbergove ravnoteže (na osnovi kojeg se utvrđuje postojanost alela kroz generacije, tj. njihova međusobna neovisnost), populacijsko-genetička usporedba s podacima susjednih populacija (s ciljem potvrđivanja mogućnosti korištenja tih podataka i za ispitanike iz regije), snaga diskriminacije i snaga isključivanja za pojedine lokuse, heterozigotnost (postotak utvrđenih i očekivanih heterozigota na danom bijegu u ispitivanoj populaciji) i slično.

Za računanje indeksa roditeljstva uobičajeno je koristiti učestalosti pretpostavljenih očeva ili majki u nekoj populaciji. Ukoliko pretpostavljeni otac ili majka potječu iz dvije miješane populacije, npr. iz Hrvatske i subsaharske Afrike, tada bi p vrijednost, ukoliko je moguće, trebala predstavljati njihovu prosječnu učestalost. S druge strane, ukoliko je pretpostavljeni roditelj Talijan, a jedina dostupna baza podataka je ona u Republici Hrvatskoj, to ne bi trebalo drastično utjecati na rezultate. Naime, kada se za računanje indeksa roditeljstva koristi više od 10 STR biljega, dolazi i do balansiranja međupopulacijskih razlika. U stvarnosti, gotovo su sve ljudske populacije u određenoj mjeri miješane. Aleli specifični za središnju Aziju, sjevernu Aziju i Afriku mogu se naći i u europskim populacijama zbog gena koje su tijekom povijesti donijeli Mongoli i Avari, kao i zbog migracija afričkih robova. Za takve povijesne događaje nije potrebno raditi nikakve posebne prilagodbe jer će oni biti vidljivi u samom uzorku ispitivane populacije. Ukoliko je osoba koju testiramo turist, npr. iz Portorika, bilo bi vrlo poželjno, ako je moguće, koristiti bazu podataka iz Portorika. Međutim, ukoliko specifična baza podataka nije dostupna, tijekom analize može doći do određene statističke pogreške. Ukoliko je poznata struktura istraživane populacije, može se računati učestalost korištenjem proporcionalno korigirane učestalosti pripadajućih subpopulacija.

S druge strane, bitno je uzeti u obzir i druge faktore koji mogu utjecati na DNA profil osobe tijekom interpretacije testa roditeljstva, npr. migraciju, povijesne događaje, genetsko miješanje (engl. *genetic admixture*). Populacijska genetika, kao što je ranije napomenuto, podrazumijeva uspoređivanje genetskog profila testirane osobe s profilima osoba iz različitih populacija. Na taj način moguće je identificirati genetske biljege, koji su više zastupljeni u nekoj određenoj populaciji, čime se može predvidjeti porijeklo ili etnička pripadnost ispitivane osobe. Ovakav pristup može biti posebno koristan kada su pretpostavljeni roditelj i dijete iz različitih etničkih ili rasnih skupina, ili kada je ispitivana osoba miješanog porijekla.

Kada govorimo o povijesnim događajima koji su mogli utjecati na genetsku strukturu populacije, npr. migracija ili kolonizacija, važno je napomenuti da u slučajevima kada populacija ima povijest miješanja s drugom populacijom, genetski profili osoba iz te populacije mogu biti još raznovrsniji od očekivanoga te je moguće da nije dovoljna samo jedna populacijska baza u svrhu prikazivanja potpunih i reprezentativnih podataka.

Na kraju, neophodno je uzeti u obzir i kvalitetu i potpunost genetskih baza podataka koje se koriste za usporedbu, jer, ukoliko je naprimjer neka baza premalena ili više zastupljena određenim populacijama, preciznost rezultata može biti kompromitirana. Tada je potrebno koristiti više populacijskih baza podataka kako bi se osigurala njihova reprezentativnost u kontekstu populacija koje se uspoređuju (Arenas *et al.*, 2017; Butler *et al.*, 2021; Shewale i Liu, 2013). Upravo iz tih razloga, internetska dostupnost publiciranih populacijskih podataka jedan je od preduvjeta za njihovo objavljivanje u gore navedenim časopisima.

7.5. PRAVILA PRILIKOM TESTIRANJA RODITELJSTVA

Na temelju Mendelovih zakona nasljeđivanja sastavljena su četiri pravila za testiranje roditeljstva:

1. Dijete, osim ako se ne radi o mutaciji, ne može imati alelnu varijantu koja nije prisutna kod jednog od roditelja.
2. Dijete nasljeđuje po jedan alel iz para genetičkih biljega od svakog roditelja.
3. Dijete ne može imati par istih alela, osim u slučaju ako ih oba roditelja imaju.
4. Dijete mora imati alel koji je prisutan kao istovjetan par neovisno kod oba roditelja.

7.6. DOKAZIVANJE OČINSTVA (RODITELJSTVA)

Danas, u suvremeno opremljenim forenzičko-genetičkim laboratorijima utvrđivanje očinstva provodi se kao rutinska metoda zahvaljujući razvoju DNA tehnologije. Osnovna funkcija forenzičkih testova, bez obzira radi li se o dokazivanju roditeljstva, identifikaciji žrtve ili utvrđivanju biološkog porijekla analiziranoga traga jest isključiti što je moguće veći broj pojedinaca kao potencijalne očeve, žrtve ili donore.

Prilikom testiranja roditeljstva, kada su dostupni svi potrebni uzorci (uzorak majke, djeteta i potencijalnog oca), uz pomoć DNA profila majke i djeteta određuje se tzv. obavezni alel (engl. *obligatory allele*) iz DNA profila potencijalnog (pretpostavljenog) oca, odnosno, nosi li pretpostavljeni otac obavezni alel (za potrebe rješavanja takvih slučajeva, očevi koji se testiraju nazivat će se pretpostavljeni očevi). Obavezni alel je onaj alel koji vuče genetičko porijeklo od biološkog oca. Naprimjer, ako pretpostavimo da je majka genotip AA , a dijete AB , onda je djetetov B alel morao poteći od biološkog oca. Bitno je napomenuti da se uvijek pretpostavlja da je majka uistinu majka djeteta, osim ako se pri testiranju pokaže neslaganje s Mendelovim zakonima nasljeđivanja. Ako pretpostavljeni otac ima B alel u obliku homozigota (odnosno, dva B alela) ili u obliku heterozigota (jedan

B alel), on se ne može isključiti. U slučaju da navodni otac nije nositelj B alela, tj. da ga dijete nije moglo od njega naslijediti te ako se isključi mogućnost mutacije na promatranom biljegu, ta osoba može biti isključena. Iznimka navedenog je slučaj kad postoji mogućnost mutacije koja je uvjetovala promjenu „originalnog” očevog alela u alel B . Zbog toga je opće prihvaćeno da se tek u slučaju nepostojanja poklapanja alela na minimalno tri ispitivana biljega u oca, a koji se nalaze kod djeteta (oni koji su determinirani kao obavezi), pretpostavljeni otac automatski isključuje kao biološki otac djeteta. Ako su i majka i dijete genotipa AB , onda su obilgatni aleli A i B te su oba mogla doći od biološkog oca. Očito je da u ovom slučaju postoje dva obavezna alela. Hipotetski, svaki pretpostavljeni otac koji je nositelj A ili B alela ne može biti isključen. Međutim, u slučaju da je navodni otac CC ili bilo koji drugi ne- A i ne- B genotip, može ga se isključiti.

7.6.1. Statistički postupci i dokazivanje očinstva – indeks očinstva ili kombinirani indeks očinstva

U slučajevima kada pretpostavljeni otac ne može biti isključen kao mogući biološki otac, vrijednost dokaza jednaka je relativnoj vjerojatnosti da je pretpostavljeni otac, a ne neki drugi pojedinac iz populacije, prenio obavezni alel na dijete. Relativna vjerojatnost da je pretpostavljeni otac prenio obavezni alel naspram vjerojatnosti da je obavezni alel prenio neki drugi pojedinac iz populacije naziva se *indeks očinstva* (engl. *paternity indeks*, PI). Mendelovi zakoni određuju vjerojatnost ili mogućnost da pretpostavljeni otac može prenijeti alelnu varijantu.

Ako je pretpostavljeni otac homozigot za obavezni alel ili heterozigot koji u slučaju da su majka i dijete također poklapajući heterozigoti, ima oba obavezna alela, onda je vjerojatnost da je on prenio obavezni alel jednaka $1,0$ ($2/2$). Ako pretpostavljeni otac ima samo jednu kopiju obaveznog alela ili ako ima jedan od dva obavezna alela, onda je vjerojatnost da je on prenio obavezni(e) alel(e) jednaka $0,5$ ($1/2$). Vrijednost PI za određeni lokus jednaka je vjerojatnosti da pretpostavljeni otac može prenijeti alel, podijeljenoj s učestalošću obaveznog(ih) alela. Stoga će PI biti ili $1/p$ ili $0,5/p$, ovisno o broju obaveznih alela koje nosi pretpostavljeni otac. U slučaju da su prema genotipovima majke i djeteta određena dva obavezna alela, p će se računati prema formuli $p = p_1 + p_2$, i PI bit će jednak $1/(p_1 + p_2)$ ili $0,5/(p_1 + p_2)$. PI se računa za svaki lokus koji se testira (Tablica 7.1.).

Statistička pravila jasno određuju način analize kada je u pitanju više PI , tj. zajedničke analize rezultata s više molekularnih biljega, kako bi se odredila ukupna vjerojatnost očinstva - radi se izračun kojim se determinira vrijednost za *kombinirani indeks očinstva* (engl. *combined paternity index* ili CPI). Kombinirani indeks očinstva je omjer vjerojatnosti da je pretpostavljeni otac, a ne neki drugi pojedinac, prenio obavezne alele sa svih ispitivanih lokusa. Pravila za izračunavanje

TABLICA 7.1. Formule za računanje indeksa očinstva (detaljnije na www.DNA-view.com).

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)

A, B, C – aleli; a, b, c – učestalost alela A, B, C

CPI-a su jednostavna. Ako želimo saznati kombiniranu vjerojatnost karakteristika A i B i C, potrebno je pomnožiti dobivene vrijednosti za A i B i C. Bez obzira koliko lokusa koristimo za analizu spornoga očinstva, vrijednost kombiniranog indeksa očinstva (CPI) utvrđuje se množenjem svih izračunatih PI vrijednosti, tj. izračunatih indeksa očinstva za svaki od promatranih lokusa.

U početku, kada se koristio relativno mali broj lokusa u ove svrhe, (tri do pet lokusa), vrijednost CPI koja je bila prihvatljiva, npr. za njemačko pravosuđe, bila je 1000, dok je u Sjedinjenim Američkim Državama ta vrijednost mogla biti manja čak i od 100. Danas, pri korištenju npr., 15 STR lokusa zastupljenih u najpoznatijim komercijalnim panelima, koje smo predstavili u prethodnim poglavljima, nije ništa neuobičajeno da se vrijednost CPI u testiranju standardnoga očinstva (majka-dijete-potencijalni otac) kreće u intervalu od nekoliko stotina tisuća pa i nekoliko milijuna, dok je u testiranju bezmajčinskoga očinstva ova vrijednost niža.

Zbog potencijalnih poteškoća s razumijevanjem i interpretacijom omjera vjerojatnosti, predložen je i alternativni način prikazivanja podataka, koji se temelji na pretvaranju omjera vjerojatnosti u vjerojatnost očinstva, kako bi se prikazao stupanj srodnosti između pretpostavljenog oca i djeteta.

7.6.2. Vjerojatnost očinstva (W)

U 18. stoljeću, matematičar Bayes razvio je model kako bi procijenio vjerojatnost da se neki događaj dogodio, čak i onda kada nije moguće izravno izmjeriti taj događaj. Ovo je temelj Bayesove matematike, koja ima široku primjenu, posebice u području kao što je genetičko savjetovanje za procjenu opasnosti od oboljenja djeteta. Bayesova formula za procjenu mogućnosti da se neki događaj dogodi je:

$$\text{Bayesova formula} = \frac{X * p}{X * p + Y * (1 - p)}$$

gdje je X vjerojatnost da će se neki događaj dogoditi, Y je vjerojatnost da se neće dogoditi, p je prethodna vjerojatnost da će se X dogoditi, a 1 – p je prethodna vjerojatnost da se neće dogoditi.

U skladu s tim, Essen-Moller i njegov kolega matematičar Quensel, stvorili su formulu (Essen-Moller formula) za standardne slučajeve testiranja očinstva, koja uključuje potencijalnog oca, majku i dijete, što je omogućilo da serološki fenotipovi budu izraženi numerički i to kao vjerojatnost očinstva.

$$\text{Essen-Moller formula} = W = X / (X + Y),$$

gdje X i Y predstavljaju vjerojatnost očinstva, odnosno ne očinstva (Gjertson *et al.*, 2007).

Ipak, postoji nekoliko ograničenja Bayesove formule. Ona je sveobuhvatna, tj. uključuje sve mogućnosti u svemiru. U slučaju testiranja očinstva, X je kombinirana vjerojatnost da je pretpostavljeni otac prenio sve obavezne alele i sastoji se od rezultata svih 0,5 i 1,0 vrijednosti za svaki lokus, a Y je kombinirana vjerojatnost da je neki netestirani nesrodni pojedinac u populaciji biološki otac i ova vrijednost je umnožak učestalosti svih obaveznih alela – tj. PI. Prethodna vjerojatnost je vjerojatnost da se taj događaj mogao dogoditi bez poznavanja trenutnog rezultata. U ovom slučaju, to je vjerojatnost da je pretpostavljeni otac biološki otac, prije nego što su gotovi laboratorijski rezultati. Postoje različiti načini da se izračuna prethodna vjerojatnost da je pretpostavljeni otac ujedno i biološki otac. Može se pretpostaviti da je to laboratorijska stopa uključenja koja je približno 70-80%. Također može se pretpostaviti da je to zbroj svih muškaraca koji se mogu uzeti u obzir unutar područja gdje se dogodila oplodnja ili točnije, muškaraca u reproduktivnoj dobi iz tog područja. Uobičajeno je pretpostaviti da je ista vjerojatnost da pretpostavljeni otac jest ili nije biološki otac. Ovo je tzv. neutralna prethodna vjerojatnost koja je jednaka vrijednosti 0,5. Neki statističari tvrde da bi se prethodna vjerojatnost trebala računati tako da se željeni rezultat podijeli s ukupnim brojem mogućih rezultata, npr. prethodna vjerojatnost da prilikom bacanja kocke dobijemo jedinicu jednaka je 1/6, dok je početna vjerojatnost da dobijemo glavu prilikom bacanja novčića jednaka 1/2. S obzirom na to da su prilikom testiranja očinstva moguća samo dva nalaza - on jest ili nije biološki otac - početna je vjerojatnost jednaka 1 za dvije mogućnosti ili 0,5, što znači da je moguće da je „neutralna početna vjerojatnost” moguća ispravna početna vjerojatnost. U slučaju da je vrijednost od 0,5 izabrana kao početna vjerojatnost, formula se reducira na onu u kojoj se koristi CPI.

Vjerojatnost očinstva (engl. *probability of paternity*):

$$(p = 0,5) = PP = \left(\frac{1}{1}\right) + \frac{1}{CPI}$$

Kada se ova formula matematički sredi i jednostavnije prikaže, dobije se obrazac:

$$PP = \frac{CPI}{(CPI+1)}$$

Svim znanstvenicima, tužiteljima, sucima i odvjetnicima koji pročitaju ovu formulu bit će jasno zašto nije moguće dobiti rezultat od 100%. Bez obzira koliko veliki broj CPI, uvijek se mora podijeliti s brojem koji je veći od njega za 1 i nikada taj količnik neće moći dati broj jedan, a samim tim u postotnom predstavljanju vjerojatnosti očinstva nikada neće moći dati 100%. Kada se dobije rezultat od recimo 99,999999678998% poprilično je suvišno pitanje koje se, nažalost, često postavlja DNA stručnjaku: jeste li 100% sigurni da je dotična osoba biološki otac djeteta? Vjerojatnost očinstva je vjerojatnost da pretpostavljeni otac može biti stvarni (biološki) otac. Ako je CPI jednak recimo 6 477 698, onda je vjerojatnost da je pretpostavljeni otac biološki otac 0,999999846, ili 99,9999846%. Suprotno tome, vjerojatnost da pretpostavljeni otac nije biološki otac je 0,000000154 ili 0,0000154%.

Logično pitanje koje se može postaviti je koja je najniža vrijednost vjerojatnosti očinstva koje se može u potpunosti prihvatiti. Opća pravila ukazuju na to da je u standardnom testiranju, kada je i majka prisutna, poželjno dobiti najmanje pet znamenki broja 9 nakon decimalnoga zareza, tj. 0,99999 ili kada prikazujemo u postocima, 99,999%. U slučajevima bezmajčinskog očinstva, uslijed gubljenja određenoga dijela informacija ta vjerojatnost može biti nešto niža, ali broj i dalje mora biti veći od 0,9999, tj. 99,99%. Ovako visok postotak vjerojatnosti uvjetovan je primjenom većeg broja molekularnih biljega koji je u današnje vrijeme uglavnom preko 13. Velik broj laboratorija, bez obzira je li utvrđeno poklapanje alelnih varijanti oca sa obaveznim alelima na svim ispitivanim lokusima, u slučaju kada ne dobije ovakve vrijednosti sugerira analizu dodatnih molekularnih biljega.

7.6.3. Neisključenost slučajne osobe u općoj populaciji (random man not excluded ili RMNE)

Indeks očinstva i vjerojatnost očinstva imaju zajedničku pretpostavku s Mendelovom vjerojatnosti da je pretpostavljeni otac ujedno biološki otac djeteta. Postoji i alternativni, danas manje korišteni način analize istoga pitanja. Kako bi se na drugačiji način procijenio isti podatak moguće je zapitati se kolika je količina genetičke informacije prisutna u paru majka-dijete, tj. kolika je mogućnost testa pri prevenciji pogrešnog uključivanja potencijalnog oca. Ovo je slično pojmu „snage testa” u statistici. U idealnoj situaciji test bi trebao biti i snažan i praktičan te bi trebao isključiti sve pretpostavljene očeve koji zapravo nisu biološki očevi.

Snaga testa očinstva može se odrediti pomoću tzv. *neisključenosti slučajne osobe u općoj populaciji* (engl. *random man not excluded, RMNE*). Ovaj statistički test može se usporediti s računanjem učestalosti u populaciji, koji se koristi u forenzičkim identifikacijama i individualizacijama, o kojima će biti više riječi u nastavku ovoga poglavlja. RMNE je udio populacije koji može dati sve obavezne alele te ne može biti isključen. Ovaj se termin koristi kako bi se izrazila učestalost osoba koje ne mogu biti isključene kao mogući davatelji genetičkog materijala.

$$RMNE \text{ za jedan lokus} = p^2 + 2p(1 - p)$$

$$\text{ili, pojednostavljeno: } 1 - (1 - p)^2$$

Kombinirana neisključenost slučajne osobe u općoj populaciji (engl. *combined random man not excluded, CRMNE*) analogna je CPI, tj. jednaka je rezultatu pojedinačnih vrijednosti. Vrijednost CRMNE obično je vrlo niska. Ipak, u praksi je jednostavnije upotrebljavati recipročnu vrijednost izraza $(1 - CRMNE)$, za koju se obično koristi termin vjerojatnost isključenja. Međutim, budući da je moguće pomiješati termin „vjerojatnost isključenja” s terminom „vjerojatnost očinstva”, mnogo se češće koristi manje zbunjujući termin „snaga isključenja” (engl. *exclusionary power, EP ili power of exclusion, PE*), što je vjerojatnost isključenja lažno optuženog muškarca $(1 - RMNE)$. U slučaju da se koristi *a priori* vjerojatnost 0,5, PE je jednak Bayesovoj vjerojatnosti očinstva u tzv. modelu neisključenja. Kako bi se izbjeglo miješanje s terminom „vjerojatnost očinstva”, koji proizlazi iz modela nasljeđivanja, treba koristiti termin „neisključena vjerojatnost očinstva” ili Weine-rova vjerojatnost očinstva po znanstveniku koji je prvi predložio taj termin 1976. godine (Weiner, 1976). Termin neisključena vjerojatnost očinstva ima određene prednosti u odnosu na standardnu vjerojatnost očinstva (Li i Chakravarti, 1988). Najveća prednost jest da se ona uvijek povećava s povećanjem broja izvršenih testiranja i potpuno je analogna terminu populacijske učestalosti koji se koristi u forenzičkim analizama. Ipak, zbog lakšeg prezentiranja dobivenih rezultata, u praksi se daje prednost standardnom pristupu utvrđivanja parametara PI i CPI.

Tablica 7.1. prikazuje opće obrasce koji se koriste u utvrđivanju očinstva, dok tablica 7.2. prikazuje konkretan primjer utvrđivanja. Prva kolona u tablici 7.2. prikazuje analizirani STR lokus, druga i treća prikazuju genotipove majke i djeteta za svaki analizirani lokus, četvrta sve obavezne alele kod pretpostavljenog oca, dok peta prikazuje genotipove pretpostavljenog oca za sve analizirane lokuse. Kolona „p” predstavlja učestalost (frekvenciju) svakog pojedinog alela koja je u ovdje temeljena na rezultatima konkretne populacijske studije (Projić *et al.*, 2007). RMNE računa se po prije navedenoj formuli. „X” predstavlja vjerojatnost da pretpostavljeni otac (engl. *alleged father*) može prenijeti obavezni alel, a određuje se prema očevom tipu alela. SI se računa kao X/p . Iz zajedničkih vrijednosti

prikazanih u donjem dijelu tablice, vidljivo je da je vjerojatnost navodnog oca skoro 790 milijuna puta veća od nekog drugog nesrodnog muškarca u uzorku ispitivane populacije. Ta se vrijednost označava kao vjerojatnost od 99,99999987% utvrđenog očinstva. RMNE pokazuje da vjerojatnost da se isključi krivo optuženi otac iznosi 99,99999973%. Stoga je, vjerojatnost utvrđivanja očinstva temeljena na prijenosu alela približna vjerojatnosti temeljenoj na metodi neisključivanja.

TABLICA 7.2. Primjer potpunog utvrđivanja očinstva.

STR lokusi	Majka	Dijete	Obavezni alel	Pretpostavljeni otac	p(Y)	RMNE	X	PI
D8S1179	13 14	11 13	11	11 13	0,0564	0,1096	0,5	8,8652
D21S11	30 32.2	31 32.2	31	30.2 31	0,0590	0,1145	0,5	8,4746
D7S820	10 12	9 10	9	9 9	0,1795	0,3268	1	5,5710
CSF1P0	12 12	10 12	10	10 12	0,2538	0,4432	0,5	1,9701
D3S1358	15 15	15 18	18	15 18	0,1487	0,2753	0,5	3,3625
TH01	6 9.3	6 8	8	6 8	0,1308	0,2445	0,5	3,8226
D13S317	8 10	10 11	11	11 11	0,3308	0,5522	1	3,0230
D16S539	9 11	11 13	13	9 13	0,1718	0,3141	0,5	2,9104
D2S1338	17 18	17 23	23	23 25	0,1026	0,1947	0,5	4,8733
D19S433	14.2 16	13 16	13	12 13	0,2128	0,3803	0,5	2,3496
vWA	15 16	16 17	17	17 17	0,2256	0,4003	1	4,4326
TPOX	8 9	9 9	9	8 9	0,0846	0,1620	0,5	5,9102
D18S51	16 17	15 17	15	14 15	0,1359	0,2533	0,5	3,6792
D5S818	11 12	11 11	11	11 12	0,3256	0,5452	0,5	1,5356
FGA	20 21	20 25	25	20 25	0,1000	0,1900	0,5	5,0000
Amelogenin	X X	X Y		X Y				
Zajednički (combined)						$2,67 \times 10^{-9}$		790 169 857
Snaga isključivanja						99,9999997%		
Vjerojatnost (likelihood)	1-CRMNE					374 531 835		
Vjerojatnost očinstva	CPI/(CPI+1)					99,99999973%		99,9999 9987%

p(Y) – učestalost alela za svaki pojedini alel ili obavezni alel temeljen na hrvatskoj bazi podataka (Projić et al., 2007)

RMNE – neisključenost slučajno odabrane osobe iz opće populacije

X – vjerojatnost da pretpostavljeni otac može prenijeti obavezni alel

PI – indeks očinstva

7.6.4. Bezmajčinsko testiranje očinstva

Povremeno je potrebno utvrditi očinstvo, a da majka nije dostupna za analizu. Ovakav test označava se kao bezmajčinski ili deficijentni test (engl. *deficient test*) jer nisu prisutne sve strane. U tom slučaju dolazi do značajnog gubitka informacija. Formula koja se koristi za računanje učestalosti mogućih očeva u datoj populaciji je sljedeća:

$$RMNE = p^2 + q^2 + 2pq + 2p(1 - p - q) + 2q(1 - p - q) = (p + q)^2 + 2(p + q)(1 - p - q)$$

Sukladno tome i PI različito se računa. Ukoliko majka nedostaje, koristi se posebna formula za svaki pojedinačni fenotip navodnog roditelja. Formule preuzete od Brennera (Brenner, 1993) i dodatno proširene, na osnovi podataka s www.DNA-view.com¹, prikazane su u tablici 7.3. Da bi se pokazao gubitak informacija, kao i razlike u rezultatima, slučaj utvrđivanja očinstva prikazan u tablici 7.1. ponovo je računat bez podataka o majci korištenjem tome primjerenih formula, a rezultati su prikazani u tablici 7.4. Prvo što se može zamijetiti jest da snaga isključivanja pada približno 20 525 puta, dok CPI pada svega oko 760 puta, što dovoljno slikovito ukazuje na razlike između dviju metoda za računanje vjerojatnosti utvrđivanja roditeljstva. Znatno manji gubitak informacija u slučajevima, koji bitno dobiva na značaju s povećanjem broja molekularnih biljega koji se koriste u analizi, jedan je od najvažnijih razloga što se mnogo češće koristi CPI od RMNE pristupa. Uz to, kako smo već i naveli, prednost ovoga pristupa je izuzetno jednostavna prezentacija rezultata koja se, zbog izbjegavanja kompliciranih statističkih pojašnjenja na sudu, lako može u potpunosti jasno prezentirati i pojasniti čak i osobama koje nemaju veliko znanje iz populacijske genetike i statistike.

Jedno od otvorenih, ali jako važnih pitanja, jest i potencijalno pojavljivanje mutacija koje uvjetuju da na jednom, a ponekad čak i na dva molekularna biljega, dolazi do nepoklapanja DNA profila pretpostavljenog oca s utvrđenim kompletom obaveznih alela. To ukazuje na činjenicu da ako je od npr. testiranih 15 molekularnih biljega na jednom od njih opaženo nepoklapanje alelnih varijanti, očinstvo/majčinstvo se ne može automatski odbaciti. Tada se primjenjuju nešto kompliciraniji statistički obrasci koji uzimaju u obzir učestalost pojavljivanja mutacija na konkretnom lokusu, tj. u slučaju kada se radi o *one-step* mutaciji, procjena indeksa očinstva izračunava se po obrascu $X/Y = \mu / (4P(q))$, a za slučaj *two-step* mutacije koristi se obrazac $X/Y = \mu / (40P(q))$, gdje je μ stopa mutacije utvrđena za dati lokus (izražava se u formi mutacija/broj mejoza), a $P(q)$ frekvencija alela koja se javlja kod djeteta za koji se pretpostavlja da je rezultat navedenih mutacija

¹ www.DNA-view.com, pristup 12.5.2024.

TABLICA 7.3. Formule za računanje indeksa očinstva u odsustvu majke (detaljnije na www.DNA-view.com).

Aleli djeteta	Aleli testiranoga roditelja	PI
AA	AA	1/a
AB	AA	1/2a
AA	AB	1/2a
AB	AB	(a+b)/4ab
AB	AC	1/4a

A, B, C – aleli; a, b, c – učestalost alela A, B, C

TABLICA 7.4. Primjer bezmajčinskog utvrđivanja očinstva.

STR lokusi	Dijete	Pretpostavljeni otac	Zajednički aleli	p(Y)	RMNE	PI
D8S1179	11 13	11 13	11 13	0,0564 0,3487	0,6461	5,1496
D21S11	31 32.2	30.2 31	31	0,0590 0,1128	0,3141	4,2373
D7S820	9 10	9 9	9	0,1795 0,2590	0,6847	2,7855
CSF1P0	10 12	10 12	10 12	0,2538 0,3538	0,8460	1,6916
D3S1358	15 18	15 18	15 18	0,1487 0,2538	0,6430	2,6663
TH01	6 8	6 8	6 8	0,1308 0,2641	0,6338	2,8580
D13S317	10 11	11 11	11	0,3308 0,0615	0,6307	1,5115
D16S539	11 13	9 13	13	0,1718 0,2795	0,6990	1,4552
D2S1338	17 23	23 25	23	0,1026 0,2154	0,5348	2,4366
D19S433	13 16	12 13	13	0,2128 0,0641	0,4772	1,1748
vWA	16 17	17 17	17	0,2256 0,2205	0,6932	2,2163
TPOX	9 9	8 9	9	0,0846 0,0846	0,3097	5,9102

D18S51	15 17	14 15	15	0,1359 0,0897	0,4003	1,8396
D5S818	11 11	11 12	11	0,3256 0,3256	0,8784	1,5356
FGA	20 25	20 25	20 25	0,1000 0,1231	0,3965	2,5000
Amelogenin	X Y	X Y				
Zajednički (combined)					1,61 × 10 ⁻⁴	826 693
Snaga isključivanja	1-CRMNE				99,9839%	
Vjerojatnost (likelihood)	1-CRMNE				6170	
Vjerojatnost očinstva	CPI/ (CPI+1)				99,983795%	99,9997808%

p(Y) – učestalost alela za svaki pojedini alel ili obavezni alel temeljen na hrvatskoj bazi podataka (Projić et al., 2007)

RMNE – neisključenost slučajno odabrane osobe iz opće populacije

PI – indeks očinstva

(www.DNA-view.com). Neki, preferiraju pristup korištenja prosječne stope mutacija po sustavu ($X/Y = \mu m$), kako bi se izbjeglo korištenje konkretne stope mutacija (Gjertson *et al.*, 2007). Drugim riječima, računaju se prosječne stope mutacija iz različitih genetskih sustava ili STR lokusa umjesto konkretne stope mutacija za svaki pojedinačni lokus. Tako se dobiva općenita procjena mogućnosti očinstva. Ovaj pristup praktičan je kad majčina DNA nije dostupna za analizu, no treba uzeti u obzir da korištenjem prosječne stope gubimo još više informacija nego korištenjem mutacijskih stopa koje su specifične za određeni lokus. O ovom i mnogim drugim statističkim analizama više se može saznati na www.DNA-view.com.

Nakon toga računa se vjerojatnost očinstva koja, prema iskustvu najvećega broja laboratorija, u slučajevima standardnoga testiranja očinstva treba prelaziti vrijednost od 99,999%, dok u slučajevima bezmajčinskoga testiranja očinstva treba prelaziti 99,99%. U slučajevima kada se to ne dogodi, a postoji vjerojatnost da se radi o mutacijama uobičajeno je zatražiti dodatno testiranje na Y- ili X- (ovisno o spolu djeteta) vezanim biljezima. Važno je napomenuti da se s povećanjem broja biljega koji se koriste u ovim analizama povećava i vjerojatnost da se neka od mutacija na njima utvrdi. Ipak, ovakvi slučajevi nisu previše česti te ih u različitim državama različito tretiraju. U većini dovoljna su minimalno tri takva nepoklapanja da se testirana osoba automatski isključi kao biološki roditelj djeteta (engl. *two exclusion rule*; Butler, 2005).

7.6.5. Utvrđivanje majčinstva

Ponekad se postavlja pitanje tko je majka napuštenog ili preminulog djeteta. U ovom slučaju, za razliku od utvrđivanja očinstva, nema saznanja o roditeljima djeteta. Stoga je, kao kod drugih forenzičkih dokaza, genetički profil djeteta dokaz sam za sebe. Ukoliko je dijete na određenom lokusu heterozigot, tada postoje dva obavezna alela. No, kada je dijete homozigot, postoji samo jedan obavezni alel.

Formula koja se koristi za računanje RFNE, što označava pojam „neisključenost slučajno odabrane žene iz opće populacije” (engl. *random female not excluded, RFNE*), ista je kao ona za računanje RMNE ukoliko nema informacija o majci. Majka se isključuje iz daljnje analize ukoliko nema niti jedan od dva alela koje ima dijete. No, majka se ne može isključiti ukoliko ima samo jedan od dva djetetova alela. Ukoliko se ovaj rezultat pokaže za sve lokuse, pretpostavljena se majka ne može isključiti. Kombinirana neisključenost slučajno odabrane žene iz opće populacije (engl. *combined random female not excluded, CRFNE*) rezultat je svih pojedinačnih RFNE i prikazuje postotak žena u populaciji koje ne mogu biti nasumično isključene ili mogu biti lažno uključene. Suprotno je $1/CRMNE$ koji prikazuje broj žena koje moraju biti testirane kako bi se došlo do poklapajućeg rezultata. $1/CRMNE$ ujedno je i Bayesova vjerojatnost utvrđivanja majčinstva.

Nasuprot tome, moguće je izračunati indeks majčinstva temeljen na prijenosu alela, slično kao prije prikazan PI te ga pretvoriti ga u Bayesovu vjerojatnost. Dakle, u slučaju nedostatka informacija o ocu, indeks majčinstva se računa po formulama prikazanim u tablici 7.4. Princip je u potpunosti identičan principu bezmajčinskog testiranja očinstva, samo se utvrđene alelne varijante u djetetovom DNA profilu uspoređuju s alelnim varijantama u DNA profilu pretpostavljene majke djeteta.

7.6.6. Utvrđivanje roditeljstva nasuprot forenzičkoj analizi DNA

U utvrđivanju roditeljstva, učestalost mogućih roditelja određena je učestalošću RMNE ili populacijom mogućih davatelja alela. U forenzičkoj individualizaciji, odgovarajuća populacijska statistika učestalost je mogućih davatelja fenotipova (genotipova). U tablici 7.5. prikazana je usporedba rezultata utvrđivanja roditeljstva ($RMNE = (p + q)^2 + 2(p + q)(1 - p - q)$) i rezultata forenzičke individualizacije ($2pq$). U tom je slučaju populacija davatelja (RMNE) približno sedam puta veća od učestalosti dobivene forenzičkom individualizacijom. Dakle, na jednom je lokusu gotovo čitav red veličine razlike između dva načina statističke analize. Procjene u tablici 7.5. temelje se na heterozigotnom fenotipu. Da su rezultati homozigotni za procjenu Hardy-Weinbergove ravnoteže služio bi p^2 , pod pretpostavkom da nema značajnog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže uslijed substruktu-

TABLICA 7.5. Usporedba računanja populacijskih frekvencija u slučaju utvrđivanja očinstva nasuprot forenzičkim individualizacijama na lokusu.

	RMNE (očinstvo)	Forenzički dokazi
Alel	15 17	15 17
Učestalost	$(p + q)^2 + 2(p + q)(1 - p - q)$	$2pq$
	0,6751	0,0909
$p = f(15) = 0,2425, q = f(17) = 0,1875$		

riranja populacije ili nekih drugih događaja. U SAD-u, National Research Council (NRC) preporučuje da se substrukturirajuća korekcija dodaje svim populacijama kako bi se očuvala, pa čak i onima kod kojih substrukturiranje nije primijećeno. U tom slučaju, za procjenu Hardy-Weinbergove ravnoteže koristi se $p^2 + p(1 - p) * (0,01)$. Na primjeru u tablici 7-5, ukoliko se radi o materijalu D3S1358 15, 15, procjena za Hardy-Weinbergovu ravnotežu uz korekciju bila bi $0,2425^2 + 0,2425 * 0,7575 * 0,01 = 0,0606$. No kako je već navedeno, ova se korekcija rjeđe koristi u relativno malim i nestrukturiranim populacijama.

Vidljivo je kako je mnogo lakše individualizirati pojedini dokaz nego roditelja. Posljednji je korak objediniti sve individualne mjere kako bi se dobila učestalost multi-genotipske vrste ili profila. To se postiže množenjem učestalosti genotipa svakog pojedinog lokusa.

7.7. FORENZIČKA INDIVIDUALIZACIJA

U forenzičkoj individualizaciji mogu se koristiti dva generalna pristupa u izvještavanju rezultata. Prvi podrazumijeva izvještavanje rezultata u formi prikazivanja vjerojatnosti slučajnog podudaranja (engl. *random match probability, RMP*) utvrđenoga DNA profila u konkretnoj populaciji (Butler, 2005). Tako se u krajnjoj formulaciji može pojaviti podatak da je frekvencija ustanovljenoga DNA profila unutar hrvatske populacije, npr. $1,33 \times 10^{-9}$. Ovakva formulacija jasno i uistinu precizno može prezentirati rezultate u matematičkom smislu.

Međutim, na sudovima se puno češće koristi pojam indeksa vjerodostojnosti (engl. *likelihood ratio, LR*), koji uspoređuje vjerojatnost rezultata DNA vještačenja pod dvjema hipotezama. Ove dvije hipoteze međusobno se isključuju i one su u forenzičkoj analizi DNA uglavnom sljedeće:

- H_1 – Hipoteza tužitelja (biološki materijal u spornom tragu je od osumnjičenog ili pretpostavljenog oca u slučaju testiranja očinstva);

- H_0 – Hipoteza obrane (donori biološkog materijala u spornom tragu osobe su nevezane za osumnjičenog, odnosno, biološki materijal dolazi od nesrodnog pojedinca i svako podudaranje s osumnjičenim ili pretpostavljenim ocem je slučajno).

LR vrijednost koja je veća od 1 ide u prilog H_1 , odnosno, ukazuje na to da je veća vjerojatnost da biološki trag dolazi od osumnjičenog. LR vrijednost koja je manja od 1 ide u prilog H_0 , odnosno, ukazuje na to da je veća vjerojatnost da biološki trag ne dolazi od osumnjičenog. Na taj se način uspoređuje najčešće stav optužbe (trag dolazi od osumnjičenog) čija vjerojatnost iznosi 1 i stav obrane (trag dolazi

TABLICA 7.6. Primjer forenzičke individualizacije spornog traga krvi analizom 15 STR lokusa.

STR lokus	Pretpostavljeni otac	Sporni trag krvi	p	q	Formula	RMP
D3S1358	16 18	16 18	0,265	0,155	2pq	2pq
TH01	6 9,3	6 9,3	0,225	0,330	2pq	2pq
D21S11	28 32,2	28 32,2	0,165	0,085	2pq	2pq
D18S51	12 17	12 17	0,080	0,100	2pq	2pq
Penta E	7 13	7 13	0,190	0,155	2pq	2pq
D5S818	12 12	12 12	0,340	---	p ²	p ²
D13S317	12 13	12 13	0,270	0,075	2pq	2pq
D7S820	10 11	10 11	0,290	0,185	2pq	2pq
D16S539	11 12	11 12	0,340	0,280	2pq	2pq
CSF1P0	11 12	11 12	0,245	0,345	2pq	2pq
Penta D	9 9	9 9	0,245	---	p ²	p ²
vWA	16 19	16 19	0,205	0,065	2pq	2pq
D8S1179	12 15	12 15	0,165	0,080	2pq	2pq
TPOX	8 8	8 8	0,570	---	p ²	p ²
FGA	21 22	21 22	0,155	0,190	2pq	2pq
Amelogenin	XY	X Y	////	////	////	////
RMP						6,9598 x 10 ⁻¹⁸
LR, (1/RMP)						143 681 443 246 475 686

* p , q - frekvencije alelnih varijanti u hrvatskoj populaciji

od nekoga drugoga), čija vjerojatnost za homozigota iznosi p^2 , a za heterozigota $2pq$ (Butler, 2005). Tako se primjerice dolazi do obrasca da je za jedan heterozigotni lokus, $LR = 1/2pq$. Na kraju, u slučaju poklapanja DNA profila pronađenog traga i ispitivane osobe, dobije se formulacija da je 751 879 699 puta vjerojatnije da taj trag potiče od ispitivane osobe nego od neke druge nesrodne osobe iz iste populacije. U tablici 7.6. prikazano je utvrđivanje vjerojatnosti da sporni trag krvi pripada ispitanom osumnjičenom osobi. Rezultat je pokazao da RMP iznosi $6,9598 \times 10^{-18}$, dok LR iznosi oko 143 681 443 milijarde, što daleko premašuje ukupan broj svih ljudi koji žive na planeti Zemlji. Taj podatak govori dovoljno o snazi ovoga dokaza.

Kako je već navedeno u pojedinim znanstvenim krugovima, prvenstveno u SAD-u, s ciljem izbjegavanja značajnog smanjenja RMP-a koje proizlazi iz strukture populacije iz koje dolazi ispitanik i formule p^2 , odlučili su koristiti korektivnu formulu $p_i^2 + \theta * p_i * (1 - p_i)$, koja predstavlja korekciju zasnovanu na substrukturnom riranju populacije, gdje θ za velike populacije iznosi 0,01, dok za manje (endogamnije) populacije iznosi 0,03.

7.8. STATISTIČKA ANALIZA MIJEŠANIH I LCN TRAGOVA

7.8.1. Statistička analiza miješanih tragova

Pojavljivanje i osnovne karakteristike miješanih tragova (smjese bioloških tragova) detaljno su elaborirane u četvrtom poglavlju. Što se pak statističke obrade podataka tiče, ona je znatno kompleksnija od analize i individualizacije pojedinačnih DNA profila. Moguće je razlikovati dva osnovna tipa miješanih tragova. Prvi, izuzetno čest u slučajevima silovanja jest kada je barem jedna osoba (žrtva) poznata kao kontributor i drugi (npr. kod kontaktnih tragova), kada su svi kontributori nepoznati. U prvom slučaju postoji više polaznih informacija koje u određenoj mjeri mogu olakšati i samu analizu.

Sa stanovišta statističkoga pristupa, svi miješani tragovi mogu se podijeliti u tri klase (Curran i Buckleton, 2010). U klasu A ubrajaju se oni miješani tragovi u kojima su svi DNA profili jasno i intenzivno zastupljeni, tj. svi kontributori u biološkom tragu zastupljeni su u relativno velikim količinama prisutne DNA. U tim slučajevima preporučuje se upotreba RMP modela koji se zasniva na kombinaciji HWE procjene svih mogućih genotipova. Ako se radi o primjeru lokusa D8S1179 i utvrđenim alelima 9, 10, 13 i 14 na njemu, onda odgovarajući RMP pristup izgleda ovako:

$$2 * 9,10 + 2 * 9,13 + 2 * 9,14 + 2 * 10,13 + 2 * 10,14 + 2 * 13,14 + 9^2 + 10^2 + 13^2 + 14^2.$$

Kada se izračuna RMP za svaki lokus, onda se pristupa izračunavanju ukupnog RMP-a (CRMP) za cijeli profil jednostavnim množenjem pojedinačnih RMP-ova.

Klasa B može se opisati kao miješani trag gdje dominirajući pikovi predstavljaju jače zastupljenu frakciju u miješanom tragu, dok manji, slabiji pikovi predstavljaju slabije zastupljenu frakciju u miješanome tragu. U tom slučaju, smjesa se dijeli u dvije frakcije i to B1 (jače zastupljenih) i B2 (slabije zastupljenih) DNA profila. U skupini B2 mora se uzeti u obzir i postojanje stohastičkih pikova koji dodatno kompliciraju analizu ovog traga. Za B1 klasu preporučuje se RMP pristup. S druge strane, za B2 klasu nema jasnoga modela i većina znanstvenika prihvaća formulaciju da, ako se primijeti većina alela osumnjičenoga u B2 klasi, ispitivanu se osobu ne može sa sigurnošću isključiti kao kontributora smjese.

Klasa C, kako se može pretpostaviti, predstavlja smjese gdje su svi kontributori izuzetno slabo zastupljeni. U DNA profilima ovih tragova izuzetno su česti stohastički pikovi, kao i kod svih LCN tragova te sa stoga u analizi ovih tragova sugerira neprovođenje statističke analize.

7.8.2. Statistička analiza LCN tragova

U statističkoj analizi LCN tragova otežavajuću okolnost, kako je već navedeno u četvrtom poglavlju, predstavljaju različiti stohastički pikovi. Stoga se u statističkoj analizi ovih rezultata mora pristupiti modificiranom analitičkom pristupu kao za smjesu tragova, gdje se vodi računa i o pojavljivanju stohastičkih pikova koji daju određenu nedefiniranost i nesigurnost u interpretaciji rezultata. Prema jednom od predloženih modela, uvodi se postojanje tzv. Z fenotipa (jer priroda

TABLICA 7.7. Usporedba RMP vrijednosti za kompletne i LCN profile (model preuzet iz Caragine et al., 2009).

Lokus	Genotip	p_i	p_j	HWE	RMP	LCN	LR	RMP
D13S317	11,12	0,379	0,238	$2p_i p_j$	0,180	11,Z	$2p_i$	0,757
D16S539	11,12	0,332	0,272	$2p_i p_j$	0,181	11,Z	$2p_i$	0,663
D8S1179	10,15	0,073	0,136	$2p_i p_j$	0,020	10,15	$2p_i p_j$	0,020
CSF1PO	10,12	0,223	0,356	$2p_i p_j$	0,159	10,Z	$2p_i$	0,446
D21S11	30,30	0,214	---	p_i^2	0,046	30,30	p_i^2	0,046
D7S820	8,10	0,178	0,223	$2p_i p_j$	0,079	10,Z	$2p_i$	0,446
					$3,70 \cdot 10^{-07}$			$9,00 \cdot 10^{-05}$

alela koja ga predstavlja nije sigurna, tj. ne zna se postoje li aleli stvarno ili su stohastički efekti). Ako se frekvencija Z fenotipa označava kao $2p_i$, onda se dolazi do RMP obrasca za LCN profile:

$$RMP = \Pi p_i^2 * \Pi 2 * p_i * p_j * \Pi 2 p_i,$$

gdje su Πp_i^2 proizvod homozigota, $\Pi 2 * p_i * p_j$ proizvod heterozigota, a $\Pi 2 p_i$ - proizvod fenotipa Z (Caragine et al., 2009).

Iz tablice 7.7. vidi se da je LCN RMP je $9,0 \times 10^{-5}$, dok je RMP profila $3,7 \times 10^{-7}$, što jasno indicira gubljenje na vrijednosti RMP-a kod LCN profila.

7.9. STATISTIČKO UTVRĐIVANJE BIOLOŠKOGA SRODSTVA

Primjenom forenzičke analize DNA, uz utvrđivanje roditeljstva, moguće je potencijalno utvrditi i druge stupnjeve srodnosti kao što su srodstvo u prvoj generaciji (brat, sestra, polubrat i polusestra), drugoj (rođaci, stričevi, ujaci...), pa čak i trećoj generaciji (unuci, djedovi, bake...). Izračunate vrijednosti LR-a nisu tako upečatljive kao PI i CPI indeksi, ali svakako mogu ukazati na potencijalnu srodnost ispitanika. Također, statistički izrazi nešto se razlikuju, ali su i dalje primarno zasnovani na učestalosti zajedničkih alelnih varijanti (Tablica 7.8.). Ovaj koncept izuzetno je važan u procesu identifikacije žrtava i njegovu bit predstavlja traženje odgovora na pitanje koliko je puta vjerojatnije da su ispitivane osobe srodne u odnosu na mogućnost da se radi o dvije slučajno izabrane nesrodne osobe iz lokalne populacije (Butler, 2023).

TABLICA 7.8. Formule za izračunavanje LR-a u ispitivanju srodstva potencijalne braće i sestara te polubraće i polusestara. Konačni LR izračunava se tako da se u slučaju npr. ispitivanja mogućnosti da dvije osobe imaju oba zajednička roditelja u odnosu na vjerojatnost da nemaju koristi obrazac A:C. U slučaju da se ispituje imaju li dvije osobe jednog zajedničkog roditelja u odnosu na mogućnost da nemaju koristi se obrazac B:C (formule preuzete sa www.DNA-view.com).

Kombinacija alela na promatranom lokusu	A:B:C
Djeca dijele dva alela u heterozigotu (oba pq)	$(1+p+q+2pq) : (p+q+4pq) : 8pq$
Djeca dijele dva alela u homozigotu (oba pp)	$(1+p)^2 : 2p(1+p) : (2p)^2$
Djeca dijele jedan alel (pp i pq)	$(1+p) : (1+2p) : 4p$
Djeca dijele jedan alel, oba heterozigoti (pr i pq)	$(1+2p) : (1+4p) : 8p$
Djeca ne dijele alele (pp i pq , odnosno rs ili rr)	1 : 2 : 4

7.10. IDENTIFIKACIJA ŽRTAVA MASOVNIH KATASTROFA

Statistička analiza dobivenih rezultata u procesu DNA identifikacije žrtava masovnih katastrofa (ratova, avionskih nesreća, elementarnih nepogoda i sl.) nešto je drugačija u odnosu na standardno testiranje srodstva (Prinz *et al.*, 2007). U biti preporučuju se standardni statistički obrasci, kao što su izračuni indeksa, koji se koriste u testiranju roditeljstva i srodstva ili LR ako postoji ranije utvrđen DNA profil žrtve. Neophodno je koristiti bazu podataka iz one populacije kojoj su žrtve pripadale, uvažavajući njeno „populacijsko porijeklo”. Međutim, posebno u slučajevima kada je analiza DNA jedini pristup kojim se može ostvariti identifikacija, neophodno je postaviti tzv. „donju statističku granicu identifikacije” (engl. *minimal statistical threshold for DNA identification*). Taj parametar ovisi o ukupnom očekivanom broju žrtava, ali i očekivanoj pogrešci u procesu identifikacije nastaloj zbog drugih faktora. Stoga se uvode dva pojma: pre-slučajnost (engl. *prior odds*) i post-slučajnost (engl. *posterior odds*), tj. apriorna i posteriorna slučajnost. Preporuka Internacionalnog udruženja forenzičkih genetičara (engl. *International Society for Forensic Genetics – ISFG*) je da, ako se želi doseći željena post-vjerojatnost (koja se izračunava iz post-slučajnosti) od 99.9% u incidentu s 1000 žrtava, direktno poklapanje mora biti u rangu jedan na milijun. Za testiranje srodstva također se postavlja donja granica vjerojatnosti na 99.9% na osnovu utvrđenog LR-a. Stoga je jako važno da se u slučajevima testiranja srodstva testira što je više moguće potencijalnih srodnika. U okviru ovakvih identifikacija često se koristi simultano više testova (autosomni, Y-vezani, mitohondrijski). Biostatistička procjena ovih rezultata izražava se u formi LR-a i dozvoljena je određena kombinacija pojedinačno dobivenih rezultata u svrhu kreiranja kombiniranog LR-a i izračuna post-vjerojatnosti.

7.11. STATISTIČKA PRAVILA U ANALIZI SPOLNO VEZANIH BILJEGA

7.11.1. Prezentacija rezultata dobivenih upotrebom Y-STR sustava

Kako je već navedeno, molekularni biljezi smješteni na kromosomu Y uz svoj znanstveni značaj u populacijskoj genetici mogu dati iznimno bitne rezultate i u primijenjenoj forenzičkoj genetici. Njihova primjena naišla je na veliko odobravanje i prihvaćanje šire forenzičke javnosti. Ipak, jedan od otežavajućih parametara njihove primjene u području forenzičke genetike je statističko prikazivanje ostvarenih rezultata. Naime, ovi biljezi mogu poslužiti tzv. djelomičnoj identifikaciji i individualizaciji, uslijed svoje prirode nasljeđivanja isključivo muškom linijom i visokog stupnja konzerviranosti. U odsustvu mutacije, Y-STR profil identičan je po muškoj liniji kroz generacije, tj. s oca se identično nasljeđuje

na sve sinove, sa sinova na njihovu mušku djecu itd. Upravo ta karakteristika predstavlja osnovno ograničenje upotrebe ovih biljega na sudu.

Najšire prihvaćena metoda prikazivanja rezultata je određivanje učestalosti utvrđenog haplotipa unutar konkretne populacije. Unutar forenzičko-genetičke zajednice utvrđen je tzv. minimalni haplotip (minHt) koji se sastoji od sedam single-copy Y-STR lokusa i jednog multi-copy lokusa, no danas se koriste sustavi sa znatno povećanim brojem Y-STR lokusa, npr. PowerPlex® Y i PowerPlex® Y23 (Promega Corporation) s 12, odnosno 23 lokusa, Yfiler™ i Yfiler™ Plus (Applied Biosystems) sa 17, odnosno 27 lokusa i Investigator Argus Y-12 QS i Y-28 QS Kitovi (Qiagen) sa 17, odnosno 27 lokusa (Butler, 2023; Ferreira-Silva *et al.*, 2018).

U slučaju kada se Y-STR profili ispitivanih tragova ne poklapaju, može se zaključiti da oni ne potječu od istog traga te tada statistički prikaz najčešće nije potreban, no u situacijama kada se Y-STR profili tragova poklapaju, onda se preporučuje korištenje podataka iz najveće svjetske online Y baze podataka www.yhrd.org (Willuweit *et al.*, 2007), koja je npr. u zadnjoj verziji ovoga poglavlja (na dan 29.8.2023.) imala 349 750 haplotipa. Najjednostavniji pristup je unošenje utvrđenog haplotipa u bazu podataka i određivanje njegove učestalosti u svjetskoj i lokalnoj populaciji na osnovi formule $p = X/N$ (engl. *counting method*), gdje je p učestalost haplotipa, X ukupan broj ponavljanja analiziranog haplotipa u populaciji, a N ukupan broj svih pohranjenih haplotipova, tj. pojedinaca u datoj populacijskoj bazi (Butler, 2005). Statistički korektniji pristup jest kada se uzima u obzir činjenica da se u bazi podataka nalazi samo određeni uzorak promatrane populacije i kada se navedena formula korigira u oblik $p = X/N + 1,96[(p)(1-p)/N]^{1/2}$. Primjera radi, ako se neki haplotip pojavljuje samo pet puta u YHRD bazi podataka, njegova očekivana učestalost u svjetskoj populaciji iznosila bi $p = 5/51253 + 1,96[(5/51253)(1-5/51253)/51253]^{1/2}$, što je 0,00018305304, tj. 0,018305304%.

Taj broj raste sa smanjenjem populacije, tj. kada se u računicu uzimaju podatci za regionalne subpopulacije, no on je i dalje, posebice ako se koristi u kombinaciji s rezultatima standardnog DNA profiliranja, više nego dovoljan.

7.11.2. Prezentacija rezultata dobivenih upotrebom X-STR sustava

U prethodnim poglavljima smo elaborirali potencijale primjene X-STR sustava u forenzici. Jedan od osnovnih izazova u vezi ovog molekularnog biljega upravo je formulacija dobivenih rezultata i njihova statistička obrada. X-STR biljezi u tom smislu imaju određenu dozu specifičnosti. Pojednostavljeno, X-STR biljezi se unutar muškog dijela istraživane populacije mogu statistički promatrati (tretirati) kao haplotipovi dok se, s druge strane, unutar ženskog dijela iste populacije može primijeniti sličan statistički pristup kao kod autosomnih biljega. Stoga i postoji određeni stupanj kompleksnosti u njihovoj analizi (Butler, 2023).

Krajem prošloga stoljeća, različite su skupine znanstvenika promovirale parametar pod nazivom srednja šansa isključenja (engl. *mean exclusion chance*, *MEC*), koji je određen tako da uvažava sve specifičnosti nasljeđivanja kromosoma X. Ovaj se parametar prvenstveno koristi u testiranjima spornoga očinstva, ali i u određivanju porijekla bioloških tragova pronađenih na mjestu zločina i ima različite oblike ovisno o tome radi li se o ženskom ili muškom pojedincu te radi li se o standardnom ili manjkavom testiranju očinstva (Tablica 7.8.). Snaga diskriminacije u analizama X-vezanih biljega znatno varira ovisno o spolu. Kada se radi o ispitivanju tragova ženskog porijekla on je značajno veći (jači – formula V u tablici 7.9.) nego kada istu analizu primjenjujemo na tragove koji potječu od muške osobe (formula VI u tablici 7.9.). To je logična posljedica činjenice da muškarce karakterizira prisustvo samo jednog alela po STR lokusu dok se kod žena radi o paru alela. Stoga se može zaključiti da primjena X vezanih biljega, u usporedbi s primjenom autosomnih biljega, pokazuje slabije statističke rezultate. Još jedna činjenica, koja dodatno komplicira analizu jest, da, ako se povećava broj promatranih biljega u jednoj analizi, postoji velika mogućnost da će neki od njih, zbog specifičnosti kromosoma X, biti povezani te će se pojaviti tzv. neravnoteža vezanosti gena, a što će dodatno otežati daljnje statističke izračune.

Što se tiče testiranja srodstva u slučajevima u kojima se testiraju otac, majka i žensko dijete, upotreba X-STR biljega može dati bolje rezultate od autosomnih biljega, što se može vidjeti iz formula I i II (Tablica 7.9.). Određena prednost X-vezanih biljega može se naslutiti i u testiranju majčinstva (posebno majka-sin kombinacija) te u testiranju srodstva (baka s očeve strane-unuk). Općeniti zaključak o prednosti autosomnih biljega u širem rasponu analiza je i dalje ispravan.

TABLICA 7.9. Statistički obrasci koji se koriste u izračunima vezanim uz primjenu X-STR u forenzičkoj genetici (Szibor et al., 2003).

No.	Formula
I	$\sum_i f_i^3(1 - f_i)^2 + \sum_i f_i(1 - f_i)^3 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j)(1 - f_i - f_j)^2$
II	$\sum_i f_i^3(1 - f_i) + \sum_i f_i(1 - f_i)^2 + \sum_{i < j} f_i f_j (f_i + f_j)(1 - f_i - f_j)$
III	$1 - \sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^4 - (\sum_{i < j} f_i^2 f_j^2)^2$
IV	$1 - 2\sum_i f_i^2 + \sum_i f_i^3$
V	$1 - 2(\sum_i f_i^2)^2 + \sum_i f_i^4$
VI	$1 - \sum_i f_i^2$

Formula I: Srednja šansa isključenja (MEC) za autosomne biljege pri trio analizi (roditelji - dijete)

Formula II: Srednja šansa isključenja (MEC) za X vezane biljege pri trio analizi (roditelji –kći)

Formula III: Srednja šansa isključenja (MEC) za X vezane biljege pri trio analizi (roditelji –kći) (Desmarais)

Formula IV: Srednja šansa isključenja (MEC) za X vezane biljege pri otac –kći analizi

Formula V: Snaga diskriminacije (PD) kod žena

Formula VI: Snaga diskriminacije (PD) za X vezane biljege kod muškaraca f_i (f_j) – alelna frekvencija biljega i (j) u populaciji

7.12. BIOSTATISTIKA U ANALIZI mtDNA

Analiza rezultata sekvenciranja mitohondrijske DNA je poput svake forenzičke analize komparativne prirode. Clj joj je generirati kompletnu ili parcijalnu sekvencu mitohondrijskog genoma, usporediti ga s revidiranom Andersonovom sekvencom (rCRF), drugim dostupnim sekvencama te rezultate predstaviti na adekvatan način. Sve osobine mtDNA o kojima smo ranije pisali u ovoj knjizi, uvjetovali su njene specifične primjene u forenzici i genetici općenito te karakterističan pristup i formule koje se koriste u ovoj analizi. Kao i u drugim analizama, postojanje populacijske baze podataka, u ovom slučaju specifično za mtDNA sekvence, presudan je prvi korak u procesu izvještavanja rezultata ove analize (Konjhodžić, 2013).

Nakon sekvenciranja mtDNA, rezultati se predstavljaju u tekstualnom obliku u vidu nukleotidnih pozicija koje se razlikuju u odnosu na rCRS, s naglaskom na opaženu bazu koja se razlikuje od reference (npr. 16093C). Svi nukleotidi koji nisu zabilježeni u izvještaju automatski se smatraju identičnim onima iz rCRS. Većina ovih razlika bit će opažena unutar kontrolne regije, iako su mutacije moguće cijelom dužinom mtDNA. Zbog nedostatka rekombinacije i uniparentalnog nasljeđivanja, sekvencirana mtDNA promatra se kao haplotip i tako se i obrađuje. Gornja granica intervala pouzdanosti (engl. *upper level confidence interval*, *ULCI*) izračunava se za kompletan mtDNA profil i pokazuje koliko se često taj profil pojavljuje unutar testirane populacije prema formuli:

$$ULCI = p + 1.96 * \sqrt{p * (1 - p) / N},$$

gdje je p frekvencija pojavljivanja određenog haplotipa, a N je ukupan broj profila iz populacije. Indeks vjerodostojnosti za mtDNA profile, zbog njenih osobina, računa se po jednostavnoj formuli kao:

$$LR = 1 / p.$$

- Arenas M, Pereira F, Oliveira M, Pinto N, Lopes AM, Gomes V, ..., & Amorim A. Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair. *PLoS Genet* 2017; 13(9): e1006960.
- Babić Jordamović N, Kojović T, Dogan S, Bešić L, Salihefendić L, Konjhodžić R, Škaro V, Projić P, Hadživadić V, Ašić A, & Marjanović D. Haplogroup Prediction Using Y-Chromosomal Short Tandem Repeats in the General Population of Bosnia and Herzegovina. *Front Genet* 2021; 12: 671467.
- Brenner CH. A note on Paternity Computation in Cases Lacking a Mother. *Transfusion* 1993; 33: 51-54.
- Brenner CH. Forensic Mathematics. Pristupljeno 31.7.2023. na <https://dna-view.com/>
- Butler J, Fondevila M, Santos C, Freire A, Phillips C, Lareu M, & Vallone P. Revision of the SNPforID 34-plex forensic ancestry test: Assay enhancements, standard reference sample genotypes and extended population studies. *Forensic Sci Int - Genet* 2013; 7(1): 63-74.
- Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers (2nd edition). London: Elsevier Academic Press; 2005.
- Butler JM. Forensic DNA Typing: Biology, Technology and Genetics of STR Markers (2nd edition). London: Elsevier Academic Press; 2005.
- Butler JM. Recent advances in forensic biology and forensic DNA typing: INTERPOL review 2019–2022. *Forensic Sci Int - Synergy* 2023; 6: 100311.
- Caragine T, Mikulasovich R, Tamariz J, Bajda E, Sebestyen J, Baum H, & Prinz M. Validation of testing and interpretation protocols for low template DNA samples using AmpFlSTR® Identifiler®. *Croat Med J* 2009; 50: 250-267.
- Curran JM, & Buckleton J. Inclusion probabilities and dropout. *J Forensic Sci* 2010; 55(5): 1171-1173.
- Ferreira-Silva B, Fonseca-Cardoso M, Porto MJ, Magalhães T, & Cainé L. A Comparison Among Three Multiplex Y-STR Profiling Kits for Sexual Assault Cases. *J Forensic Sci* 2018; 63(6): 1836-1840.
- Gjertson DW, Brenner CH, Baur MP, Carracedo A, Guidet F, Luque JA, Lessig R, Mayr WR, Pascali VL, Prinz M, Schneider PM, & Morling N. ISFG: Recommendations on biostatistics in paternity testing. *Forensic Sci Int - Genet* 2007; 1(3-4): 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.06.006>
- Gusmão L, Butler JM, Linacre A, Parson W, Roewer L, Schneider PM, & Carracedo A. Revised guidelines for the publication of genetic population data. *Forensic Sci Int - Gen* 2017; 30: 160–163. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.06.007>
- Hamilton MB. Population genetics. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2021.
- Konjhodžić R. Identifikacija polimorfizama kontrolne regije mitohondrijske DNA u populaciji Bosne i Hercegovine i razvoj protokola za njihovu forenzičku primjenu. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu; 2013.
- Lasić L. Historical overview of the human population-genetic studies in Bosnia and Herzegovina: small country, great diversity. *Coll Antropol* 2016; 40(2): 145-149.
- Li CC, & Chakravarti A. An Expository Review of Two Methods of Calculating a Paternity Probability. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 197-205.
- Marjanović D, Bakal N, Pojskić N, Kapur L, Drobnič K, Primorac D, Bajrović K, & Hadžiselimović R. Allele Frequencies for 15 Short Tandem Repeat Loci in a Representative Sample of Bosnians and Herzegovinians. *Forensic Sci Int* 2006a; 156: 79-81.
- Marjanović D, Bakal N, Pojskić N, Kapur L, Drobnič K, Primorac D, Bajrović K, & Hadžiselimović R. Population Data for the Twelve Y-chromosome Short Tandem Repeat Loci from the Sample of Multinational Population in Bosnia and Herzegovina. *J Forensic Sci* 2005d; 50: 223-225.
- Marjanović D, Pojskić N, Davoren J, Kovačević L, Durmić A, Bakal N, Drobnič K, Primorac D, Škaro V, Bajrović K, & Hadžiselimović R. Population data at two STR loci D2S1338 and D19S433 in the sample of multinational Bosnia and Herzegovina residents. *J Forensic Sci* 2006b; 51: 1219-1220.
- National Research Council. The evaluation of Forensic DNA Evidence. Washington DC: National Academy Press, Washington, 1996.
- Pojskić N, Silajdzic E, Kalamujic B, Kapur-Pojskić L, Lasic L, Tulic U, & Hadžiselimović R. Polymorphic Alu insertions in human populations of Bosnia and Herzegovina. *Ann Hum Biol* 2013; 40(2): 181-185.
- Primorac D, Marjanović D, *et al.* Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, *et al.* DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Recommendations Regarding the Role of Forensic Genetics for Disaster Victim Identification (DVI). *Forensic Sci Int - Genet* 2007; 1: 3–12.
- Projić P, Skaro V, Samija I, Pojskić N, Durmic-Pasic A, Kovacevic L, Bakal N, Primorac D, & Marjanovic D. Allele Frequencies for 15 Short Tandem Repeat Loci in Representative Sample of Croatian Population. *Croat Med J* 2007; 48: 473-475.
- Shewale JG, & Liu RH. Forensic DNA analysis: current practices and emerging technologies. Boca Raton, FL: CRC Press; 2013.
- Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, & Krause D. Use of X Linked Markers for Forensic Purposes. *Int J Legal Med* 2003; 117: 67-74.
- Weiner AS. Likelihood of Parentage. U: Paternity Testing in Blood Group-ing. Springfield, VA: Charles C. Thomas; 1976.
- Weir BS. Population genetics of DNA profiles. *J Forensic Sci* 1993; 33: 218-25.
- Willuweit S, Roewer L, & International Forensic Y Chromosome User Group. Y chromosome haplotype reference database (YHRD): update. *Forensic Sci Int - Genet* 2007; 1(2): 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2007.01.017>

8.

DNA BAZE PODATAKA

prof. dr. sc. Damir Marjanović
prof. dr. sc. Dragan Primorac
prof. dr. sc. Adna Ašić
dr. sc. Dubravka Havaš Auguštin

DNA BAZE PODATAKA

Forenzička DNA tehnologija i DNA baze podataka široko su prihvaćeni kao najefikasnija i najefektivnija sredstva dostupna pravosudnim tijelima (Asplen, 2008). U odsustvu DNA baze podataka, ova tehnologija prestaje biti izrazito učinkovito oruđe istrage i može biti upotrebljiva samo onda kada je već identificirana osumnjičena osoba tradicionalnim načinom istrage. U tim uvjetima, kada je policija već odradila svoj posao, analiza DNA može samo dodatno poduprijeti slučaj. Međutim, s adekvatnom bazom podataka, proces istrage postaje efektivniji i učinkovitiji, što posebno dolazi do izražaja kada tradicionalnim tehnikama istrage nije moguće identificirati osumnjičenog.

Veliki je broj čimbenika koji utječu na kreiranje učinkovite DNA baze podataka, no najvažniji od njih su specifična legislativa i ovlasti/ograničenja koja zakon nameće prilikom korištenja tih baza. Čak i ako je kvaliteta laboratorija izvrsna i vrijeme procesiranja uzoraka vrlo kratko, neadekvatna legislativa može umnogome ograničiti iskorištavanje potencijala koje DNA baze podataka imaju. Upravo je kvaliteta danog zakona ono što čini DNA efikasnim sredstvom istrage. Mnoge države u svijetu iskoristile su prednosti DNA tehnologije, no svaka od njih je na različit način pristupila procesu uvođenja i uporabe DNA baza podataka. Pitanja poput čiji bi podatci trebali biti uključeni u bazu, kako pohraniti uzorke, koliko dugo je dopušteno čuvati uzorke, trebaju li i kada podatci biti izbrisani iz baze, samo su neka o kojima se mora voditi računa u kreiranju i razvoju baze podataka.

Drugi važan čimbenik koji mora biti ispunjen za formiranje funkcionalne DNA baze podataka jest postojanje DNA baze za eliminiranje, koja sadrži DNA profile laboratorijskog osoblja, policijskih službenika i zdravstvenih radnika, koji bi nenamjerno mogli kontaminirati uzorke (ostaviti svoju DNA) prikupljene na mjestu zločina. Ova vrsta kontaminacije može se dogoditi prilikom ispitivanja mjesta zločina, prilikom uzimanja uzorka žrtve (npr. kod slučajeva silovanja) ili tijekom analize uzoraka u forenzičkom DNA laboratoriju. DNA baza podataka

za eliminiranje mora biti odvojena od baze podataka s profilima kriminalaca, a pristup bazi za eliminiranje mora se ograničiti isključivo na pretrage kojima je cilj otkrivanje potencijalne kontaminacije. Sve su ovo ujedno teme kojima ćemo se baviti u ovom poglavlju na primjeru više zemalja, kao i analizom trenutnog stanja u zemljama regije.

8.1. KRITERIJI ZA KREIRANJE LEGISLATIVE U VEZI S DNA BAZOM PODATAKA

Prilikom kreiranja legislative, a s ciljem njezine maksimalne učinkovitosti, neophodno je definirati nekoliko bitnih kriterija kao što su oni za unos i uklanjanje profila iz baze te za čuvanje bioloških tragova i uzoraka korištenih u analizi DNA (Corte-Real, 2004).

8.1.1. Kriteriji za arhiviranje profila

8.1.1.1. Profili osuđenih prijestupnika

Kriteriji za arhiviranje profila osuđenih prijestupnika uvelike variraju od države do države. No, ono što je zajedničko za sve sustave jest tendencija uključivanja većeg broja kako specifičnih zločina (npr. pljačke ili krađe auta), tako i grupa osuđenih pojedinaca (npr. teški nasilni delikti). U nekim državama unos profila osuđenih počinitelja kaznenih djela u bazu podataka provodi se samo za posebno naznačene zločine, dok u drugim državama, unos ovisi o dužini ili mogućoj dužini kazne. Također, u nekim državama su za uzimanje uzoraka potrebne i presuda i specifičan sudski nalog, dok u drugim zemljama policija ima ovlasti da uzme uzorke bez posjedovanja navedenih dokumenata Ledić A, Makar A, Obleščuk I. DNA Databases. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 477-492.

8.1.1.2. Profili osumnjičenika

Slično kao i za profile osuđenih počinitelja kaznenih djela, kriteriji za pohranu DNA profila osumnjičenika i uhićenika u baze podataka izrazito se razlikuju od države do države. Najčešće, pohrana podataka u bazu ovisi o specifičnom zločinu za koji se određena osoba sumnjiči ili o mogućoj duljini kazne koju bi osumnjičnik mogao dobiti ukoliko bude osuđen. Neke države ne rade razliku između ova dva pristupa i dozvoljavaju unos podataka o osobama osumnjičenim ili uhićenim

za bilo koje kazneno djelo. Kao i za profile osuđenika, postoji trend u svijetu za dopunom važeće legislative kako bi se dopustio unos podataka o osumnjičenim osobama s ciljem povećanja učinkovitosti baza podataka.

8.1.1.3. Profili dobiveni iz mrlja (tragova) nađenih na mjestu zločina

Većina država ne postavlja nikakva zakonska ograničenja za unos u bazu podataka DNA profila dobivenih iz tragova nađenih na mjestu zločina. Njemačka, recimo, ograničava unos ovakvih DNA profila na tragove pronađene na mjestu zločina prilikom izvršenja određenih kaznenih djela, poput ubojstva, terorizma, različitih vrsta krađe i ucjene, tjelesnog napada, krađe vozila, paljevine i drugih teških zločina. Međutim, kako je ovo vrlo širok spektar zločina, čak i u ovakvim zemljama to praktično znači da će skoro svi dokazi s mjesta zločina moći biti analizirani i tako generirani DNA profili uneseni u bazu podataka.

8.1.2. Kriteriji za uklanjanje profila iz baze podataka

8.1.2.1. Profili osuđenih prijestupnika

Kao i kriteriji za unos profila osuđenih prijestupnika u bazu podataka, kriteriji za uklanjanje profila iz baza razlikuju se od države do države. Uvidjevši mogućnost rješavanja starih, neriješenih slučajeva, neke zemlje zadržavaju profile osuđenih prijestupnika u bazama podataka neodređeno dugo ili sve do smrti te osobe. U nekoliko zemalja profili ostaju pohranjeni u bazi podataka onoliko godina koliko traje dodijeljena kazna.

8.1.2.2. Osumnjičenici/uhićenici

U većini država koje imaju baze podataka DNA profila osumnjičenika, profili se uklanjaju nakon oslobađajuće presude ili odbacivanja optužbi. Ukoliko osumnjičena osoba bude osuđena, tada se primjenjuju kriteriji za uklanjanje profila osuđenih prijestupnika.

8.1.3. Čuvanje uzoraka

Čuvanje referentnog uzorka ima praktične, kao i političke implikacije. Neke države odlučile su zadržati uzorke u bazama podataka radi usporedbe ili budućih analiza u slučaju pogreške ili napretka tehnologije dok su druge odlučile uništiti referentne uzorke kako bi uklonile svaku mogućnost ili pomisao da bi ih vlada mogla iskoristiti za bilo kakve neprikladne ili nezakonite analize.

8.2. FORENZIČKE DNA BAZE PODATAKA U SVIJETU

Prema posljednjim podacima, 85 zemalja u svijetu može se pohvaliti postojanjem forenzičke DNA baze podataka, prema posljednjim informacijama koje smo uspjeli prikupiti preko INTERPOL-ovih izvora (Tablica 8.1.). Dodatno, određeni broj zemalja uspostavile su ili rade na uspostavljanju legislative neophodne za rad DNA baze podataka, ali često takve procedure znaju trajati godinama, pogotovo ako se radi o zemljama u razvoju ili zemljama složene demografske ili političke slike. Nažalost, većina zemalja koje trenutno rade na uspostavljanju svoje forenzičke DNA baze podataka upravo su takve, stoga ne treba čuditi činjenica da broj novih zemalja s funkcionalnom DNA bazom podataka u zadnje vrijeme vrlo sporo raste.

Najveće svjetske baze podataka nalaze se u Kini (više od 80 milijuna profila), SAD-u (preko 20 milijuna profila), i Velikoj Britaniji (preko sedam milijuna profila). U skupinu velikih forenzičkih DNA baza podataka (preko 100 000 DNA profila) pripadaju one koje su uspostavljene u Francuskoj, Njemačkoj, Kanadi, Australiji, Izraelu, Austriji, Novom Zelandu, Nizozemskoj, Švicarskoj, Španjolskoj i Finskoj. Ostale baze sadrže manje od 100.000 DNA profila¹.

TABLICA 8.1. Zemlje koje imaju usvojenu legislativu vezanu za forenzičku DNA bazu podataka.²

Albanija	Danska	Jamajka	Malta	Sjeverna Makedonija
Alžir	Egipat	Japan	Maroko	Slovačka
Austrija	Estonija	Jordan	Mauricijus	Slovenija
Australija	Finska	Južna Koreja	Namibija	Srbija
Azerbajdžan	Francuska	Južnoafrička Republika	Nizozemska	Sudan
Bahami	Grčka	Kanada	Norveška	Sv. Lucija
Bahrein	Gruzija	Katar	Novi Zeland	Španjolska
Bangladeš	Gvatemala	Kazahstan	Njemačka	Švedska
Belgija	Honduras	Kina	Panama	Švicarska
Bermuda	Hong Kong	Cipar	Peru	Tajvan
Bjelorusija	Hrvatska	Kolumbija	Poljska	Tunis
Botsvana	Indonezija	Latvija	Portugal	Ujedinjeni Arapski Emirati
Brazil	Iran	Libanon	Rumunjska	Ukrajina
Bugarska	Irska	Lihtenštajn	Rusija	Velika Britanija
Crna Gora	Island	Litva	SAD	Vijetnam
Češka Republika	Italija	Luksemburg	Saudijska Arabija	Uzbekistan
Čile	Izrael	Mađarska	Singapur	

¹ Podatak preuzet iz Gordon Thomas Honeywell Government Affairs, prezentacija Tima Schellberga, American Academy of Forensic Sciences meeting, veljača 2012. godine (ljubazno ustupljeno od strane Chrisa Asplena) i u veljači 2024. godine s https://dnapolicyinitiative.org/wiki/index.php/Global_summary.

² INTERPOL-ovi podatci su preuzeti 17.5.2024. godine s https://dnapolicyinitiative.org/wiki/index.php/Global_summary.

8.2.1. CODIS baza podataka – Sjedinjene Američke Države

Sustav arhiviranja DNA podataka u Sjedinjenim Američkim Državama temelji se na softverskom kompleksu nazvanom CODIS (engl. *Combined DNA Indexing System*). CODIS baze podataka postoje na lokalnoj, državnoj i nacionalnoj razini. Početci CODIS-a, kao pilot projekta, vežu se za 1990. godinu i 14 saveznih država u SAD-u. Četiri godine poslije usvojen je DNA identifikacijski akt (*Public Law 103 322*) koji je formalno ovlastio FBI da uspostavi Nacionalnu DNA bazu podataka. U listopadu 1998., FBI je prvi put prezentirao NDIS (engl. *National DNA Index System*), koji je od tog trenutka postao operativan. CODIS je implementiran kao distribucijska baza podataka s tri hijerarhijske razine: lokalni, državni i savezni. NDIS zauzima najvišu poziciju u okviru CODIS hijerarhije. Drugu razinu predstavlja SDIS (engl. *State DNA Index System*), dok je prva instanca LDIS (engl. *Local DNA Index System*). Ovako strukturiran sustav dozvoljava kriminalističkim laboratorijima da kontroliraju vlastite podatke, odnosno svaki laboratorij zasebno odlučuje koje će profile podijeliti s ostatkom zemlje.

Zaključno s veljačom 2024. godine, 204 laboratorija iz svih 50 država (plus Puerto Rico, Washington, D.C. i jedan laboratorij vojnih snaga SAD-a)³ dio su CODIS-NDIS programa. NDIS-om na nacionalnoj razini upravlja FBI, na tajnoj lokaciji. U svom prvobitnom izdanju, CODIS se sastojao od dva dijela: indeksa osuđenih prijestupnika i forenzičkog indeksa. Prvi indeks sadržavao je profile osoba osuđenih za neki zločin; državni zakon određuje koje vrste zločina ulaze u CODIS sustav. Svih 50 država usvojile su DNA legislativu kojom se dopušta prikupljanje DNA profila osuđenika s ciljem pohranjivanja podataka u CODIS. Forenzički indeks sadrži profile dobivene iz bioloških tragova nađenih na mjestu zločina. Tijekom nekoliko prethodnih godina, CODIS je dodao nove indekse, uključujući: indeks uhićenika, indeks nestalih ili neidentificiranih osoba i referentni indeks nestalih osoba. CODIS sadrži algoritam za pretraživanje, koji pretražuje i uspoređuje različite indekse na temelju strogih pravila koja štite privatnost osoba. Za rješavanje slučajeva silovanja i ubojstava CODIS uspoređuje forenzički indeks s njim samim i s indeksom osuđenika. Uspoređivanje forenzičkog indeksa s njim samim daje mogući trag koji povezuje dva ili više prethodno nepovezana slučaja. Važno je naglasiti da CODIS algoritam daje jedino *potencijalne veze*. Svaka potencijalna veza biva potvrđena ili opovrgnuta od strane kvalificiranog DNA analitičara.

Do veljače 2024. godine, CODIS je imao 1 322 543 forenzičkih profila, zatim 17 026 097 profila osuđenih ili optuženih prijestupnika i 5 391 074 profila uhićenika, što ovu bazu čini drugom najvećom bazom podataka na svijetu. Također,

³ Podatci su preuzeti 3.8.2024. godine s <https://le.fbi.gov/science-and-lab/biometrics-and-fingerprints/codis/codis-ndis-statistics>.

zaključno s veljačom 2024. godine, CODIS baza imala je 698 183 pozitivnih identifikacija i time pomogla u rješavanju 680 122 istrage. Prijašnje izdanje ove knjige objavljeno je 2012. godine i prikazalo je podatke iz srpnja te godine. Tada je CODIS sadržavao 441 200 forenzičkih, 9 812 200 profila osuđenih ili optuženih prijestupnika te 1 181 300 profila uhićenika, iz čega možemo vidjeti da ova baza i dalje nastavlja vrtoglavo rasti u opsegu i broju podataka koje može pružiti u svakodnevnom forenzičkom radu (Marjanović, Primorac, 2012). Zanimljivo je da Kalifornija trenutno posjeduje DNA bazu podataka od preko 2 milijuna DNA profila, što je čini četvrtom po veličini DNA bazom podataka u svijetu (naravno, CODIS sadrži sve podatke iz državnih baza), dok još dvije baze sadrže po više od milijun profila, a to su baze iz saveznih država Floride i Teksasa.⁴

8.2.2. NDNAD baza podataka – Engleska

Engleska se smatra zemljom s najuspješnijim i najefikasnijim pristupom upotrebi forenzičke DNA tehnologije u svijetu. Osnivanjem Nacionalne DNA baze podataka (engl. *National DNA Database – NDNAD*) 10. travnja 1995. godine, Engleska (zajedno s Walesom koji od početka sudjeluje u istoj bazi) tada je preuzela primat u svijetu na području otkrivanja inovativnih načina korištenja DNA dokaza u svrhu identificiranja osumnjičenih, zaštite nevinih i kažnjavanja krivih. DNA tehnologija i arhiviranje DNA podataka postale su centralne točke u procesu kriminalističke istrage.

Devedeset posto svih DNA forenzičkih analiza provedenih u Engleskoj u početku razvoja ove baze podataka, obavljala je poludržavna agencija, Služba za forenzičku znanost (engl. *Forensic Science Service – FSS*), koja je radila pod ovlastima Odjela ministarstva za imigraciju, sigurnost, pravo i red (engl. *Home Office*). Nadalje, ne samo da je FSS obavljala većinu analiza DNA u državi, nego je također imala i službenu ovlast nad DNA bazom podataka, koju joj je dodijelila Asocijacija policijskih zapovjednika (engl. *Association of Chief Police Officers – ACPO*). Ipak, 2007. godine, odgovornost za nacionalnu DNA bazu podataka dodijeljena je Nacionalnoj policijskoj agenciji (engl. *National Police Improvement Agency – NPIA*). Ova agencija nadgledala je funkcioniranje baze podataka, ali je ujedno bila odgovorna za akreditiranje laboratorija koji šalju DNA profile u bazu⁵. Prema NPIA podacima u razdoblju od 2001. do 2012., upotrebom NDNAD podataka riješeno je skoro 410 000 različitih kaznenih djela. Zanimljiv je podatak da je u razdoblju od 2003.–2009. zabilježen pad pozitivnog podudaranja DNA

profila u NDNAD bazi za 11%, no u istom intervalu u Velikoj Britaniji zabilježen je ukupni pad izvršenja kaznenih djela za 22%, tako da se ova dva podatka mogu povezati i indirektno uputiti na preventivnu ulogu DNA baze podataka u sprječavanju kriminalnih aktivnosti. U skladu s promjenama u tehnologiji obrade DNA uzoraka i podataka, došlo je do promjene unutar struktura koje su održavale NDNAD, tako je FSS službeno ugašena 31. ožujka 2012., a NPIA 7. listopada 2013. godine, nakon donošenja Zakona o kriminalu i sudu (engl. *Crime and Courts Act*) (Wilson, 2015).

Trenutno NDNAD-jem upravlja Strateški odbor za baze podataka forenzičnih informacija (engl. *Forensic Information Database Strategy Board*) koji upravlja i Nacionalnom bazom otisaka prstiju (engl. *National Fingerprint Database, IDENT1*). Prema posljednjem statističkom izvještaju iz NDNAD-ja iz drugog kvartala 2024. godine, u bazi je postojalo 7 269 527 profila iz različitih uzoraka, što odgovara broju od 6 059 559 osoba (procjenjuje se da je trenutno 16,4% uzoraka duplicirano, tj. da više uzoraka dolazi od jedne osobe). 4 398 volontera ostavilo je uzorak u bazi dok je iz uzoraka s mjesta zločina generirano 692 365 profila.⁶

Statistika konstantno pokazuje da manje od jedne četvrtine uhićenja u Velikoj Britaniji otpada na prijestupnike koji su počinili neki prekršaj prvi put, da 85% prijestupnika bude osuđeno prvi put između 14. i 19. godine života, a da vjerojatnost da će neki 14-godišnjak ponovo učiniti prekršaj iznosi 77%. Vladine statistike također pokazuju da 20% kriminalaca počini 80% svih zločina, a 60% sudskih suočenja tiče se 21% svih prijestupnika (Asplen, 2008). Sve su ovo čimbenici koji snažno podupiru široku upotrebu DNA baza podataka.

Uspješna primjena DNA baze podataka u Velikoj Britaniji u velikoj mjeri zasnila se na izuzetno liberalnom, pa pomalo i agresivnom zakonu, koji je dozvoljavao pohranjivanje DNA profila u bazu podataka za sve prijestupnike i koji uopće ne predviđa brisanje DNA profila iz te baze. S druge strane, Škotska šalje kopije svojih profila u NDNAD, samo u slučajevima osuđenih kriminalaca ili osoba koje čekaju suđenje, da bi ta odluka naknadno bila proširena na osobe optužene za ozbiljne seksualne ili nasilne zločine, čiji su se profili u bazi podataka čuvali do pet godina nakon njihovog oslobađanja. Forenzički uzorci s otoka Isle of Man šalju se na provjeru u NDNAD, ali se uklanjaju ukoliko osumnjičenik nije osuđen za zločin.

Ovaj model rada NDNAD-ja u Engleskoj doveden je u pitanje odlukom Europskog suda za ljudska prava iz 2008. koja je proistekla iz dva odvojena slučaja. U prvom slučaju, 11-godišnji dječak bio je osumnjičen za pokušaj pljačke, ali je nakon pet mjeseci ta optužba odbačena. Njegov DNA profil i otisci prstiju pohranjeni su u bazu podataka. Slično se dogodilo i u poznatom Marper slučaju kada

⁶ Podatci preuzeti 3.8.2024. godine s <https://www.gov.uk/government/statistics/national-dna-data-base-statistics>.

⁴ Svi podatci u ovom odlomku preuzeti su 3.8.2024. s <https://le.fbi.gov/science-and-lab/biometrics-and-fingerprints/codis/codis-ndis-statistics>.

⁵ <http://www.npia.police.uk/en/13340.htm>, pristup 15.09.2012.

su DNA profili i otisci prstiju osumnjičenika (protiv kojih nikada nije podignuta optužnica) pohranjeni u bazu podataka. U oba je slučaja zatraženo uklanjanje profila iz baze podataka, kao i uništavanje njihovih bioloških tragova, no to je odbijeno. Europski sud za ljudska prava je za ova dva slučaja donio odluku u kojoj prihvaća da DNA profili i otisci prstiju pohranjeni u bazi podataka predstavljaju jako oruđe i javni interes u prevenciji i borbi protiv kriminala. Ipak, ukazali su da DNA profili, otisci prstiju i biološki uzorci osoba koje su bile osumnjičene, ali ne i optužene/osuđene, a koji su pohranjeni u DNA bazi podataka, ukazuju na konflikt između javnog i privatnog interesa, stoga su suci jednoglasno donijeli odluku da biološki uzorci moraju biti uklonjeni iz baze podataka. Nakon donošenja Zakona o zaštiti sloboda (engl. *Protection of Freedoms Act*) iz 2012. godine, uzorci osoba koje nisu optužene ili osuđene moraju se ukloniti iz baze podataka nakon određenog broja godina⁷. Posljedično donošenju ovog Zakona, NDNAD je u listopadu 2013. godine objavio brisanje 1 766 000 DNA profila odraslih osoba i djece koji su proglašeni nevinim, kao i uništenje 7 753 000 DNA uzoraka, od kojih su već generirani DNA profili.⁸

Bitno je napomenuti, s obzirom na različite interpretacije ove presude Europskog suda za ljudska prava, da ova odluka nije dovela u pitanje postojanje DNA baze podataka i njezin značaj, nego je ukazala i na njezine prednosti. Bitno je zaključiti i da ova odluka ni na koji način nije ograničila funkcioniranje NDNAD-a.

8.2.3. Primjena analiza DNA u Njemačkoj

Njemačka je postala jedan od međunarodnih lidera u primjeni DNA u forenzici, uključujući adekvatnu izmjenu legislative, učešće u rješavanju prekograničnih zločina upotrebom DNA, promociju DNA forenzike, kao i činjenicu da je njemačka DNA baza podataka jedna od većih u Europi i sadrži profile oko 1% ukupne populacije u državi. Prvo DNA testiranje na sudu u Njemačkoj izvršeno je 1988. godine, iako tada nije postojala zakonska regulativa, a baza podataka uspostavljena je 1998. godine (Amelung *et al.*, 2020). Prema informacijama s web stranice Federalnog ureda kriminalističke policije (njem. *Bundeskriminalamt*), DNA profiliranje radi se na osam markera, uključujući SE33.⁹

⁷ Detaljnije o praktičnim izmjenama legislative na <https://www.gov.uk/government/publications/protection-of-freedoms-act-2012-dna-and-fingerprint-provisions/protection-of-freedoms-act-2012-how-dna-and-fingerprint-evidence-is-protected-in-law#contents>.

⁸ Pristupljeno 18.2.2024. na <https://www.gov.uk/government/speeches/protection-of-freedoms-act-implementation-and-national-dna-database-annual-report-2012-to-2013>.

⁹ Pristupljeno 23.5.2024. godine na https://www.bka.de/EN/OurTasks/SupportOfInvestigationAndPrevention/DNAAnalysis/dnaanalysis_node.html#doc25816bodyText3.

U 2005. godini, Parlament Savezne Republike Njemačke i Federalno vijeće Njemačke usvojili su zakon koji značajno proširuje mogućnosti korištenja analize DNA u kriminalističkim istragama na širok spektar zločina, koji uključuje i sitna kaznena djela, ukoliko se radi o recidivistima. Donesena je i izmjena prema kojoj sudski nalog više nije apsolutno neophodan i ljudi su mogli dobrovoljno dati svoje uzorke za generiranje DNA profila u bazi podataka, što je doprinijelo značajnom rastu broja profila u bazi. Posljednje izmjene odnose se na „obiteljsko pretraživanje” baze podataka, odnosno potraga za srođnicima na temelju djelomičnog poklapanja profila nepoznatog uzorka s onima iz baze podataka. Kada su u pitanju pravila za brisanje uzoraka iz DNA baze podataka, Njemačka prati praksu iz Velike Britanije nakon presude Europskog suda za ljudska prava (Amelung *et al.*, 2020).

Bavarska je 2018. godine eksplicitno dopustila predviđanje starosti osobe koja je ostavila trag, kao i boje kože, kose i očiju koristeći tehnologiju DNA fenotipizacije (detaljnije opisano u poglavlju 10), u slučaju da se radi o „neposrednoj opasnosti”. Ova odluka naišla je na otpor civilnih grupa kao i profesionalaca u području forenzičke genetike i zaštite podataka, zbog značajno povećane mogućnosti diskriminacije, a što je u suprotnosti s presudama Europskog suda za ljudska prava. Do kraja 2019. godine, zakon je proširen na cijelu državu na način da koristi DNA fenotipizaciju za predviđanje vanjskih osobina i godina, ali ne i biogeografskog porijekla osobe koja je ostavila trag (Amelung *et al.*, 2020).

8.2.4. Europska razmjena DNA podataka

Kako sve više država uspostavlja i širi svoje forenzičke DNA baze podataka, tako se također povećava mogućnost uspješne razmjene podataka između zemalja. Općenito, države nastavljaju s praksom usvajanja i dopune legislative koja se tiče ovoga pitanja. Čak i zemlje koje nemaju legislativu koja se posebno tiče upotrebe DNA, počele su proces pohrane podataka pod nadzorom nekih drugih institucija policijskog i pravosudnog sustava. Kako baze podataka rastu u sadržaju i učinkovitosti, tako i značaj prekogranične razmjene podataka postaje sve očitiji.

Na temelju sporazuma sklopljenog u Prümü, od prosinca 2006. godine, Njemačka i Austrija mogu uspoređivati sadržaje svojih nacionalnih DNA baza podataka (Europski parlament, 2007). Prvi put, dvije su države dopustile jedna drugoj pristup svojim nacionalnim policijskim bazama podataka po metodi slaganja/neslaganja profila. Nakon samo šest tjedana, pri usporedbi njemačkih kriminalističkih profila s austrijskom bazom podataka nađeno je 1500 unosa koji su se podudarali. Kada su austrijski profili uspoređeni s njemačkom bazom podataka, to je rezultiralo s 1400 podudarnih unosa. Na taj način, za vrlo kratko vrijeme, njemačka i austrijska vlada omogućile su važne podatke za policiju i pravosuđe, dokazujući tako važnost prekogranične integracije DNA baza podataka.

Prvobitno potpisan od strane sedam država (Njemačka, Austrija, Belgija, Nizozemska, Luksemburg, Francuska i Španjolska), sporazum iz Prüma olakšao je razmjenu DNA podataka između zemalja potpisnica. Kao predsjedavajuća Europske unije, Njemačka je prenijela koncept Sporazuma u EU legislativu, što je učinilo da sve članice Europske unije sada postanu učesnice u mreži nacionalnih baza podataka. Sada kada je takva legislativa usvojena, kriminalci više nisu u mogućnosti izbjeći najefikasnijem policijskom oruđu u borbi protiv kriminala tako što će se jednostavno prevesti preko granice. Zaključno s 2012. godinom, 14 zemalja sudjelovalo je u razmjeni podataka zasnovanoj na sporazumu iz Prüma (Austrija, Njemačka, Španjolska, Belgija, Luksemburg, Slovenija, Finska, Francuska, Bugarska, Slovačka, Latvija, Litva, Rumunjska i Nizozemska) (ENFSI, 2012). U istom ovom dokumentu, ENFSI je prezentirao 28 osnovnih preporuka vezanih za uspostavljanje i funkcioniranje državnih DNA baza podataka (ENFSI, 2012). Trenutno, svih 27 zemalja članica EU sudjeluju u razmjeni podataka na osnovu Prümskog sporazuma, uz zemlje koje nisu članice EU, a to su Norveška, Švicarska, Island i Lihtenštajn. Velika Britanija, usprkos napuštanju EU, sudjeluje u razmjeni DNA profila osuđenih kriminalaca, a u lipnju 2020. je nagoviještena mogućnost da će sudjelovati i u razmjeni DNA profila osumnjičenika (DNA Policy Initiative, 2020; EUR-Lex, 2023).

Prüm II predložen je u proljeće 2021. godine, s ciljem da proširi količinu i vrstu informacija koje se mogu razmijeniti u okviru prekogranične suradnje, a što bi uključivalo automatiziranu razmjenu podataka u okviru policijske suradnje (fotografije, informacije iz vozačkih dozvola, digitalne informacije, a posebno je značajna upotreba centraliziranog sustava umjesto odvojenih usporedbi s bazama podataka iz svih zemalja članica). Sporazum je privremeno usvojen prilikom prvog čitanja sa 451 glasom za, 94 protiv i 10 suzdržanih, 8. veljače 2024. godine.¹⁰

8.2.5. INTERPOL-ov globalni DNA protokol

INTERPOL je 2002. godine uspostavio INTERPOL DNA protokol (engl. *INTERPOL DNA Gateway*), koji je kreiran kako bi olakšao usporedbu DNA profila između država članica INTERPOL-a. INTERPOL održava bazu podataka DNA profila kojoj svaka država članica može pristupiti putem interneta, nakon usvajanja povelje kojom se osigurava njena sigurna upotreba. U veljači 2012. godine, u bazi je bilo pohranjeno više od 117 000 DNA profila iz 61 države članice, što je dovelo do toga da je samo u 2011. godini zabilježena 51 transnacionalna pozitivna identifikacija (INTERPOL, 2012). Trenutni podatci na INTERPOL-ovoj web

¹⁰ Pristupljeno 3.8.2024. na https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/PV-9-2024-02-08-ITM-008-04_EN.html.

stranici navode da njihova baza sadrži 280 000 profila iz 87 zemalja članica, dok je ukupno 196 zemalja primljeno u članstvo, što INTERPOL čini najvećom globalnom policijskom organizacijom.¹¹

Država članica može dostaviti DNA informaciju za pohranu u DNA protokol Generalnom sekretarijatu putem INTERPOL-ovog sigurnog telekomunikacijskog sustava ili u vidu ispisanog dokumenta, a poslani profil temelji se na INTERPOL-ovom standardnom setu lokusa (engl. *Interpol Standard Set of Loci - ISSOL*), o kojem smo više pisali u trećem poglavlju ove knjige. Sustav je indeksiran u četiri osnovne kategorije: uzorci mjesta zločina, referentni uzorci, nestale osobe i neidentificirani umrli. Također je značajno spomenuti da države članice koje dostavljaju DNA profile INTERPOL-u, u skladu s njihovom legislativom, imaju mogućnost ograničavanja pristupa informacijama određenim državama. U slučaju kada su države članice obaviještene o postojanju pozitivnog identifikiranja, na državi koja je pohranila sporni profil odluka je želi li otkriti dodatne informacije koje se tiču tog DNA profila.

Međunarodna povezanost forenzičkih DNA baza podataka je slijedeći logičan korak u nastojanju da se u potpunosti iskoristi potencijal DNA tehnologije u borbi protiv kriminala. Konačno, države će imati mogućnost koristiti analizu DNA u cilju lociranja prestupnika bilo gdje u svijetu.

8.3. AKTUALNO STANJE U REGIJI

U ožujku 2011. godine, u organizaciji Udruženja genetičara u BiH i Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Sveučilišta u Sarajevu, u Sarajevu je održan skup pod naslovom „Uspostava forenzičkih DNA baza podataka u zemljama regije: retrospektiva i perspektiva”. Na skupu su forenzički genetičari iz Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Srbije, Crne Gore i Sjeverne Makedonije razmatrali stanje i usvojili strategiju vezanu za uspostavu i funkcioniranje DNA baza podataka na ovim prostorima. Krajnje zaključke formulirali su u jedan izlazni dokument, koji je, pored poziva za provođenje 28 ENFSI preporuka, formulirao i osam novih preporuka zasnovanih na specifičnosti okruženja u kojem forenzički genetičari iz regije rade (Marjanović *et al.*, 2011).

Slovenija je prva od ovih zemalja koja je uspostavila funkcionalnu bazu podataka sa zakonskim okvirom 1998. godine, a od 2007. godine, Slovenija je potpisnica Prümskog sporazuma, što dodatno uređuje njihovu legislativu i svakodnevno funkcioniranje DNA baze podataka (Marjanović *et al.*, 2011). Posljednji podatak koji imamo za slovensku DNA bazu podataka je s kraja 2017.

¹¹ Pristupljeno 3.8.2024. na <https://www.interpol.int/How-we-work/Forensics/DNA>.

godine, kada je u njoj bilo pohranjeno 34 426 profila osoba i 7 677 profila nastalih iz nepoznatih tragova s mjesta zločina (ENFSI, 2020). U Republici Hrvatskoj, DNA baza podataka uspostavljena je 2000. godine, koristeći CODIS sustav, a kao članica EU, Hrvatska također primjenjuje Sporazum iz Prüma (Popović, 2018). Prema ENFSI podatcima, koji su zadnji put za Hrvatsku ažurirani početkom 2021. godine, hrvatska baza podataka sadrži 4 167 profila osoba i 6 455 profila neidentificiranih tragova s mjesta zločina (ENFSI, 2020).

Nakon održavanja skupa iz 2011. godine, u preostale četiri zemlje došlo je do određenih promjena. Crna Gora, Sjeverna Makedonija i Srbija, koje tada nisu imale usvojene legislative, završile su taj važan korak. ENFSI izvještaj navodi sljedeće podatke: za Sjevernu Makedoniju 26 141 profil osoba i 13 062 profila nepoznatih uzoraka s mjesta zločina (kraj 2020. godine), a za Srbiju 13 385 profila osoba i 800 profila s mjesta zločina, s tim da se svi individualizirani uzorci s mjesta zločina uklanjaju iz ovog dijela baze podataka i da je unesen samo jedan uzorak po mjestu zločina (kraj 2020. godine) (ENFSI, 2020). Baza za Crnu Goru i dalje ne sadrži DNA profile (ENFSI, 2020). Od navedenih šest zemalja, samo je Bosna i Hercegovina, i pored dugogodišnje i intenzivne tradicije primjene forenzičke analize DNA, još uvijek bez odgovarajuće legislative vezane za forenzičke DNA baze podataka na državnom nivou.

- Amelung N, Granja R, Machado H. Germany. In: Modes of Bio-Bordering. Singapur: Palgrave Pivot; 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-15-8183-0_4.
- Asplen C. Međunarodna praksa glede DNA baza podataka. U: Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Corte-Real F. Forensic DNA databases. Forensic Sci Int. 2004; 146 Suppl: S143-S144. doi:10.1016/j.forsciint.2004.09.043.
- DNA Policy Initiative. (2020). Global Summary. Pristupljeno 17.2.2024. na https://dnapolicyinitiative.org/wiki/index.php/Global_summary.
- ENFSI DNA Working Group. DNA-Database Management Review and Recommendations. Wiesbaden: ENFSI; 2012.
- ENFSI DNA Working Group. ENFSI Survey of DNA Databases in Europe. Wiesbaden: ENFSI; 2020.
- EUR-Lex. Stepping up cross-border cooperation – the Prüm decision. Luksemburg: Ured za publikacije Evropske unije; 2023.
- Evropski parlament. Radni dokument o Odluci Vijeća o unapređenju prekogranične saradnje, posebno u borbi protiv terorizma i prekograničnih zločina. Bruxelles: Odbor za civilne slobode, pravdu i unutrašnja pitanja; 2007.
- INTERPOL. INTERPOL Fact Sheet: DNA Profiling. Lion: Interpol; 2012.
- Ledić A, Makar A, Oblesćuk I. DNA Databases. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 477-492.
- Marjanović D *et al.* Forensic DNA databases in Western Balkan region: retrospectives, perspectives, and initiatives. Croat Med J 2011; 52: 235-244.
- Marjanović D, Primorac D. Forenzička genetika: teorija i aplikacija. Sarajevo: Naučna i stručna knjiga Lelo; 2013.
- Popović P. DNA profiliranje i baze podataka (Diplomski rad – Master teza). Split: Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za forenzičke znanosti; 2018.
- Wilson T. The Global Perspective (pp. 82-95). U: Annual Report of the Government Chief Scientific Adviser 2015: Forensic Science and Beyond: Authenticity, Provenance and Assurance: Evidence and Case Studies. London: The Government Office for Science; 2015.

9.

FORENZIČKA ANALIZA DNA BILJNIH I ŽIVOTINJSKIH BIOLOŠKIH TRAGOVA

prof. dr. sc. Damir Marjanović

prof. dr. sc. Dragan Primorac

doc. dr. sc. Petar Projić

doc. dr. sc. Jelena Šarac

FORENZIČKA ANALIZA DNA BILJNIH I ŽIVOTINJSKIH BIOLOŠKIH TRAGOVA

Najnovija dostignuća molekularne biologije ponudila su opciju izuzetno pouzdanog DNA testiranja širokog spektra organizama. Forenzička znanstvena zajednica jasno je prepoznala vrijednost takvih analiza i proteklih nekoliko godina počela koristiti mogućnosti ispitivanja životinjskih i biljnih jedinki, ali i mikroorganizama. Rezultati takvih analiza često pronalaze svoju konkretnu primjenu na sudu u sklopu redovnih forenzičko-genetičkih analiza, ali i u borbi protiv nove opasnosti opisane pod imenom bioterorizam (detaljnije opisano u poglavlju 11). Napominjemo da ovo poglavlje uglavnom predstavlja kraću, ali novim informacijama unaprijeđenu, verziju sublimiranih poglavlja iz jedne od ranijih knjiga (Primorac, Marjanović *et al.*, 2008).

9.1. FORENZIČKA BOTANIKA

Forenzička botanika kombinacija je mnogih disciplina biologije biljaka i njihove primjene u području zakonodavstva, a koja obuhvaća sve aspekte anatomije biljaka, rasta i ponašanja biljaka, genetike biljaka i populacijske studije, botaničke klasifikacije temeljene na morfologiji i molekularne biologije biljaka (Coyle i Palmbach, 2008). Forenzička primjena uključuje prepoznavanje dokaza na mjestu zločina, primjereno prikupljanje i čuvanje dokaza, poštivanje slijeda postupaka za osiguranje dokaza, razumijevanje znanstvenih metoda testiranja, potvrđivanje novih forenzičkih pretraga, prijenos osnovnih znanja o primjeni i ograničenjima botaničkih dokaza istražiteljima, izradu referentnih populacijskih baza podataka i osiguranje okvirnih načela za prihvaćanje ovih dokaza na sudu. Metode forenzičke botanike značajno doprinose u istražnim postupcima, ali je njihova primjena još uvijek ograničena na identifikaciju biljnog uzorka i komparaciju analiziranih uzoraka (Coyle *et al.*, 2023).

Postoji veliki broj načina na koji se biljke mogu predočiti kao biološki dokazi, a navodimo tek nekoliko primjera iz prakse:

- mrlje od trave na odjeći nakon seksualnog napada
- lišće i stabljike biljaka zahvaćene vozilom na sekundarnom mjestu zločina gdje je odbačeno tijelo žrtve
- sjemenje koje se zadržalo na odjeći provalnika pri bijegu s mjesta provala u kuću
- sadržaj želuca s biljnom tvari iz žrtvinog posljednjeg obroka kako bi se potvrdilo vrijeme smrti ili alibi prema lokaciji
- pelud za određivanje godišnjeg doba kad su posmrtni ostatci zakopani u masovnu grobnicu
- geografsko profiliranje kako bi se utvrdila moguća područja s kojih bi neki biljni uzorak mogao potjecati.

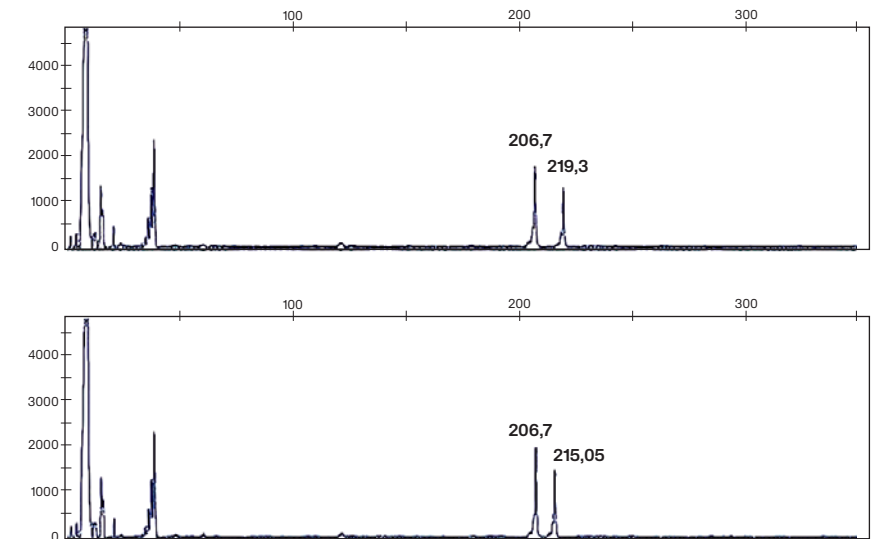
Svi ovi primjeri služe kao pomoć u utvrđivanju veza između neke osobe i nekog predmeta, osobe i mjesta ili, osumnjičenika i žrtve. Kad je malo drugih bioloških dokaza, biljke mogu pružiti vrijedne dokaze u takvom slučaju, a često ih se previdi zbog mikroskopske veličine peludnih zrnaca ili sićušnog sjemenja. Biljni materijal s mjesta zločina često je degradiran i morfološki neprepoznatljiv, pa je karakterizacija na molekularnoj razini jedini način detekcije i identifikacije biljne vrste. Uz to, važno je naglasiti da forenzička botanika igra značajnu ulogu u zločinima protiv života u divljini (zaštićena flora i fauna) te kod analize otrovnih biljaka.

9.1.1. Osnovne molekularno-genetičke tehnike u analizi biljnoga materijala

9.1.1.1. Analiza STR molekularnih biljega na biljnim tragovima

STR biljezi su visoko individualizirani molekularni biljezi i izvrsni su za analizu biljnih uzoraka kad ih se optimizira za analizu određene biljne vrste. Ako već postoji panel STR biljega ili ako nema ograničenja u potrebnom vremenu i sredstvima, tada je ovo dobra metoda (Newton i Vo, 2003). Međutim, ova tehnologija zahtijeva optimizaciju primjene za svaku biljnu vrstu ponaosob, stoga se relativno rijetko koristi u standardnim (rutinskim) forenzičkim analizama tragova s mjesta zločina. U takvim je slučajevima AFLP metoda bolji i isplativiji izbor jer je ova tehnologija univerzalno primjenjiva na svaku biljnu vrstu. Kao i kod humanih tragova, obično se primjenjuju multipleksni mikrosatelitni sustavi.

Za razliku od forenzičkog testiranja identiteta u ljudi, može se dogoditi da alelna ljestvica nije dostupna za svaku biljnu vrstu pa se određivanje alelnih



SLIKA 9.1. Usporedna analiza rezultata dobivenih na mikrosatelitnom lokusu EMCs17 iz uzoraka lista domaćeg kestena *Castanea sativa* Mill.

varijanti zasniva na programskoj analizi i mobilnosti odsječka bez referentne vrijednosti. Prednost korištenja STR biljega, kako je već navedeno, relativno je kratak vremenski period kreiranja DNA profila te mogućnost dobivanja kompletnih DNA profila iz vrlo malih količina, čak i visoko degradirane DNA. Biljni STR biljezi pogodni su za jednostavnu komparativnu analizu u kojoj softver konvertira fragmente različitih veličina u alelne varijante i na taj način omogućava jednostavnu interpretaciju rezultata (slika 9.1.).

Analiza STR biljega pokazala se učinkovitom u detekciji i identifikaciji različitih sojeva marihuane (*Cannabis sativa* L.). U nekoliko provedenih studija identificirano je i izolirano 10 STR biljega koji su korišteni u analizi 225 uzoraka marihuane u preko trideset zemalja. Rezultati analize uspješno su primijenjeni u istražnim postupcima, ali je neophodno dodatno optimizirati i validirati metodu u cilju razvijanja multipleksnog STR sustava. To bi pomoglo u povezivanju proizvođača, distributera i korisnika marihuane u cijelom svijetu (Carita, 2004).

9.1.2. Analiza nasumičnih (nepoznatih) polimorfnih biljega

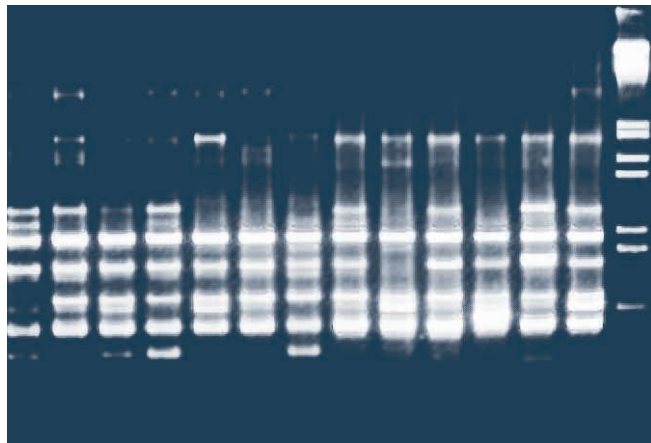
Analiza nasumičnih polimorfnih biljega je u detekciji, identifikaciji i analizi mnogobrojnih biljnih vrsta dala izuzetno dobre rezultate. Nasumični biljezi predstavljaju neke dijelove genoma koji su slučajnim odabirom umnožavaju. Analiziranjem

dovoljnog broja nasumično umnoženih regija genoma moguće je utvrditi individualne sličnosti ili razlike među analiziranim uzorcima. Najčešće korišteni nasumični biljezi u forenzičkim analizama biljnih uzoraka nasumično su umnožena polimorfna DNA (RAPD – engl. *randomly amplified polymorphic DNA*) i amplificirani fragmenti DNA različitih dužina (AFLP – engl. *amplified fragment length polymorphism*).

9.1.2.1. Analiza nasumično umnožene polimorfne DNA (RAPD)

RAPD metoda temelji se na umnožavanju nasumično odabranih, kratkih (veličine 10 bp) DNA sekvenci. Genotipizacija uzoraka vrši se gel elektroforezom pri čemu se analiziraju umnoženi fragmenti, njihova dužina i prisustvo, odnosno odsustvo dijelova fragmenta (slika 9.2.). RAPD analiza često se koristi u botaničkoj forenzici za povezivanje žrtve i mjesta zločina, za neautoriziranu komercijalizaciju biljaka prilikom patentiranja biljnih proizvoda, kao i za analizu želučanog sadržaja žrtve (Cheng-Lung, 2005; Horrocks i Walsh, 1999).

Iako je sama metodologija vrlo jednostavna i izvodiva u gotovo svim laboratorijima, RAPD analiza ima nekoliko ograničenja. Jedan od najvećih jest što je većina RAPD biljega dominantna pa nije moguće utvrditi je li amplificirani lokus homozigotan ili heterozigotan. Osim toga, RAPD analiza visoko je osjetljiva pa će bilo kakve promjene u laboratorijskim uvjetima utjecati na krajnji ishod analize. Primjenu ove metode kod bakterija detaljnije smo opisali u poglavlju 11.



SLIKA 9.2. Gel elektroforeza RAPD umnoženih DNA sekvenci vrste *Manihot esculenta* Crantz (kasava). Prvi uzorak s desne strane je biljeg, odnosno DNA ljestvica (λ HindIII/EcoRI) (dijelovi slike preuzeti iz Colombo *et al.*, 2000).

9.1.2.2. Polimorfizmi dužine amplificiranih odsječaka (AFLP)

Vos i suradnici (Vos *et al.*, 1995) prvi su opisali metodologiju AFLP koja predstavlja metodu za genotipiziranje biljnih uzoraka iz jednog izvora. Tehnika AFLP temelji se na detekciji genomskih restriktivskih fragmenata nakon umnožavanja DNA pomoću PCR-a. Ova metoda omogućava pregledavanje polimorfizama na velikom broju mjesta u kratkom vremenu, a zahtijeva samo malu količinu DNA (oko 10 ng). AFLP metoda najbližnja je izvornoj ranije opisanoj RFLP metodi za identifikaciju ljudi koju je razvio i upotrebljavao Alec Jeffreys.

Prvi korak AFLP metode jest digestija DNA s dva enzima koji prepoznaju specifične DNA sekvence u genomu, dužine 4-6 bp (slika 9.3.). Nakon digestije, adapteri poznate sekvence vežu se na krajeve fragmenata, nakon čega se dodaju i PCR početnice. Za razliku od RAPD metode, analiza fragmenata provodi se na genetičkom analizatoru, pri čemu se, isto kao i u RAPD metodi, utvrđuju varijacije u dužini fragmenata nastale dodavanjem ili gubljenjem restriktivskih mjesta ili insercijama i delecijama između njih.

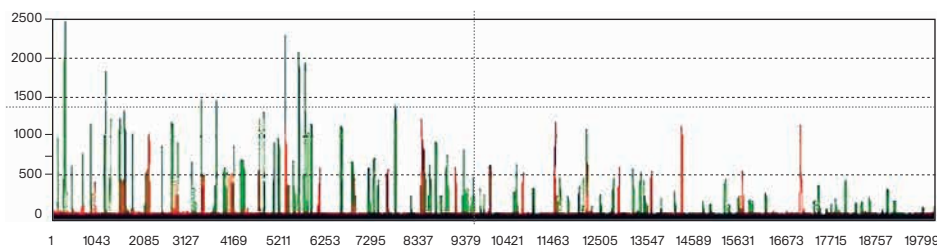
Iako postoje i druge tehnike tipiziranja DNA koje su razvijene za specifične namjene, analiza AFLP najčešće se koristi jer je primjenjiva na široki spektar biljnih uzoraka, bez obzira na vrstu (Ward *et al.*, 2005). U forenzičkim analizama, AFLP metoda koristi se za individualizaciju uzoraka marihuane, ali i za povezivanje uzgajivača, distributera i konzumenata marihuane (Coyle, 2004).

Na tržištu je dostupno nekoliko setova za analizu AFLP i oni svi su zasnovani na generalnoj proceduri, koju čine:

- reakcija enzimske digestije-ligacije
- PCR predselektivno umnožavanje većeg DNA fragmenta jednim parom početnica kako bi se stvorio ciljani fragment za daljnju analizu
- PCR selektivno umnožavanje i fluorescentno obilježavanje podskupine DNA fragmenata kako bi se stvorio individualizirajući biljni DNA profil i
- detekcija DNA fragmenata primjenom automatske elektroforeze.

Iako je AFLP vrlo pogodan za analizu botaničkog materijala, metoda ima nekoliko ograničenja. Za analizu je potrebna visoka čistoća izolirane DNA, što je ponekad vrlo teško postići s obzirom na prisustvo mnogobrojnih inhibitora u biljnoj stanici. Osim toga, ne postoji mogućnost analize smjese uzoraka te je nemoguće identificirati i isključiti kontaminante iz konačne analize (Carita, 2004).

Kada su u pitanju najčešće korišteni komercijalni kompleti za ovu analizu, izdvojit ćemo dva koji se najčešće spominju u literaturi iz područja forenzičke genetike.



SLIKA 9.3. AFLP-PCR analiza vrste *Persicaria* sp. Na x-osi prikazana je veličina fragmenta u nukleotidima, a na y-osi relativna jedinica fluorescencije (RFU).

1. AFLP® Analysis System I (Thermo Fisher Scientific) primjenjiv je za analizu biljnih genoma veličine između 5×10^8 i 6×10^9 bp, što uključuje komercijalno važne vrste (rajčica, krastavac, soja, kukuruz, kupusnjače, suncokret, ječam i slično), a proizvodi između 50 i 100 fragmenata na gelu (Invitrogen Life Technologies, 2003).
2. IRDye® Fluorescent AFLP® Protocol for Large Plant Genome Analysis sastoji se od dva seta kemikalija, i to za pripremu DNA (AFLP® Template Preparation Kit) i selektivnu amplifikaciju (AFLP® Selective Amplification Kit), a primjenjiv je na biljne genome veličine kao kod prethodnog kompleta (Li-Cor Biosciences, 2010).

9.1.2.3. SNP analiza biljnog genoma

Najnoviji trendovi u forenzičkim analizama botaničkog materijala koriste analize polimorfizama jednog nukleotida (SNP analize) i mikročip tehnologije kojima bi se mogle premostiti spomenute poteškoće. Prednost ovog pristupa njegova je visoka fleksibilnost, lakoća prilagodbe različitim vrstama i kvaliteti početnog DNA uzorka, kao i ogroman broj metoda kojima se SNP-ovi mogu analizirati, uključujući *in silico* (bioinformatičke) te *in vitro* metode. Što se tiče *in vitro* metoda one mogu uključivati sekvenciranje pomoću različitih NGS i shotgun metoda, kao i ciljano sekvenciranje regija umnoženih PCR-om, a mogu biti temeljene i na metodama koje ne uključuju sekvenciranje, poput restrikcijske digestije i mikročipa (Morgil *et al.*, 2020). Ipak, ove tehnologije izrazito su skupe i zahtijevaju interlaboratorijsku validaciju i kreiranje informativne baze podataka s velikim brojem biljnih vrsta, te se stoga vrlo rijetko koriste za genotipizaciju botaničkih uzoraka. Jedan od primjera uspješne upotrebe SNP analize biljne DNA je Maize-SNP50 DNA Analysis Kit, odnosno mikročip za ispitivanje genetičke varijacije u sortama kukuruza. Metodu je razvila tvrtka Illumina, uz pomoć tvrtki Trait-

Genetics (Gatersleben, Njemačka), Syngenta (Bazel, Švicarska) te Francuskog nacionalnog instituta za poljoprivredna istraživanja (INRA). U pitanju je analiza preko 50 000 biljega iz referentnog B73 genoma, dodatno analiziranog na 30 sojeva kako bi se utvrdila polimorfnost ciljanih markera. Dodatno, metoda pruža gustoću analize od 25 biljega na 1 Mbp, što omogućuje informativnu analizu diljem genoma (Illumina, <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/maize-snp50.html>, pristup 17.9.2023.).

9.1.2.4. Identifikacija vrste

Ispravna identifikacija biljke do razine vrste korisna je ako se nastoji utvrditi povezanost s primarnim ili sekundarnim mjestom zločina. Žrtve često budu ubijene na jednom mjestu i potom premještene na sekundarno mjesto u nastojanju da se zločin sakrije. Mnogi slučajevi u kojima su uvedeni biljni dokazi uključuju dokaze nađene stisnute u žrtvinoj ruci, na žrtvinoj odjeći, na pokrivaču ili u vozilu koje je upotrijebljeno za prijevoz žrtve. U drugim slučajevima treba ispitati odgovaraju li fragmenti drva prikupljeni s vozila, drvetu koje se nalazi na mjestu zločina ili, mogu li se iglice bora nađene u cijevi pištolja povezati s drvetom koje se nalazi na mjestu gdje je napadač čučao čekajući žrtvu. Ovi primjeri mogu izgledati kao neki čudni oblici asocijativnih dokaza, no oni se temelje na stvarnim slučajevima u kojima je zatražena individualizacija biljke pomoću DNA. Identifikacija biljne vrste odgovara na pitanje „koja je ovo vrsta biljke i u kojem podneblju ona raste?“, no ne može osigurati individualizaciju koja odgovara na pitanje „potječe li ovaj fragment s ovoga drveta i to isključivo s ovoga drveta?“. Identifikacija biljne vrste prvi je neophodan korak kad se nastoji utvrditi forenzička povezanost, a potom se provodi individualizacija ako je na raspolaganju dostatan uzorak za testiranje DNA (Coyle i Palmbach, 2008).

Identifikacija vrste može se provesti procjenom znakovitih fizičkih obilježja biljnoga dokaza. Međutim, često je fragment premalen ili nema dovoljno detalja za zaključnu identifikaciju. U takvoj situaciji primjenjuje se analiza DNA za identifikaciju vrste (Coyle i Palmbach, 2008). Međutim, izolacija DNA iz biljnog materijala vrlo je osjetljiv korak u molekularno-genetičkim analizama, prvenstveno zbog specifičnosti biljne stanice koja sadrži staničnu stijenku, ali i zbog prisustva mnogobrojnih sekundarnih metabolita koji djeluju kao inhibitori pojedinih faza ekstrakcije i PCR analize. Iako su na tržištu dostupni kitovi za izolaciju DNA iz biljnog materijala, često je neophodno koristiti protokole koji predviđaju uklanjanje različitih inihibitora. Pregled komercijalno značajnih kitova nalazi se u tablici 9.1.

Dio izolirane biljne DNA se nakon uspješne ekstrakcije i odvajanja od ostatka materijala, umnožava pomoću specifičnih PCR početnica za selektivno ciljanu

TABLICA 9.1. Komercijalno dostupni kompleti za izolaciju biljne DNA.

Komplet	Proizvođač	Opis
DNeasy Plant Pro	Qiagen	Prilagođen izolaciji DNA iz posebno izazovnih uzoraka, uz superiorno uklanjanje inhibitora PCR-a, bez korištenja organskih otapala i etanola
PureLink™ Genomic Plant DNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	Optimiziran za izolaciju ukupne DNA, uključujući plastidnu, unutar 40 minuta i s minimalnom kontaminacijom s RNA
GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific	Preporučeni za izolaciju svih vrsta DNA iz najrazličitijih početnih uzoraka, brzo, efikasno i primjenjivo za dalju upotrebu
Maxwell® RSC Plant DNA Kit	Promega Corp.	Automatizirana ekstrakcija DNA iz različitih biljnih tkiva spremna za daljnju upotrebu
Plant Genomic DNA Mini Kit	Geneaid	Adekvatan za svježe ili uzorke tretirane tekućim dušikom, uz brzu izolaciju i zadovoljavajuću čistoću uzorka
E.Z.N.A.® Plant DNA Kit	Omega Bio-Tek	Izolacija pomoću spin kolona omogućava kratko vrijeme izolacije, izbjegavanje organskih otapala i koristi optimizirani sustav pufera, koji daje konstantne i pouzdane rezultate

regiju koja je specifična za tu biljnu vrstu. Postoje stotine biljnih sekvenci koje se mogu koristiti za identifikaciju na temelju DNA, a danas je na raspolaganju mnoštvo baza podataka (npr. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) koje se mogu pretraživati radi potvrde podataka o sekvencama. Evolucijske i taksonomske studije identificirale su nekoliko biljnih lokusa koji su visoko konzervirani u mnogobrojnim biljnim vrstama. Danas se rutinski koriste za identifikaciju biljnih vrsta, a među najčešće korištenim su sekvence za malu ribosomalnu podjedinicu (18S) i ITS1 i ITS2 (engl. *Internal Transcribed Spacer*) sekvence (Hall i Byrd, 2012) te nekodirajuće sekvence plastidnih regija gena kao što su: atpB (ATP sintaza beta), ndhF (NADH dehidrogenazna podjedinica 5), trnL (tRNA-Leu) i rbcL (ribulozo-1,5-bisfosfat karboksilaza) (Ferri *et al.*, 2009) koja sadrži 1400 baznih parova i do sada je identificirana u genomu 6500 biljnih vrsta (Bever, 2005). Još je jedan koristan biljeg gen matK iz genoma kloroplasta koji se koristi za identifikaciju otrovnih biljnih vrsta (Coyle *et al.*, 2014).

Nakon dobivanja sekvenci iz uzorka, one se uspoređuju sa sekvencama dostupnim u NCBI bazi podataka. Za usporedbu podataka koristi se BLAST algoritam (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) koji sekvencu od interesa uspoređi s nizom sličnih, poznatih sekvenci koje su sadržane u bazi. Podudaranje može biti apsolutno (100%) ili

manje. Ovisno od sekvence od interesa i biljne vrste, visok postotak podudaranja ukazuje na identifikaciju na razini vrste. Međutim, ako je poklapanje manje od 100%, neophodna je filogenetska analiza za bolju karakterizaciju sekvence. S obzirom da NCBI baza podataka sadrži poznate sekvence mnogih biljnih vrsta, moguće je napraviti i filogenetsku analizu. Filogenetske metode vrlo su korisne za određivanje roda ili porodice kojoj sekvenca danog uzorka pripada. Naravno, najinformativniji je ishod analize sekvenca određena na razini vrste, ali su često vrlo korisni i podatci dobiveni na razini roda ili porodice. Osim toga, globalna distribucija većine biljaka dobro je poznata te je nakon uspješne identifikacije sekvence (na razini vrste, roda ili porodice) moguće međusobno povezivati dokaze i dovoditi ih u vezu s mjestom i geografskom lokalizacijom zločina (Bever, 2005).

U prvoj polovini 1990-ih godina, mlada žena ubijena je u Phoenixu, Arizona, a tijelo je ostavljeno u pustinji. Na mjestu zločina pronađen je dojavljivač (engl. pager) koji je predstavljao osnovnu vezu s osumnjičenim, koji je tvrdio da je povezoao žrtvu, ali da ga je ona opljačkala, tj. da mu je ukrala novčanik i dojavljivač. Forenzički eksperti ispitali su kamion osumnjičenika i prikupili biljne tragove za koje se poslije ustanovilo da predstavljaju plodove biljaka roda *Cercidium* (Parkinsonija, rod cvjetnica iz porodice graška). Istražitelji su otišli na mjesto zločina na kojem je bilo više primjeraka ovoga drveta, a na jednom od njih primijećeno je oštećenje koje je moglo nastati od kontakta s vozilom. Nakon toga, istražitelji su kontaktirali više ustanova u nadi da će u jednoj od njih moći izvršiti komparaciju DNA s pronađenih tragova na kamionu i oštećenog drveta. Na kraju, znanstvenici sa Sveučilišta Arizona (Tucson) uspjeli su dokazati jedinstveni DNA milje ispitanih drveta pomoću RAPD-PCR analize i utvrditi da se radi o istom drvetu u oba dokaza. Ovo je bilo moguće zahvaljujući činjenici da je ovaj rod biljaka karakterističan po iznimnoj polimorfnosti unutar vrste. Ovo je ujedno prvi slučaj u kojem je biljna DNA prihvaćena kao dokaz na sudu, a osumnjičeni je osuđen za ubojstvo prvog stupnja (Botanical Society of America, 2006).

9.1.2.5. Palinologija i mikologija

Palinologija, odnosno ispitivanje peludi, može biti odlučujuća u svrhu povezivanja ostalih forenzičkih dokaza i za utvrđivanje vremena smrti. Zrna peludi mogu se koristiti za identifikaciju vrste, kako je iznad opisano, kao i određivanje geografske disperzije biljnih vrsta, a posebno je značajna njihova otpornost na nepogodne vremenske uvjete, jer dugo ostaju očuvana i korisna za analizu. Iako ne pripada u popularnije forenzičke alate, postoje slučajevi kada je pelud bio značajna dodatna

metoda analize u forenzici, poput istraživanja ratnih zločina u Bosni i Hercegovini. Pelud i spore koriste se kao asocijativni dokazi za usmjeravanje istrage u različitim vrstama zločina, uključujući ubojstvo i samoubojstvo, tjelesni i seksualni napad, trgovinu drogom, krivotvorenje i oružanu pljačku.

Kratko ćemo spomenuti i mikologiju (istraživanje gljiva) u kriminalnim obradama, iako je ovo područje forenzičke genetike zasebno. Upotreba gljiva u forenzici uglavnom se susreće u slučajevima trovanja i halucinacija, a mogu biti korisne i za određivanje vremena smrti i lociranja mjesta ukopa tijela (Coyle *et al.*, 2014).

9.2. OSNOVE ANIMALNE FORENZIČKE ANALIZE DNA

Jedna od mogućih podjela pri analizi DNA životinjskih uzoraka podjela je prema vrsti životinje od koje biološki uzorak potječe. Temeljna je podjela na (1) forenzičku entomologiju i (2) animalnu forenziku kralježnjaka (potkoljeno *Vertebrata*). Forenzička entomologija ima primjenu gotovo isključivo kao pomoćni alat u humanoj forenzici dok animalna forenzika kralježnjaka ima podjednaku primjenu u humanoj forenzici i animalnoj forenzici u širem smislu (Čurić i Lauc, 2008; Čurić i Lauc, 2008; Menotti-Raymond *et al.*, 2023; Wells i Škaro, 2023).

9.2.1. Forenzička entomologija

Entomologija se bavi proučavanjem životinja koljena člankonožaca (*Arthropoda*), uglavnom razreda kukaca (*Insecta*), dok se forenzička entomologija bavi proučavanjem kukaca i ostalih člankonožaca u svjetlu pravnih i kriminalističkih istraga. Najčešća primjena forenzičke entomologije je u sudsko-medicinskim slučajevima, dakle kod ubojstava, samoubojstava, silovanja, fizičkog zlostavljanja i krijumčarenja. Analiza DNA ima dominantnu praktičnu primjenu u sudsko-medicinskoj forenzičkoj entomologiji te je to predmet razmatranja ovog dijela poglavlja. Analizom DNA kukaca može se (1) povezati osumnjičeni s mjestom zločina ili sa žrtvom, (2) dokazati da je tijelo žrtve bilo pomaknuto ili (3) utvrditi vrijeme smrti žrtve.

Uz pomoć forenzičke entomologije, proučavanjem prisutnih nekrofagnih vrsta i utvrđivanjem razvojnih stadija kukaca koji se hrane truplom, vrijeme proteklo od trenutka smrti do otkrića tijela može se točno procijeniti za interval od jednog dana do nekoliko tjedana. U forenzičkoj entomologiji je uz razvojni stadij pronađenog kukca ključna i točna identifikacija vrste. Prepoznavanje na osnovi morfoloških obilježja često je teško te je potrebno vrlo specijalizirano taksonomsko znanje. U slučajevima nemogućnosti razlikovanja ličinki kukaca, rješenje problema može biti identifikacija vrste na temelju analize genetičkog materijala. Moderne analize DNA omogućuju brzu i pouzdanu identifikaciju

nekrofagnih kukaca. Analizom DNA (mitohondrijskog ili nuklearnog porijekla) moguće je utvrditi vrstu kukca u svakoj fazi životnog ciklusa, a također i u slučajevima kada su dostupni samo dijelovi kukaca (čahure ličinki, raspadnute ličinke ili dijelovi odrasle jedinice). Analiza DNA je u slučajevima kada je dostupna mala količina uzorka jedina moguća opcija.

Kada je god to moguće, analiziraju se primjerci u najkasnijem razvojnom stupnju, zbog sprečavanja kontaminacije stranom DNA (u kasnim stadijima su crijeva ličinki prazna) te zbog što točnijeg utvrđivanja posmrtnog razdoblja. Referentni primjerak vrste koji služi za komparaciju obično je dio entomološke zbirke, a izolacija može biti neuspješna zbog degradacije DNA kroz vrijeme ili zbog upotrebe etilnih estera za ubijanje kukca.

Često su analizirani mitohondrijski geni za podjedinice I i II citokrom oksidaze (COI i COII), 12S rRNA i 18S rRNA. Od nuklearno kodiranih gena, najčešće su analizirani 18S rRNA i 28S rRNA. InsectBase baza podataka sadrži više od 16 milijuna sekvenci DNA izolirane iz insekata, uključujući 817 genoma insekata (Mei *et al.*, 2022; <http://v2.insect-genome.com/>, pristupljeno 17.9.2023.). Od mitohondrijskih gena najviše je proučavan COI, kao dio pristupa COI DNA *barcodinga* – inicijative da se na globalnoj razini stvori baza podataka sa sekvencama COI gena svih životinja na Zemlji. Smislenost stvaranja takve univerzalne baze podataka još je uvijek predmet žustrih debata, ali je projekt i dalje aktivan te proširen mimo životinjskih vrsta i na ostale vrste, s njihovim reprezentativnim genima i sekvencama (<https://www.gbif.org/>). Budući da su muhe forenzičko najvažniji kukci, istraživanja su bila usredotočena na rod dvokrilaca (*Diptera*). Unosom niza baza nepoznatog uzorka moguće je učiniti filogenetičku analizu, tj. usporediti nepoznati uzorak s homolognim podacima poznatih uzoraka. Ako se takvom analizom i ne otkrije točna vrsta, može se suziti izbor mogućih vrsta te zatim nastaviti s ciljanom analizom. Iako su varijacije unutar vrste uglavnom manje od varijacija između vrsta, potrebna je pažljiva interpretacija jer podatci o sekvencama i varijacijama još nisu potpuni. Dodatni su problem moguća križanja između različitih vrsta te moguće bitne razlike DNA sekvenci kod primjeraka iste vrste iz geografski udaljenih lokaliteta.

Analiza DNA sekvence, tj. sekvenciranje, zasigurno je najzastupljenija metoda u forenzičkoj entomologiji, prvenstveno jer je to najinformativnija među dostupnim metodama analize DNA. Setovi reagencija za analizu, genetički analizatori i programska podrška učinili su analizu sekvenci dostupnom i relativno lako izvedivom. Mnoge tvrtke danas nude analizu sekvence po relativno povoljnoj cijeni.

PCR-RFLP analiza (engl. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) koristi se rjeđe, prvenstveno zbog slabije pouzdanosti. Kao što je

već opisano, umnoženu DNA kidaju endonukleaze na karakterističnim mjestima te se dobivaju fragmenti DNA različite dužine. Ovom se metodom dobiva informacija samo o manjem dijelu sekvence te u slučaju varijacije redoslijeda nukleotida unutar vrste na restriksijskom mjestu može doći do lažnog isključivanja.

Metoda nasumično umnožene polimorfne DNA, odnosno **RAPD-PCR analiza**, omogućuje brzu identifikaciju vrste kukca i može poslužiti kao izuzetno dodatno oruđe klasičnoj morfološkoj analizi. Jedan primjer primjene ove metode bilo je utvrđivanje jesu li ličinke nađene u vreći s tijelom bile identične onima nađenim izvan vreće i kukuljicama na podu ispod tijela. S obzirom na broj vrsta kukaca, jedan od glavnih problema u klasificiranju i analizi DNA je nedostatak prikladnih početnica za PCR. Početnice za RAPD analizu nisu specifične za vrstu, a ipak stvaraju jedinstveni uzorak za mnoge životinje i biljke. Nedostatak ove metode jest osjetljivost na razlike u reakcijskim parametrima PCR, uključujući i primjenu različitih instrumenata, no standardizacijom i matematičkim pristupom značajno je unaprijeđena. RAPD analiza ograničenih je mogućnosti – pouzdana je u isključivanju (da su dva uzorka različita), no ne i potvrdi da dva uzorka potječu od iste jedinke ili vrste, zbog mogućnosti istog ili sličnog RAPD uzorka kod neke druge životinje. Usprkos navedenim ograničenjima, RAPD analiza mogla bi biti koristan alat u hitnim forenzičkim slučajevima identifikacije ličinki, kada uzgoj do odrasle dobi, zbog manjka vremena, nije moguć. Također je moguće razlikovanje ličinki iz različitih vremena polaganja jajašaca.

Polimorfizam konformacije jednonolančane DNA – SSCP (engl. *Single Strand Conformation Polymorphism*) vrlo je rijetko korištena metoda u forenzičkim analizama. Omogućuje samo izravnu usporedbu (*site-to-site*), jer se dobivaju rezultati koji se teško mogu provjeriti u drugom laboratoriju. To je također metoda koja brzo daje rezultate analize, no ne može osigurati nedvojbeno određivanje vrste.

9.2.1.1. Analiza humane DNA izolirane iz kukaca

Analiza humane DNA izolirane iz kukaca još je jedna bitna primjena molekularnih metoda u rasvjetljavanju zločina. Ova metoda može biti korisna (1) u slučajevima kada je tijelo dislocirano te su pronađene samo ličinke na mjestu mogućeg ubojstva, (2) na mjestu zločina postoji alternativni izvor hrane koji je mogao rezultirati pojavom ličinki nekrofagnih kukaca ili (3) kada je pouzdanost prikupljenih dokaza sporna. Dokazom humane DNA u probavnom sustavu ličinke može se potvrditi da se ona hranila ljudskim mrtvim tijelom. Analizom takve humane DNA (npr. D-petlja ili STR lokusi) može se dokazati da se ličinka hranila točno određenim mrtvim tijelom.

Za takvu analizu se izolacija DNA iz ličinke radi i za utvrđivanje vrste kukca i za povezivanje ličinke s njenim posljednjim obrokom. Budući da je to relativno novo područje istraživanja, ova je metoda još neispitanih ograničenja. Istraživanja su potvrdila logičnu pretpostavku da su zrele ličinke (engl. *third-instar larvae* – duge 15-20 mm, stare četiri do šest dana) koje se aktivno hrane na mrtvom tijelu najbolji izvor ljudske DNA. Prilikom dokazivanja ljudske DNA u probavnom sustavu kukca ključna je specifičnost početnica. Identifikacija ljudi na temelju mitohondrijske DNA obično počiva na dvije hipervarijabilne regije (HV1 i HV2) unutar nekodirajuće kontrolne regije (D-petlja) ljudske mitohondrijske DNA. Razlikovanje među kralježnjacima također može biti temeljeno na D-petlji, iako je za većinu životinja biljeg izbora kodirajući gen (npr. citokrom b, Cytb). Za kukce su „forenzički” geni oni za podjedinicu I i II citokrom oksidaze (COI i COII). DNA kralježnjaka iz različitih kukaca uspješno se može umnožiti i analizirati. DNA izolirana iz komarca (do 26 sati nakon hranjenja) kvalitativno i kvantitativno je zadovoljavajuća za identifikaciju (upotrebom analize mikrosatelitnih i minisatelitnih ponavljanja).

9.2.1.2. Analiza ribonukleinske kiseline (RNA analiza)

Insekti prolaze kroz mnogobrojne morfološke i fiziološke promjene tijekom životnog ciklusa. Različiti stadiji u razvojnom ciklusu insekata koriste se za procjenu starosti raznih forenzičkih uzorka. Međutim, ponekad je teško samo na temelju morfoloških karakteristika odrediti starost insekta, što je slučaj i kod nekih vrsta muha zunzara (porodica *Calliphoridae*) koje su istih morfoloških karakteristika u dva različita stadija larve. Istraživanja su pokazala da se ekspresija gena, koji sudjeluju u razvojnim ciklusima insekata, može pratiti mjerenjem razine informacijske RNA (iRNA). Naime, uočeno je da je razina iRNA različita u dvije forme larvi vrste *Lucilia sericata* (Tarone, 2007). Kako je procjena starosti insekata od izuzetne važnosti u forenzičkim analizama, RNA analiza mogla bi postati snažan alat u rutinskim forenzičkim analizama. Jedan od najvećih nedostataka RNA analize je što je RNA molekula, za razliku od DNA, kemijski nestabilna pa je neophodno provesti dodatna istraživanja s ciljem optimizacije protokola za prezervaciju RNA neophodne za analizu (Byrd i Castner, 2010).

9.2.2. Forenzička analiza DNA kralježnjaka

Povremeno se u sudsko-medicinskoj problematici pojavljuju biološki tragovi koji ne potječu od ljudi te je utvrđivanje vrste kojoj uzorak pripada prvi korak u postupku identifikacije. Tradicionalno se to postizalo proučavanjem određenih morfoloških karakteristika i analizom specifičnih proteina (elektroforetskim,

kromatografskim ili imunološkim metodama). Danas se ova analiza temelji na uspoređivanju sekvenci nukleotida određenih regija DNA. Gotovo se svaka vrsta može genetički okarakterizirati s visokim stupnjem sigurnosti.

9.2.2.1. Analiza animalne nuklearne DNA

U oko 90% objavljenih studija molekularne identifikacije životinja upotrijebljena je neka od sljedeće tri metode: vrsno specifični PCR, PCR-RFLP i PCR-FINS (engl. *forensically informative nucleotide sequencing*). Vrsno specifični PCR temelji se na primjeni početnica karakterističnih za određenu vrstu. PCR-RFLP je analiza polimorfizma dužine restrikcijskih fragmenata nakon lančane reakcije polimerazom (npr. umnoženi fragmenti citokroma b se izlože djelovanju različitih restrikcijskih enzima, a zatim se analiziraju dobiveni fragmenti). Prednosti vrsno-specifičnog PCR-a i PCR-RFLP analize su brzina razvoja molekularnih biljega, niska cijena i nedvosmisleni rezultati.

PCR-FINS je najizravnija metoda za dobivanje informacija iz produkata umnažanja DNA, a temelji se na primjeni univerzalnih početnica za neke (forenzički informativne) regije ili gene. Ovaj pristup omogućuje identifikaciju velikog broja vrsta, ali ipak nije previše informativna za varijacije unutar vrste. Prednost je i da se pomoću kloniranja može dokazati DNA različitih vrsta u istom uzorku. Novije metode poput lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) i DNA čipova nisu još uvijek značajno zastupljene u animalnoj forenzici.

Pri forenzičkoj analizi nuklearne DNA kod životinja se gotovo isključivo radi o analizi mikrosatelitnih ponavljanja. Druge metode analize DNA, poput RFLP i RAPD analize, rjeđe su korištene, prvenstveno zbog slabije dokazne snage tih markera, iako te metode imaju neke prednosti (kao metoda probira, zbog niže cijene). Ipak, visok stupanj srodnosti koji je uobičajen kod domaćih životinja bitno smanjuje varijacije u mikrosatelitnim ponavljanjima i time njihovu dokaznu vrijednost. Većim brojem proučavanih lokusa postiže se visoka moć razlučivanja te je utvrđeno da pseći STR lokusi imaju skoro podjednaku diskriminatornu moć kao ljudski STR lokusi. Većina studija proučava nekoliko vrsta životinja u tri glavne skupine kralježnjaka – sisavaca, riba i ptica (nuklearna DNA i/ili mitohondrijska DNA). U sisavaca se u većini studija radi o psima i mačkama te ostalim češćim domaćim životinjama (govedo, svinja, ovca i koza), dok su ostalo uglavnom ugrožene vrste životinja. Među pticama, u 60% studija radilo se o kokošima i/ili purama, dok se u ostalim studijama najčešće radilo o guskama, patkama i nojevima. Broj proučavanih ribljih vrsta puno je veći, no najčešće su proučavani tuna, losos i kečiga. Usprkos relativno velikom broju objavljenih istraživanja, broj vrsta za koje postoje podatci o molekularnoj identifikaciji je još relativno malen,

TABLICA 9.2. Komercijalni mikrosatelitni kompleti za analizu životinjske DNA.

Pas, vuk	StockMarks™ for Dogs Genotyping Kit, canine (Thermo Fisher Scientific) Canine Genotypes Panel 1.1 i 2.1 (Thermo Fisher Scientific)
Domaća mačka i druge vrste porodice <i>Felidae</i> (puma, ocelot itd.)	MeowPlex (Promega Corp.)
Govedo, bizon	StockMarks™ for Cattle Genotyping Kit, bovine (Thermo Fisher Scientific) Bovine Genotypes Panels 1.2, 2.2 i 3.1 (Thermo Fisher Scientific)
Konj, magarac, zebra i njihovi križanci	StockMarks™ for Horses 17-Plex Genotyping Kit, equine (Thermo Fisher Scientific) Equine Genotypes™ Panel 1.1 (Thermo Fisher Scientific)

možda za stotinjak vrsta. Još je manji broj vrsta za koje su kreirani komercijalni STR multipleksni sustavi (Tablica 9.2.).

Za životinjske vrste za koje postoji manji (forenzički) interes ne postoje komercijalni kitovi. Za te vrste još je potrebno dogovoriti nomenklaturu alela (najpraktičnije temeljeno na broju ponavljanja, sličnoj onoj za humane STR lokuse), razviti standard za svaki biljeg (*allelic ladder*) i odrediti kontrolni uzorak DNA, čime će se omogućiti usporedivost rezultata različitih laboratorija i primjenjivost populacijskih podataka u cijeloj forenzičkoj zajednici.

9.2.2.2. Analiza animalne mitohondrijske DNA

DNA u keratiniziranim stanicama dlake je dosta degradirana, dužine samo oko 100 bp. Ako analiza nuklearne DNA iz dlake ili iz drugih forenzičkih uzoraka ne daje rezultat, može se analizirati mtDNA. S obzirom na veći broj kopija (10^3 - 10^4 po stanici) i često manju degradaciju od nuklearne DNA, mitohondrijska DNA osobito je korisna pri analizi jako raspadnutih uzoraka (dlake ili nekih drugih životinjskih uzoraka).

Analiza životinjske mtDNA načelno se može podijeliti u dvije grupe analiza: (1) određivanje vrste od koje uzorak potječe i (2) određivanje jedinke unutar neke vrste/pasmine. Prikladan DNA biljeg za identifikaciju na razini vrste trebao bi biti dovoljno varijabilan među vrstama (osobito među onim najbližim) te bez ikakvih ili sa slabim varijacijama unutar vrste s obzirom na geografsku distribuciju. Uz to, taj bi biljeg trebao biti proučavan u velikom broju vrsta

da bi bila moguća usporedba nepoznatog uzorka s referentnim sekvencama iz baze podataka. Gen za citokrom b (Cytb, engl. *cytochrome b*) zadovoljava većinu ovih uvjeta te je daleko najčešće proučavan gen za filogenetičke potrebe. Preko milijun sekvenci citokroma b dostupno je u Nucleotide bazi podataka na NCBI-ju u trenutku pripreme ove knjige (kolovoz 2023. godine). Istovremeno, Gene baza podataka (NCBI) nudi sekvence i opise za 50 937 verzija ovog gena širom živog svijeta. Ovaj gen ima konzerviranu regiju, što omogućuje upotrebu univerzalnih početnica, ali i visoko varijabilne dijelove, što omogućuje proučavanje i diferencijaciju vrlo bliskih vrsta. Otprilike u polovini svih studija molekularne identifikacije ciljani gen je citokrom b. Upotrebom univerzalnih početnica za specifični segment mitohondrijskog gena citokroma b, može se odrediti pripadanje uzorka nekoj od velikog broja sekvenciranih vrsta. 3' krajevi početnica naliježu na evolucijski očuvanu regiju citokroma b, što osigurava univerzalnost primjene, a vrlo varijabilne nizvodne sekvence umnožene ovim početnicama omogućuju filogenetičku analizu do razine porodice, roda i vrste. Na osnovi analize gena citokroma b može se utvrditi filogenetičko srodstvo među vrstama, a slične genetičke analize danas su temelj moderne molekularne taksonomije i sistematike.

Učestalo proučavana regija mtDNA je i ranije spominjana D-petlja koja je dosta proučavana u genetici različitih životinjskih vrsta. Identitet jedinke unutar vrste/pasmine može se utvrditi analizom mtDNA. Slično kao što se radi u analizi humane mtDNA, kod pasa su proučavana dva hipervarijabilna segmenta, HVS-I i HVS-II (engl. *hypervariable segment I and II*) unutar kontrolne regije mtDNA. Sekvenciranje kontrolne regije u mačaka nešto je složenije zbog područja dugih ponavljanja – LTR (engl. *long tandem repeat*) u sredini. Ovo ponavljanje unosi značajan polimorfizam u sekvencu, no zbog veličine fragmenata može biti poteškoća pri sekvenciranju forenzičkih uzoraka, kao što su dlake. Među češće proučavanim biljezima su još geni za mitohondrijske 12S rRNA i 16S rRNA, kao i nuklearnu 18S rRNA, a povremeno je ispitivano još petnaestak drugih biljega.

9.2.3. Forenzička analiza DNA u kontroli porijekla prehrambenih proizvoda

Molekularne metode mogu biti primijenjene i za utvrđivanje porijekla prehrambenih proizvoda, ponajprije mesa, no i korištenih materijala u prehrani domaćih životinja. Specifičnost takve analize DNA su problemi zbog moguće jake degradacije DNA tijekom postupka proizvodnje. Sirovine prehrambenih proizvoda mogu biti podvrgnute termičkoj obradi, visokom tlaku, različitom pH, zračenju, isušivanju itd. Molekularne metode identifikacije takvih vrlo degradiranih proizvoda trebaju biti usmjerene na analizu vrlo kratkih odsječaka DNA, dugih

između 100 i 200 parova baza. Uz to što je degradirana, DNA je prisutna u maloj količini, što značajno smanjuje broj njenih fragmenata prikladnih za molekularnu analizu. Iz tih je razloga ponekad potrebno povećati broj ciklusa lančane reakcije polimerazom na 45 ili 55, da bi se dobila dovoljna količina DNA za kasnije analize. Početnice za analizu takve DNA moraju biti vrlo specifične. Za postizanje visoke pouzdanosti analize neophodno je pažljivo odvajanje postupaka prije i poslije lančane reakcije polimerazom te upotreba negativnih kontrola pri svakoj analizi. Pošto je PCR vrlo osjetljiva metoda, može se pretežno umnožiti samo jedna strana molekula DNA, umjesto degradirane DNA.

Mnogi sastojci hrane mogu biti izolirani zajedno s ciljnom DNA, a poznati su kao inhibitori umnožavanja DNA. Neki od njih su polisaharidi, glikogen, masti, bjelančevine mlijeka, kolagen i željezo. Dakle, nemogućnost umnožavanja DNA iz hrane ili forenzičkog uzorka (negativan rezultat) može biti objašnjena inhibicijom umnožavanja u reakciji lančanom polimerazom, a ne samo nepostojanjem ili nedovoljnom količinom ciljane DNA. Neke od inhibitora moguće je neutralizirati dodatkom BSA ili spermidina u reakcijsku smjesu za PCR. Opisane su brojne metode izolacije DNA, no nijedan se protokol nije pokazao prikladnim za sve vrste uzoraka. Za svaki novi oblik uzorka prehrambenog proizvoda može biti potrebno prilagoditi postojeće metode izolacije i umnožavanja DNA. Također, molekula DNA izolirana iz prehrambenih uzoraka, ali i iz drugih forenzičkih uzoraka izloženih različitim okolišnim uvjetima (kiseli medij, UV svjetlo, vlaga itd.), može biti kemijski modificirana. U takvim slučajevima mogu nastati lomovi ili mutacije, tako da pri analizi takvih uzoraka treba imati na umu i mogućnost postojanja tragova.

Uzimajući u obzir sve navedeno, dva su se pristupa pokazala kao najbolja kada je u pitanju analiza prehrambenih proizvoda na bazi PCR metode i to (1) SNP analiza i (2) VNTR analiza. SNP analiza bazira se na korištenju PCR amplifikacije i detekcije SNP-a na gel elektroforezi jer SNP zapravo predstavlja restrikcijsku poziciju endonukleaze te se stoga ove sekvence ponekada zovu cijepajuće umnažajuće polimorfne sekvence (engl. *cleavable amplifiable polymorphic sequences, CAPS*). VNTR pristup podrazumijeva detekciju polimorfizama dužine te kasniju detekciju pomoću gel elektroforeze ili kvantitativnu detekciju koristeći fluorescentno označene početnice (Omanović Mikličanin, 2017).

Praktičan primjer značaja kontrole kvaliteta prehrambenih proizvoda je kontrola sastava mesa, zbog javnog zdravlja, točne deklaracije na proizvodu i religijskih uvjerenja korisnika. Zbog brojnih ograničenja ranije korištenih metoda, trenutno su najpopularnije metode bazirane na analizi DNA, preciznije na hibridizaciji DNA koja je osjetljiva metoda i ima limit detekcije od 0,1% do 0,01%, ovisno o vrsti mesa. *Real-time* PCR metoda korištena je u analizi mesa divljači na način da se radi usporedba rezultata kvantifikacije DNA koja dolazi od

ciljane vrste divljači s kvantifikacijom ukupno izolirane DNA iz uzorka. Referentni je sustav razvijen i unaprijeđen korištenjem ciljanog fragmenta od 70 bp iz sekvence gena za miostatin, iako su dalje optimizacije neophodne za meso koje je bilo termički obrađeno prije analize. Još jedan primjer je detekcija kontaminacije konjskim mesom na način da su razvijene početnice za Cytb gen vrste *Equus caballus* (domaći konj) te korištene u dvije metode, vrsno specifičnom PCR-u i kvantitativnom PCR-u u stvarnom vremenu s EvaGreen® bojom. Obje metode pokazale su vrhunsku osjetljivost i specifičnost. Polimorfizam jednolančane konformacije jest metoda korištena za analizu Cytb gena za diferencijaciju između različitih vrsta tune i palamide u konzerviranim proizvodima, budući da točna vrsta ribe određuje je li u pitanju premium proizvod (Omanović Mikličanin, 2017).

Pored DNA metoda, u kontroli kvaliteta prehrambenih proizvoda često se koriste sofisticirane metode analitičke kemije, kao što su nuklearna magnetna rezonanca (NMR) i tehnika infracrvene spektroskopije s Furijeovom transformacijom (FT-IR). Kod detekcije spojeva od interesa, značajne su različite enzimatske, kromatografske, elektroforetske i metode bazirane na masenoj spektrometriji (Omanović Mikličanin, 2017).

Kontrola porijekla prehrambenih proizvoda izuzetno je bitna s više stajališta. Višestruka opravdanost takve kontrole može se vidjeti na primjeru identifikacije goveda. Zanimljiva su zbog velikog značaja u ljudskoj prehrani, ali i zbog opasnosti koje može donijeti konzumiranje mesa upitnog porijekla. Molekularna biologija omogućuje praćenje puteva životinja koje ulaze u ljudsku prehranu te time pomaže u suzbijanju crnog tržišta stoke, prvenstveno goveda. Deklaracija na prehrambenom proizvodu trebala bi omogućiti mogućnost praćenja komada mesa do životinje od koje potječe. U interesu je svake države ovakav vid nadzora kvalitete, no to je neophodno i za međunarodnu trgovinu prehrambenim proizvodima. Time se istovremeno postiže osiguranje kvalitete i zaštita proizvođača koji svoje stado uzgajaju u skladu s međunarodnim smjernicama za suzbijanje i sprečavanje širenja zoonoza i drugih bolesti od kojih čovjek može oboljeti konzumiranjem zaraženog mesa. Osiguranje kontroliranog porijekla neophodno je i za certifikaciju autohtonosti određenih prehrambenih proizvoda i porijekla sirovina za proizvodnju određenih proizvoda od autohtonih pasmina te dokaz geografskog porijekla. S praktičnog stajališta, malo je dostupnih setova reagensa za identifikaciju domaćih životinja. Trenutno dostupne setove potrebno je usavršiti (na osnovi naših iskustava, ponajviše u identifikaciji goveda) i time poboljšati vjerodostojnost nalaza identifikacije, iako je uz pažljivu, stručnu i iskusnu interpretaciju analize DNA moguće postići vrlo visoku vjerojatnost identifikacije jedinke.

Tri su glavne skupine forenzičkih slučajeva kada je životinjska DNA dokaz: (1) životinja kao svjedok (povezivanje osumnjičenog i žrtve ili povezivanje osumnjičenog s mjestom zločina), (2) životinja kao žrtva i (3) životinja kao počinitelj (kod napada na čovjeka).

Veliki broj ljudi u razvijenim zemljama drži životinje u kući, a prvenstveno su to psi i mačke. U SAD-u 50% kućanstava ima bar jednog psa ili mačku. U Europi, 5-10% ljudi ima bar jednog psa, a 8-16% barem jednu mačku. Ljudi su često vrlo bliski sa svojim ljubimcima, tako da njihove dlake lako dospjevaju posvuda: na odjeću, po kući, u automobilu (primarnim ili sekundarnim prijenosom). Dlake su najčešći forenzički nalaz, no kao uzorak mogu se koristiti i ostatci sline, izmeta i drugo. Gotovo je nemoguće posjetiti kuću u kojoj se drži dlakavi kućni ljubimac, a da se ne „kontaminira“ životinjskim dlakama. Budući da je pas najčešći kućni ljubimac, on je i forenzički najvažnija životinja za koju postoji najviše forenzičkih podataka.

Dokazi životinjskog porijekla mogu biti nađeni u slučajevima kada je žrtva ili počinitelj bio u (bliskom) kontaktu s nekom životinjom, kod napada divljih ili domaćih životinja na ljude, itd. Dosta je opisanih slučajeva kada je trag/dokaz životinjskog podrijetla bio poveznica osumnjičenog i mjesta zločina.

Svakako najpoznatiji forenzički slučaj u kojem je analiza DNA biološkog traga animalnog porijekla dala bitne, za istragu presudne rezultate, je slučaj poznat pod imenom Snowball case. Snowball je ime mačke koja je možda uveseljavala svoga vlasnika, ali ga je na kraju poslala u zatvor. Naime, ubijena je ženska osoba u mjestu Prince Edward Island, Kanada. Od samoga početka njen muž, od kojega je odvojeno živjela, bio je glavni osumnjičeni, ali su nedostajali materijalni dokazi. Njih je pribavio primjerak vrste *Felis domestica* (domaća mačka), koji je ostavio svoju bijelu dlaku na jakni koja je pronađena u blizini mjesta zločina i koja je nepobitno bila povezana s počiniteljem. Usporednom analizom DNA ustanovljeno je da dlaka pripada navedenoj mački, koja je inače bila kućni ljubimac osumnjičikovih roditelja. Tu se krug zatvara i cijela priča završava uz konstataciju da mačke i DNA ne lažu (Menotti-Raymond *et al.*, 1997).

- Bever RA. Plant Identification by DNA. U: Coyle HM. Forensic botany: Principles and applications to criminal casework. Boca Raton, FL: CRC Press; 2005.
- Botanical Society of America. Crime Scene Botanical – Forensic Botany. Plant Sci. Bull. 2006; 52(3).
- Byrd JH, Castner JL. Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations. Boca Raton, FL: CRC Press; 2010.
- Carita EJ. Classical and future DNA typing technologies for plants. U: Coyle HM. Forensic botany: Principles and applications to criminal casework. Abingdon, Oxfordshire: Routledge; 2004.
- Cheng-Lung L. DNA and the Identification of Plant Species from Stomach Contents. U: Coyle HM. Forensic botany: Principles and applications to criminal casework. Abingdon, Oxfordshire: Routledge; 2004.
- Coyle HM, Lee HC, Palmbach TM. Forensic Botany Plants as Forensic Evidence in Criminal Cases and as Agents of Bioterrorism. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 305-316.
- Colombo C, Second G, Charrier A. Diversity within American cassava germ plasm based on RAPD markers. Genet. Mol. Biol. 2000; 23: 189-199.
- Coyle HM, Lee HC, Palmbach TM. Forensic botany: Plants as evidence in criminal cases and as agents of bioterrorism. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA applications: An interdisciplinary perspective. Boca Raton, FL: CRC Press; 2014.
- Coyle HM, Palmbach TM. Forenzička botanika: biljke kao dokaz u kriminalističkim slučajevima. U: Primorac D, *et al.* Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Ćurić G, Lauc G. Forenzička analiza DNA životinjskog podrijetla. U: Primorac D, *et al.* Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Ferri G, Alu M, Corradini B, Beduschi G. Forensic botany: species identification of botanical trace evidence using a multigene barcoding approach. Int. J. Legal Med. 2009; 123: 395-401.
- Hall DW, Byrd JH. Forensic Botany: A Practical Guide. London: Wiley-Blackwell Publishing; 2012.
- Horrocks M, Walsh KAJ. Fine resolution of pollen patterns in limited space: differentiating a crime scene and alibi scene seven meters apart. J. Forensic Sci. 1999; 44: 417-420.
- Illumina. Maize SNP50 DNA Analysis Kit. San Diego, CA: Illumina. Pristupljeno 17.9. 2023. na <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/maize-snp50.html>
- Invitrogen Life Technologies. AFLP® Analysis System I; AFLP® Starter Primer Kit. Calrsbad, CA: Invitrogen Life Technologies; 2003.
- Li-Cor Biosciences. IRDye® Fluorescent AFLP® Protocol for Large Plant Genome Analysis. Lincoln, NE: Li-Cor Biosciences; 2010.

- Mei Y, Jing D, Tang S, *et al.* InsectBase 2.0: A comprehensive gene resource for insects. Nucleic Acids Res. 2022; 50(D1): D1040–D1045. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1090>
- Menotti-Raymond MA, David VA, Kanthaswamy S. Forensic Animal DNA Analysis. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 257-284.
- Menotti-Raymond M, David VA, O'Brien SJ. Pet cat hair implicates murder suspect. Nature 1997; 386: 774.
- Morgil H, Gercek YC, Tulum I. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in plant genetics and breeding. U: Caliskan M, Erol O, Oz GC. The recent topics in genetic polymorphisms. Rijeka: IntechOpen; 2020.
- Newton C, Vo T. Application of Microsatellite Markers in Plant Forensics. Can. Soc. Forensic Sci. J. 2003; 36: 57.
- Omanović Mikličanin E. Food forensics. U: Marjanović D, Primorac D, Dogan S. Forensic Genetics: Theory and Application. Sarajevo: International Burch University; 2017.
- Primorac D, *et al.* Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
- Tarone A, Jennings KC, Foran DR. Aging blow fly eggs using gene expression: A feasibility study. J. Forensic Sci. 2007; 52: 1350–1354.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Res. 1995; 23: 4407-4414.
- Ward J, Peakall R, Gilmore SR, Robertson J. A Molecular Identification System for Grasses: A Novel Technology for Forensic Botany. Forensic Sci. Int. 2005; 152: 121-131.
- Wells JD, Škaro V. Application of DNA-Based Methods in Forensic Entomology. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 285-304.

10.

UPOTREBA ANALIZE DNA U ODREĐIVANJU TJELESNIH OSOBINA

prof. dr. sc. Adna Ašić
dr. sc. Dubravka Havaš Auguštin

UPOTREBA ANALIZE DNA U ODREĐIVANJU TJELESNIH OSOBINA

Najnoviji trendovi u forenzičkoj analizi DNA pretendiraju SNP genotipizaciji u svrhu potencijalne predikcije pojedinih fenotipskih karakteristika poput boje kože, očiju, kose, zatim visine, starosti i drugih (Tablica 10.1.). Ovaj pravac forenzičke genetike opisan je kao forenzička DNA fenotipizacija (engl. *forensic DNA phenotyping, FDP*). Osnovna ideja DNA fenotipizacije temelji se na potrebi sakupljanja što većeg broja fenotipskih informacija o osobi čiji se identitet pokušava utvrditi, ukoliko to nije moguće učiniti standardnim STR profiliranjem, bilo da se to radi u svrhu identificiranja posmrtnih ostataka te osobe ili da se radi u svrhu individualizacije osobe koja je ostavila određeni biološki trag. Ovakve informacije mogu biti izuzetno korisne u slučajevima kada se identificiraju nepoznate nestale osobe, u nedostatku polazne informacije na temelju koje bi se mogli potražiti i testirati srodnici. S druge strane, u slučajevima forenzičkih istraga, kada se pronađe biološki trag i kada ne postoje nikakve dodatne informacije o počinitelju (izjave svjedoka i sl.), a generirani DNA profil se ne nalazi u DNA bazi podataka, fenotipizacija bi teoretski mogla dati polazne informacije o analiziranim fenotipskim karakteristikama počinitelja. Bitno je napomenuti da se rezultati fenotipskih analiza ne unose u DNA baze podataka, nego imaju isključivo ulogu usmjeravanja pravca istraživanja (Walsh i Kayser, 2023).

Kako je već navedeno u jednom od prethodnih poglavlja ove knjige, uloga forenzičkog antropologa jest da utvrdi osnovne osobine iz humanih skeletnih ostataka s ciljem njihove individualizacije, poput rase pripadnosti, spola, starosne dobi, visine i sl. Donedavno je na osnovi ovih analiza bila nemoguća bilo kakva predikcija mnogih karakteristika poput boje očiju, kose i kože. Najnovija istraživanja uspjela su determinirati određene genetičke biljege koji stoje u korelaciji s genetičkom determinacijom ovih osobina (Anno *et al.*, 2008, Valenzuela *et al.*, 2010). U skladu s tim, u zadnje vrijeme forenzička znanstvena zajednica radi na etabliranju multipleksnih sustava u koje su inkorporirani SNP-ovi, koji

TABLICA 10.1. Pregled najvažnijih dosada identificiranih gena i lokusa koji doprinose određivanju vidljivih tjelesnih karakteristika kod čovjeka (na osnovu Dabas *et al.*, 2022).

Boja oči	Boja kose	Boja kože	Oblik dlake	Gubitak kose	Facijalne karakteristike	Tjelesna visina
<i>HERC2</i>	<i>MC1R</i>	<i>SLC24A4</i>	<i>AR/EDA2R</i>	<i>EDAR</i>	<i>DCHS2</i>	<i>ACAN</i>
<i>OCA2</i>	<i>OCA2</i>	<i>SLC24A5</i>	<i>EBF1</i>	<i>TCHH</i>	<i>PDE8A</i>	<i>DNM3</i>
<i>SLC45A2</i>	<i>SLC24A4</i>	<i>SLC45A2</i>	<i>HDAC9</i>	<i>ERRF11</i>	<i>SCHIP</i>	<i>IHH</i>
<i>TYR</i>	<i>HERC2</i>	<i>ASIP</i>	<i>TARDBP</i>	<i>PTK6</i>	<i>ASPM</i>	<i>FBXW11</i>
<i>IRF4</i>	<i>TUBB3</i>	<i>ANKRD11</i>		<i>OFCC1</i>	<i>DLX6</i>	<i>EFEMP1</i>
<i>SLC24A4</i>	<i>ECOC2</i>	<i>BNC2</i>		<i>KRTAP2-3</i>	<i>DYNC1L1</i>	<i>GH REGION</i>
	<i>SLC45A2</i>	<i>DEF8</i>		<i>HOXC13</i>	<i>EDAR</i>	<i>GHSR</i>
	<i>KITLG</i>	<i>HERC2</i>		<i>WNT10A</i>	<i>HOXD1-MTX2</i>	<i>GPR126</i>
	<i>IRF4</i>	<i>IRF4</i>		<i>KRT71</i>	<i>WDR27</i>	<i>HHP</i>
	<i>TYR</i>	<i>KITLG</i>		<i>PADI3</i>	<i>PAX3</i>	<i>HMGAI</i>
	<i>PIGU</i>	<i>MC1R</i>		<i>GATA3</i>	<i>TP63</i>	<i>LCORL</i>
	<i>TYRP1</i>	<i>OCA2</i>		<i>PEX14</i>	<i>RABP1-C1L2A</i>	<i>MICA</i>
		<i>PIGU</i>		<i>LIPH</i>	<i>HADC8</i>	<i>NOG</i>
		<i>RALY</i>		<i>TGFA</i>	<i>THEM163</i>	<i>NPR3</i>
		<i>TYR</i>		<i>HRNR</i>	<i>COL17A1</i>	<i>PML</i>
				<i>PARK2</i>		

su pozicionirani u blizini gena prvenstveno odgovornih za pigmentaciju, ali i za druge vidljive, vanjske osobine. Upravo je pregled najnovijih otkrića u ovom području tema poglavlja. Za pregled svih genetičkih lokusa povezanih s različitim fenotipskim osobinama u ranijim studijama (Tablica 10.1.), preporučujemo pregledni rad koji nudi širok tablični prikaz ovih informacija, razvrstanih po osobini i genima (Dabas *et al.*, 2022).

Prije svega, korisno je imati ideju o metodologiji koja se najčešće koristi prilikom analize fenotipskih osobina. Vjerojatno je i dalje najpopularnija metoda SNaPshot®, koja se temelji na reakciji jednobaznog produženja (engl. *single base extension, SBE*), jer je pristupačna i tehnički uhodana te razrađena u mnogim svjetskim laboratorijima koji su adekvatno opremljeni za provođenje ove analize. Međutim, SBE analiza komplicirana je i uključuje više koraka koji povećavaju mogućnost međusobne kontaminacije te je ograničena na istovremeno procesiranje 30-40 SNP biljega po uzorku, zbog čega je bilo potrebno pronaći metodu zadovoljavajuće osjetljivosti i specifičnosti, ali koja će moći ponuditi veću količinu informacija u jednoj reakciji. Metode sekvenciranja sljedeće generacije (NGS platforme)

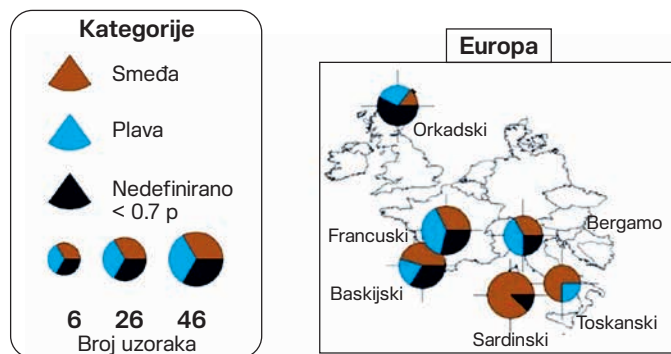
nameću se kao vodeće na tržištu i sve veći broj novijih studija okreće se upravo ovim uređajima. Tako je Ion Torrent ponudio zadovoljavajuće rezultate koristeći 0,5 ng početne DNA i s 20x pokrivenosti čitanja (engl. *coverage*) sekvenci (Daniel *et al.*, 2015). Kada je u pitanju analiza podataka i sama klasifikacija u određene kategorije fenotipova, četiri su metode korištene s ujednačenim performansama: multinomijalna logistička regresija (engl. *multinomial logistic regression, MLR*) te tri metode strojnog učenja, uključujući umjetne neuralne mreže (engl. *artificial neural networks, ANN*), metodu slučajne šume (engl. *random forest, RF*) i strojnog vektora podrške (engl. *support vector machines, SVM*) (Katsara *et al.*, 2021).

10.1. ODREĐIVANJE STUPNJA PIGMENTACIJE – PREDVIĐANJE BOJE OČJU, KOSE I KOŽE

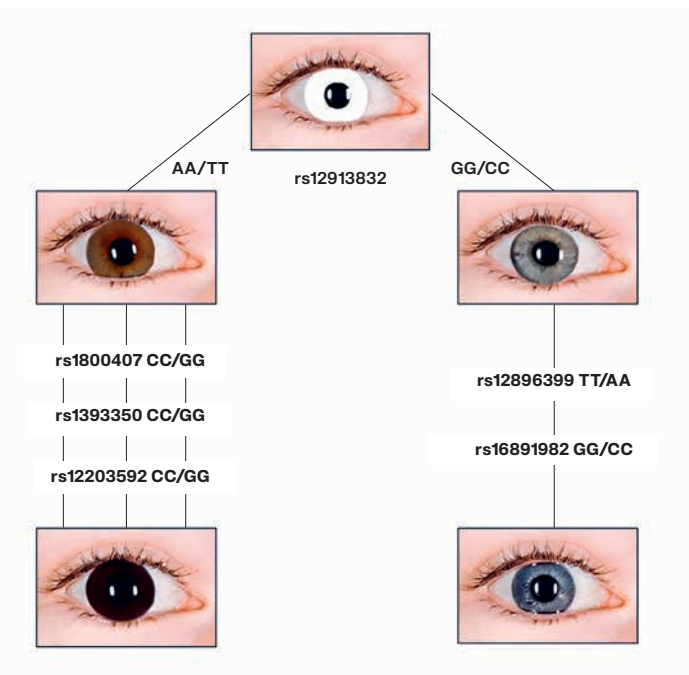
Melanin je osnovni pigment odgovoran za boju oči, kože i kose. Njegova je sinteza ovisna o većem broju gena i drugih faktora, kao što su starosna dob, lijekovi, bolest, uvjeti vanjske okoline te se zbog toga pigmentacija smatra kompleksnom osobinom.

Početak ove priče dogodio se u prvom desetljeću 21. stoljeća kada su različiti timovi počeli istraživati genetičku pozadinu pigmentacije kod čovjeka, odnosno gene i biljege koji omogućavaju klasifikaciju boje oči, kose i kože. Prve studije i setovi reagensija za analizu fokusirali su se na boju oči. Smeđa boja oči je prema ranijem konsenzusu uzeta kao originalni fenotip, koji je kasnije izmijenjen u druge, svjetlije boje i to na području europskog kontinenta. Europa je ujedno područje s daleko najviše fenotipskih varijacija kada je u pitanju boja oči, što dijelom objašnjava zašto je većina studija rađena upravo tu (slika 10.1.).

Razvoj prvog multipleks modela za istovremenu analizu šest informativnih SNP biljega, pod nazivom IrisPlex, bio je veliki korak u pravcu prevođenja ideje DNA fenotipizacije u realnu upotrebu. U pitanju su bili geni *HERC2*, *OCA2*, *SLC24A4*, *SLC45A2* (*MATP*), *TYR* i *IRF4*. Sustav se pokazao izuzetno osjetljivim. Davao je optimalne rezultate s 0,25-0,5 ng početne DNA, međutim, kompletni profili generirani su i sa samo 31 pg DNA, što odgovara masi DNA u šest diploidnih stanica. Također, s dužinom PCR amplikona između 80 i 128 bp, očekivano je da će esej raditi i s visoko degradiranom ili starom DNA u forenzičkim uzorcima. Na temelju rezultata, predstavljen je model klasifikacije boje oči prema dostupnim podatcima (slika 10.2.). Ovaj esej je ubrzo je validiran prema SWAGDAM (engl. *The Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) pravilima za korištenje s različitim uzorcima poput krvi, sperme, pljuvačke, kose i *trace DNA* tragova (Walsh *et al.*, 2011b), s preciznošću preko 90% za klasificiranje smeđe i plave boje oči. Kasnija validacija sustava u sedam europskih populacija s ukupno 3840



SLIKA 10.1. Rezultati ranijih studija koje pokazuju distribuciju boje očiju (smeđe, plave, ostalo) u različitim geografskim područjima Europe (na osnovu Walsh *et al.*, 2011a).



SLIKA 10.2. SNP rs12913832 (gen *HERC2*) prvi je informativni biljeg, čiji genotip usmjerava model u pravcu predviđanja plavih ili smeđih očiju. Daljnja klasifikacija plavih očiju radi se na temelju rs12896399 (*SLC24A5*) i rs16891982 (*MATP*), dok se tamnija nijansa smeđih očiju dalje predviđa pomoću tri biljega: rs1800407 (*OCA2*), rs1393350 (*TYR*) i rs12203592 (*IRF4*) (na osnovu Walsh *et al.*, 2011a).

ispitanika European Eye (EUREYE) projekta koristila je donju granicu vjerojatnosti za klasifikaciju od 0,7 u tri kategorije („plavo”, „smeđe”, „srednje” – podrazumijeva ostale opcije fenotipa) i postigla je točnost od 94% (u rangu od 91% do 98%, ovisno o populaciji). Točnost predviđanja za plave ili smeđe oči je bila 0,96 u oba slučaja. Važno je naglasiti da je 23% uzoraka ostalo neklasificirano jer nijedna od ponuđenih kategorija boje očiju nije dostigla limit od 0,7 (Walsh *et al.*, 2012).

Kasnija studija testirala je efikasnost modela u populaciji SAD-a te došla do podatka o točnosti predviđanja od 58% („smeđa”), 95% („plava”) i 19% („srednja”), koristeći donju granicu pouzdanosti od 0,5 koja se u ovom slučaju pokazala korisnijom u odnosu na strožu granicu od 0,7 (Dembinski, Picard, 2014). Model se pokazao jednostavnim za upotrebu i široko primjenjivim u EDNAP (engl. *European DNA Profiling Group*) vježbi u kojoj je sudjelovao 21 laboratorij, s ciljem testiranja uspjeha pri implementaciji eksperimentalne metode i korištenja modela za predviđanje, kao i rada s izazovnim uzorcima, specifičnim za one pronađene na mjestu zločina. Dodatna su testiranja pokazala 96% točnosti pri određivanju fenotipa boje očiju u posljednjoj fazi projekta (Chitanya *et al.*, 2014). Kasnija testiranja potvrdila su izvrsne performanse IrisPlex sustava kod određivanja plave i smeđe boje očiju, ali i ukazala na njegove nedostatke kada su u pitanju predviđanja fenotipova, koji bi se mogli svrstati u „srednje” ili „intermedijarne”, kada je u pitanju količina pigmentacije (zelene i svijetlosmeđe boje očiju) (Paparazzo *et al.*, 2022).

Daljnji razvoj ovog područja obilježen je uvođenjem novog eseja pod nazivom HIrisPlex, koji se temeljio na 6 SNP-ova iz IrisPlex kita, uz dodatak novih 18, uključujući 17 SNP-ova i jedan indel polimorfizam na 11 gena (*MC1R*, *HERC2*, *OCA2*, *SLC24A4*, *SLC45A2*, *IRF4*, *EXOC2*, *TRYPI*, *TYR*, *KITLG* i *PIGU/ASIP*) s ciljem istovremene predikcije boje očiju i kose (slika 10.3.). Testiranje i validacija eseja rađena je na 1551 ispitaniku iz različitih dijelova Europe, ponovno zbog izražene fenotipske varijacije u odnosu na ostatak svijeta te su postignute sljedeće točnosti predviđanja: 69,5% za plavu, 78,5% za smeđu, 80% za crvenu i 87,5% za crnu boju kose. Dodatno, sustav je razvijen na način da bude primjenjiv na uzroke s niskom koncentracijom DNA ili degradiranim materijalom, tako da su rezultati proizvedeni koristeći samo 63 pg DNA u početnom uzorku, a svi PCR produkti bili su ispod 160 bp dužine. Rezultati ostvareni HIrisPlex kitom zadovoljavajući su, pogotovo uzimajući u obzir veći broj fenotipskih klasa, kada je u pitanju boja kose u Evropi, u odnosu na boju očiju, kao i značajno veći utjecaj okoline na boju kose u odnosu na oči (poput godina, pojave sijede kose, bojenja, utjecaja sunca i topline i slično) (Walsh *et al.*, 2013).

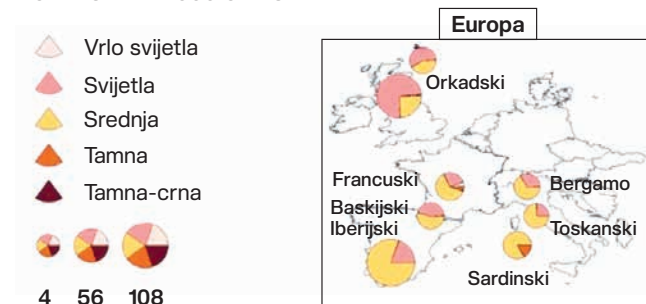
Na kraju, razvoj i validacija HIrisPlex-S sustava označila je najširu analizu pigmentacije kod čovjeka, pokrivajući pitanja boje očiju, kose i kože. Sustav se sastoji od prethodnog HIrisPlex multipleksa od 24 polimorfizma, od čega je njih 19 potvrđeno kao relevantno za određivanje boje kože, uz dodatni multipleks od



SLIKA 10.3. Hipotetski scenarij o utjecaju alternativnih alela SNP polimorfizama iz HlrisPlex kita, koristeći homozigotne genotipove. Za svaki fenotip boje kose, navedeni su najvažniji biljezi s najvećom dodanom vrijednošću kontribucije fenotipu (na osnovu Walsh *et al.*, 2013).

17 SNP-ova iz 11 gena (*ANKRD11*, *OCA2*, *BNC2*, *HERC2*, *SLC24A4*, *TYR*, *SLC24A5*, *ASIP*, *RALY*, *MC1R* i *DEF8*), koji su svi uvedeni radi predviđanja boje kože. HlrisPlex-S je sustav koji se sastoji od dva multipleksa, pokrivajući ukupno 41 DNA polimorfizam, od čega je 36 biljega informativno za određivanje boje kože. Novorazvijeni multipleks pokazao se relativno lakim za primjenu pomoću kapilarne elektroforeze, a s ulaznom količinom od 63 pg DNA detektirani su svi pikovi u svim provedenim analizama, dok je analiza miješanih tragova izazovna, što je generalno karakteristika metoda temeljenih na autosomnim SNP-ovima. Stoga su autori preporučili STR analizu kao prvi uobičajeni korak u analizi forenzičkih tragova, što bi omogućilo puno lakšu i pouzdaniju identifikaciju miješanog traga, a što je važna informacija prije provođenja SNP analize i usmjerit će tumačenje rezultata. Testiranje i validiranje ovog eseja potvrdilo je ranija očekivanja da će u slučaju boje kože, Europljani prikazati niži stupanj varijacije u odnosu na druge populacije (slika 10.4.) (Chaitanya *et al.*, 2018).

HGDP-CEPH I 1000 GENOMA



SLIKA 10.4. Predviđanje boje kože pomoću HlrisPlex-S sustava u populaciji Europe, uz klasifikaciju u jednu od pet definiranih kategorija: vrlo svijetla, svijetla, srednja, tamna i tamna-crna (na osnovu Chaitanya *et al.*, 2018).

10.2. ODREĐIVANJE VISINE POMOĆU ANALIZE DNA

Donedavno su se studije u području DNA fenotipizacije gotovo isključivo bavile određivanjem pigmentacije, dok su druge osobine često zapostavljene, zbog nedostatka dominantne genetičke odrednice, na temelju koje će predviđanje biti izvršeno. Drugim riječima, ove kompleksne osobine određene su velikim brojem gena i vanjskim čimbenicima, stoga je nužna analiza velikog broja DNA biljega kako bi se dobili imalo pouzdani i znanstveno relevantni rezultati. No, kao i u drugim područjima, znanost svakodnevno napreduje, stoga ovdje predstavljamo studije temeljene na drugim vanjskim osobinama poput visine, kronološke starosti i oblika dlake koje su provedene i publicirane u prethodnih nekoliko godina.

Iako je definitivno kompleksna genetička osobina, visina ima jaku nasljednu komponentu s heritabilnosti od oko 80% (Macgregor *et al.*, 2006). Na temelju provedenih studija na europskoj populaciji, identificirano je 697 nezavisnih genetičkih lokusa koji doprinose fenotipu visine kod analizirane populacije (Wood *et al.*, 2014). Na temelju ovih, provedena je zanimljiva istraživačka studija u Nizozemskoj u koju je uključeno ukupno 10 361 osoba, od toga 770 visokih (prema definiciji u studiji, to su muškarci viši od 195 cm i žene više od 180 cm), a analizirano je 2 530 557 autosomnih SNP-ova. Koristeći prethodno utvrđenih 689 SNP-ova povezanih s visinom, autori su dostigli vrijednost $AUC = 0,79$ za klasifikaciju osoba koje su visoke u odnosu na osobe izvan te kategorije te $R^2 = 0,21$ za visinu kao kvantitativnu osobinu, što je ukazalo na nisku mogućnost predviđanja visine iz DNA podataka. Dodatne analize pokazale su da je set od 412 SNP-ova najadekvatniji model u kontekstu ekonomičnosti broja korištenih DNA biljega i optimalnih performansi modela. Smanjenje broja analiziranih SNP-ova nije samo pitanje uštede, nego i tehničko pitanje u slučaju analize degradiranih ili starih uzoraka, kakvi se često susreću na mjestu zločina (Liu *et al.*, 2019). Do sada je najveća studija na ovu temu uključila 5,4 milijuna osoba europskog porijekla i preko 12 000 SNP-ova povezanih s 7200 genomskih lokusa, na temelju kojih je objašnjeno 40% varijacije u visini kod te populacije (Kayser *et al.*, 2023).

Nešto drugačiji i pristup ovoj temi korišten je u studiji populacije sa sjevera Švedske gdje su analizirani proteini u plazmi kod 811 osobe i DNA metilacija kod 617 ispitanika. Korištenjem isključivo analize proteina, postignute su korelacije između 0,74 i 0,81 u trening setu i 0,65 i 0,27 u test setu, što odgovara pogrešci u predviđaju od 5,1 cm za muškarce i 5,8 cm za žene. Koristeći samo DNA metilacijsku analizu, postignute su korelacije između 0,58 i 0,85 u trening setu i 0,53 i 0,78 u test setu, odnosno greška od 5,7 do 6,7 cm za analizirane ispitanike. Kombinacija dvije metode dala je izrazito visoku korelaciju između 0,82 i 0,92 u trening setu i 0,57 i 0,75 u test setu, uz standardnu pogrešku od 5,7 do 6,7 cm za analizirane ispitanike (Llobet *et al.*, 2023).

10.3. PREDVIĐANJE KRONOLOŠKE DOBI POMOĆU METILACIJE DNA

Kada je u pitanju prirodni, biološki proces starenja živog organizma, uključujući čovjeka, opisano je devet ključnih promjena koje se događaju u sklopu tog procesa: genomska nestabilnost, propadanje telomera, epigenetske promjene, gubitak proteostaze, poremećaji u recepciji nutrijenata, mitohondrijska disfunkcija, starenje stanica, gubitak matičnih stanica i promjene u staničnoj komunikaciji (López-Otín *et al.*, 2013). Metilacija DNA nametnula se kao vodeća metoda predviđanja starosti osobe korištenjem molekularnih analiza, pogotovo u forenzici. Međutim, važno je imati na umu da se metilacija značajno razlikuje između tkiva, pa čak i vrsta stanica, stoga je značajno prikupiti i analizirati podatke koristeći različite početne uzorke koji se mogu pronaći na mjestu zločina. Dosadašnje studije uglavnom su se bazirale na analizi venske krvi, ali drugi uzorci u zadnje vrijeme također dobivaju na značaju. Dodatno, važno je naglasiti da se istraživački timovi trude smanjiti broj biljega koje analiziraju kao informativne, zato je očekivano da većina DNA uzoraka pronađenih na mjestu zločina sadrži malo DNA ili degradiranu DNA loše kvalitete, što bi otežalo analizu velikog broja metilacijskih CpG pozicija.

Ipak, ranije studije su analizirale utjecaj starosti na metilacijske profile u miješanim uzorcima, tj. uzorcima koji su dolazili iz različitih tkiva. U ovakvim studijama je pokazano da veći broj korištenih biljega daje značajno bolje rezultate, pa je tako korištenje 19 CpG pozicija rezultiralo u srednjoj apsolutnoj devijaciji od kronološke starosti od 12,7 godina, dok je upotreba 353 biljega proizvela grešku od 2,9 godina u trening i 3,6 godina u testnoj fazi. I ovdje su ipak detektirana tkiva kod kojih je razina metilacije značajno odstupala od drugih, time ukazujući na različite potrebe prilikom analize, ovisno o vrsti uzorka. Kada je u pitanju metilacija u krvi, izdvojeni su geni *KLF14* i *ELOVL2*, dok se u metilomu uzoraka sperme kao posebno informativan istaknuo gen *TTC7B* (Jung *et al.*, 2017).

Jedna od novijih studija provedena je u Južnoj Koreji gdje su korišteni uzorci pljuvačke od 54 osobe, starosti između 18 i 73 godine, u svrhu identifikacije potencijalnih DNA biljega metilacije za određivanje starosti. Dodatno testiranje identificiranih biljega na 226 uzoraka omogućilo je kreiranje prediktivnog modela za starost pomoću uzoraka pljuvačke (sline). Rezultati su ukazali na značaj šest metilacijskih biljega povezanih s genima *SST*, *CNGA3*, *KLF14*, *TSSK6*, *TBR1* i *SLC12A5* te dodatnog biljega specifičnog za vrstu analiziranog uzorka na genu *PTPN7*. Trening model imao je korelaciju od 94,5% između stvarne i predviđene starosti uz pogrešku od 3,13 godina dok je testni model ponudio pogrešku od 3,15 godina i korelaciju od 95,2%. Dodatno, samo 4 ng DNA nakon bisulfitne konverzije bilo je dovoljno da se generiraju informativni rezultati analize (Hong *et al.*, 2017).

TABLICA 10.2. Rezultati DNA fenotipizacije u području predviđanja starosti (na osnovu Kayser *et al.*, 2023).

Naziv	Tkivo	Broj CpG pozicija	Validirano	Greška u predviđanju (godine)
Vidaki <i>et al.</i> (2017)	Krv	16	Ne	7,5
Naue <i>et al.</i> (2017)	Krv	13	Ne	3,16
Hong <i>et al.</i> (2019)	Pljuvačka	7	Ne	3,19
VISAGE Basic Tool for age from blood	Krv	32	Ograničeno	---
VISAGE Enhanced Tool for age from somatic tissues	Krv, bukalne stanice, kost	44	Da	3,2 (krv), 3,7 (bukalne stanice), 3,4 (kost)
VISAGE Enhanced Tool for age from semen	Sperma	13	Da	5,1
Aliferi <i>et al.</i> (2022)	Krv	18	Ograničeno	3,3

Tablica 10.2. prikazuje dosadašnje studije na temu predviđanja starosti iz bioloških uzoraka (Kayser *et al.*, 2023). Kao što tablica pokazuje, validirane metode nedavno su razvijene od strane VISAGE (engl. *The Visible Attributes through Genomics*) konzorcija koji aktivno radi na standardizaciji i implementaciji analize DNA metilacije u svrhu predviđanja starosti osobe koja je ostavila trag. Tako je njihov VISAGE Basic Tool for age estimation in blood korišten za predviđanje starosti iz krvi pomoću 32 CpG pozicije u pet gena (*ELOVL2*, *MIR29B2CHG*, *FHL2*, *TRIM59* i *KLF14*) dok je VISAGE Enhanced Tool for age estimation from somatic tissues u upotrebi za različita tkiva i analizira 44 CpG-ja u osam gena (*ELOVL2*, *FHL2*, *KLF14*, *MIR29B2CHG*, *TRIM59*, *EADARADD*, *PDE4C* i *ASPA*).

Problem nedostatka studija za predviđanje starosti kod djece posebno je izražen. Tako su ranije studije izdvojile *KCNAB3* kao posebno informativan biljeg za ovu namjenu dok je druga studija koristila set od 94 CpG biljega i ostvarila grešku od samo 0,35 godina na uzorku od 689 osoba (Kayser *et al.*, 2023).

10.4. ANALIZA OSTALIH VIDLJIVIH OSOBINA POMOĆU DNA

Boja obrva je osobina, koja je često, ne uvijek, u vezi s bojom kose. Trenutno se šest lokusa dovodi u vezu s ovom osobinom, uključujući jedan koji ranije nije povezan s pigmentacijom. Drugi model temeljen na 25 SNP-ova dostigao je vjerojatnost točnog predviđanja od 0,7, 0,67 i 0,62 za plavu, crnu i smeđu boju obrva.

Kada je u pitanju određivanje prisustva pjegica na koži, jedan od prvih modela identificirao je SNP-ove u tri gena uz dodatnu analizu *MC1R* gena te postigao

točnost od 0,77 za klasifikaciju u dvije kategorije (prisustvo/odsustvo pjegica) i 0,78 kada se u obzir uzme spol ispitanika. Nešto noviji model klasificirao je rezultate u tri kategorije („puno pjegica”, „manje pjegica”, „odsustvo pjegica”) koristeći 14 varijabli kao što su: *MC1R* gen, drugi SNP-ovi, spol, interakcije između SNP-ova te spol-SNP interakcije. Točnost modela dostigla je vrijednosti od 0,79 (kategorija „puno pjegica”), 0,55 („manje pjegica”) i 0,75 („odsustvo pjegica”) (Kayser *et al.*, 2023).

Činjenica da se s godinama povećava vjerojatnost i stupanj sijede kose može se smatrati općim znanjem i činjenicom s kojom smo svi iskustveno upoznati. Međutim, za to imamo i znanstveni dokaz kroz rad Pospiech i kolega (2020), u kojem je objavljeno da godine imaju 48% utjecaja na vjerojatnost da osoba ima sijedu kosu, dok spol ima nešto više od 5%, a svi analizirani SNP biljezi zajedno oko 10% utjecaja. Inače, model je koristio informacije iz 12 SNP-ova te podatke o godinama i spolu i dostigao točnost od 0,86 („odsustvo sijede kose”), 0,79 („umjereno sijeda kosa”) i 0,88 („značajno sijeda kosa”) (Pospiech *et al.*, 2020). Dodatno, studija provedena u Latinskoj Americi identificirala je gen *IRF4* kao poziciju na kojoj se nalazi moguće najvažniji lokus za određivanje ove osobine (Adhikari *et al.*, 2016).

Kada je u pitanju oblik dlake, tj. je li kosa ravna, valovita ili kovrčava, u literaturi možemo pronaći nekoliko manjih studija koje su uspjele detektirati određene genetičke biljege, ovisno o porijeklu populacije i povezati ih s ovom osobinom. Najveća i dosada najznačajnija studija provedena je u sklopu EUROFORGEN-NoE konzorcija koja je razvijena koristeći podatke 9600 ispitanika i 90 SNP-ova kandidata. Validiranje rezultata izvršeno je na nezavisnom setu od 2500 uzoraka osoba različitog genetičkog porijekla. U modelu koji je razlikovao dvije kategorije („ravna” ili „nije ravna”) oblika dlake, postignuta je točnost od 0,7 korištenjem informacije o genotipovima na 32 SNP-a, godinama i spolu. Model s tri kategorije („ravna”, „valovita” i „kovrčava” kosa) koristio je 33 SNP-a i postigao vrijednosti od 0,68, 0,6 i 0,62 za „ravnu”, „valovitu”, odnosno „kovrčavu” kosu, bez korištenja informacija o spolu i godinama. Zanimljivo je da su rezultati bili puno točniji za ispitanike koji nisu europskog porijekla u odnosu na Europljane zbog značajnog SNP-a u genu *EDAR* koji nije bio informativan u europskoj populaciji (Pospiech *et al.*, 2018).

Sva ova istraživanja ukazala su na izuzetnu kompleksnost analiza fenotipskih osobina, a posebno kvantitativnih osobina s velikim brojem detektiranih varijanti, kao i značajnim utjecajem okoline na finalni fenotip koji će se manifestirati kod ispitanika. I pored toga istraživanja u ovome pravcu nastavljaju se, s posebnim naglaskom na njihovu primjenu u forenzičkoj genetici.

- Adhikari K, Fontanil T, Cal S, *et al.* A genome-wide association scan in admixed Latin Americans identifies loci influencing facial and scalp hair features. *Nat. Commun.* 2016; 7: 10815. doi: 10.1038/ncomms10815
- Aliferi A, Sundaram S, Ballard D, *et al.* Combining current knowledge on DNA methylation-based age estimation towards the development of a superior forensic DNA intelligence tool. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2022; 57: 102637. doi: 10.1016/j.fsigen.2021.102637
- Anno S, Abe T, Yamamoto T. Interactions between SNP alleles at multiple loci contribute to skin color differences between caucasoid and mongoloid subjects. *Int. J. Biol. Sci.* 2008; 4(2): 81-86. doi: 10.7150/ijbs.4.81
- Chaitanya L, Breslin K, Zuñiga S, *et al.* The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018; 35: 123-135. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.04.004
- Chaitanya L, Walsh S, Andersen JD, *et al.* Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014; 11: 241-251. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.04.006
- Dabas P, Jain S, Khajuria H, Nayak BP. Forensic DNA phenotyping: Inferring phenotypic traits from crime scene DNA. *J. Forensic Leg. Med.* 2022; 88: 102351. doi: 10.1016/j.jflm.2022.102351
- Daniel R, Santos C, Phillips C, *et al.* A SNaPshot of next generation sequencing for forensic SNP analysis. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015; 14: 50-60. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.08.013
- Dembinski GM, Picard CJ. Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population [published correction appears in *Forensic Sci. Int. Genet.* 2016; 24: 211-213. doi: 10.1016/j.fsigen.2016.06.002]. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014; 9: 111-117. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.12.003
- Hong SR, Jung SE, Lee EH, Shin KJ, Yang WI, Lee HY. DNA methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2017; 29: 118-125. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.04.006
- Hong SR, Shin KJ, Jung SE, Lee EH, Lee HY. Platform-independent models for age prediction using DNA methylation data. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2019; 38: 39-47. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.10.005
- Katsara MA, Branicki W, Walsh S, Kayser M, Nothnagel M, VISAGE Consortium. Evaluation of supervised machine-learning methods for predicting appearance traits from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2021; 53: 102507. doi: 10.1016/j.fsigen.2021.102507
- Kayser M, Branicki W, Parson W, Phillips C. Recent advances in Forensic DNA Phenotyping of appearance, ancestry and age. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2023; 65: 102870. doi: 10.1016/j.fsigen.2023.102870

- Liu F, Zhong K, Jing X, *et al.* Update on the predictability of tall stature from DNA markers in Europeans. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2019; 42: 8-13. doi:10.1016/j.fsigen.2019.05.006
- Llobet MO, Johansson Å, Gyllensten U, Allen M, Enroth S. Forensic prediction of sex, age, height, body mass index, hip-to-waist ratio, smoking status and lipid lowering drugs using epigenetic markers and plasma proteins. *Forensic Sci Int Genet.* 2023; 65: 102871. doi: 10.1016/j.fsigen.2023.102871
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013; 153(6): 1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Macgregor S, Cornes BK, Martin NG, Visscher PM. Bias, precision and heritability of self-reported and clinically measured height in Australian twins. *Hum. Genet.* 2006; 120(4): 571-580. doi: 10.1007/s00439-006-0240-z
- Naue J, Hoefsloot HCJ, Mook ORF, *et al.* Chronological age prediction based on DNA methylation: Massive parallel sequencing and random forest regression. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2017; 31: 19-28. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.07.015
- Paparazzo E, Gozalishvili A, Lagani V, *et al.* A new approach to broaden the range of eye colour identifiable by IrisPlex in DNA phenotyping. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 12803. doi: 10.1038/s41598-022-17208-w
- Pośpiech E, Chen Y, Kukla-Bartoszek M, *et al.* Towards broadening Forensic DNA Phenotyping beyond pigmentation: Improving the prediction of head hair shape from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2018; 37: 241-251. doi: 10.1016/j.fsigen.2018.08.017
- Pośpiech E, Kukla-Bartoszek M, Karłowska-Pik J, *et al.* Exploring the possibility of predicting human head hair greying from DNA using whole-exome and targeted NGS data. *BMC Genomics.* 2020; 21(1) :538. doi: 10.1186/s12864-020-06926-y
- Valenzuela RK, Henderson MS, Walsh MH, *et al.* Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J. Forensic Sci.* 2010; 55(2): 315-322. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x
- Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, Miller TH, Barron LP, Syndercombe Court D. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2017; 28: 225-236. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.02.009
- Walsh S, Lindenbergh A, Zuniga SB, *et al.* Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011b; 5(5): 464-471. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.09.008
- Walsh S, Liu F, Ballantyne KN, van Oven M, Lao O, Kayser M. IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011a; 5(3): 170-180. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.02.004

- Walsh S, Liu F, Wollstein A, *et al.* The HIrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2013; 7(1): 98-115. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.07.005
- Walsh S, Kayser M. Prediction of Physical Characteristics, such as Eye, Hair, and Skin Color, Based Solely on DNA. U: Primorac D, Schanfield M. *Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective*, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 357-386.
- Walsh S, Wollstein A, Liu F, *et al.* DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2012; 6(3): 330-340. doi: 10.1016/j.fsigen.2011.07.009
- Wood AR, Esko T, Yang J, *et al.* Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. *Nat. Genet.* 2014; 46(11): 1173-1186. doi: 10.1038/ng.3097

11.

MIKROBIOLOGIJA U FORENZICI

Amra Džuho, MSc
prof. dr. sc. Adna Ašić
doc. dr. sc. Petar Projić

MIKROBIOLOGIJA U FORENZICI

Prokarioti su sveprisutni u našoj okolini i kao takvi uspostavljaju interakcije s drugim organizmima, uključujući i ljude. Omjer bakterijskih i ljudskih stanica u tijelu je 1.3:1 te svaki pojedinac ima jedinstven trag (engl. *individual trace*) na koji najveći utjecaj imaju bakterije. Najveća pozornost pridaje se patogenima kao prokariotima koji mogu uzrokovati bolesti i koji su glavni alati bioterorizma i biološkog zločina. Upravo suprotno, mnogi mikroorganizmi žive kao saprofitski organizmi u suživotu s organizmom domaćina. Neki mikroorganizmi sudjeluju u biokemijskim procesima u ljudskom tijelu dok drugi pružaju zaštitu od patogena. Kompozicija prokariotskih zajednica na ili u ljudskom tijelu ovisi od geografske pozicije, ishrane, konzumacije lijekova i stila života. Stoga su informacije koje se mogu dobiti analizom mikroorganizama u sklopu jednog organizma unikatne i vrlo važne u forenzičkoj znanosti (Avdić *et al.*, 2018).

11.1. FORENZIČKA MIKROBIOLOGIJA

Forenzička mikrobiologija bavi se proučavanjem dokaza na način da utvrdi i potvrdi mikroorganizme i njihove toksine koji imaju određenu povezanost s osobom odgovornom za biološki zločin (Lehman, 2012; National Research Council (NRC), 2014). Cilj ove znanstvene discipline je da uz pomoć stručnjaka iz područja genetike, ostalih grana mikrobiologije, agronomije i epidemiologije efikasno osigura pouzdane informacije, dovoljno snažne za znanstvenu zajednicu, na temelju kojih se mogu donijeti zaključci koji mogu pomoći u provođenju zakona (Carter *et al.*, 2017). Metode postupanja s uzorkom i identifikacije mikroorganizama koje se koriste u forenzičkoj mikrobiologiji su iste kao i u znanstveno-istraživačkoj, iako se prioriteta razlikuju (Blondeau *et al.*, 2019). Klasične metode, kao što su mikrobiološka kultura i biokemijski testovi koje se koriste prilikom analiziranja uzorka

su unaprijedene metodama molekularne biologije, genetike i filogenetike te je posljednjih godina genotipizacija mikroorganizama pridonijela pouzdanosti zaključaka u analizama forenzičke mikrobiologije (Carter *et al.*, 2017; Lehman, 2012).

11.1.1. Pregled povijesti i razvoja forenzičke mikrobiologije

Ova disciplina počela je svoj razvoj 2001. godine nakon serije bioterorističkih napada antraksom u SAD-u, iako je suvremena forenzička mikrobiologija utemeljena 1990-tih godina u SAD-u. Između 1990. i 1992. godine, filogenetska analiza mikroorganizama u forenzici prvi je put predstavljena u slučaju navodnog prijenosa virusa HIV sa zaraženog stomatologa na pacijente (Robinson *et al.*, 2021). Dodatni slučajevi koji su riješeni filogenetskom analizom uključuju slučaj gastroenterologa koji je 1994. godine namjerno ubrizgao pacijentici miješani uzorak krvi, koji je sadržavao viruse HIV i hepatitis C, zatim slučaj u Španjolskoj u kojem je anesteziolog zarazio 275 pacijenata virusom hepatitisa C te praćenje i utvrđivanje sličnosti sojeva bakterije *Staphylococcus aureus* na inhalacijskim pomagalicama, što je omogućilo praćenje korisnika opojnih droga (Schmedes *et al.*, 2016).

Najveće promjene ipak su se dogodile nakon slučaja poznatog kao Amerithrax u kojem su pošiljke, koje su sadržavale spore tri bakterije *Bacillus anthracis*, korištene u bioterorističkom napadu 2001. godine u SAD-u (Federal Bureau of Investigation (FBI), 2010). Nepoznata osoba poslala je pisma dvojici senatora i određenim medijskim kućama te su u ovom napadu antraksom zaražene 22 osobe, od kojih je 11 razvilo inhalacijski oblik antraksa, a petero je smrtno stradalo od posljedica ove bolesti. Uzorci ovog patogena obrađeni su uz pomoć multilokusne analize varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (engl. *multilocus variable number tandem repeat analysis*, *ML-VNTR*) i metodom polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, *SNP*), kao i sekvenciranjem cijelog genoma (engl. *whole-genome sequencing*, *WGS*) poznatih sojeva, što je doprinijelo identificiranju laboratorijskog soja Ames bakterije *Bacillus anthracis* (Carter *et al.*, 2017; Lehman, 2012; NRC, 2014). Ovaj je slučaj doveo do veće osviještenosti javnosti o biološkim zločinima kao i do promjene u forenzičkoj mikrobiologiji koja se prethodno nije oslanjala na metode genotipizacije mikroorganizama na dijelovima genomskih sekvenci (Rasko *et al.*, 2011).

Forenzička mikrobiologija nije uključena samo u istraživanje zločina već je i dio istraživačke mikrobiologije i epidemiologije. Tako je, recimo, forenzička mikrobiologija korištena u istraživanju izvora epidemije kolere na Haitiju, izvora epidemije bakterije *E. coli* u Njemačkoj, kao i identifikaciji posmrtnih ostataka iz Drugog svjetskog rata pomoću analize virusa parvovirus B19 (Schmedes *et al.*, 2016).

11.1.2. Bioterorizam

Bioterorizam je pojam kojim se definira zločin u kojem jedna ili više osoba prijeti zloupotrebom ili koristi štetni biološki agens da bi se postigao određeni cilj koji je često motiviran politikom, vjerom, ekologijom ili nečim četvrtim (Jansen *et al.*, 2014; NRC, 2014). Oružje bioterorizma je patogen, toksin, ili toksin koji proizvodi patogen, a koji narušavaju zdravlje (Jansen *et al.*, 2014; Markotić *et al.*, 2023).

11.1.3. Ostala kaznena djela i ova disciplina

Forenzička mikrobiologija bitna je i u analiziranju i rješavanju ostalih kaznenih djela (Schmedes i Budowle, 2019). Posebna se pozornost pridaje pravilnom uzimanju, transportu i označavanju uzoraka, kao i pravovremenoj i stručnoj obradi kako bi uzorak mogao dati ispravne podatke o mikrobiološkom tragu (Blondeau *et al.*, 2019). Primjeri su: prikupljanje briseva, uzorkovanje tjelesnih tekućina, prikupljanje odjeće, dlaka i predmeta s mjesta na kojem se dogodio seksualni napad te testiranje osoba na spolno prenosive bolesti (Carter *et al.*, 2017; Frieden *et al.*, 2015).

Iako testiranje na spolno prenosive bolesti primarno služi za provjeru zdravlja žrtava, ono može postati i forenzički značajno. U jednom slučaju, silovatelj je osuđen pomoću mikoloških profila analizom uzoraka s odjeće i obuće (Hawksworth i Wiltshire, 2011). Kod slučajeva bolničkih infekcija, nerijetko je važno istražiti uzrok izbijanja infekcija i utvrditi postojanje nesavjesnog medicinskog postupanja. 2011. godine je pomoću analize sekvenciranja cijelog genoma (WGS), utvrđeno da se transmisija *Klebsiella pneumoniae* dogodila usprkos pravilnom provođenju dezinfekcije (Carter *et al.*, 2017; Snitkin *et al.*, 2012). Sekvenciranje se još koristi i pri ispitivanju autentičnosti proizvoda na tržištu te su ovom metodom otkrivene velike količine krivotvorenih kontaktnih leća na kojima su nađene *Pseudomonas aeruginosa* i druge bakterijske kolonije (Land *et al.*, 2018). Više bakterijskih vrsta pronađeno je u visokim koncentracijama i u zubnim pastama 2007. godine. Ova kontaminacija potvrđena je mikroskopi- ranjem i biokemijskim metodama, što je rezultiralo povlačenjem kontaminiranih proizvoda s tržišta (Blondeau *et al.*, 2019).

11.2. TEHNIKE U FORENZIČKOJ MIKROBIOLOGIJI

Uspješna forenzička istraga koja uključuje analizu mikroba ima sljedeće karakteristike: veliku senzitivnost i specifičnost za detekciju i identifikaciju mikroorganizma, veliku bazu podataka, potvrđene analitičke metode i praćenje smjernica za osiguranje kvalitete kako bi rezultati bili pouzdani (Yousefsaber *et al.*, 2022). U ovoj disciplini koriste se tradicionalne i suvremene (molekularne) metode

mikrobiološke analize, kao i u ostalim granama mikrobiologije (Blondeau *et al.*, 2019; Carter *et al.*, 2017; Lehman, 2012). Tradicionalna je metoda uzgoj kultura mikroorganizama na različitim podlogama, nakon čega se organizmi mogu proučavati po fenotipu i genotipu (Lagier *et al.*, 2015). Tradicionalne su metode fokusirane na analizu fenotipa jednom od sljedećih metoda: rastom mikroorganizama na specifičnim podlogama, bojanjem i mikroskopiranjem ili biokemijskim testovima. Fenotipske karakteristike nisu pouzdane za identifikaciju jer se mogu mijenjati zbog različitih utjecaja iz okoline. Stoga se suvremene metode fokusiraju na genotip, točnije na jedinstvene varijacije genoma. Ove molekularne metode sve više zamjenjuju tradicionalne jer su očigledne njihove brojne prednosti (Ellington *et al.*, 2017; Laupland i Valiquette, 2013).

11.2.1. Genotipizacija

Fingerprinting analiza, tj. DNA profiliranje ili DNA otisak, zasniva se na metoda genotipizacije, u ovom slučaju na analizi jedinstvenih polimorfizama mikrobnog genoma (Schürch *et al.*, 2018). Genotipizacija se može podijeliti na:

1. metode temeljene na restriksijskim endonukleazama, tj. RFLP analiza (engl. *restriction fragment length polymorphism*), sa ili bez hibridizacije,
2. metode temeljene na amplifikaciji DNA,
3. metode temeljene na sekvenciranju (Yousefsaber *et al.*, 2022).

Najčešće se u svrhu analize koriste mikrosateliti (kratka tandemska ponavljanja, engl. *short tandem repeats, STR*) i minisateliti (promjenjivi broj tandemskih ponavljanja, engl. *variable number tandem repeats, VNTR*), kao ponavljajući genetski elementi koji se razlikuju po veličini i obrascu ponavljanja. Ipak, polimorfizmi jednog nukleotida (SNP), odnosno točkasti polimorfizmi, prihvaćeni su kao najprecizniji. Kada su u pitanju PCR metode amplifikacije DNA, postoji nekoliko različitih varijacija ove metode koje se koriste u forenzičkoj mikrobiologiji, uključujući multiplex sustave (umnožava više sekvenci istovremeno) i real-time PCR, odnosno, kvantitativni PCR (mjeri količinu sekvenci u stvarnom vremenu), koje su se pokazale učinkovitim pri utvrđivanju mikrobnog otiska (NCR, 2014). VNTR analiza temelji se na PCR-u i manje je specifična od SNP analize, ali je uvelike pomogla u raznim istragama. Za SNP analizu se, uz PCR, može koristiti tehnika mikročipova (engl. *microarray*) (CDC, 2016; Schmedes i Budowle, 2019). Važno je napomenuti da je PCR analiza vrlo osjetljiva na kontaminaciju uzorka i nije u mogućnosti utvrditi genetski materijal koji prethodno nije poznat, ali je u svakom slučaju ova metoda amplifikacije prvi korak mnogih naprednijih metoda sekvenciranja (CDC, 2022; Garibyan i Avashia, 2013).

Kada je sekvenciranje u pitanju, prve takve analize provedene su na mikroorganizmima uzgojenim u kulturi, ali s obzirom da se mikroorganizmi u prirodi rijetko nalaze izolirani u pojedinačne kulture već su prisutni u mikrobnim zajednicama, analiza tih zajednica postala je važna i trenutno je opisana pojmom metagenomika, odnosno, analiza genetičkog materijala i vrsta iz uzoraka uzetih izravno iz okoliša, bez izdvojenog uzgajanja čistih kultura. Takva analiza moguća je uz sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next-generation sequencing, NGS*) koje dolazi uz mnoge prednosti: nije potreban uzgoj kultura što skraćuje vrijeme analiziranja, olakšava identifikaciju mikroorganizama koje je teško uzgojiti ili se ne mogu uzgojiti (kao što su anaerobne bakterije ili *Nocardia*), moguće je identificirati i žive i mrtve organizme na razini soja te se može odrediti nepoznati nukleotidni slijed uzorka DNA (Garibyan i Avashia, 2013; Heather i Chain, 2016; Schmedes i Budowle, 2019). Ovom metodom omogućeno je identificiranje uzročnika polimikrobnih infekcija istovremeno. Prva metoda (prva generacija sekvenciranja) bila je Sangerova metoda prekinutih lanaca DNA, nakon koje se uz konstantna unaprjeđenja razvila druga generacija sekvenciranja (NGS). NGS se od prve razlikuje po mogućnosti masovnog paralelnog sekvenciranja velikih količina DNA istovremeno (Persing *et al.*, 2016). Treća generacija sekvenciranja, koja se ne razlikuje puno od druge, omogućuje sekvenciranje jedne iznimno duge molekule i odvijanje procesa u stvarnom vremenu. U sklopu NGS tehnike, najčešće se koristi 16S ili 18S ribosomsko (rDNA) sekvenciranje za identifikaciju bakterija na temelju kratkog nukleotidnog slijeda gena 16S rDNA. Ovaj gen očuvan je među skoro svim bakterijskim rodovima i većini vrsta, pa je dobra meta filogenetskih analiza. Pored navedenog, kada je potrebno da se za detekciju sojeva unutar vrste bakterija koriste i SNP biljezi te sekvenciranje cijelog genoma (Blondeau *et al.*, 2019; Carter *et al.*, 2017; Muhamad Rizal *et al.*, 2020).

11.2.2. RAPD-PCR

Metoda slučajnog umnožavanja polimorfne DNA (engl. *random amplified polymorphic DNA, RAPD*) posebna je metoda amplifikacije DNA PCR-om, koja proizvodi nasumične genomske sekvence korištenjem DNA početnice ili više njih, proizvoljne nukleotidne sekvence. Metoda je posebno popularna u svrhu razlikovanja bakterijskih vrsta ili čak sojeva unutar jedne vrste.

Ova metoda ne traži prethodno znanje o sekvenci ciljane DNA molekule unutar ciljanog organizma, jer se početnice, najčešće dekameri (dugi 10 nukleotida), hoće ili neće hibridizirati na komplementarnu sekvencu ovisno o tome postoji li takva sekvenca u genomu koji se analizira i je li prisutna u ispravnoj orijentaciji. Također, nužno je da početnice ne budu previše razdvojene i da su krajevi ispravno okrenuti jedan prema drugom, tj. 3' kraj prema 3' kraju druge

početnice. Ova je metoda vrlo informativna, brza i cjenovno pristupačna u svrhu jednostavne filogenetske analize bakterijskih vrsta i sojeva. Odabir optimalne početnice najvažniji je korak u provođenju ove metode, jer će različiti genomi proizvesti različite kombinacije DNA fragmenata na gelu, dok neke početnice mogu biti izrađene specifično za prepoznavanje i klasifikaciju određenih bakterijskih vrsta (National Library of Medicine (NLM), 2022).

Kao i svaka enzimatska reakcija, uvjeti PCR-a moraju biti pažljivo određeni i poštovani. RAPD-PCR koristi visok broj ciklusa amplifikacije, obično od 40 do 45, kao i nisku temperaturu vezivanja početnica (obično oko 35°C), zbog kratkih sekvenci koje se koriste. Nakon ovog koraka, dobiveni fragmenti razdvajaju se uobičajenom metodom agarozne gel elektroforeze, boje i analiziraju pod odgovarajućim izvorom svjetla (Ladan, 2020).

11.2.3. Validacija rezultata

Potvrđivanje rezultata obavezan je korak ukoliko se mikroorganizmi koriste u forenzičkoj analizi, jer ovi rezultati mogu utjecati na javno zdravstvo te političke i sudske odluke. Ovaj je proces sažet u sljedećim koracima:

1. procjena koliko su rezultati točni nakon određene procedure koja je provedena u određenim uvjetima,
2. definiranje uvjeta u kojima se rezultati mogu dobiti,
3. utvrđivanje nedostataka procedure,
4. utvrđivanje aspekata analize koji moraju biti kontrolirani i praćeni te
5. formiranje temelja za razvoj smjernica koje se moraju poštivati prilikom opisivanja značaja rezultata (Yousefsaber *et al.*, 2022).

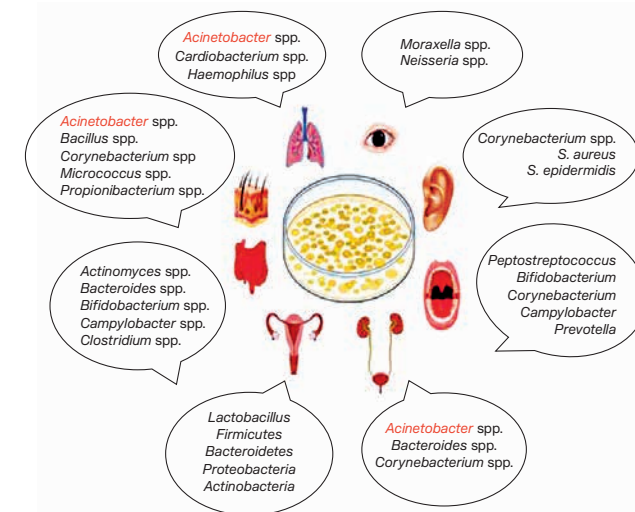
11.2.4. Mikrobni potpis (engl. microbial fingerprint)

Mikrobni potpis može se poistovjetiti s otiskom prsta, ali nađenim u mikrobiološkom uzorku. Fingerprinting, uglavnom putem genotipizacije mikroba u uzorku, koristi se kako bi se objasnilo širenje određene zarazne bolesti tako što razlikuje mikroorganizme ili njihove skupine na temelju sličnih osobina (genetskog materijala ili dijela biomolekula kao što su fosfolipidi) (Interstate Technology Regulatory Council (ITRC), 2011). Mikrobnim potpisom (mikrobnim otiskom prsta) postiže se precizna usporedba s referentnim genomom i omogućuje praćenje mikroorganizama sve do njihovog izvora (Lehman, 2012). Ova metoda koristi se u istraživanju izvora epidemije i u suvremenim forenzičko-mikrobiološkim slučajevima (Blondeau *et al.*, 2019; ITRC, 2011). Ovo retrogradno praćenje prijenosa mikroorganizama najočiglednije je bilo u slučaju izbijanja antraksa među

korisnicima heroina u Švedskoj između 2009. i 2010. godine. Ovaj se slučaj proširio na Njemačku i Ujedinjeno Kraljevstvo, a kako bi se utvrdilo porijeklo zaraze koristili su se prethodno potvrđeni genetski mikrobni SNP potpisi da bi se utvrdilo porijeklo soja. S obzirom da su svi bolesnici dijelili isti polimorfizam, potvrđen je izvor zaraze, a po filogeografskoj analizi soj je bio usko povezan sa sojevima iz Turske što je doprinijelo zaključku da se radi o slučajnoj kontaminaciji duž rute krijumčarenja heroina u Europu (Price *et al.*, 2012).

11.2.5. Identifikacija osobe putem mikrobioma

Mikroorganizmi se smatraju vrstom fizičkog dokaza u forenzici. Recimo, geolokaciju je moguće odrediti analizom mikroorganizama, s obzirom da se u različitim staništima nalaze različite zajednice mikroba. Također, moguće je identificirati ljude na temelju njihovog mikrobioma (Bousslimani *et al.*, 2015; Lax *et al.*, 2014, 2015; Tridico *et al.*, 2014). Mikrobni otisak (slika 11.1.) jedinstven je pa tako jednodjajčani blizanci nemaju jedinstven otisak, što ukazuje na mogućnost korištenja ovoga otiska u svrhu individualizacije. Jedinstveni mikrobni otisak istražiteljima može pružiti dodatne informacije o žrtvi ili počinitelju (npr. spol, je li osoba pacijent s dijabetesom, pušač ili nepušač, itd.) (Avdić *et al.*, 2018). Ali, zajednice mikroorganizama podložne su promjenama kao odgovor na nove uvjete, kao što su promjena ishrane, korištenje antibiotika ili lijekova, zdravstveno stanje, dob ili bolesti, što dodatno komplicira njihovu primjenu u identifikaciji (Avdić



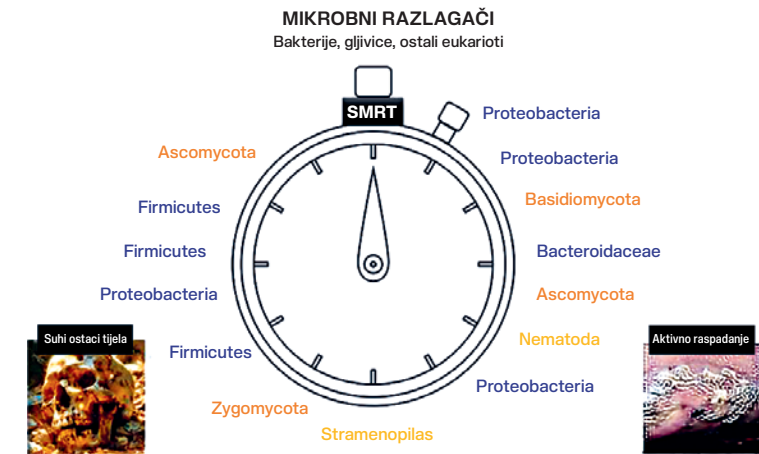
SLIKA 11.1. Ljudski mikrobiom (dijelovi slike preuzeti iz Yousefsaber *et al.*, 2022).

Iako je ljudska dlaka čest uzorak s mjesta zločina, njezina je primjena u analizi nuklearne DNA ograničena i često nepostojeća, zbog stanja u kojem se zatekne na mjestu zločina, dok analiza mtDNA ima ograničenu sposobnost diskriminacije i samim tim, individualizacije na bazi DNA profila. Stoga bi upotreba 16S rDNA sekvenciranja u svrhu identifikacije bakterijskih vrsta prisutnih na kosi i stidnim dlakama mogla biti zanimljiv novi pristup u analizi ovih tragova, što novije studije predlažu. Rezultati jedne zanimljive studije (Tridico et al., 2014) pokazali su da se mikrobiomi kose ne razlikuju značajno između muškaraca i žena i da su razlike uglavnom uvjetovane vanjskim čimbenicima, odnosno time što žene češće tretiraju kosu bojom i sredstvima za oblikovanje kose. Međutim, profili stidnih dlaka značajno se razlikuju između muških i ženskih osoba. Kompozicija pojedinačnih mikrobioma bila je poprilično stabilna tijekom petomjesečnog razdoblja, koliko je istraživanje trajalo. Međutim, kako je ova studija uključila i nekoliko ispitanika koji su živjeli zajedno, autori su dokazali da postoji značajna mogućnost transfera bakterijskih vrsta i promjena u sastavu mikrobioma stidnih dlaka nakon spolnog odnosa. Dodatna prednost usporedbe muškog i ženskog mikrobioma u ovom kontekstu proizlazi iz činjenice da je vaginalni mikrobiom specifičan, posebno zbog prisustva *Lactobacillus* spp., i jednostavniji u odnosu na mikrobiome drugih dijelova tijela, poput kože, probavnog trakta ili usne šupljine. Ovo je posebno značajno u slučajevima forenzičke istrage zločina silovanja (Tridico et al., 2014).

et al., 2018; Carter et al., 2017). Ovo dodatno ukazuje da su zajednice mikroorganizama primarni fokus forenzičke mikrobiologije, iako je svaki mikroorganizam ili njegov produkt od velikog značaja za ovu disciplinu (Carter et al., 2017; NRC, 2014; Schmedes i Budowle, 2019).

11.2.6. Forenzička mikrobiologija u postmortem analizama

Ljudski postmortem mikrobiom sastoji se od tanatomikrobioma (engl. *thanatomicrobiome*), odnosno mikroba koji se nalaze na unutrašnjim organima i tekućinama nakon smrti i epinekrotičnih (engl. *epinecrotic*) mikrobnih zajednica koje se sastoje od mikroba na površini mrtvog tijela (Spagnolo et al., 2019). Mikroorganizmi su također pokretači razgradnje tijela (slika 11.2.) (Carter et al., 2017). Detaljno proučavanje mikrobnih zajednica i pojava sekvenciranja sljedeće generacije ukazali su na korist ovih analiza u postmortem analizama. Tako mikroorganizmi i njihova dinamika mogu pomoći u određivanju vremena smrti, kao i u rasvjetljavanju mnogih drugih okolnosti.



SLIKA 11.2. Mikrobni sat raspadanja mrtvog tijela (na osnovu Yousefsaber et al., 2022).

Postmortalni interval (engl. *postmortem interval*, *PMI*) u sudsko-medicinskoj procjeni temelji se na znakovima smrti, promjenama na mrtvom tijelu i znakovima u okolini tijela. Jedna od najbitnijih točaka bilo koje istrage precizno je procijenjen PMI, najčešće kombinacijom čimbenika kako bi se vremenski razmak u kojem se smrt vjerojatno dogodila što više suzio (Zečević et al., 2018). Temperatura okoline, vlaga, dostupnost kisika, ukop u zemlji, građa i položaj leša te izloženost svjetlosti, kao i način smrti, sve su čimbenici koji utječu na brzinu postmortalnih procesa. Također, svi ovi čimbenici ukazuju na pogodnost okoliša za rast i umnožavanje različitih mikroorganizama. Truljenje tijela najbrže se očituje u srednjoj vlažnosti okoliša, pri temperaturi od 25°C do 30°C, što ukazuje na okolinu na koju su mikroorganizmi navikli zbog optimalne enzimatske aktivnosti (Janaway et al., 2009). Sekvenciranje ovih mikrobnih zajednica pomaže pri utvrđivanju mikrobnog sata (engl. *microbial clock*) koji je vremenski određen i sličan ostalim ranijim metodama procjene PMI. Istraživanje koje je dokazalo da bi se PMI mogao određivati pomoću mikrobnog sata, pokazalo je i da bi se PMI mogao određivati i do 24 dana od smrti, s pogreškom od tri dana, pomoću ove metode (Metcalf et al., 2013, 2019). Ova metoda ipak se još ne koristi u svakodnevnoj praksi (Blondeau et al., 2019).

Forenzička mikrobiologija našla je primjenu i prilikom obdukcija nakon iznenadnih smrti, radi potencijalnog pronalaska infektivnih uzoraka. U jednom istraživanju pronađeno je 20 slučajeva miokarditisa od 56 iznenadnih smrti, kao i 18 bronhopneumonije, pet meningokokcemija i 10 virusnih pneumonija. U drugom istraživanju, najviše infektivnih uzoraka bilo je povezano s upalom

pluća, sepsom, meningitisom te upalom slijepog crijeva komplicirane perforacijom i peritonitisom (Blondeau *et al.*, 2019).

Iako je određivanje uzroka smrti pomoću mikroorganizama moguće, ipak je otežano stalnim promjenama mikrobioma. Ovo ukazuje na potrebu daljnjeg proučavanja dinamike mikroorganizama na ili u mrtvom tijelu i njegovoj okolini. Mikroorganizmi mogu pomoći pri utvrđivanju vremena i načina smrti, ali također mogu utjecati na toksikološke nalaze. Mnoge bakterije i gljivice tako mogu prikriti otkrivanje neinfektivnog uzroka smrti razgradnjom ksenobiotika ili stvaranjem alkohola i drugih derivata. Štoviše, mikroorganizmi su u međusobnoj interakciji, a to također utječe na analize forenzičke mikrobiologije, tako što prilikom obdukcije, prisustvo jednog mikroorganizma može biti samo posljedica prisustva drugog organizma. Otkrivanje određenog mikroorganizma u uzorku ne mora nužno ukazivati na zarazu ili uzrok smrti, što dodatno komplicira tumačenje postmortalnih kultura. Izolacija mikroorganizama može ukazivati na postmortalnu translokaciju, migriranje mikroorganizama preko sluznice u krv i unutrašnje organe (Carter *et al.*, 2017). Stoga se naglašava potreba da se postmortalna translokacija uzme u obzir prilikom obdukcije, te da se selektivno, pri sumnji na zarazu, uzimaju hemokulture za analiziranje (Riedel, 2014). Pored postmortem translokacije, gubitak osjetljivih mikroorganizama i prekomjerni rast brzoraštucih organizama također su problemi na koje se može naići prilikom provođenja ovih analiza (Yousefsaber *et al.*, 2022).

11.3. ZAKLJUČAK

Mikroorganizmi su od velikog značaja u forenzičkoj mikrobiologiji. Oni omogućavaju individualizaciju, pomažu pri određivanju geolokacije i u postmortem analizama. Jedna od osobina mikroorganizama jest da dulje vrijeme mogu preživjeti, pogotovo na ljudskom tijelu, što dodatno olakšava analize, ali još uvijek postoje mnoga tehnička ograničenja i nedoumice oko interpretacije rezultata analiza forenzičke mikrobiologije (Schmedes i Budowle, 2019).

- Avdić, M., Smajlović Skenderagić, L., & Hukić, M. (2018). Microbiomes as tools in human identification. In: *Forensic Genetics: Theory and Application* (pp. 262-270). Sarajevo: International Burch University.
- Blondeau, L. D., Rubin, J. E., Deneer, H., Kanthan, R., Sanche, S., Hamula, C., & Blondeau, J. M. (2019). Forensic, investigative and diagnostic microbiology: similar technologies but different priorities. *Future Microbiology*, *14*, 553–558. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0088>
- Bouslimani, A., Porto, C., Rath, C. M., et al. (2015) Molecular cartography of the human skin surface in 3D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*, E2120–E2129.
- Carter, D. O., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E., & Metcalf, J. L. (2017). *Forensic Microbiology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd.
- Center for Disease Control and Prevention. (2016). Multiple locus variable number tandem repeat analysis. Pristupljeno 4.5.2023. na <https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/mlva.html>
- Center for Disease Control and Prevention. (2022). The whole-genome sequencing (WGS) process. Pristupljeno 4.5.2023. na <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/genome-sequencing-508c.pdf>
- Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., et al. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *23*(1), 2–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>
- Federal Bureau of Investigation. (2010). Amerithrax investigative summary. Pristupljeno 6.5.2023. na <https://www.justice.gov/archive/amerithrax/docs/amx-investigative-summary2.pdf>
- Frieden, T. R., Jaffe, H. W., & Cono, J. (2015) Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. In: *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Atlanta, GA: Center for Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, Centers for Disease Control and Prevention, US Department of Health and Human Services.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Hawksworth, D. L., & Wiltshire, P. E. (2011) Forensic mycology: the use of fungi in criminal investigations. *Forensic Science International*, *206*(1–3), 1–11.
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, *107*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
- Interstate Technology Regulatory Council. (2011). Microbial Fingerprinting Methods. Pristupljeno 11.5.2023. na https://itrcweb.org/Documents/team_emd/Microbial_Fingerprinting_Fact_Sheet.pdf
- Janaway, R. C., Percival, S. L., & Wilson, A. (2009). Decomposition of Human Remains. In: *Microbiology and Aging: Clinical Manifestations*. Totowa, NJ: Humana Press.

- Jansen, H. J., Breeveld, F. J., Stijnis, C., & Grobusch, M. P. (2014). Biological warfare, bioterrorism, and biocrime. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(6), 488–496. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12699>
- Ladan, P. (2020). *Završni rad: Metoda slučajnog umnažanja polimorfne DNA (RAPD)*. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu.
- Lagier, J. C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M., & Raoult, D. (2015). Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 208–236. <https://doi.org/10.1128/CMR.00110-14>
- Land, A. D., Penno, K. L., & Brzezinski, J. L. (2018). Identification of microorganisms isolated from counterfeit and unapproved decorative contact lenses. *Journal of Forensic Science*, 63(2), 635–649.
- Laupland, K. B., & Valiquette, L. (2013). The changing culture of the microbiology laboratory. *The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 24(3), 125–128. <https://doi.org/10.1155/2013/101630>
- Lax, S., Hampton-Marcell, J. T., Gibbons, S. M., et al. (2015). Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. *Microbiome*, 3, 21.
- Lax, S., Smith, D. P., Hampton-Marcell, J., et al. (2014). Longitudinal analysis of microbial interaction between humans and the indoor environment. *Science*, 345, 1048–1052.
- Lehman, D. C. (2012). Forensic microbiology. *Clinical laboratory science: Journal of the American Society for Medical Technology*, 25(2), 114–119.
- Markotić A, Kurolt I-C, Cvetko Krajinović L, et al. Bioterrorism and Microbial Forensics. U: Primorac D, Schanfield M. Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective, 2nd edition. Boca Raton, FL: CRC Press; 2023. str. 237-256.
- Metcalf, J. L. (2019). Estimating the postmortem interval using microbes: Knowledge gaps and a path to technology adoption. *Forensic Science International: Genetics*, 38, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.11.004>
- Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Gonzalez, A., et al. (2013). A microbial clock provides an accurate estimate of the postmortem interval in a mouse model system. *eLife*, 2, e011104.
- Muhamad Rizal, N. S., Neoh, H. M., Ramli, R., et al. (2020). Advantages and Limitations of 16S rRNA NextGeneration Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 10(10), 816. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
- National Library of Medicine. (2022). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Pristupljeno 24.8.2023. na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrapd/>
- National Research Council. (2014). *Science Needs for Microbial Forensics: Developing Initial International Research Priorities*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/18737>
- Persing, D. H., Tenover, F. C., Hayden, R. T., Ieven, M., Miller, M. B., Nolte, F. S., Tang, Y. W., Belkum, A. V. (2016). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, 3rd Edition*. Washington, DC: ASM Press.
- Price, E. P., Seymour, M. L., Sarovich, D. S., et al. (2012). Molecular epidemiologic investigation of an anthrax outbreak among heroin users, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 1307–1313.
- Rasko, D. A., Worsham, P. L., Abshire, T. G., et al. (2011). Bacillus anthracis comparative genome analysis in support of the Amerithrax investigation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(12), 5027–5032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016657108>
- Riedel, S. (2014). The value of postmortem microbiology cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(4), 1028–1033. <https://doi.org/10.1128/JCM.03102-13>
- Robinson, J. M., Pasternak, Z., Mason, C. E., & Elhaik, E. (2021). Forensic Applications of Microbiomics: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11:608101. doi: 10.3389/fmicb.2020.608101
- Schmedes, S. E., Sajantila, A., & Budowle, B. (2016). Expansion of Microbial Forensics. *Journal of clinical microbiology*, 54(8), 1964–1974. <https://doi.org/10.1128/JCM.00046-16>
- Schmedes, S., & Budowle, B. (2019). Microbial Forensics. *Encyclopedia of Microbiology*, 134–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02483-1>
- Schürch, A. C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R., & Goering, R. V. (2018). Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(4), 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016>
- Snitkin, E. S., Zelazny, A. M., Thomas, P. J., et al. (2012) Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae with whole-genome sequencing. *Science Translational Medicine*, 4, 148ra116.
- Spagnolo, E. V., Stassi, C., Mondello, C., Zerbo, S., Milone, L., & Argo, A. (2019). Forensic microbiology applications: A systematic review. *Legal Medicine*, 36, 73–80.
- Tridico, S. R., Murray, D. C., Addison, J., Kirkbride, K. P., & Bunce, M. (2014). Metagenomic analyses of bacteria on human hairs: a qualitative assessment for applications in forensic science. *Investigative Genetics*, 5, 16.
- Yousefsaber, F., Naseri, Z., & Hasani, A. H. (2022). A Short Review of Forensic Microbiology. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 9(2), 88–96.
- Zečević, D. (2018). *Sudska medicina i deontologija*. Zagreb: Medicinska naklada.

12.

PRILOG: PROCEDURE PRIKUPLJANJA I OZNAČAVANJA BIOLOŠKIH TRAGOVA NAMIJENJENIH ZA ANALIZU DNA

prof. dr. sc. Damir Marjanović
Josip Crnjac, MSc

PRILOG: PROCEDURE PRIKUPLJANJA I OZNAČAVANJA BIOLOŠKIH TRAGOVA NAMIJENJENIH ZA ANALIZU DNA

12.1. PRIKUPLJANJE TRAGOVA KRVI

U Republici Hrvatskoj na snazi je Pravilnik o načinu uzimanja uzoraka biološkog materijala i provođenja molekularno-genetske analize (Narodne Novine, Službeni list Republike Hrvatske od 10. listopada 2014. godine NN 120/2014). Kako se navodi u članku 1. tog Pravilnika njime se određuje „način uzimanja uzoraka biološkog materijala za potrebe molekularno-genetske analize, uvjeti pohrane i čuvanja uzoraka biološkog materijala, uvjeti pohrane, obrade i čuvanja podataka prikupljenih molekularno-genetskom analizom te nadzor nad pohranom, obradom i čuvanjem prikupljenih podataka”. U članku 2. ovog Pravilnika nabrojane su vrste (nespornih) bioloških uzoraka (nespornih i spornih) koje se mogu prikupljati, kao i metode kojima se postupak može provoditi, ali detaljnije metode i procedure za pojedine tragove nisu obuhvaćene Pravilnikom. Stoga u ovom Prilogu, pozivajući se na literaturu objavljenu 2005. godine (Marjanović *et al.* 2005c) prikazujemo detaljnije kako bi te procedure trebale izgledati za određene tipove uzoraka.

12.1.1. Prikupljanje neosušenih tragova krvi s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu

Na mjestu inkriminirane radnje moguće je pronaći tragove svježe, neosušene krvi i to na predmetima koje iz objektivnih razloga nije moguće poslati u laboratorij na daljnja ispitivanja (na asfaltu, zidovima, statičnim glomaznim predmetima itd.). Tada se primjenjuju sljedeća pravila prikupljanja uzorka krvi koja za cilj imaju izbjegavanje moguće dodatne kontaminacije traga:

- Vateni vrh sterilnog štapića (iz kompleta) umočiti u trag tekuće krvi i pustiti da vata upije dovoljnu količinu krvi. U nedostatku kompleta, krv je moguće

upiti sterilnim (čistim) filter papirom ili pak, sterilnom gazom (slika 12.1.). Površina kojom se prikuplja trag ne smije se doticati prstima.

- Svaki krvni trag neophodno je obrađivati različitim štapićima (komadima filter papira ili gaze).
- Prikupljene uzorke krvi moguće je odmah staviti u posebnu kartonsku kutiju iz priručnog kompleta za prikupljanje uzoraka. Ako komplet nije dostupan, neophodno je osušiti trag na zraku, ne izlažući ga izravnoj sunčevoj svjetlosti ili toplinskoj energiji.
- Prilikom sušenja uzoraka paziti da se uzorci ne pomiješaju niti dodiruju. Najbolje je uzorke sušiti pored već pripremljenog i označenog papirnato omota (koverte).
- U nedostatku kompleta, nakon sušenja, uzorak je moguće upakirati u čistu papirnatu, jasno označenu, kovertu ili omot. Ispuniti prateći dokument.



SLIKA 12.1. Prikupljanje neosušenih tragova krvi.

12.1.2. Prikupljanje neosušenih tragova krvi s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu

U slučaju pronalaženja neosušenih tragova krvi na predmetima koje je moguće u cijelosti poslati u laboratorij (oružje, odjeća, obuća, mali prijenosni predmeti itd.) nije potrebno na licu mjesta prikupljati tragove i provoditi navedenu proceduru. Dovoljno je ispoštovati sljedeće upute:

- Predmet na kojem je uočen svježi krvni trag osušiti na zraku, ne izlažući ga izravnoj sunčevoj svjetlosti ili izvoru toplinske energije.
- Osušeni predmet upakirati u odgovarajuću papirnatu (kartonsku) ambalažu i po potrebi ga dodatno upakirati u novi omot. Omot mora biti jasno označen, a oznaka se mora poklapati s oznakom u pratećoj dokumentaciji.

- Ako iz nekog razloga nije moguće na mjestu opservacije predmet temeljito osušiti, neophodno ga je u što kraćem roku dostaviti u laboratorij.
- Trag krvi uočen na snijegu, tj. uzorak krvavog snijega neophodno je staviti u čistu, sterilnu plastičnu ili staklenu epruvetu (ili neku drugu posudu), pazeći da se zahvati što manje neokrvavljenog snijega. Trag je neophodno što hitnije dostaviti u analitički laboratorij.

12.1.3. Prikupljanje osušenih tragova krvi s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu

U odnosu na neosušene tragove krvi, uočavanje i pronalaženje osušenih tragova krvi znatno je češće. Prikupljanje ovih tragova lociranih na zidu, većim staklenim površinama, asfaltu i slično, zahtijeva poštivanje sljedeće procedure:

- Osušeni se trag ostruže čistim skalpelom (nožićem, skalpelom ili britvom) na čisti papir koji se nakon prikupljanja praha presavije u obliku pisma. Tako umotan trag upakira se u dodatni, označeni papirnat ovoj. Tijekom prikupljanja ovoga traga treba izbjegavati upotrebu velikih vrećica i plastičnih epruveta.
- Manji krvni tragovi i tanki krvavi brisovi sa površina koje se ne žele oštetiti prikupljaju se sterilnim štapićima s vatiranim vrhom. Vatirani kraj štapića navlaži se s 1-2 kapljice sterilne vode iz preporučenog kompleta (mogu poslužiti i male doze sterilne vode koje se mogu naći u svakoj ljekarni – slika 12.2.). Tim dijelom prelazi se preko traga (slika 12.3.). Površina kojom se prikuplja trag ne smije se doticati prstima. Ako je trag jako male kvantitete izbjegava se rotiranje štapića da bi se što više uzorka prikupilo na jednom



SLIKA 12.2. Vatirani kraj štapića navlaži se s 1-2 kapljice sterilne vode.



SLIKA 12.3. Prikupljanje osušenih tragova krvi.

mjestu. Nakon toga suhim se vatiranim krajem drugoga štapića prođe ponovo preko, sada navlaženog traga. Ova dva štapića upakiraju se u isti papirnati (kartonski) omot i označe kao jedan trag.

- Osušeni krvni tragovi na tapetama, tekstilnim podnim oblogama, kaučima i zastorima moraju se izrezati i upakirati u označene papirnate (kartonske) omote.
- Osušeni krvni tragovi iz drvenih površina moraju se izdubiti/izrezati skalpelom i upakirati u označene papirnate (kartonske) omote.
- Osušene krvne tragove u pijesku ili na zemlji, neophodno je prikupiti odgovarajućim oruđem (lopaticom i sl.) i prebaciti u označenu staklenu epruvetu ili neku drugu posudu s poklopcem.

12.1.4. Prikupljanje osušenih tragova krvi s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu

U izbjegavanju potencijalne sekundarne kontaminacije traga, kada je to moguće, poželjno je cijele predmete na kojima je uočen trag osušene krvi dostaviti na analizu (oružje, odjeća, obuća, mali prijenosni predmeti itd.). Procedura prikupljanja ovih tragova znatno je jednostavnija nego procedura za prikupljanje tragova s predmeta koji se ne mogu transportirati u ordinirajući laboratorij.

- Navedeni predmet, na kojem je uočen osušeni trag krvi zapakira se u označenu papirnatu (kartonsku) ambalažu. Krvne tragove na predmetu treba jasno označiti i po potrebi, dodatno zaštititi manjim pokrovnim omotom da bi se spriječilo njegovo eventualno otpadanje i rasipanje.
- Posebno se mora biti pažljiv prilikom pakiranja oštih predmeta (igle, noževi i sl.).

12.1.5. Tragovi krvi na mokroj ili vlažnoj obući i odjeći

Tragovi krvi uočeni na mokroj ili vlažnoj odjeći i obući zahtijevaju posebnu pažnju prilikom prikupljanja, a zbog specifičnog stanja u kojem se nalaze. U njihovom tretmanu neophodno je učiniti sljedeće:

- Mokru odjeću i obuću, na kojoj je uočen trag krvi, položiti na čistu bijelu papirnatu podlogu ili objesiti u prozračnoj prostoriji. Ove predmete treba sušiti na zraku, izbjegavajući izravno sunčevo svjetlo i izvore topline.
- Za sušenje obuće potreban je nešto dulji period nego za sušenje odjeće.
- Mokra obuća i odjeća nikada se ne smiju pakirati u plastične omote jer vlaga pospješuje rast mikroorganizama i gljivica i daljnju degradaciju DNA.

- Nužno je paziti da se predmeti tijekom prikupljanja međusobno ne dodiruju da bi se izbjegla potencijalna sekundarna kontaminacija.
- Svaki komad odjeće i obuće, nakon sušenja, mora se upakirati u poseban omot i jasno označiti. Oznaka se mora nepogrešivo podudarati s navedenom oznakom u pratećoj dokumentaciji.

12.2. PRIKUPLJANJE TRAGOVA SPERME

Tragovi sperme kao sporni biološki tragovi često se mogu pronaći na mjestu izvršenja seksualnih delikata. S obzirom na njihovu kvalitativnu vrijednost za cjelokupnu istragu, ali i molekularnu prirodu, vrlo je važno pravovremeno obaviti sve neophodne aktivnosti s ciljem pravilnog prikupljanja ovih tragova. Zato proces prikupljanja ovih tragova mora biti elaboriran s više različitih aspekata.

Najvažniju ulogu u prikupljanju tragova ima službena osoba koja prva stupa u kontakt sa žrtvom zločina. Ovaj kontakt posebno dobiva na značaju ako se radi o seksualnom deliktu koji je žrtva prijavila odmah ili relativno brzo nakon izvršenog kaznenog djela. U preliminarnom razgovoru važno je žrtvu upozoriti na osnovne parametre kojih se mora pridržavati u cilju očuvanja svih potencijalnih tragova koje je počinitelj ostavio za sobom. Žrtva se upozorava na sljedeće:

- da ne smije mijenjati ili prati odjeću u kojoj je bila u trenutku kaznenog djela
- da se ne smije kupati, prati kosu ili umivati
- da ne smije prati ruke i čistiti nokte
- da se ne smije češati
- da ne smije urinirati ili defecirati (ako već mora urinirati onda to mora učiniti u čistu staklenu posudu s poklopcem)
- da ne smije jesti, piti i pušiti
- da ne smije prati zube i ispirati usta
- da ne smije ništa doticati i pomicati
- da ne smije izbacivati smeće.

12.2.1. Razdoblje u kojem je neophodno prikupiti trag sperme

Tragovi sperme na odjeći i predmetima lako se mogu prikupiti i analizirati kroz dulje vremensko razdoblje nakon izvršenog kaznenog djela. Ako je trag sperme bio u suhom prostoru i nije bio izložen vlazi ili izravnom suncu te ako se predmet na kojem se trag nalazi nije naknadno prao, on se može lako analizirati i nakon nekoliko godina. Ukoliko su predmeti na kojima se nalazi biološki trag bili pohranjeni u nepovoljnim uvjetima, onda je njihov vijek upotrebe znatno kraći.

Stručna literatura navodi da je najduži period do kojega je moguće prikupiti i uspješno analizirati trag sperme iz vagine 72 sata. Nakon tog perioda, trag sperme, koji se već od samog početka uslijed vaginalnih sekreta i mikro sredine brzo degradira, je već u takvom stupnju razgradnje da ga nije moguće dalje procesirati. Stoga, nakon tri dana od izvršenja kaznenog djela, nema smisla uzimati vaginalni bris žrtve. U tom pogledu situacija je nešto povoljnija kod mrtvih tijela (vidi dalje).

Trag sperme iz usta moguće je uspješno prikupiti sve dok žrtva nije isprala usta. Slična je situacija s tragom sperme iz anusa, koji ima smisla prikupljati samo ukoliko osoba nije defecirala. Osim toga, tragovi sperme u ustima i anusu ostaju upotrebljivi znatno kraće nego trag sperme iz vagine, a uslijed stalnog ispiranja pljuvačkom u ustima i progresivne degradacije u anusu.

Trag koji se često zanemaruje i koji može biti jako pouzdan, ako imamo potencijalnog počinitelja, je trag s penisa osumnjičene osobe. Krajnji rok za prikupljanje ovoga traga je 48 sati. U tom razdoblju moguće je uspješno prikupiti tragove biološkog materijala žrtve na tijelu osumnjičenog prikupljanjem brisa s penisa osumnjičenog. Prikupljanje ovoga traga mora biti dokumentirano i informacijama o mogućim drugim seksualnim kontaktima osumnjičene osobe poslije izvršenja kaznenog djela.

Razdoblje trajanja traga sperme na mrtvom tijelu žrtve relativno je dulje u odnosu na prethodne. U vagini mrtvog tijela spermatozoidi mogu opstati i pet dana nakon smrti, a u nekim slučajevima i do 10 dana.

Važno je napomenuti da, u cilju preciznog i točnog identificiranja osobe koja je izvor spornog traga, neophodno je, pored spornog biološkog traga i nespornog traga osumnjičene osobe, analizirati i nesporni trag žrtve.

12.2.2. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova sperme s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu

Ako su na mjestu kaznenog djela pronađeni tragovi svježe, neosušene sperme i to na predmetima koje iz objektivnih razloga nije moguće poslati u laboratorij na daljnja ispitivanja (na asfaltu, zidovima, statičnim glomaznim predmetima itd.), tada se primjenjuju sljedeća pravila prikupljanja uzorka:

- Vateni vrh sterilnog štapića iz kompleta umočiti u trag sperme i rotirati ga tako da vata upije dovoljnu količinu uzorka. U nedostatku kompleta, trag je moguće upiti sterilnim (čistim) filter papirom ili pak sterilnom gazom. Površina kojom se prikuplja trag ne smije se doticati prstima.
- Svaki trag sperme neophodno je obrađivati različitim štapićima (komadima filter papira ili gaze).

- Prikupljene uzorke sperme moguće je odmah staviti u posebnu kartonsku kutijicu iz priručnog kompleta za prikupljanje uzoraka. Ako komplet nije dostupan, neophodno je osušiti trag na zraku, ne izlažući ga izravnoj sunčevoj svjetlosti ili toplinskim izvorima.
 - Prilikom sušenja uzoraka paziti da se uzorci ne pomiješaju niti dodiruju. Najbolje ih je sušiti pored već pripremljenog i označenog papirnato omota.
- Nakon sušenja, označeni uzorak upakira se u odgovarajući papirnati omot (kovertu).

12.2.3. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova sperme s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu

- Mokre ili vlažne predmete (odjeća, posteljina, maramice itd.) kao i predmete na kojima se nalazi svježi trag sperme neophodno je položiti na čistu bijelu papirnatu podlogu ili objesiti u prozračni prostor da se dobro osuši.
- Predmet na kojem je uočen trag zapakira se u označenu papirnatu (kartonsku) ambalažu. Tragove na predmetu jasno označiti i po potrebi dodatno zaštititi manjim pokrovnim omotom da bi se izbjeglo njegovo eventualno otpadanje i rasipanje.
- Kondomi predstavljaju specifične predmete istrage na kojima se (najčešće) mogu pronaći zajedno tragovi počinitelja kaznenog djela i žrtve. Ta činjenica traži posebnu pozornost tijekom prikupljanja ovih tragova. Ako u kondomu ima još sperme u tekućem stanju, sterilnim štapićem s vatiranim završetkom prikupiti tragove sperme (slika 12.4.). Štapić odmah staviti u posebnu kartonsku kutijicu iz priručnog kompleta za prikupljanje uzoraka. Ako komplet nije dostupan, neophodno je osušiti trag na zraku, ne izlažući ga



SLIKA 12.4. Prikupljanje neosušenih tragova sperme iz kondoma.

izravnoj sunčevoj svjetlosti ili toplini, a zatim ga upakirati u označeni papirnati omot. Kondom s ostatkom sperme treba zavezati tako da se spriječi izlivanje njegovog unutarnjeg sadržaja na površinu kondoma (na kojoj se nalaze epitelne stanice žrtve) te ga upakirati u odgovarajuće označen papirnati omot. Bitno je dobro zavezati kondom da se njegova unutrašnjost ne bi osušila. Ako su tragovi sperme u kondomu osušeni treba ga upakirati u označeni papirnati ovoj i dostaviti u laboratorij.

12.2.4. Prikupljanje osušenih tragova sperme s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu

Prikupljanje ovih tragova lociranih na zidu, većim staklenim površinama, asfaltu i slično zahtijeva poštivanje sljedeće procedure:

- Osušeni tragovi sperme s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu prikupljaju se sterilnim štapićima s vatiranim vrhom. Navlaži se vatirani kraj štapića s 1-2 kapljice sterilne vode iz kompleta (mogu poslužiti i male doze sterilne vode koje se mogu naći u svakoj apoteci). Tim dijelom prelazi se preko traga. Površina kojom se prikuplja trag ne smije se dirati prstima. Ako je trag kvantitativno mali, izbjegava se rotiranje štapića da bi se što više uzorka prikupilo na jednom mjestu. Nakon toga suhim se vatiranim krajem drugoga štapića prijede ponovo preko, sada navlaženog, traga. Ova dva štapića upakiraju se u isti papirnati (kartonski) omot i označe kao jedan trag.
- Osušeni tragovi sperme na tapetama, tekstilnim podnim oblogama, kaučima i zastorima se moraju izrezati i upakirati u označene papirnat (kartonske) omote.
- Osušeni tragovi sperme s drvenih površina moraju se skalpelom izdubiti/izrezati i upakirati u označene papirnat (kartonske) omote.

12.2.5. Prikupljanje osušenih tragova sperme s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu

Procedura prikupljanja ovih tragova znatno je jednostavnija nego u postupcima sakupljanja tragova s predmeta koji se ne mogu transportirati u laboratorij.

- Predmet na kojem je uočen osušeni trag sperme zapakira se u označenu papirnatu (kartonsku) ambalažu. Trage na predmetu neophodno je jasno označiti i po potrebi dodatno zaštititi manjim pokrovnim omotom da bi se izbjeglo njegovo eventualno otpadanje i rasipanje.

12.2.6. Prikupljanje tragova sperme iz tijela žrtve (vaginalni i analni bris)

U velikom broju seksualnih delikata, počinitelj ejakulira u žrtvu, najčešće u otvoru i samoj šupljini vagine (rodnice) ili okolini, odnosno u anusu. Tada je važno pravovremeno izvršiti ginekološki ili drugi specijalistički pregled žrtve i prikupi vaginalni, odnosno analni bris. Priroda ovih tragova podrazumijeva da prikupljanje provodi stručna, sudsko-medicinski educirana osoba ili specijalist ginekolog. S obzirom na protok vremena i aktualnost doživljaja, važno je, u razgovoru sa žrtvom, preciznije determinirati način izvršenja kaznenog djela i koordinirati aktivnosti s nadležnom stručnom osobom za uzimanje brisa.

- Vaginalni i analni bris (i kod žive i kod mrtve osobe) ovlaštenu sudsko-medicinski vještak ili ginekolog (kod žive osobe) uzima sterilnim štapićem s vatiranim vrhom. Poželjno je, ako je moguće, vaginalni bris uzeti dva puta, svaki put koristeći drugi štapić.
- Tako prikupljeni vaginalni bris osuši se na zraku. Bris se ne izlaže izravnom sunčevom svjetlu niti izvoru topline.
- Bris se ne smije pohraniti u staklenu epruvetu s poklopcem.
- Nakon sušenja, bris se pohrani u papirnati (kartonski) omot ili čistu kovertu. Na omot se upiše ime žrtve, datum rođenja, datum uzimanja brisa i podatak radi li se o prvom ili drugom štapiću.

12.2.7. Prikupljanje tragova sperme s tijela žrtve

Priroda ovih tragova podrazumijeva njihovo prikupljanje od stručne, sudsko-medicinski educirane osobe.

- Trag sperme s tijela žrtve prikuplja se sterilnim štapićem s vatiranim vrhom.
- Vatirani kraj štapića umoči se u sterilnu destiliranu vodu (mogu poslužiti i male doze sterilne vode koje se mogu naći u svakoj ljekarni) ili pak u fiziološku otopinu. Višak vode obriše se bijelim papirnatim ubrusom. Tim dijelom prikuplja se trag, tj. njime se prelazi po dijelu kože gdje je lociran trag sperme. Nakon toga uzme se suhi sterilni štapić s vatiranim vrhom i mjesto na kojem je prikupljen trag prelazi se vatiranim krajem sve dok se koža ne osuši.
- Tako prikupljeni tragovi sperme osuše se na zraku. Trag se ne izlaže izravnom sunčevom svjetlu niti izvoru topline. Nakon sušenja trag se pohrani u označeni papirni (kartonski) omot ili čistu kovertu s oznakom radi li se o prvom ili drugom štapiću.

12.2.8. Prikupljanje tragova sperme iz usta

- Trag sperme iz usta žrtve prikuplja se sterilnim štapićem s vatiranim vrhom.
- Sterilnim štapićem prelazi se po usnoj šupljini: ispod jezika, po desnim, među zubima i nepcu. Ako je moguće bukalni bris uzeti dva puta, drugim štapićem.
- Tako prikupljeni bukalni bris osuši se na zraku. Ne izlaže se izravnom sunčevom svjetlu niti izvoru topline.
- Nakon sušenja, bris se pohrani u papirnati (kartonski) omot ili čistu kovertu. Na omot se upiše ime žrtve, datum rođenja, datum uzimanja brisa i podatak radi li se o prvom ili drugom štapiću.

12.2.9. Rano testiranje spornog očinstva

U slučaju da kao rezultat kaznenog djela žrtva zatrudni, a prethodno iz raznih razloga (nepravovremeno prijavljivanje, nepronalaženje odgovarajućih tragova itd.) nisu prikupljeni tragovi sperme, na temelju utvrđivanja DNA profila ploda i provođenja ekspertize spornog očinstva, lako se može utvrditi je li osumnjičeni počinitelj navedenog kaznenog djela. To je moguće i kada žrtva želi prekinuti trudnoću (utvrđivanje DNA profila odstranjenog embrija), ili zadržati dijete (utvrđivanje DNA profila ploda iz korionskih resica). U oba slučaja važna je koordinacija ovlaštene stručne osobe, koja će izvršiti prekid trudnoće ili uzimanje uzorka korionskih resica i kompetentnog forenzičkog genetičara.

12.3. PRIKUPLJANJE TRAGOVA PLJUVAČKE

Pljuvačka (slina, saliva) izuzetno je pogodan biološki trag koji se može široko i višeslojno analizirati. Prisutnost dovoljnog broja bukalnih epitelnih stanica čini ga pogodnim polaznim uzorkom za analizu DNA. Metode prikupljanja su kao i za druge uzorke relativno jednostavne i lako primjenjive.

12.3.1. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu

Metoda prikupljanja svježih tragova pljuvačke (sline) skoro se u potpunosti poklapa s ranije opisanim metodama za svježije tragove krvi.

- Slinu (pljuvačku) treba prikupiti sterilnim štapićem s vatiranim vrhom. Pri tome se vatirani vrh umoči u uzorak i blagim rotiranjem i prelaženjem preko

opaženog traga, cilj je prikupiti što više biološkog materijala. Uzorak je moguće upiti sterilnim (čistim) filter papirom ili pak sterilnom gazom.

- Svaki trag je neophodno je obrađivati različitim štapićima (komadima filter papira ili gaze).
- Prikupljene uzorke moguće je odmah staviti u posebnu kartonsku kutijicu iz priručnog kompleta za prikupljanje uzoraka. Ako komplet nije dostupan, neophodno je osušiti trag na zraku, ne izlažući ga izravnoj sunčevoj svjetlosti ili izvoru topline.
- Prilikom sušenja uzoraka neophodno je paziti da se uzorci ne pomiješaju, niti dodiruju. Najbolje ih je sušiti pored već pripremljenog i označenog papirnato (kartonskog) omota.
- Oznaka na omotu mora se poklapati s navedenom oznakom u pratećoj dokumentaciji.

12.3.2. Prikupljanje neosušenih (svježih) tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu

- Mokre ili vlažne predmete (odjeća, posteljina, maramice itd.), kao i predmete na kojima se nalazi svježi trag pljuvačke nužno je položiti na čistu bijelu papirnatu podlogu ili objesiti u prozračnom prostoru da se dobro osuši.
- Tako osušen predmet na kojem je uočen trag pakira se u označenu papirnatu (kartonsku) ambalažu. Tragovi na predmetu jasno se označe i po potrebi dodatno zaštite manjim pokrovnim omotom, kako bi se spriječilo njegovo eventualno otpadanje i rasipanje.

12.3.3. Prikupljanje osušenih tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje nije moguće dostaviti kompletne na analizu

Procedura prikupljanja ovih tragova poklapa se s ranije opisanim metodama prikupljanja krvi i sperme.

- Tragovi se prikupljaju sterilnim štapićima s vatiranim vrhom. Navlaži se vatirani kraj štapića s 1-2 kapljice sterilne vode iz kompleta (mogu poslužiti i male doze sterilne vode koje se mogu naći u svakoj ljekarni). Tim dijelom prelazi se preko traga. Površina kojom se prikuplja trag ne smije se doticati prstima. Ako je trag jako mali, izbjegava se rotiranje štapića da bi se što više uzorka prikupilo na jednom mjestu. Nakon toga suhim se vatiranim krajem drugog štapića prijeđe preko sada navlaženog traga. Ova dva štapića upakuju se u isti papirnati (kartonski) omot i označe kao jedan trag.

- Osušeni tragovi na tapetama, tekstilnim podnim oblogama, kaučima i zastorima moraju se izrezati i upakirati u označene papirnate (kartonske) omote.
- Osušeni tragovi s drvenih površina moraju se skalpelom izdubiti/izrezati i upakirati u označene papirnate (kartonske) omote.

12.3.4. Prikupljanje osušenih tragova pljuvačke (sline) s predmeta koje je moguće dostaviti kompletne na analizu

- Predmet na kojem je uočen osušeni trag pljuvačke (sline) zapakira se u označenu papirnatu (kartonsku) ambalažu. Tragovi na predmetu jasno se označe i po potrebi dodatno zaštite manjim pokrovnim omotom da bi se spriječili njihovo eventualno otpadanje i rasipanje.
- Posebna pozornost neophodna je prilikom pakiranja oštih predmeta (igle, noževi i sl.).
- Opuške cigareta pronađene na mjestu kaznenog djela potrebno je zasebno pohraniti u označene papirnate (kartonske) omote. Ako su pronađeni skupa u pepeljari, onda ih treba pohraniti zajedno. Ako su opušci bili pronađeni u pepeljari, treba ih prebaciti u papirnati omot pincetom i pažljivo s njih odstraniti tragove pepela. Ako su opušci mokri, prije pakiranja treba ih osušiti. Nikada se opušci, kao ni drugi tragovi, ne smiju pakirati u PVC vrećice.
- Žvakaće gume polažu se na čistu staklenu ili plastičnu površinu gdje se trebaju dobro osušiti. Nakon toga pohranjuju se u pravilno označene papirnate (kartonske) omote. Ne smiju se pakirati vlažni jer će se sekundarno kontaminirati prisutnim česticama prašine.
- Staklena čaša ili boca na kojoj se nalazi osušeni trag pljuvačke prvo se u potpunosti isprazni brzim prevrtanjem čaše, pazeći da tekućina što manje dodiruje rub čaše. Nakon toga ostavi se u tom položaju na bijeloj papirnatij podlozi da se ocijedi. Zatim se čvrsto upakira da se ne bi razbila i precizno označi. Ako su na čaši uočeni otisci prstiju, zaštitit će se papirnatim pokrovom.
- Ako su uočeni tragovi pljuvačke na tetrapak pakiranju ili na limenci, prvo se odreže dno ovih pakiranja da iz njih iscuri sva tekućina. Nakon toga ove predmete treba osušiti i pravilno ih upakirati u papirnati omot.
- Plastičnu čašu ili bocu s tragovima pljuvačke treba prerezati tako da gornji dio čaše s uzorcima čini jednu cjelinu. Taj dio neophodno je osušiti i pravilno upakirati u papirnati omot.

12.3.5. Prikupljanje tragova pljuvačke s tijela

Ove tragove prikuplja stručno, sudsko-medicinski educirano osoblje. Procedura je slična kao za već opisane procedure uzimanja tragova sperme s tijela.



SLIKA 12.5. Prikupljanje tragova pljuvačke s tijela žrtve.

- Trag pljuvačke (sline) s tijela žrtve prikuplja se sterilnim štapićem s vatiranim vrhom (slika 12.5.).
- Vatirani kraj štapića umoči se u sterilnu destiliranu vodu (mogu poslužiti i male doze sterilne vode koje se mogu naći u svakoj ljekarni). Višak vode obriše se bijelim papirnatim ubrusom. Tim dijelom prikuplja se trag, tj. njime se prelazi po dijelu kože na kojem je detektiran trag pljuvačke. Nakon toga uzme se suhi sterilni štapić s vatiranim vrhom te se preko mjesta na kojem je prikupljen trag, prelazi vatiranim krajem štapića, sve dok se koža na tom mjestu ne osuši.
- Tako prikupljeni tragovi pljuvačke (sline) osuše se na zraku. Trag se ne izlaže izravnom sunčevom svjetlu niti izvoru topline. Nakon sušenja pohrane se u označeni papirnati (kartonski) omot ili u čistu kovertu s napomenom radi li se o prvom ili drugom štapiću.

12.4. PRIKUPLJANJE TRAGOVA DLAKA

Dlake su čest trag koji se može naći na mjestu zločina. Prema podatcima iz dostupne literature, većina (oko 80%) tako pronađenih dlaka nisu pogodne za standardno testiranje nuklearne DNA, pretežno zbog odsustva korijena ili epitelnog ovoja s korijena, tj. činjenice da se korijen nalazi u telofazi. U tom slučaju, jedino se može primijeniti testiranje mitohondrijske DNA u adekvatno osposobljenim laboratorijima.

12.4.1. Prikupljanje pronađenih tragova dlake na mjestu zločina

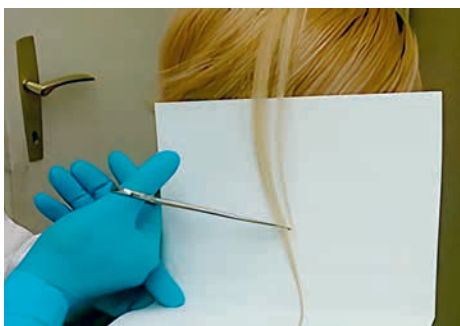
Prikupljanje i pohrana dlaka pronađenih na mjestu zločina podrazumijeva nekoliko jednostavnih pravila.

- Sve dlake koje je moguće opaziti pažljivim vizualnim pregledom neophodno je prikupiti pojedinačno. To se realizira nenazubljenom pincetom, pazeći da se prilikom prikupljanja ne ošteti sama dlaka (posebno ako ona treba da posluži za morfološku analizu), a osobito njen korijen (ako postoji).
- Dlake se moraju upakirati odvojeno u jasno označeni papirnati omot (kovertu).
- One dlake koje se iz različitih razloga ne mogu prikupiti pojedinačno mogu se prikupiti posebno pripremljenom ljepljivom trakom.

12.4.2. Prikupljanje dlaka s tijela žrtve

Prikupljanje nespornih dlaka gotovo je identično u situacijama kada je žrtva zločina živa i kada se radi o mrtvom tijelu. Postoje određene varijacije s obzirom na anatomske lokacije prikupljanja uzorka (kosa, brada, obrve, trepavice, pazušne, stidne, nosne i ušne dlake). Bit upotrebljivosti dlake kao biološkog traga u DNA testiranju u očuvanju je njenog korijena, zajedno s epitelnim ovojem. U slučajevima istrage o mrtvoj žrtvi, mora se voditi računa o vremenu proteklom od trenutka smrti. Proporcionalno duljini tog razdoblja, povećava se mogućnost progresivne degradacije korijena dlake. U pojedinim slučajevima, pogodnost dlake prikupljene s mrtvog tijela limitirana je i uzrokom smrti. Ipak, najjednostavniji pristup prikupljanja ovih tragova se temelji na sljedećem:

- Prikupljanje se realizira nenazubljenom pincetom, pazeći da se prilikom prikupljanja ne ošteti sama dlaka (posebno ako treba poslužiti za morfološku analizu), a osobito njen korijen (ako postoji).
- Neophodno je prikupiti 10-20 dlaka od jedne ispitivane osobe.
- Dlake treba upakirati u papirnati ovoj s naznačenim imenom, spolom i godinom rođenja tretirane osobe.



SLIKA 12.6. Prikupljanje dlaka s tijela žrtve na kojima se mogu nalaziti tragovi sperme ili krvi.

12.4.3. Prikupljanje dlaka s tijela žrtve na kojima se mogu nalaziti tragovi sperme ili krvi

- Dlake na kojima se nalaze tragovi krvi ili sperme odrežu se čistim škarama nad bijelim čistim papirom (slika 12.6.). Papir s dlakama savije se u obliku pisma i nakon toga se zapakira u označenu papirnatu kovertu.
- Usporedno s uzimanjem ovih tragova neophodno je prikupiti i nesporne tragove žrtve s ciljem kompariranja utvrđenih DNA profila.

12.5. PRIKUPLJANJE BIOLOŠKIH TRAGOVA ISPOD NOKATA I IZ FECESA

U velikom broju slučajeva, biološki tragovi počinitelja zločina zadrže se ispod noktiju žrtve. U vezi s tim važno je prikupiti i pregledati taj sadržaj koji se može iskoristiti, kako za analizu DNA, tako i za preliminarna mikroskopska ispitivanja. Prikupljanje ovih tragova vrlo je jednostavno.

- Nokte lijeve i/ili desne ruke odrezati iznad čistog papira. Papir s noktima savije se u obliku pisma i nakon toga se zapakira u označenu papirnatu kovertu. Bitno je označiti radi li se o noktima lijeve ili desne ruke.
- Poslije svakog rezanja pojedinog nokta nije naodmet škarice (svaki njihov krak) obrisati čistim filter papirom.

Novija dostignuća iz područja forenzičke genetike uvjetovala su da feces pronađen na mjestu zločina može biti iskorišten kao polazni uzorak za analizu DNA. Prikupljanje fecesa jednostavna je procedura:

- Uočeni feces prikupiti odgovarajućim priborom (lopaticom), pazeći da mu se ne naruši primarna konstrukcija miješanja površinskog i unutarnjeg sloja.
- Feces se pohranjuje u široku staklenu teglu s poklopcem koji se hermetički zatvara. Odmah po prikupljanju, ovakav trag treba dostaviti u laboratorij na daljnje testiranje.

12.6. PRIKUPLJANJE NESPOJNIH BIOLOŠKIH UZORAKA

Prikupljanje nespornih bioloških tragova izuzetno je važno u svakoj policijskoj (a time i pravosudnoj) istrazi. Naime, u slučajevima nalaza kompletnog DNA profila iz pronađenog spornog biološkog traga, on ne može sam po sebi identificirati

počinitelja ako ne postoji DNA profil nespornog biološkog traga, tj. osumnjičene osobe. Nesporni biološki tragovi podrazumijevaju analizu uzoraka:

- bukalne sluznice, krvi, dlaka (s korijenom) i svakog drugog tkiva osumnjičene/optužene osobe čiji se DNA profil želi usporediti s DNA profilom pronađenog spornog traga ili ukoliko se želi dokazati očinstvo u slučajevima seksualnog delikta koji je rezultirao trudnoćom
- bukalne sluznice, krvi, dlaka (s korijenom), koštanog (u slučaju kada se radi o mrtvoj osobi) i svakog drugog tkiva oštećene osobe (žrtve) u slučajevima kada se ona želi isključiti kao potencijalni donor nekog spornog biološkog traga, a posebno u slučajevima kada je sporni trag prikupljen s tijela žrtve ili, vaginalnim/analnim brisom
- bukalne sluznice, krvi i dlaka (s korijenom) od osoba koje su svojim svakodnevnim aktivnostima mogle ostaviti biološke tragove na mjestu zločina i kada se one žele isključiti/potvrditi kao potencijalni donori nekog spornog biološkog traga
- bukalne sluznice, krvi i dlaka (s korijenom) prikupljene od svih stručnih osoba koje u opisu svoje djelatnosti dolaze u neposredni kontakt s mjestom zločina poslije njegovog izvršenja;
- bukalne sluznice, krvi i dlaka (s korijenom) članova obitelji nestale osobe s ciljem kompariranja utvrđenih DNA profila i utvrđivanja stupnja potencijalne srodnosti i krajnje DNA identifikacije;
- bukalne sluznice, krvi i dlaka (s korijenom) prikupljene od svih ostalih osoba za koje se u danom trenutku s osnovanim razlogom može procijeniti da njihov DNA profil može poslužiti u istrazi.

12.6.1. Prikupljanje nespornih uzoraka bukalne sluznice (sluznice usne šupljine)

Uzorak bukalne sluznice smatra se neintimnim uzorkom te ga mogu prikupiti i policijski eksperti i forenzičari. Prije prikupljanja uzorka bukalne sluznice, treba dobiti informaciju kada je osoba posljednji put jela, pila ili pušila, jer se uzorak može uzeti minimalno pola sata nakon obroka. Postoji više načina prikupljanja uzorka:

- Komad čistog filter papira okruglog oblika presaviti i njegovu ravnu stranu staviti u usta. Papir treba stisnuti jezikom i dobro navlažiti. Papir se ne smije žvakati ili pljuvati. Nakon toga treba ga osušiti i označiti dio koji je bio u ustima. Zatim uzorak pohranimo u označeni papirnati omot (kovertu). Osoba koja prikuplja uzorak mora nositi rukavice.



SLIKA 12.7. Prikupljanje uzoraka bukalne sluznice.

- Uzorak bukalne sluznice lakše se prikuplja sterilnim štapićem s vatiranim vrhom. Osoba koja prikuplja uzorak mora nositi rukavice. Vatirani vrh štapića stavi se u usta ispitanika i prijeđe preko unutarnje strane obraza 15-ak puta (slika 12.7.). To treba ponoviti i drugim čistim štapićem. Uzorke je neophodno upakirati u posebnu kartonsku kutiju iz priručnog kompleta ako je on dostupan. Ako nije, uzorak se mora osušiti na zraku, ne izlažući ga izravnom sunčevom svjetlu ili izvoru topline. Potom ih treba pohraniti u isti označeni papirnati omot (kovertu).

Whatman® Omniswab štapići se recentno sve više koriste radi njihovog sastava koji onemogućuje degradaciju DNA i kontaminaciju mikroorganizmima.

12.6.2. Prikupljanje nespornih uzoraka krvi

Nesporni uzorak krvi intimni je uzorak i s obzirom na njegovu prirodu, uvijek ga treba prikupljati osoblje koje je stručno osposobljeno. Kao nesporni uzorci može se koristiti puna krv osobe prikupljena u medicinskim ustanovama i pohranjena u odgovarajućim posudama ili krvne mrlje prikupljene na čistom filter papiru.

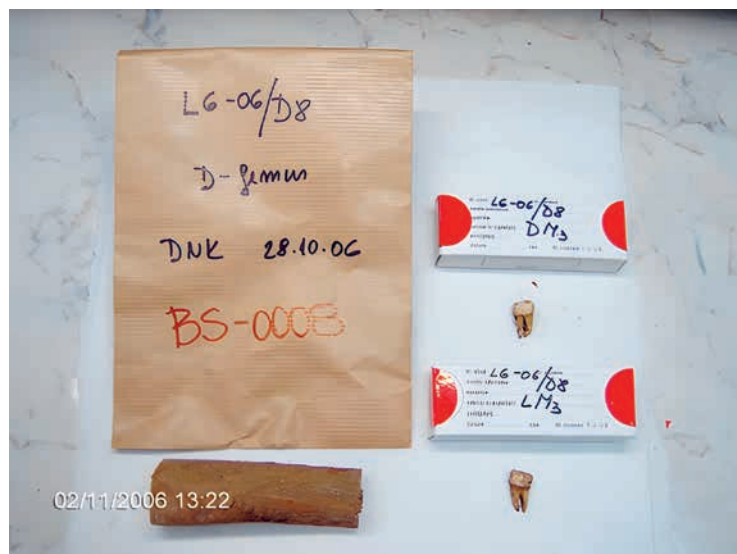
Procedura uzimanja tragova pune krvi poklapa se sa standardnim procedurama uzimanja uzoraka krvi za druge medicinske pretrage. Krv se mora prikupiti u posebne plastične ili staklene epruvete s antikoagulansom (najbolje EDTA). Epruvetu treba adekvatno označiti i odmah dostaviti u laboratorij. Ako uzorak nije moguće odmah transportirati treba ga pohraniti u frižider na +4°C ili zamrznuti na -20°C, u slučajevima kada će prije transporta u laboratorij, uzorak morati biti pohranjen duže od 2-3 dana. Krvna mrlja dobiva se ubodom u jagodicu bilo kojeg prsta ruke. Prst, tj. mjesto uboda, prvo se očisti alkoholnom maramicom, a zatim ubode sterilnom medicinskom iglom. Prilikom prikupljanja krvne mrlje iz prsta na sterilnom filter papiru, ne smije se ostvariti izravan

kontakt papira i prsta. Također, uzorak je prije pakiranja neophodno osušiti na zraku, ne izlažući ga izravnom sunčevom svjetlu ili izvoru topline.

12.6.3. Prikupljanje skeletnih ostataka

U slučajevima kada se u identifikaciji posmrtnih ostataka ne mogu koristiti konvencionalne metode, pristupa se metodi DNA identifikacije. Prvi korak u tom kompleksnom procesu pravilno je prikupljanje odgovarajućih uzoraka s posmrtnih ostataka. Kao jako dobar polazni trag može poslužiti zub, a njegovo prikupljanje je jednostavno. Izvađeni zub osuši se na zraku i upakira u papir-nati omot. Ovi se tragovi nikada ne smiju pakirati u plastificirane omote jer to znatno ubrzava degradaciju DNA koja je i inače u ovim tragovima prisutna u jako malim količinama. Pronađeni zub pored skeletnih ostataka (pogotovo u masovnim grobnicama i izmiješanim skeletnim ostacima) mora biti uklopljen u njemu pripadajuću gornju ili donju vilicu.

Dobar i krajnje pouzdan trag u skeletnim uzorcima isječak je bedrene kosti (lat. *femur*). U nedostatku bedrene kosti mogu poslužiti uzorci i drugih, prvenstveno dugih (nadraktične, podlaktične i potkoljenične) kostiju, ali i kosti lubanje te sve druge kosti ukoliko je nužno. S obzirom na njihovu prirodu, poželjno je da izuzimanje koštanih uzoraka provede isključivo sudsko-medicinski educirano stručno osoblje, liječnik ili sudsko-medicinski tehničar u prisutnosti liječnika.



SLIKA 12.8. Isječak bedrene kosti i zubi.

- Izreže se komad duge kosti polucilindričnog oblika u dužini 5-10 cm (slika 12.8.). Duga kost ne smije biti u potpunosti poprečno presječena da bi se dobila dva polucilindrična uzorka.
- Ako se radi o pločastim kostima (obično krov lubanje), izreže se segment dimenzija 5×5 cm ili pravokutnik dimenzija 3×8 cm.
- Kada je kost bez mišićnog tkiva, gola i suha, upakira se u označeni papir nati omot.
- Ako se na kosti mogu primijetiti ostatci mišićnog tkiva te druge prljavštine, potrebno je strugačem za kosti ili tupim borerom ručne, obducentске brusilice skinuti svu prljavštinu, kako s vanjske, tako i s unutarnje koštane površine.
- Kada površinsko čišćenje kosti nije moguće, onda se kost pohrani u čistu i suhu posudu. Tako pohranjenu kost pohraniti u frižider i odmah transportirati u hladnim uvjetima u laboratorij. Ako treba proći određeno vrijeme do analize DNA, onda kost treba pohraniti na -20°C.

12.6.4. Prikupljanje osobnih predmeta s ciljem prikupljanja nespornih uzoraka

U slučajevima identificiranja određene osobe, kada ne postoje nikakvi srodnici s kojima bi se utvrđeni DNA profil mogao komparirati, pristupa se prikupljanju osobnih predmeta te osobe s ciljem potencijalnog pronalaska bioloških tragova koje je dotična osoba mogla ostaviti.

- Zubna četkica – cijelu četkicu treba osušiti na zraku (ako je mokra) i zapakirati u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Kapa ili marama za glavu – ako se sa sigurnošću može utvrditi da ju je nosila odgovarajuća osoba, predmet treba zapakirati u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Proteza ili zubni aparat – pakiraju se u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Očne leće – treba dostaviti u ambalaži u kojoj su bile nađene.
- Korišteni ubrusi - ako se sa sigurnošću može utvrditi da ne pripadaju drugoj osobi, zapakiraju se u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Britvica za brijanje ili električni aparat za brijanje - ako se sa sigurnošću može utvrditi da je nije koristila druga osoba, zapakira se u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Cigaršpic ili lule za pušenje - ako se sa sigurnošću može utvrditi da je nije koristila druga osoba, zapakira se u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Tamponi i ulošci – ako su mokri, prvo ih treba osušiti a onda zapakirati u odgovarajući papirni omot (vreću).
- Donje rublje – zapakira se u odgovarajući papirni omot (vreću).

12.7. OZNAČAVANJE PRIKUPLJENIH BIOLOŠKIH TRAGOVA

- Svaki biološki trag mora biti pohranjen u prozračnoj papirnatoy ambalaži (papirnata vreća, papirnati omot, kartonske kutije i sl.). Tragovi se ne smiju pakirati u plastičnu ambalažu.
- Svaki prikupljeni sporni trag mora biti jasno i precizno označen, fotografiran i dokumentiran. Na ambalaži svakog traga bi minimalno trebali stajati sljedeći podaci:
 - numerirana oznaka (šifra) traga
 - lokacija na kojoj je pronađen trag
 - datum prikupljanja
 - ime i prezime osobe koja je prikupila trag.
- Prikupljeni odjevni predmeti trebaju minimalno imati sljedeće podatke u pratećoj dokumentaciji:
 - numerirana oznaka (šifra) traga
 - vrsta odjavnog predmeta, marka i veličina (ako je to moguće ustanoviti)
 - ime i prezime osobe od koje je predmet izuzet
 - eventualno potvrdu o izuzimanju.
- Nesporni biološki tragovi minimalno trebaju na svojoj ambalaži i u pratećoj dokumentaciji imati:
 - ime i prezime, datum rođenja osobe od koje su tragovi prikupljeni, spol

Marjanović D., Dobrača I., Drobnič K. Prikupljanje, prezervacija i transport uzoraka za DNA analizu, Sarajevo: INGEB, 2005c.

Pravilnik o načinu uzimanja uzoraka biološkog materijala i provođenja molekularno-genetske analize, Narodne Novine, Službeni list Republike Hrvatske od 10. listopada 2014. godine.

Primorac D, Marjanović D, Crnjac J. Molecular Reconstruction. U: Forensic Reconstruction: Theory to Practice, Lee HC, Pagliaro E. (ur.). Oxford: Oxford University Press; 2024. str. 164-189.

Index pojmova

A

ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER 279
 ABI PRISM 3100 GENETIC ANALYZER 280
 ABI PRISM 3130 GENETIC ANALYZER 281
 ABI PRISM 373 DNA SEQUENCER 277
 ABI PRISM 377 DNA SEQUENCER 278
 adenin 69, 168, 209, 235, 237
 AFLP (engl. *Amplified Fragment Length Polymorphisms*) 351
 agarozni gel 157
 alel 68, 94, 96, 98, 104, 110, 115, 182, 183, 221, 316
 alelna ljestvica (engl. *Allelic Ladder*) 99, 173, 209, 250, 351
Alu biljezi 103
 AluQuant® Human DNA Quantitation System 160
 amelogenin 102, 112, 175, 183, 190, 222, 316
 AmpFlSTR® Identifiler™ PCR Amplification and Typing Kit 192
 AmpliType® PM+DQA1 PCR Amplification and Typing Kit 181
 AmpFlSTR™ NGM / NGM Select PCR Amplification Kit 193
 AmpFlSTR® Yfiler™ PCR Amplification and Typing Kit 227
 amplifikacija 162, 195, 200
 Andersonova sekvenca 231, 329
 aspermija 135
 ATP 160, 229, 291
 automatsko sekvenciranje 84, 178, 275
 autosomi (autosomalni kromosomi) 67, 165, 180, 223

B

Barrovo tijelo 244, 246
 Bayesova formula 313, 320

Bentamine Fast Blue B 134
 Bertillonova klasifikacija 43, 52
 bezmajčinsko testiranje očinstva (engl. *Motherless Paternity Testing*) 317
 biološki trag 83, 99, 121, 201, 206, 271, 334, 346, 396
 biotehnologija 27, 79
 Blue Dextran Loading Solution 279
 Bluestar® Forensic set 131
 bp (bazni parovi ili parovi baza) 65, 110, 158, 182, 249
 bulbus 139

C

centromera 66
 Chelex® 102 146
 citokrom b 359, 362
 citozin 69, 168, 276, 287
 CODIS (engl. *Combined DNA Indexing System*) 97, 100, 186, 188, 337, 344
 Coomassie blue 157
crossing-over 247
 CRS (engl. *Cambridge Reference Sequence*) 114, 231, 329
 CSI (engl. *Crime Scene Investigation*) 130
 CTS (engl. *Christmas Tree Stain*) 135

D

D-petlja (engl. *D-loop*) 115, 232
 deficijentno testiranje očinstva (engl. *Deficiency Paternity Testing*) 317
 denaturacija 168
 dentalni (zubni) status 35
 dermatoglifi 47
 dezoksiriboza 168
 ddNTP 111, 179, 237, 275
 diferencijalna izolacija 153
 digestivni pufer 145, 154
 distalna ploha 53
 dlaka 139, 150, 409

DNA

- analiza 43, 73, 93,
- baza podataka 332
- degradirana 208
- fenotipizacija 85, 294, 369
- hibridizacija 111, 168
- izolacija 143, 353, 359, 392
- jezgrina 72
- kontaminacija 202, 243
- kvantifikacija 154
- mitohondrijska 229
- profil 135, 154, 172, 196, 216, 280, 310, 324, 326, 334

dNTP 160, 170

E

- EDTA 145, 413
- ekstenzija 165, 237
- elektroferogram 175, 204, 236
- elektroforeza 156, 200, 279
- ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) 135
- epidermis 47
- etidij-bromid 156, 274

F

- FBI (engl. *Federal Bureau of Investigation*) 52, 100, 384
- fenol 144
- fluorescencija 130, 162
- folikul 140
- forenzička
 - antropologija 33
 - botanika 347
 - entomologija 356
 - genetika 28
 - mikrobiologija 382
 - odontologija 42
 - patologija 32
 - psihijatrija 41

- psihologija 41

- toksikologija 38

Freedom EVO® Forensics DNA System 264

FTATM kartica 152

FSS (engl. *Forensic Science Service*) 338

G

gen 63

GeneAmp® PCR System 9700 269

genetički biljeg 68, 91, 108

GeneMapper ID softver 174, 207, 280

gonosomi (polni kromosomi) 243

grizna ploha 53

gvanin 69, 168

H

haplogrupa 113, 308

haplotip 113, 250

- mtDNA 329

- minimalni 234

- Y 224, 234

Hemastix 129

hemoglobin 129

heteroplazmija 242

heterozigot 68, 97, 208, 304, 325

hipervarijabilni region (HV) 92, 113, 114, 232

HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) 78, 83

Homo sapiens 104, 114

homozigot 68, 208, 304, 350

Hardy-Weinbergova ravnoteža 304

I

ICMP (engl. *International Commission on Missing Persons*) 57

ILS (engl. *Internal Lane Standard*) 187, 190, 275

incest 253

indeks očinstva (engl. *Paternity Index - PI*) 311

indeks majčinstva (engl. *Maternity Index*) 320

individualizacija 30, 42, 315, 321

INTERPOL 54, 102, 342

INTERPOL DVI (engl. *INTERPOL Disaster Victim Identification Form*) 54

IPC (interna PCR kontrola, engl. *Internal PCR Control*) 162

ISFH (engl. *International Society of Forensic Haemogenetics*) 250

ISFG (engl. *International Society of Forensic Genetics*) 98, 326

isoljavanje (engl. *salting-out*) 152

ISSOL (engl. *INTERPOL Standard Set of Loci*) 102

J

jezgra 63, 64

K

kariogram 67, 68, 224

kariotip 68, 248

Kastle-Mayerova reakcija 129

katagen 140

kisela fosfataza (engl. *Acid Phosphatase*) 134

kloroform 144, 153

kombinirani indeks očinstva (engl. *Combined Paternity Index - CPI*) 312, 317, 319

kombinirana neisključenost slučajne osobe u populaciji (engl. *Combined Random Man Not Excluded - CRMNE*) 315, 319

kombinirana neisključenost slučajne žene u populaciji (engl. *Combined Random Female Not Excluded - CRFNE*) 320

komplet za prikupljanje uzoraka 397

kontrolni region (engl. *Control Region - CR*) 115, 231

kontaminacija 125, 202, 243, 401

kriminalistika 30

kromatida 68

kromatin 68

kromonema 66, 68

kromosom 64

- akrocentrični 65

- homologni 67, 223

- metacentrični 65

- submetacentrični 65

- telocentrični 65

kromosomska garnitura 65

- haploidna 65

- diploidna 65

kromosom X 67, 175, 177, 220, 244, 308, 328

kromosom Y 67, 163, 176, 185, 221, 223, 227, 248, 308

kroskontaminacija (engl. *cross-contamination*) 153

L

LCN DNA (engl. *low copy number DNA*) 112, 171, 202, 323

lingvalna ploha 53

lokus 68, 91, 95, 97, 177, 180, 182, 203

LR (engl. *Likelihood Ratio*) 208, 316, 321

luminol 130

M

Maxam-Gilbertova metoda 178

Mendelijansko nasljeđivanje 304

Argus X-12 PCR Amplification Kit 251

mezijalna ploha 53

miješani tragovi 207, 323

mikrosateliti 92, 107, 361

mikrovarijante 98

Millerov protokol 153

minisateliti 92, 359, 386
 miniSTR 85, 122, 188, 197
 mitohondrija 63, 71
 mjesto zločina (mjesto kriminalnog događaja) 122, 353
 mtDNA 113, 114, 229, 232, 329
 mutabilnost 70

N

NDNAD (engl. *National DNA Database*) 338
 negativna kontrola 170
 neisključenost slučajne osobe u populaciji (engl. *Random Man Not Excluded - RMNE*) 314
 neisključenosti slučajne žene u populaciji (engl. *Random Female Not Excluded - RFNE*) 320
 nesporni uzorak 123, 153, 217, 412
 NRY (nerekombinantni region kromosoma Y) 112, 224
 nukleotid 69, 110, 170, 241, 384

O

obligatni (obavezni) alel 310
 očinstvo 78, 91, 211, 225, 253, 310
 oligospermija 135
 otisak prstiju 43, 47, 234, 339
 osumnjičenik 41, 122, 322, 334, 402
 Ouchterlony test 132

P

papilarne linije 32, 48
 PAR (pseudoautosomalni region) 223
 parcijalni DNA profil 177
 PCR (engl. *Polymerase Chain Reaction*) 61, 167, 111, 165, 180, 236, 267
 - inhibitor 150
 Phadebas test 137
 pirimidini 69, 108

Plexor® HY System 164, 270
 polimer 156, 282
 polimorfizam 91, 105, 107, 225, 352, 358, 384
 PowerPlex® 16 System 173, 183, 186, 188
 PowerPlex® Fusion 184, 190
 PowerPlex® S5 System 183, 200
 PowerPlex® Y23 System 184, 227
 početnica 111, 162, 168
 pozitivna kontrola 170
 dimer početnica (engl. *primer-dimer*) 171
 preliminarno testiranje (engl. *Presumptive Test*) 127
 „prigušujuća” boja (engl. *Quencher Dye*) 111, 161, 165, 167
 Promega IQTM System 150
 proteinaza K 145
 purini 69, 71

Q

qPCR (engl. *Quantitative real-time PCR*) 161, 287
 QuantiBlot Human DNA
 Quantitation Kit 159
 Quantifiler® Trio DNA
 Identification Kit 161

R

7500 Real-Time PCR System for Human Identification 269
 RAPD (engl. *Random Amplified Polymorphic DNA*) 350, 387
 reporterska boja (engl. *Reporter Dye*) 161
 RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) 83, 93, 358
 RFU (engl. *Relative Fluorescence Units*) 177, 352
 RNA 359
 rodoslovni markeri (engl. *Lineage Markers*) 109, 220

S

Sangerova metoda 178, 235, 283
 sekvenciranje nove generacije (NGS) 238, 270, 288, 290
 skeletni ostaci 34, 55, 56, 199, 414
 snaga isključivanja (engl. *Power of Exclusion*) 83, 315
 snaga diskriminacije (engl. *Power of Discrimination*) 181
 SNP (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) 84, 105, 108, 307
 sporni tragovi 123, 323, 401
 srođivanje (engl. *Inbreeding*) 305
 stanica 62, 65
 stater (engl. *Stutter*) 109, 178
 STR (engl. *Short Tandem Repeats*) 84, 95, 100
 - multipleks 84
 sudska medicina 32

T

Taq polimeraza 84, 167, 170, 206
 TaqMan® metoda - 5' nukleazni esej (engl. *5' Nuclease Assay*) 111, 161
 telogen 140
 telomera 66, 376
 testiranje očinstva (engl. *paternity testing*) 151, 252, 317, 406
 testiranje majčinstva (engl. *maternity testing*) 210
 testis-determinirajući faktor (engl. *Testis-Determining Factor*, TDF) 163, 248
 timin 69, 168, 237

U

uhićenik 338
 urea 138
 UV transiluminator 158

V

vaginalni sekret (iscjedak) 128, 136, 207, 405
 vestibularna ploha 53
 VNTR (engl. *Variable Number of Tandem Repeats*) 81, 92, 94, 180, 363, 384

X

X-STR 185, 243, 249, 253, 327

Y

Y kromosom konzorcijum (engl. *Y Chromosome Consortium - YCC*) 113
 Y-STR 183, 190, 225, 227, 326
 Y-SNP 113, 308

Z

zdjelična kost 59
 zubni karton 56



Izvodi iz recenzija:

Prof. dr. sc. Gordan Lauc, prvi voditelj osječkog Laboratorija za identifikacije žrtava Domovinskog rata i redoviti profesor u trajnom zvanju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

S obzirom da se radi o dinamičnom znanstvenom području, postoji stalna potreba za osuvremenjivanjem spoznaja iz područja forenzične genetike te je objava ovakvog djela ne samo opravdana, već i potrebna. Knjiga je iznimno relevantna za ciljanu skupinu studenata i stručnjaka iz područja forenzične genetike.

Prof. dr. sc. Jasmina Čakar, voditeljica Laboratorija za forenzičku genetiku, Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Sveučilište u Sarajevu.

Knjiga Forenzična genetika: teorija i primjena autora Marjanović Damira, Primorac Dragana i Ašić Adne sa saradnicima je neophodna literatura za svakoga tko je zainteresiran za fascinantni svijet forenzičke nauke. Ona ne samo da educira čitatelje o naučnim temeljima DNK analize, već ih također uključuje u šire rasprave o pravdi, etici i budućnosti forenzičke nauke. Ova knjiga je svjedočanstvo o snazi nauke u rješavanju zločina i odgovornosti koja dolazi s tim, čineći je vrijednim dodatkom literature za studenata, praktičare i entuzijaste.

Mr. sc. Petra Uvodić, glavni vještak za biološka vještačenja, Centar za forenzična ispitivanja, sitraživanja i vještačenja Ivan Vučetić.

U usporedbi sa dosadašnjim izdanjima udžbenika sa temom forenzičke genetike, ovo izdanje je prošireno brojnim suvremenim primjerima iz prakse, čime je učinjen korak naprijed u načinu prenošenja znanja i povećanju zainteresiranosti za ovu znanstvenu oblast.

