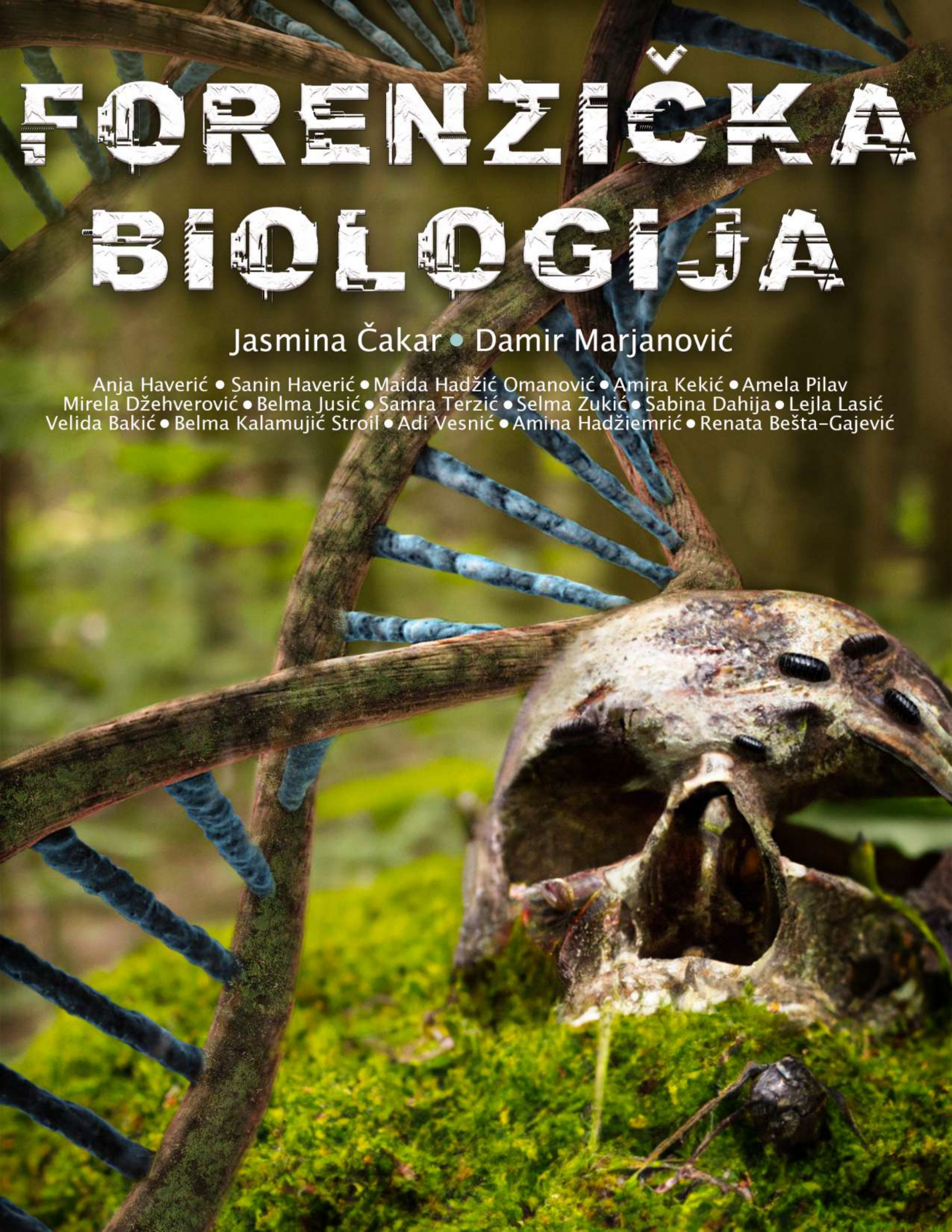




FORENZIČKA BIOLOGIJA

Jasmina Čakar • Damir Marjanović

Anja Haverić • Sanin Haverić • Maida Hadžić Omanović • Amira Kekić • Amela Pilav
Mirela Džehverović • Belma Jusić • Samra Terzić • Selma Zukić • Sabina Dahija • Lejla Lasić
Velida Bakić • Belma Kalamujić Stroil • Adi Vesnić • Amina Hadžiemrić • Renata Bešta-Gajević

Urednici

Prof. dr. Jasmina Čakar, naučna savjetnica Univerziteta u Sarajevu – Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (Sarajevo, Bosna i Hercegovina)

Prof. dr. Damir Marjanović, Odsjek za genetiku i bioinženjering, Fakultet za inženjering i prirodne nauke, Internacionalni Burch univerzitet (Sarajevo, Bosna i Hercegovina), Institut za antropologiju (Zagreb, Hrvatska)

Izdavač

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, Zmaja od Bosne 8, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Za izdavača

Prof. dr. Naris Pojskić, naučni savjetnik i direktor Univerziteta u Sarajevu – Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (Sarajevo, Bosna i Hercegovina)

Recenzenti

Prof. emeritus dr. Rifat Hadžiselimović, naučni savjetnik Univerziteta u Sarajevu - Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju (Sarajevo, Bosna i Hercegovina) i dopisni član Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine (ANUBiH)

Prof. dr. Dragan Primorac, profesor na Eberly College of Science - Pennsylvania State University (University Park, PA, USA), Henry C. Lee College of Criminal Justice and Forensic Sciences - University of New Haven (West Haven, CT, USA), Medical School REGIOMED (Coburg, Njemačka), The National Forensic Sciences University (Gandhinagar, Gujarat, Indija), Sveučilišnom odsjeku za forenzičke znanosti Sveučilišta u Splitu (Split, Hrvatska), Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu (Split, Hrvatska), Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Osijeku (Osijek, Hrvatska), Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta u Osijeku (Osijek, Hrvatska) i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci (Rijeka, Hrvatska), Specijalna Bolnica Sv. Katarina (Zagreb, Hrvatska)

Lektor i korektor

Dr. sc. Zenaida Karavdić, Institut za jezik Univerziteta u Sarajevu (Sarajevo, Bosna i Hercegovina)

Autor naslovnice

Mr. Mujo Hasanović

Tehnički urednici

Prof. dr. Jasmina Čakar

Mr. Belma Jusić

CIP - Katalogizacija u publikaciji

Nacionalna i univerzitetska biblioteka Bosne i Hercegovine, Sarajevo

577.2:340.64

Forenzička biologija [Elektronski izvor] / Jasmina Čakar ... [et al.] - El. knjiga. – Sarajevo : Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju, 2023

Link: http://www.ingeb.unsa.ba/knjige/Forenzička_biologija_2023.pdf. – Nasl. sa nasl. ekrana. – Opis izvora dana: 7.8.2023. – Bibliografija uz svako poglavlje.

ISBN 978-9958-083-11-2

l.Čakar, Jasmina

COBISS.BH-ID 55968774

FORENZIČKA BIOLOGIJA

Jasmina Čakar

Damir Marjanović

Anja Haverić

Sanin Haverić

Maida Hadžić Omanović

Amira Kekić

Amela Pilav

Mirela Džehverović

Belma Jusić

Samra Terzić

Selma Zukić

Sabina Dahija

Lejla Lasić

Velida Bakić

Belma Kalamujić Stroil

Adi Vesnić

Amina Hadžiemrić

Renata Bešta-Gajević

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju

Sarajevo, 2023.

A U T O R I

Jasmina Čakar

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Damir Marjanović

Odsjek za genetiku i bioinženjering
Fakultet za inženjering i prirodne nauke
Internacionalni Burch univerzitet
Sarajevo, Bosna i Hercegovina
Institut za antropologiju
Zagreb, Hrvatska

Anja Haverić

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Sanin Haverić

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Maida Hadžić Omanović

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Amira Kekić

Odjeljenje za kriminalističku tehniku i forenziku
Ministarstvo unutrašnjih poslova Kantona
Sarajevo
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Amela Pilav

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Mirela Džehverović

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Belma Jusić

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Samra Terzić

Međunarodna komisija za nestale osobe
(*International Commission on Missing Persons,*
ICMP)
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Selma Zukić

Katedra za morfologiju zuba, dentalnu
antropologiju i forenziku
Univerzitet u Sarajevu - Stomatološki fakultet sa
stomatološkim kliničkim centrom
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Sabina Dahija

Odsjek za biologiju
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Sarajevu
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Lejla Lasić

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Velida Bakić

Odsjek za biologiju
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Sarajevu
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Belma Kalamujić Stroil

Univerzitet u Sarajevu – Institut za genetičko
inženjerstvo i biotehnologiju
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Adi Vesnić

Odsjek za biologiju
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Sarajevu
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Amina Hadžiemrić

Odsjek za biologiju
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Sarajevu
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Renata Bešta-Gajević

Odsjek za biologiju
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u
Sarajevu
Sarajevo, Bosna i Hercegovina

SADRŽAJ

PREDGOVOR	14
1 BIOLOGIJA ĆELIJE	15
1.1 BIOLOŠKA OSNOVA NASLJEĐIVANJA	16
1.1.1 Mendelovi zakoni	17
1.1.2 Geni	20
1.1.3 Hromosomi	21
1.1.4 Interakcije alelnih gena	24
1.1.5 Tipovi nasljeđivanja	25
1.2 ĆELIJA	28
1.2.1 Ćelijske membrane	30
1.2.1.1 Transport kroz ćelijsku membranu	31
1.2.2 Jedro (nukleus)	34
1.2.3 Endomembranski ćelijski sistem	38
1.2.4 Mitohondrije	38
1.2.5 Endoplazmatski retikulum	40
1.2.6 Goldžijev aparat	41
1.2.7 Lizosomi	43
1.2.8 Peroksisomi	44
1.2.9 Nemembranske strukture ćelije	44
1.2.9.1 Ribosomi	44
1.2.9.2 Citoskelet	45
1.2.9.3 Centrosom	46
1.2.10 Specifičnosti biljnih ćelija	46
1.3 REALIZACIJA GENETIČKE INFORMACIJE KOD EUKARIOTA	49
1.3.1 Centralna biološka dogma	49
1.3.2 Replikacija DNK	50
1.3.3 Transkripcija DNK	51
1.3.4 Translacija	53
1.3.5 Regulacija genske ekspresije	53
1.4 PROMJENJIVOST NASLJEDNOG MATERIJALA I NJENE POSLJEDICE	54
1.4.1 Genske mutacije	55
1.4.2 Tačkaste mutacije	56

1.4.3	Male insercije i delecije	57
1.4.4	Spontane mutacije	57
1.4.5	Inducirane mutacije	58
1.5	ĆELIJSKI CIKLUS	59
1.5.1	Ćelijski ciklus prokariota	59
1.5.2	Ćelijske diobe eukariota	59
1.5.2.1	Mitoza	60
1.5.2.2	Metafazni hromosom	66
1.5.2.3	Mejoza	70
	Literatura	75
2	BIOLOŠKI TRAGOVI	77
2.1	TIPOVI BIOLOŠKIH TRAGOVA	80
2.1.1	Forenzička serologija	81
2.1.1.1	Tragovi krvi	82
2.1.1.1.1	Tragovi slijevanja krvi i natapanja tkanine krvlju	84
2.1.1.1.2	Lokva krvi	85
2.1.1.1.3	Kapi krvi	85
2.1.1.1.4	Prskotine	86
2.1.1.1.5	Tragovi krvi preneseni dodirrom	87
2.1.1.1.6	Ostaci krvi	88
2.1.1.1.7	Tragovi nalik na krv	89
2.1.1.1.7.1	Preliminarne metode testiranja tragova krvi	89
2.1.1.1.7.2	Potvrdne metode testiranja tragova krvi	92
2.1.1.1.7.2.1	Krvne grupe ABO sistema	93
2.1.1.1.7.2.1.1	Tehnike određivanja krvnih grupa ABO sistema iz sasušanih uzoraka krvi	95
2.1.1.2	Sjemena tečnost kao biološki trag	98
2.1.1.2.1	Makroskopski pregled tragova sperme	100
2.1.1.2.2	Preliminarne metode testiranja tragova sperme	101
2.1.1.2.3	Potvrdne metode testiranja tragova sperme	103
2.1.1.3	Pljuvačka kao biološki trag	107
2.1.1.4	Urin kao biološki trag	109
2.1.2	Epitelne ćelije kao biološki trag	110
2.1.2.1	Daktiloskopija	111
2.1.2.1.1	Metode detekcije otisaka prstiju	114
2.1.2.1.1.1	Tehnike detekcije otisaka prstiju na poroznim površinama	114

2.1.2.1.1.2	Tehnike detekcije otisaka prstiju na neporoznim površinama -----	116
2.1.2.1.1.3	Ostale metode detekcije otisaka prstiju -----	118
2.1.2.1.1.4	Detekcija otisaka prstiju na ljudskoj koži-----	118
2.1.3	Dlaka kao biološki trag-----	119
2.1.4	Koštani uzorci kao biološki trag-----	123
2.2	PRIKUPLJANJE, IDENTIFIKACIONO OZNAČAVANJE, PAKOVANJE I EVIDENCIJA KRETANJA TRAGA -----	127
	Literatura-----	132
3	MOLEKULARNOGENETIČKA ANALIZA TRAGOVA HUMANOG PORIJEKLA-----	135
3.1	DNK ANALIZA-----	137
3.1.1	Izolacija DNK iz bioloških tragova-----	137
3.1.1.1	Detekcija količine izolovane DNK -----	143
3.1.2	Simultano umnožavanje (amplifikacija) STR markera-----	150
3.2	MOLEKULARNI MARKERI U FORENZIČKOJ ANALIZI-----	152
3.2.1	Minisatelitni markeri -----	154
3.2.2	Mikrosatelitni markeri-----	158
3.3	FORENZIČKO DNK PROFILIRANJE -----	161
3.3.1	Generiranje DNK profila -----	165
3.3.2	Izazovi u analizi i interpretaciji DNK profila -----	168
3.3.2.1	Zaostajući pikovi-----	169
3.3.2.2	Off-ladder pikovi i mikrovarijante-----	170
3.3.2.3	Trialelne varijante STR lokusa -----	172
3.3.2.4	Ispadanje alela i nul-aleli -----	174
3.3.2.5	Mutacije-----	175
3.3.3	Spolno-vezani markeri -----	177
3.3.3.1	Analiza Y-STR markera -----	177
3.3.3.1.1	Analiza Y-haplogrupa -----	180
3.3.4	X-STR markeri -----	183
3.3.5	Mitohondrijska DNK-----	187
3.3.5.1	Mitohondrijske haplogrupe-----	192
3.3.6	Izazovi u forenzičkoj analizi STR markera-----	194
3.3.6.1	Analiza degradirane molekule DNK -----	194
3.3.6.2	Miješani DNK profili-----	197
3.3.6.3	Analiza malih količina DNK-----	202
3.3.6.4	Inhibitori -----	203

3.3.7	Statistička analiza -----	205
3.3.7.1	Baze alelnih frekvencija u humanim populacijama -----	207
3.3.7.2	Statistička analiza frekvencije / individualnosti DNK profila -----	211
3.3.7.3	Statistička analiza miješanih tragova -----	215
3.3.7.4	Statistička analiza parcijalnih DNK profila -----	217
3.3.7.5	Statistička analiza utvrđivanja biološkog srodstva -----	218
3.3.7.5.1	Potpuno očinstvo -----	219
3.3.7.5.2	Bezmajčinsko očinstvo / majčinstvo -----	220
3.3.7.5.3	DNK analiza biološkog srodstva -----	222
3.3.7.5.4	Statistička analiza spolno vezanih STR markera -----	224
	Literatura -----	226
4	FORENZIČKA ANTROPOLOGIJA -----	228
4.1	PROCJENA SPOLA -----	231
4.2	PROCJENA ŽIVOTNE DOBI -----	237
4.2.1	Procjena životne dobi kod osoba koje su završile rast -----	237
4.2.2	Procjena životne dobi kod individua koje nisu završile rast -----	244
4.3	PROCJENA UKUPNE TJELESNE VISINE -----	248
4.4	TRAUME NA SKELETNIM OSTACIMA -----	252
4.5	PATOLOŠKE PROMJENE NA KOSTIMA -----	254
4.6	FORENZIČKA ANTROPOLOGIJA U PRAKSI U BOSNI I HERCEGOVINI -----	258
4.7	OSNOVE FORENZIČKE STOMATOLOGIJE / ODONTOLOGIJE -----	262
4.7.1	Identifikacija preminulih osoba putem dentalnih metoda -----	263
4.7.1.1	Evaluacija dentalnih karakteristika -----	264
4.7.1.2	Identifikacija na osnovu dentalnih karakteristika -----	267
4.7.2	Biološko profiliranje primjenom dentalnih metoda -----	268
4.7.2.1	Procjena dentalne dobi -----	268
4.7.2.2	Procjena spola na osnovu zuba i čeljusti -----	273
4.7.2.3	Procjena geografskog porijekla na osnovu karakteristika zuba i čeljusti -----	276
4.7.3	Izvođenje zaključka identifikacije putem dentalnih metoda i pisanje izvještaja -----	277
4.7.4	Analiza tragova ugriza -----	279
4.7.5	Forenzička stomatologija u medicinsko-pravnim slučajevima -----	282
	Literatura -----	283
5	FORENZIČKA BOTANIKA -----	285
5.1	ANATOMIJA I MORFOLOGIJA BILJAKA U FORENZICI -----	287
5.2	TAKSONOMIJA BILJAKA U FORENZICI -----	292

5.3	EKOLOGIJA BILJAKA U FORENZICI-----	295
5.4	LIMNOLOGIJA U FORENZICI-----	297
5.5	PALINOLOGIJA U FORENZICI -----	302
5.5.1	Bazična palinologija -----	302
5.5.1.1	Struktura i osobine polenovog zrna-----	302
5.5.1.2	Identifikacija polenovih zrna-----	304
5.5.2	Forenzička palinologija -----	305
5.5.2.1	Polen kao biološki trag-----	306
5.5.2.2	Forenzička analiza polena -----	308
5.6	BILJNI OTROVI U FORENZICI-----	309
5.6.1	Alkaloidi kao biljni toksini -----	312
5.6.1.1	Kolhicin-----	313
5.6.1.2	Konin-----	314
5.6.1.3	Tropanski alkaloidi -----	315
5.6.1.4	Ostali alkaloidi -----	317
5.6.2	Glikozidi -----	320
5.6.2.1	Digoksin -----	321
5.6.2.2	Cijanogeni glikozidi -----	321
5.6.3	Toksični biljni lektini-----	322
5.6.4	Toksini iz gljiva -----	324
5.7	MOLEKULARNOGENETIČKA ANALIZA TRAGOVA BILJNOG PORIJEKLA -----	325
5.7.1	DNK analiza biljnih tragova -----	326
5.7.2	Metode genotipizacije biljnih tragova-----	327
5.7.3	Ekstrakcija DNK iz biljnih tragova -----	330
5.7.4	Molekularni markeri u analizi biljnih tragova -----	332
5.7.4.1	RFLP – Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata -----	333
5.7.4.2	Metoda slučajnog umnožavanja polimorfne DNK – RAPD -----	337
5.7.4.3	Polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata – AFLP -----	339
5.7.4.4	Mikrosatelitni markeri -----	344
5.7.4.5	DNK barkodiranje -----	346
5.7.4.6	Polimorfizam jednog nukleotida – SNP -----	349
5.7.5	Interpretacija rezultata molekularnoforenzičke analize biljnih tragova -----	350
	Literatura-----	352
6	ANIMALNA FORENZIKA -----	356
6.1	METODE IDENTIFIKACIJE VERTEBRATA U ANIMALNOJ FORENZICI-----	359

6.1.1	Fizičke metode u analizi kičmenjaka u animalnoj forenzici -----	359
6.1.1.1	Morfološka analiza tijela i skeleta -----	359
6.1.1.2	Analiza tragova ujeda -----	360
6.1.1.3	Analiza fecesa -----	361
6.1.1.4	Žigosanje -----	362
6.1.1.5	Ušne markice -----	363
6.1.1.6	Mikročipovi -----	363
6.1.1.7	Dlake -----	363
6.1.2	Molekularne tehnike u analizi kičmenjaka u animalnoj forenzici-----	364
6.1.2.1	Markeri na mitohondrijskom genomu-----	365
6.1.2.2	STR (engl. Short Tandem Repeats) markeri -----	366
6.1.2.3	Markeri na X i Y-hromosomu -----	368
6.1.2.4	Polimorfizam jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism – SNP)-----	370
6.1.3	Hemijske tehnike u analizi kičmenjaka u animalnoj forenzici-----	371
6.1.3.1	Rendgenska difrakcija-----	371
6.1.3.2	Analiza stabilnih izotopa -----	372
6.1.3.3	Analiza hemijskog sastava tkiva -----	372
6.1.4	Statistički parametri koji se koriste u animalnoj forenzici-----	373
6.1.5	Izazovi i preporuke u animalnim forenzičko-genetičkim istraživanjima -----	373
6.1.6	Primjena animalne forenzike u slučajevima u kojima su životinje pasivni svjedoci zločina-----	374
6.1.6.1	Životinje kao pasivni svjedoci u slučajevima ubistava ili nasilnih zločina-----	376
6.1.6.1.1	Slučaj Snowball-----	376
6.1.6.1.2	Slučaj Bird-----	377
6.1.6.2	Životinje kao pasivni svjedoci u slučajevima privrednih prevara -----	377
6.1.6.2.1	Slučaj prevare u sektoru akvakulture -----	378
6.1.7	Primjena animalne forenzike u slučajevima u kojima su životinje žrtve zločina-----	381
6.1.7.1.1	Slučaj krivolova divljih životinja-----	381
6.1.7.1.2	Slučaj krađe životinja-----	384
6.1.8	Primjena animalne forenzike u slučajevima u kojima su životinje počinitelji zločina -----	386
6.1.9	Primjena animalne forenzike u kontroli porijekla i sadržaja prehrambenih proizvoda-----	389
6.2	FORENZIČKA ENTOMOLOGIJA -----	391
6.2.1	Forenzički bitni insekti-----	393
6.2.1.1	Red Diptera -----	394
6.2.1.1.1	Familija Calliphoridae (zunzare) -----	394
6.2.1.1.2	Familija Sarcophagidae (mesaruše) -----	395

6.2.1.1.3	Familija Muscidae (muhe)-----	396
6.2.1.1.4	Familija Phoridae (muhe mrtvačkih sanduka)-----	396
6.2.1.1.5	Familija Phiophilidae (sirne muhe) -----	397
6.2.1.2	Red Coleoptera -----	397
6.2.1.3	Ostale entomološki važne vrste u forenzici -----	398
6.2.2	Određivanje postmortalnog intervala (PMI) -----	400
6.2.2.1	Određivanje PMI na osnovu razvojnog stadija insekata -----	400
6.2.2.2	Određivanje PMI na osnovu sukcesije insekta -----	402
6.2.2.2.1	Svježa faza (0–48 sati)-----	405
6.2.2.2.2	Faza nadutosti (2–12 dana) -----	405
6.2.2.2.3	Faza truljenja (12–20 dana)-----	406
6.2.2.2.4	Suha faza ili faza poslije truljenja (20–40 dana)-----	406
6.2.2.2.5	Skeletna faza -----	407
6.2.3	Faktori koji utiču na sukcesiju / razvoj insekata na lešu -----	407
6.2.3.1	Uticaj temperature i vlažnosti na razvoj insekata -----	407
6.2.3.2	Uticaj toksina na razvoj artropoda -----	408
6.2.4	Sakupljanje entomološkog materijala i određivanje postmortalnog intervala (PMI) -----	409
6.2.4.1	Tehnike prikupljanja i identifikacije entomološkog materijala -----	411
6.2.4.2	Molekularnogenetička analiza entomološkog dokaznog materijala -----	413
6.2.4.2.1	Determinacija vrste-----	413
6.2.4.2.2	Populacijskogenetička analiza -----	415
6.2.4.2.3	Genotipizacija sadržaja crijeva insekata-----	415
6.2.4.2.4	Analiza molekule RNK-----	416
Literatura	-----	418
7	FORENZIČKA MIKROBIOLOGIJA-----	424
7.1	BIOLOŠKO ORUŽJE I BIOTERORIZAM-----	426
7.1.1	Klasifikacija bioloških uzročnika koji se mogu koristiti u bioterorizmu-----	427
7.1.2	Identifikacija uzročnika u bioterorizmu-----	430
7.1.3	Molekularne metode identifikacije mikroorganizama u bioterorizmu -----	431
7.1.4	Mikroorganizmi u bioterorizmu -----	435
7.1.4.1	Bacillus anthracis -----	435
7.1.4.2	Bakterije roda Shigella-----	441
7.1.4.3	Virus humane imunodeficijencije-----	443
7.2	MIKROBIOTA I MIKROBIOM-----	446
7.2.1	Mikrobiom kože-----	447

7.2.2	Mikrobiom usne šupljine -----	448
7.2.2.1	Gram-pozitivne koke -----	449
7.2.2.2	Gram-negativne štapićaste bakterije-----	449
7.2.2.3	Gram-negativne koke -----	450
7.2.2.4	Gram-negativne štapićaste bakterije-----	450
7.2.2.5	Mikoplazme -----	450
7.2.3	Mikrobiom gastrointestinalnog trakta -----	450
7.2.3.1	Mikrobiom želuca i dvanaestopalačnog crijeva -----	452
7.2.3.2	Mikrobiom jejunuma i ileuma -----	453
7.2.3.3	Mikrobiom debelog crijeva -----	453
7.2.4	Vaginalni mikrobiom-----	454
7.2.5	Primjena mikrobioma u forenzici -----	455
7.2.5.1	Utvrđivanje identiteta osobe na osnovu mikrobioma-----	457
7.2.5.2	Individualizacija na osnovu mikrobioma kože -----	458
7.2.5.3	Procjena postmortalnog intervala na osnovu mikrobioma-----	458
7.2.5.4	Određivanje geolokacije na osnovu mikrobioma -----	460
7.2.5.5	Identifikacija tkiva / tjelesne tečnosti na osnovu mikrobioma-----	461
7.2.5.5.1	Pljuvačka-----	462
7.2.5.5.2	Vaginalni sekret-----	463
7.2.5.6	Mikrobiom kao pokazatelj vremena kada je ostavljen biološki trag na mjestu zločina -----	463
7.2.5.7	Primjena mikrobioma u druge forenzičke svrhe-----	464
7.2.6	Metode za proučavanje mikrobioma u forenzici -----	465
7.2.6.1	Sekvenciranje 16S rRNK -----	466
7.2.6.2	Sekvenciranje kompletnog genoma-----	466
7.2.7	Bioinformatička analiza mikrobiotskih podataka -----	466
	Literatura-----	468
	IZVORI SLIKA-----	471
	INDEKS POJMOVA -----	474

PREDGOVOR

Nauka nema početak i nema kraj. Ona je stalno brojanje od jedan do deset, koje uvijek u narednom koraku krije neko novo decimalno mjesto. U modernome okruženju, u ovim godinama punim izazova, nauka se nerijetko vrednuje po širini njene primjene u svakodnevnim aktivnostima karakterističnim za ljudsku civilizaciju.

Forenzička biologija je upravo jedna od takvih naučnih disciplina. Ovaj zanimljivi spoj fundamentalne biologije, u najširem smislu te riječi, i njene svakodnevne primjene u širokom spektru sudskih i policijskih istraga odličan je primjer onoga što u 21. stoljeću nazivamo aplikativna nauka.

Stoga ne treba da čudi potreba da se jedna ovakva knjiga napiše. Treba biti iskren i reći da su da su i mnogi bosanskohercegovački naučnici u proteklom desetljećima postavili osnovne temelje ove oblasti. No, napredak same forenzičke biologije, najnovije metode u oblasti antropoloških, botaničkih, animalnih, mikrobioloških i mnogih drugih analiza koje su svoju primjenu pronašle u forenzičkim istragama jednostavno uslovljavaju objavljivanje jedne nove sveobuhvatne knjige koja kroz svoja poglavlja spaja teoriju i praksu, mjesto zločina i laboratoriju te eksperte koji realiziraju opisane analize i one koji rezultate tih analiza inkorporiraju u finalne izvještaje.

I naravno priča o forenzičkoj biologiji ovom knjigom se ne završava. Naprotiv, neće nas iznenaditi da se u skorije vrijeme ukaže potreba za novim izdanjem ili potpunim redizajnom tekstova, misli i spoznaja. Naime, u ovome momentu, dok čitate ove redove, na stotine, ako ne i hiljade forenzičkih laboratorija širom svijeta u svojim rutinskim dnevnim aktivnostima ispisuju nove redove i nove naučne spoznaje u ovoj dinamičnoj oblasti.

Prof. dr. Jasmina Čakar

Prof. dr. Damir Marjanović

The background of the entire page is a microscopic view of red blood cells, which are biconcave discs. They are densely packed and appear in various shades of red and pink, with some showing the characteristic indentation in the center. The lighting creates a sense of depth, with some cells in sharp focus and others blurred in the foreground and background.

1. **BIOLOGIJA ĆELIJE**

ANJA HAVERIĆ
SANIN HAVERIĆ
MAIDA HADŽIĆ OMANOVIĆ

Forenzička biologija u najširem se smislu definiše kao “primjena biološke nauke u pravnim postupcima, odnosno istragama”. U nazivu forenzička biologija, riječ “forenzički” vodi porijeklo od latinskog pridjeva *forensis* što znači “od/iz foruma” ili “prije foruma”, jer je još kod starih Rimljana kaznena prijava značila javno iznošenje slučaja pred skupinom pojedinaca na trgu (forumu). Osoba optužena za zločin, kao i tužitelj, javno bi predstavljali svoju stranu priče, a konačni je ishod zavisio od jačine argumenata i forenzičkih dokaza. Ovo porijeklo riječi danas je izvor za dvije moderne upotrebe riječi “forenzički” – kao oblika pravnog dokaza i kao kategorije javnog predstavljanja. Svakako, u modernoj upotrebi, izraz “forenzika” umjesto “forenzička nauka” sada je tako blisko povezan s naučnim poljem da mnogi rječnici poistovjećuju ova dva termina.

Forenzička biologija podrazumijeva primjenu različitih bioloških disciplina u istražnopravnim postupcima, od citologije, humane anatomije i fiziologije do sistematike živog svijeta. Pri tome, sva živa bića, od najjednostavnijih do složenijih oblika, predmet su proučavanja forenzičke biologije. Kompletni organizmi ili fragmenti živih bića pronađeni na mjestu izvršenja krivičnih radnji predstavljaju veoma važan i vrijedan materijalni dokaz koji povezuje osobe (počinioce zločina, žrtve, svjedoke i ostale) s mjestom zločina i počinjenim krivičnim djelom. Upravo zbog toga, u okviru forenzičke biologije razvile su se i specifične podoblasti koje se fokusiraju na određeni predmet proučavanja, kao što su: forenzička botanika, animalna forenzika, forenzička mikrobiologija, forenzička antropologija, forenzička odontologija i molekularna (DNK) forenzika (forenzička genetika). Iskoristivost, odnosno upotrebljivost biološkog materijala kao forenzičkog dokaza zavisi od razumijevanja fundamentalnih bioloških procesa. Stoga su poznavanje strukture, organizacije i funkcije ćelije kao osnovne gradivne i funkcionalne jedinice svakog živog bića te osnova nasljeđivanja biološkog materijala ključni u poznavanju i praktičnoj primjeni forenzičke biologije.

1.1 BIOLOŠKA OSNOVA NASLJEĐIVANJA

Nasljeđivanje se, u biološkom smislu, odnosi na pojavu ili proces prenošenja gena (osnovnih jedinica nasljeđivanja), tj. njihovih varijanti u formi bioloških uputstava kodiranih slijedom azotnih baza u nukleotidima makromolekula dezoksiribonukleinske kiseline (DNK). Prenosjenje gena se odvija kroz sukcesivne generacije, bez obzira na to da li je riječ o spolnom ili bespolnom

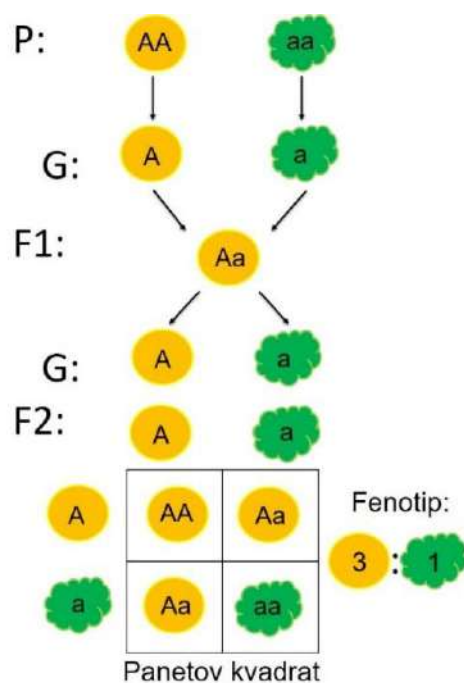
razmnožavanju. Posebno je bitno naglasiti da nove jedinke od svojih roditelja nasljeđuju gene, a ne osobine. Nauka koja proučava nasljeđivanje bioloških, odnosno genetičkih informacija u najširem se smislu naziva *genetika*, a obuhvata brojne oblasti. Iako je fenomen sličnosti roditelja i njihovih potomaka od davnina zaokupljao učenjake i filozofe, a ciljano ukrštanje različitih rasa domaćih životinja bilo primjenjivano još 3000 g. pr. n. e., zakonitosti biološkog nasljeđivanja postavio je tek češki sveštenik, biolog, botaničar i matematičar Gregor Johann Mendel (1822 – 1884). On se zato smatra *ocem genetike* koja svoje početke ipak veže za 1900. godinu kada je značaj njegovih rezultata prepoznat. Mendel je fundamentalne zaključke donio na osnovu višegodišnjih, gotovo decenijskih eksperimenata ukrštanja različitih sorti graška.

1.1.1 Mendelovi zakoni

Mendel je prvi pretpostavio da svaku osobinu određuje par nasljednih elemenata (faktora), za koje je 1909. danski botaničar, biljni fiziolog i genetičar Wilhelm Johannsen (1857–1927) uveo termin *geni*, koji se prvenstveno odnosio na njihovu funkciju nosioca nasljedne informacije bez ikakvog određenja materijalnog oblika, mehanizma djelovanja, fizičke ili hemijske strukture niti lokacije u organizmu i ćeliji. Prethodno je (1903) uveden termin *genotip* za genetički potencijal organizma, a naknadno (1911) termin *fenotip* za sve formirane osobine organizma.

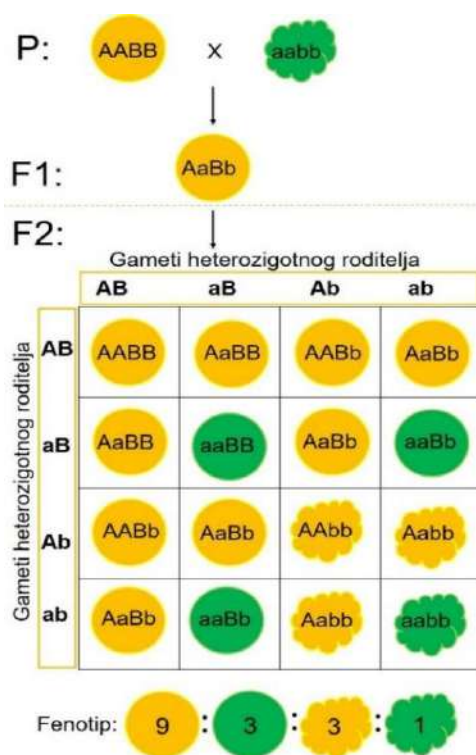
Osobinom se smatra kvantitativni (kontinuiran, koji može biti metrički – utvrđuje se mjerenjem ili meristički – utvrđuje se brojanjem) ili kvalitativni (diskontinuiran – utvrđuje se opisno) element opisa nekog sistema. Neke od osobina javljaju se u jednoobraznoj, a neke u više međusobno različitih formi (varijanti). *Gen*, u savremenom biološkom i materijalnom kontekstu, predstavlja dio molekule DNK ili RNK (ribonukleinska kiselina) čija sekvenca nosi genetičku informaciju, odnosno kôd za sintezu određene funkcionalne molekule: rRNK (ribosomske RNK), tRNK (transportne RNK), strukturnih proteina (kodiraju ih *strukturni geni*), regulatornih proteina, npr. represora (kodiraju ih *regulatorni geni*). Različite varijante određenog gena nazivaju se *alelima* (alelomorfima), pri čemu se onaj koji je najčešće zastupljen ili određuje izvorni fenotip označava kao *alel divljeg tipa* (engl. *wild-type*, skraćenica *wt*) s oznakom “+” u potenciji. Suprotan njemu je *mutirani alel* koji nosi oznaku “–”. Eksperimentišući s čistim linijama, koje se tako nazivaju jer samooprašivanjem daju isto svojstvo u potomstvu, a kojima je, odrezavši im prašnike, spriječio samooprašivanje te ih je vještački oprašivao, Mendel je pratio sedam različitih osobina graška.

Kompleksne obrasce nasljeđivanja u prirodnim populacijama simplificirano je proučavao najprije kroz monohibridna ukrštanja koristeći sorte koje se razlikuju po alternativnim varijantama samo jedne osobine, a potom i kroz dihibridna ukrštanja. U monohibridnom modelu ukrštanja čistih linija, Mendel je u prvoj filijalnoj generaciji (F1) dobio sve individue s istom varijantom posmatrane osobine kakvu ima jedan od roditelja. Prvi Mendelov zakon ili *zakon uniformnosti* upravo se odnosi na ovu fenotipsku (pojavnu) i genotipsku (nasljednu) istovjetnost jedinki u F1 generaciji. Ovo svojstvo se označava kao *dominantno*, a određuje ga dominantni (A) “nasljedni faktor”, kako ga je u ono vrijeme imenovao Mendel, a danas se označava kao alel, dok se drugo svojstvo i alel označavaju kao *recesivni* (a). Jedinka za svaki gen normalno nosi po jedan alel od svakog roditelja. To znači da sve jedinke u F1 generaciji monohibridnog ukrštanja imaju Aa genotip za posmatrano svojstvo. U F2 generaciji, nakon ukrštanja pripadnika F1 generacije, odnos varijanti osobina bio je 3 : 1 u korist dominantne varijante uz sljedeći odnos genotipova: 1 (AA) : 2 (Aa) : 1 (aa), što je prikazano na Punnetovoj (Reginald Punnet, 1875–1967) mreži u kojoj se prikazuju gameti obje roditeljske individue i sve mogućnosti njihovog kombinovanja u potomstvu (slika 1.1).



Slika 1.1. Šematski prikaz monohibridnog ukrštanja

Drugi Mendelov zakon (*zakon segregacije*) odnosi se na činjenicu da jedinke F2 generacije monohibridnog ukrštanja nisu uniformne, nego se razvrstavaju u genotipove i fenotipove. U dihibridnom ukrštanju, koje u matematičkom smislu predstavlja proizvod dva monohibridna ukrštanja, u F1 generaciji također su sve individue uniformne, dok se u F2 generaciji, zbog dva posmatrana svojstva, fenotipsko-genotipske kombinacije komplikuju uz odnos genotipova 9 (AABB, AaBB, AABb, AaBb) : 3 (AAbb, Aabb) : 3 (aaBB, aaBb) : 1 (aabb) (slika 1.2).

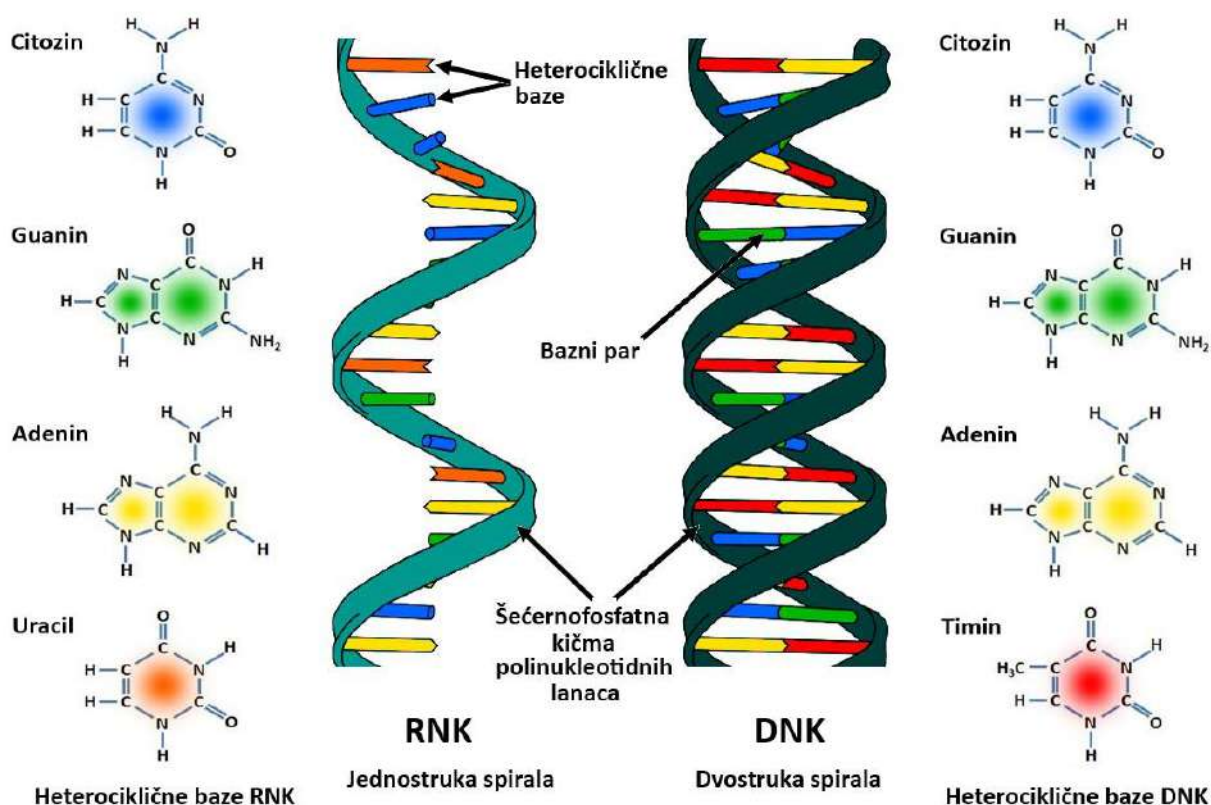


Slika 1.2. Šematski prikaz dihibridnog ukrštanja

Treći Mendelov zakon se odnosi na činjenicu da se alelni parovi (pod pretpostavkom da za posmatranu osobinu postoje dva različita alela i u tom slučaju tri moguća genotipa) za različite osobine (gene) kombinuju nezavisno jedni od drugih. Mendel nije znao za hromosome, nukleoproteinske strukture na kojima su locirani geni, tj. aleli. Na sreću, aleli za osobine koje je on posmatrao nalaze se na različitim hromosomima, koji su se stoga nesmetano razdvajali i kombinovali.

1.1.2 Geni

Gen je definisan kao dio molekule nukleinske kiseline (DNK ili RNK) koji nosi “šifru” (genetičku informaciju) za sintezu neke od više mogućih vrsta funkcionalnih molekula RNK (rRNK, tRNK i iRNK). Informaciona RNK (iRNK) predstavlja intermedijarnu molekulu između gena i proteina, a slijed nukleotida u genu određuje slijed aminokiselina, tj. primarnu strukturu proteina (slika 1.3).



Slika 1.3. Građa i strukturne razlike između molekula DNK i RNK

U formalnoj genetici, gen je jedinica strukture (definisane sastavom i redoslijedom nukleotida u molekuli nukleinske kiseline), funkcije i transmisije nasljednog materijala. Savremena genetika odvojila se od univerzalnosti koncepta da jedan gen kontroliše jedan protein (svojstvo). Samo je mali broj osobina monogenetskog karaktera, tj. određuje ih aktivnost samo jednog gena, i tu spadaju: bijeli pramen kose kod muškaraca, guste obrve, spojene obrve, rupica na bradi i dr. Neka od oboljenja uzrokovanih mutacijom jednog gena su: hemofilija, cistična fibroza, Hantingtonova horea, hemohromatoza i druge. S druge strane, najveći broj uočljivih osobina je rezultat uzajamnog

djelovanja manjeg (oligogenija) ili većeg (poligenija) broja gena. Boja kose je, na primjer, svojstvo koje je rezultat uzajamnog djelovanja dva ili više gena, a primjer oligogenskog oboljenja je familijarna trombofilija. Boja očiju je poligenско svojstvo, dok je, također, veliki broj kompleksnih oboljenja (kanceri, kardiovaskularna, autoimuna, mentalna oboljenja) rezultat uzajamnog djelovanja većeg broja gena. Istovremeno, određeni geni polivalentno (plejotropija) utiču na formiranje više osobina (polifenija).

Geni su u organizmu locirani na *hromosomima* (grč. *chroma* = boja; *soma* = tijelo). Mjesto gena na hromosomu naziva se *lokus* i može biti promijenjen pod uticajem mobilnih genetičkih elemenata – *transpozona*. Geni koji se nalaze na istom hromosomu nazivaju se *vezanim* genima. Mapiranje hromosoma, tj. određivanje linearnog rasporeda gena na hromosomima, što je prvi učinio Thomas Morgan (1866–1945), zasniva se na činjenici da je vjerovatnoća odvijanja rekombinacije između dva lokusa veća ako su oni udaljeniji. Za jedinicu mapiranja (centimorgan – cM) uzima se rastojanje između lokusa na kojima se odvija 1% rekombinacija. Za par vezanih gena učestalost krosing-overa i učestalost rekombinovanja nisu identične. Učestalost krosing-overa se odnosi na fizičke razmjene genetičkog materijala između hromosoma u mejozi dok se učestalost rekombinacija prati na osnovu pojave rekombinovanih fenotipova u potomstvu na osnovu čega se može i procijeniti udaljenost genskih lokusa. Maksimalna učestalost rekombinacija između dva lokusa iznosi 50%.

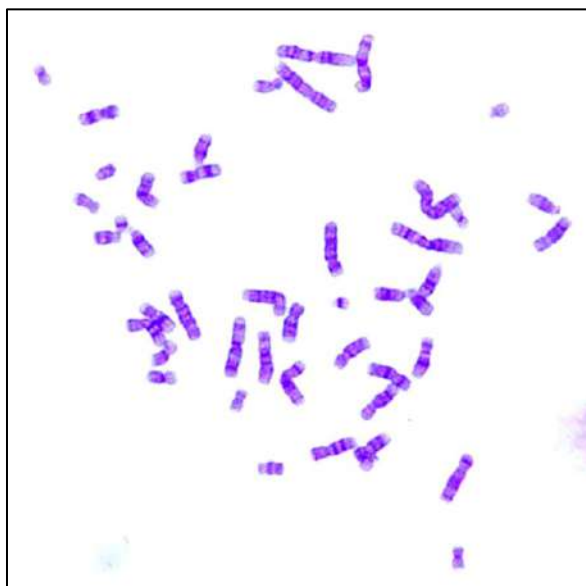
Skup gena, tj. ukupni genetički materijal nekog organizma, predstavlja *genom* tog organizma. Termin genom prvi je put upotrijebio Hans Winkler (1877–1945) 1920. godine kako bi, spajajući termine “gen” i “hromosom”, imenovao haploidni set hromosoma u gametima ili drugim ćelijama višćelijskih organizama.

1.1.3 Hromosomi

Svaki gen zauzima specifično mjesto (tzv. *genski lokus*) na određenom hromosomu, koji su osnovna organizaciono-funkcionalna jedinica genetičkog materijala unutar ćelije. Hromosomsku garnituru čini skup svih hromosoma u ćeliji, a njen sastav s obzirom na broj, veličinu, oblik i sadržaj hromosoma temelj je genetičke posebnosti svake biološke vrste. S obzirom na to da li su zastupljeni u jednoj ili dvije kopije razlikujemo *haploidnu* (n) i *diploidnu* ($2n$) hromosomsku garnituru (slika 1.4), gdje n predstavlja haploidni set, odnosno osnovni broj hromosoma prisutan

u gametu. Kod organizama sa spolnim razmnožavanjem *gameti* su haploidni, dok su tjelesne (somatske) ćelije diploidne, tj. u njima su zastupljeni parovi *homolognih* hromosoma (istosmislenih, odgovarajućih, koji vode porijeklo od različitih roditelja). Hromosomsku garnituru čovjeka čini 46 hromosoma ($2n$), dakle $n = 23$. Od 46 hromosoma (23 para), 22 para su *autosomi*, a jedan par su *heterosomi* (hromosomi koji određuju spol).

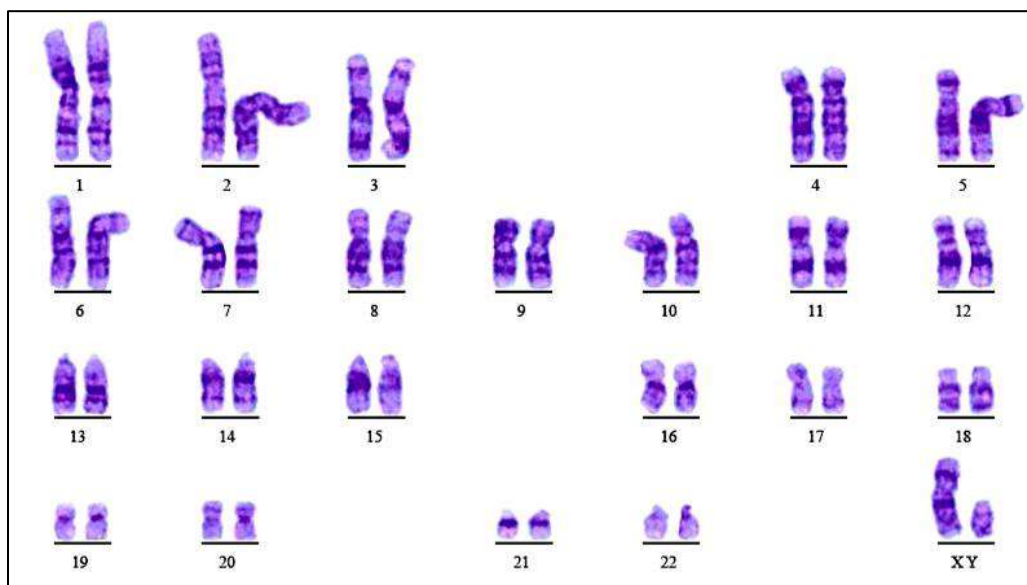
Spolni hromosomi, označeni kao X i Y, međusobno su različiti (morfološki, strukturno, genetički), odatle i naziv heterosomi, pa je ženski spol, koji karakterizira prisustvo dva X-hromosoma, *homogametski*, dok je muški spol, određen prisustvom X i Y-hromosoma, u tom pogledu *heterogametski*. Svi muškarci su *hemizigotni* za sva kompletno spolno vezana svojstva jer te gene nasljeđuju u jednostrukoj (hemi) količini: X-vezane od majke, a Y-vezane od oca.



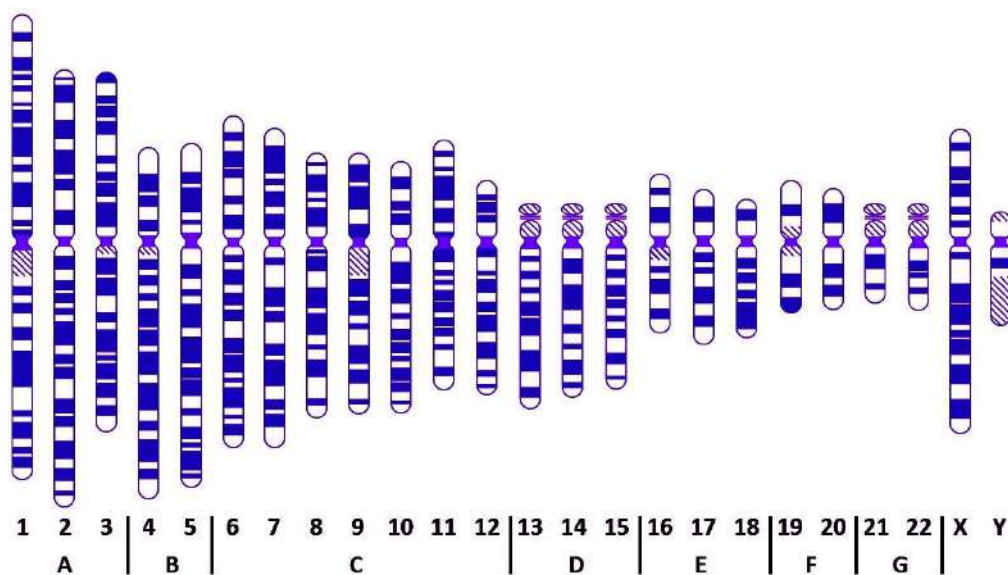
Slika 1.4. Diploidna hromosomska garnitura 46,XY

U nekim slučajevima broj genoma u hromosomskoj garnituri u organizmu može biti veći od dva. Za to su odgovorne mutacije koje predstavljaju promjene u količini ili rasporedu genetičkog materijala. Mutacije koje se očituju kao povećanje ili smanjenje broja čitavih genoma u hromosomskoj garnituri obuhvaćene su terminom *genomske mutacije*. *Poliploidija* je genomska numerička mutacija koja nastaje višestrukim umnožavanjem osnovnog haploidnog hromosomskog komplementa (n). U humanom genomu opisane su *triploidija* ($3n = 69$) i *tetraploidija* ($4n = 92$).

Ukupan broj i izgled hromosoma jedne somatske ćelije naziva se *kariotip*. Prikaz kariotipa u kojem su hromosomski parovi složeni na osnovu veličine i morfologije označava se kao *kariogram* (slika 1.5), dok je *idiogram* (slika 1.6) idealizirana šematska prezentacija haploidne hromosomske garniture nekog organizma ili biološke vrste.



Slika 1.5. Kariogram 46,XY



Slika 1.6. Idiogram

1.1.4 Interakcije alelnih gena

Oplođnjom, jednu haploidnu garnituru u zigot unosi muški, a drugu ženski gamet. U slučaju da su u obje od ovih garnitura zastupljene iste varijante određenog gena, tj. isti aleli, pojava se označava kao *homozigotnost*, za razliku od *heterozigotnosti*, koju karakterizira prisustvo različitih alela na određenom genskom lokusu.

Alelni geni (kao uostalom i nealelni, tj. oni s različitih genskih lokusa) homolognih hromosoma mogu biti u različitim međusobnim interakcijama s različitim efektima na ispoljavanje određene osobine, tj. sintezu funkcionalne molekule. Oblici interakcije alelnih gena su:

- *Dominantnost – recesivnost* – heterozigoti imaju isti fenotip kao i dominantni homozigoti. Dakle, kod heterozigota je ispoljen samo jedan, dominantni alel, dok su fenotipski efekti recesivnog alela maskirani i ispoljavaju se samo kod recesivnih homozigota. Ovaj oblik interakcije najčešće je posljedica djelimičnog ili potpunog gubitka sposobnosti recesivnog alela da kodiranje sinteze specifičnog produkta dovede do njenog finalnog oblika (koji je karakterističan za funkciju izvornog, “divljeg tipa” alela). Neki primjeri dominantnih (recesivnih) osobina su: normalna boja kože (albinizam), ravna (kovrdžava) kosa, široki (uski) nos, polidaktilna (normalna) šaka, savijanje (nesavijanje) jezika, patuljasti (normalan) rast, Rh⁺ (Rh⁻) rezus faktor i drugi. U ABO sistemu krvnih grupa koji određuju tri moguća alela (I^A, I^B i I^O), bolje rečeno klase alela koje, uz svoje brojne podvarijante, određuju pripadnost jednoj od krvnih grupa ABO sistema (A, B, AB i O), odnos I^O alela je recesivan u odnosu na I^A i I^B. Dominantnost funkcije jednog alela može biti potpuna (kada se fenotipovi dominantnog homozigota i heterozigota ne razlikuju) ili nepotpuna, uz čitavu skalu prelaznih oblika opadanja izražajnosti dominantnog alela. Situacija u kojoj određeni gen ima više alelnih varijanti označava se kao *multipli alelizam* i karakterizira ga više mogućih genotipova, a *multipli aleli* su posljedica različitih mutacija istog gena.
- *Intermedijarnost (nekompletna dominantnost)* – heterozigoti predstavljaju izvjestan međufenotip u odnosu na dominantne i recesivne homozigote, tj. fenotip heterozigota je između dvije krajnosti homozigotnih individua. Najslikovitiji primjer je ružičasta boja cvijeta kod heterozigotnih individua od homozigotnih roditelja crvene (dominantni) i bijele (recesivni) boje cvijeta.

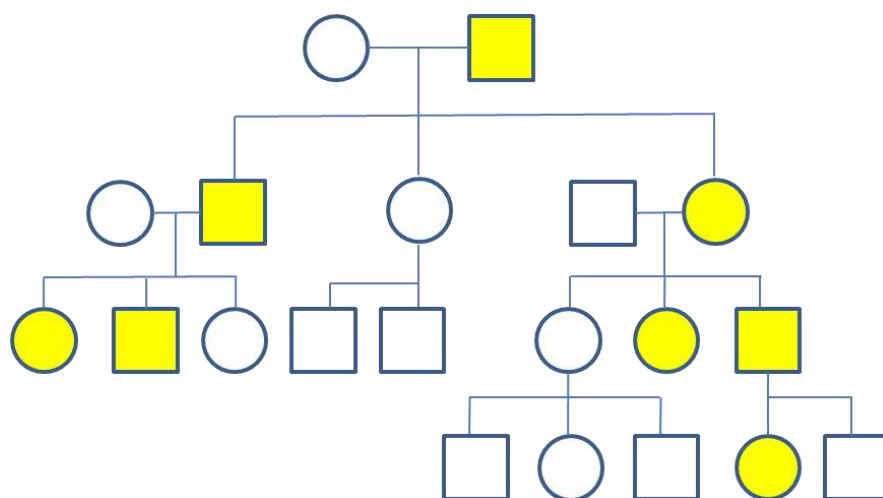
- *Kodominantnost* – kod heterozigotnih jedinki simultano se ispoljavaju oba alela. Jedan od opisanih slučajeva kodominantnosti je AB krvna grupa ABO sistema. Kod individua ove krvne grupe istovremeno su ispoljena oba prisutna alela (I^A i I^B) te jedinke s krvnom grupom AB na površini eritrocita sadrže i A i B antigene (glikolipidne receptore).
- *Superdominantnost (naddominantnost)* – fenotipski učinak kod heterozigotnih jedinki prevazilazi onaj kod dominantnih homozigota. Primjer je fenomen *heteroze (hibridne snage)*, pojave poboljšanih osobina kod potomaka u odnosu na roditeljske individue. Ovaj je termin formulisan prije uvođenja molekularnog koncepta u genetiku te nije u saglasnosti s molekularnim principima, zbog čega je i predmet naučnih kontroverzi.
- *Alelna isključivanje* – pojava u kojoj je u određenim ćelijama aktivna samo određena alelna varijanta.
- *Genetički utisak (engl. imprinting)* – odnosi se na epigenetički uslovljene razlike u fenotipskim efektima alela koji su različitog roditeljskog porijekla (od oca ili od majke). Neki od genskih lokusa s ovakvim fenotipskim efektima su 7q32, 11p15 i dr.
- *Alelna komplementacija* – ovaj tip alelne interakcije podrazumijeva da heterozigoti s mutiranim varijantama alela imaju normalan fenotip, tj. isti fenotipski efekat kao i normalni alel, što je posljedica komplementarne aktivnosti fenotipskih efekata mutiranih alela u heterozigotnom stanju.

1.1.5 Tipovi nasljeđivanja

Tipove nasljeđivanja gena koji određuje odabrano svojstvo koje posmatramo najprije određuje tip hromosoma (autosomi ili heterosomi) na kojem se posmatrani gen nalazi.

Autosomno nasljeđivanje dominantnih svojstava (slika 1.7) karakterizira:

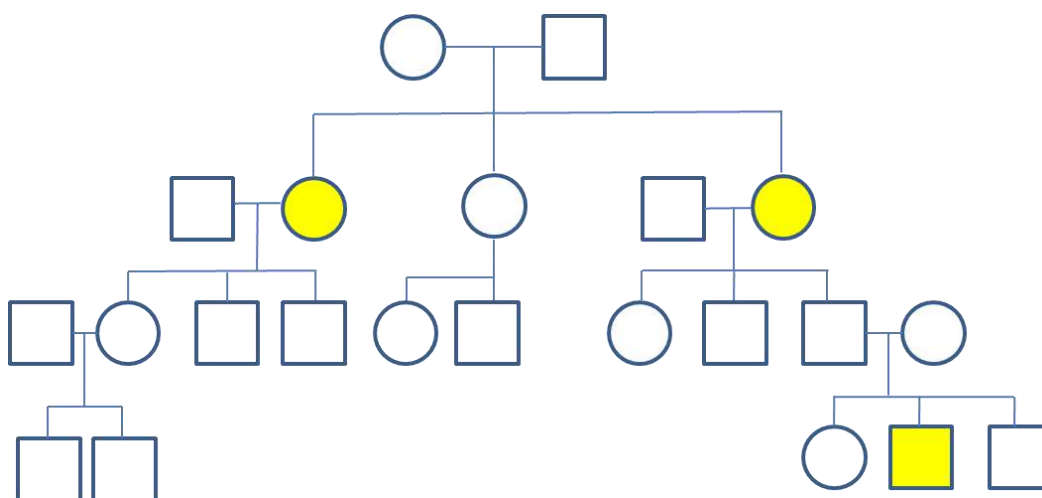
- dominantne osobine ne preskaču generacije;
- autosomne osobine imaju ravnomjernu (homogenu) distribuciju po spolovima;
- bar je jedan roditelj aficirane osobe (osobe kod koje je osobina ispoljena) aficiran;
- u potomstvu recesivnih homozigota (neaficiranih) nema aficiranih;
- u potomstvu dva pouzdana heterozigota odnos fenotipova je 3 (dominantan) : 1 (recesivan).



Slika 1.7. Prikaz nasljeđivanja autosomno dominantnog svojstva

Autosomno nasljeđivanje recesivnih svojstava (slika 1.8) prepoznatljivo je po sljedećem:

- recesivne osobine ne moraju se javiti u svim generacijama, tj. mogu preskočiti jednu ili više generacija posmatranog genealoškog stabla te roditelji aficiranih osoba mogu biti neaficirani – asimptomatski nosioci recesivnog alela;
- ravnomjerna je distribucija po spolovima;
- svi su potomci oba aficirana roditelja aficirani;
- u potomstvu heterozigotnih roditelja odnos fenotipova je približno 3 (dominantan) : 1 (recesivan).



Slika 1.8. Prikaz nasljeđivanja autosomno recesivnog svojstva

Heterosomno nasljeđivanje – nasljeđivanje pod kontrolom heterosoma izrazito je kompleksno i još uvijek nepotpuno razjašnjeno, ali se većina autora slaže da se razlikuju *spolno vezano* i *spolno kontrolisano nasljeđivanje*. Spolno vezano nasljeđivanje odnosi se na pojavu da određene osobine kontrolišu geni smješteni na spolnim hromosomima, pri čemu razlikujemo *parcijalno (nekompletno)* i *kompletno spolno vezane osobine*.

Parcijalno spolno vezani geni nalaze se na homolognim regionima spolnih X i Y-hromosoma. Ovakvu prirodu nasljeđivanja imaju na primjer sljepilo za boje ili kožno oboljenje s malignim posljedicama – *xeroderma pigmentosum*. Kompletno spolno vezani geni prisutni su na nehomolognim dijelovima spolnih hromosoma, što određuje isključivo hemizigotnu genetičku konstituciju muških osoba za ove gene. *Holandrični* geni su Y-kompletno vezani geni pa je holandrično, kompletno Y-vezano nasljeđivanje isključivo svojstveno za muškarce, ali i izuzetno rijetko.

Spolno kontrolisano nasljeđivanje odnosi se na ulogu specifičnih produkata spolnih hromosoma u kontroli fenotipskog ispoljavanja autosomnih i heterosomnih gena, a razlikuju se *spolno uvjetovane* (npr. jedan alel u jednom spolu može biti dominantan, a u drugom recesivan) i *spolno ograničene osobine* koje se fenotipski ispoljavaju isključivo kod jednog spola (npr. razvijenost mliječnih žlijezda).

X-vezano dominantno nasljeđivanje dvostruko je više zastupljeno kod osoba ženskog spola. Ipak, zbog inaktivacije jednog od dva prisutna X-hromosoma u ženskom spolu, ekspresija ovih osobina u ženskom spolu rjeđa je nego kod muškaraca. Djeca aficiranih majki, bez obzira na spol, imaju 50% šanse da budu aficirana. Aficirani muškarci se javljaju samo u potomstvu aficirane majke, dok su sve kćerke aficiranog oca aficirane, a sinovi, s obzirom na to da od oca nasljeđuju Y-hromosom, nisu. Neaficirane kćerke su moguće jedino u potomstvu neaficiranog oca i neaficirane ili aficirane heterozigotne majke. U svojstva s ovim tipom nasljeđivanja spadaju na primjer ginekomastija, manijačno-depresivna psihoza i noćno sljepilo.

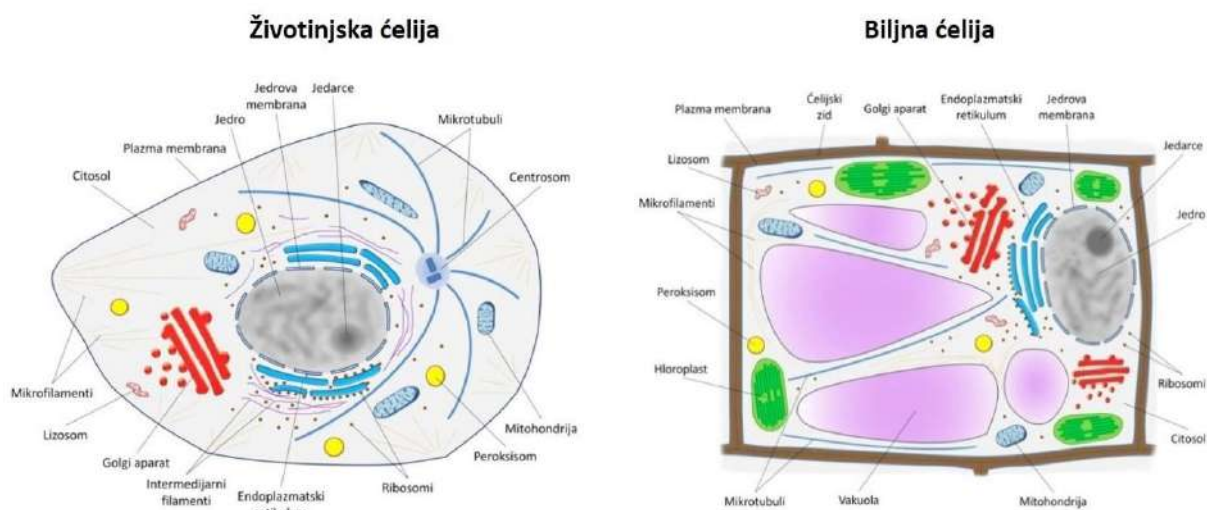
X-vezano recesivno nasljeđivanje primarno se prepoznaje po izrazito većoj učestalosti među muškarcima. Osobine koje dolaze do izražaja pod uticajem ovog tipa nasljeđivanja su na primjer deficitarno viđenje crvene i zelene boje ili mišićne distrofije (*Duchenne* i *Becker* tipa).

Domen Eukarya odnosno nadcarstvo Eucaryotae obuhvata jednoćelijske i višećelijske organizme koji su distribuirani u preostala četiri carstva: *Protista* (jednoćelijske eukariote), *Plantae* (biljke), *Fungi* (gljive) i *Animalia* (životinje).

Unutar eukariota postoje strukturne, pa samim tim i funkcionalne razlike između biljnih i životinjskih ćelija (slika 1.9). Biljne ćelije sadrže plastide, organele u koje, između ostalih, spadaju i hloroplasti u kojima se odvija proces fotosinteze, ćelijski zid koji doprinosi čvrstoći biljnih ćelija i biljaka općenito te biljnu vakuolu specifičnu samo za biljne ćelije.

Tabela 1.1. Komparativni prikaz osnovnih karakteristika prokariotskih i eukariotskih ćelija

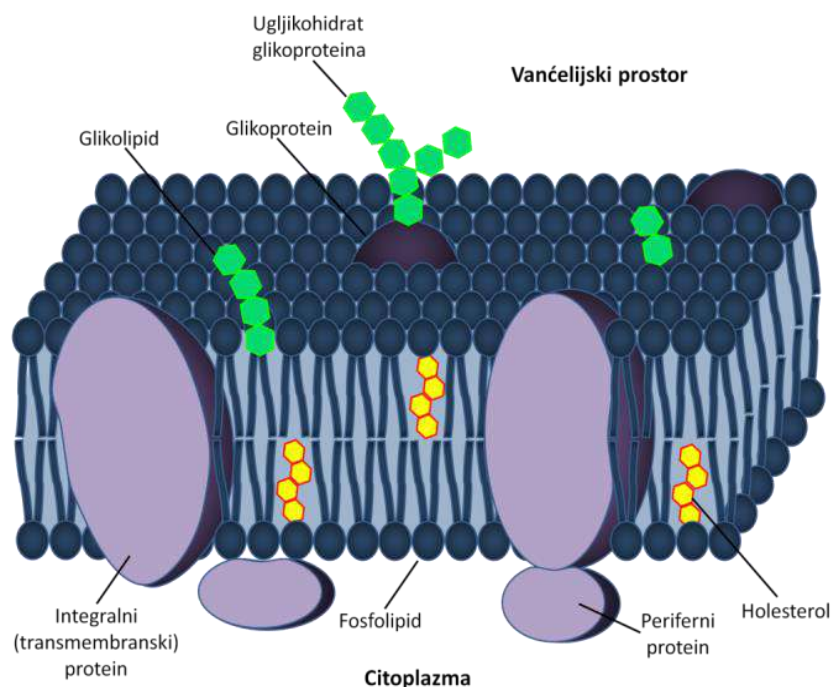
	PROKARIOTI	EUKARIOTI
Organizmi	Arheobakterije	Jednoćelijski eukarioti
	Eubakterije	Biljke
	Cijanobakterije	Gljive Životinje
Veličina	0,1–5 μm	5–100 μm
DNK	Prstenasta u nukleoidu	Linearna
Ribosomi	Brojni u citoplazmi, 70 S	Na granuliranom endoplazmatskom retikulumu, 80 S
Ćelijski zid	Kompleksan, prisutan kod svih prokariota	Jednostavan, prisutan kod biljaka i gljiva
Citoskelet	Nemaju	Prisutan
Tip diobe	Binarna fizija (prosta dioba)	Mitoza i mejoza



Slika 1.9. Šematski prikaz životinjske i biljne ćelije

1.2.1 Čelijske membrane

Biološke membrane su strukture koje karakteriziraju sve ćelije u živom svijetu. Plazmamembrana (ćelijska membrana) je sofisticirana dinamička i fleksibilna struktura koja određuje oblik i veličinu svake ćelije, ali i omogućava njenu funkcionalnost. Plazmamembrana obavlja unutrašnji sadržaj ćelije koji se naziva protoplazma (citoplazma – citosol s organelama i jedro) i predstavlja prvi kontakt ćelije s okruženjem, ali i kontrolnu tačku interakcija između ćelijskog sadržaja i vanjske sredine. Omogućava kontrolisani prijenos materije i energije, prijem i provođenje signala iz spoljašnje sredine te predstavlja mjesto fiksiranja elemenata citoskeleta ili ekstracelularnog matriksa. Čelijska membrana je građena od lipidnog dvosloja, kao osnovne membranske komponente, u koji su bilateralno, periferno, ali asimetrično, ili integralno uronjeni proteini (model tečnog mozaika) te s lipidima i proteinima povezani ugljikohidrati na vanjskoj površini (slika 1.10).



Slika 1.10. Građa plazmamembrane

Lipidni dvosloj je primarno građen od molekula fosfolipida koje su amfipatične, tj. imaju i hidrofilna i lipofilna svojstva. Hidrofilnim, polarnim krajevima (glavama) su okrenute prema citosolu i ekstracelularnom matriksu, a hidrofobni, nepolarni krajevi (repovi) su u unutrašnjosti membrane. U membranama su pored fosfolipida zastupljene i druge lipidne molekule poput holesterola i glikolipida. Lipidni dvosloj, poznat kao lipidni matriks, predstavlja fluidnu sredinu koja je esencijalna za membransku funkcionalnost, a direktno je zavisna od temperature i lipidnog sastava, kao i od sastava masnih kiselina. Za većinu specifičnih funkcija plazmamembrane odgovorni su u njoj prisutni proteini (integralni, transmembranski), u formi čistih proteina, glikoproteina i proteoglikana, koji služe kao enzimi, receptori, transportne, signalne ili adhezivne molekule. Ugljikohidrati su zastupljeni samo na ekstracelularnoj površini plazmamembrane. Kovalentno su vezani za proteine ili za lipide membrane te su zastupljeni u formi glikoproteina (kratki razgranati oligosaharidni lanci povezani s proteinom), proteoglikana (nerazgranati polisaharidi povezani s proteinom) i glikolipida (oligosaharid vezan za lipid).

1.2.1.1 *Transport kroz ćelijsku membranu*

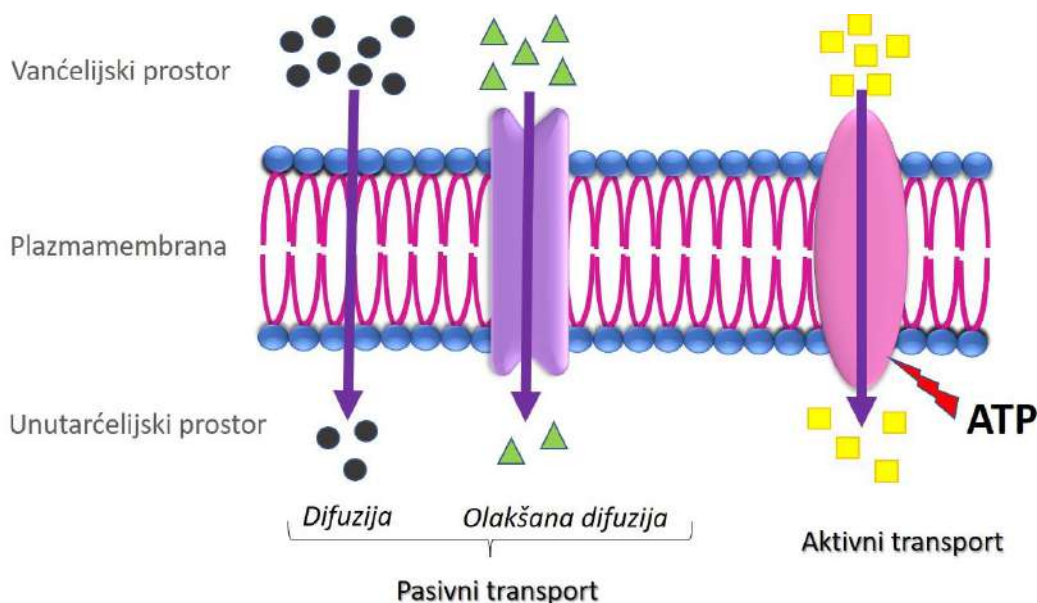
Građa plazmamembrane omogućava da kroz nju nesmetano, difuzijom,¹ prolaze samo male nenaelektrisane molekule (O_2 , CO_2 , H_2O) i ioni, što znači da je membrana selektivno (semi) propustljiva (permeabilna) struktura. Za transport većih nenaelektrisanih molekula kao što je glukoza ili naelektrisanih iona potrebna je aktivnost specifičnih transmembranskih proteina – proteinskih nosača (npr. transport glukoze) i proteinskih kanala (npr. ionski kanali koji se selektivno otvaraju i zatvaraju u skladu s vanćelijskim signalima ili akvaporini koji transportuju u vodi otopljene materije) koji djeluju na principu konformacijskih promjena, kao i enzimi. Transport niz elektrohemijski gradijent, tj. s mjesta veće prema mjestu niže koncentracije transportovanih molekula, ne zahtijeva utrošak energije te se naziva *pasivnim* transportom. U ovaj vid transporta spadaju prosta i olakšana difuzija (slika 1.11).

Prosta difuzija je kretanje liposolubilnih molekula kroz lipidni matriks. Ovim vidom transporta kroz membranu prolaze O_2 , CO_2 , N_2 , masne kiseline i derivati holesterola (steroidni hormoni), hidrofobne molekule poput benzena te nenaelektrisane polarne molekule (voda, etanol, urea).

¹ Difuzija – spontano kretanje čestica iz područja veće koncentracije u područje manje koncentracije.

Olakšana difuzija uključuje aktivnost transmembranskih proteina, čime je transportovani materijal zaštićen od kontakta s hidrofobnim dijelom lipidnog matriksa, a na ritmičnost promjene konformacije proteinskog nosača tokom transporta molekula ne utiče popunjenost veznih mjesta na proteinskom nosaču. Na ovaj način kroz membranu prolaze aminokiseline, monosaharidi, nukleotidi, anorganski ioni (npr. Na, Ca, K).

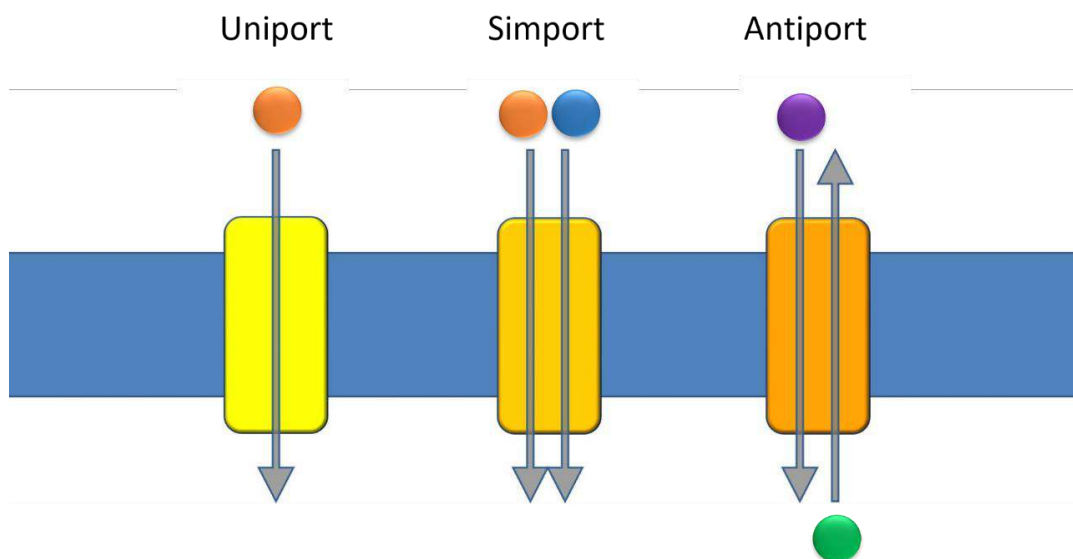
Osmoza je difuzija vode, tj. kretanje molekula rastvarača s mjesta manje ka mjestu veće koncentracije rastvorene tvari kroz semipermeabilnu membranu u cilju izjednačavanja koncentracija.



Slika 1.11. Transport molekula kroz plazmamembranu

Kada je transport nasuprot elektrohemijском gradijentu, za njegovo savladavanje je potrebna energija pa govorimo o *aktivnom* transportu. Energija za aktivni transport obezbjeđuje se ili u reakciji hidrolize ATP-a (adenozin-trifosfata), kada je riječ o *primarnom* aktivnom transportu (npr. transport Na i K iona tzv. Na/K pumpom) ili koristeći energiju transporta neke druge molekule (npr. gradijenta Na iona uspostavljenog radom Na/K pumpe), što se smatra *sekundarnim* aktivnim transportom. Aktivni transport isključivo se odvija preko proteinskih nosača koji funkciju obavljaju samo kada su sva vezna mjesta za transport molekula određenog oblika i veličine popunjena (slika 1.12).

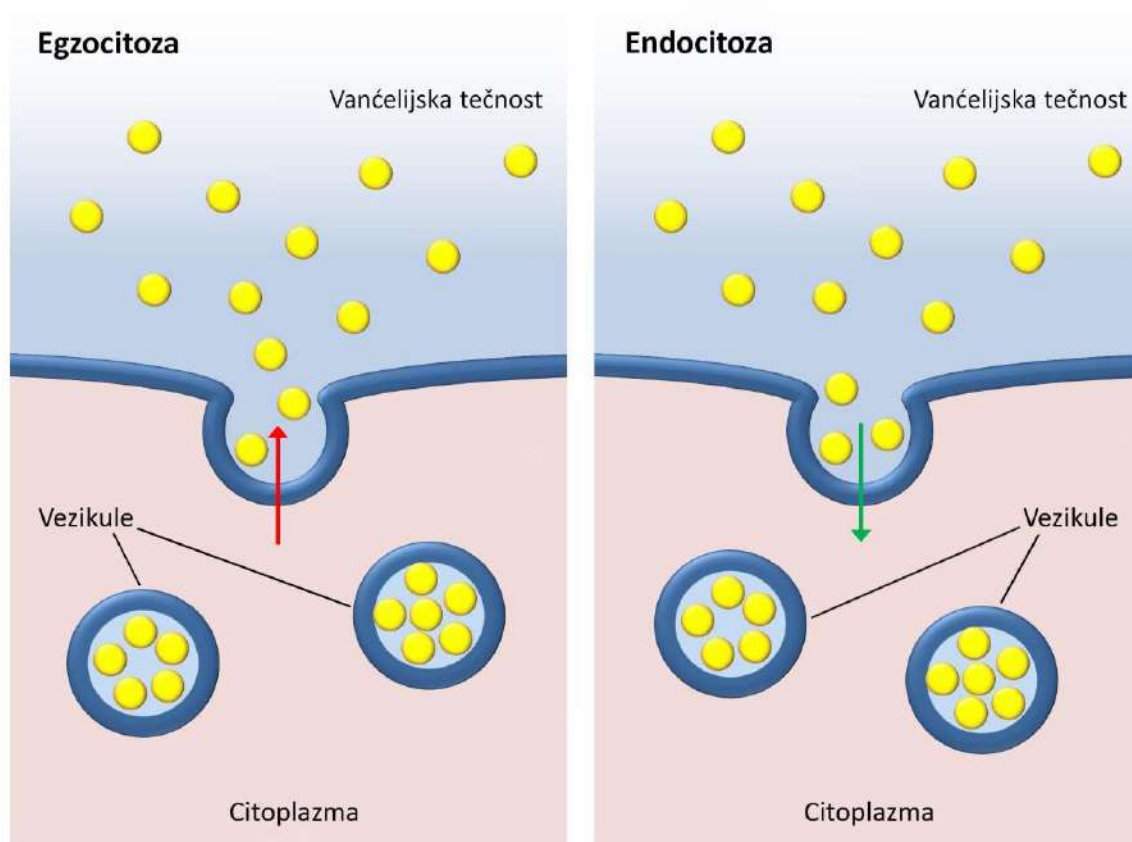
Prema smjeru djelovanja i kapacitetu proteinskih nosača razlikuju se tri tipa aktivnog transporta: *uniport* (transport samo jedne vrste molekula uvijek u istom smjeru), *simport* (istosmjerni simultani transport dvije molekule) i *antiport* (transport dvije supstance, ali u suprotnom smjeru).



Slika 1.12. Tri tipa aktivnog transporta prema smjeru i kapacitetu proteinskih nosača

Transport makromolekula kroz ćelijsku membranu odvija se različitim specifičnim procesima. *Endocitoza* je proces ulaska u ćeliju proteina, nukleinskih kiselina, bakterija i virusa ili njihovih dijelova. Tokom endocitoze membrana tvori invaginaciju koja najprije obuhvati transportovanu materiju, a zatim membranom okružena materija ulazi u ćeliju u formi endocitotičke vezikule (slika 1.13). Razlikuju se dva tipa endocitoze: *fagocitoza* (odnosi se na transport velikih čestica i karakteristika je nekih ameba i fagocita, tj. makrofaga i neutrofilnih granulocita) i *pinocitoza* (odnosi se na transport manjih u vodi topivih ćelija, a odvija se u svim ćelijama).

Egzocitoza, s druge strane, predstavlja procese kojima veće molekule napuštaju ćeliju (slika 1.13). Razlikuju se *konstitutivna* i *regulisana* egzocitoza. Konstitutivna egzocitoza se odvija kontinuirano, a membrana koja okružuje transportovani sadržaj postaje dijelom plazmamembrane. Regulisana egzocitoza dešava se tek pod djelovanjem određenog specifičnog stimulusa (hormon, enzim, neurotransmiter i sl.). Ovaj tip transporta karakterističan je za ćelije endokrinog i nervnog sistema.

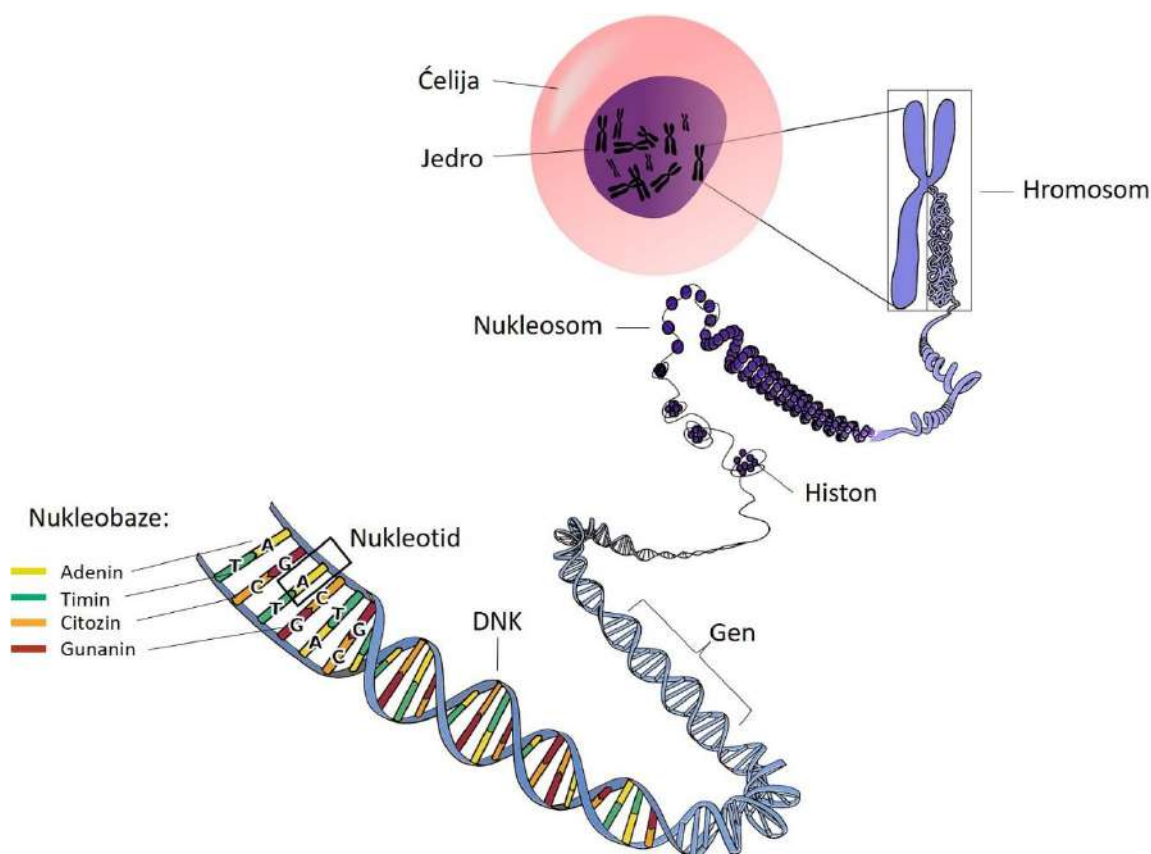


Slika 1.13. Egzocitoza i endocitoza

1.2.2 Jedro (nukleus)

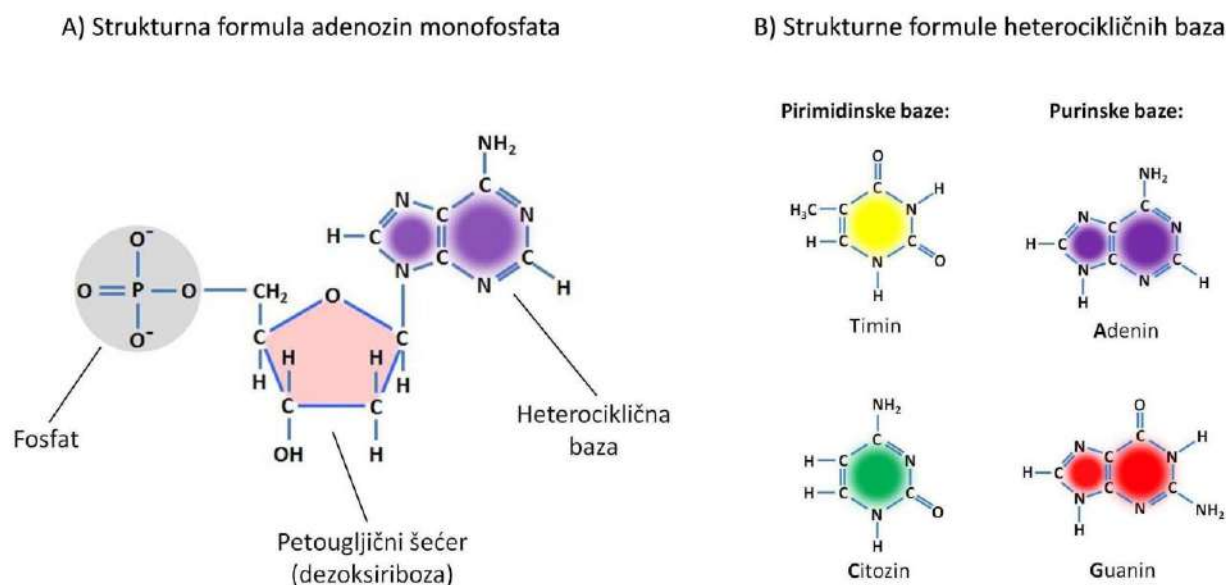
Jedro je jedna od glavnih struktura eukariotskih ćelija i prisutno je u gotovo svim eukariotskim ćelijama (izuzetak su npr. zreli eritrociti sisara koji su sekundarno izgubili jedro), a gubitak jedra brzo dovodi do smrti ćelije. Najveći broj ćelija sadrži jedno jedro (mononukleusne ćelije), obično sfernog oblika, čija veličina varira u zavisnosti od tipa ćelije i njene aktivnosti. Jedro je obavijeno s dvije lipidne membrane između kojih je perinukleusni prostor. Vanjska membrana se nastavlja na membranu granuliranog endoplazmatskog retikuluma, a za unutrašnju membranu su vezani enzimi koji učestvuju u replikaciji DNK. Ova dvostruka jedarna ovojnica naziva se i karioteka ili kariomembrana. Na njoj se nalaze nukleusne pore koje omogućuju prolaz malih i molekula srednje veličine. Uz unutrašnju površinu karioteke proteže se jedarna lamina, mreža citoskeleta građena od intermedijarnih filamenata, koja daje potporu jedru. Jedarca (nukleolusi) su strukture unutar jedra u kojima se sintetizira rRNK, a formiraju se oko genetičkih lokusa – regiona organizatora

nukleolusa (engl. *Nucleolar Organizing Regions* – NORs), koje čine tandemska ponavljanja gena rRNK. U humanom genomu, ovi regioni su locirani na drškama satelita hromosoma D i G grupe. U jednom jedru može biti prisutno jedno ili više jedaraca, a jasno se mogu uočiti tokom interfaze, dok se početkom ćelijske diobe dezorganizuju. Jedarna se membrana također početkom diobe razgrađuje da bi se nakon diobe ponovo formirala. Unutrašnjost jedra ispunjena je jedarnim sokom (nukleoplazmom ili karioplazmom) u kojem se nalaze genetički materijal u formi hromosoma i jedarca. Hromosome izgrađuje nukleoproteinska komponenta jedra koja ispoljava afinitet prema bojenju te se zbog toga naziva hromatin. Molekule DNK u jedru ne egzistiraju samostalno, već s proteinima (nukleoproteinski kompleks), višestrukim sabijanjem, spiralizacijom i kondenzacijom formiraju više nivo organizacije genetičkog materijala – *hromosome*. Hromosomi (grč. *hroma* – boja, *soma* – tijelo) nakon bojenja specifičnim bojama u određenim fazama ćelijskog ciklusa, pod mikroskopom se uočavaju kao obojena štapićasta tjelašca (slika 1.14).



Slika 1.14. Kondenzacija DNK i formiranje metafaznog hromosoma

Grativni materijal hromosoma – *hromatin* kompleks je koji se sastoji od DNK, proteina (histonskih i nehistonskih) i RNK. Prema intenzitetu bojenja, razlikuju se *heterohromatin* (kondenzovan i tamnije obojen) i *euhromatin* (difuzan i svjetlije obojen). Iako se interfazni hromosomi ne vide pod mikroskopom, u jedru somatske ćelije čovjeka DNK sadrži približno šest milijardi parova baza (pb) raspoređenih u 46 hromosoma (po 23 naslijeđena od svakog roditelja). Molekulu DNK čine dva helikoidno uvijena polinukleotidna lanca međusobno povezana vodikovim vezama između komplementarnih baza. Svaki nukleotid u lancu građen je od petougličnog šećera (dezoksiriboza), fosfata (orto-fosfatna kiselina) i azotne, heterociklične baze (adenin – A, timin – T, guanin – G i citozin – C) (slika 1.15). Adenin i guanin su purinske baze, dok su citozin i timin (uracil umjesto timina u molekuli RNK) pirimidinske baze. Svaki bazni par sastoji se od jednog purina i jednog pirimidina, tako da je vezanje baza specifično: A–T i G–C. Dva lanca DNK međusobno su antiparalelna, odnosno 5' kraj jednog lanca nalazi se naspram 3' kraja drugog lanca. Po jedna linearna molekula DNK je u svakom hromosomu u interfaznom jedru, a broj i raspored heterocikličnih baza u polinukleotidnim lancima molekule DNK karakteristični su za svaki hromosom.



Slika 1.15. Građa nukleotida s formulama pirimidinskih i purinskih baza

RNK je u hromatinu uglavnom privremeni konstituent kao produkt transkripcije. U manjim količinama prisutna je i *hromosomska RNK (hRNK)* kao stalni sastavni dio hromatina kod organizama na višem stupnju evolucijskog razvoja. U kompleksu sa specifičnim proteinom za koji se veže (kompleks hRNK-protein) ima ulogu u strukturiranju hromosoma. Hromosomska RNK je za molekulu DNK vezana na mjestu repetitivnih sekvenci.

Proteini hromatina omogućavaju sabijanje molekule DNK duge približno 174 cm (promjera oko 2 nm) i njeno pakovanje u hromosome sadržane u ćelijskom jedru prečnika 5–10 µm. *Histoni*, bazni, elektropozitivni proteini bogati aminokiselinama lizinom i argininom, prisutni su kod svih viših eukariota u količinama ekvivalentnim količini DNK.

U sastav hromatina ulazi pet tipova histona: H1, H2A, H2B, H3 i H4. Evolucijski su konzervirani i slični u gotovo svim ćelijama eukariota različitih vrsta (u spermatozoidima se umjesto histona nalaze mali bazni proteini – *protamini*). Njihova glavna funkcija je kontrola kondenzacije i dekonenzacije, odnosno sabijanje i relaksiranje duge molekule DNK u hromosomima. Ova kontrola se bazira na intenzivnim procesima modifikacija histona, koji uključuju acetilaciju, metilaciju i fosforilaciju. Tako modificirani histoni predstavljaju nespecifične regulatore aktivnosti gena. U maksimalno kondenzovanom hromatinu, DNK je neaktivna.

Nehistonski proteini hromatina su heterogena i brojna grupa koju čini 40–80 različitih kiselih proteina. Za razliku od histonskih, sastav nehistonskih proteina varira ne samo između različitih vrsta već i u ćelijama organizama iste vrste, kao i u ćelijama različitih tkiva istog organizma. Neki od ovih proteina su strukturni elementi hromatina koji pomažu oblikovanje metafaznih hromosoma tokom ćelijske diobe jer formiraju centralni proteinski skelet hromosoma. Ostali nehistonski proteini su funkcionalne komponente hromatina: enzimi replikacije, reparacije, transkripcije, modifikatori histona, regulatorni proteini – specifični regulatori aktivnosti gena.

Kod eukariota, replikacija molekule DNK odvija se u jedru. Iako je riječ o složenijem genomu s većim brojem gena raspoređenih na većem broju molekula DNK, odnosno hromosoma, replikacija se kod eukariota odvija po jednakim molekularnim principima kao kod prokariota.

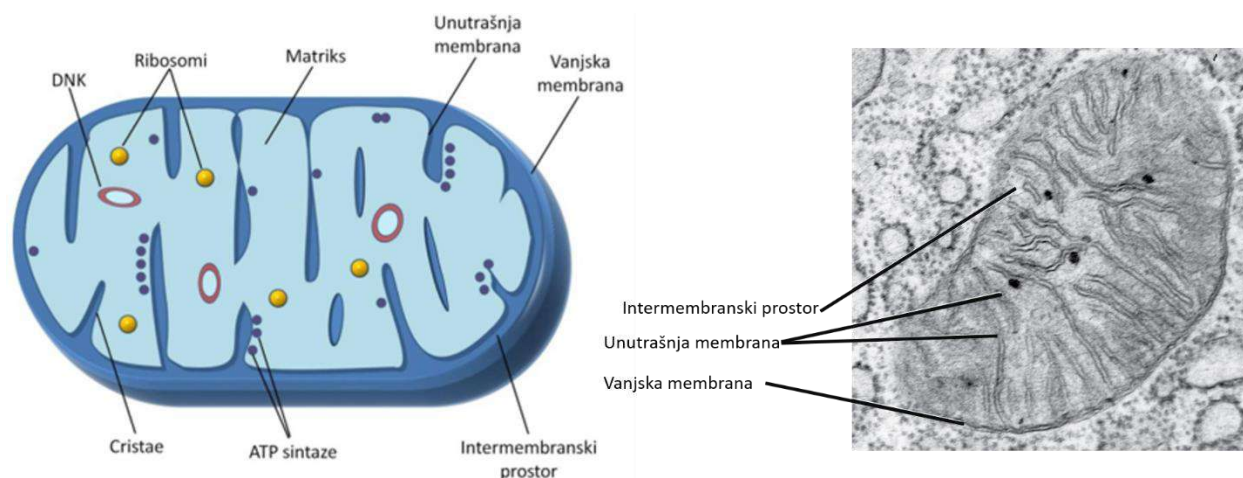
1.2.3 Endomembranski ćelijski sistem

Endomembranski ćelijski sistem čine membranom ograničene citoplazmatske organele, fizički povezane membranama ili malim prijenosnim membranskim segmentima – vezikulama (membranskim vrećicama). Uglavnom ne funkcionišu zasebno, nego su zajedno uključene u procese sinteze, skladištenja i transporta različitih molekula.

1.2.4 Mitohondrije

Mitohondrije su organele prisutne u ćelijama biljaka, životinja i aerobnih protista. To su strukture koje sadrže vlastiti genetički materijal i reprodukuju se nezavisno od jedra. Mitohondrije su najčešće ovalne do cilindrične, nalaze se u svim tipovima ćelija i može ih biti do 2000 po ćeliji, zavisno od funkcije i metaboličke aktivnosti ćelije, pa im je broj veći što je veća metabolička funkcija ćelije (npr. mišićne ćelije imaju veliki broj mitohondrija). Nemaju stalnu poziciju, tj. nasumično su rasute u citoplazmi i mogu biti grupisane u područjima oko jedra ili uz plazmamembranu. Mitohondrija je obavijena dvjema lipoproteinskim membranama. Vanjska membrana je zategnuta i glatka. Unutrašnja je naborana i formira mitohondrijske nabore (lat. *cristae mitochondriales*), koji se pružaju prema unutrašnjosti. Zbog naboranosti, površina unutrašnje membrane je povećana. Na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani, a prema matriksu, smještene su globularne molekule enzima ATP-sintaza koje su uključene u proizvodnju hemijske energije, što je centralna funkcija mitohondrija. Naborima unutrašnje membrane povećan je i kapacitet mitohondrija za proizvodnju hemijske energije. Između vanjske i unutrašnje membrane mitohondrija je intermembranski prostor. Unutrašnjost mitohondrija ispunjena je matriksom u kojem se nalaze stotine različitih enzima, mitohondrijski ribosomi na kojima se kod eukariota sintetiziraju neki proteini, tRNK, nekoliko kopija *mitohondrijske DNK (mtDNK)* i granule koje održavaju optimalnu koncentraciju kalcija i drugih dvovalentnih iona u citosolu. Građa mitohondrije prikazana je na slici 1.16.

Mitohondrijska DNK je prstenasta, dvolančana molekula bez histona i asociranih proteina. Kod nekih vrsta nižih eukariota kao što su kvasci nađena je linearna mtDNK. Veličina mtDNK je obično 16–18 kb, dok se njena veličina kod biljaka kreće od 100 kb do 2,5 Mb. U svakoj organeli je prisutan veći broj kopija mtDNK, koji također može značajno varirati. U mitohondrijskoj DNK zabilježeni su slučajevi odstupanja od standardnog genetičkog koda.



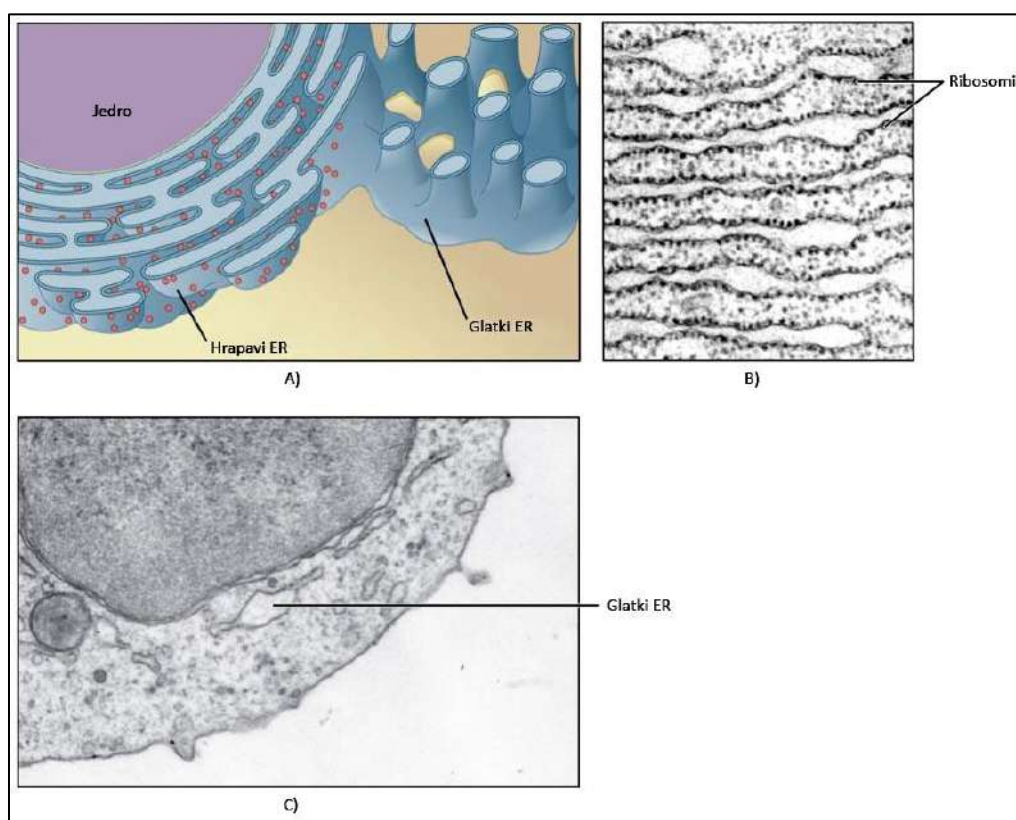
Slika 1.16. Šematski prikaz građe mitohondrija (lijevo) i slika pod elektronskim mikroskopom i uvećanjem 236.000x (desno)

Većina mutacija u mtDNK rezultira nastankom degenerativnih poremećaja, uglavnom mozga i mišića, ali s obzirom na esencijalnu ulogu mitohondrija u ćelijskoj proizvodnji ATP-a, efekti ovih mutacija mogu biti ozbiljni. Normalno je stanje *homoplazmije* – kada su sve kopije mtDNK u ćeliji identične. S druge strane, *heteroplazmiju* karakterizira postojanje mutiranih i normalnih molekula mtDNK u istoj ćeliji, a od njihovog međusobnog odnosa zavisi vrsta i ozbiljnost uočljivih simptoma za određeno oboljenje, odnosno mutaciju mtDNK. U mitohondrijama se odvija ćelijska respiracija, odnosno oksidacija hranljivih materija i generiranje energije u formi ATP-a, tzv. *oksidativna fosforilacija*. U mitohondrijama animalnih ćelija se u procesu ćelijskog disanja proizvede i do 95% ATP-a. *Ćelijska respiracija* je proces koji se sastoji od slijeda hemijskih reakcija koje uključuju fosforilaciju adenzin-difosfata (ADP) dodavanjem fosfatne grupe: $ADP + P = ATP$. Ćelijska respiracija se odvija u tri faze:

1. Glikoliza – razlaganje glukoze na dvije molekule piruvata, odvija se u citoplazmi;
2. Citratni ciklus – završava se razlaganje glukoze, oslobađa se CO_2 , oslobađanje elektrona neophodnih za treću fazu odvija se u mitohondrijama;
3. Oksidativna fosforilacija – niz kaskadnih hemijskih reakcija respiracijskog lanca kojima elektroni s vodika prelaze na kisik (aktivacija kisika). Iako se i u prethodne dvije faze ćelijske respiracije vrši sinteza ATP-a, u respiracijskom lancu se odvija proizvodnja najvećih količina ATP-a.

1.2.5 Endoplazmatski retikulum

Endoplazmatski retikulum je organela koja spada među najveće u većini eukariotskih ćelija, a sačinjen je od sistema povezanih izuvijanih kanala (cjevastog ili pljosnatog poprečnog presjeka), ograničenih dvoslojnom lipoproteinskom membranom. Lokaliziran je u citoplazmi, kontinuirano se nastavlja na nukleusnu membranu i pruža do površine ćelije (slika 1.17). Membrana endoplazmatskog retikuluma čini više od 50% ukupnih membrana i oko 10% od ukupnog volumena ćelije.



Slika 1.17. Endoplazmatski retikulum: A – šematski prikaz hrapavog i glatkog ER, B – hrapavi ER sa brojnim ribosomima pod elektronskim mikroskopom (uvećanje 110.000x), C – glatki ER (EM, uvećanje 110.500x)

U većini ćelija prisutne su dvije forme ove organele: agranulirani (glatki, SER – *Smooth Endoplasmic Reticulum*) i granulirani (hrapavi, RER – *Rough Endoplasmic Reticulum*) endoplazmatski retikulum.

Molekularna konstitucija obje forme endoplazmatskog retikuluma gotovo je identična i komunikacija između njih je slobodna. U većini ćelija je više zastupljena hrapava forma s izuzetkom žljezdanih ćelija kore nadbubrega, endokrinih ćelija spolnih žlijezda i hepatocita.

Agranulirani endoplazmatski retikulum ima membranu u kojoj se nalaze mnogobrojni enzimi uključeni u biosintezu lipida, uključujući masne kiseline, fosfolipide i steroide. Ima značajnu ulogu u ćelijama jetre u procesu oksidacije i detoksikacije stranih agenasa – ksenobiotika (npr. lijekova), kao i u metabolizmu ugljikohidrata (razgradnja glikogena). Poseban oblik agranuliranog endoplazmatskog retikuluma u ćelijama glatkih i poprečnoprugastih mišića – sarkoplazmatski retikulum, služi za skladištenje i otpuštanje iona kalcija, koji su neophodni za mišićnu kontrakciju.

Granulirani endoplazmatski retikulum karakterizira prisustvo velikog broja ribosoma na njegovoj površini, što mu (na elektronskom mikroskopu) daje hrapav izgled. S obzirom na specifičnu funkciju ribosoma, ova forma endoplazmatskog retikuluma je karakteristična za ćelije u kojima se odvija intenzivna biosinteza proteina. Ribosomi učestvuju u sintezi proteina namijenjenih sekreciji iz ćelije (inzulin, proteini plazme, proteini mlijeka) kao i građivnih proteina plazmamembrane i određenih organela.

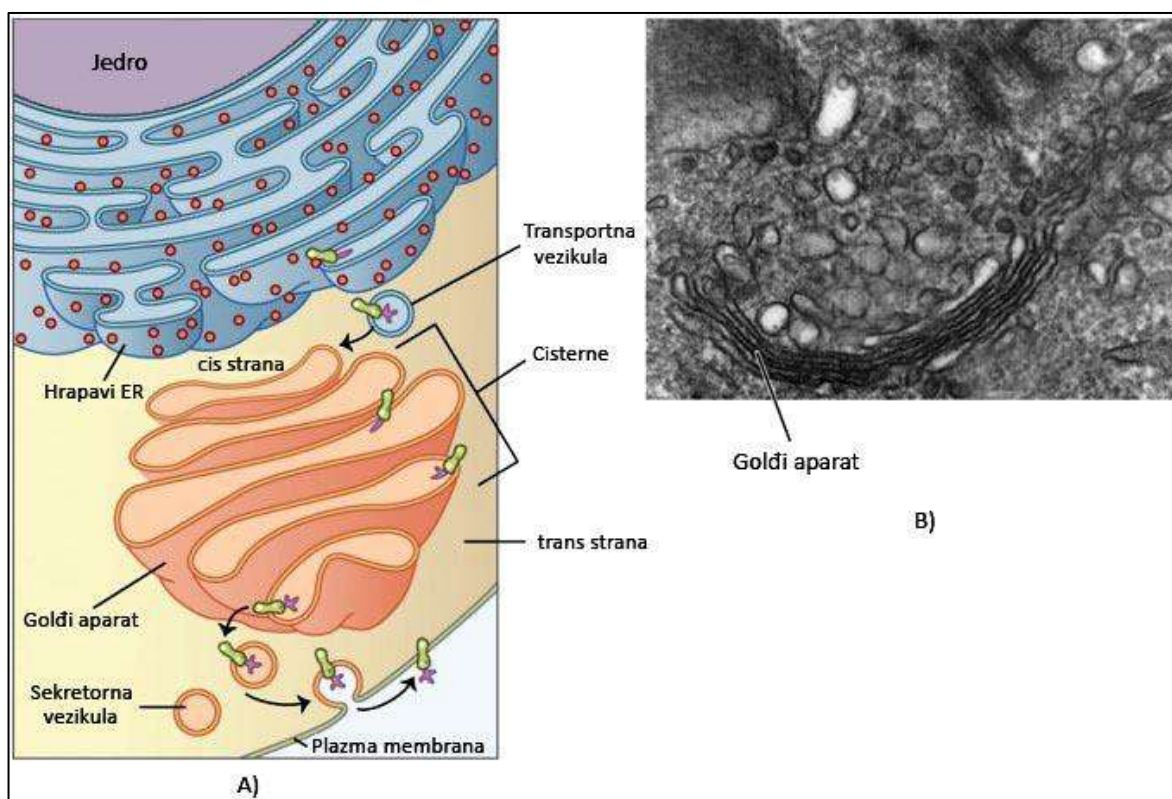
Osim proteina plazmamembrane koji se inicijalno ugrađuju u membranu hrapavog endoplazmatskog retikuluma, svi ostali novosintetizirani se proteini prenose u lumen hrapavog endoplazmatskog retikuluma gdje se modificiraju, uglavnom procesom glikozilacije. U granuliranom endoplazmatskom retikulumu proteini se savijaju u trodimenzionalni oblik i vrši se integracija multimernih proteina, kao i uklanjanje loše savijenih ili sklopljenih proteina. Lipidi i proteini koji su sintetizirani na hrapavom endoplazmatskom retikulumu, transportnim vezikulama se prenose do Goldžijevog kompleksa.

1.2.6 Goldžijev aparat

Goldžijev aparat ili Goldžijev kompleks, nazvan po Camillu Golgiju (1843–1926), kompleksna je organela sastavljena od diktiosoma, strukturnih i funkcijskih jedinica, koje čini 4–8 spljoštenih i paralelnih cisterni obavijenih membranama (slika 1.18). Tipičan Goldžijev aparat humanih ćelija čini od nekoliko do 100 ovakvih nakupina, a njihov broj zavisi od sekretorne aktivnosti ćelije. U Goldžijevom aparatu se modificiraju, dorađuju, sortiraju i pakuju molekule za sekreciju (procesom

egzocitoze) ili unutarćelijsku upotrebu. Makromolekule koje se modificiraju u Goldžijevom aparatu (proteini i lipidi) dopremaju se transportnim vezikulama.

Moguće modifikacije molekula u Goldžijevom aparatu su fosforilacija (dodavanje fosfora), glikozilacija (dodavanje ugljikohidrata), sulfacija (dodavanje sumpora), sinteza složenih polisaharida koji s proteinima sintetiziranim u granuliranom endoplazmatskom retikulumu formiraju proteoglikane. Modificirane molekule se iz Goldžijevog aparata, upakovane u vezikule koje nastaju sazrijevanjem cisterni, transportuju prema krajnjim odredištima: lizosomima, plazmamembrani ili vanćelijskom prostoru.



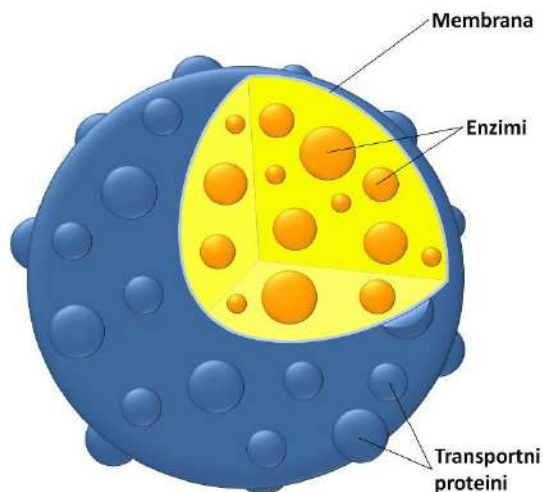
Slika 1.18. Goldžijev aparat: A – šematski prikaz građe i funkcije Goldžijevog aparata, B – slika Goldžijevog aparata pod elektronskim mikroskopom (uvećanje 110.000x)

Razlikuju se tri tipa Goldžijevih vezikula: lizosomske, egzocitotne i sekretorne. Lizosomske vezikule nose strukturne komponente lizosoma i proteine namijenjene degradaciji u lizosomima. Egzocitotne vezikule nose proteine namijenjene ekstracelularnoj upotrebi, a napuštaju ćeliju

procesom konstitutivne sekrecije koja se odvija konstantno i bez vanjskog podražaja. Sekretorne vezikule također nose proteine namijenjene ekstracelularnoj upotrebi, ali napuštaju ćeliju procesom regulirane sekrecije za koju je potreban signal (npr. neurotransmiteri).

1.2.7 Lizosomi

Lizosomi (grč. *lisis* – digestija; *soma* – tijelo) male su mjehuraste organele koje mogu imati različit oblik u zavisnosti od svog sadržaja (slika 1.19). Formiraju se pupanjem cisterni Goldžijevog aparata, a ograničeni su dvoslojnom lipoproteinskom membranom i ispunjeni tečnim sadržajem s hidrolitičkim enzimima. Ovi hidrolitički enzimi (lipaze, amilaze, proteaze i nukleaze) sintetiziraju se u citoplazmi i endoplazmatskom retikulumu, odakle ulaze u lizosome. Unutrašnja sredina lizosoma je kisela ($\text{pH} = 5$), za razliku od blago alkalne reakcije citosola. Lizosomi predstavljaju centre digestije i recikliranja unutar ćelije, a digestirani produkti se iz lizosoma u citosol transportuju pomoću transmembranske permeaze. Veliki broj lizosoma prisutan je u hepatocitima i leukocitima.



Slika 1.19. Šematski prikaz građe lizosoma

Poremećaji funkcije lizosoma u ćelijama mogu uzrokovati pojavu ozbiljnih i rijetkih nasljednih oboljenja, koja se nazivaju bolesti lizosomnog skladištenja. Većina ovih oboljenja je fatalna u ranom djetinjstvu, jer se u ćelijama aficiranih osoba nakupljaju nerazgrađene supstance kao posljedica nedostajanja jednog ili više hidrolitičkih lizosomnih enzima.

1.2.8 Peroksisomi

Peroksisomi su male organele obavijene dvoslojnom membranom, koje izgledom (na elektronskom mikroskopu) podsjećaju na lizosome, ali se od njih razlikuju sastavom enzima. U peroksisomima se kao posljedica metaboličkih reakcija, generiraju visoko reaktivni slobodni radikali i vodikov peroksid. Funkcija peroksisoma vezana je za oksidaciju masnih kiselina s dugim repovima, razgradnju vodikovog peroksida, metabolizam azotnih jedinjenja, a učestvuju i u brojnim specifičnim funkcijama kod različitih organizama. Naročito su brojni u ćelijama jetre i bubrega gdje se vrši detoksikacija akumuliranih toksičnih materija.

1.2.9 Nemembranske strukture ćelije

1.2.9.1 Ribosomi

Ribosomi su male granule sfernog oblika. Promjera su 20 nm i mogu se vidjeti jedino pod elektronskim mikroskopom. Nalaze se slobodni u citoplazmi ili vezani za površinu vanjske membrane endoplazmatskog retikuluma kod eukariotskih ćelija. Nalaze se i u matriksu mitohondrija i stromi hloroplasta, ali tu su prokariotskog tipa. Ribosomi su građeni od kompleksa ribosomskih RNK (2/3) i proteina (1/3). Sastoje se od dvije podjedinice (velike i male), koje formiraju cjelovit ribosom jedino u toku sinteze proteina. Kod eukariota, obje podjedinice ribosoma se formiraju u nukleolusu, nakon čega kroz pore jedarne ovojnice dopijevaju u citoplazmu. Ribosomi se mogu udruživati u veće skupine – poliribosome.

Eukariotski ribosomi su, prema sedimentacijskom koeficijentu izraženom u Svedbergovim jedinicama (S), označeni kao 80S ribosomi. Čini ih velika 60S podjedinica (građena od 28S; 5,8S i 5S molekula rRNK) i mala 40S podjedinica s 18S rRNK. Za razliku od eukariotskih ribosoma, prokariotski ribosomi se talože sporije te su označeni kao 70S ribosomi. Kod viših biljaka u hloroplastima je umjesto 5,8S prisutna 4,5S rRNK. Osnovna funkcija ribosoma je biosinteza proteina. Ključnu ulogu u ovom procesu ima rRNK, dok pridruženi proteini imaju strukturnu ulogu. Ribosomi “čitajući” informaciju s iRNK učestvuju u sintezi polipeptidnog lanca dodajući aminokiseline od amino (NH₂) prema karboksilnom (COOH) kraju rastućeg polipeptidnog lanca.

1.2.9.2 Citoskelet

Citoskelet je mreža proteinskih vlakana različite debljine koja daje oblik i čvrstinu ćeliji, obezbjeđuje potporu ćelijskim strukturama te omogućava različite oblike ćelijskog kretanja i unutrašnjih fizioloških procesa (ćelijska dioba, transport materija i ćelijskih struktura unutar ćelije). Citoskelet je građen od tri tipa proteinskih struktura: mikrofilamenti, intermedijarni filamenti i mikrotubuli.

Mikrofilamenti su najtanja vlakna citoskeleta, promjera 7 nm. Građeni su od kontraktilnog proteina aktina, organizovanog u formi dvostruke spirale. Aktin je najzastupljeniji protein u eukariotskoj ćeliji. Mikrofilamenti formiraju trodimenzionalnu mrežu, koja se nalazi odmah ispod plazmamembrane i daje potporu ćeliji održavajući njen oblik. U mišićnim ćelijama (miofibrilima) mikrofilamenti se udružuju s još tanjim miozinskim filamentima te omogućuju kontrakcije ovih ćelija.

Intermedijarni filamenti su vlakna srednje debljine, promjera oko 10 nm. Građeni su od fibroznih proteina, koji formiraju končaste zavijene strukture. Imaju ulogu u dodatnom učvršćivanju ćelijskog oblika i pridržavanju nekih organela – jedro se obično održava na određenom mjestu u ćeliji uz pomoć intermedijarnih filamenata. Intermedijarni filamenti su jedini elementi citoskeleta prisutni u jedru, gdje uz unutarnju membranu grade mrežu – *jedarnu laminu*. Njihovo prisustvo varira u ćelijama različitih tkiva, a dominantna je njihova zastupljenost u ćelijama koje se odupiru mehaničkim pritiscima i deformacijama. Otkriveno je više vrsta intermedijarnih filamenata (u ljudskom genomu više od 70 gena kodira različite vrste proteina intermedijarnih filamenata) koji su svrstani u šest klasa.

Mikrotubuli su cjevasti elementi citoskeleta, ukupnog promjera oko 25 nm. To su polimeri α i β tubulinskih dimera. Mikrotubuli su uključeni u ćelijsku diobu, organizaciju intracelularnih struktura i transporta kao i cilijarno i flagelarno kretanje. Slično intermedijarnim filamentima, mikrotubuli pridržavaju određene organele, a djeluju i kao tračnice za kretanje organela kroz citoplazmu. Mikrotubuli diobenog vretena usmjeravaju kretanje hromosoma tokom ćelijskih dioba. Također su osnovna strukturna komponenta cilija i flagela. Cilije (treplje) i flagele (bičevi) končasti su lokomotorni izraštaji na površini nekih ćelija, a razlikuju se po funkciji i dužini. Flagele su duže i izvide kretnje slične pokretima biča, omogućujući na taj način kretanje čitavih ćelija

(npr. kretanje spermatozoida kroz reproduktivni trakt). Cilije su kraće i ima ih više na površini ćelije, a njihove kretnje su obično talasaste. Ovakvim pokretima omogućuju kretanje ekstracelularnih supstanci u jednom smjeru (npr. u respiratornom traktu). Osnovni plan građe i strukture cilija i flagela je isti. One predstavljaju izuzetno izdužene izraštaje plazmamembrane ispunjene citoplazmom u kojoj se nalazi posebno organizirana mikrotubularna struktura – aksonema, a u njihovoj osnovi, ispod površine plazmamembrane, nalazi se bazalno tijelo.

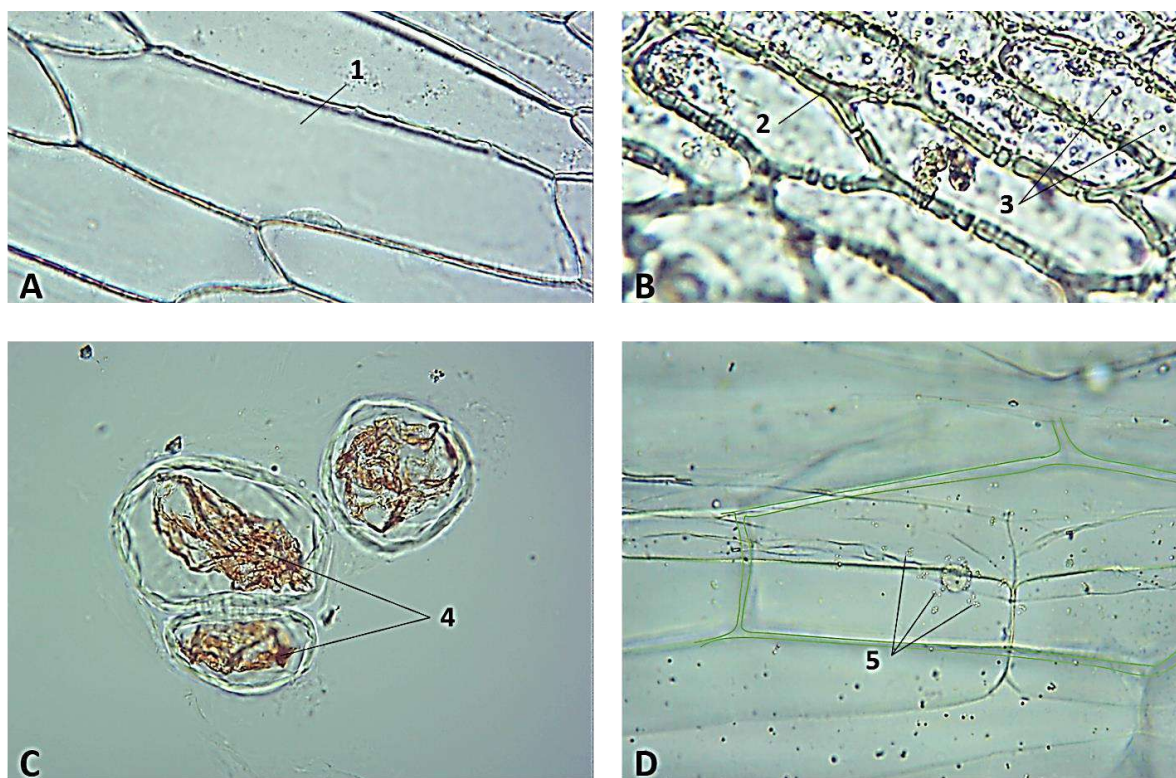
1.2.9.3 Centrosom

Centrosom predstavlja centar formiranja mikrotubula (diobenog vretena) i regulisanja ćelijskog ciklusa. Osim rijetkih izuzetaka, centrosomi se ne nalaze u ćelijama biljaka i gljiva kao ni u ljudskim jajnim ćelijama. Centrosomi su građeni od para ortogonalno postavljenih centriola (majčinska i kćerinska centriola) u centrosferi – regionu citoplazme s masom proteina koji se još naziva i pericentriolni materijal. Svaka ćelija sadrži jedan centrosom koji se replicira tokom S faze interfaze, tako da su tokom mitoze u jednoj ćeliji prisutna dva centrosoma, od kojih svaki predstavlja centar formiranja polovine diobenog vretena. Tokom profaze centrosomi migriraju na polove ćelije, a pošto se dupliciraju samo jednom tokom ćelijskog ciklusa, nakon citokineze svaka novonastala ćelija sadrži po jedan centrosom građen od dvije centriole.

1.2.10 Specifičnosti biljnih ćelija

Biljne ćelije, za razliku od životinjskih, karakterizira prisustvo biljne vakuole (slika 1.20. A), ćelijskog zida (slika 1.20. B) i plastida (slika 1.20. C i D) te odsustvo centrosoma. *Plastidi* su u biljnim ćelijama prisutni u različitim oblicima s različitim svojstvima i ulogama u ćeliji. Među plastidima se razlikuju hloroplasti, hromoplasti i leukoplasti. Proplastidi, od kojih vode porijeklo sve ostale forme plastida, prisutni su u mladim, nediferenciranim biljnim ćelijama. Unutrašnjost plastida naziva se *stroma*, a od citoplazme je odvojena dvjema membranama.

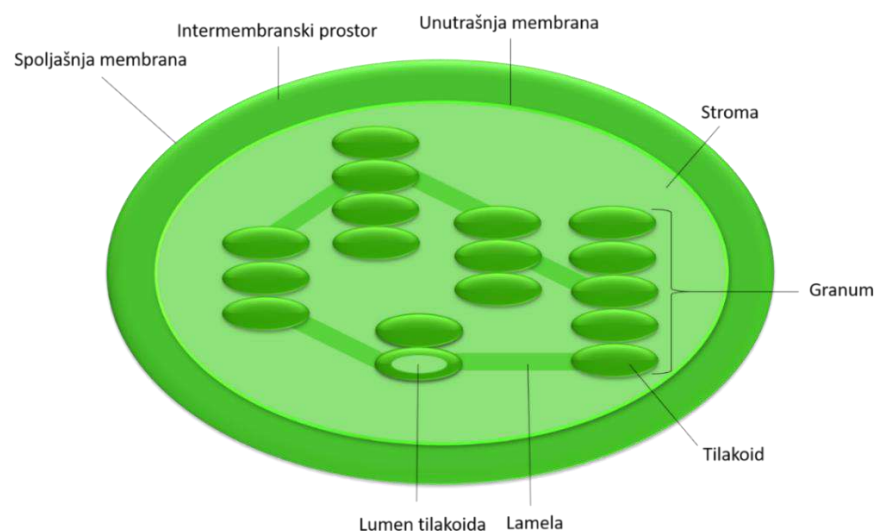
Hloroplasti su prisutni u ćelijama viših biljaka, nekih protozoa i algi. Broj i izgled hloroplasta varira u različitim ćelijama i kod različitih biljnih vrsta. Unutar hloroplasta nalaze se i specifične membranske strukture – *tilakoidi*, čiji se unutrašnji prostor naziva *lumen*. U takozvanim granalnim hloroplastima tilakoidi su mjestimično gusto naslagani jedan na drugi (i do 100 tilakoida), formirajući strukturu koja se naziva *granum* (slika 1.21).



Slika 1.20. Izgled biljnih ćelija pod svjetlosnim mikroskopom: A – ćelije vrste *Allium cepa* L. sa velikom vakuolom (1), B – ćelijski zid (2) i hloroplasti (3) na ćelijama vrste *Aspidistra* sp., C – hromoplasti (4) ćelija vrste *Rosa* sp., D – leukoplasti (5) kod ćelija vrste *Tradescantia* sp.

Membrane tilakoida su mjesta enzimskih kompleksa uključenih u proces fotosinteze. U hloroplastima su prisutne i molekule DNK, ribosomi (70S) te rezerve škroba i lipida. Tu se vrše procesi fotofosforilacije (sinteze ATP-a), biosinteze masnih kiselina, sinteze purina i pirimidina. Sintezu enzima uključenih u proces fotosinteze kodira hloroplastni genom. Obično se hloroplastni genom opisuje kao prstenasta dvolančana DNK veličine 120 do 160 kb, s oko 20–40 kopija po organeli, ali skorije studije ukazuju na to da je većina hloroplastnih DNK linearna te da je samo mala količina u prstenastoj formi.

Hromoplasti su različitih oblika, a boja im zavisi od prisutnih pigmenata koje kodiraju jedarni geni. Hromoplasti na taj način određuju boju cvjetova i plodova. Hromoplasti sadrže ribosome i DNK.



Slika 1.21. Građa hloroplasta

Leukoplasti su bezbojni i imaju funkciju depoa različitih rezervnih materija, prema čemu se i razlikuju pojedini tipovi leukoplasta.

Biljna vakuola predstavlja vodom ispunjeno područje u citoplazmi biljne ćelije s važnom ulogom u održavanju čvrstine ćelije, skladištenju rezervnih materija i krajnjih produkata metabolizma. Obavijena je vlastitom membranom – *tonoplastom*. Tokom rasta biljne ćelije, veći broj malih vakuola spaja se u jednu veliku centralnu vakuolu koja, zauzimajući centralno mjesto u diferenciranoj biljnoj ćeliji, potiskuje jedro i citoplazmu uz plazmamembranu.

Ćelijski zid je zaštitna, čvrsta struktura na površini biljne ćelije, građena primarno od celuloze, ali i kalcijevog pektinata, hemiceluloze, pektina i ekstenzina. Tokom života biljne ćelije, debljina i čvrstoća ćelijskog zida se povećava, a komunikaciju između ćelija omogućavaju *plazmodezme*, tanke citoplazmatske niti. Formiranje ćelijskog zida počinje u kasnoj anafazi obrazovanjem *fragmoplasta* u ekvatorijalnoj ravni od kojeg će nastati *centralna lamela*, a potom i *primarni ćelijski zid* ugradnjom iz endoplazmatskog retikuluma i Goldžijevog aparata dopremljenih gradivnih komponenti ćelijskog zida s obje strane centralne lamele. Po završetku primarnog rasta, formira se sekundarni ćelijski zid, obično troslojni, koji je značajno čvršći od primarnog. Sekundarni ćelijski zid čini i do 45% celuloze, a impregniran je ligninom (do 35%) koji je odgovoran za čvrstoću. Plazmodezme se zadržavaju tokom cijelog perioda formiranja ćelijskog zida.

1.3 REALIZACIJA GENETIČKE INFORMACIJE KOD EUKARIOTA

Proteini predstavljaju molekularne posrednike između genotipa i fenotipa jer su proteini u formi enzima biokatalizatori svih važnijih procesa metabolizma, iz kojih proističu sve osobine živog sistema. Odnos između slijeda baza u nukleinskim kiselinama i slijeda aminokiselina u proteinima, koji su proizvod realizacije genetičke informacije, definisan je genetičkim kodom. Međutim, između lokacije DNK u jedru i mjesta realizacije genetičke informacije na nemembranskim ćelijskim strukturama – ribosomima postoji fizička barijera, jedarna membrana, koju nukleusna molekula DNK zbog svoje veličine ne može proći. Stoga, ulogu posrednika u prijenosu genetičke informacije igra *informaciona* (iRNK) koja nastaje procesom transkripcije. Ovaj lingvistički pojam se u genetici odnosi na prepisivanje genetičke informacije iz molekule DNK u molekulu iRNK. Prijevod genetičke poruke iz jezika nukleinskih kiselina u jezik proteina realizira se kroz lingvistički ekvivalentno nazvan proces – *translaciju*. Dakle, genetička informacija se u najvećem broju slučajeva realizira slijedom $DNK \rightarrow RNK \rightarrow \text{protein}$, a procesi koji upravljaju ovim slijedom su transkripcija i translacija.

1.3.1 Centralna biološka dogma

Termin “centralna dogma” prvi je uveo Francis Harry Compton Crick (1916–2004) koji je centralnu dogmu predstavio kao transfer genetičke informacije od DNK preko RNK do proteina. Koliko god to danas zvučalo trivijalno, u to vrijeme neki vodeći naučnici (uslijed nedostatka eksperimentalnih dokaza) nisu prihvatili ideju da nukleinske kiseline učestvuju u sintezi proteina. Zbog toga je termin “dogma” potpuno odgovarao tadašnjem nivou znanja, odnosno predstavljao je ono u šta je Crick vjerovao. U današnjem kontekstu, centralna dogma molekularne biologije obuhvata i druge oblike prijenosa informacije. S obzirom na tri vrste biopolimera (DNK, RNK i protein), teorijski je moguće devet različitih kombinacija prijenosa genetičke informacije između njih, a klasificirani su u tri skupine:

- osnovni prijenosi – normalno se odvijaju u svakoj ćeliji, a uključuju procese replikacije, transkripcije i translacije DNK,
- specifični prijenosi – normalno se odvijaju, ali pod specifičnim okolnostima (kod nekih virusa ili u laboratoriji) i
- nepoznati prijenosi – smatra se da se prirodno ne dešavaju (tabela 1.2).

Tabela 1.2. *Moguće kombinacije prijenosa genetičke informacije*

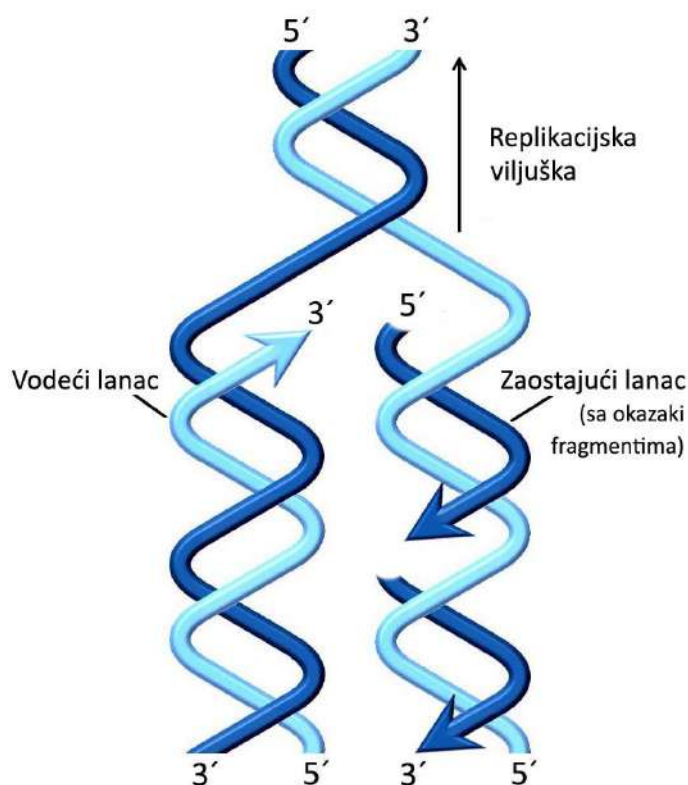
Osnovni	Specifični	Nepoznati
<i>DNK → DNK</i>	<i>RNK → DNK</i>	<i>Protein → DNK</i>
<i>DNK → RNK</i>	<i>RNK → RNK</i>	<i>Protein → RNK</i>
<i>RNK → protein</i>	<i>DNK → protein</i>	<i>Protein → protein</i>

1.3.2 Replikacija DNK

Replikacija DNK je semikonzervativan proces u kojem svaki od roditeljskih lanaca u molekuli služi kao matrica za sintezu novih. Ključni enzim ovog procesa je DNK polimeraza koji katalizira povezivanje dezoksiribonukleozid 5'-trifosfata (dNTP) u novonastali lanac DNK. Proces replikacije je osnovni preduslov za ćelijsku reprodukciju i uključuje niz kompleksnih proteina, enzima i mehanizama stroge regulacije. U prokariotskim i eukariotskim ćelijama, replikacija počinje s jedinstvenom sekvencom, odnosno na mjestu koje se naziva *porijeklo replikacije* (engl. *origin of replication*) i služi za vezanje specifičnih proteina koji iniciraju proces replikacije.

Za sintezu novog lanca neophodno je rasplitanje postojećih (roditeljskih lanaca DNK), što katalizira enzim DNK helikaza te dolazi do formiranja replikacijske viljuške. Nakon rasplitanja lanaca DNK, replikacija će se odvijati bidirekciono. Smjer sinteze novog lanca DNK uvijek je 5' → 3', a lanci u molekuli DNK su antiparalelni, stoga će se jedan lanac sintetizirati kontinuirano i biti vodeći (engl. *leading*), dok će drugi lanac DNK, koji je suprotne polarnosti (engl. *lagging*) biti sintetiziran u vidu kratkih *Okazaki* fragmenata nazvanih po bračnom paru koji ih je otkrio – Reiji Okazaki (1930–1975) i Tsuneko Okazaki (1933–). Okazaki fragmenti su kratke sekvence novosintetizirane DNK čije povezivanje katalizira enzim DNK ligaza.

Tačnost i preciznost replikacije DNK ključna je za reprodukciju ćelija, a procijenjena stopa mutacija za različite gene pokazuje da učestalost grešaka tokom replikacije odgovara samo jednoj netačnoj bazi na 10^9 – 10^{10} ugrađenih nukleotida (slika 1.22).



Slika 1.22. Replikacija (duplikacija) molekule DNK

1.3.3 Transkripcija DNK

Transkripcija je proces koji se odvija u jedru eukariota, a podrazumijeva sintezu RNK po uzoru na matricu DNK, čime se postiže doslovni prijenos genetičke informacije s molekule DNK na molekulu RNK. Prepisana molekula RNK zato je identična kodirajućem, a komplementarna matričnom (kalupnom ili nekodirajućem, engl. *antisense*) lancu molekule DNK. Utvrđeno je da oba lanca DNK mogu da učestvuju u transkripciji, ali je smjer transkripcije uvijek $5' \rightarrow 3'$. To znači da je lanac DNK smjera $5' \rightarrow 3'$ kodirajući ili smisleni lanac i identičan je novonastalom lancu RNK, s tom razlikom što sadrži timin umjesto uracila.

Kod eukariota su prisutne tri različite vrste RNK polimeraza:

- RNK polimeraza I – lokalizirana je u jedarcetu i katalizira sintezu ribosomske RNK;
- RNK polimeraze II i III – prisutne su u nukleoplazmi. RNK polimeraza II transkribuje većinu strukturnih gena; RNK polimeraza III transkribuje *malu jedarnu RNK* (snRNK) i transportnu RNK (tRNK), a njeni su promotori intragenetski.

Prvi proizvod transkripcije je *primarni transkript* (pre-iRNK), tj. nezrela jednolančana molekula RNK. Pre-iRNK se sastoji od većine *heterogene nukleusne RNK* (hnRNK). Obradom primarnog transkripta (splajsing, engl. *splicing*) nastaje zrela informacijska RNK. Geni eukariota su uglavnom diskontinuirani, tj. pored segmenata sa šifrom za sintezu polipeptidnog lanca (*egzoni*) sadrže i one koji nemaju značaj za sintezu proteina (*introni*) te se uklanjaju iz primarnog transkripta njegovom obradom. Jedarne pre-iRNK obrađuju se u kompleksnim strukturama sastavljenim od više vrsta snRNK i proteina (*splajsosom*).

Najveći broj prekursorskih molekula rRNK kod eukariota te neke prekursorske molekule rRNK, tRNK i iRNK u mitohondrijama i kloroplastima različitih bioloških vrsta imaju autokatalitičku sposobnost. Proces obrade primarnog transkripta mora biti izuzetno precizan kako ne bi došlo do promjene okvira čitanja. U procesu preciznog isijecanja introna najvažniju ulogu imaju dinukleotidi na krajevima introna, ali u određenoj mjeri i konsenzus sekvence² na spojevima introna i egzona. Ipak, mogući su različiti načini isijecanja introna (alternativni splajsing) te formiranje različitih iRNK koje nose informaciju za sintezu različitih proteina.

Sintetizirani primarni transkript u ovoj formi ne može učestvovati u procesu translacije. Naime, da bi se formirala zrela forma iRNK koja je neophodna za naredne korake kojima se sintetiziraju proteini, primarni transkript mora pretrpjeti značajne promjene i modifikacije. Tokom ovih modifikacija i prerade primarnog transkripta, prvo se isijecaju (engl. *splicing*) introni (nekodirajuće sekvence), a zatim se međusobno povezuju egzoni (kodirajuće sekvence). Zatim slijedi blokiranje 5' kraja novosintetizirane molekule iRNK dodavanjem guanina na 5' kraju (formiranje kape), uz pomoć enzima guanilil transferaze. Modifikacija 3' kraja uključuje dodavanje poliadeninskog repa (poli (A) rep), uz pomoć enzima poliadenilat-polimeraze, čime se stabilizira molekula iRNK i završava proces njene modifikacije. Tek ovako modificirana molekula iRNK napušta jedro, odlazi u citoplazmu te može stupiti u proces translacije. Životni vijek molekule iRNK kod eukariota iznosi između 4 i 24 sata, tokom kojih se izvrši translacija, nakon čega se iRNK degradira.

² Konsenzus sekvenca je u molekularnoj biologiji i bioinformatički izračunati redoslijed gradivnih komponenti nukleinskih kiselina ili proteina (nukleotida ili aminokiselina), koji se nalaze na položaju poravnanja sekvenci, čime se utvrđuju funkcijski, strukturni ili evolucijski odnosi između sekvenci.

1.3.4 Translacija

Nakon završetka transkripcije i modifikacije, zrela iRNK napušta jedro i odlazi u citoplazmu, do ribosoma gdje se odvija proces translacije. Translacijom se genetička informacija s iRNK prenosi na krajnji proizvod gena – protein ili polipeptid. Kod eukariota, translacija je složeniji proces u smislu da uključuje veći broj proteinskih faktora, a i iRNK se kasnije veže za ribosom kod eukariota, iako su bazični procesi u osnovi isti. Proces translacije je generalno podijeljen u tri faze: inicijaciju, elongaciju i terminaciju. U najvećem broju slučajeva se i kod prokariota i kod eukariota formira tzv. polisom, tj. veći broj ribosoma na molekuli iRNK, pri čemu se ribosomi na molekulu RNK vežu u razmaku od oko 80 nukleotida.

Kod eukariota, inicijacijsko mjesto u molekuli iRNK eukariota je 7-metil guanozinska kapa. Nakon što se formira inicijacijski kompleks, u fazi elongacije se sintetizira polipeptidni lanac sve do pojave stop-kodona, odnosno signala za terminaciju translacije.

1.3.5 Regulacija genske ekspresije

Za razliku od prokariota, kod eukariota nisu pronađeni dokazi o organizaciji gena u operone. Generalno je genska regulacija kod eukariota znatno kompleksnija i u principu se razlikuje brza genska regulacija u skladu s fiziološkim zahtjevima i ontogenetska genska regulacija i diferencijacija. Regulacija genske aktivnosti kod eukariota ostvaruje se na nivou DNK, transkripcije, obrade primarnog transkripta, transporta iRNK u citoplazmu, translacije i razgradnje iRNK, modifikacije i razlaganja proteina. Regulacija na nivou DNK ostvaruje se različitim hemijskim modifikacijama (npr. metilacija ili demetilacija citozina), rearanžmanima genetičkog materijala i konformacijama hromatina te regulacijom amplifikacije gena. Poznato je da proces spiralizacije i despiralizacije hromatina ima važnu ulogu u aktivnosti gena kao i histonski proteini. Histoni su precizno raspoređeni duž molekule DNK, a svojim vezanjem za molekulu DNK (posebno za TATA blok u promotorskim sekvencama, prisutan u oko 85% eukariotskih gena) efikasno blokiraju transkripciju. Aktiviranje blokiranih gena vjerovatno se ostvaruje vezanjem proteina za stimulatorske nizove DNK – *pojačivače* (engl. *enhancer*) i interakcijom s promotorskim histonima. Također, u transkripcijski aktivnom hromatinu je primijećena povećana acetilacija lizinskih ostataka, regiona histona koji su van nukleosoma, što dovodi do destabilizacije kondenzacije hromatina i oslobađanja DNK za pristup transkripcijskih faktora. Kontrola

transkripcije kod eukariota podrazumijeva kontrolu početka i kontrolu brzine odvijanja transkripcije. Regulatorni proteini, kojih je u principu relativno malo, svojim vezanjem za promotore ili pojačivače olakšavaju inicijaciju transkripcije pomoću RNK polimeraze II. Promotori se nalaze uzvodno od mjesta gdje počinje transkripcija, a pojačivači se nalaze na izvjesnoj udaljenosti od gena uzvodno ili nizvodno. Određeni promotorski segmenti (npr. TATA blok) određuju mjesto početka transkripcije, dok drugi kontrolišu dolazi li uopće do transkripcije određenog gena pod uticajem transkripcijskih faktora koji se vežu za ove segmente. Ako dođe do aktivacije transkripcije, promotorski segment djeluje kao pozitivni regulator, a specifični transkripcijski faktor je regulatorni protein. Ako, međutim, vezanje proteina blokira transkripciju, promotorski segment je negativni regulatorni protein. S druge strane, pojačivači omogućavaju postizanje maksimalne brzine transkripcije. Ako određena sekvenca nukleotida ima efekat blokiranja aktivnosti gena, označava se kao *prigušivač* (engl. *silencer*).

Kontrola obrade primarnog transkripta prije svega se odnosi na kontrolu alternativnih načina obrade jednog primarnog transkripta, čime nastaju različiti proteini kodirani istim genom (*izoforme proteina*). Sinteza izoformi proteina može biti tkivno specifična. Jednom obrađeni primarni transkript i njegova zrela forma – iRNK moraju napustiti jedro kroz nukleusne pore da bi došlo do ekspresije gena. Utvrđeno je da oko 50% heterogene jedarne RNK (hnRNK) nikada ne napusti jedro i u njemu se razgrađuje.

Kontrola translacije vrši se na nivou ribosoma, a uključuje selekciju iRNK koja će se prevesti u protein. Stabilnost iRNK nakon završene translacije može varirati od nekoliko minuta do nekoliko mjeseci, na šta u značajnoj mjeri utiču regulatorni signali. Posttranslacijski mehanizmi kontrole genske aktivnosti obuhvataju modifikacije i kontrolu razgradnje proteina. Poluživot različitih proteina dosta varira. Degradacija proteina kod eukariota kontrolisana je široko rasprostranjenim proteinskim faktorom *ubikvitinom*.

1.4 PROMJENJIVOST NASLJEDNOG MATERIJALA I NJENE POSLJEDICE

Promjenjivost, kao univerzalna i najuočljivija pojava u živom svijetu te karakteristika svih živih bića s biparentalnim spolnim razmnožavanjem, uzrokovana je genetičkim i negenetičkim faktorima. Pri tome se na genetičke faktore odnose složeni procesi biološkog nasljeđivanja, a uključuju rekombinacije postojećeg genetičkog materijala, kao i njegove kvalitativne i

kvantitativne promjene, odnosno *mutacije*. Ispoljavajući se na različitim nivoima organizacije genetičkog materijala, razlikuju se *genske*, *hromosomske*, *genomske* i *ekstranukleusne (plazmatske) mutacije*. Prema efektu na vijabilnost individue, mutacije mogu biti *letalne* (uzrokuju smrt 100% aficiranih jedinki), *poluletalne* (usmrćuju preko 90% aficiranih individua) i *subvitalne* (izazivaju smrt kod manje od 90% jedinki). *Uslovno letalne* mutacije rezultiraju letalnim posljedicama samo u određenim uslovima sredine. Ako mutacija izaziva promjenu najfrekventnijeg fenotipa u neki novi, označava se kao *direktna mutacija*. Suprotno tome, *povratne mutacije* uzrokuju promjenu mutiranog fenotipa u divlji tip. *Somatske mutacije* su one u tjelesnim ćelijama, za razliku od *gametskih mutacija* koje pogađaju spolne ćelije.

1.4.1 Genske mutacije

Promjene u hemijskoj strukturi nukleinskih kiselina, odnosno gena (*genske mutacije*), nastaju slučajnom (spontane mutacije) ili izazvanom (inducirane mutacije i mutacije izazvane traspozicijama³) promjenom jednog ili više nukleotida. U tom slučaju, stroga pravila komplementarne replikacije DNK, na kojoj počiva stabilnost i ponovljivost karakterističnih osobina svih živih bića, mogu biti narušena, iako složeni ćelijski reparacijski mehanizmi nastoje spriječiti ovakav ishod.

Prema prirodi interakcije s postojećim alelima, genske varijante nastale kao posljedica mutacija mogu biti dominantne, recesivne ili bez odnosa funkcionalne dominacije. Priroda i smjer mutiranja funkcije alela divljeg tipa (ishodišnog alela) označava se nazivima: *izomorf* (forma alela bez vidljivih promjena na nivou fenotipa), *amorf* (alel bez funkcije), *hipomorf* (alel sa smanjenom funkcijom), *hipermorf* (alel s povećanom funkcijom), *neomorf* (alel s novom funkcijom) i *antimorf* (ima antagonističku funkciju u odnosu na alel divljeg tipa).

Prosječna učestalost mutiranja pojedinačnih ljudskih gena iznosi oko 10^{-5} (jedna mutacija na 100.000 gameta). Ipak, uzimajući u obzir broj od oko 25.000–30.000 gena u ljudskom genomu uz navedenu frekvenciju mutiranja, čak svaki treći čovjek je nosilac jedne nove mutacije. Taj podatak ide u prilog činjenici da su genske mutacije osnovni izvor nasljedne promjenjivosti i sveukupnog polimorfizma bioloških vrsta. Najčešća posljedica genskih mutacija je eliminacija ili redukcija

³ Transpozicija – promjena pozicije sekvenci DNK ili hromosomskih segmenata unutar istog genoma.

funkcije gena. Mutacije koje dovedu do promjene jednog ili više kodona⁴ u genu za posljedicu imaju i promijenjenu aminokiselinsku sekvencu u sintetiziranom polipeptidnom lancu. Zbog kompleksnosti strukture gena, promjena ili povećanje genske funkcije mnogo je rjeđa posljedica genskih mutacija. Na molekularnoj osnovi razlikuju se dva osnovna tipa genskih mutacija: tačkaste mutacije (bazne supstitucije) i male insercije i delecije (*frameshift* mutacije).

1.4.2 Tačkaste mutacije

Tačkaste mutacije su tip genskih mutacija kojima je zahvaćen samo jedan par baza i najčešće se odnose na bazne supstitucije, iako se pod tačkastim mutacijama podrazumijevaju i bazne adicije i delecije. Ipak, s obzirom na to da baznim adicijama i delecijama mogu biti zahvaćeni pojedinačni bazni parovi, ali i više njih te da najčešće uzrokuju promjenu okvira čitanja (engl. *reading frame*) šifre, ovdje će bazne adicije i delecije biti razmatrane kao *frameshift* mutacije.

Bazne supstitucije predstavljaju zamjene jednog nukleotida drugim i, zavisno od toga koje su baze zahvaćene supstitucijom, razlikujemo *tranzicije* i *transverzije*. Tranzicije predstavljaju zamjene purina purinom ili pirimidina pirimidinom. Transverzije predstavljaju zamjene purina pirimidinom ili pirimidina purinom.

Iako je većina tačkastih mutacija benigna, mnoge mogu imati funkcionalne posljedice, uključujući promjene u genskoj ekspresiji i kodiranju proteina. Stoga se, u zavisnosti od posljedice po ekspresiju gena zahvaćenog mutacijom, tačkaste mutacije mogu podijeliti na: tihe (*silent*) mutacije, mutacije pogrešnog smisla (*missense*) i besmislene (*nonsense*) mutacije.

Tihe (*silent*) mutacije su bazne supstitucije koje ne mijenjaju značenje kodona. Ovim mutacijama se određeni kodon za određenu aminokiselinu mijenja u drugi kodon za istu aminokiselinu. Mutacije pogrešnog smisla (*missense*) bazne su supstitucije koje mijenjaju značenje kodona te uzrokuju promjenu aminokiseline u proteinu. Dakle, ove mutacije uzrokuju promjenu kodona za određenu aminokiselinu u kodon za drugu aminokiselinu. Ako mutacija pogrešnog smisla uzrokuje supstituciju hemijski sličnom aminokiselinom, onda se ona označava kao sinonimna supstitucija, a uglavnom ispoljava manje značajne efekte na strukturu i funkciju proteina. Supstitucije hemijski

⁴ Jedinica genetičke informacije, slijed od tri nukleotida u molekuli iRNK koji predstavlja kôd (šifru) za jednu aminokiselinu koja se ugrađuje u polipeptidni lanac.

veoma različitim aminokiselinama označavaju se kao *nesinonimne* supstitucije i one uglavnom uzrokuju značajne promjene strukture i funkcije proteina.

Besmislene (*nonsense*) mutacije su bazne supstitucije koje mijenjaju kodon u stop-kodon⁵ te time uzrokuju prijevremenu terminaciju translacije (sinteze proteina) i formiranje skraćenih proteina. Opisana je i obrnuta mogućnost, promjena stop-kodona u kodon, što se označava kao *nonstop* ili *stop-loss* mutacija, a za posljedicu ima abnormalan produžetak karboksilnog kraja proteina.

1.4.3 Male insercije i delecije

Mutacije pomaka okvira čitanja (*frameshift* mutacije) posljedica su malih insercija ili delecija koje podrazumijevaju dodatak ili gubitak jednog ili više nukleotida. Kao posljedica ovih mutacija svi će kodoni od mjesta mutacije biti drugačiji i vjerovatno kodirati nefunkcionalan protein. Zatim, stop-kodon će biti pogrešno pročitao, jer će jedan od novih kodona biti stop-kodon i uzrokovati prijevremeni završetak translacije, ili će translacija biti nastavljena iza kraja gena jer originalni stop-kodon neće biti prepoznat. Ove mutacije imaju potencijalno izrazito devastirajuće efekte po zahvaćene ćelije i čitav organizam.

1.4.4 Spontane mutacije

Spontane mutacije se javljaju veoma rijetko, u odsustvu poznatog mutagena, i uklapaju se u normalnu stopu mutacija, koja je osnovni izvor genetičke varijacije u populaciji. Greške u replikaciji molekule DNK mogu biti posljedica ugradnje tautomernih oblika baza⁶ te spontanih insercija ili delecija baza.

Kao posljedica tautomerije nastaju mutacije tipa tranzicija i transverzija. Premještanjem atoma vodika na karboksilni kisik susjednog atoma azota u molekuli timina i guanina nastaju tautomeri oblici ovih heterocikličnih baza. Timin i guanin su normalno u keto (C=O) formi, ali tautomernim premještanjem prelaze u enolnu (C-OH) formu. Premještanje atoma vodika između susjednih atoma ugljika i azota rezultira nastankom tautomernih oblika citozina i adenina. Citozin i adenin

⁵ Stop-kodon (završni kodon) – niz nukleotida (UAG, UAA i UGA) koji signalizira kraj transkripcije ili translacije i dovršetak sinteze nukleinske kiseline ili proteina

⁶ Tautomeri su izomeri organskih jedinjenja koji se lako konvertuju iz jednog u drugi oblik hemijskom reakcijom tautomerizacije. Tautomerija je reverzibilna hemijska fluktuacija atoma ili skupine atoma unutar molekule.

su normalno u amino (NH_2) formi, a tautomernim premještanjem prelaze u imino (NH) formu. Ugradnja tautomernih oblika tokom replikacije rezultira pogrešnim sparivanjem baza. Tako se npr. enolna forma timina veže za guanin, a iminoforma citozina za adenin.

U spontane mutacije spadaju i tzv. *spontane lezije*, tj. prirodna oštećenja molekule DNK nastala procesima depurinacije⁷ i deaminacije⁸ nukleotida. Npr. ćelije sisara gube oko 10.000 purina iz molekule DNK tokom dvadesetosatnog generacijskog perioda na 37°C. Veoma čest uzrok nastanka spontanih lezija je deaminacija citozina u dijelovima molekule DNK koji su bogati citozinom i u pravilu visoko mutabilni. Deaminacijom citozina nastaje uracil. Nereparirani uracil se tokom replikacije veže za adenin, što rezultira konverzijom G–C u A–T par.

1.4.5 Inducirane mutacije

Inducirane mutacije su posljedica djelovanja mutagenih agenasa (fizičkih, hemijskih ili bioloških) koji mogu djelovati direktno na baze u molekuli DNK ili indirektno biti okidači određenog molekularnog mehanizma, što može uzrokovati promjenu u sekvenci DNK.

Najpoznatiji primjeri djelovanja fizičkih agenasa su mutageni efekti UV svjetla koji se ispoljavaju formiranjem *pirimidinskih dimera*⁹ (ciklobutanski pirimidinski fotodimeri) i 6–4 fotoprodukata. Tako nastali pirimidinski dimeri nisu u stanju da uspostavljaju vodikove veze s bazama komplementarnog lanca.

Hemijski mutageni agensi mogu uzrokovati oštećenja molekule DNK procesima alkilacije, deaminacije ili depurinacije, prekidima fosfodieterskih veza, hemijskim izmjenama baza, ugradnjom baznih analoga i interkalirajućih agenasa.

⁷ Depurinacija je proces uklanjanja purinskih baza (adenina i guanina) iz molekule DNK kao rezultat cijepanja N-glikozilne veze između azotne baze i šećera dezoksiriboze, ostavljajući “ogoljenu” fosfodietersku kičmu.

⁸ Deaminacija je proces uklanjanja aminogrupa iz molekula koji katalizira enzim deaminaza.

⁹ Dimeri su molekule niske molekularne mase, koje se sastoje od dviju identičnih molekula ili dva identična monomera.

1.5 ĆELIJSKI CIKLUS

Njemački ljekar Rudolf Ludwig Karl Virchow (1821–1902) postavio je važan biološki princip: “Svaka ćelija od ćelije”, kojim je istaknuto da su temeljni aspekti reprodukcije i nasljeđivanja upravo zasnovani na reprodukciji ćelije, tj. ćelijskoj diobi. U osnovi biološkog nasljeđivanja i reprodukcije je ćelijska dioba kao dio sveukupnih promjena u ćeliji koje zajedno čine *ćelijski ciklus*. Životni vijek ćelije i metabolički procesi koji se u njoj ciklično i po određenom slijedu odvijaju, karakteristični su za pojedine tipove ćelija i genetički su određeni. Život ćelije se završava njenom smrću ili podjelom na dvije nove ćelije. Svakoј ćelijskoј diobi prethodi udvostručavanje ćelijskih sadržaja kako po završetku ćelijske diobe niti jedna od novonastalih ćelija ne bi bila deficitarna za esencijalne ćelijske komponente.

1.5.1 Ćelijski ciklus prokariota

Jedna od osnovnih karakteristika živih sistema je sposobnost reprodukcije – stvaranja sebi jednakih. Najjednostavniji vid reprodukcije, svojstvene jednoćelijskim organizmima, jest aseksualna reprodukcija. Kod ovih organizama, nakon repliciranja DNK, dva identična “hromosoma” pozicioniraju se na suprotne polove ćelije, koji će u daljnjem procesu predstavljati mjesta formiranja dvije nove ćelije. U aseksualnoj reprodukciji učestvuje jedan roditelj, a svaki potomak (uz izuzetak spontanijh ili induciranih mutacija) ima identičan genetički komplement kao i roditelj.

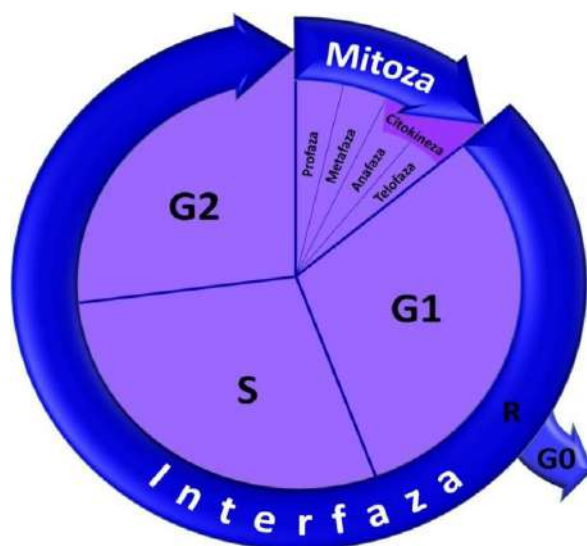
Kod prokariota, ćelijska dioba predstavlja ujedno i nastanak novog organizma. Prokarioti se razmnožavaju binarnom fisijom. Kod tipičnih prokariota, većina gena je smještena na prstenastoj molekuli DNK koja s pridruženim proteinima čini pojedinačni hromosom. Binarna fisija uključuje nekoliko suštinskih procesa: duplikaciju hromosoma, kretanje pojedinačnih hromosoma ka suprotnim polovima ćelije, izduživanje i uvećanje ćelijske mase te podjelu ćelijskog sadržaja na dvije ćelije.

1.5.2 Ćelijske diobe eukariota

Tokom života višećelijskih organizama kontinuirano se odvija stvaranje novih ćelija i uklanjanje starih i oštećenih, a ravnoteža ukupnog broja ćelija odraslih jedinki određena je balansom između ćelijske proliferacije i ćelijske smrti.

1.5.2.1 Mitoza

Mitoza (grč. *mitos*, konac, zbog končastog izgleda hromosoma na početku mitoze) je termin koji opisuje ćelijsku diobu, iako se suštinski ovaj termin odnosi na *kariokinezu* (diobu jedra). Sve somatske (tjelesne) ćelije vode porijeklo od zigota u kojem je ujedinen nasljedni materijal roditeljskih gameta (jajne ćelije i spermatozoida). Svaka somatska ćelija, ako zanemarimo mutacije genetičkog materijala, sadrži kvalitativno i kvantitativno jednak nasljedni materijal. Nasljedni materijal se prenosi (nasljeđuje) iz jedne ćelije u drugu ćelijskom diobom. Mitoza je dioba koja osigurava istovjetnu i ravnomjernu raspodjelu nasljednog materijala. Dvije osnovne faze ćelijskog ciklusa somatskih ćelija su *interfaza* (lat. *inter* = između) i *mitoza* (M faza) (slika 1.23). Interfaza je zapravo period između dvije M faze ćelijskog ciklusa. Na interfazu, period tokom kojeg se duplicira molekula DNK, vrši transkripcija (sinteza RNK) te kroz intenzivne metaboličke procese duplicira ćelijska biomasa kao preduslov podjele jedne na dvije nove ćelije, otpada 90% ćelijskog ciklusa. Interfaza se dijeli na tri jasno odvojena stadija: *G1* (predsintetski), *S* (sintetski) i *G2* (postsintetski) stadij. Pojedini tipovi ćelija (npr. neuroni), miruju privremeno ili trajno, u tzv. *G0* fazi. To su tzv. *neciklusne* ćelije. Početak novog ciklusa determinira nekoliko vanćelijskih uticaja u *G1* fazi kao što su prisustvo mitogena te interakcija s vanćelijskim matriksom i drugim ćelijama (kontaktna inhibicija). Mitogeni djeluju preko specifičnih receptora i najčešće signaliziraju započinjanje novog ciklusa diobe.

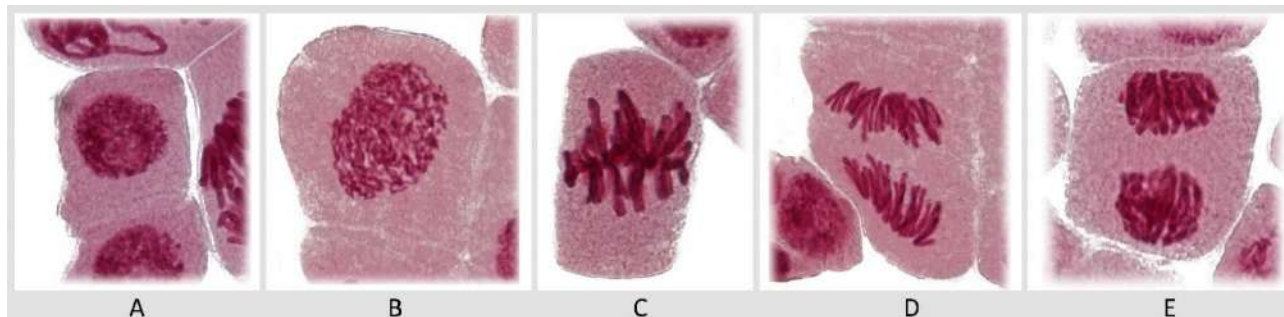


Slika 1.23. Šematski prikaz faza ćelijskog ciklusa

Restriksijska (R) tačka označava kratak period u G1 fazi, nakon koje daljnji tok ćelijskog ciklusa ne zavisi od mitogena. U G1 stadiju ćelija raste do genetički determinisane veličine uz intenzivnu sintezu proteina. Sinteza DNK, histona i enzima replikacije odvija se u narednom, S stadiju zbog čega i nosi naziv sintetski stadij. Tokom G1 stadija, u ćeliji se odvijaju intenzivni metabolički procesi sinteze proteina i drugih materija neophodnih za rast ćelije i replikaciju DNK. Količina DNK u jedru iskazuje se kao ugljična vrijednost jedra (C). Jedra somatskih ćelija u G1 fazi sadrže diploidan broj ($2n$) jednostrukih hromosoma, tako da količina DNK u njihovom jedru iznosi $2C$. U haploidnom (n) jedru spolnih ćelija, u kojima je duplo manja količina DNK, ugljična vrijednost iznosi $1C$. Interfazna S faza obilježena je autoreplikacijom DNK, odnosno udvostručavanjem svakog hromosoma. Ključni događaj interfaze, kao uostalom i čitavog ćelijskog ciklusa, jest udvostručavanje nasljedne tvari, odnosno dupliranje broja postojećih molekula DNK ($46 \rightarrow 92$) tako da se i ugljična vrijednost jedra udvostruči i iznosi $4C$. Od jedne ishodišne molekule (koja je u sastavu jednog jednostrukog hromosoma) nastaju dvije nove, potpuno identične molekule DNK. Sposobnost DNK da kopira samu sebe, tj. sposobnost autoreplikacije, od temeljne je važnosti za procese nasljeđivanja. Postsintetski stadij je kratak period u kojem se finaliziraju sve pripreme za diobu ćelije kao i eventualne prepravke grešaka u molekuli DNK, nastale tokom njene replikacije. Interfazna G2 faza počinje kada ćelija postigne punu veličinu, a DNK je udružena s odgovarajućim proteinima i egzistira u formi dugih hromatinskih vlakana promjera 30 nm . Broj hromosoma u G2 fazi je diploidan ($2n$), svaki se sastoji od po dvije sestrinske hromatide, u svakoj hromatidi je po jedna molekula DNK (u ćelijama čovjeka to je $46\text{ hromosoma} = 92\text{ hromatide} = 92\text{ molekule DNK}$) pa ugljična vrijednost jedra iznosi $4C$.

U ćelijskom ciklusu postoji više kontrolnih tačaka u kojima se ćelijski ciklus zaustavlja ako prethodni događaji nisu dovršeni, odnosno nastavlja se odvijanje ćelijskog ciklusa ako su ostvareni svi neophodni uslovi iz prethodne faze, tako da su ključne kontrolne tačke u G1 i G2 stadiju interfaze te u metafazi. Centralno mjesto u kontroli ćelijskog ciklusa pripada familiji protein kinaza (dodaju supstratu fosfatne grupe) – *ciklin-zavisnim kinazama* (engl. *Cyclin-Dependent Kinase* – CDK). Njihovi najvažniji regulatori su proteini *ciklini* i *inhibitori ciklin-zavisnih kinaza*. Kontrola ćelijskog ciklusa zasniva se na preciznoj cikličnoj hidrolizi ciklina u pojedinim periodima ćelijskog ciklusa.

Interfazno jedro, fiksirano i obojeno pod svjetlosnim mikroskopom, ima homogen i kompaktan izgled bez uočljivih struktura. Interfazno jedro sadrži disperzirani hromosomski materijal – hromatin. Struktura hromatina, hijerarhijski nivoi molekularne organizacije, spiralizacije, kondenzacije, funkcije i ponašanja različiti su i karakteristični za pojedine faze ćelijskog ciklusa (slika 1.24).



Slika 1.24. Ćelijski ciklus kod ćelija crvenog luka (*Allium cepa* L.): A – interfaza, B – profaza, C – metafaza, D – anafaza, E – telofaza

Prema intenzitetu bojenja razlikuje se *heterohromatin* – konstantno kondenzovan, intenzivnije obojen te stoga i lakše uočljiv i *euhromatin* – genetički aktivan dio hromatina na kojem se vrši prepisivanje iRNK, a koji svojom kondenzacijom prati ćelijski ciklus i svjetlije je obojen. Euhromatin se kondenzuje tokom mitoze i postiže najveći stepen kondenzacije u metafazi, dok je heterohromatin minimalno spiraliziran u metafazi, tj. ciklus spiralizacije heterohromatina obrnut je od ciklusa spiralizacije euhromatina. Enzimi teško dopiru do heterohromatinske DNK, zbog visokog stepena kondenzacije, stoga se ona kasno replicira u S fazi interfaze i rijetko ili nikada se ne prepisuje u iRNK.

U vrijeme ćelijske diobe kod eukariota dolazi do kondenzacije hromatina izgrađenog od makromolekula DNK, proteina i malih količina RNK i tada se formiraju mikroskopski uočljive karakteristične strukture nasljednog materijala – *hromosomi*.

Dakle, *euhromatin* je transkripcijski aktivni dio hromatina, dok je *heterohromatin* njegov inaktivan, nekodirajući dio, bogat visoko repetitivnim, tandemski raspoređenim sekvencama DNK.

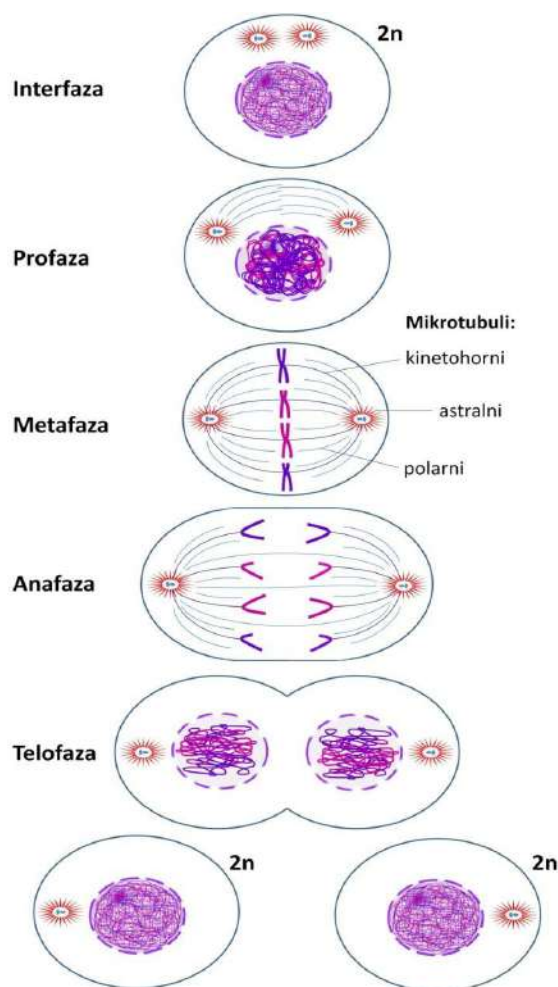
U hromatinu je utvrđeno postojanje tri vrste sekvenci DNK:

- visoko repetitivni nizovi (satelitna DNK) – višestruko ponovljeni kratki nizovi nukleotida prisutni u gotovo svim hromosomima, ali s još uvijek nepotpuno razjašnjenom funkcijom;
- intermedijarna (srednje repetitivna) DNK – nizovi nukleotida s manjim brojem ponavljanja u genomu (npr. geni za rRNK, geni za tRNK, za histone, tubuline, aktine i sl.);
- unikatni nizovi (“jedinstvene”) sekvence – najčešće predstavljaju strukturne gene uglavnom prisutne u jednoj kopiji (engl. *single copy*) ili eventualno 2–3 kopije u genomu.

Heterohromatin može biti *strukturni (konstitutivni)* i *fakultativni*. *Strukturni heterohromatin* je uglavnom građen od kratkih, nekodirajućih, visoko repetitivnih sekvenci DNK (*satelitna DNK*). Gradivna je komponenta svakog hromosoma, a pretežno je lokaliziran u centromernim i telomernim regionima. *Interkalarni* heterohromatin je najmanje zastupljen, nalazi se isprepleten u euhromatinu, a čini ga utišani genetički materijal. Raspored, kondenzacija i veličina euhromatinskih regiona i strukturnog heterohromatina karakteristični su za svaki hromosom, što omogućava identifikaciju diferencijalno obojenih metafaznih hromosoma – pruganje hromosoma. Tamnije trake su područja jače spiralizacije hromatina, dakle područja heterohromatina, i sadrže veću količinu A–T parova nukleotida, dok su svjetlije trake područja euhromatina s većom količinom G–C parova. *Fakultativni heterohromatin* predstavlja funkcijski neaktivno stanje određenog hromosoma, npr. inaktivaciju jednog X-hromosoma u somatskim ćelijama osoba ženskog spola, koja se u interfaznim jedrima vizualizira kao tamnije obojen region hromatina (*Barrovo tjelašce*) uz jedarnu membranu. Kanadski naučnici Murray Llewellyn Barr (1908–1995) i Ewart George Bertram (1923–2022) 1949. su analizom neurona mačke ustanovili da kod ženki u jedru postoji kondenzovana hromatinska masa uz ivicu jedarne membrane, koja nije bila prisutna u interfaznim jedrima normalnih mužjaka. Broj ovih struktura zavisio je od broja X-hromosoma te je nazvan X-hromatin ili *Barrovo tijelo*. Nešto kasnije, 1961. godine Mary Frances Lyon (1925–2014) ustanovila je da se jedan od dva X-hromosoma, slučajno odabran, kod ženki sisara stabilno inaktivira još u ranom embrionalnom razvoju i ostaje inaktiviran tokom života. Proces je nazvan *inaktivacija X-hromosoma* ili *lionizacija (lajonizacija)*, po naučnici koja ga je opisala, a podrazumijeva pakovanje jednog X-hromosoma u transkripcijski neaktivnu formu, tj. u heterohromatin. S obzirom na to da je ženski spol homogametski (XX) kod većine sisara,

inaktivacijom jednog X-hromosoma ostvaruje se kompenzacija doze, čime se izjednačava doza gena u oba spola. Inaktivacija je nasumična s obzirom na porijeklo X-hromosoma te se u nekim ćelijama inaktivira hromosom naslijeđen od oca, a u nekim onaj od majke.

Nakon dupliciranja u S fazi interfaze, nasljedni materijal se mitozom raspodjeljuje ravnomjerno u jedra kćerinskih ćelija. Biološki značaj mitoze je očuvanje konstantnosti u kvalitativnom i kvantitativnom smislu te kontinuiteta nasljedne tvari i genetičke informacije iz generacije u generaciju ćelija. Mitozom se dijele diploidne somatske ćelije (slika 1.25), organizam raste, obnavlja mrtve ili oštećene ćelije, dok se mitozom razmnožavaju jednoćelijski eukarioti.



Slika 1.25. Šematski prikaz toka mitoze

Tokom mitoze odvijaju se dva mikroskopski vidljiva procesa: podjela jedarnog materijala – *kariokineza*, i podjela citoplazme ćelije – *citokineza*. Mitoza je najkraća faza ćelijskog ciklusa i kod tipične ćelije sisara traje oko jednog sata. Zbog lakšeg praćenja njenog toka, mitozu je na osnovu suštinskih procesa te karakterističnog izgleda i položaja hromosoma podijeljena na nekoliko faza.

Profaza je prva faza mitoze i započinje nakon završetka G2 faze. Spiralizacijom i kondenzacijom hromatina hromosomi postaju kraći i deblji, a time i lakše uočljivi pod svjetlosnim mikroskopom. U profazi se uočavaju u formi dugih hromosomskih niti upletenih u klupko – *spirem*. Pred kraj profaze (ili na početku prometafaze) u centromernom području svake hromatide vežu se specifični proteini gradeći *kinetohore*.¹⁰ Centrosomi migriraju k suprotnim polovima, a mikrotubuli diobenog vretena kontinuirano se izdužuju polimerizacijom dimera α i β tubulina, formirajući na taj način diobeno vreteno. Profaza završava razgradnjom jedarnog omotača i jedarca, nakon čega nastupa prelazna faza između profaze i metafaze – *prometafa*, u kojoj su hromosomi zbog već dezintegriranog jedra dostupni mikrotubulima diobenog vretena za koje se vežu i kreću prema centralnom regionu ćelije, tj. *ekvatorskoj ravni*.

Metafaza je faza u kojoj su dvohromatidni hromosomi postavljeni u ekvatorsku ravan u središtu ćelije, a sestrinske hromatide svakog hromosoma (i njihovi kinetohori vezani za kinetohorne mikrotubule) orijentisane su prema suprotnim polovima ćelije. U metafazi su hromosomi najkondenzovaniji i najbolje vidljivi pod svjetlosnim mikroskopom.

Anafaza započinje razdvajanjem sestrinskih hromatida u centromeri. Razdvojene sestrinske hromatide se zatim kreću k suprotnim polovima. Njihovo kretanje je posljedica skraćivanja kinetohornih mikrotubula koji povlače vezane hromatide i produžavanja polarnih mikrotubula koji polove vretena dodatno udaljavaju. Kada se sestrinske hromatide razdvoje, predstavljaju zasebne jednostruke hromosome, tako da prema svakom polu ćelije odlazi diploidan broj jednostrukih hromosoma. Ova faza traje vrlo kratko i završava se dolaskom hromosoma na polove ćelije.

Telofazu karakterizira despiralizacija hromosoma koji postepeno poprimaju morfologiju karakterističnu za interfazu. Diobeno vreteno se dezintegriše i oko svake grupe hromosoma formira se jedarni omotač, odnosno formiraju se dva zasebna jedra. Udružuju se regioni

¹⁰ Kinetohor je proteinska struktura na hromatidama, za koju se vežu niti diobenog vretena tokom ćelijskih dioba

organizatori nukleolusa (engl. *Nucleolar Organizing Regions* – NORs) akrocentričnih hromosoma i ponovo se formiraju jedarca (jedno ili više njih). NOR-ovi sadrže gene za sintezu određenih tipova rRNK od kojih se formiraju podjedinice ribosoma.

Telofazom se završava raspodjela nasljednog materijala, odnosno od jednog diploidnog jedra diobom (*kariokinezom*) nastaju dva nova (potpuno identična) diploidna jedra. Nakon kariokineze završava se i dioba citoplazme – *citokineza*, kojom završava mitozu.

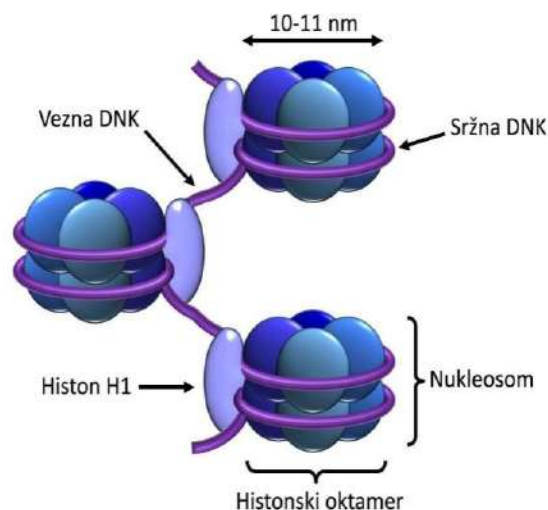
Citokineza započinje u anafazi, traje tokom telofaze i završava s početkom interfaze. Citokinezu karakterizira uvlačenje ćelijske membrane u području ekvatorske ravni te formiranje žlijeba – diobene brazde. Uvlačenje membrane omogućavaju mikrofilamenti formiranjem kontraktilnog prstena koji steže ćeliju sve dok je sasvim ne prekine, odnosno ne podijeli na dvije nove ćelije kćeri. U biljnim ćelijama se u centru ćelije stvara posebna struktura – *fragmoblast*, u koju se ugrađuje materijal ćelijskog zida šireći se k periferiji ćelije.

1.5.2.2 Metafazni hromosom

Kondenzacija hromatina je krucijalan proces za tačnu segregaciju hromosoma tokom ćelijske diobe. Najveći stepen kondenzacije hromatina postiže se u metafazi. Za više nivoe strukturne organizacije hromatina značajni su nehistonski proteini hromosomskog skeleta. Ulrich Laemmli (1940–) je sa saradnicima kasnih 1970-ih nakon uklanjanja histonskih proteina u hromosomima otkrio strukturu (*chromosome scaffold*) koja je, poput kičme ili skeleta, pozicionirana duž hromosomske ose.

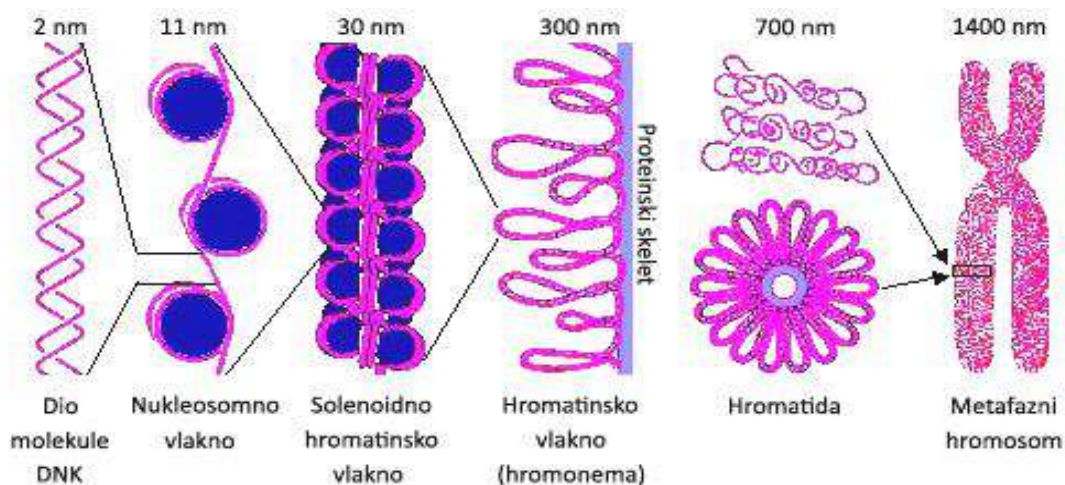
Osnovna strukturna, repetitivna jedinica u hijerarhijskim nivoima organizacije i kondenzacije hromatina do hromosoma je *nukleosom*. Građen je od osam molekula (oktamera) histona koji čine srž nukleosoma: po dvije molekule histonskih proteina tipa H2A, H2B, H3 i H4. Oko histonskog oktamera približno je dva puta omotana DNK dužine oko 146 parova baza (tzv. *sržna DNK*). Svakom nukleosomu je s vanjske strane pridružen i histon H1 (vezni histon), što predstavlja *hromatosom*.

Nukleosome povezuje međunukleosomska DNK dužine približno 60 bp formirajući tako *nukleosomno vlakno*, čiji promjer približno odgovara promjeru nukleosoma i iznosi oko 11 nm (slika 1.26).



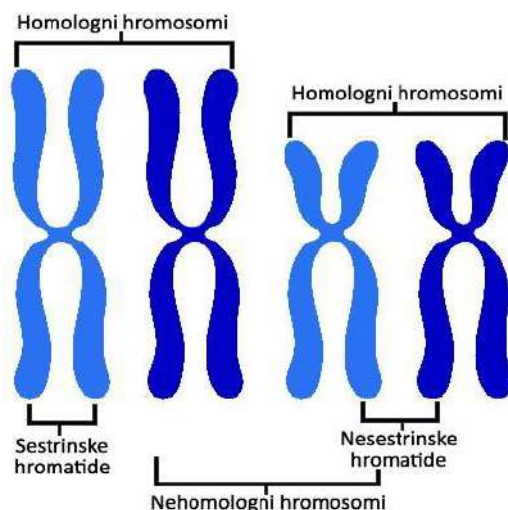
Slika 1.26. Isječak nukleosomnog vlakna s detaljnim prikazom nukleosoma

Sljedeći hijerarhijski nivo kondenzacije hromatina rezultat je spiralizacije i kondenzacije nukleosomnog vlakna, što omogućava histon H1. Ovim nivoom sabijanja formira se solenoidno hromatinsko vlakno (*solenoid*), promjera oko 30 nm, sa 6–10 nukleosoma u jednom navoju. Solenoidno hromatinsko vlakno dalje se kondenzira formirajući petlje različite dužine u asocijaciji s kiselim nehistonskim proteinima skeleta hromosoma te formira hromatinsko vlakno – *hromonemu*, promjera oko 300 nm. Daljom spiralizacijom i sabijanjem hromoneme nastaje *hromatida* metafaznog hromosoma promjera oko 700 nm. Različiti nivoi kondenzacije hromatina prikazani su na slici 1.27.



Slika 1.27. Prikaz različitih nivoa kondenzacije hromatina, od DNK do metafaznog hromosoma

Svaki metafazni hromosom sastavljen je od dvije hromatide. Hromatide metafaznog hromosoma genetički su identične pa se zovu *sestrinske hromatide*, a hromatide homolognih hromosoma su *nesestrinske hromatide* (slika 1.28).



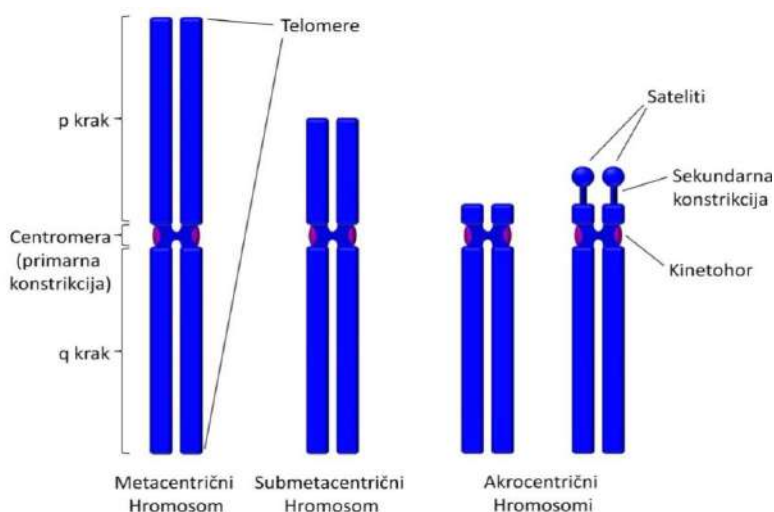
Slika 1.28. Uporedni prikaz dva para homolognih hromosoma

Centromera je funkcionalna struktura koja povezuje sestrinske hromatide svakog hromosoma. Jasno se uočava na metafaznim hromosomima kao suženje, tj. *primarna konstrikcija*. Centromera je područje strukturnog heterohromatina (centromerni, C-heterohromatin) i sadrži specifične, kratke, visoko repetitivne, nekodirajuće sekvence alfa-satelitne DNK. Intenzivno se boji specifičnim bojama, što omogućuje mikroskopsku analizu ovog regiona. Centromera je glavni aktivni faktor usmjerenog kretanja i normalne raspodjele hromosoma tokom ćelijske diobe. Centromera je glavni aktivni faktor usmjerenog kretanja i normalne raspodjele hromosoma tokom ćelijske diobe. Centromera dijeli hromosom na p i q krak koji mogu biti jednake ili različite dužine. Na osnovu pozicije centromere određuje se centromerni indeks (dužina kraćeg kraka podijeljena s ukupnom dužinom hromosoma). Prema položaju centromere razlikuje se nekoliko morfoloških tipova hromosoma (slika 1.29):

1. metacentrični – centromera locirana medijalno, kraci jednake dužine ($p = q$),
2. submetacentrični – centromera postavljena submedijalno, kraci nejednake dužine ($p : q = 1 : 1,5-3$) i

3. akrocentrični – centromera pri samom kraju hromatida, kratki (q) krak vrlo kratak ($p : q = 1 : 7$).

Postoji i četvrti tip hromosoma koji karakterizira prisustvo samo q kraka. To su telocentrični hromosomi koji nisu prisutni u kariotipu čovjeka.



Slika 1.29. Morfologija metafaznih hromosoma humanog kariotipa

Pored centromere – *primarne konstrikcije*, koju ima svaki hromosom, na određenim regionima nekih hromosoma postoje i tzv. sekundarna suženja – *sekundarne konstrikcije*. Sekundarne konstrikcije mogu biti terminalne (npr. na kratkim kracima akrocentričnih autosoma), u blizini centromere (npr. proksimalni dio dugog kraka hromosoma 1, 9 i 16), a mogu se nalaziti i na drugim dijelovima kratkog ili dugog kraka nekih hromosoma (npr. hromosoma 2 i 3).

Sekundarne konstrikcije su regioni slabije spiralizacije hromoneme koje se često ne mogu uočiti standardnom mikroskopskom analizom, zbog čega nisu pouzdan marker za identifikaciju hromosoma.

U sekundarnim konstrikcijama akrocentričnih hromosoma locirani su geni za sintezu određenih tipova rRNK. Ova se sinteza odvija u nukleolusu, pa se ta područja označavaju kao *regioni organizatori nukleolusa (NOR)*, a nukleolus je mjesto stvaranja ribosomskih podjedinica koje se u citoplazmi, tokom sinteze proteina, sjedinjuju u ribosome.

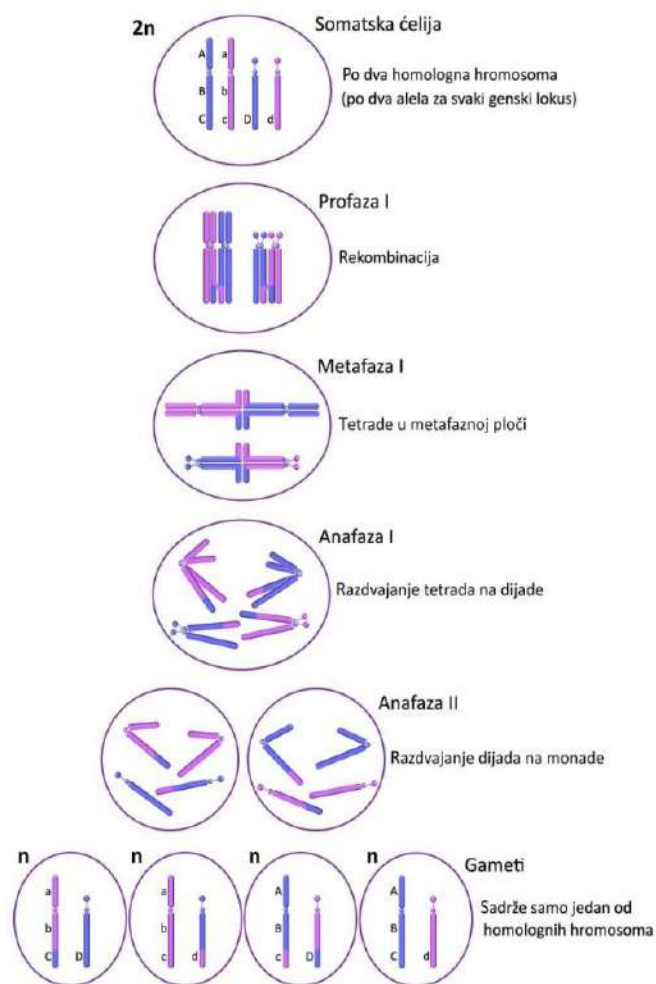
Svaki jednostruki hromosom, odnosno svaka hromatida metafaznog hromosoma, sadrži samo jednu linearnu molekulu DNK. Uzdužnu osnovu svake hromatide čini *hromonema*, nukleoproteinska nit građena od spomenute molekule DNK i proteina (slika 1.27). Na završecima molekule DNK, na oba hromosomska kraka, smještene su repetitivne sekvence TTAGGG, koje zajedno s proteinima izgrađuju krajeve hromosoma – *telomere* (grč. *telos* – kraj, *meros* – dio). Dužina telomera varira te je kod čovjeka u rasponu 5–20 kb. Varijabilnost dužine telomera uzrokovana je prirodom replikacijskog procesa molekule DNK, koji ne uspijeva u cijelosti replicirati krajeve linearne molekule DNK. Zbog toga se pri svakoj ćelijskoj diobi molekula DNK, odnosno telomera, skraćuje za približno 50 do 100 bp. Skraćivanje telomere dovodi se u vezu s biološkim, tj. ćelijskim starenjem, koje se još naziva *senecencija*.

S obzirom na to da su telomere važne za očuvanje integriteta i stabilnosti svakog hromosoma, u eukariotskim ćelijama djeluje enzim telomeraza, koja prepoznaje jednolančane krajeve DNK i katalizira sintezu novih telomernih sekvenci, nadoknađujući sekvence koje su se izgubile nepotpunom replikacijom.

Leonard Hayflick (1928–) 60-ih godina 20. vijeka utvrdio je da ćelija prođe kroz 40–60 ciklusa prije nego što prestane da se dijeli, tj. prije nego što prestane aktivnost telomeraze u njoj. Ovo ćelijsko ograničenje poznato je kao *Hajflickov limit* i upravo je uzrokovano skraćivanjem telomere, a na telomeraznu aktivnost utiču brojni faktori kao što su stres, prehrana, pušenje. S druge strane, većina malignih ćelija ima povećanu aktivnost telomeraze. Dokazano je da inhibicija aktivnosti telomeraze uzrokuje skraćivanja telomera i supresira proliferaciju tumorskih ćelija u kulturi.

1.5.2.3 Mejoza

Spolne ćelije (gameti) nastaju od somatskih, gametogonijalnih ćelija procesom gametogeneze. Dioba koja u ovom procesu omogućava redukciju količine nasljednog materijala, odnosno broja hromosoma s diploidnog na haploidan, naziva se *mejoza* (grč. *meiosis* – smanjenje, redukcija). Mejoza se odvija u gametogenom tkivu spolnih žlijezda, a sastoji se od dvije uzastopne diobe – *mejoze I*, u kojoj dolazi do redukcije broja hromosoma s $2n$ na n , i *mejoze II*, kojima prethodi jedna replikacija genetičkog materijala. Konačni rezultat mejoze su četiri haploidne, genetički različite ćelije. Mejoza je složen proces i obuhvata niz karakterističnih događaja koji omogućavaju redukciju broja hromosoma i genetičku varijabilnost gameta (slika 1.30).



Slika 1.30. Pregled ključnih događaja u mejozi

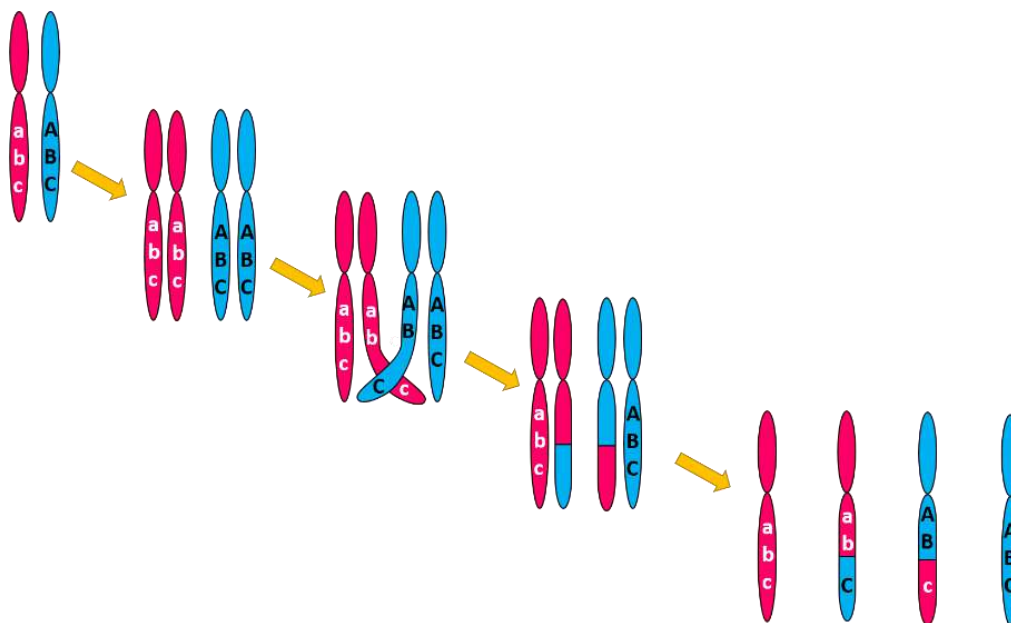
Mejoza I – redukcijska dioba je kompleksnija i duža od mitoze i mejoze II. Zbog kompleksnosti i specifičnih procesa, profaza mejoze I se dijeli na pet podfaza: *leptoten*, *zigoten*, *pahiten*, *diploten* i *dijakineza*.

Leptoten – u ćeliji je diploidan broj ($2n$) udvostručenih hromosoma u vidu tankih, dugih niti upletenih u klupko s jasno uočljivim tamnije obojenim (intenzivnije spiraliziranim) područjima *hromomere*. Ugljična vrijednost jedra je $4C$, sve do anafaze I.

Zigoten – spiralizacija i kondenzacija hromosoma se nastavlja. Odvija se prepoznavanje i uparivanje (*konjugacija*) homolognih hromosoma. Pravilno uparivanje podrazumijeva da se uparuju homologni regioni homolognih hromosoma, što omogućava proteinska struktura – tzv.

sinaptonemni kompleks, koji se obrazuje između nesestrinskih hromatida homolognih hromosoma približavajući ih te dovodeći u poziciju da mogu ukrstiti i razmijeniti dijelove svojih hromatida. Budući da svaki hromosom (*univalent*) sadrži dvije hromatide, novonastali kompleks je *bivalent*. Prema broju hromatida svaki hromosom je *dijada* (dvije monade), a *bivalent* je *tetrada* (dva puta dvije monade).

Pahiten – započinje nakon završene konjugacije. Nesestrinske hromatide homolognih hromosoma (*bivalenata*) razmjenjuju segmente (gene). Ovaj proces se označava kao *genetička rekombinacija* ili *krosing-over* (engl. *crossing-over*). Krosing-over omogućava da jedan hromosom sadrži kombinaciju gena od oba roditelja (slika 1.31). Na svakom paru humanih hromosoma prosječno se dogode 2–3 krosing-overa. Izostanak krosing-overa se označava kao neefektivna konjugacija. Što su geni bliže locirani na hromosomu, vjerojatnoća odvijanja krosing-overa između njih je manja i obrnuto. Iako kod sisara spolni hromosomi nisu homologni, na X i Y-hromosomima postoje mali homologni segmenti koji kod mužjaka konjugiraju i između kojih se odvija krosing-over.



Slika 1.31. Rekombinacija i krosing-over tokom mejoze

Diploten – sinaptonemni kompleks iščezava, homolozi se razmiču i udaljavaju jedan od drugoga, dok ostaju povezani u područjima označenim kao *hijazme*.

Dijakineza – kondenzovani, kratki bivalenti obrazuju, zavisno od broja i položaja hijazmi (koje su uglavnom postavljene terminalno), formacije različitog izgleda (npr. poput slova V, X ili broja 8).

Na kraju *profaze I* (ili u *prometafazi*) dezintegriše se jedarna membrana i jedarce (ili jedarca); kinetohorni mikrotubuli s jednog pola diobenog vretena vežu se za centromeru (kinetohor) jednog homologa, a mikrotubuli koji polaze sa suprotnog pola za kinetohor drugog homologa (svakog homolognog para) te pomjeraju bivalente k ekvatorskoj ravni.

Metafaza I – homologni hromosomi povezani hijazmama (bivalenti, tj. tetrade) smješteni su u središtu potpuno formiranog diobenog vretena, orijentisani svojim centromerama prema suprotnim polovima. Za centromerne regione svakog homologa vezani su kinetohorni mikrotubuli sa suprotnih polova diobenog vretena.

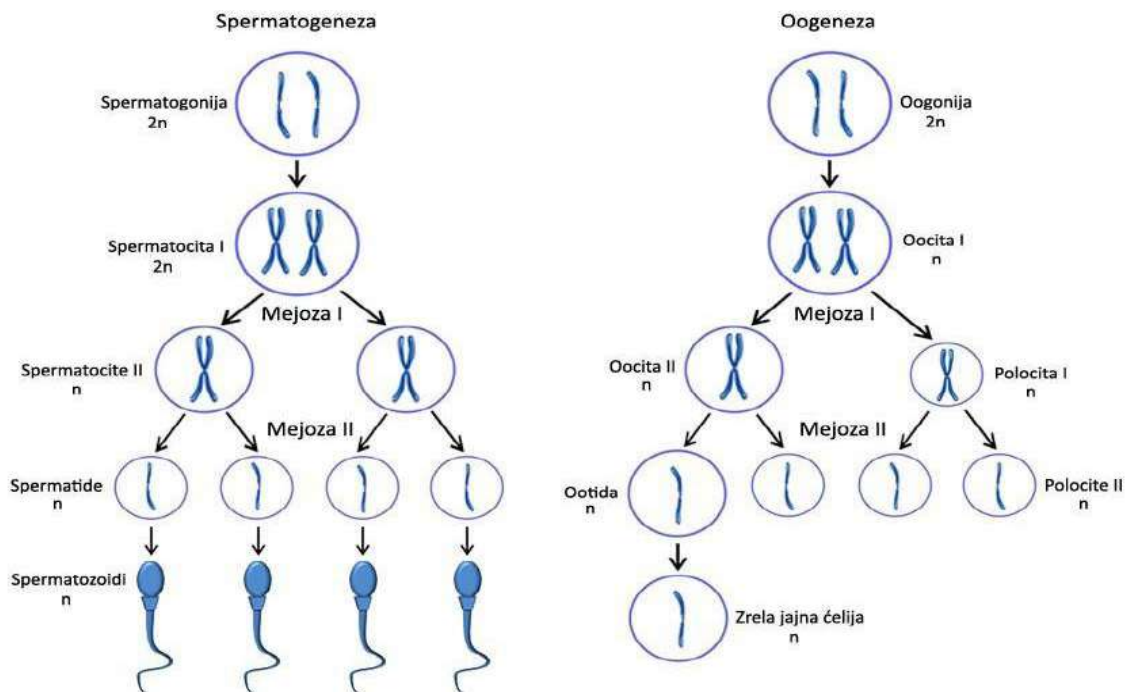
Anafaza I – kinetohorni mikrotubuli se skraćuju i povlače homologne hromosome ka suprotnim polovima, pri čemu hijazme pucaju, a homolozi se razdvajavaju. Jedan homolog svakog para odlazi prema jednom, a drugi prema suprotnom polu diobenog vretena. Razdvajanje homolognih hromosoma ključni je momenat u mejozi jer reducira broj hromosoma (mijenja se i ugljična vrijednost $4C \rightarrow 2C$). Prema svakom polu ćelije odlazi haploidan broj hromosoma (univalenata), a svaki se sastoji od dvije hromatide – dijade. Važno je istaći da se razdvajanje (segregacija) homolognih hromosoma ne događa pravilno, nego nasumice (u pogledu očevog ili majčinog porijekla). Stoga 23 homologna hromosomska para mogu dati 2^{23} (oko 8 miliona) genotipski različitih gameta, ne računajući raznolikost uzrokovanu krosing-overom.

Telofaza I – despiralizirani, međusobno isprepleteni hromosomi su na polovima, a oko njih se formira jedarni omotač i dva jedra s haploidnim brojem dvohromatidnih hromosoma – dijada (ugljična vrijednost oba novonastala jedra je $2C$). Iako sadrže jednak broj hromosoma, ova jedra su, zbog krosing-overa i slučajnog razdvajanja homolognih hromosoma, genetički različita. U mejozu I ulazi ćelija s diploidnim brojem hromosoma, tj. s po jednim setom hromosoma od oca i od majke. Po završetku telofaze I u dvjema novonastalim haploidnim ćelijama prisutne su nasumične kombinacije hromosoma porijeklom od oca i od majke.

Po završetku citokineze, formirane su dvije haploidne ćelije, koje poslije kratkog interfaznog perioda (*interkineze*) u kojem izostaje S faza, započinju *drugu mejotičku diobu* – mejozu II.

Mejoza II – ekvacijska dioba odvija se po modelu mitoze. Osnovna razlika je u početnom broju hromosoma, koji je u mitozu diploidan, dok u mejozu II stupaju ćelije koje sadrže haploidan broj dvohromatidnih hromosoma (dijada). *Profaza II* traje kratko. U *metafazi II* dijade su smještene u ekvatorskoj ravni. U *anafazi II* se razdvajaju dijade (hromatide svakog hromosoma) te prema svakom polu odlazi haploidan set jednostrukih hromosoma – monada, čime se mijenja ugljična vrijednost ($2C \rightarrow 1C$). U *telofazi II* despiralizirani hromosomi su na polovima ćelije, oko njih se formira jedarna membrana, tj. nastaje jedro.

Nakon citokineze formirane su haploidne ćelije, a u svakom hromosomu je po jedna molekula DNK te ugljična vrijednost jedra iznosi $1C$. Od jedne početne diploidne ćelije, nakon dvije uzastopne mejotičke diobe (mejoza I i II) u procesu gametogeneze, formiraju se četiri haploidne, genetički različite ćelije. Procesom spermatogeneze nastaju četiri muške spolne ćelije – *spermatozoidi*, dok oogenezom nastaje samo jedna zrela funkcionalna spolna ćelija – *oocita* i tri nefunkcionalne *polocite* (slika 1.32). Svako odstupanje od normalnih procesa u mejozi, a naročito tokom konjugacije u profazi I i razdvajanja homologa u anafazi I te razdvajanja hromatida u anafazi II, rezultira formiranjem aberantnih gameta. Oplođnja s aberantnim gametima u pravilu se odražava na razvoj ploda.



Slika 1.32. Uporedni prikaz gametogeneze spermatozoida i oocita

Literatura

- Allison, L.A. (2007). *Fundamental Molecular Biology*. Massachusetts, USA: Blackwell Publishing.
- Batty, P., Gerlich, D.W. (2019). Mitotic Chromosome Mechanics: How Cells Segregate Their Genome. *Trends in Cell Biology*, 29(9), 717-726.
- Bolsover, S.R., Shephard, E.A. White, H.A., Hyams, J.S. (2011). *Cell Biology: A Short Course* (3rd Edition). New Jersey, USA: Wiley-Blackwell.
- Brouwer, I., Lenstra, T.L. (2019). Visualizing transcription: key to understanding gene expression dynamics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 51, 122-129.
- Brown, T.A. (2002). *Genomes* (2nd Edition). Oxford, UK: Wiley-Liss.
- Campbell, N.A., Reece, J.B., Taylor, M.R., Simon, E.J. (2006). *Biology: Concepts & Connections* (5th Edition). San Francisco, USA: Pearson/Benjamin Cummings.
- Clark, M.S., Wall, W.J. (1996). *Chromosomes - The Complex Code*. London, UK: Chapman & Hall.
- Coffman, J.A. (2004). Cell cycle development. *Developmental Cell*, 6(3), 321-327.
- Cooper, G.M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd Edition). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates Inc.
- Cuvier, O., Fierz, B. (2017). Dynamic chromatin technologies: from individual molecules to epigenomic regulation in cells. *Nature Reviews Genetics*, 18(8), 457-472.
- Deakin, J.E., Potter, S., O'Neill, R., Ruiz-Herrera, A., Cioffi, M.B., Eldridge, M.D.B., Fukui, K., Marshall Graves, J.A., Griffin, D., Grutzner, F., Kratochvíl, L., Miura, I., Rovatsos, M., Srikulnath, K., Wapstra, E., Ezaz, T. (2019). Chromosomics: Bridging the Gap between Genomes and Chromosomes. *Genes (Basel)*, 10(8), 627.
- Đelić, N., Stanimirović, Z. (2009). *Principi genetike*. Beograd, Srbija: Elit Medica.
- Ekundayo, B., Bleichert, F. (2019). Origins of DNA replication. *PLoS Genetics*, 15(9), e1008320.
- Fragkos, M., Ganier, O., Coulombe, P., Méchali, M. (2015). DNA replication origin activation in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(6), 360-374.
- Gao, S.W., Liu, F. (2019). Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 20(6), 467-475.
- Gayon J. (2016). From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*, 339(7-8), 225-230.
- Haverić, S., Haverić, A., Hadžić, M. (2018). *Genotoksikologija*. Sarajevo, Bosna i Hercegovina: Univerzitet u Sarajevu - Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju.
- Hwang, J., Kim, Y.K. (2013). When a ribosome encounters a premature termination codon. *BMB Reports*, 46(1), 9-16.
- Ibrulj, S., Haverić, S., Haverić, A. (2008). *Citogenetičke metode - primjena u medicini*. Sarajevo, Bosna i Hercegovina: Univerzitet u Sarajevu - Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju.
- Khanna, P. (2008). *Cell and Molecular Biology*. New Delhi, India: I.K. International Publishing House.
- Kozak, M. (1999). Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 234(2), 187-208.

- Krebs, J.E., Goldstein, E.S., Kilpatrick S.T. (2011). *Lewin's genes X*. Sudbury, Massachusetts, USA: Jones and Bartlett.
- Levy, A., Albiges-Sauvin, L., Massard, C., Soria, J.C., Deutsch, E. (2011). Cycle cellulaire, mitose et applications thérapeutiques [Cell cycle, mitosis and therapeutic applications]. *Bulletin du Cancer*, 98(9), 1037-1045.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L., Matsudaria, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th Edition). New York, USA: W.H. Freeman and Company.
- Man, T., Witt, H., Peterman, E.J.G., Wuite, G.J.L. (2021). The mechanics of mitotic chromosomes. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 54, 10.
- Manjrekar, J., Shah, H. (2020). Protein-based inheritance. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 97, 138-155.
- Martincorena, I., Campbell, P.J. (2015). Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349(6255), 1483-1489.
- Merrick, W.C., Pavitt, G.D. (2018). Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(12), 033092.
- Morris, J.D., Payne, C.K. (2019). Microscopy and Cell Biology: New Methods and New Questions. *Annual Review of Physical Chemistry*, 70, 199-218.
- Murray, A. (1994). Cell cycle checkpoints. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(6), 872-876.
- Norppa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters*, 149(1-3), 309-334.
- O'Donnell, M., Langston, L., Stillman, B. (2013). Principles and concepts of DNA replication in bacteria, archaea, and eukarya. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(7), 010108.
- Ohkura, H. (2015). Meiosis: an overview of key differences from mitosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(5), 015859.
- Perge, P., Igaz, P. (2019). Basic Concepts of Genetics. *Experientia Supplementum*, 111, 3-19.
- Pocza, P., Santiago-Blay, J.A. (2021). Principles and biological concepts of heredity before Mendel. *Biology Direct*, 16(1), 19.
- Pojškić, L. (Ed.) (2014). *Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju* (2. izdanje). Sarajevo, Bosna i Hercegovina: Univerzitet u Sarajevu - Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju.
- Pope, S.D., Medzhitov, R. (2018). Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Molecular Cell*, 71(3), 389-397.
- Ribatti, D. (2018). An historical note on the cell theory. *Experimental Cell Research*, 364(1), 1-4.
- Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H. (Eds.) (1986). *Human Cytogenetics: A Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Schafer, K.A. (1998). The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology*, 35(6), 461-78.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., Van Bockstaele, D.R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation*, 36(3), 165-75.
- Zickler, D., Kleckner, N. (2015). Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), 016626.



2.

BIOLOŠKI TRAGOVI

AMIRA KEKIĆ

JASMINA ČAKAR

AMELA PILAV

MIRELA DŽEHVEROVIĆ

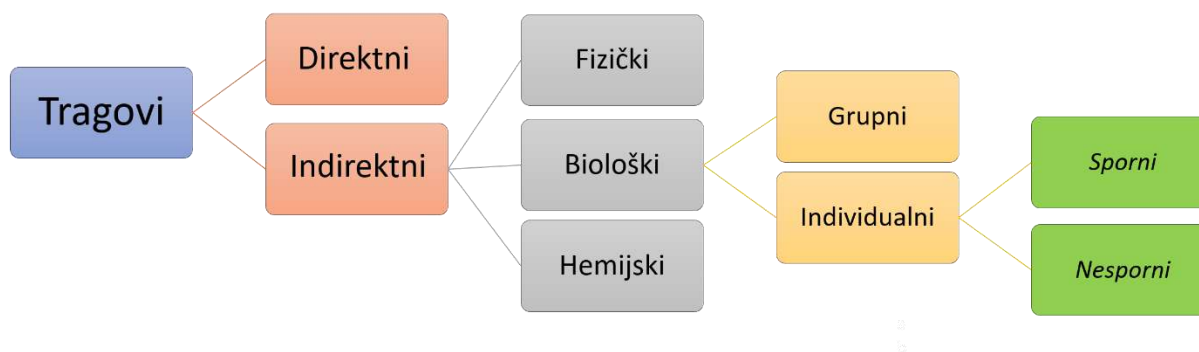
DAMIR MARJANOVIĆ

CRIME SCENE DO NOT CROSS

Trag je bilo koja vidljiva ili nevidljiva materija, pronađena na mjestu izvršenja krivičnog djela. Tragovi najčešće pružaju ključne informacije u procesu rješavanja zločina i zbog toga je vrlo važno pažljivo i detaljno pristupiti analizi mjesta izvršenja zločina te prepoznati, dokumentovati i prikupiti što veći broj tragova. Rješavanje svakog pojedinog slučaja zavisi od sklapanja slagalice čije dijelove čine svi prikupljeni dokazi, a koji u konačnici daju kompletnu sliku događaja.

Važnost tragova na mjestu zločina prvi je prepoznao i definisao dr. Edmond Locard (1877–1966), francuski kriminolog poznat i kao “francuski Sherlock Holmes”. Rečenicom “svaki kontakt ostavlja trag” postavio je osnovne postulate *traseologije*, discipline forenzičke nauke koja se bavi proučavanjem tragova, a koji su danas poznati kao *Locardov princip razmjene*. Princip razmjene podrazumijeva da će počinitelj zločina ostaviti neki trag na mjestu izvršenja krivičnog djela i s njega otići noseći sa sobom (na sebi) nešto što se može iskoristiti kao forenzički dokaz. Dva su osnovna postulata *Locardovog principa razmjene*: 1. kada osoba dođe u kontakt s objektom ili drugom osobom, može doći do transfera tragova; 2. intenzitet, trajanje i vrsta materijala pri kontaktu određuju obim prijenosa.

Svi tragovi pronađeni na mjestu izvršenja zločina mogu se svrstati u direktne i indirektne tragove (slika 2.1).



Slika 2.1. Šematski prikaz klasifikacije tragova u forenzičkoistražnim postupcima

Direktni tragovi, kao što im i samo ime kaže, direktno ukazuju na izvršenje zločina i tu spadaju videosnimak, izjava svjedoka i priznanje. Direktni tragovi mogu biti vrlo nepouzdana, posebno kada su u pitanju izjave svjedoka i priznanja, jer mogu dati lažnu sliku o samom zločinu uslijed niza faktora koji utiču na interpretaciju događaja. Tako, na primjer, izjave svjedoka mogu biti namjerno lažne i netačne, ali i nenamjerno, uslijed različitih percepcija konkretnih događaja koji nastaju kao rezultat subjektivnog doživljaja događaja. Slučajevi bazirani samo na izjavama svjedoka rezultirali su optuživanjem i zatvaranjem mnogih nedužnih osoba, a statistike pokazuju da je u Sjedinjenim Američkim Državama čak 87% pogrešnih optužbi zasnovano na izjavama svjedoka. Slično je i s priznanjem počinioaca zločina, koje često može biti nametnuto i iznuđeno. Zbog svega navedenog, svaki direktni trag treba biti samo jedna od slagalica u kompleksnom mozaiku istrage zločina. Za razliku od direktnih tragova, *indirektni tragovi* ukazuju na zločin, ali ga direktno ne dokazuju. Indirektni tragovi moraju se detaljno analizirati, a to najčešće podrazumijeva korištenje različitih stručno-naučnih metoda i ekspertiza. Što je veća količina indirektnih tragova na mjestu izvršenja krivičnog djela, to je veća vjerovatnoća da će se otkriti počinilac krivičnog djela. Sve indirektno tragove možemo podijeliti na *fizičke*, *hemijske* i *biološke*.

Fizički tragovi su vlakna, meci, čahure, oružje, fragmenti instrumenata i opreme te sve vrste otisaka na podlozi (otisci prstiju, stopala, cipela, guma i dr.). U hemijske tragove spadaju različite hemijske komponente i sredstva koji se mogu naći na mjestu zločina kao što su rastvarači, boje, kozmetika te droge i druga opojna sredstva.

Biološki tragovi su svi tragovi biološkog porijekla (humanog, animalnog, biljnog ili mikrobiološkog). Najčešće se na mjestu zločina nalaze, kao kompletni ili fragmentirani, organizmi ili, pak, veći ili manji fragmenti tkiva. Biološki tragovi mogu dati jasnu sliku o počinioцу zločina jer smanjuju broj osumnjičenih na nekolicinu ili najčešće na jednu individuu. Tu se posebno izdvajaju tragovi humanog porijekla (tkiva iz kojih je moguće izolovati molekulu DNK) koji mogu ukazivati na isključivo jednu osobu. Sve je tragove moguće podijeliti i na *grupne tragove*, koji sužavaju broj osumnjičenih na ograničen broj individua (npr. krvne grupe ABO sistema) i *individualne tragove* koji otkrivaju osumnjičenog (npr. otisci prstiju ili biološki tragovi iz kojih je moguće izolovati DNK). Grupni tragovi ponekad mogu biti individualizirani (npr. odjevni predmet za koji se zna da pripada tačno određenoj osobi).

2.1 TIPOVI BIOLOŠKIH TRAGOVA

Iako je svaki trag pronađen na mjestu zločina od iznimne važnosti i može predstavljati ključni faktor u rješavanju zločina, biološki tragovi najčešće daju precizne odgovore o počiniocu zločina jer ih je molekularnogenetičkim metodama moguće individualizirati i na taj način povezati konkretni trag sa izvršiocom zločina. Najčešći biološki tragovi humanog porijekla koji se nađu na mjestu zločina su: tragovi krvi (krv i krvne ćelije), tragovi sperme (sperma i sjemene ćelije), tkiva, organi, dlake, perut, nokti, skeletni ostaci, tjelesne izlučevine (pljuvačka, slina, mokraća, feces i ostalo) te epitelne ćelije na predmetima i podlogama. Od tragova životinjskog porijekla, najveći značaj u forenzičkim postupcima identifikacije počinioca i rješavanja zločina imaju dlake, feces i izlučevine, kao i kompletni ili fragmentirani organizmi. Među biljnim tragovima koji se najčešće pronalaze na mjestu zločina najznačajnije su intaktne biljke, svježe, ali i degradirano biljno tkivo, polen i dr.

U istražnim postupcima, biološki tragovi humanog porijekla dijele se na *sporne* i *nesporne*. *Sporni tragovi* predstavljaju tragove koji su pronađeni na mjestu zločina, bez obzira na njihovo biološko porijeklo, za koje se u trenutku pronalaska ne može sa sigurnošću tvrditi od koga potiču. *Nesporni tragovi* su tragovi prikupljeni od osoba čiji je identitet poznat, a to mogu biti osumnjičeni, oštećeni ili bliski srodnici osoba čiji se identitet utvrđuje. Uspoređivanjem rezultata analize za sporne i nesporne biološke tragove moguće je zaključiti od koje tačno osobe potiče trag pronađen na licu mjesta. Identifikacija tipa biološkog traga vrši se *prethodnim (orijentacijskim) metodama*, koje predstavljaju preliminarne *screening* testove. *Potvrdnim metodama* definitivno se potvrđuje prisustvo supstance u tragu i/ili određuje porijeklo traga. Prethodne metode koriste brze i jednostavne testove koji se najčešće mogu izvesti na mjestu zločina kako bi se utvrdilo prisustvo traga (npr. testiranje prisustva hemoglobina, tačnije iona željeza prisutnih u hemoglobinu, za dokazivanje prisustva krvi ili testiranje prisustva kisele fosfataze za dokazivanje prisustva sperme). Ipak, ovi testovi imaju određenu dozu nepouzdanosti jer mogu dati lažno pozitivne rezultate uslijed prisustva supstanci sličnih hemijskih osobina koje mogu da reaguju s testnom komponentom. Zbog toga se ovi testovi koriste samo kao preliminarni, kako bi se prepoznao trag, koji se zatim podvrgava potvrdnim testovima koji često zahtijevaju korištenje odgovarajuće opreme i stručnu osposobljenost eksperata, a najčešće se rade u laboratorijama opremljenim za te svrhe. U situacijama kada je dostupna mala količina traga, izbjegava se provođenje preliminarne testova

kako ne bi došlo do nepotrebnog gubitka dijela uzorka te se odmah pristupa provođenju potvrdnih testova. Danas je najčešće korišteni potvrdni test za gotovo sve biološke tragove molekularnogenetička analiza molekule DNK, koja omogućava individualizaciju traga, odnosno pouzdano povezivanje traga s počinioem zločina.

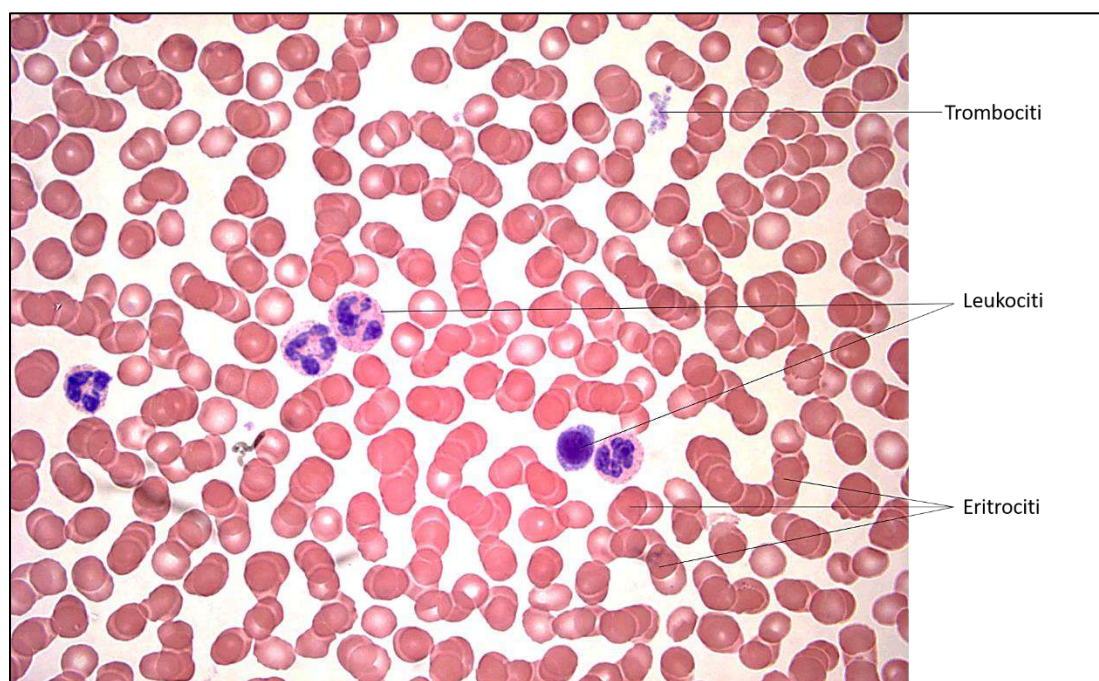
2.1.1 Forenzička serologija

Forenzička serologija bavi se detekcijom, identifikacijom, klasifikacijom i proučavanjem bioloških tragova tjelesnih tečnosti kao što su: krv, pljuvačka, sperma, vaginalni sekret, urin, majčino mlijeko, fekalije i znoj te njihovom povezanošću s mjestom zločina.

Tragovi tjelesnih tečnosti na mjestu krivičnog djela predstavljaju jednu od najvažnijih vrsta dokaza. Prvi korak identificiranja tragova tjelesnih tečnosti veoma je bitan, jer je sama priroda tjelesne tečnosti veoma informativna za istragu. Dokazivanje prisustva ovih tragova na mjestu zločina zahtijeva primjenu preliminarnih (engl. *screening*) testova, naročito kada se radi o maloj količini traga, pa čak i kada se radi o nevidljivim tragovima. Sposobnost prepoznavanja nepoznatih tragova na mjestu izvršenja krivičnog djela, bez čekanja na rezultate iz forenzičkih laboratorija, predstavlja kritičan korak u forenzičkoj analizi tjelesnih tečnosti. Prije svega, važno je što prije dobiti informacije o počinjenom djelu i počinioima, jer je u forenzičkoj praksi prvih 48 sati ključno za rješavanje krivičnog djela. Drugo, tragovi tjelesnih tečnosti mogu veoma brzo degradirati, zbog čega je veoma važno da se brzo detektuju i što prije pošalju na dodatne, odnosno potvrdne analize. Zbog izuzetnog forenzičkog značaja ovih tragova, metode identifikacije tjelesnih tečnosti intenzivno su se razvijale u posljednjih nekoliko godina. Značajan napredak laserske tehnologije i razvoj novih svjetlosnih detektora otvorili su nove mogućnosti razvoja preliminarnih nedestruktivnih metoda za identifikaciju tjelesnih tečnosti na mjestu izvršenja krivičnog djela. Ove metode su univerzalno primjenljive na sve tjelesne tečnosti, uključujući krv, pljuvačku, slinu, spermu, vaginalni sekret, urin i znoj. Sasvim je jasno da u slučajevima kada se zna o kojoj se tjelesnoj tečnosti radi, nije potrebna prethodna obrada serološkog materijala primjenom preliminarnih testova, nego se odmah primjenjuju potvrdni testovi. To su slučajevi utvrđivanja srodstva, identifikacije skeletnih ostataka, kao i svi slučajevi u kojima se krv koristi kao nesporni trag.

2.1.1.1 Tragovi krvi

U kriminalističkoj i forenzičkoj praksi najčešće pronađeni tragovi biološkog porijekla na mjestu događaja, žrtvi, osumnjičenom ili sredstvu izvršenja su tragovi krvi. Krv predstavlja tjelesnu tečnost koja protiče sistemom krvnih sudova kao rezultat neprekidnog rada srca. Ona je osnovni prijenosni sistem kisika i hranjivih materija u organizam te ugljičnog dioksida i štetnih materija iz organizma. Volumen krvi zdrave odrasle osobe iznosi 60–80 ml/kg tjelesne težine. Krv se sastoji od krvne plazme i krvnih ćelija. Plazma je žućkasta tečnost koja se dobija nakon centrifugiranja nekoagulirane krvi. Sadrži oko 90% vode, u kojoj su otopljene soli, proteini, šećeri, enzimi i drugi sastojci. Krvne ćelije (slika 2.2) čine crvene krvne ćelije (eritrociti), bijele krvne ćelije (leukociti) i krvne pločice (trombociti). Eritrociti predstavljaju ćelije koje primarno služe za transport kisika od pluća do tkiva. Leukociti predstavljaju odbrambeni sistem organizma od infektivnih bolesti i stranih tijela, dok je uloga trombocita zgrušavanje krvi na mjestu krvarenja.



Slika 2.2. *Ćelije krvi čovjeka, razmaz periferne krvi obojen May Grunvald-Giemsa bojom, uvećanje 100x*

U istražnim postupcima, kao i za druge tipove tragova, za analizu krvnih tragova veoma je bitna sistematičnost, temeljitost i misaona rekonstrukcija samog događaja, jer tragovi krvi mogu biti prisutni i u veoma malim količinama, nevidljivi golim okom.

Pronalaskom, fiksiranjem, prikupljanjem, ispitivanjem i analizom tragova može se dobiti uspješna identifikacija traga i forenzička individualizacija osobe od koje tragovi potiču, kao i vrijedni podaci koji će biti korisni prilikom obrade svih oblika krivičnih djela.

Tragovi krvi se pojavljuju u različitim krivičnim djelima protiv života i tijela, razbojništvima, silovanjima, saobraćajnim nesrećama, krađama i drugim oblicima krivičnih djela. Na osnovu izgleda, oblika i položaja pronađenih tragova krvi, mogu se tumačiti i razjasniti okolnosti pod kojima se desilo krivično djelo. Prilikom tumačenja tragova krvi, uvijek mora postojati određena doza opreza, jer određeni tragovi u različitim situacijama mogu nastati i u drugačijem obliku od očekivanog. Krv iz određenog izvora može pasti na podlogu jednostavnim kapanjem, pod uticajem sile zemljine teže. Međutim, krv iz određenog izvora krvarenja može imati smjer kretanja suprotan sili zemljine teže, pod pritiskom izazvanim pumpanjem srca, ponovljenim udarcem po zakrvavljenom dijelu tijela ili naglim pokretom zakrvavljenog dijela tijela ili predmeta. Na ovaj način nastaju različiti oblici tragova krvi. Dva su načina nastanka tragova krvi: *direktni* i *indirektni*.

Direktni tragovi krvi koji se mogu naći na mjestu krivičnog djela mogu imati različit izgled te ih dijelimo na:

- tragovi slijevanja krvi,
- tragovi krvi koji natapaju tkaninu,
- lokva krvi,
- tragovi krvi nastali padom iz udaljenosti,
- prskotine,
- tragovi krvi preneseni dodirrom – otisci i brisotine,
- ostaci krvi.

Indirektni tragovi nastaju nakon ispiranja zakrvavljenih predmeta i površina kao rezultat prikrivanja krivičnog djela. Ovi se tragovi detektuju upotrebom specijalnih lampi i reagensa.

Osim navedenog, na mjestu krivičnog djela mogu se pronaći i tragovi koji liče na krv, kao što su mrlje od crnog vina, čokolade, kečapa, karmina za usne, laka za nokte, tragovi hrđe, kafe i slično. Iako se čini jednostavno razlikovati navedene tragove od tragova krvi, važno je naglasiti da su na mjestu zločina vrlo rijetko optimalni uslovi za vizualno razlikovanje navedenih tragova. Zbog toga se primjenjuju različiti preliminarni testovi koji detektuju prisustvo hemoglobina te na taj način dokazuju krv u tragu.

Na osnovu pronađenih tragova krvi moguće je zaključiti odgovara li neki trag krvi udarnom prskanju ili pasivno padajućoj kapi krvi, orijentaciji tkanine ili odjeće i visini pada, što je vrlo važno za rješavanje počinjenog krivičnog djela.

2.1.1.1.1 Tragovi slijevanja krvi i natapanja tkanine krvlju

Krv se iz rane ili prirodnog tjelesnog otvora, djelovanjem sile zemljine teže, slijeva prema zemlji, uslijed čega nastaju tragovi krvi u obliku pruge. Na osnovu izgleda traga krvi, može se zaključiti u kojem se položaju nalazila osoba u trenutku i nakon povređivanja, nezavisno od položaja u kojem je pronađena. Tragovi krvi nisu uvijek jasni i čisti (slika 2.3). Ponekad povrijeđena osoba može svjesno ili nesvjesno razmazati ili obrisati trag.



Slika 2.3. Tragovi slijevanja (lijevo) i natapanja (desno)

Prilikom promjene položaja povrijeđenog, mijenja se i smjer kojom krv natapa okolnu tkaninu. Međutim, isticanje krvi iz krvnog suda nije neprekidna radnja. Samim povređivanjem zida krvnog suda organizam pokreće sve svoje faktore koji pomažu u procesu zgrušavanja krvi, kojim se

smanjuje i na kraju zaustavlja krvarenje. Prvenstveno dolazi do konstrikcije krvnog suda, stvaranja trombocitnog čepa, a zatim i formiranja krvnog ugruška te stabilizacije i razgradnje krvnog ugruška.

2.1.1.1.2 Lokva krvi

Lokva krvi kao trag može se pronaći na mjestu krivičnog djela, a predstavlja posljedicu obilnog krvarenja, na manje ili više ravnu neupijajuću podlogu, iz tijela koje miruje (slika 2.4). Oblik i veličina lokve zavise od nekoliko faktora kao što su: količine krvarenja, svojstva upijanja podloge (asfalt, drvena podloga), površine podloge (glatka, hrapava), nagiba podloge (vodoravno, pod uglom) te odnosa izvora krvarenja prema podlozi (slijeva li se krv direktno na podlogu ili preko odjevnog predmeta).



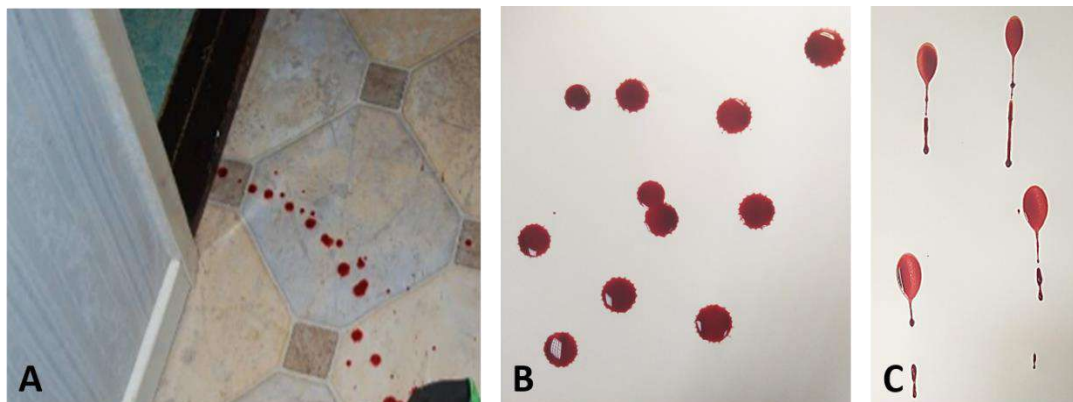
Slika 2.4. *Primjeri lokve krvi*

2.1.1.1.3 Kapi krvi

Kapi krvi, s kriminalističkog aspekta, predstavljaju najznačajnije tragove krvi. Prosječna količina krvi u jednoj kapi krvi iznosi 50 μ l (0,05 ml), međutim različiti faktori utiču na veličinu traga krvne mrlje. Kapi krvi nastaju kapanjem s manje ili veće visine, na ravnu ili kosu podlogu koja može biti glatka, hrapava, sa svojstvima upijanja ili bez njega (slika 2.5. A).

Oblici kapi krvi koje padaju na ravnu površinu zavise od visine pada i svojstava podloge na koju krv pada. Ako kap krvi padne s manje visine na vodoravnu glatku neupijajuću površinu, rub traga krvi ima okrugao oblik s jasnim granicama. Kap krvi koja padne s veće visine na istu podlogu ima

više-manje nazubljene ivice (slika 2.5. B), dok kap krvi koja pada s iste visine na hrapavu podlogu ima nepravilan izgled, zbog ispunjavanja ispupčenja i udubljenja same podloge. Također, kapi koje padaju vertikalno na kosu podlogu imaju karakterističan izgled (slika 2.5. C).



Slika 2.5. Izgled kapi krvi nastalih: A i B – vertikalno kapanje na vodoravnu glatku površinu, C – vertikalno kapanje na kosu površinu

2.1.1.1.4 Prskotine

Prskotine su tragovi krvi koji nastaju prskanjem krvi suprotno sili zemljine teže, zbog povrede velikog krvnog suda (arterije), ponovljenog udarca po već zakrvavljenom području ili naglog pokreta zakrvavljenog dijela tijela / predmeta (slika 2.6).



Slika 2.6. Prskotine

Iz položaja i raspodjele prskotina moguće je pretpostaviti položaj i kretanje izvora krvarenja. Iz rasporeda prskotina može se odrediti stav, položaj i kretanje izvora krvarenja. Obično se uz prskotine nalaze i kontaktne tragovi, kao i tragovi slijevanja krvi.

2.1.1.1.5 Tragovi krvi preneseni dodirrom

Krv se može prenijeti s dijela tijela ili predmeta koji je zamrljan krvlju na drugi dio tijela ili predmeta, namjerno ili nenamjerno, pri čemu mogu nastati otisci i manje-više nepravilne mrlje-brisotine (slika 2.7). Krvavi otisci u praksi imaju važan kriminalistički značaj te se na osnovu njih može utvrditi pravac kretanja pa čak i izvršiti identifikacija počinioca krivičnog djela. Krvavi otisci mogu biti s jednog ili više prstiju, dlana, stopala (đona), guma vozila ili predmeta. Često se na mjestima krivičnih djela (naročito provalne krađe) mogu pronaći krvavi otisci dlana ili prsta (ista slika 2.7. A). Oni mogu potjecati od žrtve, izvršitelja ili čak nekih trećih osoba.



Slika 2.7. A – krvavi otisak prsta, B – brisotina s otiskom

Krvavi otisci stopala (đonovi) nastaju prilikom nesmotrenog gaženja u trag krvi, a izražajnost je sve manja što je veća udaljenost od traga. Na temelju otiska stopala (obuće) može se zaključiti pravac kretanja te opće i individualne karakteristike obuće. Krvavi otisci predmeta kojim je nanesena povreda nekada se mogu pronaći i na komadu papira, posteljini, krpama, maramicama, peškirimima i slično. Najčešće izvršioци, želeći uništiti trag, vrše brisanje i čišćenje predmeta kojim su izvršili krivično djelo te na taj način nastaju i otisci i brisotine.

Brisotine predstavljaju tragove krvi koje nastaju brisanjem ili povlačenjem zakrvavljenog dijela tijela ili predmeta po drugom dijelu tijela ili predmetu. Nepravilnog su oblika i često se ne može odrediti kojim dijelom tijela ili predmeta je izvršen prijenos krvi na drugi dio tijela ili predmeta (slika 2.7. B).

2.1.1.1.6 Ostaci krvi

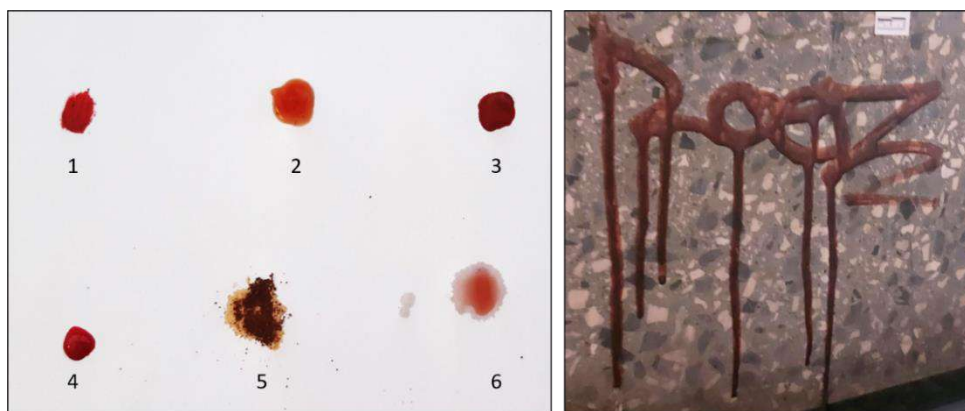
U slučajevima kada izvršilac nekog krivičnog djela želi da se riješi tragova krvi s određenog predmeta ili sa svojih ruku, odjeće ili obuće, najčešće pribjegava pranju tih predmeta. U slučajevima nepotpunog pranja i ispiranja, ostaju manje ili više vidljivi tragovi, koji po izgledu i mjestu pronalaska mogu ukazivati na to da se radi o tragovima krvi. Također, u posudama i na mjestima gdje su se prali zakrvavljeni predmeti često se mogu naći tragovi krvi, koji ne moraju uvijek biti vidljivi golim okom, ali se upotrebom određenih metoda dokazivanja mogu vrlo lako pronaći (slika 2.8).



Slika 2.8. Ostatak krvi na nožu nakon pranja noža. Na slici desno prikazano je pozitivno obojenje kojim se dokazuje prisustvo krvi

2.1.1.1.7 Tragovi nalik na krv

Tragovi krvi stajanjem na zraku, pod uticajem različitih faktora životne sredine, mogu izmijeniti izgled i boju toliko da ih je teško prepoznati i razlikovati od drugih mrlja koje potječu npr. od kafe, hrđe, čokolade, džema, karmina, laka za nokte, crnog vina, kečapa i slično (slika 2.9).



Slika 2.9. *Tragovi nalik na krv: lijevo 1 – karmin, 2 – kečap, 3 – tempera, 4 – lak za nokte, 5 – kafa, 6 – vino, desno sprej za grafite*

Vremenom, trag krvi mijenja boju iz tamnocrvene u smeđu i tamnosmeđu. Pod uticajem direktne sunčeve svjetlosti, trag krvi postaje sjajne ispucale, smeđecrne boje. Ako je vlažna, krv će ubrzo degradirati i promijeniti boju. Nekada i izmet muha i drugih insekata može ličiti na sitne prskotine.

2.1.1.1.7.1 Preliminarne metode testiranja tragova krvi

U forenzičkim laboratorijama, u svrhu identifikacije tragova krvi, koriste se jednostavni i brzi preliminarni testovi. Zavisno od starosti traga, podloge na kojoj se trag nalazi i djelovanja vanjskih faktora (uticaj direktne sunčeve svjetlosti, temperature, vlažnosti vazduha), tragovi krvi mogu izmijeniti izgled i boju pa ovi testovi predstavljaju odličan alat u rješavanju dileme da li se radi o tragu krvi. Međutim, pozitivna reakcija nije dokaz da se radi o tragu ljudskog porijekla, nego upućuje na potrebu daljnjeg ispitivanja pronađenog traga.

Ako se na mjestu zločina ne pronađu vidljivi tragovi krvi, kao ni drugih tjelesnih tečnosti (npr. urina, sperme, pljuvačke), njihovo eventualno prisustvo provjerava se primjenom UV lampi za detekciju tragova tjelesnih tečnosti.

Analiza se zasniva na pojavi luminiscencije, tj. emitovanja svjetlosti kao rezultata prisustva neke hemijske tvari. Postoje dva oblika luminiscencije, fotoluminiscencija i hemiluminiscencija. Fotoluminiscencija je emisija uzrokovana svjetlošću, pri čemu se razlikuju fluorescencija i fosforescencija. Fluorescencija predstavlja emisiju svjetlosti iz predmeta koji ima sposobnost apsorpcije svjetlosti ili neke vrste ionizirajućeg zračenja (ultraljubičasto ili rendgensko zračenje). Fosforescencija je emisija svjetlosti iz predmeta koji je bio osvijetljen i koji nastavlja da svijetli nakon što se ukloni izvor svjetla.

Hemiluminiscencija je emisija svjetlosti koja nastaje kao rezultat hemijske reakcije. Bioluminiscencija je oblik hemiluminiscencije koja predstavlja sposobnost živih bića da emituju svjetlost. Posebno je razvijena kod organizama koje žive u velikim dubinama mora. U istražnim postupcima najčešće se koristi hemiluminiscentna detekcija tragova. Najpoznatiji test koji se zasniva na hemiluminiscenciji je luminol test i veoma se često koristi za otkrivanje tragova krvi na mjestu krivičnog djela. Luminol u prisustvu vodikovog peroksida reaguje s hemoglobinom u krvi pri čemu nastaje plava hemiluminiscencija. Plava nijansa svjetlosti se emituje dok reakcija traje, a detektuje se u zamračenom okruženju. S obzirom na to da je dužina trajanja reakcije samo 30 sekundi, potrebno je nekoliko puta ponoviti apliciranje luminola. Iako je vremenski ograničen, intenzitet emisije plave svjetlosti ne zavisi od količine traga.

Danas se u praksi za dokazivanje prisustva krvi na površinama gdje to nije moguće vizualno utvrditi primjenjuje Bluestar®Forensic reagens (slika 2.10), koji se također zasniva na reakciji s luminolom. To je izuzetno osjetljiv test i predstavlja moćno sredstvo za detekciju krvnih mrlja bilo u zatvorenom ili na otvorenom prostoru, na svježim, osušenim, ispranim tragovima krvi, čistim ili razrijeđenim tragovima krvi, bez obzira na to jesu li u pitanju velike količine traga ili mikrotragovi vidljivi ili nevidljivi golim okom. Primjenom seta BlueStar®Forensic javlja se jača i vremenski duža hemiluminiscencija pa se emisija detektuje i u slabo zamračenim prostorima (slika 2.10. B i C). Dodatna prednost je što se reagens može primjenjivati više puta na istu krvnu mrlju, a da pri tome ne kompromitira uzorak i ne utiče na daljnje analize, kao što su npr. određivanje krvnogrupnog statusa ABO sistema ili analiza DNK. Istraživanjem je utvrđeno postojanje i lažno pozitivne hemiluminiscencije kod sredstava za kućnu upotrebu (izbjeljivači, sredstva za čišćenje i sl.) i hrane koja sadrži dosta vlakana, ali je u tim slučajevima reakcija hemiluminiscencije dosta slaba i varira od bijele do svijetloplave boje.



Slika 2.10. A – Bluestar® Forensic set, B – mjesto tretiranja prije primjene reagensa, C – mjesto tretiranja poslije primjene reagensa

Druga vrsta preliminarnih testova za dokazivanje krvi temelji se na katalitičkom djelovanju hemoglobina, koji u prisustvu vodikovog peroksida ubrzava reakciju oksidacije nekih organskih spojeva, uz nastajanje produkata koji se gotovo trenutno mogu vizualno uočiti, jer su karakteristične boje.

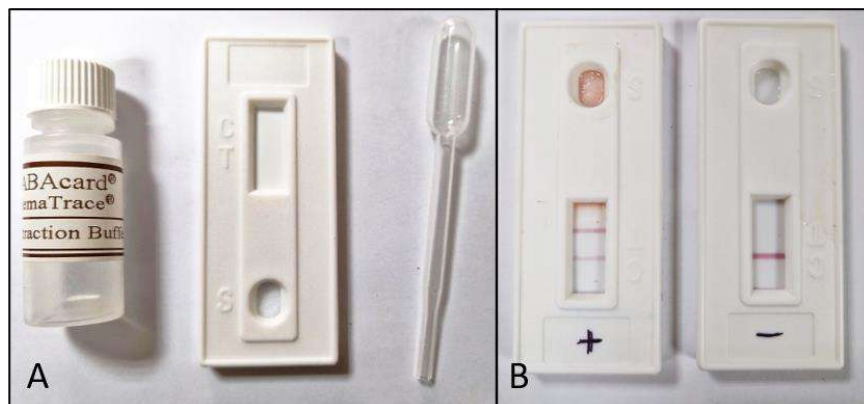
Nekada široko primjenjivani testovi, kao što su: benzidinski test (pozitivna reakcija daje plavo obojenje), test s fenolftaleinom (pozitivna reakcija daje ružičastocrveno obojenje), test s leukomalahit zelenim (pozitivna reakcija daje zelenoplavo obojenje), danas su zamijenjeni fabrički napravljenim testovima s indikatorskim trakama (testne trake Hemastix i Combur). Vizualno, reakcija promjene boje očitava se u roku od nekoliko do 60 sekundi (slika 2.11).



Slika 2.11. Combur testne trake (lijevo) s primjerom pozitivne i negativne reakcije (desno)

2.1.1.1.7.2 Potvrдне metode testiranja tragova krvi

Potvrđni testovi za određivanje tragova krvi podrazumijevaju korištenje analiza kojima se potvrđuje tačno porijeklo traga krvi. Među njima razlikujemo testove kojima se dokazuje je li krv humanog porijekla i testove koji omogućavaju individualizaciju traga (određuju kome pripada trag). Za utvrđivanje humanog porijekla traga, u forenzičkoj analizi krvnih tragova primjenjuje se imunološki precipitacijski test – test taloženja. Test se zasniva na reakciji antihumanog seruma s nekim proteinima krvi, uslijed čega dolazi do precipitacije (taloženja) vidljive golim okom. Ova reakcija izostaje ako se radi o životinjskoj krvi. Isti se test primjenjuje za određivanje vrste životinje od koje krv potječe. U takvim slučajevima koriste se komercijalni antiserumi, koji su dostupni za mnogobrojne životinjske vrste. Za dokazivanje krvi humanog porijekla danas se najčešće koriste komercijalni testovi ABACard®HemaTrace® (slika 2.12) i OBTI testovi, koji predstavljaju vrstu imunohromatografskih testova. Ovi testovi su visoko senzitivni i specifični te se koriste za *in vitro* detekciju humanog hemoglobina u tragu ili tragovima krvi. Rezultati se dobijaju u roku do 10 minuta, koliko traje sama reakcija.



Slika 2.12. A – ABACard®HemaTrace® test za potvrđno analiziranje tragova krvi humanog porijekla, B – prikaz negativne i pozitivne reakcije

Testovi koji se primjenjuju za utvrđivanje individualnog porijekla traga u forenzičkoj analizi traga su analiza krvnih grupa ABO sistema i analiza DNK. S obzirom na to da će analiza DNK detaljno biti opisana u narednom poglavlju, ovdje ćemo se osvrnuti samo na analizu krvnih grupa ABO sistema, koja predstavlja najpoznatiju i medicinski najvažniju distinkciju krvnih grupa.

2.1.1.1.7.2.1 Krvne grupe ABO sistema

Iako se danas u forenzičkim analizama bioloških tragova prednost daje analizi DNK, upotreba ABO sistema u različitim slučajevima je još uvijek opravdana pa čak i poželjna. Za razliku od analize DNK, determinacija krvnih grupa primjenom ABO sistema je prilično brza, jednostavna za izvođenje, rezultati su jasni i nedvosmisleni i, što je možda i najvažnije, znatno je jeftinija. Idealna je za isključivanje osumnjičenih lica kao počinilaca krivičnog djela, pri čemu se smanjuje broj uzoraka koji će biti procesuirani primjenom analize DNK.

Iako postoji nekoliko metoda za distinkciju krvnih grupa, najpoznatija i medicinski najvažnija je po ABO sistemu. Ovu diferencijaciju krvnih grupa uspostavio je Karl Landstainer (1868–1943) 1900. i 1901. godine, za šta je i dobio Nobelovu nagradu 1930. godine. Naime, nakon otkrića da miješanjem krvi različitih ljudi dolazi do zgrušavanja krvi, Landstainer je klasificirao ljudsku krv po grupama na A, B, AB i O grupe. Svjestan činjenice da transfuzije krvi nekad spašavaju život pacijenta, a nekad uzrokuju smrt, Landstainer otkriva dva antigena (antigen A ili antigen α i antigen B ili antigen β) na membrani eritrocita. Međutim, neki ljudi imaju antigene u tjelesnim tečnostima, uključujući slinu, suze i urin i dva antitijela (antitijelo anti-A i antitijelo anti-B) u krvnoj plazmi. Specifičnom kombinacijom ove četiri komponente (tabela 2.1) određuje se tip krvne grupe, i to: A, B, O i AB.

Tabela 2.1. Prikaz krvnih grupa ABO sistema

Krvna grupa	Antigen A (antigen α)	Antigen B (antigen β)	Antitijelo anti-A	Antitijelo anti-B
A	+	–	–	+
B	–	+	+	–
O	–	–	+	+
AB	+	+	–	–

Nakon što je Landstainer otkrio i opisao sistem krvnih grupa ABO, pretpostavio je da će se otkriti i drugi sistemi krvnih grupa. Naknadno su otkriveni sistemi krvnih grupa: MN, Rh, P, Lutheran, Lewis, Kelly, Duffy, Kidd, Diego, Sutter, Auberger, koji su našli svoju primjenu u transfuziologiji, transplantaciji organa i forenzičkim analizama.

Istraživanja Ludwiga Hirszfelda (1884–1954) i Emila von Dungerna (1867–1961) 1910. i 1911. godine pokazala su da su ABO krvne grupe nasljedne. Determiniraju se određenim genima na hromosomu 9 i rezultat su nasljeđivanja jednog od tri alela (A, B, O) od oba roditelja, što je prikazano u tabeli 2.2.

Tabela 2.2. Prikaz nasljeđivanja krvnih grupa – kombinacija alelnih varijanti koje determinišu krvnu grupu (slovo u zagradi)

Aleli roditelja	A	B	O
A	AA (A)	AB (AB)	AO (A)
B	AB (AB)	BB (B)	BO (B)
O	AO (A)	BO (B)	OO (O)

Određivanje krvnih grupa ABO sistema moguće je izvršiti iz svježe krvi, sasušениh tragova krvi, pa čak i iz tkiva. U različitim populacijama postoje razlike u procentualnoj zastupljenosti pojedinih krvnih grupa ABO sistema, što je pod uticajem faktora evolucije i zavisi od geografskog područja, migracija, bolesti, reprodukcione sposobnosti, tradicije i običaja. Najrasprostranjenija krvna grupa u centralnoj i istočnoj Evropi je krvna grupa A. Krvna grupa B je dosta rijetka u Evropi, a češće zastupljena u Kini, Indiji i drugim zemljama centralne Azije. Praktično je nema među američkim Indijancima i australskim Aboridžinima. Krvna grupa AB je najrjeđa krvna grupa, koja je zastupljena s čak 10% u Japanu, Koreji i Kini, dok je u drugim regionima taj procenat dosta niži. Krvna grupa nulta (O) u geografskom smislu predstavlja najrasprostranjeniju, ali ne i najfrekventniju krvnu grupu u svijetu. Predstavlja najčešću krvnu grupu u zapadnoj Evropi, Južnoj Americi i među Aboridžinima u Australiji. Procentualna zastupljenost krvnih grupa u svjetskoj populaciji je sljedeća: A – 43%, B – 16%, AB – 7%, O – 34%. Za bosanskohercegovačku populaciju procentualna zastupljenost je slična svjetskoj i za krvnu grupu A iznosi 42%, za B 15%, za AB 7% i za O 36%.

Sistemi krvnih grupa i faktora mogu poslužiti prilikom identifikacije u forenzičkoistražnim postupcima primjenom seroloških metoda. Krvne grupe u kriminalistici imaju ograničenu moć u cilju isključivanja osumnjičenih te nisu pouzdane za provjeru identiteta. Zahvaljujući tehnološkom napretku i uvođenju podobnih metoda u određivanje krvnih grupa, učinjen je značajan napredak, tako da se danas test primjenjuje za određivanje krvne grupe ABO sistema u različitim tipovima bioloških tragova (npr. pljuvačka, slina, znoj, mokraćna, izmet itd.), ali i za sasušene tragove i

mikrotragove. Danas je čak moguće utvrditi krvnu grupu iz čvrstih tkiva (vlasi kose i mišići). Kao što je već rečeno, prednost korištenja testova za određivanje pripadnosti krvnih grupa je što su oni brzi, jednostavni za izvođenje i jeftini. Osim toga, krvne grupe se ne mijenjaju pod uticajem faktora okoline tokom života te, kao i otisak prsta, predstavljaju nepromjenljiv primarni karakter.

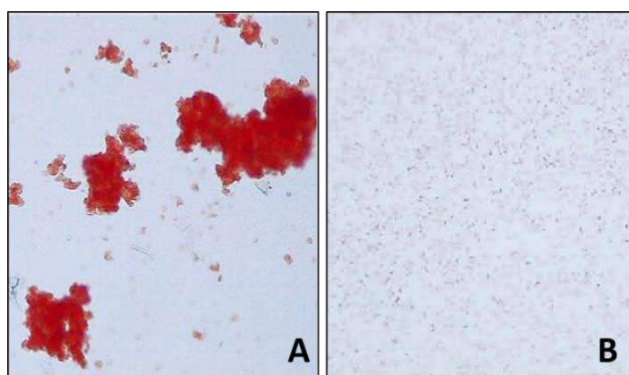
S druge strane, test nije primjenljiv za utvrđivanje identiteta, ali se ipak u nekim slučajevima koristi prilikom forenzičke obrade traga za isključivanje pripadnosti individue određenoj krvnoj grupi ABO sistema. Na primjer, ako je na mjestu zločina pronađen krvni trag za koji je utvrđeno da pripada krvnoj grupi A, a osumnjičeno lice ima krvnu grupu AB, onda je moguće, bez prethodno provedene analize DNK, potvrditi da trag ne potiče od osumnjičene osobe.

Testovi za određivanje krvne grupe ABO sistema iz tačne krvi zasnivaju se na detekciji aglutinacije koja nastaje kao rezultat imunološke reakcije antigena s antitijelom (npr. anti-A s antigenom A). Pri određivanju krvne grupe, kap krvi se tretira anti-A, anti-B i anti-AB testnim serumima. Ako je prisutna aglutinacija i s anti-A i anti-AB, onda je u pitanju krvna grupa A. Ako se pojavi aglutinacija u reakciji s anti-B i anti-AB, onda se radi o krvnoj grupi B. Za krvnu grupu AB karakteristična je pojava aglutinacije na sva tri testna seruma, dok odsustvo reakcije nakon dodavanja sva tri testna seruma ukazuje na krvnu grupu O.

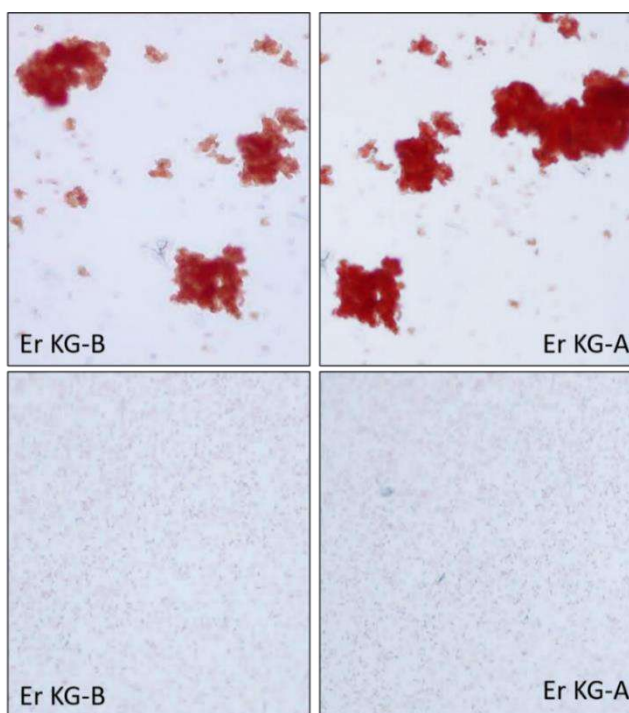
2.1.1.1.7.2.1.1 Tehnike određivanja krvnih grupa ABO sistema iz sasušanih uzoraka krvi

Za određivanje krvnih grupa ABO sistema iz sasušanih uzoraka krvi najčešće se koristi modificirana apsorpcijsko-inhibicijska i Lattesova metoda. Modificirana apsorpcijsko-inhibicijska metoda koristi se za sasušene tragove krvi različite starosti i veličine, na različitim podlogama.

Sama tehnika se zasniva na sposobnosti aglutinogena da iz seruma veže aglutinin, a rezultat se očituje kao pojava (slika 2.13. A) ili odsustvo (slika 2.13. B) aglutinacije eritrocita određene krvne grupe. Očitavanje rezultata vrši se primjenom svjetlosnog mikroskopa. Pojava aglutinacije eritrocita na oba ispitivana uzorka znači da se radi o tragu nulte krvne grupe (O), dok odsustvo aglutinacije eritrocita na oba ispitivana uzorka znači da se radi o tragu krvne grupe AB (slika 2.14).

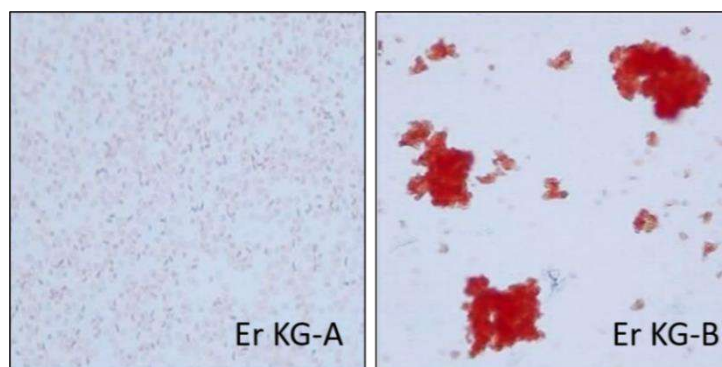


Slika 2.13. A – fotomikrograf (40x) aglutinacija, B – odsustvo aglutinacije test eritrocita

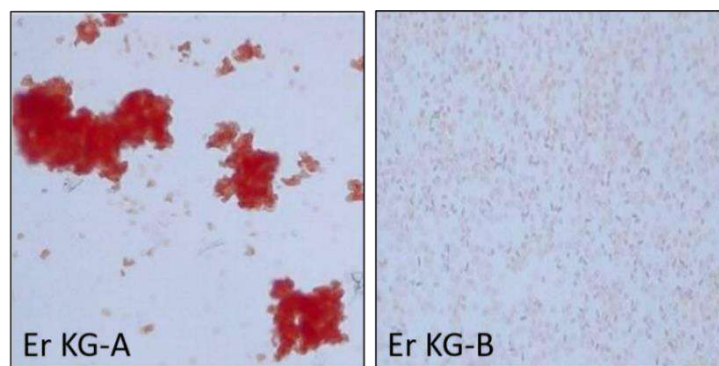


Slika 2.14. Aglutinacija eritrocita krvne grupe B (Er KG-B) i eritrocita krvne grupe A (Er KG-A) ukazuje na krvnu grupu 0 (slike gore), dok odsustvo aglutinacije (slike dolje) ukazuju na krvnu grupu AB

Pojava aglutinacije na ispitivanom uzorku s eritrocitima krvne grupe B, a njeno odsustvo u uzorku sa eritrocitima krvne grupe A (slika 2.15), znači da se radi o tragu krvi krvne grupe A, dok pojava aglutinacije na ispitivanom uzorku s eritrocitima krvne grupe A, a njeno odsustvo u uzorku sa eritrocitima krvne grupe B (slika 2.16), znači da se radi o tragu krvi krvne grupe B.



Slika 2.15. Dokazivanje krvne grupe A na osnovu odsustva aglutinacije za eritrocite krvne grupe A (Er KG-A) (lijevo) i pojave aglutinacije za eritrocite krvne grupe B (Er KG-B) (desno)



Slika 2.16. Dokazivanje krvne grupe B na osnovu pojave aglutinacije za eritrocite krvne grupe A (Er KG-A) (lijevo) i odsustva aglutinacije za eritrocite krvne grupe B (Er KG-B) (desno)

Lattesova metoda predstavlja metodu testiranja na aglutinine, a koristi se za tragove krvi u obliku suhih ljuspica, za uzorke stare do šest sedmica. Očitavanje rezultata se također vrši pod mikroskopom. Ova metoda, prema mišljenju mnogih stručnjaka, predstavlja sigurnu metodu za identifikaciju krvnih grupa A, B ili O, ali ne i krvne grupe AB.

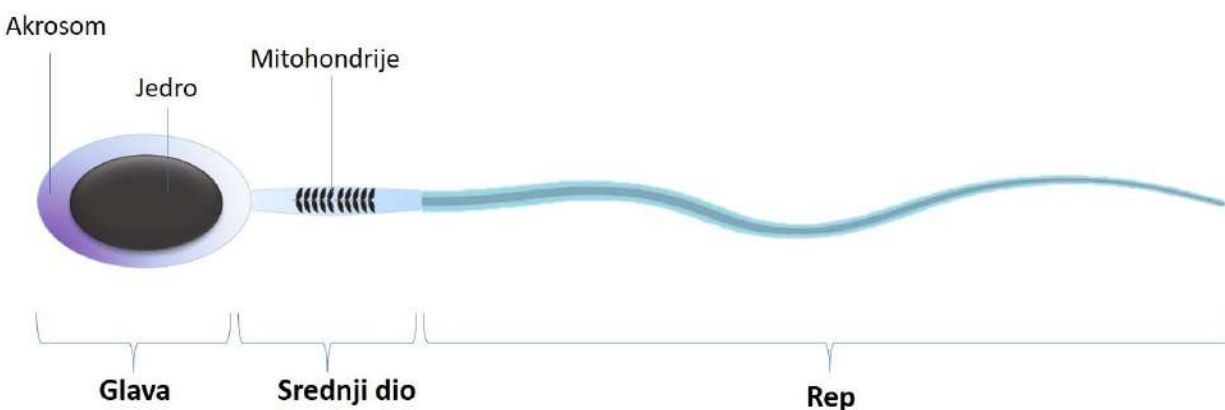
Iako testiranje krvnih grupa ABO sistema iz sasušanih tragova krvi u forenzici predstavlja metodu koja se rijetko koristi u svijetu, na ovim prostorima ona i dalje predstavlja aktuelnu, pouzdanu i jeftinu metodu te se koristi kao metoda isključenja prije primjene analize DNK.

2.1.1.2 Sjemena tečnost kao biološki trag

U krivičnim djelima protiv dostojanstva osobe i morala (silovanje, bludne radnje i drugi oblici nedozvoljenog seksualnog odnosa) tragovi sperme se smatraju najvažnijim dokazom jer se na osnovu njih, a primjenom odgovarajućih identifikacijskih metoda, mogu donijeti ključni zaključci o počinocu i počinjenom krivičnom djelu. Pored niza postupaka koje podrazumijeva istraga slučajeva seksualnog napada, poseban akcenat je na karakterizaciji bioloških dokaza porijeklom od ljudi, a koji uključuju tragove sperme, vaginalnog iscjetka, kao i njihove mješavine. Otkrivanje i najmanje količine sperme vrlo često predstavlja ključnu tačku istrage i može pružiti čvrste dokaze u slučajevima seksualnog napada.

Sjemena tečnost (sperma) predstavlja kompleksnu želatinoznu žućkastobjeličastu tjelesnu tečnost sastavljenu od žljezdanog sekreta i spermatozoida koji vode porijeklo iz različitih dijelova muškog reproduktivnog sistema (prostata, sjemeni mjehurići i testisi).

U jednom ejakulatu nalazi se od 1,5 do 5 ml sperme (prosječno 3,5 ml) i sadrži od 50 do 150 miliona spermatozoida. U sastav sperme, pored spermatozoida, ulaze organske i anorganske tvari poput aminokiselina, šećera, mineralnih soli, iona itd. Spermatozoidi su karakteristične ćelije sperme i sadrže genetičku informaciju. Spermatozoid je u prosjeku dug od 50 do 60 μm i ima tri glavne strukture: glavu koja sadrži DNK, srednji dio i rep (slika 2.17).



Slika 2.17. Šematski prikaz spermatozoida

Na mjestu zločina, tragovi sperme se mogu pronaći na različitim objektima i površinama. Često se pronalaze i u rodnici žene (žrtve), na odjeći i na tijelu žrtve i počinitelja. Tijelo žrtve može biti najvažnije mjesto pronalaska tragova sperme. Radi očuvanja dokaza bitno je da se tragovi prikupe što prije nakon snošaja. Kvalitetniji dokazi se očekuju ako se tragovi sperme prikupe unutar 24 sata, ali nekada mogu biti očuvani i nekoliko dana od počinjenja seksualnog delikta. Istraživanja pokazuju da su pokretni spermatozidi u vagini detektabilni u prvih 6–28 sati nakon snošaja, a u cerviksu 3–7 dana. Nepokretni spermatozoidi se održavaju duže, i to 14 sati do 10 dana u vagini, 7–10 dana u cerviksu, 2–31 sat u ustima i 4–113 sati u rektumu. S obzirom na značaj tragova sperme za forenzičku istragu, njihovo prikupljanje mora se obaviti na pravilan način. Trag sperme može ostati očuvan i do nekoliko godina ako nije bio izložen uticaju negativnih vanjskih faktora poput vlage, direktne sunčeve svjetlosti ili ako predmeti na kojima se nalazio trag sperme nisu oprani.

Međutim, na očuvanje tragova sperme vrlo negativno djeluju i biotički faktori kao što su vaginalni sekret i mikroorganizmi koji brzo utiču na proces degradacije. Također, negativan učinak na očuvanje sperme ima pljuvačka, kao i prisustvo fecesa. Zanimljiv je podatak da je proces degradacije traga sperme nešto sporiji u slučaju smrtnog ishoda žrtve te je moguće i nakon 5 dana ove tragove prikupiti i koristiti u forenzičkoj istrazi. Često, ako se prikupi unutar 48 sati, trag sperme prikupljen sa spolnog organa potencijalnog počinitelja seksualnog delikta može se uspješno analizirati i dati validne rezultate.

Za prikupljanje spornog traga sperme uglavnom se primjenjuju iste ili slične metode kao i prilikom prikupljanja krvi ili pljuvačke. Proces prikupljanja uzorka sperme zavisi od toga radi li se o sasušanim ili svježim tragovima sperme te je li moguće dostaviti kompletne predmete s kojih se prikuplja sperma na analizu. Forenzička DNK analiza bioloških tragova iz vaginalnih briseva, prikupljenih kao dokaz seksualnog napada, često zahtijeva ekstrakciju DNK u cilju dobijanja dviju frakcija DNK: odvojene spermatozoidne (tj. muške) i nespermatozoidne (npr. ženske vaginalne epitelne) frakcije. Ako se želi dokazati prisutnost DNK žrtve u uzorku, tada se koristi nespermatozoidna frakcija, dok se, s druge strane, spermatozoidna frakcija koristi za identifikaciju počinitelja seksualnog napada.

2.1.1.2.1 Makroskopski pregled tragova sperme

Ljuskavost i bjelkastosivkasta ili žućkasta boja glavne su karakteristike mrlje sperme koja pod UV svjetlom fluorescira plavoljubičasto. Prvi korak detekcije tragova sperme najčešće je vizualni pregled, a ako je trag teško uočljiv, može se primijeniti alternativni izvor svjetlosti (engl. *Alternative Light Source* – ALS), koji nema negativan uticaj na tragove. Prednost korištenja ove metode je što omogućava brzu analizu velikih površina bez obzira na boju materijala na kojem se nalaze tragovi sperme. Sve to uveliko olakšava prikupljanje uzoraka s mjesta na kojem je počinjeno krivično djelo.

Ipak, treba imati na umu da pljuvačka, urin i vaginalni sekret sadrže molekule koje pod UV svjetlom ili argonskim svjetlom mogu fluorescirati ili emitirati svjetlost u području vidljive svjetlosti, što može rezultirati pogrešnim zaključkom da se radi o tragovima sperme. Sirchie Mini Bluemaxx III Forensic Light Kit (slika 2.18) predstavlja odličan alat za identifikaciju različitih fizioloških tečnosti (urin, pljuvačka i sperma). Prisustvo sperme u tragu dokazuje se preliminarnim i potvrdnim testovima čiji redoslijed primjene zavisi od konkretne situacije, ali i od prakse tretiranja tragova svake forenzičke laboratorije.



Slika 2.18. Sirchie Mini Bluemaxx III Forensic Light Kit

2.1.1.2.2 Preliminarne metode testiranja tragova sperme

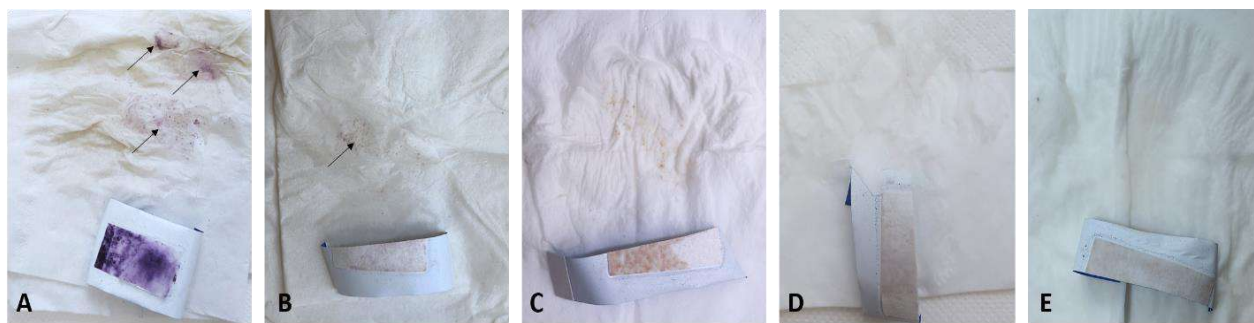
U sastav sperme ulazi enzim kisel fosfataza (engl. *Acid Phosphatase* – AP) koji luči prostata. Ovaj enzim se u spermi, u odnosu na druge tjelesne izlučevine, nalazi u značajno većoj koncentraciji (100–1000 puta više nego u drugim tjelesnim tečnostima). Upravo ovako visoke koncentracije kisele fosfataze predstavljaju osnovu najvećeg broja komercijalno dostupnih preliminarnih testova za detekciju prisustva sperme u biološkim tragovima.

Koncentracija enzima nije u korelaciji s prisutnošću spermatozoida u uzorku pa se primjenom ovog testa ne može odrediti broj spermatozoida po jedinici sjemene tečnosti. Najčešće primjenjivani test za detekciju tragova sperme je test Phosphatesmo KM (slika 2.19) koji se zasniva na detekciji kisele fosfataze uz pojavu karakterističnog ljubičastog obojenja.

Izvođenje testa je vrlo jednostavno i brzo. Potrebno je namočiti trag fiziološkom otopinom ili sterilnom vodom i pričekati jednu minutu te na trag prisloniti testnu trakicu. Pojava ljubičaste boje znak je pozitivnog rezultata testa, odnosno prisustva enzima kisele fosfataze. Intenzitet obojenja je u korelaciji s koncentracijom enzima (slika 2.20).



Slika 2.19. Set za izvođenje Phosphatesmo testa



Slika 2.20. Rezultati *Phosphatesmo* testa u reakciji s različitim vrstama bioloških tragova:
A – trag sperme – intenzivno ljubičasto obojenje ukazuje na prisustvo sperme (strelice pokazuju ljubičasto obojenje na podlozi, s prisustvom karakterističnog tačkastog obojenja),
B – vaginalni bris – nespecifično ružičasto obojenje koje nastaje kao rezultat prisustva malih količina kisele fosfataze u vaginalnom iscjetku, C – trag urina – odsustvo ljubičastog obojenja,
D – trag pljuvačke – odsustvo ljubičastog obojenja, E – sterilna voda – odsustvo ljubičastog obojenja

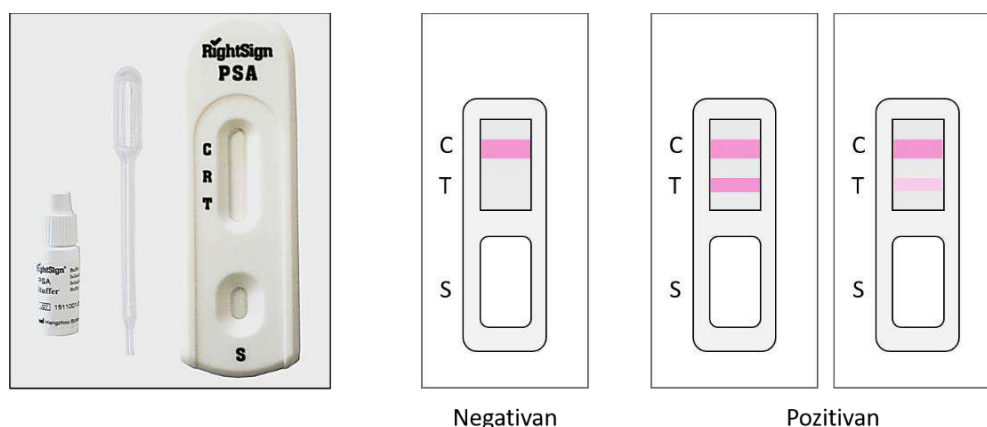
Pored testa *Phosphatesmo*, za detekciju tragova sperme primjenjuje se i test *Brentamine Fast Blue B*. Test se zasniva na pojavi karakterističnog ljubičastog obojenja koje nastaje kao rezultat reakcije alfa-naftil fosfata i reagensa *Brentamine Fast Blue B* u prisustvu visokih koncentracija kisele fosfataze. Prije dodavanja reagensa *Brentamine Fast Blue B* potrebno je sterilnom vodom navlažiti sterilni filter papir kojim se tretira ispitivani trag. Ljubičasto obojenje, ako se pojavi u roku od dvije minute, dokaz je prisustva sperme u ispitivanom tragu.

Važno je naglasiti da se u oba testa nespecifično ljubičasto obojenje javlja u tragovima vaginalnog iscjetka, urina i pljuvačke (slika 2.20). S druge strane, na obojenim podlogama može biti teško detektovati obojenje, što može biti uzrok lažno negativnog rezultata. Na aktivnost enzima kisele fosfaze negativno utiče i vrijeme proteklo od prikupljanja uzorka, što također može dovesti do pojave lažno negativnih rezultata tokom preliminarnih testova detekcije sperme.

2.1.1.2.3 Potvrдне metode testiranja tragova sperme

Potvrдне metode testiranja tragova sperme su analiza prisustva prostata-specifičnog antigena (PSA) te detekcija prisustva spermatozoida primjenom mikroskopske analize. Prostata-specifični antigen (engl. *Prostate Specific Antigen* – PSA) je glikoprotein koji stvaraju ćelije prostate, a izlučuju se u krv i sjemenu tekućinu, gdje mu je i najviša koncentracija (0,5–3,0 mg/ml).

Poznat je još i kao p30 i služi kao marker za dokazivanje prisustva sperme. Postoji više načina detekcije PSA u tragovima sperme. Nekada je za analizu p30 korišten standardni ELISA (engl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) test koji se zasniva na vrlo osjetljivoj reakciji antitijelo – antigen. Sama metoda je dugotrajna, zahtjevena i podrazumijeva analizu većeg broja uzoraka, što za većinu forenzičkih laboratorija nije ekonomično zbog malog broja uzoraka, za razliku od dijagnostičkih laboratorija. Danas su na tržištu prisutni komercijalni imunohromatografski testovi kao što je PSA Check Test (slika 2.21). Test se zasniva na brznoj, jednostavnoj i relativno pouzdanoj detekciji humanog PSA. Moguće ga je primijeniti i na uzorke koji vode porijeklo od azoospermičnih i vazektomiziranih osoba. Budući da su PSA testovi po senzitivnosti slični ili jednaki ELISA testu, predstavljaju održivu alternativu u forenzičkim laboratorijama.



Slika 2.21. PSA test sa šematskim prikazom pozitivnog i negativnog rezultata testa

Testovi funkcioniraju slično testu za utvrđivanje rane trudnoće. Analiza se izvodi tako što se uzorak nanosi na membranu na kojoj se nalaze vezana antitijela (antihumana PSA). Prilikom testiranja prati se pojava obojenja i, ako je prisutan antigen p30 na testnoj poziciji, pojaviće se i obojenje. Također, obojenje je uvijek prisutno na kontrolnoj poziciji, čime se potvrđuje ispravnost

testa. Ako se ovim testom potvrdi prisustvo sperme, može se raditi analiza DNK kako bi se utvrdilo porijeklo traga. Ipak, ako se u testiranom uzorku nalazi urin, periferna krv ili neki drugi sekret, moguća je pojava lažno pozitivnih rezultata. Međutim, koncentracija p30 u spermi je oko 100–1000 puta veća nego u drugim tjelesnim tečnostima.

Identi-PSA Semen Detection Test Kit i BLUESTAR®Identi-PSA® su kvalitativni, komercijalno dostupni testovi s vrlo visokom senzitivnošću na prisustvo PSA. Koriste se za brzu detekciju PSA u uzorcima kao što su: krv, plazma i serum u svrhu medicinske dijagnostike. Međutim, ovi testovi su vrlo pogodni za primjenu u forenzičkim laboratorijama kada su u pitanju uzorci sperme prikupljeni s tijela ili odjeće žrtve seksualnog napada.

Među potvrdne testove prisustva sperme ubraja se i test RSID-Semen (slika 2.22) koji se zasniva na detekciji prisustva proteina semenoleglin (Sg). To je antigen koji je glavna komponenta humane sperme za koju je specifičan i ne može se zamijeniti s drugim tjelesnim tečnostima porijeklom od žene ili spermom drugih sisara. Test RSID-Semen koristi dva antisenogelin-monoklonska antitijela u imunohromatografskom formatu za testiranje bočnog protoka kako bi se detektovalo prisustvo sperme u tragu. Test je precizan, ponovljiv, jednostavan za upotrebu i može detektovati spermu na raznim materijalima i površinama.



Slika 2.22. RSID-Semen set za testiranje prisustva sperme

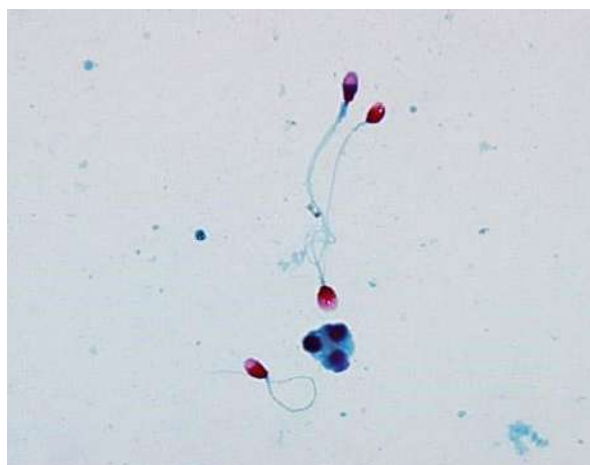
U većini laboratorija kao potvrdni test prisustva sperme u dokaznom materijalu provodi se direktno mikroskopsko posmatranje spermatozoida koje je veoma bitno ako se želi uraditi DNK profiliranje (slika 2.23).

Aspermija (potpuno odsustvo spermatozoida) ili oligospermija (prisustvo relativno malog broja spermatozoida) kod muškaraca mogu biti uzrok neuspješne DNK analize tragova sperme. Zbog ovoga je bilo neophodno razviti metode koje će omogućiti detekciju spermatozoida, posebno u osušenim uzorcima npr. s upijajućih površina (kao što su tkanine) ili uzoraka prikupljenih s tijela čovjeka.



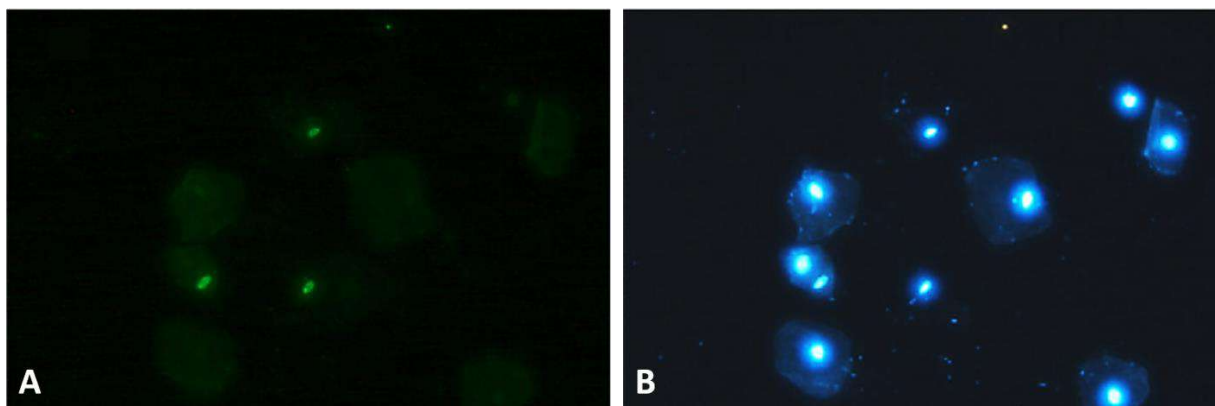
Slika 2.23. Izgled spermatozoida pod mikroskopom (uvećanje 100x)

Najpoznatija metoda detekcije spermatozoida u uzorku je metoda *Christmas Tree Stain* – CTS. Tamponom, navlaženim u sterilnoj dejoniziranoj vodi, prikuplja se trag sperme (koji može biti i sasušen) i nanosi na predmetno mikroskopsko staklo. Na imobilizirane spermije, a u svrhu njihove vizualizacije, primjenjuju se tehnike bojenja (reagensi za CTS). Tako pripremljeni preparati analiziraju se pod mikroskopom (uvećanje 400–1000 puta), a spermatozoidi se vizualiziraju s različito obojenim dijelovima: ružičastom bojom je obojen vrh glave, tamnocrvenom dno glave, plavom srednji dio glave te žućkasto zelenom rep spermatozoida (slika 2.24). Zbog, ovakve šarolike slike spermatozoida test je i dobio naziv “božićno drveće” (engl. *Christmas tree*).



Slika 2.24. Karakterističan izgled spermatozoida nakon primjene CTS tehnike bojenja

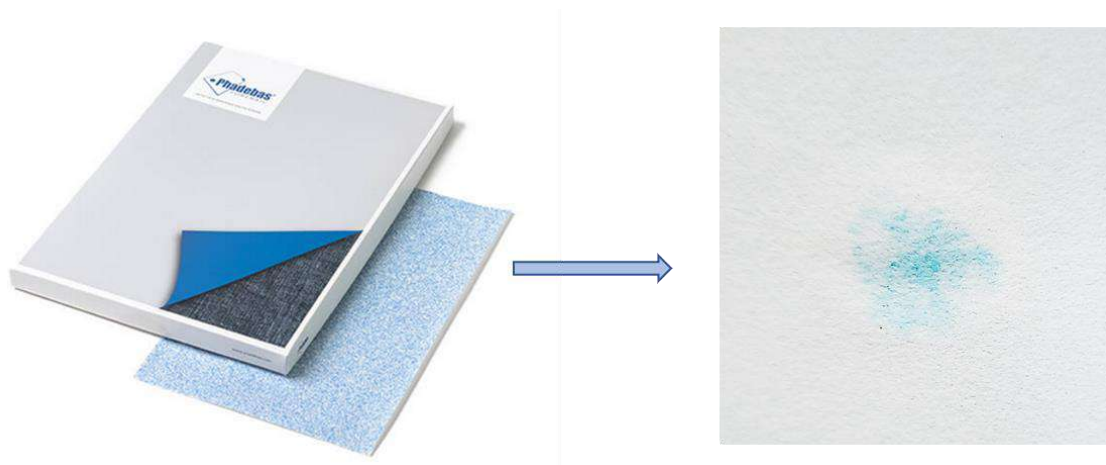
Danas je mikroskopska analiza humanih spermatozoida značajno olakšana zahvaljujući primjeni specifičnih monoklonalnih antitijela koja fluorescentno markiraju glavu i rep spermija. Testovi su vrlo senzitivni čak i kada su u uzorku prisutne velike količine epitelnih ćelija. Jedan od njih je i Sperm Hy-Liter™. Ova fluorescentna analiza olakšava forenzičke istrage seksualnih delikata, jer je posebno usmjerena i optimizirana za humane spermatozoide (slika 2.25).



Slika 2.25. Mikroskopska analiza razmaza vaginalnog sekreta tretiranog Sperm Hy-Liter™ reagensom: A – korištenjem FITC filtera uočavaju se tri spermatozoida (intenzivno zelene boje) i epitelne ćelije, B – korištenjem DAPI filtera uočavaju se jedra svih prisutnih ćelija

2.1.1.3 Pljuvačka kao biološki trag

Pljuvačka (sline ili saliva) je blago alkalni sekret koji nastaje kao produkt egzokrinih žlijezda, i to tri para glavnih i velikog broja sitnih pljuvačnih žlijezda koje su smještene u sluzokoži usta, jezika i ždrijela. Osim vode (na koju otpada najveći dio – oko 99%), u njenom sastavu nalaze se elektroliti, glikoproteini, proteini i enzimi kao što je α -amilaza. Pljuvačka često sadrži epitelne ćelije, što ovaj trag čini pogodnim za forenzičku analizu. Može se naći na mjestu zločina na različitim predmetima (žvakaća guma, opušak, koverta, poštanske markice, dječije cucle, četkice za zube, pribor za jelo i piće itd.), kao i na žrtvama i počiniteljima zločina (ugrizi). Način prikupljanja tragova pljuvačke vrlo je jednostavan. Prilikom procesa prikupljanja uzorka mora se voditi računa da li se radi o sasušanim ili nerasušanim (svježim) tragovima pljuvačke i da li je predmete s kojih se prikuplja ovaj biološki trag moguće kompletne dostaviti na analizu ili nije. Metode i procedure prikupljanja tragova pljuvačke uglavnom se podudaraju s onima koje se primjenjuju prilikom prikupljanja drugih tragova tjelesnih tečnosti kao što su krv i sperma. Preliminarni testovi identifikacije pljuvačke u biološkom tragu zasnivaju se na detekciji enzimске aktivnosti α -amilaze, pri čemu se najčešće koristi tzv. škrob-jodni test. Pljuvačka obiluje enzimom α -amilaza, koji se nalazi i u drugim tjelesnim tečnostima, ali u znatno nižoj koncentraciji. Ovaj test se zasniva na činjenici da otopina joda u kontaktu sa škrobom rezultira pojavom plavog obojenja koje se gubi kada, pod dejstvom enzima α -amilaza, dođe do potpune razgradnje škroba. Neki od komercijalnih naziva ovog testa su SALIgAE[®], Starch-IodineMini-Centrifuge Test, Phadebas[®] Amylase Test, Amylose Azure, Rapignost-Amylase i drugi. Najpoznatiji preliminarni test koji se rutinski koristi za detekciju prisustva pljuvačke je Phadebas[®] Forensic Press Test. U forenzičkoj biologiji ovaj test se koristi već dugi niz godina. Ovaj preliminarni test u osnovi sadrži papir, tretiran hemikalijama, koji omogućava lokalizaciju mrlja i ukazuje na prisustvo pljuvačke. Sumnjiva mjesta tretirana ovim papirom pokazuju plavo obojenje ako je zaista prisutna α -amilaza, što je potvrda prisustva pljuvačke (slika 2.26). Neophodno je obratiti pažnju na vrijeme pojave karakterističnog obojenja te njegov intenzitet. Bitno je napomenuti da enzim amilaza u drugim tjelesnim tečnostima nije prisutan u dovoljnoj količini za detekciju primjenom testa Phadebas. S druge strane, tragovi fecesa mogu sadržavati visoke koncentracije amilaze, što bi potencijalno moglo dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Međutim, to se u praksi skoro nikada ne dešava, jer se tragovi fecesa vizualno očigledno razlikuju od tragova pljuvačke.



Slika 2.26. *Phadebas® Forensic Press Test s primjerom pozitivne reakcije*

Postoji i drugi tip testa Phadebas® Forensic Tube Test, koji sadrži sterilne tubice. U tubicama se prvo rastvaraju tablete, a zatim dodaje navlaženi trag koji se testira. Kao i u prvom testu, pojava obojenja je znak prisustva α -amilaza, što je dokaz da se radi o uzorku pljuvačke. Limitirajući faktor ovih testova predstavlja činjenica da mnoge druge tjelesne tečnosti sadrže amilazu, što ga čini manje pouzdanim u odnosu na testove koji se primjenjuju prilikom testiranja krvi ili sperme.

Za identifikaciju tragova pljuvačke, kao uostalom i ostalih bioloških tragova, danas se najčešće primjenjuje analiza DNK. Bris bukalne sluznice jedan je od najčešće uzorkovanih nespornih tragova koji se, s obzirom na to da predstavlja neinvazivnu metodu prikupljanja traga (za razliku od postupka vađenja krvi), koristi za generiranje DNK profila osumnjičenih osoba i žrtava prilikom forenzičkih istraga. U forenzičkoj praksi pljuvačka se najčešće koristi za detekciju psihotropnih komponenti i etanola. Međutim, iako se primarno koristi za detekciju kanabisa i alkohola, u uzorku pljuvačke mogu se veoma lako detektovati različiti narkotici poput amfetamina, kokaina i opijata.

Još jedna važna činjenica je da su oko 80% pripadnika ljudske populacije sekretori antigena krvne grupe ABO sistema. Sekretori izlučuju ABO antigene kroz tjelesne tečnosti (izuzev krvi), posebno kroz pljuvačku. U slučajevima gdje se pronađu tragovi ugriza, moguće je odrediti krvnu grupu ABO sistema počinioca zločina analizom tragova pljuvačke i time suziti broj tragova koji će se podvrgnuti daljim analizama (npr. analizi DNK).

Tragovi pljuvačke se koriste i za analizu mikrobialnog transfera. Locardov princip razmjene ne odnosi se samo na transfer genetičkog materijala nego i na oralnu floru, koja je visoko specifična i unikatna za svakog pojedinca.

2.1.1.4 Urin kao biološki trag

Urin je ekskretorna tečnost kojom se iz organizma izlučuju otpadni produkti metabolizma, strane i štetne tvari. Urin zdravog čovjeka je svijetložute boje i u njegovom se sastavu osim vode nalaze: urea, amonijevi ioni, kreatinin, mokraćna kiselina. Epitelne ćelije su prisutne u vrlo niskoj koncentraciji. Značaj detekcije urina u forenzičkoj analizi često se minimizira, a razlozi za to su niska osjetljivost testova za detekciju urina i vrlo niska stopa izolovanja kvalitetne molekule DNK iz tragova urina. Pozitivna identifikacija prisustva mrlja urina može biti vrlo značajan forenzički dokaz u slučajevima seksualnog napada, silovanja, davljenja ili ubistva. Uobičajena metoda otkrivanja urina je vizualni pregled mrlja koje imaju karakteristični izgled i miris. I urin, poput ostalih spomenutih tjelesnih tečnosti, fluorescira pod djelovanjem ultraljubičaste svjetlosti. Međutim, lokalizacija mrlja urina znatno je teža jer su one obično difuzne, blijede i šire se na velikim površinama.

Preliminarni testovi detekcije urina zasnivaju se na detekciji glavnih organskih komponenti prisutnih u urinu, tj. uree i kreatinina. Ovi spojevi se nalaze i u brojnim drugim tjelesnim tečnostima kao što su krv, sperma ili znoj, ali su u urinu u znatno višim koncentracijama nego u bilo kojoj drugoj tjelesnoj tečnosti (koncentracija uree iznosi od 1.400 do 3.500 mg na 100 ml). Iako su u urinu ove komponente u relativno visokim koncentracijama, u tragovima na mjestu zločina mnogo ih je teže detektovati zbog apsorpcije u materijale i tkanine. Testovi za ureu se zasnivaju na enzimu ureaza koji razgrađuje ureu, pri čemu se oslobađa amonijak i ugljični dioksid. Amonijak se može detektovati primjenom Nesslerovog reagensa s kojim tvori smeđe obojenje ili smeđi talog. Druga metoda koja se primjenjuje za identifikaciju mrlja urina jeste primjena reagensa koji sadrži ureazu i boju bromotimol plava. Ako je rezultat pozitivan, na mjestu mrlje urina pojavi se plavo obojenje. Ipak, najčešće korišten test za detekciju uree u urinu je para-dimetilaminocinamaldehyd (DMAC) test. Ovaj test se zasniva na reakciji reagensa DMAC s ureom prilikom čega nastaje roskasto obojenje. Test je brz, jednostavan i netoksičan, ali s druge strane

nije visoko specifičan za urin pa daje pozitivne reakcije i s drugim tjelesnim izlučevinama (pljuvačka, sjemena tečnost, vaginalni sekret).

Kreatinin je drugi spoj koji se u urinu nalazi u visokoj koncentraciji, a prosječne koncentracije variraju od 105 do 210 mg na 100 ml. Može se detektovati primjenom zasićenog rastvora pikrinske kiseline u toluenu ili benzenu. Ako trag potiče od urina, pojaviće se kompleks kreatinin-pikrat koji je žutonarandžaste boje. Ovo je poznata Jaffeova metoda (Max Jaffé, 1841–1911) koja se temelji na reakciji kreatinina s pikrinskom kiselinom u alkalnom mediju, pri čemu nastaje karakteristično žutonarandžasto obojenje. Imunološka metoda kojom se može identificirati urin u mrljama uključuje otkrivanje Tamm-Horsfall glikoproteina (THP). Otkrili su ga Igor Tamm (1922–1995) i Frank Horsfall (1906–1971) 1950. godine i po njima je i nazvan. Ima visoku molekularnu masu i glavna je proteinska komponenta u urinu, a izlučuje se u urin brzinom od 50 do 100 mg/dan. THP se detektuje u urinu mnogih životinjskih vrsta. Imunohromatografski test RSID™ Urine zasniva se na detekciji komponente THP. Isto kao i ostali RSID™ testovi i ovaj je dizajniran za brzo prepoznavanje mrlja urina te omogućava jednostavnu i pouzdanu detekciju humanog urina s različitih tipova podloga i materijala (pamučni ubrusi, različite vrste tkanine i dr.). Ovaj test je brz i jednostavan za primjenu, ali i pouzdan, jer ne reaguje s drugim tjelesnim tečnostima (pljuvačka, sperma, krv, vaginalni iscjedak ili menstrualna krv).

2.1.2 Epitelne ćelije kao biološki trag

Pored ćelija krvi i sperme, epitelne ćelije kože i sluzokože često su prisutne na mjestu izvršenja krivičnih radnji. Mogu se naći na odjevnim predmetima, oružju, namještaju, priboru za održavanje lične higijene, opušcima cigarete, posudama za jelo i piće, dršci noža, dječijim cuclama i dr., ali i u sastavu drugih bioloških tragova (na korijenu dlake ili u tjelesnim izlučevinama kao što su pljuvačka, urin, feces). Sve epitelne ćelije su skvamozne ćelije, porijeklom iz višeslojnog (stratificiranog) epitela, a na mjesto zločina mogu dospjeti iz tri izvora: s kože, iz bukalne i iz vaginalne sluznice. Procjenjuje se da sa svakog čovjeka dnevno otpadne čak 400.000 epitelnih ćelija, od kojih se većina zadrži na unutrašnjoj površini odjeće koja je u direktnom kontaktu s kožom. Zbog toga su odjevni predmeti veoma važan dokazni materijal u istražnim postupcima. Ipak, analiza ovakvih tragova, kao i tragova s kontaktnih površina, veoma je zahtjevnja jer, osim kontaminacije, koja je u analizi ovakvih tragova česta pojava, dodatni problem predstavlja i mala

količina uzorka, što za posljedicu ima vrlo nisku stopu uspješnosti analize. U kontekstu forenzičke analize DNK, najpodobnije su ćelije bukalne i vaginalne sluznice jer predstavljaju bogat izvor DNK. Ćelije bukalne sluznice u ogromnom se broju nalaze u pljuvački pa je samim tim trag pljuvačke bogat izvor DNK. Kao što je već rečeno, u forenzičkoj praksi bris sluzokože usne šupljine (bukalne sluznice) najčešće se koristi kao nesporni trag u DNK analizi forenzičkih tragova, upravo zbog visokih koncentracija molekula DNK. U forenzičkim istragama slučajeva silovanja, pored tragova sperme i pljuvačke, često se traže i tragovi epitelnih ćelija žrtve koji često budu pronađeni na odjeći osumnjičene osobe. S druge strane, u nekim drugim biološkim tragovima, kao što je npr. urin, nalazi se izrazito mala količina epitelnih ćelija, što za analizu DNK predstavlja dodatni problem pa interpretacija rezultata analize uglavnom bude veoma izazovna.

Kontaktne tragove predstavljaju tragove epitelnih ćelija, najčešće porijeklom s kože, koji se po Locardovom principu razmjene nađu na mjestu zločina i/ili žrtvi u toku izvršenja zločina. Dodirivanjem predmeta, objekata i osoba, epitelne ćelije ostaju na kontaktnim površinama, a njihova količina zavisi od dužine trajanja kontakta, jačine primijenjenog pritiska i prisustva znoja koji posreduje u transferu epitelnih ćelija.

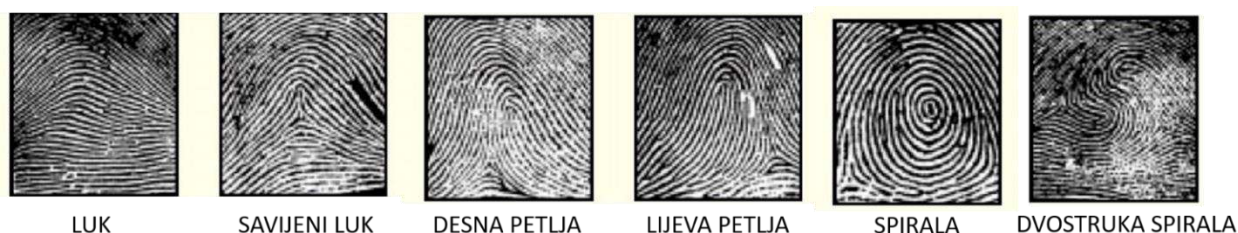
Epitelne ćelije s kontaktnih tragova na mjestu zločina prikupljaju se na više načina: pamučnim bрисom (suhi i/ili vlažni), ljepljivim trakama ili primjenom vakuuma. U velikom broju slučajeva broj epitelnih ćelija u uzorku bude vrlo mali, što za posljedicu ima relativno nisku uspješnost generiranja upotrebljivih DNK profila (koja je ipak značajno povećana primjenom analize molekularnih markera nove generacije optimiziranih za detekciju malih količina DNK). Ovakvi tragovi zbog svojih karakteristika zahtijevaju primjenu optimiziranih analiza i modifikaciju protokola koji se rutinski koriste u forenzičkoj DNK analizi bioloških tragova. Zbog toga se kontaktne tragove u forenzičkoj praksi rijetko podvrgavaju analizi DNK, nego se koriste za identifikaciju osumnjičenih primjenom daktiloskopskih metoda.

2.1.2.1 Daktiloskopija

Specifičnost otisaka prstiju je unikatna biološka osobina nekih primata i koala. Otisci se u forenzičkoj nauci klasificiraju kao fizički tragovi, jer predstavljaju otisak na površini. Oni su preslike dermatogliga, sitnih brazda i nabora kože na jagodicama prstiju ruku i nogu, usko specifičnih samo za jednu osobu. Formiraju se intrauterino, od 10. do 24. sedmice, kada dolazi do

kompresije dermalnih ćelija kože koje se nalaze između epidermisa i potkožnog tkiva. Epidermis fetusa, koji je u početku veoma tanak, uslijed ćelijske proliferacije postupno se zadebljava, što rezultira papilarnim oblikovanjem epiderme i derme. Brazde i nabori dermatoglifa razvijaju se u kraniokaudalnom smjeru (od glave prema stopalima), i to na rukama prije nego na stopalima, te ostaju nepromijenjeni do kraja života.

Za razliku od molekule DNK, koja je identična kod monozigotnih blizanaca, ne postoji identičan oblik dermatoglifa čak ni kod blizanaca. Oblici šara dermatoglifa uveliko variraju od osobe do osobe, ali se mogu grupisati u četiri osnovne kategorije s više potkategorija i prelaznih oblika. Četiri osnovne kategorije su: luk, petlja, spirala i miješana figura (slika 2.27).



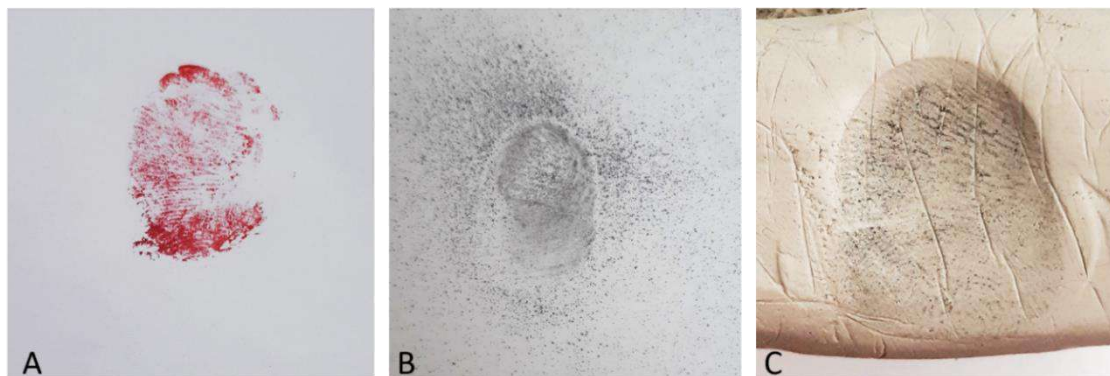
Slika 2.27. Različiti oblici dermatoglifa

Oblik dermatoglifa predstavlja kompleksni plejotropski (jedan gen kodira više osobina) fenotip, gdje nepoznati broj gena u interakciji s okolišnim faktorima učestvuje u formiranju oblika dermatoglifa. S druge strane, neki autori smatraju da su svi geni koji određuju oblik dermatoglifa međusobno blisko vezani.

Iako postoji duga tradicija korištenja otisaka prstiju kao sredstva identifikacije (izvori navode da su ih koristili Babilonci, Asirci, Kinezi i Japanci prije nekoliko hiljada godina), u forenzičkoistražnim postupcima prvi put ih je 1892. godine primijenio *Juan Vuchetic* (rođen kao Ivan Vučetić 1858. godine na Hvaru), koji je te godine primjenom otisaka prstiju riješio slučaj dvostrukog ubistva i samoubistva u Argentini, poznat kao slučaj *Francisce Rojas*. Ona je ubila svoja dva sina i pokušajem samoubistva htjela prebaciti krivnju na drugu osobu. Analizom otisaka prstiju u tragu krvi utvrđeno je da je upravo ona počinila ovo krivično djelo. Od tada je analiza otisaka prstiju postala nezaobilazna metoda te je pomogla u rješavanju mnogobrojnih krivičnih djela. Grana forenzičke nauke koja se bavi analizom otisaka prstiju naziva se *daktiloskopija*.

Na mjestu izvršenja zločina razlikujemo *vidljive* i *latentne* otiske prstiju. Vidljivi se detektuju bez bilo kakvog prethodnog tretiranja i mogu biti pozitivni, negativni ili udubljeni. *Pozitivni* (slika 2.28. A) predstavljaju sliku na podlozi (npr. krvavi otisak prsta na podlozi), *negativni* (slika 2.28. B) nastaju kada grebeni prsta otklone površinski materijal (npr. sloj prašine na predmetu), dok su *udubljeni* (slika 2.28. C) rezultat kontakta s mekanom površinom (npr. otisak prsta na svijeći ili svježoj farbi).

Latentni otisci prstiju mnogo su češći na mjestu izvršenja krivičnog djela od vidljivih otisaka. Nisu vidljivi golim okom, a detektuju se primjenom optičkih, fizičkih ili hemijskih metoda detekcije.



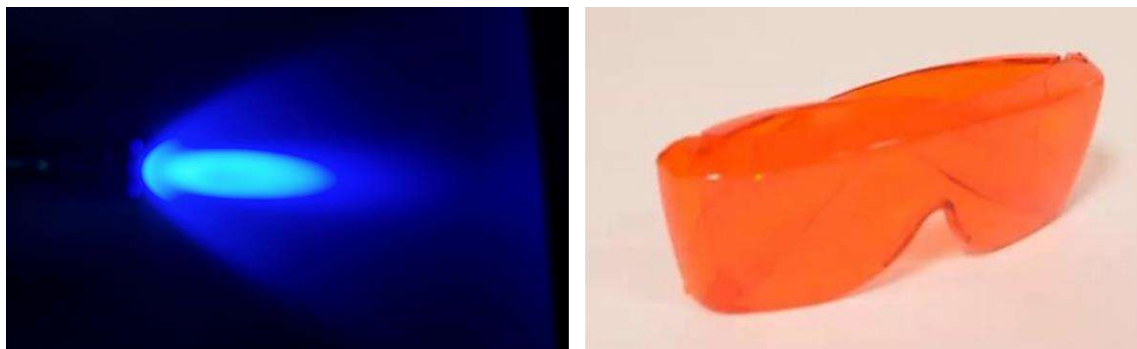
Slika 2.28. Vidljivi otisci prsta: A – pozitivni, B – negativni, C – udubljeni otisak

Uspješnost analize otisaka zavisi od više faktora, a najznačajniji su: temperatura podloge, struktura površine i elektrostatičke sile na prijanjajućoj površini. Što je viša temperatura, tragovi su manje postojani. Također, struktura površine je veoma važna za postojanost otisaka. Moguće je razlikovati tri tipa površina: porozna površina (papir, karton), koja omogućava brzu apsorpciju otiska prstiju, neporozna površina (staklo, plastika), koja ne apsorbira niti jednu komponentu latentnog otiska i poluporozna površina (plastificirani papir), koja apsorbira otiske sporije od poroznih površina. Zavisno od tipa podloge na kojoj se nalazi otisak, primjenjuju se različite metode detekcije otisaka.

2.1.2.1.1 Metode detekcije otisaka prstiju

Po dolasku na mjesto zločina, kriminalistički tehničari i forenzičari prvo vrše detaljan pregled kako bi ustanovili eventualno prisustvo otisaka prstiju. Vidljivi otisci se fotografišu, dok je za latentne neophodno primijeniti odgovarajuće metode detekcije otisaka. Nakon vizualiziranja otiska, on se fotografiše, nakon čega se komparira sa svim otiscima u bazi podataka, a pozitivno poklapanje ukazuje na (identificira) počinioca krivičnog djela.

Metode detekcije latentnih otisaka moguće je podijeliti na optičke metode, metode detekcije na poroznim površinama i metode detekcije na neporoznim površinama. Otkrivanje otisaka najpreporučljivije je započeti optičkim metodama. Optičke metode podrazumijevaju korištenje različitih vrsta osvjetljenja, a najčešće se koristi plavo svjetlo visokog intenziteta u uslovima totalnog mraka uz korištenje žutonarandžastih naočala (slika 2.29).



Slika 2.29. *Svjetlo i naočale koje se koriste za vizualizaciju otisaka prstiju*

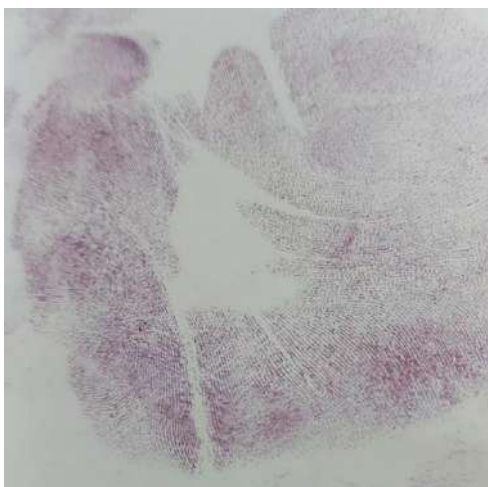
Za analizu tragova na neporoznoj površini preporučuje se upotreba CCD (engl. *Charged-Coupled Device*) kamera osjetljivih na UV, koje mjere svjetlost koja se odbije od otiska. CCD kamere se koriste u biometrijskim čitačima kao senzori za otiske prstiju.

2.1.2.1.1.1 Tehnike detekcije otisaka prstiju na poroznim površinama

Za detekciju otisaka na poroznim površinama koriste se hemijski reagensi koji reaguju s topivim i netopivim komponentama koje sadrži otisak. Najčešće korišteni reagensi su: ninhidrin, 1,8-diazafluren-9-on (DFO) i fizički razvijač.

Metoda tretmana ninhidrinom najčešće je korištena metoda u detekciji otisaka prstiju na poroznim površinama. Reagens ninhidrin reaguje s aminokiselinskim komponentama otiska, pri čemu nastaje tamnoljubičasto obojenje poznato i kao Ruhemanova ljubičasta. Reakcija je izuzetno senzitivna na temperaturu, pH i vlažnost te se mora izvoditi u kontrolisanim uslovima kako bi se dobili najbolji rezultati. Metoda se izvodi tako da se objekat (npr. isječak papira) kratko uroni u rastvor ninhidrina (ninhidrin se najčešće rastvara u maloj količini polarnog rastvarača uz dodatak acetatne kiseline) ili se rastvor nanosi sprejanjem ili četkanjem na površinu (slika 2.30).

Nakon sušenja, otisci se razvijaju na sobnoj temperaturi nakon 24–48 sati i slikaju se pri bijeloj svjetlosti. Ova tehnika se upotrebljava za razvijanje otisaka na papiru i kartonu, ali se treba izbjegavati na nekim papirnim podlogama (npr. novčanice) koje reaguju s ninhidrinom. Otisci dobijeni ninhidrinskim tretmanom mogu biti naknadno tretirani metalnim solima, kao što su soli kadmija i cinka.



Slika 2.30. *Detektovani otisak dlana nakon tretmana ninhidrinom*

Tretman cinkovim solima daje narandžasto obojenje, a kadmijevim solima crveno obojenje. Obojenja nastaju kao rezultat formiranja kompleksa između Ruhemanove ljubičaste (produkt ninhidrinske reakcije) i iona metala, a imaju luminiscirajuća svojstva. Zbog toga se vrlo često primjenjuju za analizu otisaka za koje reakcija s ninhidrinom nije dala zadovoljavajuće rezultate.

Diazafluorenon (DFO) je reagens osjetljiv na prisustvo aminokiselina, a primjenjuje se za detekciju latentnih otisaka na papiru. Za razliku od ninhidrina, za djelovanje DFO potrebna je

velika količina toplote (100°C i više). Otisci se prikazuju u ljubičastoroze boji uz snažnu luminiscenciju na sobnoj temperaturi. DFO reagens je mnogo senzitivniji od ninhidrina, a nakon tretmana njime, moguće je tretirati otiske i ninhidrinom. Zbog toga je preporučljivo koristiti prvo metodu DFO pa tek onda po potrebi tretman ninhidrinom.

Na vlažnim poroznim površinama, na kojima nije moguće koristiti spomenute razvijače boje, koristi se fizički razvijač. Fizički rastvarač je smjesa fero, feri iona i iona srebra rastvorenih u citratnoj kiselini. Divalentno željezo redukuje jednovalentno srebro koje u kontaktu s otiskom prsta na podlozi formira tamnosive ili crne otiske. Osim na vlažnim podlogama, koristi se i za detekciju latentnih otisaka koji primjenom drugih reagenasa nisu detektovani. Ipak korištenje fizičkog razvijača ima nekoliko nedostataka: pripremljena smjesa nije postojana pa se mora koristiti svježa, a na neke podloge djeluje destruktivno, što onemogućava primjenu drugih metoda nakon njegovog korištenja.

2.1.2.1.1.2 Tehnike detekcije otisaka prstiju na neporoznim površinama

Najčešće korištena tehnika detekcije otisaka prstiju na neporoznim površinama je praškanje. Praškanjem se otkrivaju tragovi na nepokretnim, glatkim, nepropusnim podlogama, pri čemu se čestice praška vezuju za vlažne, masne i ljepljive komponente otiska. Praškanje je ekonomična i jednostavna tehnika koja odmah daje rezultate. Dodatna prednost je što se na ovaj način dobijeni otisci mogu prenijeti specijalnim adhezivnim trakama s površine na kojoj su pronađeni u laboratoriju na daljnje analize (slika 2.31).



Slika 2.31. *Detekcija otisaka prstiju primjenom tehnike praškanja*

Iako se za praškanje koriste različiti materijali, najčešće korišten prašak je na bazi aluminijske prašine jer njegove čestice najbolje prijanjaju na latentni otisak. Prašak se na površine nanosi korištenjem specijalnih četkica s dlakama vještačkog ili prirodnog porijekla (dlaka vjeverice ili kamile).

Za detekciju latentnih otisaka na vlažnim neporoznim površinama koristi se reagens sitnih čestica (engl. *Small Particle Reagent* – SPR). SPR predstavlja smjesu praha molibdenovog disulfida i deterdženta, rastvorenu u vodi. Aplicira se raspršivanjem po podlozi pomoću špricaljke, a u kontaktu s otiskom čestice molibdenovog disulfida vezuju se za u vodi nerastvorljive komponente latentnog otiska. Iako nije izrazito senzitivna metoda, koristi se u slučajevima kada je bolje odmah analizirati vlažni trag, nego čekati da se osuši kako bi se primijenile pouzdanije metode.

Cijanoakrilatno zaparivanje je metoda u kojoj se koriste cijanoakrilatni esteri (npr. metil ili etil esteri) koji su bezbojne ljepljive komponente u komercijalnoj prodaji poznate kao superljepila. Cijanoakrilatne pare selektivno polimeriziraju na brazdama latentnih otisaka, stvarajući otisak bijele boje. Tehnika daje sjajne rezultate na neporoznim površinama, a pomoću nje je moguće detektovati otiske stare do sedam godina. Cijanoakrilatno zaparivanje se vrši u zatvorenim komorama gdje se postavlja ispitivani predmet (slika 2.32). Cijanoakrilatni ester se zagrijava, što izaziva njegovu evaporaciju, nakon čega se analiziraju otisci.



Slika 2.32. Komora za cijanoakrilatno zaparivanje

U posljednje vrijeme se koristi relativno nova tehnika vakuumske taloženja metala (engl. *Vacuum Metal Deposit* – VMD), koja je izuzetno senzitivna i s velikom uspješnošću detektuje otiske na glatkim neporoznim (ili poluporoznim) površinama. Nakon vakuumske evaporacije metala, stvara se sloj metalnog filma. Metoda se odvija u specijalnim VMD komorama u kojima pod vakuumom prvo dolazi do evaporacije zlata, nakon čega se javlja fini zlatni film, a onda se postupak ponavlja s cinkom. Ova metoda je izuzetno učinkovita za detekciju otisaka na staklenim i plastičnim površinama, kao i za detekciju veoma starih i parcijalnih otisaka.

2.1.2.1.1.3 Ostale metode detekcije otisaka prstiju

Latentne otiske na različitim poroznim i neporoznim površinama moguće je detektovati zaparivanjem jodnim parama, pri čemu se jod veže za masne komponente otiska prikazujući otiske u smeđoj boji. Iako je tehnika brza i jednostavna za izvođenje, ona ima niz nedostataka. Prije svega, pare joda su toksične i korozivne, kontrasti na otiscima su slabi, uslijed čega se dobija nejasna slika, a tretirani otisci nisu postojani i vidljivi su samo nekoliko dana. Ovaj nedostatak je moguće prevazići primjenom sekundarnog tretmana rastvorom α -naftolflavona, pri čemu se formiraju postojaniji i jasniji tamnoplavi otisci.

Rastvor gencijana ljubičastog također je moguće koristiti za detekciju latentnih otisaka. Reagujući s masnom komponentom otiska, pravi intenzivno ljubičasti kolorit. Metoda je posebno učinkovita za detekciju otisaka na adhezivnim površinama kao što su ljepljive i filmske trake. Za analizu latentnih otisaka na ljepljivoj strani ljepljivih traka koriste se specijalni puderi poznati kao *sticky-side powders*. Predstavljaju smjesu deterdženta i crnog pudera za detekciju otisaka prstiju, a dobijeni otisci se prikazuju u tamnosmeđoj ili crnoj boji.

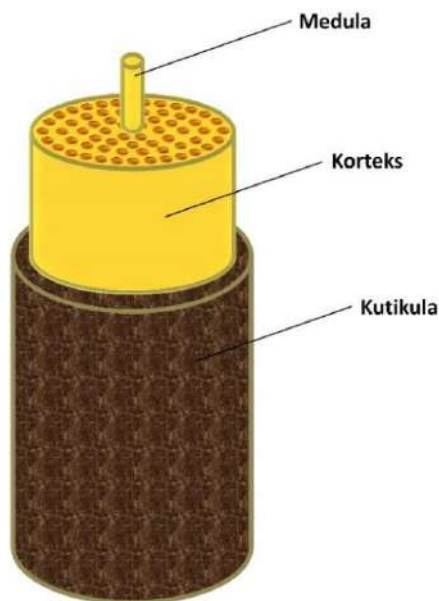
2.1.2.1.1.4 Detekcija otisaka prstiju na ljudskoj koži

Ljudska koža je najzahtjevnija površina za detekciju otisaka prvenstveno zbog toga što se sekretorne komponente, koje se nalaze na latentnim otiscima, nalaze i na ljudskoj koži. Osim toga, latentni otisci u dodiru s toplom kožom vrlo brzo nestaju. Ipak, postoje slučajevi kada su otisci na koži jedini i ključni tragovi pa ih je neophodno analizirati. Iako se generalno dobijaju parcijalni ili nezadovoljavajući rezultati, još uvijek postoji veliki interes za razvijanje pouzdane metode detekcije latentnih otisaka prstiju s kože.

Neke od danas korištenih metoda za detekciju su praškanje magnetnim prahom, zatim transfer traga na neporoznu površinu, nakon čega se primjenjuju odabrane tehnike detekcije traga, te vrlo rijetko cijanoakrilatno zaparivanje.

2.1.3 Dlake kao biološki trag

Dlake (slika 2.33) je biološki trag koji se veoma često nađe na mjestu zločina. Prednost ovog biološkog traga je što nije podložan brzom degradaciji poput drugih bioloških tragova. Međutim, složena analiza ovog biološkog traga često je uzrok pogrešne interpretacije dobijenih rezultata.



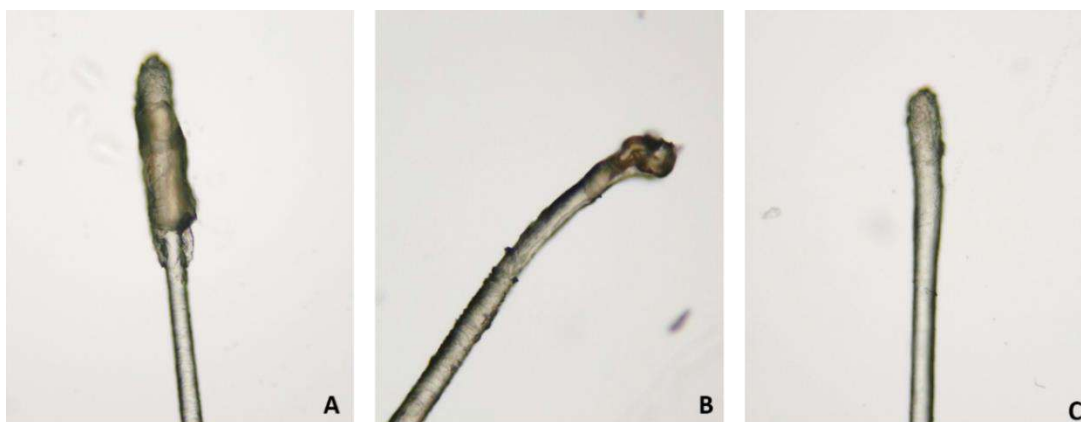
Slika 2.33. Šematski prikaz građe dlake

Dlake je biološka struktura karakteristična samo za sisare. Raste iz epidermisa kože, a uloga joj je regulacija tjelesne temperature, zaštita od sunčeve svjetlosti te djeluje kao osjetilni organ. Kod čovjeka dlake, osim na glavi, rastu na skoro svim dijelovima tijela, osim tabana, usana, unutrašnje strane dlanova, prstiju i dijelova genitalija. Dlake se javljaju u fetalnom dobu, krajem prvog trimestra trudnoće, kada dolazi do razvoja sitnih malja koje u narednim mjesecima prekriju cijelo tijelo fetusa. Tokom razvoja čovjeka ove primarne tvorevine postaju sve složenije. Kosa svoj puni razvoj dostigne u periodu puberteta, a tokom života mijenja boju pa u starijoj dobi postaje sijeda jer pigment biva zamijenjen mjehurićima zraka. Boju kose diktiraju vrsta i količina pigmenta koji

je ravnomjerno raspoređen dužinom dlake. Dlaka raste unutar folikula dlake koji predstavlja cilindrično udubljenje koje na dnu ima šupljinu. Protein keratin je najzastupljeniji sastojak dlake čija se keratinizacija intenzivira kada napusti folikul. Dijelovi dlake su: korijen, stablo i vršak.

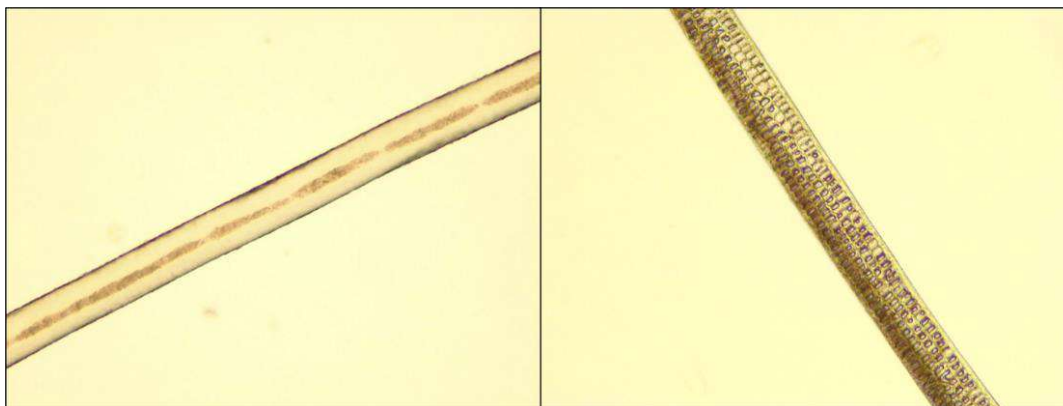
Vijek trajanja dlake zavisi od dijela tijela, a na osnovu njihovog izgleda i dužine moguće je odrediti s kojeg dijela tijela vode porijeklo. Dlaka tokom svog razvoja prolazi kroz tri faze, što je veoma bitno s aspekta analize DNK:

1. Anagena faza – traje 2–6 godina, 80–90% ljudskih dlaka je u ovoj fazi. Ovo je period aktivnog rasta kose i tada se folikularne ćelije umnožavaju i keratiniziraju. Nove ćelije se ugrađuju u strukturu dlake.
2. Katagena ili tranzicijska faza – nakon 2–7 godina folikul dlake prelazi u ovu fazu. Oko 2% dlaka kod zdrave osobe se nalazi u ovoj fazi. Nakon što se završi anagena faza, folikul dlake migrira bliže površini kože i značajno smanjuje svoju aktivnost. To traje 7–14 dana te se korijen kondenzuje i tvori bulbus.
3. Telogena faza – završna faza; nakon što se dermalna papila odvoji od folikula dlake, slijedi period mirovanja koji traje približno 5–6 sedmica. U to vrijeme mirovanja kosa ne ispada, već ostaje pričvršćena za folikul sve dok je nova dlaka ne potisne. Smatra se da se oko 10–18% dlaka u određenom trenutku nalazi u ovoj fazi. Završetkom telogene faze započinje ponovo anagena faza (slika 2.34).



Slika 2.34. Mikroskopski izgled dlake u različitim fazama rasta: A – anagena faza, B – katagena faza, C – telogena faza (40x)

Analiza traga dlake podrazumijeva primjenu mikroskopske i molekularnogenetičke metode, tj. analize DNK. S obzirom na to da se uvijek nastoji utvrditi individualno porijeklo pronađenog traga, analiza DNK je metoda koja se najčešće koristi za analizu traga dlake. U analizi tragova dlake mikroskopska analiza omogućava vizualno utvrđivanje morfoloških karakteristika dlake (slika 2.35).



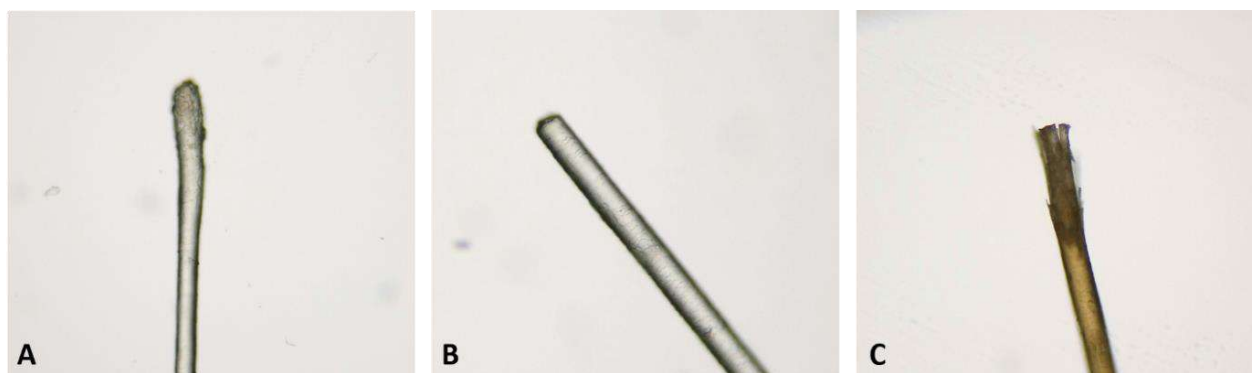
Slika 2.35. Razlike u morfologiji humane (lijevo) i animalne (desno) dlake

Tada se posmatra izgled i građa dlake, promjer, presjek, pigmentacija, dužina, boja, debljina itd. Mikroskopskim pregledom moguće je uočiti bojenje ili oštećenja dlake, a to su vrlo važne osobine na osnovu kojih se može povezati osumnjičena osoba s krivičnom radnjom. Potrebno je utvrditi porijeklo dlake (animalno ili humano), kao i s kojeg dijela tijela dlaka vodi porijeklo (tabela 2.3).

Tabela 2.3. Razlike u građi humane i animalne dlake

Osobine	Humana	Animalna
Korteks	Širina korteksa veća od medule	Širina korteksa manja od medule
Distribucija pigmenta	Duž kutikule	Centralno ili duž medule
Medula	Diskontinuirana	Kontinuirana
Kutikula	Preklapajuća	Koronarna

Od izuzetne je važnosti utvrditi je li dlaka spontano ispala ili je iščupana. Iščupane dlake u anagennoj fazi sadrže epitelne ćelije pa će izolacija i analiza genomske DNK vjerovatno biti uspješna, dok dlake spontano otpadaju u telogennoj fazi te za njihovu analizu nije primjenljiva analiza genomske DNK (slika 2.36). S druge strane, dlaka u svim fazama rasta obiluje mitohondrijskom DNK pa se za spontano otpale ili odrezane dlake najčešće primjenjuje analiza mitohondrijske DNK.



Slika 2.36. Mikroskopski izgled dlaka koje nisu pogodne za analizu genomske DNK:

A – spontano ispala dlaka, B – odrezana dlaka, C – prekinuta dlaka. Za genetičku analizu ovakvih dlaka primjenjuje se analiza mtDNK (40x).

Razlog zbog kojeg u dlaci koja nije u anagennoj fazi nema genomske DNK je proces keratinizacije kroz koji prolaze ćelije folikula kose tokom razvojnog ciklusa. Keratinizacija započinje nakupljanjem keratina u citoplazmi folikularnih ćelija, što izaziva destrukciju jedra i organela. Na kraju procesa keratinizacije nastupa apoptoza, a keratinizirane ćelije postaju gradivni blokovi dlake dajući joj potrebnu čvrstoću.

Tokom keratinizacije u keratinocitima dolazi do aktivacije keratinocit-specifične endonukleaze iz porodice DNKaza koja se naziva DNKaza1L2. Ovaj enzim je ključan za degradaciju nukleusne DNK u dlaci, što je nadalje krucijalno za programiranu smrt ćelija dlake (apoptozu) koje postaju gradivni blokovi dajući dlaci potrebnu čvrstoću. Pošto ovaj enzim ne samo da ima različito djelovanje u različitim fazama rasta dlake nego je njegovo djelovanje i različito kod različitih individua, uspješnost analize genomske DNK uveliko će varirati od slučaja do slučaja.

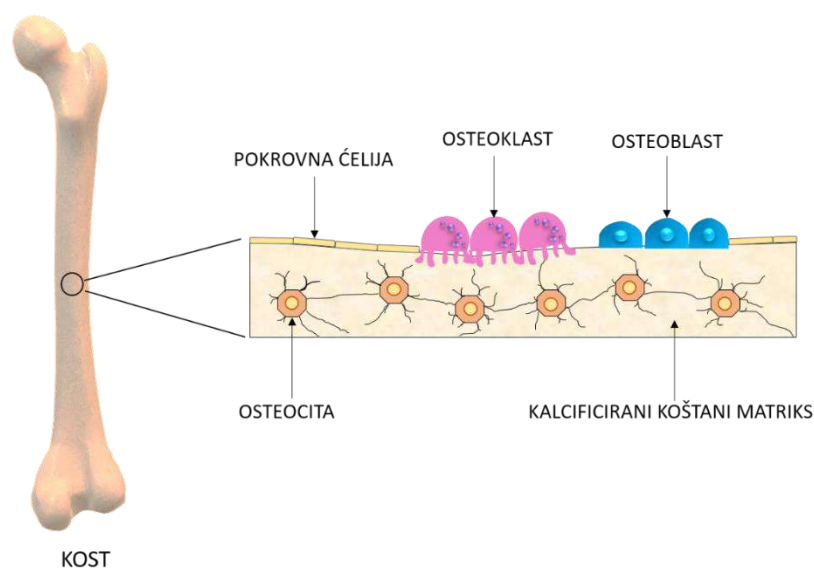
Iako je ustanovljena visoka korelacija između aktivnosti DNKaze1L2 i uspješnosti DNK profiliranja, i dalje je izolacija mitohondrijske DNK iz dlake mnogo uspješnija, zbog čega se i češće primjenjuje u forenzičkoj genetici.

Pošto dlaka ima sposobnost akumulacije i zadržavanja hemikalija duži vremenski period nakon uzorkovanja, nerijetko se koristi u forenzičko-toksikološkim analizama. Hemijskom analizom dlake moguće je detektovati prisustvo lijekova, psihoaktivnih droga (kokain, heroin, amfetamini) i rekreacijskih droga (alkohol, marihuana). Ove komponente se u dlaci zadržavaju duže nego u krvi, znoju i urinu, zbog čega dlaka predstavlja odličan izvor komponenti koje se testiraju i nakon dužeg vremenskog perioda (i nakon nekoliko mjeseci). Naravno, za svaku komponentu se razlikuje vremenski period zadržavanja u dlaci. Osim toga, na uspješnost analize utiču i vanjski faktori, odnosno vanjski kontaminanti, kao što su farba za kosu, sredstva za kosu (lak, vosak) te vanjska izloženost lijekovima i drogama. Za detekciju metabolita u dlaci koriste se imunohemijske, spektrofotometrijske (masena spektrofotometrija) te hromatografske (plinska ili tekuća) metode. Pri tome, detektuju se koncentracije različitih metabolita specifičnih za spoj čije se prisustvo dokazuje. Tako se npr. za alkohol detektuju metaboliti etanola kao što su etilni esteri masnih kiselina ili glukuronida, za dokazivanje heroina (koji treba razlikovati od kodeina ili morfija) mjeri se koncentracija 6-acetilmorfina, za marihuanu koncentracija tetrahidrokanabinola (THC) itd. Pored dokazivanja zloupotrebe droga, uzorak dlake se u forenzici veoma često koristi za dokazivanje trovanja u slučajevima samoubistva i ubistva.

2.1.4 Koštani uzorci kao biološki trag

Skeletni ostaci često predstavljaju jedini biološki trag u istražnim postupcima u kojima je prošao duži vremenski period od vremena kada je počinjeno krivično djelo. Skeletne ostatke pronađene na mjestu zločina prvo pregleda medicinski patolog ili forenzički antropolog koji, nakon što ustanovi da su ljudskog porijekla, na osnovu dostupnih informacija, kreira biološki profil osobe (spol, starost, visina, promjene na kostima). Osim toga, evidentira sve eventualne povrede koje bi mogle razjasniti okolnosti na koji je način nastupila smrt, o čemu će opširnije biti govora u poglavlju Forenzička antropologija. Zadatak medicinskog patologa / forenzičkog antropologa je i da procijeni koliko je vremena prošlo od trenutka smrti, što je veoma izazovno kada se leš pronađe u skeletiziranoj fazi. Tada se najčešće analizira zatečena fauna na skeletnom ostatku i oko njega,

jer je na osnovu valova kolonizacije pojedinih vrsta artropoda moguće procijeniti kada je nastupila smrt (opširnije u poglavlju Animalna forenzika). Zbog specifične kombinacije strukturnih, mehaničkih i hemijskih svojstava, koji stvaraju prirodnu otpornost na postmortalnu degradaciju biomolekula, ljudski skeletni ostaci predstavljaju prirodne bioarchive. Od svih biomolekula u skeletnim ostacima, forenzički najrelevantnija je molekula DNK, čijom se analizom mogu dobiti krucijalni podaci o identitetu umrle osobe. Molekula DNK se u koštanom tkivu može održati duži vremenski period (čak i nekoliko hiljada godina) upravo zahvaljujući specifičnom sastavu koštanog tkiva kojeg čine koštani matriks i tri različita tipa ćelija. Koštani matriks građen je od neorganskog (mineralnog) i organskog dijela. Neorganski dio sadrži minerale: biokarbonate, citrat, magnezij, natrij i kalij. Organski dio se u najvećoj mjeri sastoji od bjelančevine kolagena i osteokalcina, koji ima snažan afinitet prema mineralnom dijelu kosti. Najveći dio mineralnog dijela čini hidroksiapatit, koji se nalazi u obliku malih kristala inkorporiranih u kolagena vlakna. Ćelije koštanog tkiva su: osteoblasti, osteociti i osteoklasti (slika 2.37). Osteoblasti sintetiziraju organske dijelove koštanog matriksa te rast kostiju, osteociti su zapravo zreli osteoblasti i njihova se funkcija ogleda u održavanju koštanog matriksa, dok osteoklasti luče proteolitičke enzime i na taj način vrše razgradnju kao i resorpciju koštanog matriksa. DNK izolovana iz koštanog tkiva najvećim je dijelom porijeklom iz osteocita.



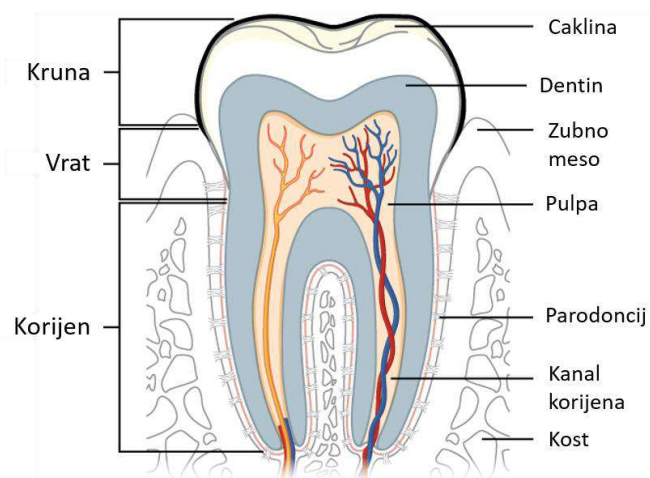
Slika 2.37. Sastav koštanog tkiva

Različiti dijelovi skeletnih ostataka, zbog svoje strukture, ne sadrže istu količinu DNK, stoga je važan odabir dijela skeleta koji će se koristiti u samom procesu analize DNK. Najkvalitetnija i najveća količina izolovane DNK dobija se iz uzoraka dugih kostiju (butna kost, potkoljenična kost, nadlaktična kost) te petroznog (lat. *pars petrosa*) dijela sljepoočne kosti (slika 2.38). Međutim, kada ovi uzorci nisu dostupni za analizu, koriste se druge dostupne kosti.



Slika 2.38. Skeletni ostaci iz perioda srednjeg vijeka. Primjer kostiju koji su bogat izvor DNK:
A – butna kost (lat. femur), B – nadlaktična kost (lat. humerus), C – petrozni dio sljepoočne kosti (lat. pars petrosa)

Veoma bogat izvor molekule DNK su zubi koji, ako su dostupni, najčešće predstavljaju prvi izbor za analizu DNK. Međutim, i među zubima postoje razlike u količini DNK pa su zdravi kutnjaci i očnjaci najbogatiji izvor DNK. Najveći dio strukturne osnove zuba čini dentin (lat. *substantia eburnea*). To je tkivo slično tkivu kosti, ali dosta tvrđe zbog prisustva kalcijevih soli. Dentin izlučuju odontoblasti i građen je od kolagenih vlakana (kolagen tipa I), glikozaminoglikana i hidroksiapatita (kalcijeve soli u obliku kristalića). Zub je morfološki sastavljen od krune gdje je dentin prekriven caklinom, a u području korijena prekriven je cementom (slika 2.39). Caklina (lat. *substantia adamantina*) ne sadrži ćelije, a sastoji se od oko 95% kalcijevih soli (uglavnom hidroksiapatita), 0,5% organske tvari, dok ostatak čini voda. Organsku tvar cakline čine barem dvije različite vrste proteina koji se nazivaju amelogenin (gen koji kodira ovaj protein upotrebljava se kao marker za određivanje spola) i enamelin. Cement je po građi sličan kosti, ali nema koštanih kanala, lamela i krvnih žila te je deblji u području vrška korijena, gdje se nalaze cementociti (ćelije slične osteocitima).



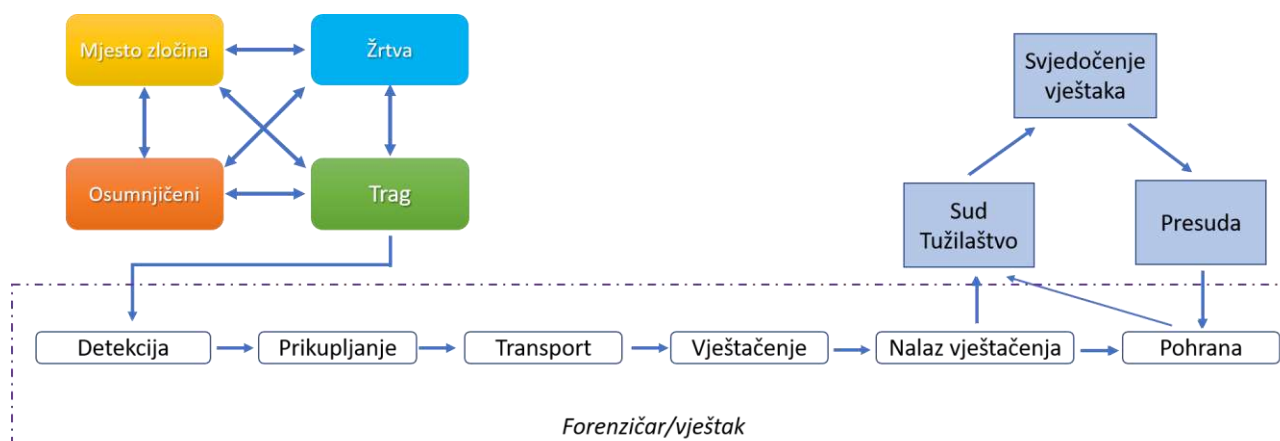
Slika 2.39. Šematski prikaz građe zuba

Iako su skeletni ostaci i zubi čvrsto tkivo, pod uticajem brojnih unutrašnjih i vanjskih (fizičkih, hemijskih i bioloških) faktora dolazi do njihove degradacije, a samim tim i degradacije molekula DNK. Zato su pravilna pohrana uzoraka skeletnih ostataka i odabir metode izolacije DNK krucijalni za dobijanje što kvalitetnijih rezultata. Za razliku od drugih bioloških tragova, skeletni ostaci imaju poseban korak koji se sastoji od pranja, čišćenja i sušenja prije same izolacije DNK. Mehaničkim čišćenjem uklanjanju se sve površinske nečistoće s uzorka skeletnog ostatka koji će biti podvrgnut analizi. Nakon toga, uzorci se detaljno peru primjenom 5% natrijevog hipohlorita i alkohola te se ispiru destilovanom vodom (u tri ponavljanja). Skeletni materijal se poslije pranja 48 sati suši u sterilnim uslovima, nakon čega se kosti, ali ne i zubi, grindaju (tupim borerom), pri čemu se uklanja prvi sloj koštanog uzorka, a zatim ponovo peru i suše po prethodno opisanoj proceduri. U posljednjoj fazi, prije same izolacije, kosti / zubi se melju u fini puderasti prah. Uzorci zuba i kostiju se prije postupka izolacije molekula DNK podvrgavaju procesu dekalifikacije, koji podrazumijeva upotrebu helirajućeg agensa (najčešće etilen-diaminotetrasirćetne kiseline – EDTA) za uklanjanje kalcijevih soli iz organo-mineralnog kompleksa. Najčešće se DNK izoluje iz ćelija koštanog uzorka primjenom organskih rastvarača (organska metoda izolacije DNK) ili primjenom komercijalno dostupnih setova za izolaciju DNK prilagođenih ovim zahtjevnim uzorcima. Generalno, izolacija DNK iz skeletnih ostataka veoma je zahtjevna i izazovna s obzirom na to da koštani uzorci sadrže manje količine DNK u odnosu na meka tkiva i tjelesne tekućine te da je DNK podložnija degradaciji što je postmortalna starost skeletnih ostataka veća. Dodatno, kao

i za sve ostale uzorke, veliki problem je i kontaminacije uzorka stranom DNK koja se u radu sa skeletnim ostacima nažalost često dešava zbog uslova u kojima se nađu skeletni ostaci, dugotrajnosti postupka izolacije, male količine i teško dostupne DNK u uzorku, kao i mnogih drugih faktora. Zbog toga su laboratorije u kojima se radi izolacija DNK iz skeletnih ostataka prilagođene radu s ovim uzorcima, što prije svega podrazumijeva rigidne uslove rada koji smanjuju mogućnost kontaminacije, čime se značajno povećava vjerovatnoća uspješnosti analize.

2.2 PRIKUPLJANJE, IDENTIFIKACIONO OZNAČAVANJE, PAKOVANJE I EVIDENCIJA KRETANJA TRAGA

Tokom prethodnih decenija fizički dokazi i tragovi s mjesta zločina, a među njima i biološki tragovi, postaju sve važniji u procesu krivičnih istraga. Povezivanja izvršioca kaznenog djela s mjestom izvršenja radnje na osnovu tragova ključni su faktor u istražnim i sudskim postupcima. Metode koje se odnose na prepoznavanje, prikupljanje, označavanje i dostavljanje tragova do mjesta njihove dalje obrade (laboratorije) predstavljaju niz koraka kojima se obezbjeđuje nepovredivost traga. Dodatno, od ključne je važnosti evidentirati svaki korak, način rukovanja i osobe koje su rukovale s tragom kako bi se obezbijedio integritet i vjerodostojnost traga na sudu. Dokumentovana historija kretanja dokaznog materijala naziva se lanac dokazivanja (engl. *chain of custody*), a podrazumijeva detaljnu hronološku evidenciju prikupljanja, dokumentovanja, pohranjivanja i analiziranja traga (slika 2.40).



Slika 2.40. Šematski prikaz koraka posjedovanja traga koji se moraju ispoštovati kako bi se osigurao kontinuitet lanca dokazivanja

Za svaki trag predložen na sudu mora se znati lanac posjedovanja čiji kontinuitet i integritet ne smiju biti narušeni. Na osnovu lanca posjedovanja zna se tačno koja je osoba bila u kontaktu s tragom u bilo kojoj fazi kretanja traga. Evidencija kretanja traga sadrži sve relevantne informacije o tragu i načinu postupanja s njim: datume prikupljanja, lokalitet, opis traga, metode prikupljanja i provedene analize uz obavezno navođenje svih osoba tj. istraživača / tehničara koji su u bilo kojem trenutku bili u kontaktu s tragom. Na taj način se osigurava vjerodostojnost traga te se isključuje mogućnost podmetanja ili lažnog predstavljanja traga na sudu.

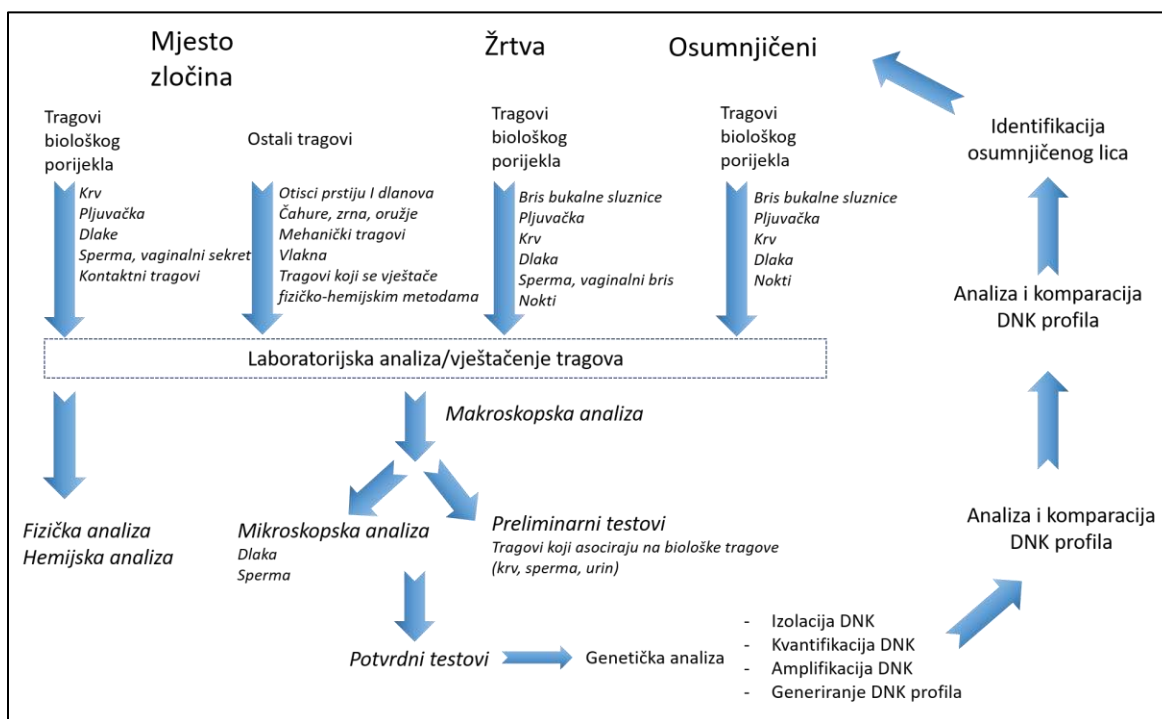
Vjerodostojnost traga može biti dovedena u pitanje ako se ne može dokazati da je trag koji je prezentovan na sudu isti onaj koji je prikupljen na mjestu zločina. Konkretno, da bi se dokazao lanac posjedovanja traga neophodno je dokazati:

1. da je trag ono što se tvrdi da jeste (npr. krv žrtve, otisak prsta osumnjičenog itd.),
2. kontinuitet u posjedovanju traga, od prikupljanja do prezentacije na sudu (s imenima svih osoba koje su trag imale u posjedu),
3. da je trag ostao u istom stanju u kojem je bio i u trenutku pronalaska.

Upravo zbog nepoštivanja lanca dokazivanja, u mnogim slučajevima validnost traga dovedena je u pitanje, zbog čega takvi tragovi nisu mogli biti uzeti u obzir u krivičnim parnicama što je za posljedicu imalo neželjeni ishod. Prikupljanje tragova, a naročito bioloških tragova, za potrebe forenzičke analize, njihovo pakovanje, označavanje i dostavljanje na vještačenje, mora se obavljati u skladu s pravilima kriminalističke struke i pravilima izuzimanja, rukovanja i transporta materijala za forenzičku analizu, čime se obezbjeđuje nepovredivost traga (slika 2.41).

Postupci prikupljanja i čuvanja tragova mogu značajno uticati na kvalitetu i rezultate njihove analize pa je prilikom prikupljanja tragova potrebno ispuniti tri uslova:

- prikupiti što veću količinu uzorka,
- izbjegavati uzimanje nečistoća iz okruženja traga, jer mogu uticati na samu analizu,
- propisno sušenje i brzo dostavljanje u forenzičku laboratoriju zbog povećane mogućnosti razgradnje i kontaminacije uslijed dugog stajanja.



Slika 2.41. Šematski prikaz koraka analize tragova

Prepoznavanje i prikupljanje biološkog traga na mjestu zločina ključno je za sve naredne korake, ali i za ishod kriminalističke istrage. Sistemsko pregledanje i procjena mjesta zločina počiva na sposobnosti istražitelja da identificira potencijalne biološke tragove koji se nalaze među velikom količinom irelevantnih, suvišnih i nepovezanih predmeta na mjestu zločina. Nakon što se konstatuje, trag se fotografiše i dokumentuje. Pažljiva dokumentacija biološkog traga u bilo kojoj krivičnoj ili građanskoj parnici daje validnost tragu na sudu. U nekim slučajevima se prije prikupljanja traga provode preliminarni testovi kako bi se dokazalo prisustvo biološkog traga na mjestu zločina (tragovi sperme – UV lampa; tragovi krvi – indikatorske trakice, itd) pa se tek nakon toga trag prikuplja i pakuje u odgovarajuću ambalažu.

Prilikom prikupljanja tragova s mjesta zločina neophodno je voditi računa o sljedećem:

- za prikupljanje tragova uvijek se koriste jednokratne lateks rukavice; ne dodirivati ništa osim potencijalnog traga; za svaki trag treba koristiti novi set rukavica ili dezinfikovati rukavice 10% natrijevim hipohloritom.

- zavisno od vrste i tipa bioloških tragova pronađenih na mjestu zločina, tragovi se prikupljaju pomoću vatiranog štapića (tragovi krvi i ostalih tjelesnih tečnosti), pincete (mali tragovi poput dlake, fragmenata tkiva) ili se uzimaju rukama zaštićenim rukavicama od lateksa (tragovi na predmetima kao što su odjeća, obuća, namještaj, posteljina, itd.).
- sav instrumentarij (pinceta, makaze i drugo), kao i rukavice, neophodno je prethodno sterilisati primjenom 10% natrijevog hipohlorit. Isto se preporučuje i između prikupljanja dva traga.
- tragovi u vidu mrlja, pronađeni na licu mjesta prikupljaju se i vještače u laboratoriji.
- tragovi otisaka prstiju i dlanova izuzimaju se na način da ne dođe do narušavanja otisaka, koji će vještačenjem dovesti do identifikacije počinioca krivičnog djela. Prije korištenja praška za izazivanje otisaka neophodno je uzeti uzorke za DNK analizu, jer prašak djeluje kao inhibitor u postupcima izolacije DNK.
- nakon prikupljanja tragovi se pakuju u odgovarajuću papirnu (nipošto plastičnu) ambalažu i transportuju do laboratorije gdje će biti analizirani. Papirna ambalaža sprječava razvoj mikroorganizama i degradaciju biološkog materijala. Svaki trag se posebno pakuje, numerički i označava. Preporučuje se da prije pakovanja tragovi budu osušeni čime se usporava degradacija biološkog materijala. U slučajevima kada se trag na mjestu zločina zatekne u sasušenom stanju (npr. trag krvi ili sperme) neophodno je prilikom prikupljanja vatrirani dio štapića navlažiti vodom i tek onda prikupiti trag. Tragovi na predmetima (npr. oružja, tkanine, odjevni predmeti i dr.) kao i fragmenti tkiva mogu se kratkotrajno pakovati u plastičnu ambalažu (maksimalno 2 sata), uz preporuku da se što prije analiziraju i pohrane u papirnoj ambalaži. Puna krv se uzima u vakutajner koji sadrži antikoagulans (najčešće EDTA). Nakon pronalaska, fiksiranja i propisnog prikupljanja, neophodno je da trag nosi stalnu identifikacijsku oznaku. Svaki trag treba biti obilježen detaljnim opisom koji uključuje naziv i opis predmeta, mjesto i datum prikupljanja, ime osobe koja ga je prikupila i datum preuzimanja. U fazi prikupljanja, ali i svim narednim fazama analize traga, vrlo je važno spriječiti bilo koji oblik kontaminacije traga. Ako je u pitanju veći broj tragova koji se pakuju, oni moraju biti upakovani odvojeno kako ne bi došlo do unakrsne kontaminacije. Kriminalistički tehničari prolaze posebne edukacije i obuke, kako bi sveli mogućnost kontaminacije uzorka na minimum.

Kada dospije u laboratoriju, dokazni materijal (tragove koji se vještače) preuzima stručno lice ili vještak koje ga zavodi u evidenciju i dodjeljuje mu odgovarajući laboratorijski kod. U narednim fazama materijal se otpakuje, detaljno pregleda, fotodokumentuje te evidentira u knjigu protokola uz detaljan opis svakog koraka analize. Loša pohrana traga može dovesti do njegove degradacije i neupotrebljivosti. Stoga, bez obzira na to da radi li se o kratkotrajnoj ili dugotrajnoj pohrani, svi tragovi moraju biti prethodno osušeni, propisno upakovani u papirnu ambalažu i pohranjeni u suhoj prostoriji bez direktnog uticaja sunčeve svjetlosti. Tragovi koji iz bilo kojeg razloga ne mogu biti osušeni (npr. puna krv) pohranjuju se na $+4^{\circ}\text{C}$, dok se tkiva pohranjuju na -20°C . Koštani uzorci se čuvaju u suhim, hladnim i mračnim prostorijama intaktni ili u formi praha. Nakon završene DNK analize, DNK izolati se mogu čuvati do nekoliko mjeseci na -20°C ili duže na -80°C .

Biološki tragovi se dugotrajno pohranjuju u institucijama nadležnim za istražne i procesne radnje. Pri tome, neophodno je da budu propisno upakovani u papirnoj ambalaži (papirnim kesama i kutijama) s naznačenim brojevima predmeta. Tragovi se, za određena krivična djela, pohranjuju u vremenskom periodu koji je propisan zakonom.

Literatura

- An, J.H., Shin, K.J., Yang, W.I., Lee, H.Y. (2012). Body fluid identification in forensics. *BMB Reports*, 45(10), 545-553.
- Azman, A.R., Mahat, N.A., Wahab, R.A., Ahmad, W.A., Huri, M.A.M., Hamzah, H.H. (2019). Relevant visualization technologies for latent fingerprints on wet objects and its challenges: a review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 9, 23.
- Berg, G.E., Ta'ala, S.C. (Eds.) (2015). *Biological Affinity in Forensic Identification of Human Skeletal Remains: Beyond Black and White*. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Burrill, J., Daniel, B., Frascione, N. (2019). A review of trace "Touch DNA" deposits: Variability factors and an exploration of cellular composition. *Forensic Science International: Genetics*, 39, 8-18.
- Butler, J.M. (2005). *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers* (2nd Edition). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Butler, J.M. (2012). Sample Collection, Storage and Characterization. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, (pp 1-27). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Carr, S. (2009). Forensic Science: The Future of Body Fluid Identification. *Measurement and Control*, 42(10), 310-313.
- Casey, D.G., Price, J. (2010). The sensitivity and specificity of the RSID-saliva kit for the detection of human salivary amylase in the Forensic Science Laboratory, Dublin, Ireland. *Forensic Science International*, 194(1-3), 67-71.
- Chatterjee, S. (2019). Saliva as a forensic tool. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 11(1), 1-4.
- Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007). Biological material – collection, characterization and storage. *An Introduction to Forensic Genetics*, (pp 17-25). Chichester, UK: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd.
- Gross, A.M., Harris, K.A., Kaldun, G.L. (1999). The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Sciences*, 44(4), 837-840.
- Gunn, A. (2009). Body fluids and waste products. *Essential Forensic Biology* (2nd Edition), (pp 45-84). Chichester, UK: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd.
- Harbison, S.A., Fleming, R.I. (2016). Forensic body fluid identification: state of the art. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 6, 11-23.
- Houck, M.M., Siegel, J.A. (2010). *Fundamentals of Forensic Science* (2nd Edition). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- James, S.H., Eckert, W.G. (1998). *Interpretation of Bloodstain Evidence at Crime Scenes* (2nd Edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- James, S.H., Nordby, J.J., Bell, S. (Eds.) (2014). *Forensic Science: An Introduction to Scientific and Investigative Techniques* (4th Edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Jusic, B., Pilav, A., Dzehverovic, M., Cakar, J. (2023). Analysis of aborted fetal material using autosomal STR markers in forensic

- cases of sexual assault. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 94, 102468.
- Kolar-Gregorić, T. (1999). *Praktikum kriminalističke tehnike*. Zagreb, Hrvatska: Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske, Policijska akademija.
- Lee, H.C., Gaensslen, R.E. (Eds.) (2001). *Advances in Fingerprint Technology* (2nd Edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Li, R. (2015). *Forensic Biology* (2nd Edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- MacDonell, H.L. (1997). *Bloodstain Patterns*. New York, USA: Laboratory of Forensic Science.
- Maksimović R., Todorčić U. (1995). *Kriminalistika – tehnika*. Beograd, Srbija: Policijska akademija u Beogradu.
- Malegori, C., Alladio, E., Oliveri, P., Manis, C., Vincenti, M., Garofano, P., Barni, F., Berti, A. (2020). Identification of invisible biological traces in forensic evidences by hyperspectral NIR imaging combined with chemometrics. *Talanta*, 215, 120911.
- Marjanović, D., Čakar, J., Smajlović Skenderagić, L., Bešić, L., Doğan, S., Primorac, D. (2018). Basic models and phases of the process of DNA analysis. In D. Marjanović, D. Primorac, S. Doğan (Eds.), *Forensic Genetics: Theory and Application*, (pp 75-146). Sarajevo, Bosna i Hercegovina: International Burch University.
- Milosavljević, M. (2012). *Forenzička biologija*. Sarajevo, Bosna i Hercegovina: GENDER Centar FBiH.
- Mitrović V., Stupar LJ. (2002). *Kriminalistika – tehnika*. Beograd – Zemun, Srbija: Viša škola unutrašnjih poslova.
- Pang, B.C., Cheung, B.K. (2007). Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen. *Forensic Science International*, 169(1), 27-31.
- Primorac, D. i saradnici (2001). *Primjena analize DNK u sudskoj medicini i pravosuđu*. Zagreb, Hrvatska: Nakladni zavod Matice Hrvatske.
- Primorac, D., Schanfield, M.S., Marjanović, D. (2014). Basic Genetics and Human Genetic Variation. In D. Primorac, M.S. Schanfield (Eds.), *Forensic DNA Applications – An Interdisciplinary Perspective*, (pp 3-53). Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Saferstein, R. (2012). *Forensic Science: From the Crime Scene to the Crime Lab* (2nd Edition). London, UK: Pearson.
- Saferstein, R. (2014). *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science* (11th Edition). London, UK: Pearson.
- Štrak, M., Hobljaj, S., Stemberga, V., Šoša, I., Cuculić, D. (2018). Biološki tragovi na mjestu događaja. *Medicina Fluminensis*, 54(2), 129-139.
- Sijen, T., Harbison, S. (2021). On the Identification of Body Fluids and Tissues: A Crucial Link in the Investigation and Solution of Crime. *Genes*, 12(11), 1728.
- Sodhi, G.S., Kaur, J. (2016). Physical developer method for detection of latent fingerprints: A review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*, 6(2), 44-47.
- Stefanidou, M., Alevisopoulos, G., Spiliopoulou, C. (2010). Fundamental issues in forensic semen detection. *The West Indian Medical Journal*, 59(3), 280–283.
- Turrina, S., Filippini, G., Atzei, R., Zaglia, E., de Leo, D. (2008). Validation studies of rapid stain identification-blood (RSID-blood) kit in forensic caseworks. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), 74-75.

- van Oorschot, R.A., Ballantyne, K.N., Mitchell, R.J. (2010). Forensic trace DNA: a review. *Investigative Genetics*, 1(1), 14.
- van Oorschot, R.A.H., Verdon, T.J., Ballantyne, K.N. (2016). Collection of Samples for DNA Analysis. In W. Goodwin (Ed.), *Forensic DNA Typing Protocols (Methods in Molecular Biology Book Series*, vol. 1420, 2nd Edition), (pp 1-12). New York, USA: Humana Press.
- Virkler, K., Lednev, I.K. (2009). Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*, 188(1-3), 1-17.
- White, B.P. (1986). Bloodstain Patterns on Fabrics: The Effect of Drop Volume, Dropping Height and Impact Angle. *Journal of the Canadian Society of Forensic Science*, 19, 3-36.
- Zapata, F., Silva Gregório Martins, M., García-Ruiz, C. (2015). Body Fluids and Spectroscopic Techniques in Forensics: A Perfect Match?. *Journal of Forensic Medicine*, 1(1), 1000101.



3.

MOLEKULARNOGENETIČKA ANALIZA TRAGOVA HUMANOG PORIJEKLA

JASMINA ČAKAR

BELMA JUSIĆ

DAMIR MARJANOVIĆ

Najpouzdanija potvrdna metoda analize bioloških tragova je molekularnogenetička analiza dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) izolovane iz biološkog traga. Ova metoda, poznata i kao *DNK profiliranje*, danas je rutinska metoda i zlatni standard za analizu bioloških tragova u forenzičkoj nauci i, iako sama po sebi nije dovoljna za konačnu presudu, predstavlja okosnicu procesuiranja svih forenzičkih slučajeva u kojima je dostupan biološki trag podoban za analizu DNK. S unapređenjem tehnologije unaprijeđena je i sama analiza te je danas moguće za relativno kratko vrijeme dobiti tačne i pouzdane rezultate. Izuzetan značaj DNK analize bioloških tragova leži u njenoj primjenljivosti na vrlo male količine traga, na miješane tragove, kao i na tragove koji su stari i do nekoliko desetina, pa čak i nekoliko stotina godina, ako je riječ o koštanom tkivu u kojem je DNK sačuvana u mineralnom matriksu kosti i zuba.

Sama analiza se zasniva na komparativnoj analizi detektovanih alelnih varijanti na odabranim genetičkim markerima za tragove pronađene na mjestu zločina, kao i za referentne uzorke koji potiču od osoba osumnjičenih za krivično djelo ili od žrtava ili, pak, bilo kojih drugih osoba koje se iz operativnih razloga povezuju s istragom i za koje je naloženo testiranje. Kao najpouzdaniji markeri u forenzičkogenetičkim analizama pokazali su se STR (engl. *Short Tandem Repeats* – kratke ponavljajuće sekvence) markeri koji se već četvrt vijeka rutinski koriste u forenzičkim laboratorijama širom svijeta. Rezultati analize STR markera predstavljaju se elektroferogramskim prikazom koji se označava kao *DNK profil*. Komparativnom analizom DNK profila dobijenih iz tragova s mjesta zločina i referentnih uzoraka (osumnjičeni, žrtva i drugo) utvrđuje se ili apsolutno poklapanje dobijenih DNK profila između osoba i bioloških tragova pronađenih na mjestu zločina ili potencijalna srodnost između dvije ili više osoba. Dobijeni rezultati prikazuju se kao vjerovatnoća da se događaj desio, tj. vjerovatnoća koja ukazuje na to koliko je pretpostavka tužilaštva (da trag pripada osumnjičenoj osobi) vjerovatnija od pretpostavke odbrane (da trag pripada nekoj drugoj osobi iz populacije), i to uz primjenu odgovarajućih statističkih metoda koje garantuju pouzdanost rezultata i olakšavaju interpretaciju rezultata. Iako je danas vrlo pojednostavljena, sama analiza nije se suštinski mijenjala od samih početaka te obuhvata tri osnovna koraka i jednu bitnu predradnju: pravilno prikupljanje bioloških tragova, izolaciju ukupne DNK, umnožavanje (amplifikaciju) ciljanih fragmenata DNK (markera koji se analiziraju) i detekciju umnoženih markera. U ovom poglavlju fokus će biti usmjeren k osnovnim laboratorijskim procedurama koje se primjenjuju za sva tri koraka analize.

3.1 DNK ANALIZA

3.1.1 *Izolacija DNK iz bioloških tragova*

Izolacija molekula DNK iz bioloških tragova prvi je i ključni laboratorijski korak u molekularnogenetičkoj analizi bioloških tragova. Uspješnost izolacije primarno zavisi od količine uzorka, stepena razgradnje uzorka i čistoće uzorka. Na mjestu zločina veoma često se nađe relativno mala količina traga (dlaka, male količine epitelnih ćelija, mikrotragovi krvi, sjemenske tečnosti itd.). U takvim slučajevima, zbog male polazne količine izolovanog genetičkog materijala, analiza može rezultirati dobijanjem nekompletnih rezultata (parcijalnih DNK profila), koji ponekad ne mogu dati jasne odgovore o samom događaju ili počinocu krivičnog djela. Tada je analiza DNK nedovoljno informativna i može poslužiti samo kao dodatna analiza, te je neophodno primijeniti druge istražne postupke u cilju rasvjetljenja počinjenog krivičnog djela.

Također, biološki tragovi pronađeni na mjestu zločina često su degradirani, posebno ako je prošlo dosta vremena između ostavljanja i prikupljanja tragova, ako su tragovi bili u nepovoljnom okruženju ili ako je sama priroda traga takva da je podložniji degradaciji (npr. meka tkiva su podložnija degradaciji od čvrstih tkiva). Zbog toga je od iznimne važnosti brzo i pravilno prikupiti tragove te ih što prije procesuirati (ili pažljivo skladištiti do upotrebe) kako bi se usporili biološki procesi koji vode do truljenja i raspadanja tkiva. Često se prave greške prilikom prikupljanja i skladištenja bioloških tragova, kada se oni pohranjuju u ambalažu koja ubrzava procese truljenja i raspadanja. Zbog toga je neophodno sve biološke tragove prikupljati i pohranjivati u papirnu ambalažu (izuzev pune krvi koja se prikuplja u plastične kontejnere / vakutajnere) i do upotrebe čuvati na suhom i hladnom mjestu.

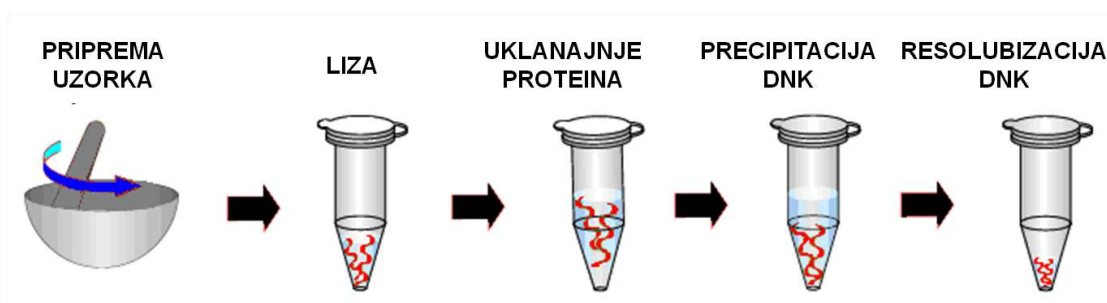
Veliki problem pri interpretaciji rezultata može praviti smjesa DNK profila (miješani DNK profil) koja može da nastane kao rezultat kontaminacije biološkog traga. Kontaminacija na mjestu zločina je česta i do nje može doći na dva načina:

1. kontaminacija tokom izvršenja krivičnog djela, kada je jedan trag kontaminiran drugim u smjesi tragova žrtve i počinioce (najčešće u slučajevima silovanja) ili kada ima više počinilaca krivičnog djela i
2. kontaminacija nakon izvršenja zločina do koje dolazi uslijed nepažljivog postupanja na mjestu zločina ili, pak, prikupljanja bioloških tragova od strane ovlaštenih lica koja se

naknadno nađu na mjestu zločina. Ovdje se ubraja i slučajna kontaminacija uzoraka u laboratorijskoj analizi tragova, do koje dolazi vrlo rijetko. Zbog toga se prilikom svake laboratorijske analize mora isključiti mogućnost pojave slučajne laboratorijske kontaminacije, i to tako što se sav prostor, oprema, instrumentarij i hemikalije sterilišu, tehničari nose posebnu laboratorijsku odjeću, zaštitne rukavice, kape i maske, te se u svaku pojedinačnu analizu uključuje i negativna kontrola. Negativna kontrola se tretira na isti način kao i uzorak, samo što se u nju ne dodaje biološki materijal (negativna ekstrakcijska kontrola) niti DNK (negativna PCR kontrola). Po završetku analize, negativna kontrola ne smije sadržavati DNK, u suprotnom, smatra se da je došlo do kontaminacije tokom laboratorijskog rada te se cijeli postupak analize mora ponoviti.

U svim postupcima izolacije DNK iz ćelije u osnovi se narušava integritet ćelije. Ovaj korak je posebno zahtjevan kod biljnih ćelija jer sadrže ćelijski zid koji je neophodno mehanički razoriti mljevenjem, maceracijom ili smrzavanjem (korištenjem tečnog azota). U narednim fazama je neophodno ukloniti ćelijske kompartimente i biomolekule poput proteina, lipida, RNK te ostale ćelijske i tkivne komponente.

Opći principi izolacije molekule DNK obuhvataju tri faze: 1. liza (razgradnja) ćelije, 2. purifikacija DNK, tj. uklanjanje kontaminirajućih supstanci i inhibitora PCR reakcije, 3. prikupljanje (kolekcija) uzorka u željenom volumenu i koncentraciji (slika 3.1).

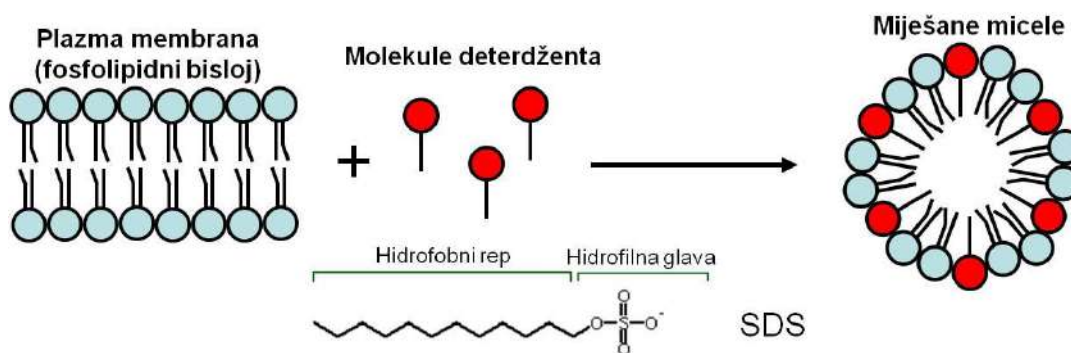


Slika 3.1. Šematski prikaz ekstrakcije DNK molekule

Liza ćelije je postupak narušavanja ćelijskog membranskog sistema. Dešava se djelovanjem enzima, osmolitika i virusa, a najčešće nastaje kao rezultat razlika u osmotskim potencijalima u ćeliji i vanćelijskom prostoru. U laboratorijskim uslovima, liza ćelija se postiže temperaturnim,

enzimatskim i osmolitičkim djelovanjem te mehaničkom ili ultrasoničnom homogenizacijom (liza biljnih ćelija i ćelija gljivica). Kod humanih i animalnih ćelija, lizom se narušava dvoslojna lipidno-proteinska membrana, dok je postupak narušavanja kod biljnih, bakterijskih i ćelija gljivica nešto zahtjevniji zbog postojanja krutih ćelijskih zidova koji su kod biljaka pretežno građeni od celuloze, kod bakterija od peptidoglikana, a kod gljivica pored ostalog ćelijski zid sadrži i čvrsti hitin. Sve ove komponente izuzetno su otporne na enzimatsko, temperaturno i osmolitičko djelovanje pa ih je neophodno prethodno izložiti mehaničkom djelovanju (maceriranje i “grindanje”) ili veoma niskim temperaturama (tečni azot, tečni CO₂) pa tek onda djelovati enzimima i osmoliticima.

Za narušavanje strukture lipidnog bisloja plazmamembrane, u postupcima izolacije molekule DNK najčešće se koriste anionski deterdženti (kao što je natrijev dodecil sulfat – SDS) čije se amfipatske molekule (molekule koje jednim svojim krajem privlače, a drugim odbijaju molekule vode) ubacuju između fosfolipidnih molekula membrane što rezultira dezintegracijom membrane (slika 3.2). Pored deterdženta, u pufer za lizu ćelija dodaje se so, zatim neki helatni agens (najčešće etilen-diaminotetrasirćetna kiselina (EDTA) koja helira Mg²⁺) te proteolitički enzim (proteinaza K, proteaza) za digestiju proteina. Konačni rezultat lize ćelije je oslobađanje ćelijskog sadržaja u okolni rastvor (lizat).



Slika 3.2. Dezintegracija plazmamembrane djelovanjem anionskog deterdženta

Naredna faza u izolaciji DNK je purifikacija (pročišćavanje) lizata, odnosno uklanjanje biolomolekula koje su koekstrahirane s molekulom DNK i koje predstavljaju neželjene nusprodukte odgovorne za značajno smanjenje kvalitete izolovane DNK. U ovoj fazi najčešće se koriste:

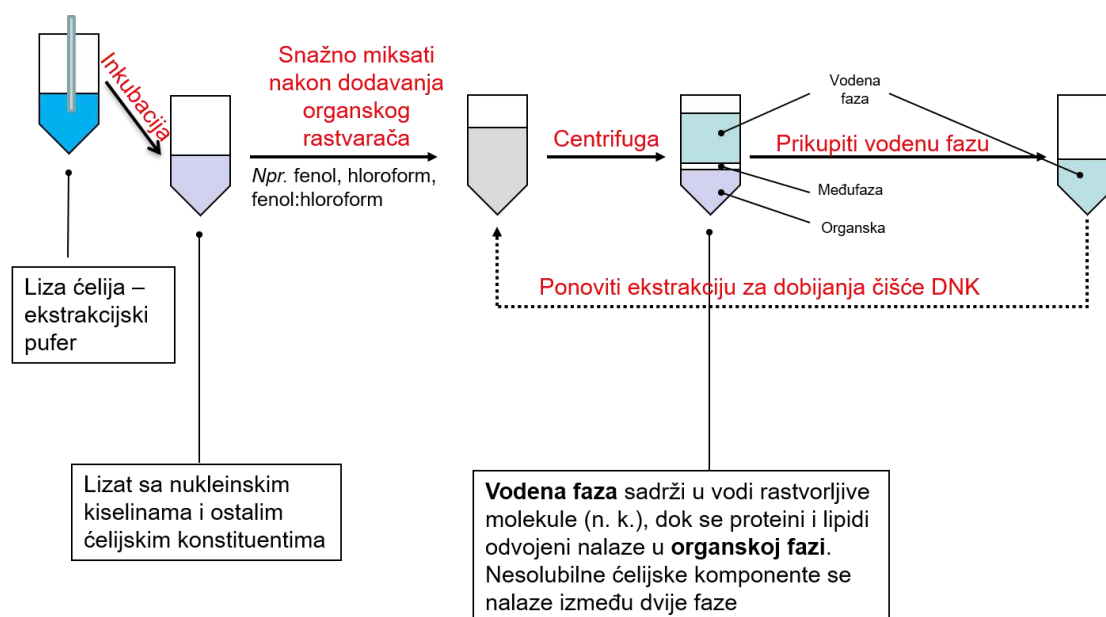
- *organska otapala* koja denaturišu preostale proteine,
- *zasićeni rastvor soli* koji prekida vodikove veze između molekula DNK i vode te omogućava taloženje DNK i/ili
- *alkohol* koji u prisustvu kationa inducira strukturne promjene molekule DNK pri čemu se stvaraju agregati koji se izdvajaju (talože) iz rastvora.

Završna faza je prikupljanje izolovanih molekula DNK, kojoj najčešće prethodi ispiranje molekule DNK u 70% rastvoru etanola. Nakon uklanjanja 70% etanola, slijedi faza sušenja te resolubizacija molekula DNK u vodi ili Tris-EDTA (TE) puferu. Prednost se daje TE puferu jer usporava degradaciju izolovanih molekula DNK i RNK.

U laboratorijskoj praksi koriste se različite metode za izolaciju DNK, a sve se mogu grupisati u *organske*, *neorganske* i *metode izolacije korištenjem komercijalnih setova*. Međusobno se razlikuju po purifikacijskoj fazi, dok su faze lize ćelije i prikupljanja izolata manje-više iste za sve protokole.

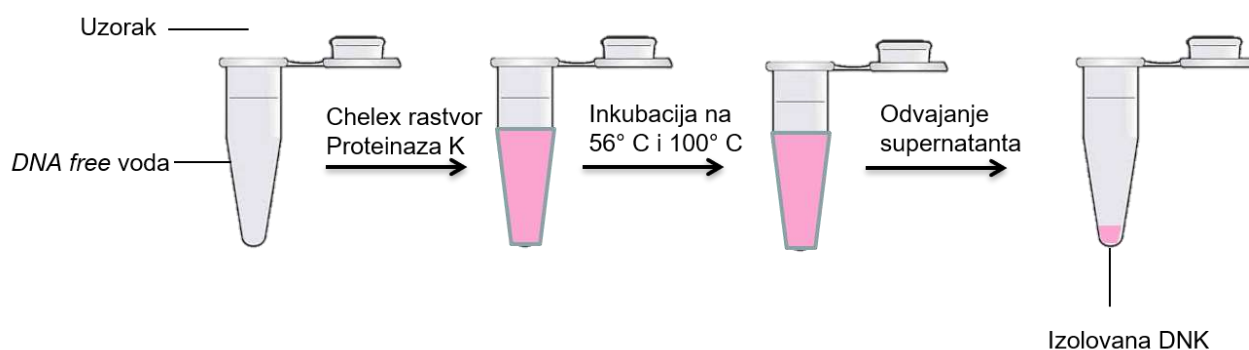
Organska metoda izolacije podrazumijeva upotrebu organskih rastvarača koji vrše deproteinizaciju. Najčešća je upotreba kombinacije fenola i hloroforma kojima se vrši sukcesivna ekstrakcija DNK, prvo fenolom pa smjesom fenola i hloroforma (najčešće u omjeru 1 : 1) koji denaturišu proteine i na kraju hloroformom koji uklanja preostali fenol (slika 3.3).

Najveći nedostatak ove metode ekstrakcije predstavljaju toksična isparavanja organskih otapala te korozivna priroda fenola, jer mogu izazvati opekotine u kontaktu s kožom. Također, radi se o relativno dugotrajnoj metodi koja iziskuje povećanu potrošnju laboratorijskog materijala poput tubica i pipetnih nastavaka. Ipak, ako se radi o zahtjevnim biološkim tragovima (koštano tkivo i derivati kože) ili maloj količini bioloških tragova, ova metoda je česta metoda izbora.



Slika 3.3. Postupak organske ekstrakcije DNK molekula

U slučajevima kada uzorak sadrži veće količine DNK (kao što su referentni uzorci pune krvi ili brisa bukalne sluznice), koriste se brze, jeftine i robusne metode ekstrakcije DNK u kojima se DNK taloži isoljavanjem ili korištenjem helatnih polimera kao što je *Chelex 100*, koji ima visok afinitet prema polivalentnim metalnim ionima. Komponenta *Chelex* sastoji se od stiren-divinilbenzen kopolimera koji sadrže uparene iminodiacetate ione koji djeluju kao helatori. Metoda *Chelex* podrazumijeva inkubaciju partikula *Chelex* s uzorkom na temperaturi ključanja, pri čemu *Chelex* sprečava degradaciju DNK heliranjem metalnih iona koji djeluju kao katalizatori denaturacije DNK na visokim temperaturama (slika 3.4).

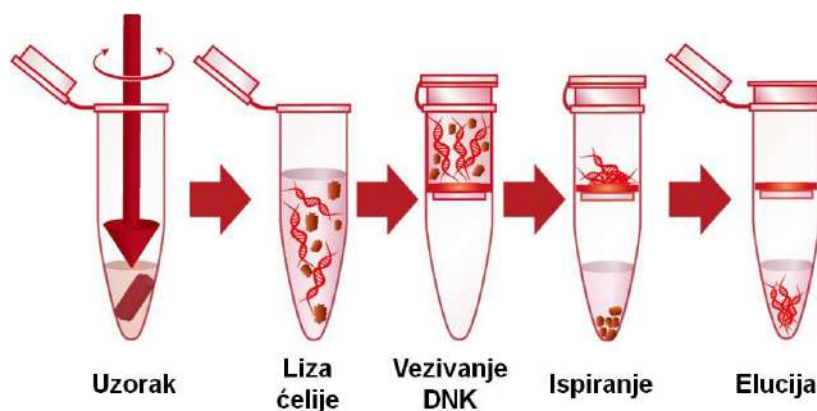


Slika 3.4. Šematski prikaz Chelex ekstrakcije DNK molekula

Još jedna veoma često primjenjivana metoda ekstrakcije DNK (mada ne tako česta u forenzičkim laboratorijama) jest metoda isoljavanja koju su opisali Miller i saradnici. U ovoj metodi u lizat se dodaje zasićeni rastvor soli natrijevog hlorida (5M NaCl) koja taloži proteine i na taj način ih uklanja iz rastvora. Metoda je ekonomična, brza, jednostavna i ne zahtijeva upotrebu toksičnih hemikalija.

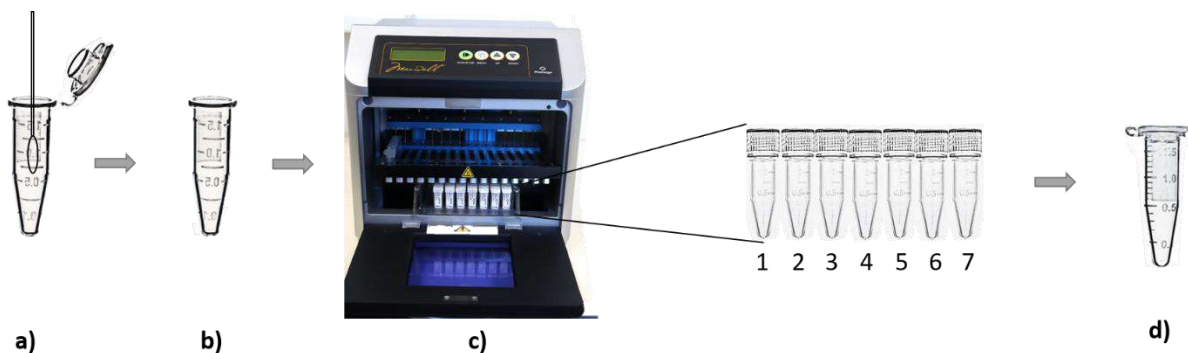
U forenzičko-genetičkim laboratorijama širom svijeta, DNK se najčešće izoluje korištenjem *komercijalno dostupnih setova za ekstrakciju DNK*. Ovi brzi, jednostavni i relativno jeftini protokoli zasnivaju se na korištenju silika-membrana, magnetnoj separaciji ili tehnologiji razmjene aniona.

Tehnike ekstrakcije zasnovane na korištenju silika-membrane (slika 3.5) vrlo se često koriste u forenzičko-genetičkoj praksi, a zasnivaju se na apsorpciji DNK na silika-membranu u prisustvu soli ili u uslovima odgovarajuće pH sredine. Čelijski kontaminanti uklanjanju se sukcesivnim ispiranjem membrane puferima koji pripremljeni dolaze u sastavu izolacijskog seta. U konačnici se DNK uklanja s membrane dodavanjem elucionog pufera koji sadrži malu koncentraciju soli. Soli u ovim puferima djeluju kao haotropni agensi koji u vodenom rastvoru narušavaju trodimenzionalnu strukturu makromolekula prekidanjem vodikovih veza. Tehnika je brza, jednostavna, ekonomična i pogodna za širok spektar uzoraka i automatizaciju procesa.



Slika 3.5. Izolacija DNK molekula primjenom silika-membrana

Magnetna separacija je tehnika koja se bazira na reverzibilnom vezivanju DNK za čvrstu magnetnu površinu, perlu ili partikulu. Nakon vezivanja DNK za neku od navedenih podloga, ćelijske komponente se odvajaju od molekule DNK, nakon čega slijedi korak ispiranja te eluiranja DNK korištenjem etanolnog rastvora. Ova metoda je brza, jednostavna i često je automatizirana (slika 3.6), ali za razliku od ostalih, spada u kategoriju skupljih metoda.



Slika 3.6. Šematski prikaz procedure automatizovanog Maxwell® instrumenta proizvođača Promega s pripremljenim setom reagenasa za ekstrakciju DNK: a – inkubacija uzorka, b – centrifugiranje i separacija lizata, c – postavljanje lizata u prvu tubicu seta za ekstrakciju (1. pufer za lizu, 2. izopropanol, 3. pufer za ispiranje, 4. pufer za eluciju, 5. suspenzija s magnetnim partikulama, 6. pufer za ispiranje), d – izolat DNK

Tehnologija razmjene aniona bazira se na interakciji negativno naelektrisane fosfatne grupe nukleinskih kiselina i pozitivno naelektrisane površine molekula supstrata. Molekula DNK se specifično veže za supstrat u prisustvu niske koncentracije soli. U narednim se koracima kontaminanti (ćelijske komponente) uklanjaju ispiranjem pomoću pufera koji sadrže soli u malim do srednjim koncentracijama, a purificirana DNK se eluira korištenjem pufera koji sadrži visoku koncentraciju soli. Ova metoda se najčešće koristi za izolaciju plazmida.

3.1.1.1 Detekcija količine izolovane DNK

Detekcija količine izolovane DNK vrlo je važan korak koji prethodi svim daljim genetičkim analizama. Ima za cilj poboljšati preciznost same analize te povećati informativnost dobijenih rezultata, ali i uspješnost narednih koraka analize DNK, posebno korak amplifikacije. Metode

detekcije količine i kvalitete izolovane DNK od krucijalnog su značaja jer omogućavaju procjenu efikasnosti protokola za izolaciju molekule DNK, kao i mogućnost odabira optimalne količine ekstrakta DNK za sve naredne faze genotipizacije. Sam proces detekcije količine dostupne DNK započinje procjenom količine i kvalitete biološkog traga na mjestu zločina (makroskopske, mikroskopske i imunohemijske metode), nakon čega slijedi kvalitativna i kvantitativna detekcija izolovane molekule DNK. Metode detekcije usavršavale su se s napretkom tehnologije od UV spektrofotometrije, preko DNK hibridizacijskih tehnika do kvantifikacijske *RealTime PCR* metode (tabela 3.1).

Tabela 3.1. Komparativni prikaz metoda detekcije izolovane DNK molekule

Detekcija ukupne DNK	Detekcija ukupne humane DNK	RealTime PCR metode detekcije
<i>UV spektrofotometrija</i>	<i>Slot blot hibridizacijska tehnika</i>	<i>Detekcija ukupne humane autosomske DNK</i>
<i>Fluorescentni testovi</i>	<i>AluQuant</i>	<i>Detekcija Y-hromosoma, mtDNK i Alu polimorfizama</i>
<i>Agarozna gel-elektroforeza</i>	<i>Southern blot analiza</i>	<i>Multipleks Real-time PCR</i>

U forenzičkim analizama, najprije su se primjenjivale metode detekcije ukupne DNK koje imaju relativno nisku senzitivnost, nisu specifične za humanu molekulu DNK te njima nije moguće razlikovati molekulu RNK od DNK, kao ni intaktnu od fragmentirane molekule DNK. Zbog toga se ove metode danas veoma rijetko primjenjuju u forenzičkim laboratorijama. To su metode detekcije DNK primjenom UV spektrofotometrije i gel-elektroforeze.

UV spektrofotometrijom je, na talasnim dužinama od 260 i 280 nm, moguće odrediti koncentraciju DNK u uzorku, koja na ovim talasnim dužinama apsorbira maksimum svjetlosti, što omogućava razlikovanje DNK od rezidualnih peptida. Međutim, primjenom ove metode nije moguće izbjeći interferencije porijeklom od drugih biomolekula i hemijskih komponenti (boje, hemijske komponente koje se koriste prilikom ekstrakcije DNK itd.). Zbog toga se primjenjuju fluorescentne interkalarnе boje, koje se specifično vežu za ciljanu biomolekulu (DNK, RNK, proteini) čime je omogućena specifična detekcija čak i manjih količina specifičnih molekula.

Za analizu uzoraka ovom metodom neophodno je korištenje spektrofotometara koji imaju mogućnost očitavanja fluorescencije (fluorometara), a jedan od najčešće korištenih u molekularnogenetičkim laboratorijama je Qubit fluorometar (slika 3.7).

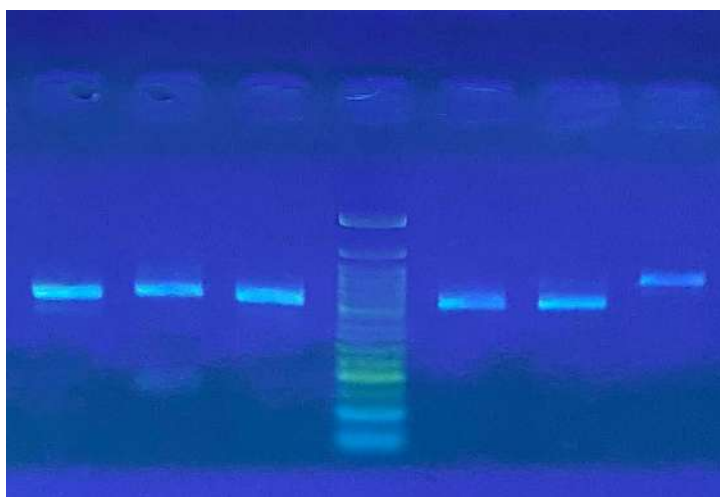


Slika 3.7. Qubit fluorometar

Iako mnogo senzitivnija od UV spektrofotometrije, ni ova metoda nije specifična za humanu DNK. U uzorku se detektuje DNK bez obzira na njeno biološko porijeklo, što može rezultirati lažno pozitivnim rezultatima (npr. uslijed kontaminacije bakterijskom DNK).

Vrlo često primjenjivana metoda detekcije molekule DNK u izolatu je *metoda agarozne gel-elektroforeze*. Metoda se zasniva na činjenici da biomolekule kao što su proteini, DNK i RNK, imaju različitu brzinu kretanja u električnom polju istosmjerne struje. Metoda je brza i jednostavna i koristi se za relativnu procjenu količine izolovane DNK. Ova se procjena može postići upotrebom standarda koji čini molekula DNK velike molekularne težine, a koja se dodaje na gel uz analiziranu molekulu DNK. DNK se boji fluorescentnom bojom kao što je etidijev bromid ili netoksične *Midori Green* i *SYBR Green* boje. Molekula DNK se vizualizira nakon završene elektroforeze korištenjem UV svjetla (za *Midori green* boju plavog / zelenog LED svjetla, za *SYBR green* zelenog svjetla) te se fotografira i analizira primjenom odgovarajućih softvera. Intaktna DNK se detektuje kao traka (engl. *band*) čija se migracija podudara s migracijom DNK koja se koristi kao standard (slika 3.8). Ako se pojavi nejasan fluorescentni signal na gelu, najvjerovatnije se radi o

degradiranoj DNK. Gel-elektroforezom je moguće izvršiti procjenu količine DNK poređenjem intenziteta fluorescencije analizirane DNK sa standardom (DNK poznate veličine). Također, ovom metodom je moguće odrediti veličinu fragmenata molekule DNK (npr. PCR i RFLP fragmenata), korištenjem veličinskog standarda koji sadrži fragmente DNK poznate veličine. Ipak, ovom metodom nije moguće detektovati količine molekula DNK manje od 1 ng, što je čini neprimjenljivom u forenzičko-genetičkim analizama malih količina DNK. Osim toga, kao i kod prethodne metode, detekcija nije specifična za ljudsku DNK.



Slika 3.8. Gel-elektroforeza PCR fragmenata sa veličinskim standardom na 4. poziciji

S obzirom na to da se na mjestu izvršenja krivičnog djela može naći DNK koja nije ljudskog porijekla, ključna je primjena kvantifikacijskih metoda koje detektuju humanu DNK. Prva metoda koja se počela primjenjivati za kvantifikaciju izolovane humane DNK u forenzičkim analizama bila je zasnovana na primjeni primat-specifične alfa-satelitne DNK sekvence koja se nalazi na D17Z1 lokusu na 17. hromosomu.

U ovoj metodi, izolovana DNK se nanosi na najlonsku membranu primjenom *southern blot* tehnologije i hibridizira s D17Z1 oligonukleotidnom probom. Metoda je poznata kao *slot blot hibridizacija* i dosta se koristila u mnogim forenzičkim laboratorijama za detekciju i kvantifikaciju humane DNK. Detekcija se vrši primjenom enzima koji nakon vezivanja za DNK omogućavaju kolorimetrijsku ili hemiluminiscentnu detekciju. Rezultati dobijeni za izolovanu DNK uspoređuju se s kontrolom koju čini serija humanih DNK molekula poznatih koncentracija.

Iako je metoda senzitivnija od gel-elektroforeze i UV detekcije, ipak ima nekoliko nedostataka. Metoda je dugotrajna, njena uspješnost zavisi od stručnosti i pažnje analitičara, a interpretacija rezultata podložna je subjektivizmu.

Metoda koja je značajno skratila vrijeme analize je *AluQuant* analiza, koja ne zahtijeva prethodnu hibridizaciju uzorka na membrani. Zasniva se na analizi *Alu* sekvenci koje se javljaju u velikom broju ponavljanja u genomu ljudi i viših primata. *Alu* sekvence su transpozabilni elementi i predstavljaju kratke segmente molekule DNK koje prepoznaju restrikcijske nukleaze vrste bakterije *Arthrobacter luteus* (*Alu*) po čemu su i dobile ime. U metodi *AluQuant* ciljanom hibridizacijom *Alu*-probe i izolovane DNK pokreće se serija enzimatskih reakcija koje rezultiraju emitovanjem svjetlosti koja se detektuje luminometrom. Izmjerena količina svjetlosti direktno je proporcionalna količini DNK u izolatu.

Iako i *AluQuant* pa i *Slot Blot* metoda omogućavaju precizno određivanje koncentracija DNK u uzorcima, ni jedna ni druga nisu dovoljno informativne kada je u pitanju kvaliteta izolovane DNK. Zbog toga su, s pojavom *Real-time PCR* tehnologije, ove metode veoma brzo izašle iz rutinske upotrebe u forenzičkim laboratorijama.

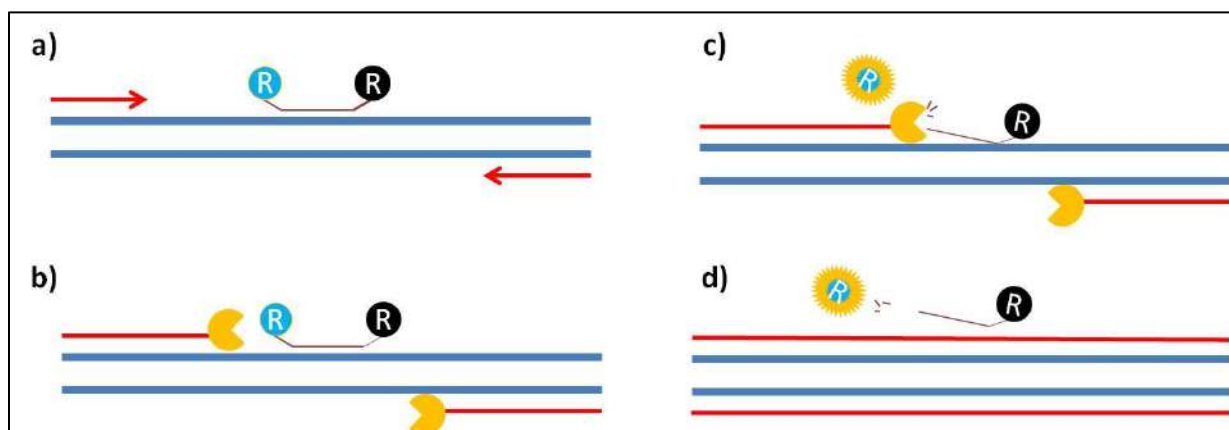
Metoda *RealTime PCR* koristi 5' nukleaznu ili *TaqMan*[®] tehnologiju koja se zasniva na 5' nukleaznoj aktivnosti *Taq* DNK polimeraze. Metoda se koristi za precizno mjerenje koncentracije DNK u uzorku i ima niz prednosti u odnosu na ostale kvantifikacijske metode. Prije svega, ona omogućava precizno mjerenje vrlo malih koncentracija humane DNK u uzorku, kao i degradirane DNK, što je veoma čest slučaj u analizi forenzičkih uzoraka. Ovom metodom je sekundarno (odsustvom pozitivnoga rezultata) moguće detektovati i prisustvo inhibitora PCR reakcije u uzorku. Metoda je automatizirana, jednostavna za primjenu, a na tržištu je dostupan veliki broj komercijalnih setova za analizu. Sama metoda se zasniva na mjerenju stope akumulacije fragmenata DNK u eksponencijalnoj fazi reakcije. Reakciju je moguće pratiti u realnom vremenu, pri čemu se količine amplificirane DNK uspoređuju s pragom detekcije (*Ct* vrijednost) koji predstavlja broj ciklusa PCR reakcije neophodan da fluorescencija pređe baznu liniju (prag fluorescencije).

Real-time PCR eseji koriste se i za analizu mtDNK koja se analizira u slučajevima degradiranih uzoraka u kojima se očekuju male količine genomske DNK. Danas korišteni *TaqMan* eseji simultano određuju koncentraciju humane i muške DNK. Pri tome, moguće je detektovati degradiranu DNK amplifikacijom fragmenata različite dužine, kao i inhibitore PCR reakcije koji se detektuju primjenom sintetičke oligonukleotidne interne PCR kontrole (engl. *Internal PCR Control* – IPC). Najčešće korišteni qPCR sistemi u forenzičkim DNK laboratorijama su kvantifikacijski setovi *Quantifiler Duo* i *Quantifiler Trio* DNK, koji amplificiraju H1 region ribonukleazne RNK čija veličina iznosi 140 bp (RPPH), spolno determinirajući Y region veličine 130 bp (SRY) i sintetičku oligonukleotidnu kontrolu – IPC veličine 130 bp.

Za razliku od seta *Quantifiler Duo*, verzija *Trio* detektuje mali fragment veličine 80 bp (engl. *Small Autosomal Target* – SAT) i veliki fragment veličine 214 bp (engl. *Large Autosomal Target* – LAT) H1 regiona ribonukleazne RNK. U degradiranom uzorku, veliki fragment je podložniji degradaciji, dok se mali uspješno amplificira. Odnos amplificiranih velikih i malih fragmenata određuje nivo degradacije DNK.

Esej *TaqMan* se zasniva na 5' nukleaznoj aktivnosti DNK polimeraze koja se odvija tokom procesa PCR reakcije. 5' nukleazna aktivnost odvija se u svakom ciklusu PCR reakcije i ne zavisi od eksponencijalne akumulacije produkta (slika 3.9). Ovaj esej sadrži probe koje se vezuju za ciljani region DNK. Probe se sastoje od fluorescentne reporter boje koja je vezana za 5' kraj probe i nefluorescirajućeg *quencher*a (prigušivača) koji se nalazi na 3' kraju probe. Uloga *quencher*a je da apsorbuje fluorescenciju koju emituje reporter boja. Čim se, djelovanjem polimeraze, reporter boja odvoji od *quencher*a, javlja se fluorescencija.

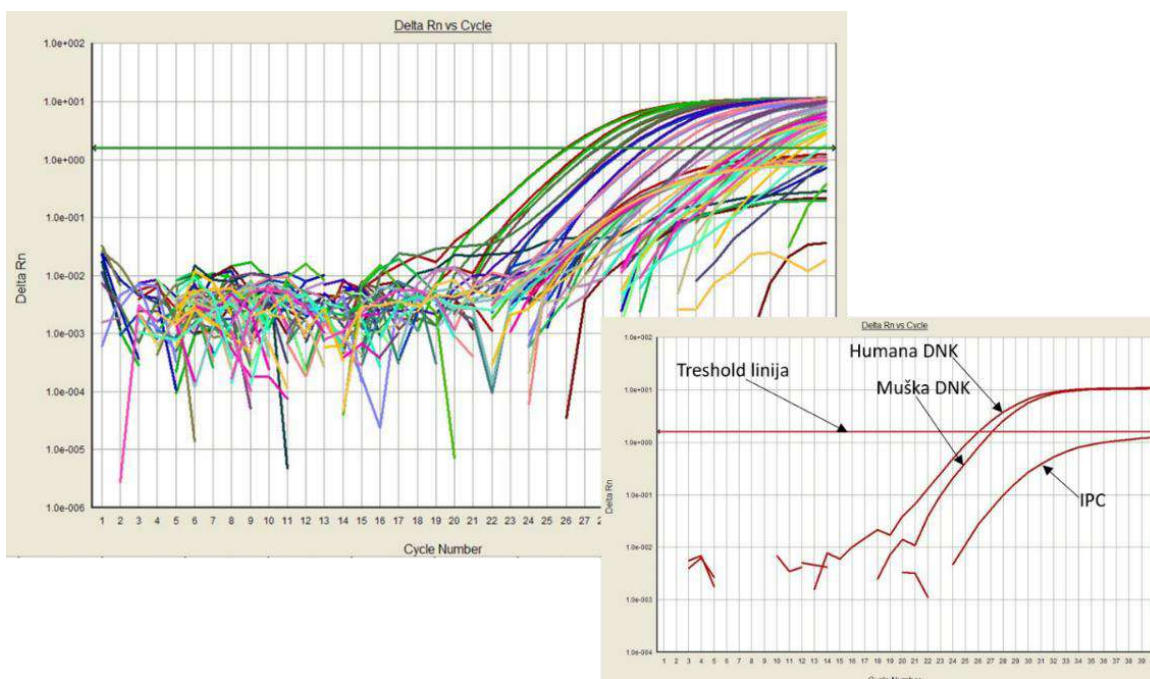
Tokom faze hibridizacije u procesu PCR reakcije, probe *TaqMan* se komplementarno vezuju između *reverse* i *forward* prajmerskih mjesta. *Taq* DNK polimeraza uklanja samo one probe koje su vezane za ciljane fragmente DNK, prilikom čega dolazi do odvajanja *quencher*a od reporter boje. Tako oslobođeni fluorescentni signal se detektuje i softverski konvertuje u disocijacionu krivu. Dakle, do povećanja signala fluorescencije dolazi samo ako je ciljana sekvenca komplementarno vezana za probu pa će fluorescencija biti jača ako je veća količina DNK. Upravo zbog toga je nemoguće detektovati nespecifičnu amplifikaciju.



Slika 3.9. Šematski prikaz TaqMan metode: a – R-boja i Q-agens su vezane za 5' i 3' kraj TaqMan probe, b – dok je proba intaktna, R-boja je prigušena, c – tokom svakog ciklusa PCR kada se amplificira fragment probe oslobađa se R boja, d – jednom oslobođena R-boja emitira karakterističnu fluorescenciju

Tokom PCR reakcije, ciklus po ciklus, softverski se detektuju i obrađuju signali reporter boje. U inicijalnim ciklusima PCR reakcije nema značajnih promjena u fluorescenciji pa se ne detektuje ni fluorescentni signal. S akumulacijom produkta PCR reakcije dolazi i do detekcije fluorescentnog signala, koji će se pojaviti ranije ako je veća početna koncentracije genomske DNK. Ciklus PCR reakcije u kojem fluorescencija dostiže zadati prag (engl. *threshold*) označava se s Ct (engl. *threshold cycle*).

U svaku PCR reakciju postavlja se serija rastvora standarda poznatih koncentracija molekula DNK, koje se uspoređuju s uzorkom čija je koncentracija molekula DNK nepoznata. Za svaku koncentraciju, i poznatu i nepoznatu, grafički se prikaže tačka fluorescencije (Ct vrijednost) te je uspoređivanjem detektovanih Ct vrijednosti moguće tačno odrediti koncentraciju DNK u analiziranom uzorku (slika 3.10). Što je manja Ct vrijednost, količina molekula DNK je veća. Na ovaj način se određuje početna koncentracija DNK izolovane iz uzorka (biološkog traga).



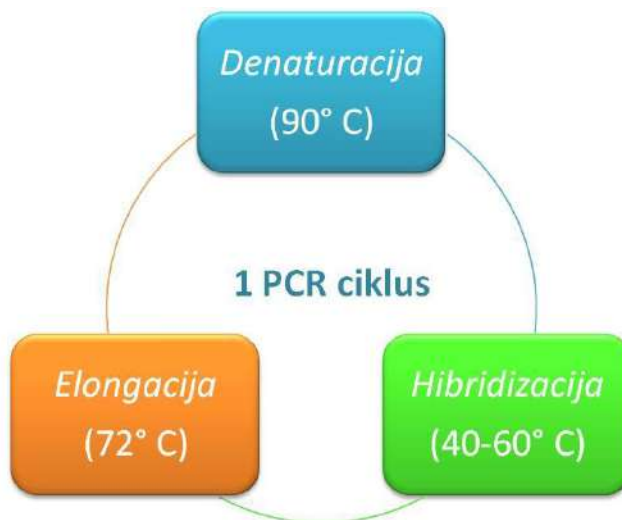
Slika 3.10. RealTime PCR plot sa izdvojenim plotom za jednu reakciju gdje su označene linije koje predstavljaju detektovanu količinu ukupne humane DNK, muške DNK i IPC

3.1.2 Simultano umnožavanje (amplifikacija) STR markera

Polimerazna lančana reakcija se koristi za umnožavanje ciljanih sekvenci molekula DNK. Pri tome, neophodno je znati koji fragment DNK želimo umnožiti, odnosno koja nam je ciljana DNK (engl. *target DNA*). Na ciljanu DNK se vezuju dva oligonukleotidna prajmera, komplementarna 3' kraju ciljane DNK, po jedan prajmer za svaki lanac. Tokom svakog ciklusa PCR reakcije od jednog lanca se dobiju dva, a svaki novonastali je matrica za sintezu novih lanaca. Tako se npr. nakon 32 ciklusa, pri teoretskoj efikasnosti reakcije od 100%, sintetizira 1,07 milijardi produkata PCR reakcije koje nazivamo ampliconi (engl. *amplicon*).

Polimerazna lančana reakcija je revolucionisala forenzičku individualizaciju tragova biološkog porijekla te je zamijenila ili unaprijedila dotadašnje metode individualizacije kao što je na primjer RFLP analiza VNTR markera o kojoj će nešto kasnije biti više govora. Ova metoda je prije svega omogućila analizu veoma malih količina biološkog traga, što najčešće nije bilo moguće s prethodnim metodama za koje je bila potrebna znatno veća početna količina uzorka.

Polimerazna lančana reakcija odvija se u tri osnovne faze: denaturacija, hibridizacija (engl. *annealing*) i produživanje (elongacija) lanca (engl. *extension*). Sve tri faze odvijaju se na različitim temperaturama i ponavljaju u 30–40 ciklusa (slika 3.11). Polimerazna lančana reakcija odvija se u posebnim uređajima za PCR (engl. *thermal cycler*) u kojima se smjenjuju temperaturni režimi kroz određeni broj ciklusa.



Slika 3.11. Faze ciklusa PCR reakcije

U prvoj fazi polimerazne lančane reakcije dolazi do razdvajanja lanaca molekule DNK pod djelovanjem visoke temperature (90°C). Na taj način postaje dostupan ciljani region molekule DNK koji će biti umnožen u narednim fazama PCR reakcije. Nakon faze denaturacije, u fazi hibridizacije, temperatura se spušta na 40–60°C, što je temperaturni raspon za vezivanje prajmera. Treba naglasiti da je ovo i kritični korak analize PCR-a, jer je za svaku reakciju neophodno precizno odrediti tačnu temperaturu, u okviru navedenog raspona, koja je optimalna za korišteni prajmerski par. Optimalna temperatura zavisi od dužine prajmera, količine citozina i guanina, ali i od tačke topljenja (T_m) prajmera. Tačka topljenja prajmera je temperatura na kojoj se polovina dupleksa DNK razdvoji na pojedinačne lance. Kraći prajmeri, koji sadrže 40–60% C/G, a čija je T_m između 52–58°C, generalno daju najbolje rezultate. U fazi hibridizacije dva oligonukleotidna prajmera vezuju se za 3' kraj lanca komplementarne ciljane molekule DNK. Ovako vezani oligonukleotidi djeluju kao prajmeri za sintezu novog lanca DNK.

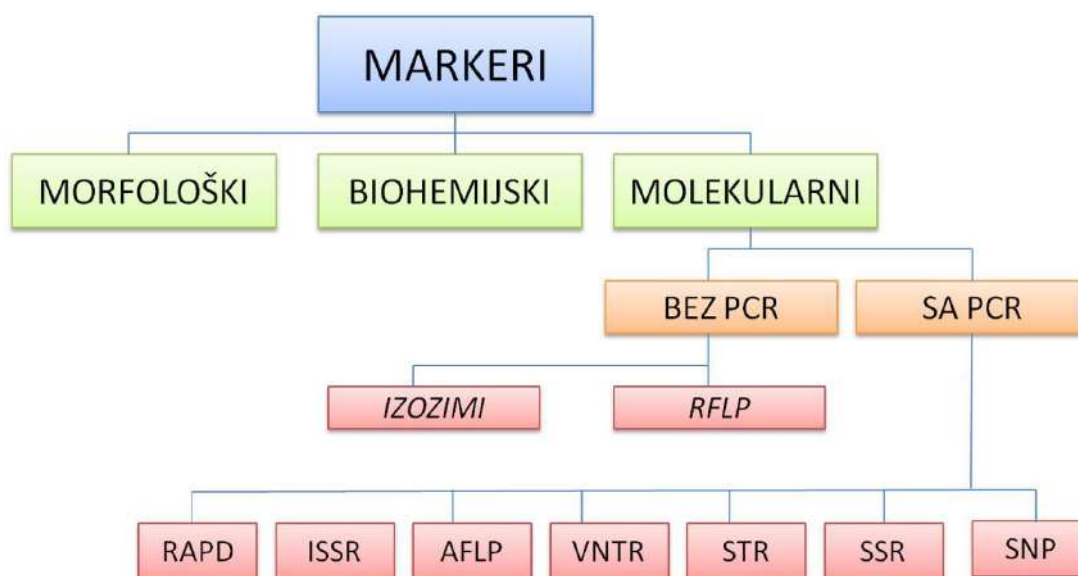
Sinteza novonastalog lanca odvija se u fazi elongacije, djelovanjem termostabilne polimeraze, i to najčešće *Taq* DNK polimeraze, enzima izolovanog iz bakterije *Thermus aquaticus*, koja prirodno živi u vrelinim izvorima. Temperaturni optimum *Taq* polimeraze je 72°C. Sinteza ciljanog regiona molekule DNK odvija se u dva pravca te na kraju svakog ciklusa od jedne nastaju po dvije nove identične kopije, koje se tokom reakcije eksponencijalno umnožavaju. Konačan rezultat PCR reakcije je značajno umnožen ciljani region molekule DNK koji se naziva *PCR produkt* i koji se koristi u svim daljnim molekularnogenetičkim analizama.

U forenzičkoj genetici, PCR se koristi za umnožavanje molekularnih markera koji se primjenjuju u individualizaciji bioloških tragova. Danas su dostupni amplifikacijski setovi za PCR različitih proizvođača koji olakšavaju i pojednostavljaju simultanu analizu više genetičkih markera, što značajno olakšava analizu. Jednostavnost korištenja multipleksnih PCR sistema ogleda se u tome što su protokoli za pripremu PCR reakcije i programi temperaturnog režima, kao i broja ciklusa, tačno utvrđeni i jasno specificirani u uputstvima koja se nalaze u svakom pojedinom amplifikacijskom setu.

3.2 MOLEKULARNI MARKERI U FORENZIČKOJ ANALIZI

Markeri su nasljedne karakteristike čije se specifičnosti mogu posmatrati na morfološkom, biohemijskom ili genetičkom (DNK) nivou (slika 3.12). Morfološki markeri su vizualno uočljive osobine jednog organizma. Brojno su ograničeni, pod uticajem su nasljednih i nenasljednih faktora pa su zato manje pouzdani od genetičkih markera.

Biohemijski markeri su biohemijske komponente (enzimi, hormoni, antitijela, antigeni itd.) koji se najčešće koriste u dijagnostičkim postupcima, kao i za određivanje predispozicije za neku bolest. Vrlo važni biohemijski markeri koji se koriste u biologiji su izozimi (izoenzimi), koji predstavljaju različite izoforme jednog enzima, i alozimi (aloenzimi), enzimi koji se razlikuju strukturno, ali ne i po funkciji. Različite forme alozima kodiraju različiti aleli na istom lokusu, dok različite forme izozima kodiraju različiti aleli na različitim lokusima. Najčešće se primjenjuju za proučavanje evolutivne povezanosti blisko srodnih bioloških kategorija.



Slika 3.12. Podjela bioloških markera

Genetički markeri su geni ili sekvence molekule DNK poznate hromosomske lokacije koji kodiraju protein ili osobinu. Univerzalna su osobina svih živih bića, a izuzetno su precizni jer se zasnivaju na razlikama (*varijacijama*) u homolognim sekvencama DNK između posmatranih jedinki. Ove razlike rezultiraju pojavom više varijanti neke osobine, što se naziva *polimorfizam* (grč. *poli* – mnogo, *morf* – oblik). Detekcijom jednog ili više polimorfizama kod analiziranih jedinki moguće je međusobno razlikovati jedinke (individualizirati ih) i/ili ih grupisati u odgovarajuće skupine (klasificirati ih). Uočene varijacije među jedinkama mogu biti rezultat: a) zamjene baza u lancu DNK (translokacije i inverzije), b) delecija i insercija te c) promjena broja ponavljanja slijeda baza u molekuli DNK. Na ovim posljednjim se najčešće zasnivaju molekularnogenetički postupci analize bioloških tragova u forenzičkoj genetici. Bez obzira na mehanizam nastanka, genetički markeri se mogu podijeliti u dvije grupe:

1. na osnovu razlika u dužini sekvence DNK (RFLP, AFLP, STR, VNTR) i
2. na osnovu razlika u samo jednoj bazi sekvence DNK (SNP).

Također, zavisno od lokacije u genomu, markeri mogu biti nukleusni (jedarna, jezgrena, nukleusna DNK), mitohondrijski (mitohondrijska DNK) i plastidni (plastidna DNK). Nukleusni (jedarni) markeri se dalje razdvajaju na autosomske i spolno-vezane markere (X-vezani i Y-vezani) markeri.

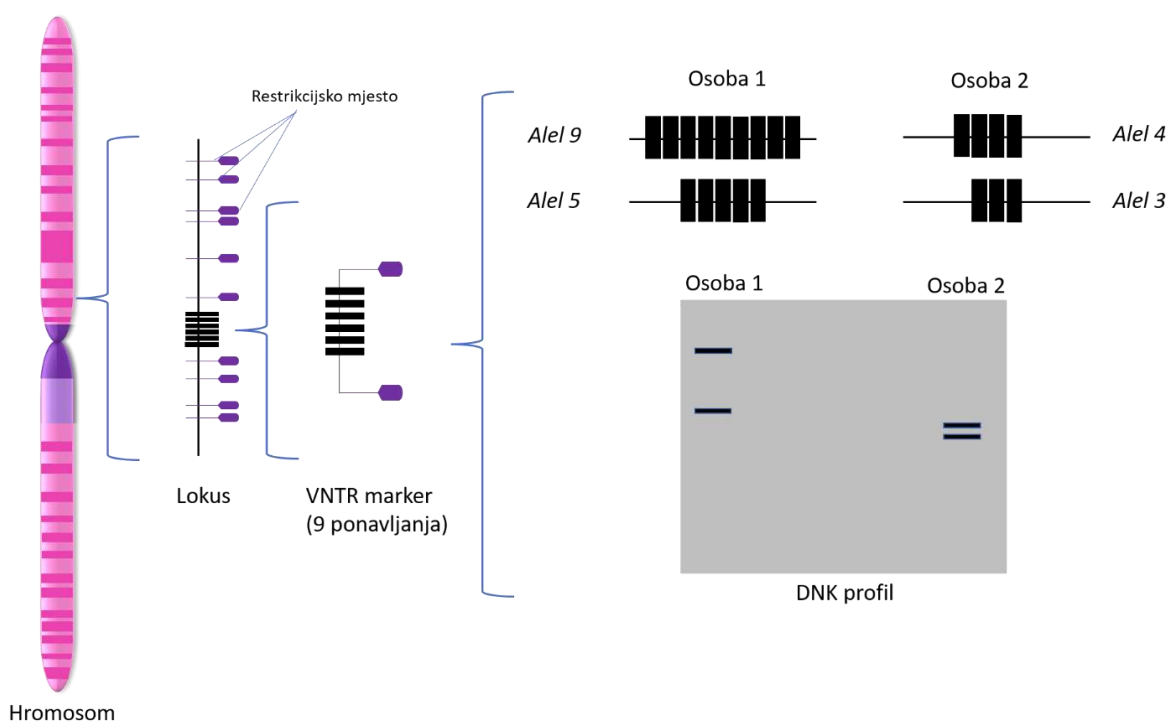
Sekvence nukleotida u genomu određuju genetičku različitost između dvije osobe. Ipak, molekula DNK kod svih ljudi je veoma slična. Razlike u genomu između dvije osobe ogledaju se u najmanje jednom na 1000 nukleotida.

Međutim, s obzirom na to da ukupan broj nukleotida u haploidnom genomu iznosi preko 3 milijarde, dvije će se osobe (ako nisu monozigotni blizanci) razlikovati u nekoliko miliona nukleotida. Većina tih razlika je izvan kodirajućih regiona (gena) pa je razlika u funkcionalnim regionima između dvije nesrodne osobe još manja. Međutim, te razlike su dovoljno velike da rezultiraju značajnim genetičkim diverzitetom u ljudskoj populaciji, koji se očituje velikim brojem različitih fenotipskih osobina kao što su oblik tijela, lica, boja kose, očiju itd.

Analizu genetičkih markera u forenzičku praksu prvi je 1985. godine uveo sir Alec Jeffreys (1950 –). On je, radeći s markerima varijabilnog broja tandemskih ponavljanja (VNTR markerima), uočio da je dužina ponavljajućih sekvenci molekule DNK različita kod svakog pojedinca. Na osnovu toga je shvatio da je moguće ove varijacije koristiti za utvrđivanje identiteta osobe, a metodu je nazvao *DNA fingerprinting* (aluzija na pojam *fingerprint*, što u engleskom jeziku znači otisak prsta). U našem jeziku se za *DNA fingerprinting* najčešće koristi pojam DNK profiliranje. Otkrićem i unapređenjem PCR tehnologije, DNK profiliranje postaje rutinska metoda individualizacije bioloških tragova i humane identifikacije u forenzičkim laboratorijama širom svijeta.

3.2.1 Minisatelitni markeri

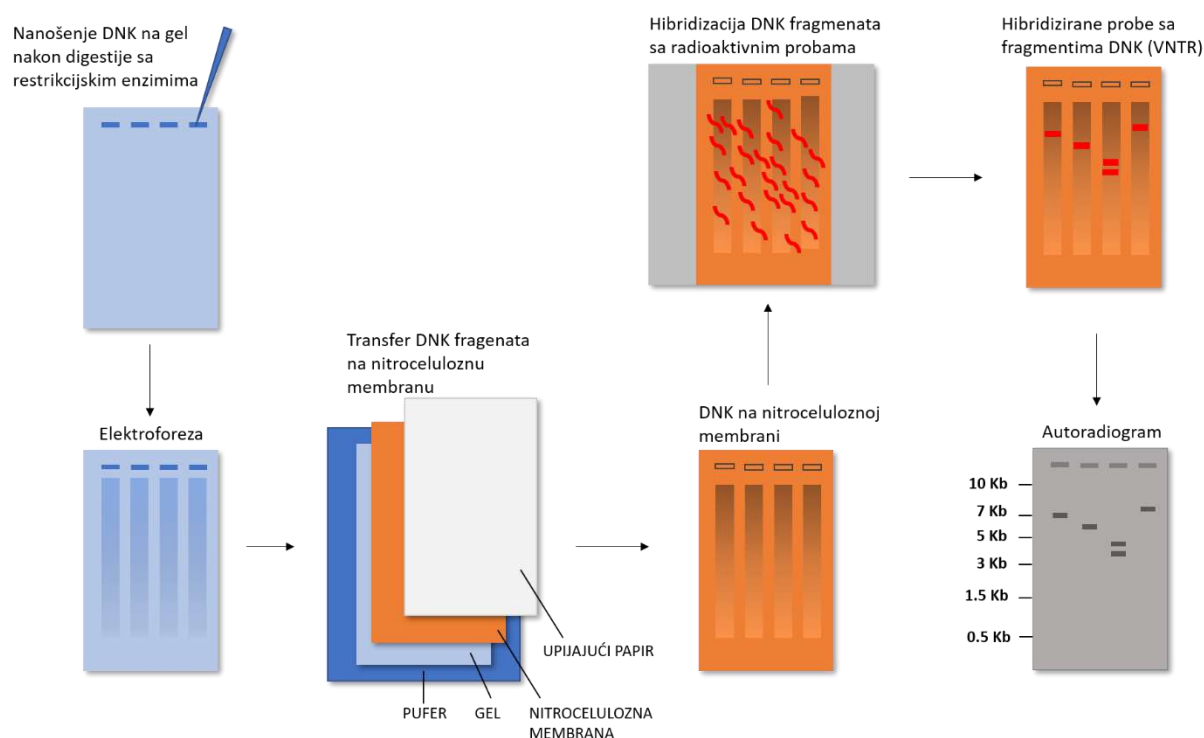
Minisatelitni markeri se u humanom genomu javljaju na preko 1000 lokacija. Sadrže repetitivne sekvence veličine 20–100 bp koje se ponavljaju 5–50 puta (slika 3.13). Karakterizira ih visoka stopa mutacije i velika varijabilnost unutar populacije. Naziv *sateliti* su dobili jer je ranije uočeno da se centrifugiranjem genomske DNK, uslijed razlike u gustoćama, izdvaja zaseban sloj koji je nazvan satelitna DNK. Do toga dolazi zato što satelitna DNK ima znatno manju gustoću u odnosu na preostalu DNK. Pored minisatelitne, postoji i mikrosatelitna DNK, koja sadrži znatno manje fragmente (2–10 bp).



Slika 3.13. VNTR markeri: građa i hromosomska pozicija (lijevo) i princip analize (desno)

Kao što je već rečeno, *varijabilni broj tandemskih ponavljanja (VNTR)* predstavlja minisatelitne markere koji su prvi rutinski korišteni u forenzičkoj analizi za individualizaciju bioloških tragova. To su nekodirajući regioni molekule DNK čiji broj ponavljanja varira od osobe do osobe. Ovi markeri zauzimaju određenu poziciju na genomu koja se zove *lokus* i imaju određeni broj ponavljanja nekog slijeda baza, što predstavlja *alele*. S obzirom na to da različiti aleli imaju različite dužine (što je broj ponavljanja veći, veća je i dužina), VNTR markeri se mogu razlikovati prema dužini. Ako se različiti fragmenti VNTR markera postave na gel u polju električne struje, putovaće različitim brzinama, što će rezultirati pojavom više fragmenata (bendova) na gelu (slika 3.13 desno). Komparativnom analizom pozicija bendova VNTR markera moguće je utvrditi individualne razlike među različitim osobama, zbog čega su VNTR markeri i našli svoju praktičnu primjenu u forenzičkim analizama. Lokusi na VNTR markerima korišteni u forenzičke svrhe najčešće imaju različite hromosomske lokacije i nezavisno se nasljeđuju. Njihova visoka varijabilnost rezultat je visoke stope mutacije koja iznosi i do 1% po generaciji. U ponavljajućim sekvencama hromosoma često dolazi do grešaka prilikom replikacije i rekombinacije homolognih hromosoma (*crossing-overa*) što rezultira povećanjem i smanjenjem broja repetitivnih sekvenci.

Dodatno, veliki broj alela omogućava ogroman broj genotipskih kombinacija. Na primjer, ako jedan lokus ima 20 alelnih varijanti (20 varijanti ponavljajuće sekvence), onda homozigotnih genotipova ima 20, a heterozigotnih $(20 \times 19) / 2 = 190$, što je ukupno 210 (20 homozigotnih + 190 heterozigotnih). Tako na pet lokusa s istim brojem alelnih varijanti postoji 190^5 , tj. 19 miliona varijanti genotipova. Još jedna prednost primjene VNTR markera u forenzičke svrhe je činjenica da se aleli javljaju u relativno niskim frekvencijama, što je rezultat visoke mutacijske stope i činjenice da većina mutacija promijeni slijed za samo jednu ili nekoliko baza. Analiza VNTR markera radi se primjenom metode RFLP u kombinaciji s hibridizacijskim tehnikama kao što je prikazano na slici 3.14.



Slika 3.14. Šematski prikaz principa Southern blot metode

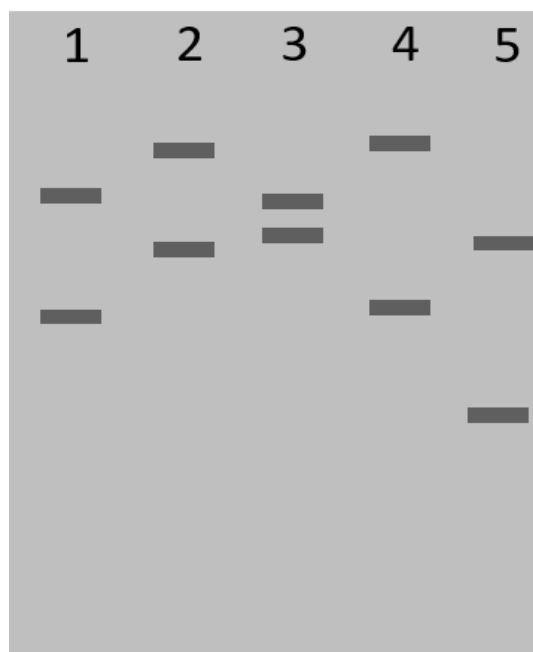
Postupak se provodi tako da se u prvoj fazi DNK izoluje iz biološkog traga, nakon čega restrikcijski enzimi, koji prepoznaju specifične kratke sekvence DNK, sijeku molekulu na manje fragmente, i to na tačno određenoj poziciji molekule. Na primjer, enzim Hae III, koji se veoma često koristi u forenzičkoj genetici, prepoznaje GGCC sekvencu (tj. CCGG niz na

komplementarnom lancu) i siječe oba niza lanca DNK između G i C. Konačni rezultat su mali fragmenti čija je dužina određena udaljenostima između uzastopnih GGCC sekvenci. Ova sekvenca s četiri baze se javlja na milione puta u genomu, pa je ukupna DNK isječena na milione fragmenata. Naravno, upotreba ovog enzima generalno podrazumijeva da ne postoje sekvence GGCC unutar bilo kojeg VNTR markera koji će se analizirati; kada su takve sekvence prisutne, dolazi do fragmentiranja VNTR markera, što znatno usložnjava analizu. Nakon djelovanja restrikcijskih enzima, dobijeni produkti se postavljaju na gel gdje u procesu elektroforeze dolazi do razdvajanja fragmenata po veličini (manji brže migriraju kroz gel, veći su slabije pokretni i ostaju bliže mjestu nanošenja).

U narednim fazama, segmenti se hemijski tretiraju kako bi došlo do razdvajanja lanaca DNK, nakon čega se dobiju jednolančane forme koje se direktno prenose na najlonsku membranu za koju prijanjaju. Ova metoda se naziva *Southern blotting* (slika 3.14). Na najlonskoj membrani se fragmenti DNK nalaze na istoj poziciji kao što su bili na gelu. U narednom koraku radioaktivno obilježena proba, jednolančani fragment DNK komplementaran odabranom VNTR markeru, hibridizira s fragmentom DNK koji sadrži specifični VNTR marker. Ako fragment DNK ne sadrži VNTR marker, neće doći do specifičnog vezivanja probe. Nakon završene hibridizacije, najlonska membrana se postavlja na rendgenski film. Emisija probe se prikazuje na rendgenskom filmu u vidu tačaka na mjestima duž membrane na kojima se proba vezala za VNTR marker. Ovakav film se naziva *autoradiograf* ili *autorad* (slika 3.15). Fragmenti na autoradiografu se razlikuju u veličini (i samim tim poziciji na autoradu) kod različitih osoba, što se najčešće izražava kao *broj baznih parova*. Ako su vidljiva dva benda, osoba je *heterozigot* za dati lokus, dok jedan bend najčešće označava *homozigotnu* varijantu. Odsustvo drugog benda može biti rezultat grešaka u analizi, ili male početne količine uzorka, ili degradirane DNK. Osim toga, dva benda mogu biti toliko blizu jedan drugome da se vide kao jedan bend.

Za forenzičku analizu koristilo se više VNTR markera (najčešće četiri, pet pa i više) pa se opisana procedura ponavlja onoliko puta koliko se markera analizira. Nakon što se završi procedura za jedan VNTR marker, ispira se radioaktivna proba te se dodaje nova koja se vezuje za drugi specifični VNTR marker koji ima drugu hromosomsku lokaciju. S obzirom na to da je potrebno nekoliko dana za emisiju radioaktivnosti u cilju dobijanja vidljivih bendova na filmu, za analizu četiri do pet markera bilo je potrebno i do nekoliko sedmica.

Osim toga, radioaktivnost kojoj su se izlagali istraživači prilikom provođenja analize predstavljala je značajan zdravstveni problem pa je razvojem PCR tehnologije ova metoda veoma brzo zamijenjena drugim, sofisticiranijim, bržim, sigurnijim i jeftinijim metodama.



Slika 3.15. Šematski prikaz autorada

3.2.2 Mikrosatelitni markeri

Mikrosatelitni markeri sadrže dva do sedam, a najčešće četiri nukleotida u ponavljajućoj sekvenci, zbog čega se nazivaju i *kratke ponavljajuće sekvence* (engl. *Short Tandem Repeats* – STR). S obzirom na to da su mnogo kraći od minisatelitnih markera, primjenom ovih markera lakše se detektuju male količine DNK kao i fragmentirana DNK. Zbog toga su STR markeri u forenzičkoj praksi našli široku primjenu i iz upotrebe brzo potisnuli VNTR markere.

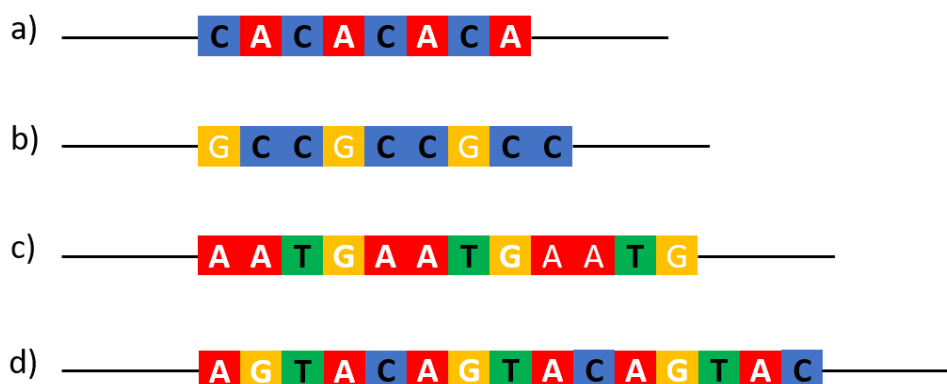
STR markeri su prvi put ušli u upotrebu ranih devedesetih godina prošlog vijeka, nakon čega počinje njihova masovna primjena u identifikaciji osoba primjenom analize DNK. Učinkovitost ovih markera ogleda se u njihovoj visokoj polimorfnosti, zbog čega su idealni kandidati za forenzičku DNK analizu bioloških tragova. Njihova varijabilnost (polimorfnost) nastaje kao rezultat različitog broja ponavljanja ponavljajućeg motiva, koji je nasljedan i specifičan za svaku individuu. STR fragmenti se nasljeđuju kodominantno, od svakog roditelja po jedan alel.

Pri tome, par naslijeđenih alela na jednom lokusu mogu sačinjavati isti (homozigot) ili različiti (heterozigot) aleli, tj. aleli s istim ili različitim brojem ponavljanja posmatrane sekvence. Vjerovatnoća da dvije osobe u populaciji imaju iste alelne varijante na jednom STR lokusu iznosi i do 25%, ali se taj procenat značajno smanjuje s povećanjem broja STR lokusa uključenih u analizu. Tako je ekstremno mala vjerovatnoća da dvije nasumično odabrane osobe iz populacije dijele isti broj ponavljanja na svim analiziranim STR lokusima (na 16 analiziranih STR lokusa vjerovatnoća iznosi manje od 10^{-19}).

Varijante kratkih ponavljajućih sekvenci mogu se naći na bilo kojem autosomu, kao i na spolnim hromosomima (X-STR i Y-STR markeri). Autosomski STR markeri od izuzetnog su značaja za individualnu identifikaciju, kao i za pouzdano utvrđivanje bliskih srodničkih odnosa (roditelj – dijete), dok se spolno-vezani STR markeri najčešće koriste u postupcima utvrđivanja daljeg biološkog srodstva. Za razliku od jedinstvenih sekvenci u genomu koje imaju nisku stopu mutacije (10^{-9} po generaciji), STR lokusi imaju nešto višu stopu mutacija (10^{-6} do 10^{-2} po generaciji). Većina kratkih ponavljajućih sekvenci nalazi se u nekodirajućim regionima humane molekule DNK, dok ih se samo 8% nalazi u kodirajućem regionu. Ove sekvence su različito distribuirane unutar genoma, a najzastupljenije su na hromosomu 19 u odnosu na ostale hromosome.

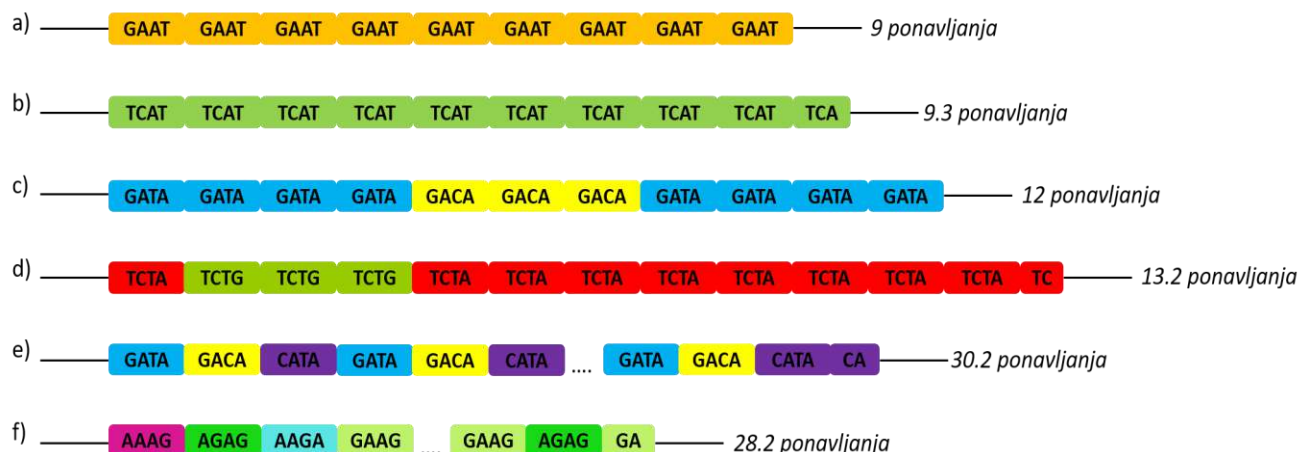
STR markeri koji se nalaze u kodirajućem regionu genoma dobijaju naziv prema genu unutar kojeg se nalaze. Tako se npr. sekvenca STR markera koja se nalazi unutar prvog introna gena za tirozin hidroksilazu (TH) zove TH01. S druge strane, sekvence STR markera koje se nalaze u nekodirajućem regionu u svom imenu imaju broj hromosoma na kojem se nalaze i jedinstveni broj sekvence. U nazivu STR markera D21S11, D je za DNK, 21 je broj hromosoma na kojem se marker nalazi (dakle na 21. hromosomu), S je oznaka za STR, a 11 je jedinstveni broj sekvence.

Prema broju baza u ponavljajućoj sekvenci razlikujemo mononukleotidne, dinukleotidne, trinukleotidne, tetranukleotidne, pentanukleotidne i heksanukleotidne STR markere (slika 3.16). Što je broj nukleotida veći u ponavljajućem motivu, to je broj tog tipa STR markera manji u humanom genomu (tako je najmanji broj heksanukleotidnih markera).



Slika 3.16. Šematski prikaz različitih tipova STR markera prema broju ponavljanja:
a – dinukleotidni STR marker, b – trinukleotidni STR marker, c – tetranukleotidni STR marker, d – pentanukleotidni STR marker

U forenzičkoj analizi najviše su zastupljeni tetranukleotidni STR markeri kojih je do danas u humanom genomu otkriveno preko 20.000. S druge strane, prema strukturi ponavljajuće sekvence, STR markeri se dijele na jednostavne i složene (slika 3.17).



Slika 3.17. Šematski prikaz STR markera koji se razlikuju po strukturi: *a – strukturno jednostavni, b – strukturno jednostavni uz prisustvo nekonzistentnih alelnih varijanti, c – strukturno složeni s dva ili više tipova ponavljanja, d – strukturno složeni uz prisustvo nekonzistentnih alelnih varijanti, e – kompleksni, f – hipervariabilni*

Jednostavni STR markeri imaju jedan slijed baza koji se ponavlja, dok se kod složenih razlikuje nekoliko tipova ponavljajućeg slijeda baza. Tako razlikujemo šest tipova STR markera:

1. strukturno jednostavni,
2. strukturno jednostavni uz prisustvo nekonzistentnih alelnih varijanti,
3. strukturno složeni s dva ili više tipova ponavljanja,
4. strukturno složeni uz prisustvo nekonzistentnih alelnih varijanti,
5. kompleksni i
6. hipervarijabilni.

3.3 FORENZIČKO DNK PROFILIRANJE

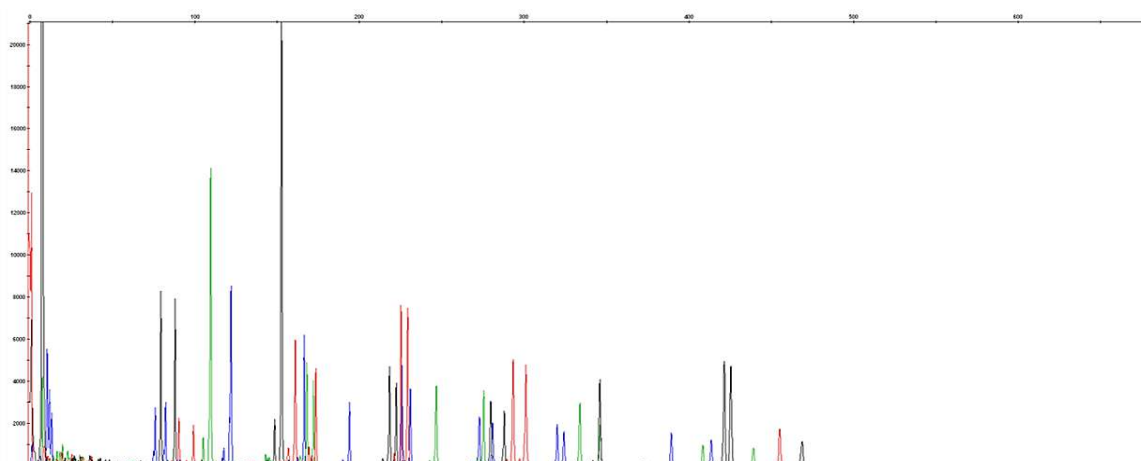
Forenzička analiza odabranih STR markera u laboratorijskom se žargonu naziva i *DNK profiliranje*, čiji je krajnji rezultat generiranje *DNK profila*. DNK profil je elektroferogramski prikaz alelnih varijanti neke osobe, detektovanih na odabranim STR lokusima. Pri tome, alelna varijanta predstavlja broj ponavljanja repetitivne sekvence.

Kao što je već rečeno, svaka osoba ima po dvije alelne varijante na svakom lokusu, svaku naslijeđenu od po jednog roditelja. Te dvije alelne varijante mogu biti prikazane kao jedan pik, ako je od svakog roditelja naslijeđena ista alelna varijanta (homozigot), ili kao dva pika, ako je svaki roditelj prenio različitu alelnu varijantu (heterozigot). Različite su smjernice za odabir broja STR markera koji će se analizirati, uz preporuku da ih se što veći broj uključi u analizu. Također, treba voditi računa da se odabrani STR markeri koriste u forenzičkim laboratorijama širom svijeta te da je poznata njihova zastupljenost (frekvencija) u svjetskoj i lokalnoj populaciji. Standardna analiza uključuje minimalno 15 autosomskih lokusa, veličine 90–500 bp, koji su sadržani u komercijalno dostupnim multipleksnim setovima. Danas se taj broj popeo na 24 STR markera, među kojima je i spolno determinirajući (amelogenin) i jedan Y-vezani STR lokus. Na tržištu su dostupni STR multipleks setovi mnogobrojnih proizvođača, s tri vodeća: Promega, Thermo Fisher Scientific i Qiagen. Zajedničko za sve proizvođače je da njihovi STR setovi sadrže markere preporučene od Saveznog istražnog ureda (engl. *Federal Bureau of Investigation* – FBI) Ministarstva pravosuđa Sjedinjenih Američkih Država. Svi preporučeni STR markeri sadržani su

u nacionalnoj bazi podataka, kreiranoj 1993. godine i nazvanoj CODIS (skraćenica od engleskog *Combined DNA Index System*). U početku, CODIS je sadržavao samo sedam STR lokusa, da bi 2017. bio dopunjen s još šest lokusa, plus amelogeninski lokus. Evropska mreža instituta za forenzičku nauku (engl. *European Network of Forensic Science Institutes – ENFSI*) 2009. godine je predložila analizu 12 STR markera koji ulaze u sastav Evropskog standardnog seta – ESS, a koji se djelomično poklapa sa STR markerima sadržanim u CODIS-u (tabela 3.2). Zbog djelomičnog preklapanja, ova dva seta formiraju zajedno standard od ukupno 18 STR markera koji se nalaze u većini komercijalno dostupnih STR setova, uz dodatak amelogenskog lokusa i nekih strukturno složenih STR markera (npr. hipervarijabilni SE33 lokus) ili pentanukleotidnih lokusa (PENTA E i PENTA D), sadržanih u setovima američke kompanije *Promega*. Setovi za amplifikaciju odabranih STR markera sadrže fluorescentno obojene prajmere za STR markere, koji se nakon amplifikacije (PCR) i separacije na gelu (kapilarne gel-elektroforeze) softverski obrađuju i u konačnici prikazuju kao *DNK elektroferogram* (slika 3.18). Na svakom elektroferogramu uočava se veliki broj različito obojenih pikova, od kojih svaki predstavlja jednu alelnu varijantu.

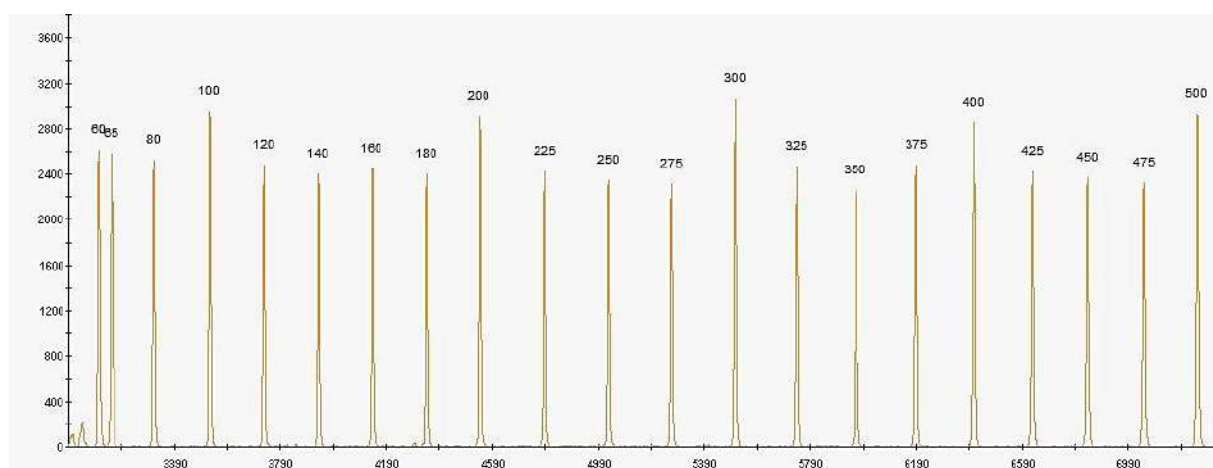
Tabela 3.2. Komparativni prikaz STR markera sadržanih u različitim preporučenim setovima

Combined DNA Indexing System (CODIS)	INTERPOL standardni set lokusa (ISSOL)		Evropski standardni set lokusa (ESS)
	Standardni set	Dodatni lokusi	
TPOX	vWA	TPOX	TH01
D3S1358	TH01	CSF1PO	vWA
D5S818	D21S11	D13S317	FGA
FGA	FGA	D7S820	D21S11
CSF1PO	D8S1179	D5S818	D3S1358
D7S820	D3S1358	D16S539	D8S1179
D8S1179	D18S51	D2S1338	D18S51
TH01	D1S1656	D19S433	D10S1248
vWA	D2S441	Penta D	D2S441
D13S317	D10S1248	Penta E	D1S1656
D16S539	D12S391	FES	D12S391
D18S51	D22S1045	FI3AI	D22S1045
D21S11	AMELOGENIN	FI3B	
AMELOGENIN X		SE33	
AMELOGENIN Y		CD4	
		GABA	

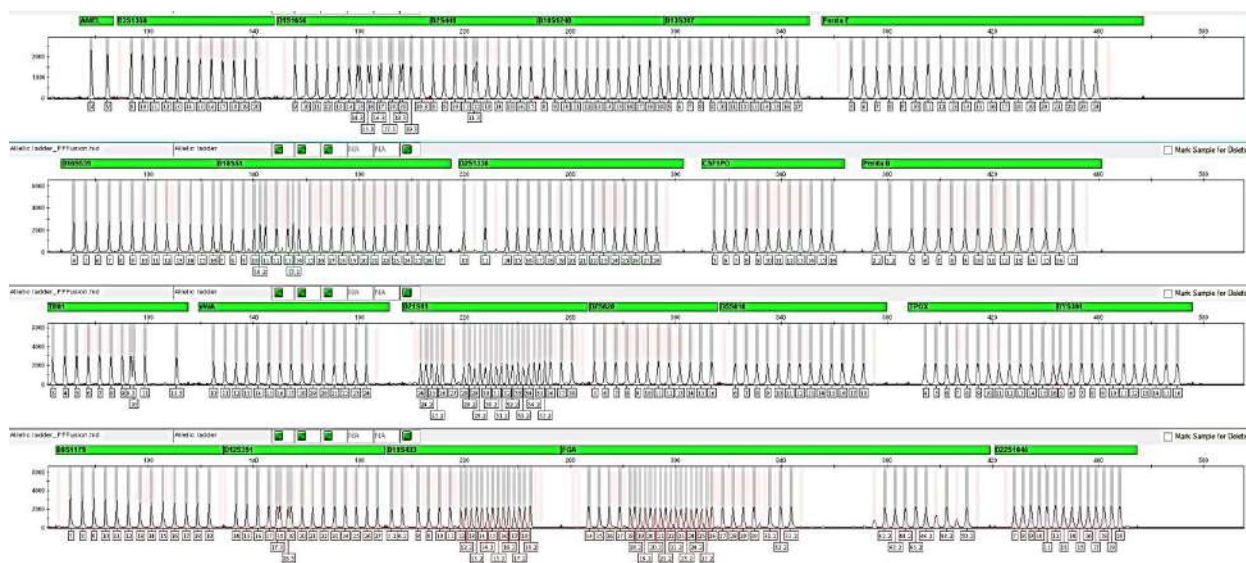


Slika 3.18. Prikaz elektroferograma s raznobojnim pikovima koji predstavljaju alelne varijante analiziranih STR markera

Softver razvrstava pikove prema boji i veličini u odgovarajuće lokuse, koji na elektroferogramu predstavljaju STR markere. Na svakom lokusu detektuju se jedan (homozigot) ili dva pika (heterozigot), kojima se softverski, na osnovu komparacije s referentnim markerom, dodjeljuje broj i on predstavlja alelnu varijantu. Pri tome, softver koristi dva referentna markera: jedan veličinski, odnosno interni veličinski standard (engl. *Internal Size Standard* – ILS) koji se dodaje u svaki uzorak i služi za razvrstavanje pikova po veličini (slika 3.19) i jedan za dodjeljivanje alelne varijante (koja predstavlja broj ponavljanja ponavljajuće sekvence) – alelna ljestvica (engl. *allelic ladder*) (slika 3.20).

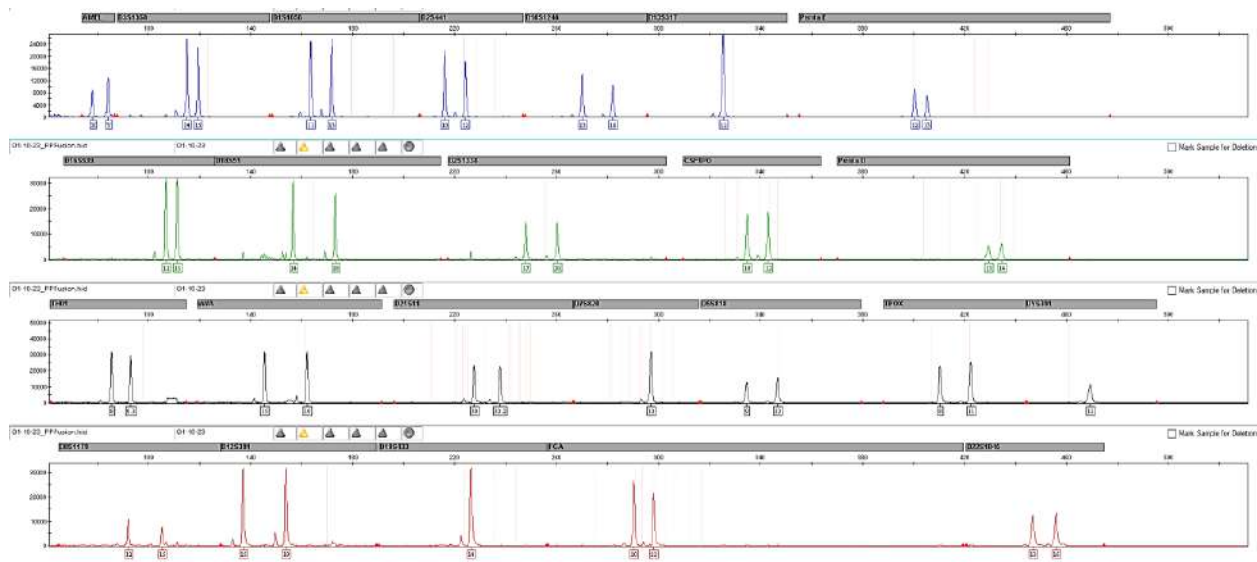


Slika 3.19. Interni veličinski standard (WEN ILS 500 Promega Corporation)



Slika 3.20. Alelna ljestvica (PowerPlex® Fusion System – Promega Corporation)

Ovako softverski obrađen rezultat elektroforeze naziva se *DNK profil* (slika 3.21) i predstavlja krajnji rezultat forenzičke DNK analize bioloških tragova.



Slika 3.21. DNK profil

3.3.1 Generiranje DNK profila

Kako smo i opisali detaljno u prethodnim poglavljima, nakon izolacije DNK iz bioloških tragova slijedi PCR analiza, nakon koje je, zavisno od početne količine i kvalitete izolovane DNK, umnoženo na milione kopija fluorescentno obojenih STR markera. Tokom PCR reakcije jedan prajmerski par STR markera (*reverse* ili *forward*), koji za svoj 5' kraj ima vezanu fluorescentnu boju (HEX, 6-FAM itd.), vezuje se za denaturirani lanac DNK. Važno je naglasiti da se prajmeri za sve odabrane STR lokuse koji će se analizirati nalaze u jednoj reakciji (multipleks) i simultano se amplificiraju. Zbog toga je, za generiranje DNK profila za jedan uzorak, dovoljna jedna PCR analiza bez obzira na broj odabranih STR markera koji će se analizirati.

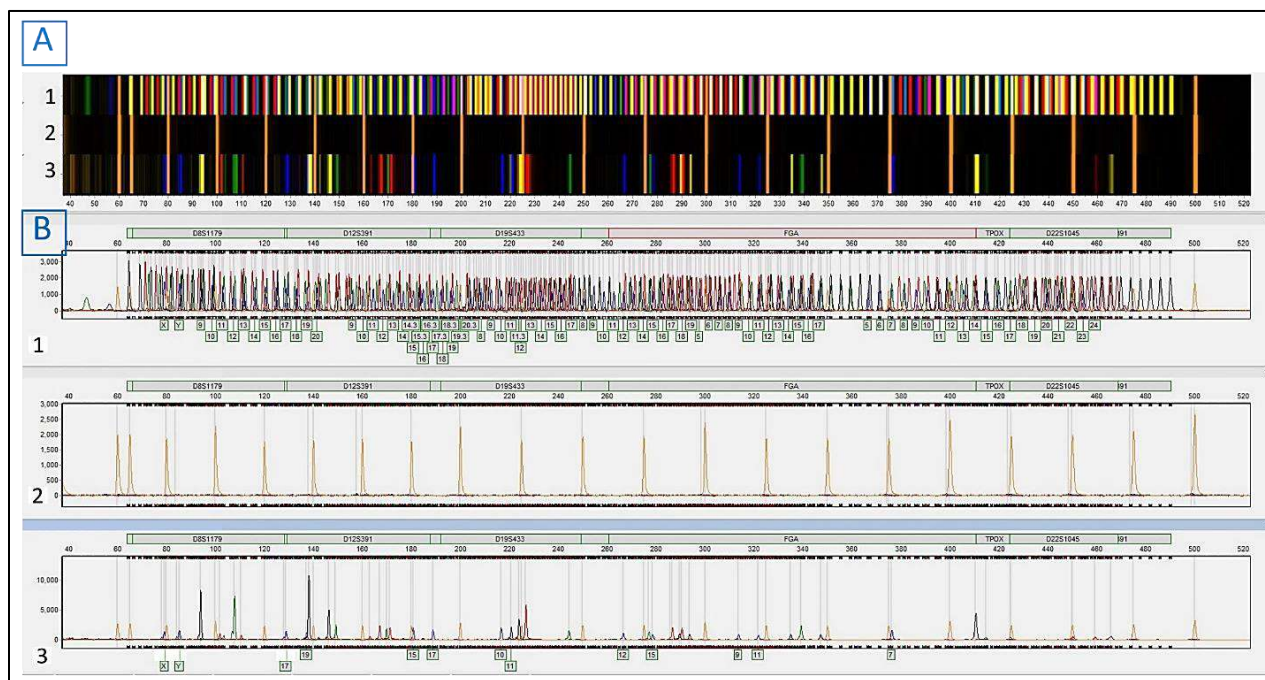
Prema primarnoj definiciji, simultana amplifikacija više od 10 STR genetičkih markera u jednoj reakciji naziva se multipleks PCR. Iako je u početku primjena multipleks STR metode u forenzičkoj genetici bila dosta ograničena, pa čak i osporavana, u proteklim godinama postalo je jasno da multilokusna PCR amplifikacija ima nekoliko prednosti koje se ogledaju u:

- mogućnosti analize veoma malih tragova (teorijski, jedna ćelija je dovoljna za generiranje profila DNK);
- mogućnosti analize iznimno fragmentirane DNK, pa čak i fragmenti od samo nekoliko stotina baznih parova mogu poslužiti kao matrica za amplifikaciju,
- simultanoj amplifikaciji većeg broja molekularnih markera s ciljem neupitne biološke individualizacije izvora traga,
- izbjegavanju amplifikacije DNK koja nije humanog porijekla i
- postojanju velikoga broja komercijalnih PCR amplifikacijskih multipleksnih setova.

Amplificirani, fluorescentno obilježeni, PCR produkti za analizirane STR lokuse razdvajaju se po veličini na gelu tokom elektroforeze koja se odvija u poluautomatiziranim sistemima, odnosno *genetičkim analizatorima*.

Na prvim genetičkim analizatorima, koji su masovno korišteni u forenzičke svrhe, separacija je vršena na poliakrilamidnim gelovima. Pored uzorka, u analizu su uvijek uključena i dva standarda; veličinski standard i alelna ljestvica.

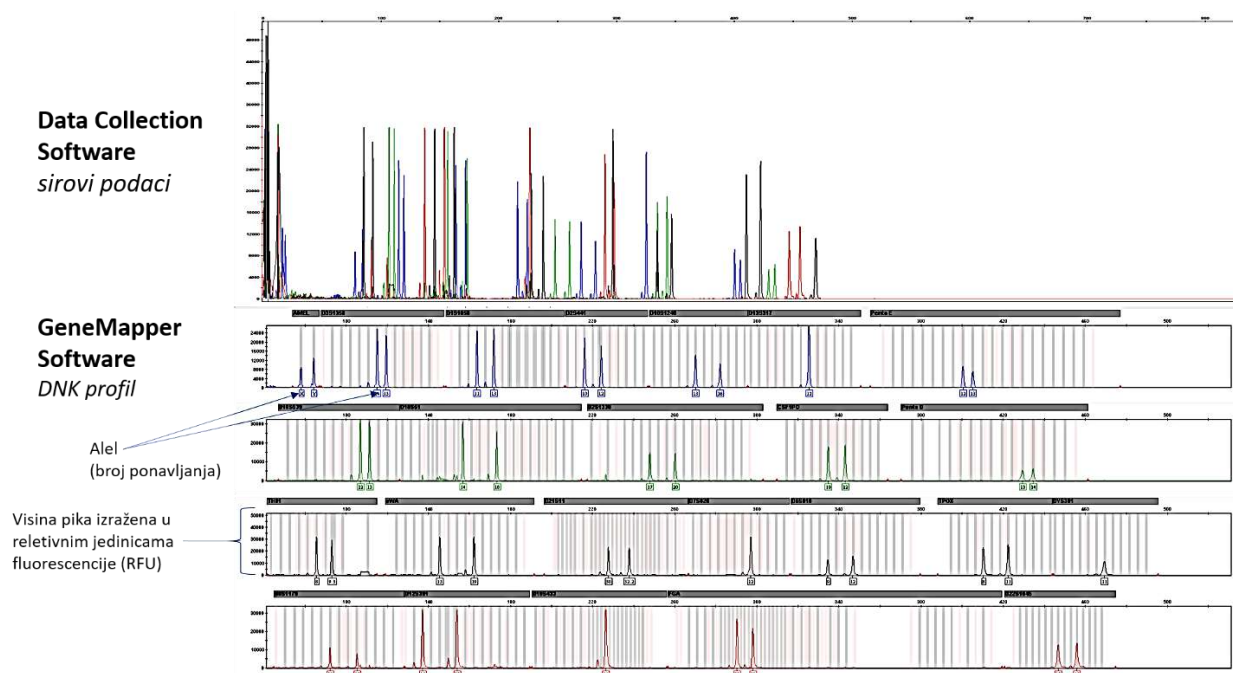
Tokom elektroforeze, kraći fragmenti brže putuju prema pozitivno naelektrisanjoj katodi, dok se veći, zbog svoje sporije putanje kroz gel, pozicioniraju bliže anodi. Tokom putanje fragmenata kroz gel, fragmenti prolaze pored lasera koji očitava fluorescenciju koju emituju fluorescentno obilježeni amplikoni, a CCD (engl. *Charge-Coupled Device*) kamera ih detektuje i prikazuje kao sliku na gelu (slika 3.22. A). Nakon toga, bendovi se softverski prevode u pikove (slika 3.22. B) i uspoređuju s referentnim standardima. U konačnici, dobija se DNK profil na kojem su pikovi razvrstani po lokusima i označeni brojem ponavljanja koji predstavljaju alelne varijante (slika 3.23).



Slika 3.22. Rezultati analize STR markera primjenom kapilarne gel-elektroforeze: A – prikaz uzoraka na gelu (1 – alelna ljestvica, 2 – interni veličinski standard, 3 – uzorak osobe muškog spola), B – elektroferogram uzorka: (1 – alelna ljestvica, 2 – interni veličinski standard, 3 – osoba muškog spola)

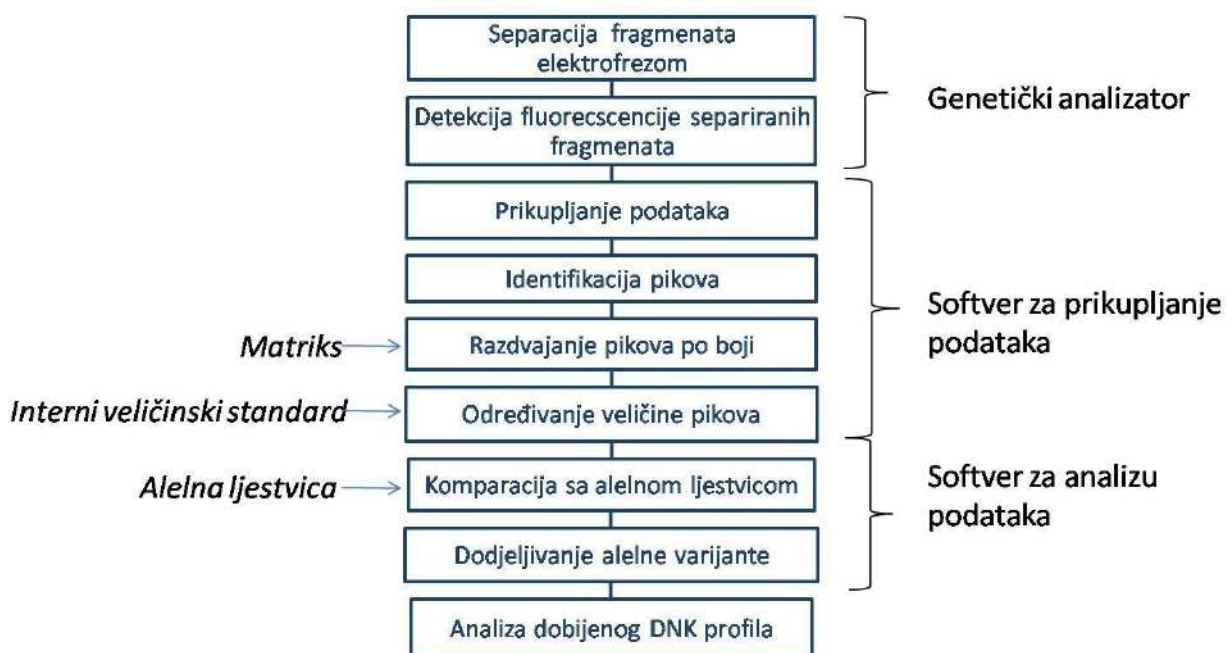
Generaciju genetičkih analizatora s poliakrilamidnim gelovima zamijenili su instrumenti koji razdvajaju STR fragmente primjenom kapilarne elektroforeze. Kao što joj i ime kaže, kapilarna elektroforeza se odvija u mikrokapilari, koja je ispunjena polimerom i kroz koju u toku elektroforeze prolaze STR fragmenti. Kako elektroforeza teče, kroz kapilaru se elektrokinetički

kreću fragmenti, zavisno od njihove veličine. Na jednom dijelu kapilara je ogoljena kako bi laser mogao detektovati fluorescenciju amplificiranih STR fragmenata. Nakon detekcije signal se softverski prevodi u korespondentni pik koji se prikazuje na monitoru.



Slika 3.23. Softverska analiza sirovih podataka i generiranje DNK profila

Po završetku elektroforeze prikaz svih detektovanih pikova uređuje se u posebnom softveru koji razdvaja pikove po boji te poredi dobijene podatke s referentnim standardima, i to veličinskim standardom i alelnom ljestvicom. Veličinski standard sadrži fragmente DNK poznate veličine od 35 do 600 bp koji su obojeni fluorescentnom crvenom bojom (npr. karboksi-x-rodamin (CXR) ili ROX) ili narandžastom (slika 3.19). Na osnovu veličinskog standarda određuje se veličina analiziranih fragmenata STR markera, koji su razdvojeni tokom elektroforeze. Na slici 3.24 prikazani su koraci u analizi molekularnih markera (konkretno STR markera) koji rezultiraju generiranjem DNK profila.



Slika 3.24. Šematski prikaz analize STR markera primjenom kapilarne gel-elektroforeze

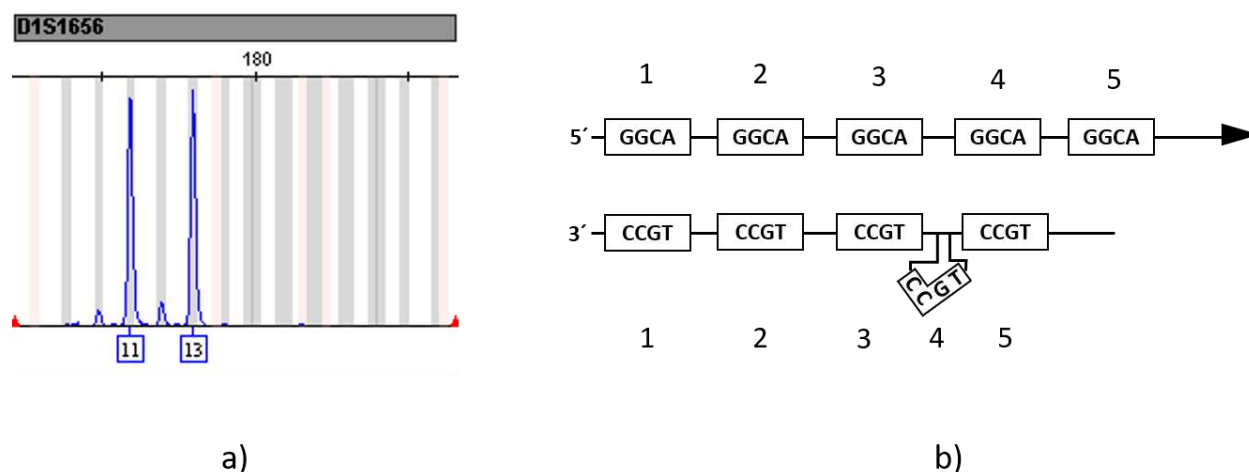
U narednom koraku, softver uspoređuje alelne varijante sadržane u alelnoj ljestvici (slika 3.20) s alelnim varijantama detektovanim u uzorku, nakon čega se svakom piku (alelu) dodjeljuje broj (alelna varijanta). Tako dobijeni DNK profil (slika 3.21) univerzalan je za svaku osobu i u forenzičkoistražnim postupcima koristi se za komparaciju s drugim DNK profilima kako bi se konkretna osoba dovela u vezu s mjestom zločina ili s počinjenim zločinom ili kako bi se potvrdilo biološko srodstvo između testiranih osoba. Također, analizom više stotina DNK profila iz neke populacije, moguće je odrediti učestalost pojavljivanja alelnih varijanti za svaki analizirani STR lokus u datoj populaciji, što je od iznimne važnosti za proučavanje genetičke strukture stanovništva, ali i za kreiranje baze podataka, koja se koristi za validaciju rezultata forenzičko-genetičke analize, a koju treba da ima svaka lokalna populacija.

3.3.2 Izazovi u analizi i interpretaciji DNK profila

Prilikom interpretacije dobijenog DNK profila važno je s visokom tačnošću detektovati sve alelne varijante na svim analiziranim lokusima. Pri tome se moraju uzeti u obzir artefakti koji mogu dovesti do grešaka u interpretaciji DNK profila. To se prije svega odnosi na povišene (pojačane) zaostajuće pikove, *off-ladder* pikove, mikrovarijante, *nul*-alele i mutacije.

3.3.2.1 Zaostajući pikovi

Mali pikovi, za nekoliko baza kraći od pika koji predstavlja alel, nazivaju se zaostajući (engl. *stutter* – mucati, zamuckivati) pikovi (slika 3.25. a). Na elektroferogramu se zaostajući pikovi detektuju kao mali pikovi, čija veličina iznosi do 15% visine alelnog pika, a nalaze se jednu poziciju ispred, ponekad i iza pika. Ovi pikovi nastaju u toku PCR-a kao rezultat grešaka u sparivanju komplementarnih lanaca DNK, pri čemu dio lanca DNK na kojem se formira kompleks prajmer-DNK, ostaje nesparen tokom elongacije prajmera. Zbog toga dolazi do “isklizavanja” prajmera ili dijela lanca DNK, što u konačnici rezultira stvaranjem petlje i skraćivanjem lanca koji je sada za jednu repetitivnu jedinicu kraći od matičnog lanca DNK (slika 3.25. b).



Slika 3.25. Zaostajući pikovi na STR lokusu: a – zaostajući pikovi na lokusu D1S1656, b – mehanizam nastanka zaostajućih pikova pri čemu dolazi do delecije jedne repetitivne jedinice što rezultira nastankom pika za jednu repetitivnu jedinicu kraćeg od alelnog pika

Vrlo rijetko petlje mogu uzrokovati skraćivanje lanca za dvije ili više repetitivnih jedinica. S druge strane, ako dođe do “isklizavanja” na matičnom lancu, kopirani lanac je za jednu repetitivnu jedinicu duži od matičnog lanca DNK te se zaostajući pikovi javljaju iza alelnog pika.

Različiti faktori utiču na pojavu povišenog broja zaostajućih pikova, od čega je najznačajnija mala koncentracija DNK koja rezultira stohastičkom varijacijom¹¹ veličine zaostajućeg pika. Pri niskim

¹¹ Varijacije nastale kao rezultat slučajnosti

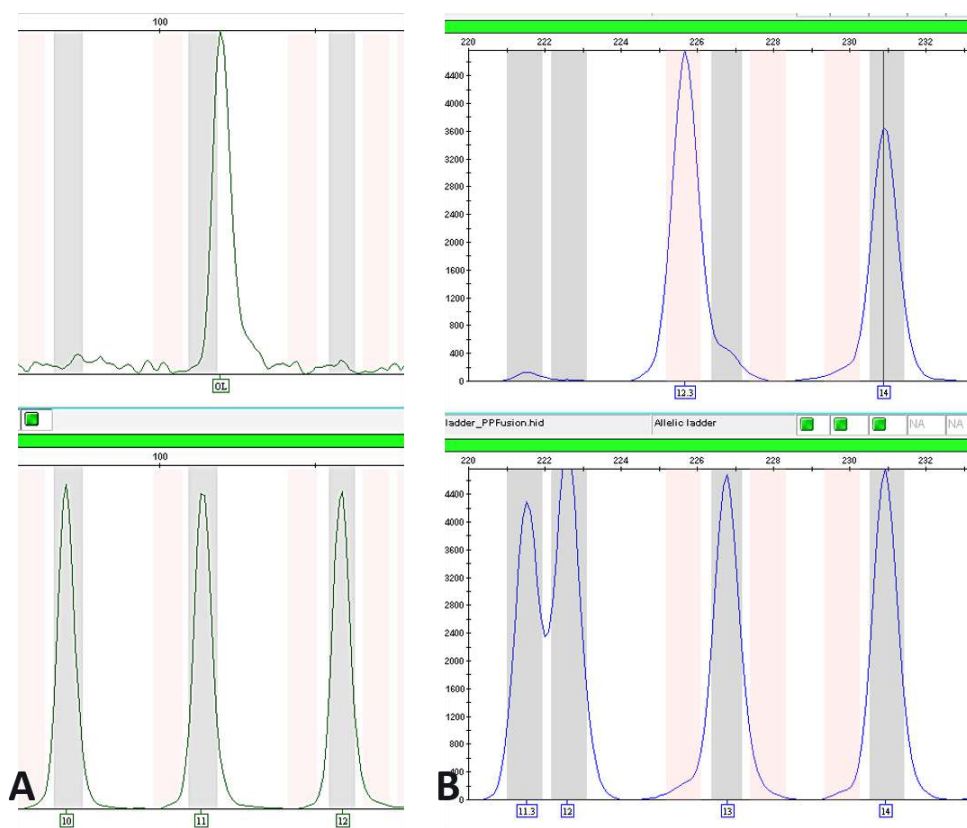
koncentracijama DNK, na generiranim DNK profilima zaostajući pikovi mogu biti iste visine kao i alelni pikovi, što uveliko otežava interpretaciju DNK profila i dovodi do grešaka u očitavanju te do pogrešnih zaključaka.

Ostali faktori koji utiču na pojavu zaostajućih pikova su: produžena PCR amplifikacija, neke specifičnosti PCR komponenti (posebno DNK polimeraze) i uslova reakcije. Na broj, intenzitet i učestalost pojavljivanja povišenih zaostajućih pikova utiče i vrsta STR markera pa je vjerovatnoća pojavljivanja zaostajućih pikova manja što je veća dužina repetitivne sekvence. Tako se na pentanukleotidnim lokusima (Penta D i Penta E) zaostajući pikovi pojavljuju u najnižim frekvencijama. Količina zaostajućih pikova zavisi i od ponavljajućeg motiva STR markera. Kod jednostavnih ponavljajućih motiva broj zaostajućih pikova je veći. Na primjer, kod TH01 markera ponavljajući motiv je AATG i pojava zaostajućih pikova je česta, međutim, kod alelne mikrovarijante 9.3, koja pored osnovnog ima i dodatni ATG motiv, učestalost pojave zaostajućih pikova mnogo je rjeđa. Učestalost pojavljivanja zaostajućih pikova može zavisiti i od polimerazne aktivnosti, tj. brzine kojom ona kopira lanac DNK. Što je brzina manja, učestalost pojavljivanja zaostajućih pikova je veća. Bržim djelovanjem polimeraze sprečava se formiranje petlji koje nastaju kao rezultat grešaka u sparivanju komplementarnih lanaca DNK tokom faze elongacije PCR reakcije.

3.3.2.2 *Off-ladder pikovi i mikrovarijante*

Pikovi koji se detektuju između dva konsenzus alela sadržana u alelnoj ljestvici nazivaju se *off-ladder* (OL) pikovi (slika 3.26. A). Ovi pikovi najčešće predstavljaju *mikrovarijante* (slika 3.26. B) koje se razlikuju od pravih pikova u ponavljajućem slijedu, što nastaje kao rezultat gubitka jedne ili više baza u jednoj repetitivnoj sekvenci. Na DNK profilima uočavaju se kao pikovi koji se nalaze izvan bina, a prilikom komparacije s alelnim varijantama sadržanim u alelnoj ljestvici ne postoji poklapanje pozicija između dva korespondentna pika.

Neke mikrovarijante su vrlo česte u populaciji, kao što je na primjer alelna mikrovarijanta 9.3 na lokusu TH01. Ona ima devet ponavljanja AATG slijeda i jedan parcijalni slijed ATG. Dakle, ova varijanta se razlikuje od alelne varijante 10 u samo jednoj bazi (adeninu) koju je izgubila delecijom u sedmom slijedu.



Slika 3.26. A – primjer off-ladder pika koji softver označava sa OL, B – mikrovarijanta 13.3 na lokusu D2S44 za koju nema korespondentni pik u alelnoj ljestvici

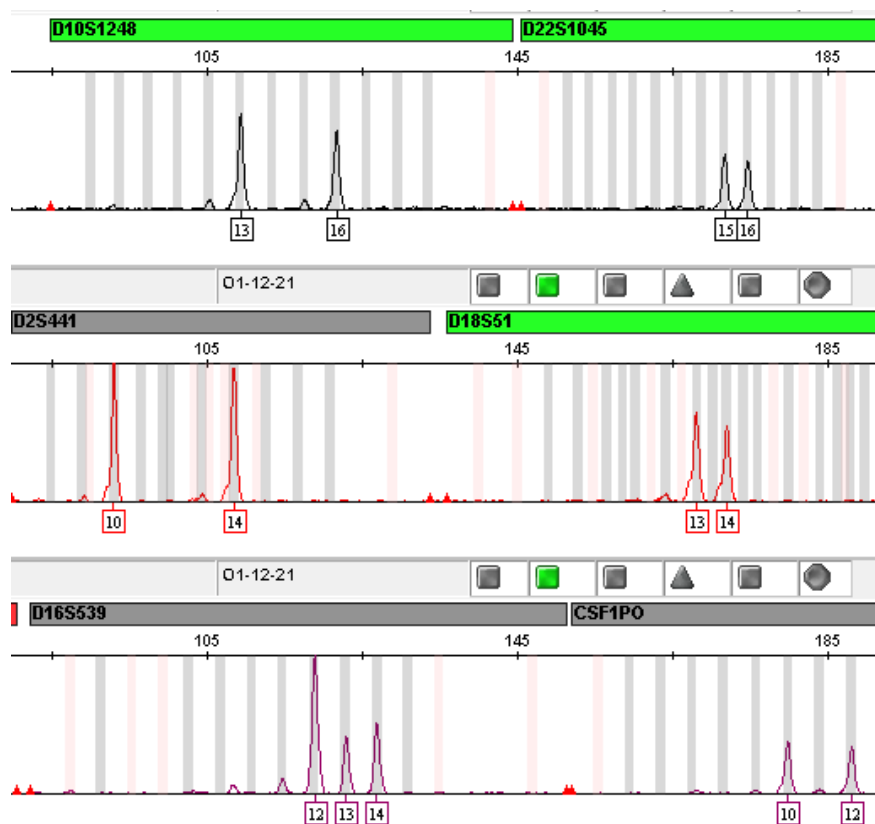
Generalno, mikrovarijante se češće sreću na polimorfnim STR lokusima kao što su FGA, D21S11, D18S5, nego na jednostavnim STR lokusima poput TPOX i CFS1PO. Većina mikrovarijanti se nalazi u alelnim ljestvicama, ali se ponekad pri analizi detektuju i one koje nisu prisutne u alelnoj ljestvici. To su uglavnom veoma rijetke mikrovarijante za koje je neophodno odrediti o kojoj je mikrovarijanti riječ analiziranjem njene pozicije između dva pika. Pri tome, potreban je poseban oprez pri imenovanju ovih OL pikova te nije isključeno i označavanje mikrovarijante s x (npr. 15.x). Ako je riječ o STR lokusima sa složenim motivima ponavljanja (npr. D21S11), tada je neophodno uraditi sekvenciranje fragmenta kako bi se precizno odredila alelna varijanta.

Vrlo rijetko se na DNK profilima javljaju nove alelne varijante koje se nalaze na poziciji između dva lokusa. U takvim slučajevima, neophodno je isti uzorak analizirati s najmanje dva multipleksna seta za amplifikaciju STR lokusa od različitih proizvođača, jer se u različitim setovima lokusi nalaze na različitim pozicijama. Na primjer, ako se korištenjem sistema

PowerPlexFusion (Promega) detektuje pik koji se nalazi između lokusa TH01 i vWA, a za koji je nemoguće sa sigurnošću reći da li se radi o velikom TH01 alelu ili malom vWA alelu, potrebno je ponoviti analizu s drugim multipleksom, npr. sistemom *24plex QS Kit (Qiagen)* u kojem se vWA nalazi između lokusa D3S1358 i D21S11. Ako se u ponovljenom slučaju nova varijanta detektuje na vWA lokusu, onda se sa sigurnošću može reći da je riječ o malom vWA alelu koji ima manje od standardnih 10 ponavljanja.

3.3.2.3 Trialelne varijante STR lokusa

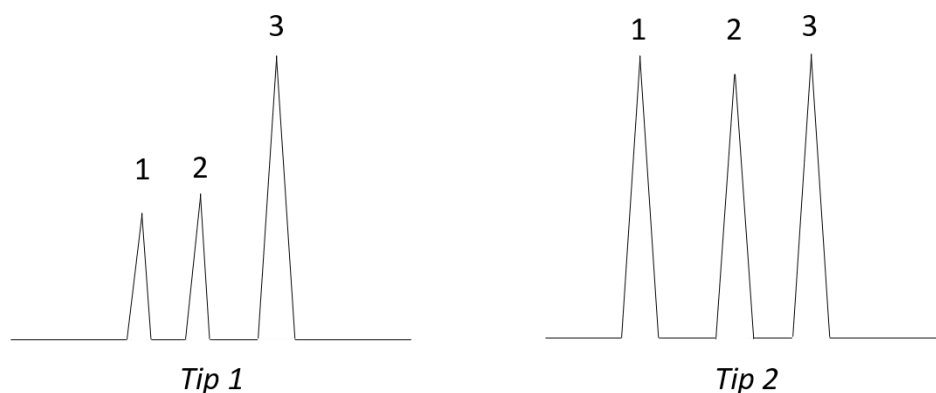
Vrlo rijetko se na DNK profilima na samo jednom lokusu detektuju trialelne varijante koje nisu rezultat miješanog traga. U tim slučajevima, i nakon ponavljanja ekstrakcije i STR amplifikacije, detektuju se tri alela na istom lokusu (slika 3.27).



Slika 3.27. Tri alela na lokusu D16S539

Trialelne varijante su veoma rijetke i dešavaju se jednom u hiljadu analiza, i to najčešće na lokusima TPOX i FGA. One predstavljaju varijacije broja kopija (engl. *Copy Number Variation* – CNV), pojavu u kojoj se dijelovi genoma ponavljaju, a njihov broj varira među pojedincima. Trialelne varijante se javljaju kao rezultat pojave ekstrahromosomalnih fragmenata ili čak kompletnih hromosoma, što u takvim slučajevima može ukazivati na trisomije (npr. *Downov* sindrom, gdje se na lokusu D21S11 i ostalim lokusima na 21. hromosomu mogu detektovati tri alelne varijante).

Forenzički relevantnije su one koje nastaju kao rezultat pojave ekstrahromosomalnih fragmenata, dok trialelne varijante kod trisomija imaju dijagnostički značaj. Razlikuju se dva tipa trialelnih varijanti: tip 1, koji je češći i u kojem je suma visine pikova dva alela jednaka visini pika trećeg alela, i tip 2 u kojem su sva tri alela iste visine (slika 3.28).

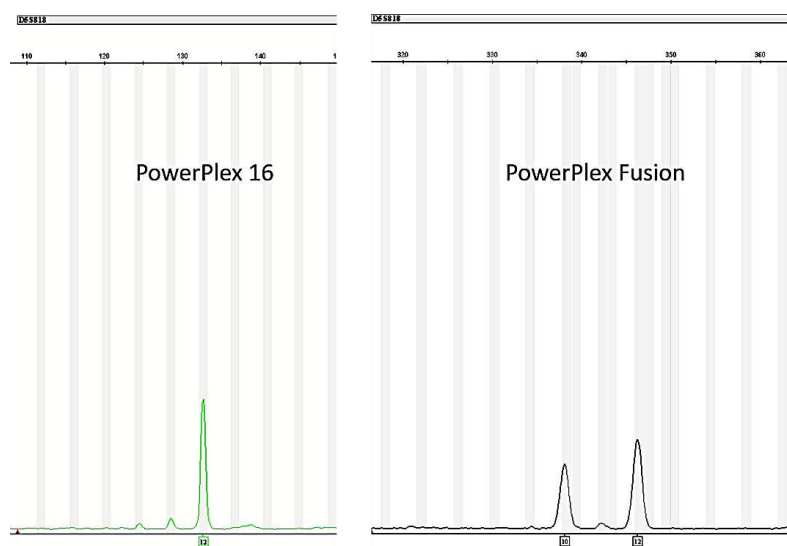


Slika 3.28. Dva tipa trialelnih varijanti: kod tipa 1 zbir visina dva pika jednak je trećem ($1 + 2 = 3$), dok su kod tipa 2 sva tri pika jednake visine ($1 = 2 = 3$)

Svakako prilikom analize trialelnih varijanti treba biti izuzetno oprezan te isključiti ovu pojavu kao rezultat miješanog traga, uvećanih zaostajućih pikova, kao i nekih bioloških procesa koji mogu rezultirati pojavom tri alelne varijante na jednom lokusu (somatske mutacije, duplikacije hromosoma kao što je trisomija 21 ili mozaicizam).

3.3.2.4 Ispadanje alela i nul-aleli

Ponekad se pri analizi DNK profila, kao rezultat grešaka tehničke prirode ili biohemijskih procesa, na generiranim profilima ne detektuju aleli, što se naziva *ispadanje alela* (engl. *allelic drop-out*). Ovi, nedetektovani aleli, nazivaju se još i nul-aleli (engl. *null-alleles*). Ispadanje alela može značajno uticati na pouzdanost analize i dovesti do pogrešne interpretacije rezultata. To se posebno odnosi na isključivanje osumnjičenog lica kao potencijalnog počinioca zločina, s obzirom na to da DNK profili na kojima je došlo do ispadanja alela ne daju nedvosmislene rezultate o identitetu osoba od kojih tragovi potječu. Najčešći uzroci ispadanja alela su: degradacija molekule DNK, veoma male količine molekule DNK u uzorku i tehnički nedostaci primijenjene metode, uslijed čega dolazi do smanjenja produkata amplifikacije. Sasvim je jasno da je za uzorke visoke kvalitete vjerovatnoća ispadanja alela ravna nuli. Ipak, nul-aleli se detektuju i u slučajevima kada je dostupna dovoljna količina visoko kvalitetne molekule DNK u uzorku, što je najčešće rezultat razlika u sekvenci, koje nastaju kao posljedica promjene nukleotidne baze (insercijom ili delecijom). Ako se promjena desi na matričnom lancu DNK na mjestu vezivanja PCR pramjera, može doći do poremećaja u vezivanju prajmera, što rezultira odsustvom amplifikacije tog regiona i samim tim i pojavom nul-alela. Nul-aleli se detektuju (i potvrđuju) korištenjem više STR setova različitih proizvođača (slika 3.29).



Slika 3.29. Detekcija nul-alela primjenom PowerPlex Fusion amplifikacijskog kita pri čemu primjenom PowerPlex 16 seta nije detektovana alelna varijanta 10 na lokusu D5S818

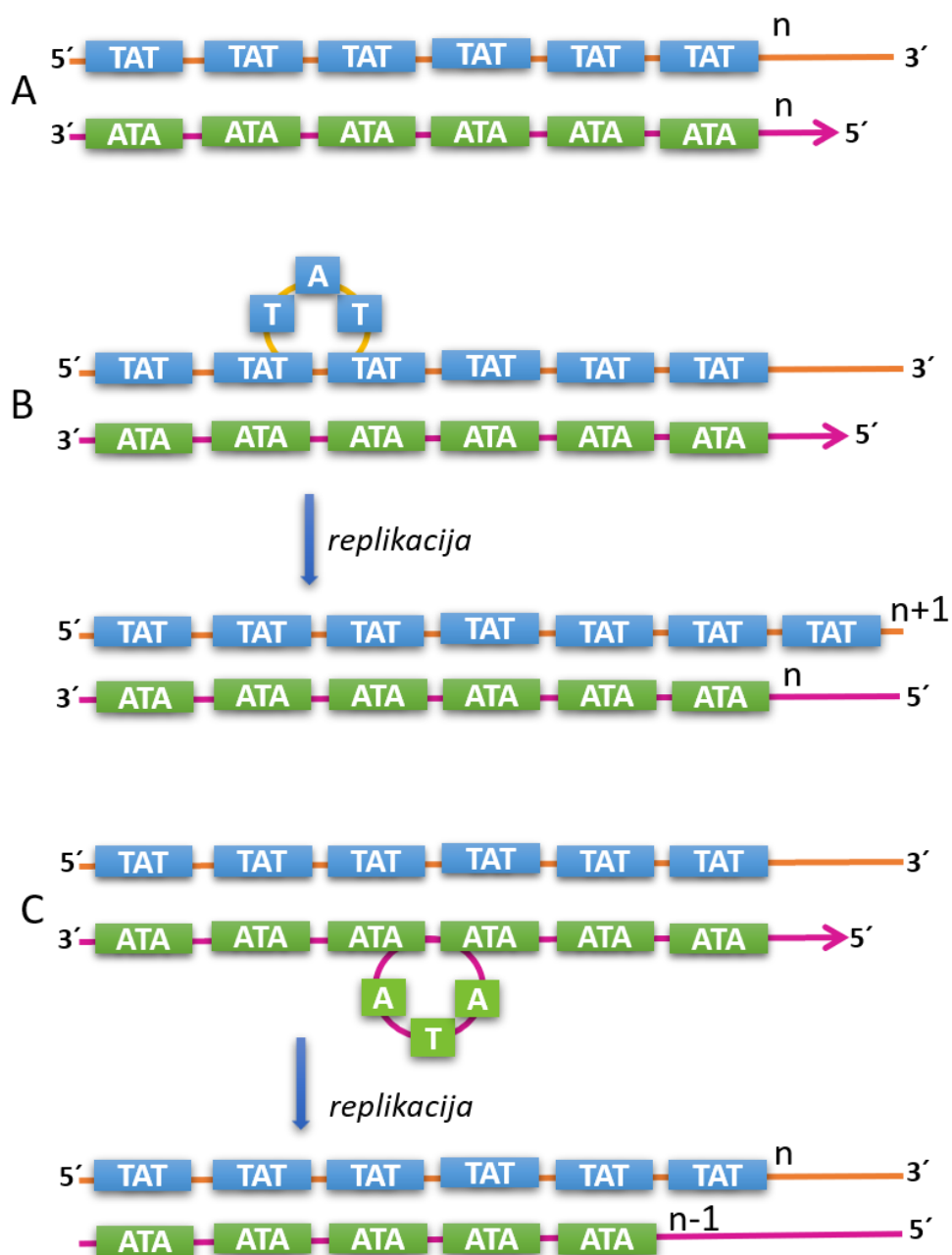
Međutim, moguće ih je i predvidjeti primjenom statističkih obrazaca za analizu odnosa uočenih i očekivanih homozigota u populaciji koja se nalazi u Hardy-Weinberg ekvilibriju. Veliki broj uočenih homozigota ukazuje na vjerovatno prisustvo nul-alela. Ako se otkrije pojava nul-alela, primjenjuje se nekoliko rješenja, koja prvenstveno podrazumijevaju promjene u dizajnu prajmera za dati STR lokus, kao i ponavljanje amplifikacije sa smanjenom temperaturom hibridizacije u PCR-u, što je učinkovito samo u nekim slučajevima.

3.3.2.5 Mutacije

Kao i sve ostale regione molekule DNK, tako i STR lokuse pogađaju mutacije koje mogu biti u formi jednostepenih mutacija (promjena u samo jednoj bazi) ili promjene ponavljajućeg motiva. Smatra se da su sve alelne varijante jednog STR lokusa nastale od jedne ishodišne varijante koja je kroz dug vremenski period prolazila kroz promjene – mutacije. Stopa mutacija je različita za različite tipove sekvenci STR markera. Najveću stopu mutacije imaju dinukleotidini STR lokusi, dok je kod tetranukleotidnih ona za 50% manja. Iako su predložena tri mehanizma nastanka mutacija u STR regionima, i to: neujednačen *crossing over* tokom mejoze, retrotranspozomski mehanizam i mehanizam replikacijskog klizanja, smatra se da je upravo ovaj posljednji odgovoran za nastanak mutacija u STR lokusima.

Do replikacijskog klizanja dolazi kada, uslijed replikacije uzastopnih ponavljanja, u jednom trenu dođe do obustavljanja replikacije i privremenog disociranja DNK polimeraze s lanca DNK. Novosintetizirani lanac se odvaja od matričnog lanca DNK i sparuje s drugim direktnim ponavljanjem uzvodno na matričnom lancu, pri čemu nastaje “omča”. DNK polimeraza prilikom vraćanja na svoju poziciju na matričnom lancu nastavlja proces replikacije i ponovno dodaje dezoksiribonukleotide koji su već dodani, uslijed čega dolazi do duple replikacije (insercije) sekvenci u novi lanac. Ako dođe do nastanka omče na matričnom lancu DNK uslijed neispravnog spajanja lanca s direktnim ponavljanjem na novom lancu, dolazi do gubitka slijeda nukleotida (delecije). Zbog toga se javljaju razlike između novonastalog i matričnog lanca (slika 3.30). Nastale promjene prepoznaju proteini koji vrše nukleotidni ekscizijski popravak, što rezultira povećanjem ili smanjenjem ponavljanja slijeda sekvence, pri čemu je češće povećanje broja ponavljanja.

Postoji više faktora koji utiču na učestalost pojavljivanja mutacija na različitim STR lokusima. Jedan od najčešćih je broj ponavljanja te je mutacijska stopa veća što je veći broj ponavljanja. S druge strane, mutacijska stopa je veća kod STR lokusa kod kojih je manja repetitivna jedinica pa tako dinukleotidni STR lokusi imaju najveću, a pentanukleotidni najmanju stopu mutacije.



Slika 3.30. Mehanizmi nastanka mutacija na STR markerima: A – normalna replikacija, B – mutacija nastala kao rezultat insercije, C – mutacija nastala kao rezultat delecije

Još jedan važan faktor je i sastav ponavljajuće sekvence STR lokusa, pa su sekvence bogate adeninom i timinom podložnije mutacijama nego sekvence bogate citozinom i guaninom. Na stopu mutacija utiču i spol i dob. Stopa mutacije viša je u somatskim nego spolnim ćelijama. Među spolnim ćelijama, stopa mutacije je veća u spermatozoidima nego u jajnim ćelijama, jer spermatozidi prolaze kroz više replikacijskih ciklusa od jajne ćelije. S obzirom na to da se učestalost mutacija povećava s brojem replikacijskih ciklusa, znatno je veća vjerovatnoća da su starije osobe (posebno muškarci) podložniji pojavi mutacija na STR lokusima.

Analiza STR markera lociranih na spolno determinirajućim hromosomima danas se rutinski koristi u mnogim forenzičkim laboratorijama. Iako je analiza autosomskih STR markera rutinski standard u postupcima identifikacije osoba ili utvrđivanja srodstva, ponekad je, posebno kod utvrđivanja srodstva, ili pak nemogućnosti da se generira potpuni autosomski DNK profil, neophodno provesti i/ili analizu spolno-vezanih STR markera. Zbog međusobnih razlika u načinima nasljeđivanja X i Y-STR markera, ali i autosomskih STR markera, analiza ovih markera može dati važne informacije koje nije moguće dobiti samo analizom autosomskih STR markera.

3.3.3 Spolno-vezani markeri

Za razliku od autosoma, koji se nasljeđuju po jedan od svakog roditelja (diploidni genotip), Y-hromosom prenosi samo muškarac svojim muškim potomcima (haplotip). Ženske osobe nasljeđuju po jedan X-hromosom od oca i majke (diploidni genotip), dok muške osobe nasljeđuju samo jedan X-hromosom od majke (haploidni genotip).

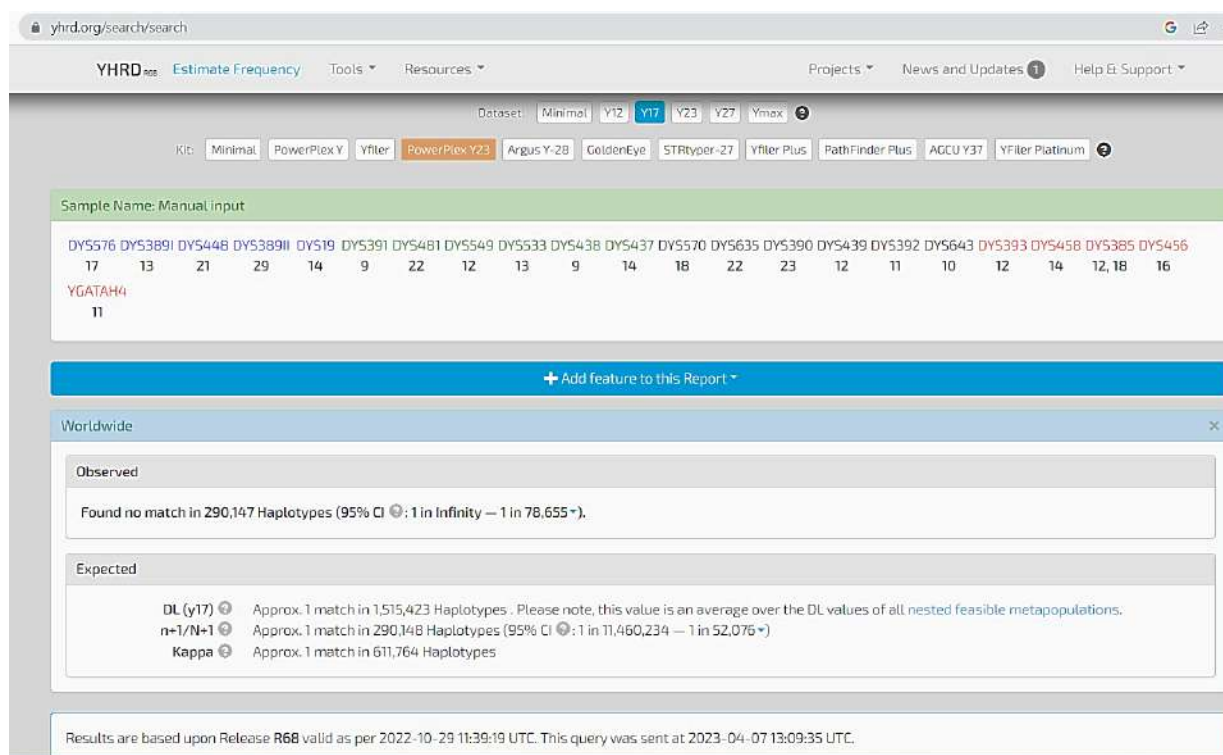
3.3.3.1 Analiza Y-STR markera

Analiza Y-STR markera u forenzičkoistražnim postupcima koristi se za identifikaciju muških individua, i to u najviše slučajevima kada se radi o smjesi molekula DNK (npr. u slučajevima silovanja). Također, analiza se koristi za utvrđivanje bližeg i daljeg srodstva po muškoj liniji, pri čemu nije moguće utvrditi o kojem se tipu srodstva zapravo radi (roditeljstvo, braća, sinovi od dva brata i dr.). Pored navedenog, analiza Y-vezanih STR markera primjenjuje se u studijama evolucije ljudi praćenjem muške linije potomaka, kao i za proučavanje prostornog i vremenskog kretanja ljudskih populacija. Pošto se Y-hromosom prenosi nepromijenjen s muškaraca na muško potomstvo, ove markere karakterizira odsustvo varijabilnosti.

Zbog toga je bilo neophodno identificirati one Y-STR markere koji imaju visok stepen diskriminacije i uključiti ih u multipleksne sisteme koji se danas koriste u laboratorijskoj praksi. Prvi komercijalni set sadržavao je 12 Y-STR markera: devet lokusa koji čine tzv. “minimalni haplotip” i još tri dodatna lokusa.

Minimalni haplotip je minimalni broj Y-STR markera koji se treba uključiti u analizu kako bi se dobio statistički relevantan rezultat. U sastav minimalnog haplotipa ulazi devet lokusa: DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 i DYS385a/b. Ovaj posljednji je multikopijski lokus i u rezultatima se predstavlja kao dva odvojena lokusa DYS385a i DYS385b. Navedeni set predstavlja minimum neophodan da se podaci iz nacionalnih baza unesu u svjetske baze podataka Y-haplotipova, od kojih je najpoznatija YHRD (engl. *Y Chromosome Haplotype Reference Database*). Danas se u forenzičke svrhe najčešće koriste setovi od 24 ili 28 Y-STR lokusa, a za isključenje osumnjičenog u forenzičkim analizama preporučuje se analiza 40 Y-STR lokusa. YHRD do danas sadrži više od stotinu nacionalnih baza podataka. Baza je kreirana 1999. godine i tada je sadržavala 3825 haplotipova, tipiziranih u 48 populacija, pri čemu je analizirano 13 Y-STR markera. Trenutno izdanje (januar, 2023) sadrži 265.324 profila iz 1251 populacije s 29 analiziranih Y-STR markera i velikim brojem SNP-ova. Baza sadrži primarne podatke o vrsti i distribuciji haplotipova, što olakšava statističke analize i interpretacije analiza u različitim slučajevima kao što je npr. testiranje srodstva, analiza smjese, predviđanje porijekla na osnovu Y-haplogrupa, itd. Baza je anonimna i ne pruža informacije o identitetu osoba čiji su haplotipovi tu pohranjeni. Također, baza ne pruža informacije o individualnim podudaranjima s drugim haplotipovima iz baze, nego koristi populacijske parametre i podatke za izračunavanje statističkih parametara koji potvrđuju rezultate analiza Y-STR markera. Baza prvenstveno pruža informacije o frekvenciji generiranog Y-STR profila unutar lokalne i svjetske populacije te preračunava vjerovatnoće da analizirani Y-STR profil pripada datoj osobi (slika 3.31).

U forenzičkoj analizi se Y-STR profili generirani iz bioloških tragova međusobno uspoređuju kao bi se ustanovilo radi li se o istom haplotipu. Važno je napomenuti da prilikom interpretacije rezultata Y-STR analize treba biti vrlo oprezan, što se posebno odnosi na identifikaciju osumnjičenog, jer nije moguće isključiti sve njegove srodnike po muškoj liniji (oca, braću, sinove...) kao potencijalne izvršioce krivičnog djela.



Slika 3.31. Sučelje web stranice YHRD s prikazanim rezultatima analize frekvencije datog YSTR profila prikazanog u polju Observed

Također, iz istog razloga analiza je ograničeno primjenljiva, i to najčešće kao dodatna analiza, u slučajevima DNK identifikacije nestalih osoba. Međutim, čak i s ovim ograničenjem, analiza je od izuzetne važnosti u različitim forenzičkim slučajevima, a posebno u onima u kojima se javljaju miješani tragovi. U slučajevima u kojima se muška frakcija u smjesi nalazi u manjim količinama u odnosu na žensku frakciju (npr. u slučajevima silovanja), analiza Y-STR markera je skoro pa nezamjenjiva. Istraživanja su pokazala da je Y-STR analizom moguće generirati profil iz smjese u kojoj je omjer muške i ženske frakcije 1 : 24000.

Y-STR analiza se danas sve više koristi i kao neinvazivna metoda za prenatalno utvrđivanje očinstva, kao i za određivanje spola fetusa. Za te se potrebe fetalna DNK izoluje iz majčine krvi u kojoj se nakon 12. sedmice nalazi u detektabilnoj koncentraciji kao slobodna cirkulirajuća DNK.

3.3.3.1.1 Analiza Y-haplogrupa

Analiza Y-vezanih STR markera koristi se i za istraživanje porijekla po muškoj liniji gdje je, uz primjenu softvera za predikciju Y-haplogrupe, moguće s velikom vjerojatnošću odrediti pripadnost jednoj od 20 humanih Y-haplogrupa (tabela 3.3). Softveri za predikciju pripadnosti određenoj Y-haplogrupi analiziraju generirane Y-DNK profile, koji predstavljaju *Y-haplotip*. Y-haplotip je dakle set Y-STR DNK markera koji muška individua nasljeđuje po očevoj liniji. Muške osobe koje pripadaju istoj Y-haplogrupi mogu imati različite haplotipove, ali ipak dijele zajedničke Y-DNK markere koji definišu određenu haplogrupu. S obzirom na to da je haplogrupa definisana mutacijama u nerekombinujućem regionu Y-hromosoma, ova akumulacija polimorfizama tokom linearnoga životnog vijeka predstavlja moćan alat za analizu genetičkog naslijeđa i predikciju migracijskih procesa iz prošlosti. S druge strane, sekvenciranjem odabranih polimorfizama jednog nukleotida (SNP) precizno se određuje individualna pripadnost Y-haplogrupi i to do nivoa specifične mutacije koja analizirani haplotip izdvaja u posebnu subhaplogrupu date Y-haplogrupe.

Na osnovu analize Y-haplogrupe može pretpostaviti ne samo individualno nego i geografsko porijeklo i disperzija humanih populacija širom svijeta. Upravo su analize Y-haplogrupa unutar cjelokupne svjetske populacije omogućile genealošku i filogenetsku rekonstrukciju evolutivnih tokova vrste *Homo sapiens*. Svaka muška osoba današnje populacije pripada jednoj od 20 Y-haplogrupa. Prema Konzorciju Y-hromosoma (engl. *Y Chromosome Consortium* – YCC) koji je razvio sistem nomenklature Y-haplogrupa, ovih 20 haplogrupa označeno je velikim slovima od A do T, dok se za imenovanje subhaplogrupa koriste brojevi i mala slova (npr. I2a je potklasa haplogrupe I). Prva haplogrupa, od koje su nastale sve ostale, jest haplogrupa A, koja se pojavila prije oko 270.000 godina, najvjerojatnije na prostoru današnje zapadne Afrike. Ova haplogrupa se još naziva i "Y-hromosomski Adam" te se smatra najvjerojatnijim zajedničkim pretkom (engl. *Most Recent Common Ancestor* – MRCA) po očevoj liniji svih danas živućih muškaraca. Danas je najzastupljenija na cijelom Afričkom kontinentu, s najvećom frekvencijom na zapadu Afrike, koja se i smatra kolijevkom čovječanstva. Od haplogrupe A se, između ostalih, izdvojila makrohaplogrupa BT prije oko 150.000 godina, od koje su se nadalje izdvojile sve ostale Y-haplogrupe.

Tabela 3.3. Osnovne Y-haplogrupe s procijenjenom starosti, mogućim mjestom porijekla te rasprostranjenosti u modernoj ljudskoj populaciji

Osnovna Y-haplogrupa	Procijenjena starost (godine)	Moguće mjesto porijekla	Najveća rasprostranjenost
A	270.000–275.000	zapadna ili centralna Afrika	Afrika, rjeđe Evropa i zapadna Azija
B	100.000–250.000	Afrika	Afrika
C	~53.000	istočna, jugozapadna ili centralna Azija	Sibir, dijelovi istočne Azije, Okeanija i Amerika
D	65.000–80.000	Afrika	istočna Azija
E	65.000–73.000	istočna Afrika ili Euroazija	Afrika, Evropa
F	57.500–62.500	južna ili zapadna Azija	južna Azija (Šri Lanka, Indija, Pakistan, Iran)
G	~48.000	zapadna Azija	Evropa, zapadna Azija, sjeveroistočna Afrika, centralna, južna i jugoistočna Azija
H	~48.000	južna ili zapadna Azija	Južna Azija, romski narod
I	~42.900	centralna Evropa	jugoistočna Evropa, zapadna evropa
J	~42.900	zapadna Azija	Arapsko poluostrvo, Srednji Istok, sjeverna Afrika, Afrički rog, Kavkaz
K	47.000–50.000	jugoistočna ili istočna Azija	primorska jugoistočna Azija, Melanezija
L	25.000–30.000	Bliski Istok, južna ili zapadna Azija ili planine Pamir	južna Azija, Bliski Istok, centralna i istočna Azija, Evropa
M	32.000–47.000	istočna Indonezija ili Nova Gvineja	Nova Gvineja, Melanezija, Indonezija, Mikronezija i Polinezija
N	36.800–44.700	istočna Azija	sjeverna Euroazija, centralna Azija
O	~42.000	istočna Azija	jugoistočna i istočna Azija
P	~35.000	Indokina ili istočna Azija	Evropa, Amerika (starosjedioci), centralna ili južna Azija
Q	~24.500	centralna Azija	Amerika (starosjedioci), centralna Azija, sjeverni Sibir
R	~27.000	centralna Azija ili Sibir	Evropa, južna i centralna Azija
S	28.000–41.000	Nova Gvineja / Indonezija	Papua Nova Gvineja, Australija (Aboridžini), Melanezija, Indonezija
T	10.500–48.800	zapadna Azija	Izolovana područja centralne Azije, sjeveroistočne i istočne Indije, centralne i južne Afrike

Danas se za skoro svaku populaciju zna sastav i učestalost pojedinih haplogrupa. U Evropi gotovo svi muškarci pripadaju jednoj od devet glavnih haplogrupa: E, G, I, J, K/T, L, N, Q i R. U Bosni i Hercegovini je najzastupljenija haplogrupa I2a koju ima 49% muškog stanovništva, zatim R1a (17%), E1b1b (17%), J2a (5%), I1 (4%), R1b (4%), J2b (2%), G2a (1,5%) i N (1%). Danas se provode intenzivna i obimna istraživanja porijekla haplogrupa te se s konstantnim unapređenjem i usavršavanjem tehnologije, uz nove spoznaje, dosadašnja saznanja kontinuirano nadopunjuju.

Prema trenutnim saznanjima *Haplogrupa I* je najstarija evropska haplogrupa, nastala u Evropi i najvjerojatnije jedina koja odatle vodi porijeklo. Potklasa I2a je najzastupljenija na području Dinarida istočne Evrope (Balkanski poluotok) s najvećom frekvencijom na prostoru bivše Jugoslavije. Visoka frekventnost ove haplogrupe na ovim područjima povezuje se s dva potencijalna scenarija. Prvi je kreiranje refugija tokom posljednjeg ledenog doba na ovim prostorima koji je bio centar radijacije za naseljavanje Evrope nakon otopljanja. Drugi je potencijalni efekat osnivača povezan s migracijama iz pravca istoka koje su se kontinuirano dešavale u proteklih 2000 godina. Smatra se da se pojavila tokom kasnog paleolitika, u periodu posljednjeg glacijalnog maksimuma (prije oko 26.500 do 19.000 godina). Masovne migracije farmera sa Srednjeg istoka tokom neolita i Indoevropljana, koje su donosile nove haplogrupe tokom bronzanog doba, značajno su smanjile frekvenciju I2 haplogrupe primarno u jugoistočnoj Evropi.

Haplogrupa R je druga najučestalija na Evropskom kontinentu, a vodi porijeklo iz sjeverne Azije, iz perioda posljednjeg glacijalnog maksimuma. U Evropi su zastupljene dvije potklase ove haplogrupe: R1a i R1b. Potklasu R1a je od R haplogrupe diferencirala serija mutacija koje su se desile tokom, ili odmah poslije posljednjeg glacijalnog maksimuma. Malo se zna o tačnom mjestu porijekla ove podgrupe. Danas je rasprostranjena u skoro cijeloj Euroaziji, od Skandinavije i centralne Evrope do južnog Sibira i južne Azije. R1b potklasa je danas najzastupljenija među muškarcima s prostora zapadne Evrope, dijela Rusije i centralne Afrike. Smatra se da su upravo pripadnici ove potklase bili prvi koji su pripitomili stoku prije 10.500 godina na području sjeverne Mesopotamije.

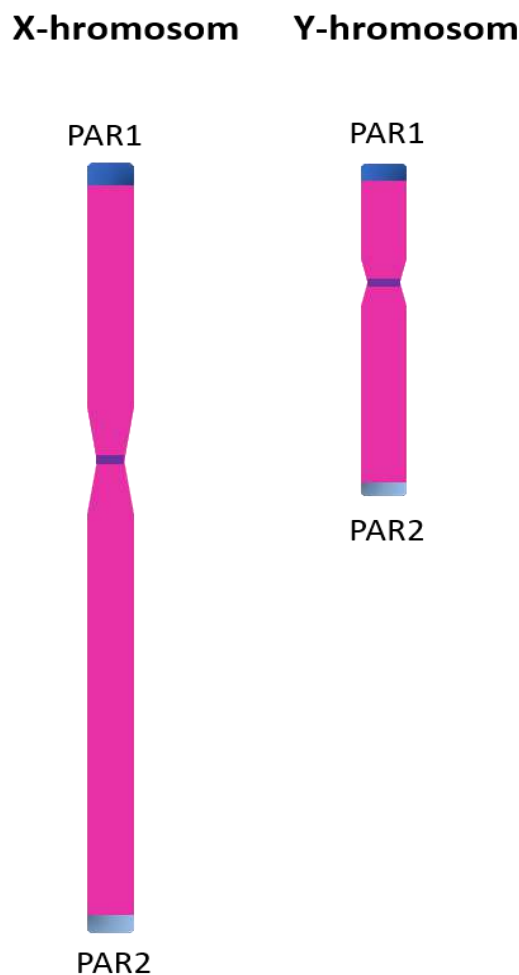
Haplogrupa E1b1b (ranije poznata i kao E3b) najvjerojatnije je jedna od posljednjih glavnih haplogrupa koja je migrirala iz Afrike u Evropu. Smatra se da se prvi put pojavila prije oko 26.000

godina u Africi, odakle se raširila u sjevernu Afriku i na Bliski Istok tokom kasnog paleolitika i mezolitika. Njeno prisustvo u Evropi vežu za kompleksni scenarij neolitskih migracija. Danas je ova haplogrupa najviše zastupljena u sjeveroistočnoj Africi (Etiopiji i Somaliji) te u zapadnoj Aziji i Evropi (posebno na Mediteranu i Balkanskom poluostrvu).

Haplogrupa J2 predstavlja jednu od dvije velike potklase haplogrupe J. Najzastupljenija je u sjeverozapadnoj Aziji, ali je zastupljena i u Evropi, kao i sjevernoj Africi. Pretpostavlja se da ova haplogrupa vodi porijeklo sa Srednjeg Istoka od prije oko 15.000–22.000 godina. Potklasa J2 je rasprostranjena od Evrope do južne Azije, kao i na području afričke mediteranske obale. Veoma je česta među jevrejskom populacijom.

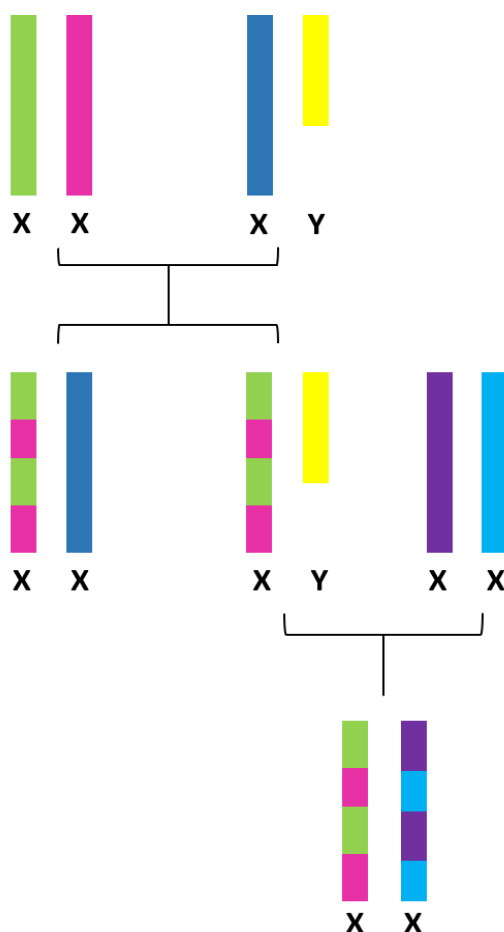
3.3.4 X-STR markeri

Analiza X-STR markera ima nekoliko specifičnosti koje ovu analizu čine drugačijom od analiza i Y i autosomskih STR markera. Te razlike su prije svega rezultat specifičnosti nasljeđivanja X-hromosoma koji muškarci nasljeđuju samo jedan od majke, dok žene nasljeđuju jedan od majke, a drugi od oca. Kod muškaraca ne dolazi do rekombinacije između X i Y-hromosoma izuzev na *pseudoautosomnim regionima* (PAR1 i PAR2). To su kratki homologni regioni X i Y-hromosoma (slika 3.32) između kojih dolazi do rekombinacije tokom mejoze kod muškaraca. Do danas, niti jedan marker iz PAR regiona nije korišten u forenzičko-genetičkim analizama. Geni koji se nalaze u PAR1 i PAR2 regionima nasljeđuju se na isti način kao autosomalni geni, a ne kao spolno-vezani geni. Za razliku od gena u PAR regionima, ostali geni na X i Y-hromosomima se prenose nepromijenjeni zbog odsustva rekombinacije.



Slika 3.32. PAR regioni na X i Y-hromosomu

Zbog toga muškarci nasljeđuju od majke i prenose na potomke nepromijenjen X-hromosom. S druge strane, kod žena X-hromosom, u kombinaciji s X-hromosomom drugog roditelja, ima osobine autosoma, te se u naredne generacije prenosi u rekombinovanoj formi (slika 3.33). Ove specifične osobine, dvije rekombinantne varijante kod osoba ženskog spola i jedna nerekombinantna varijanta kod osoba muškog spola, čine X-vezane markere odličnim alatom za analizu specifičnih forenzičkih slučajeva te zauzimaju posebno mjesto u forenzičkoj i populacijskoj genetici. Također, primjenjuju se u proučavanju evolutivnih procesa, ali imaju i važan medicinsko-dijagnostički značaj (npr. analiza X-vezanih recesivnih oboljenja kao što su hemofilija ili *Duchenne* mišićna distrofija).



Slika 3.33. X-vezano nasljeđivanje. Ženski i muški potomci nasljeđuju po jedan rekombinovani X-hromosom od majke nastao u procesu mejoze, dok ženski potomci nasljeđuju od oca nepromijenjen X hromosom, uslijed odsustva rekombinacije između X i Y hromosoma.

U forenzičkoj i populacijskoj genetici, specifičnost nasljeđivanja X-hromosoma omogućava dobijanje informacija i rezultata koje nije moguće dobiti analizom markera koji se nalaze na autosomima ili dijelovima genoma koji se nasljeđuju uniparentalno (mtDNK i Y-hromosom). Iako analiza autosomskih markera u forenzičke svrhe najčešće daje najinformativnije rezultate, analiza X-vezanih STR markera može biti nekada vrijedan izvor informacija. Takav je slučaj utvrđivanja roditeljstva u koje je uključena barem jedna osoba ženskog spola (otac – kćerka, majka – sin, majka – kćerka).

U tim slučajevima, X-STR analiza se koristi kao potvrdna metoda, posebno kada je iz nekog razloga (npr. mutacija, mala količina DNK, degradirana DNK) smanjena vrijednost indeksa očinstva / majčinstva dobijena analizom autosomskih STR markera. Štaviše, u poređenju s autosomima, X-STR markeri imaju veću statističku snagu u slučajevima potpunog očinstva (otac – majka – dijete), bezmajčinskog očinstva tipa otac – kćerka i majčinstva tipa majka – sin. S druge strane, ovi se markeri ne mogu koristiti za utvrđivanje očinstva tipa otac – sin, dok za slučaj majčinstva majka – kćerka imaju istu statističku snagu kao i analiza autosomskih STR markera.

U slučajevima utvrđivanja srodstva, kada roditelj nije dostupan za analizu, X-STR markeri mogu predstavljati vrijedan izvor informacija. Ako dvije osobe ženskog spola žele znati imaju li zajedničkog biološkog oca, rezultati analiza X-STR markera će biti informativniji od rezultata analize autosomskih STR markera. Naime, dvije polusestre moraju dijeliti X-hromosom koji su naslijedile od oca, dok je u slučaju autosomskih markera vjerovatnoća da imaju istu alelnu varijantu koju su naslijedile od oca (ako je otac heterozigot) 50%. Isto tako, vjerovatnoća da nisu naslijedile niti jednu alelnu varijantu autosomskih STR markera iznosi 50%, dok je vjerovatnoća da nisu naslijedile njegov X-hromosom (X-vezane STR markere) 0% (tabela 3.4). Isto je i u slučajevima testiranja srodstva tipa baka (očeva majka) – unuka, gdje je unuka morala naslijediti X-hromosom koji je očeva majka prenijela njenom ocu, dok je vjerovatnoća da naslijedi njenu alelnu varijantu autosomskog STR markera 50%. U nekim slučajevima incesta će analiza X-vezanih markera će dati rezultate koji imaju veću statističku snagu od analize autosomskih markera. Tako, na primjer, ako je biološki otac ženskog djeteta istovremeno i otac njene majke, njih dvije će dijeliti iste X-vezane markere koji su porijeklom od oca.

Tabela 3.4. Vjerovatnoća da dvije osobe dijele dva, jedan ili nijedan zajednički alel, uz pretpostavku specifičnog srodstva i za autosomni (Aut) i za X-hromosomski (X hro) način genetičkog prijenosa

Zajednički alel		Dva		Jedan		Nijedan			
Način prijenosa		Aut	X-hro	Aut	X-hro	Aut	X-hro		
Odnos		Žena-žena							
Jednoajčani blizanci		1		0		0			
Majka-kćerka		0		1		0			
Sestre		1/4	1/2	1/2	1/2	1/4	0		
Baka-unuka	po majci	0			1/2	1/2	1/2		
	po ocu						1	0	
Tetka-nećakinja	po majci						3/4	1/4	
	po ocu						1/2	1/2	
Polusestre	po majci						1/2	1/2	
	po ocu						1	0	
Nesrodne		0		0		1			
Žena-muškarac									
Otac-kćerka/majka-sin		0		-		1		0	
Brat-sestra		1/4		1/2		1/2		1/4	1/2
Djed-unuka	po majci	0			1/2	1/2	1/2	1/2	
	Baka-unuk							po ocu	0
Ujak/stric-nećakinja								po majci	1/4
	po ocu							1/2	1/2
Tetka-nećak	po majci							3/4	1/4
	po ocu							0	1
Polubrat-polusestra	po majci							1/2	1/2
	po ocu							0	1
Nesrodni				0		1			
Muškarac-muškarac									
Jednoajčani blizanci		1		-		0		1	0
Otac-sin		0		1		0		0	1
Braća		1/4		1/2		1/2		1/4	1/2
Djed-unuk	po majci	0			1/2	1/2	1/2	1/2	
	po ocu							0	1
Ujak/stric-nećak	po majci							1/4	3/4
	po ocu							0	1
Polubraća	po majci							1/2	1/2
	po ocu							0	1

Otac čak ne mora ni biti uključen u analizu, jer će se komparativnom analizom X-STR profila ustanoviti da majka i kćerka ili dijele iste parove X-STR markera (jedan majčin, jedan očev) ili kćerka ima dvije identične varijante X-STR markera, oba porijeklom od istog muškarca.

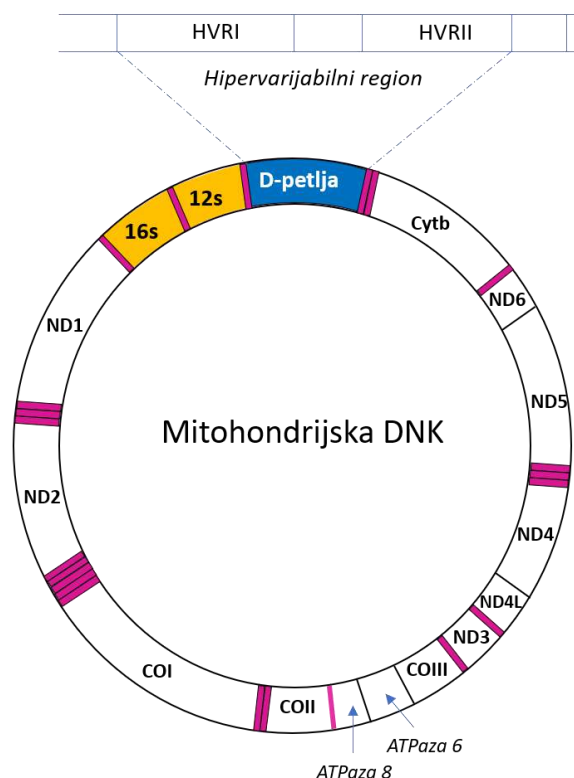
3.3.5 Mitohondrijska DNK

Mitohondrijska DNK (mtDNK) smještena je u mitohondrijama, ćelijskim organelama poznatim po svojoj funkciji oksidativne fosforilacije. Unutar jedne eukariotske ćelije nalazi se različit broj mitohondrija (zavisno od potrebe ćelije za energijom), a u svakoj od ćelija velik broj istovjetnih kopija mtDNK. Procjenjuje se da normalna oocita sadrži oko 100.000 kopija mtDNK. Somatske ćelije, zavisno od tipa i funkcije ćelije i tkiva, sadrže od dvjestotinjak do više od 1700 kopija ove male cirkularne molekule. Upravo ta brojnost molekula mtDNK u svakoj pojedinoj eukariotskoj ćeliji povećava vjerovatnoću njene uspješne izolacije i iz uzoraka u kojima se DNK, zbog vanjskih uslova, vremenom ubrzano raspada.

Humani mitohondriji sadrže cirkularni genom od 16.569 parova baza i 37 gena koji kodiraju različite proteine koji učestvuju u oksidativnoj fosforilaciji i ćelijskoj produkciji energije. Mitohondrijski genom (mitogenom) sadrži i 1.122 bazna para dug kontrolni region, koji ne sadrži aktivne gene (nekodirajući region), nego samo mjesto replikacije, zbog čega se naziva još i D-petlja (engl. *displacement loop* – *D-loop*) (slika 3.34). Ovaj region je i najpolimorniji te se najveći broj individualnih razlika nalazi upravo u njemu. Ovaj region se dijeli na dva hipervarijabilna regiona (koji se označavaju kao HV, HVR ili HVS): HVI i HVII.

Funkcija, mutacije, populacijska varijabilnost i nasljedni poremećaji mitohondrijskog genoma detaljno su istraženi te su poznate specifične delecije, udvostručenja i brojne tačkaste mutacije koje dovode do različitih specifičnih patofizioloških sindroma.

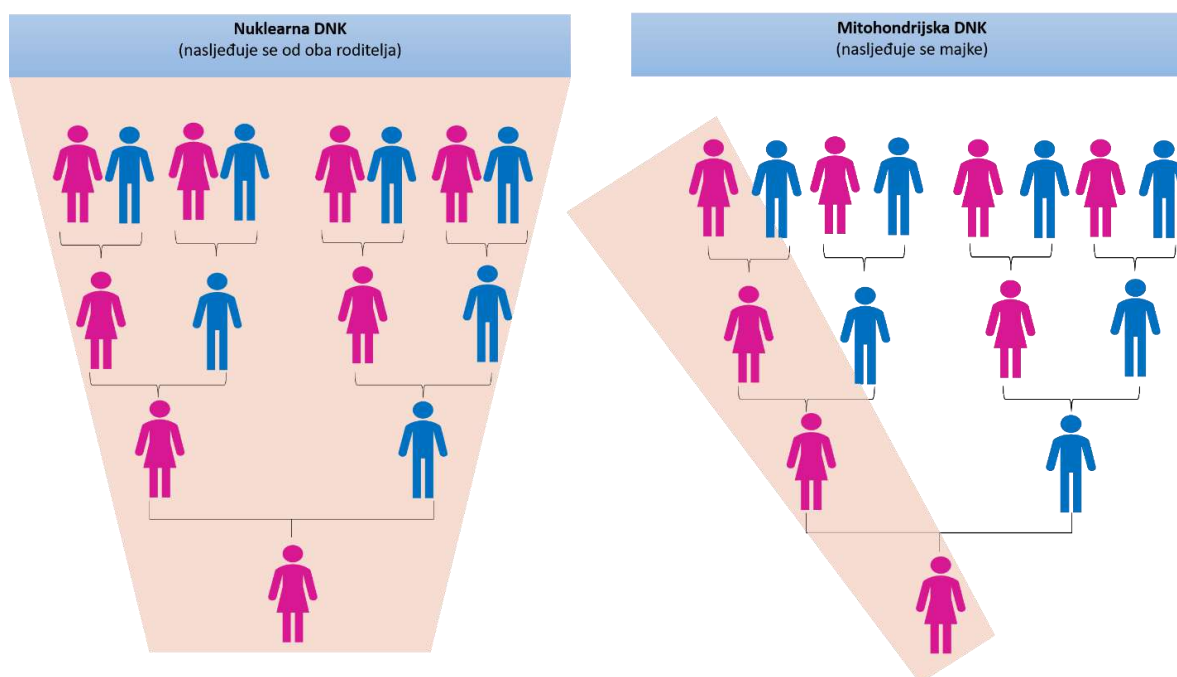
Jedna od bitnih osobina molekule mtDNK jeste i izostanak rekombinacije. Naime, kada se pojavi mutacija, ona se prenosi iz generacije u generaciju bez procesa reparacije ili rekombinacije unutar mitogenoma. Ipak, bitno je spomenuti da je u nekoliko studija potvrđeno da unutar mitogenoma dolazi do rekombinacija.



Slika 3.34. Mitogenom

Osnovna karakteristika nasljeđivanja mitohondrijske DNK je nasljeđivanje po majčinoj liniji: sva braća i sestre imaju slijed nukleotida mtDNK identičan onome koje ima njihova majka (slika 3.35). Razlog za takvu vrstu nasljeđivanja je što prije svega jajna ćelija ima nekoliko hiljada mitohondrija i stotine hiljada kopija mtDNK, a spermij svega nekoliko mitohondrija. Spajanjem citoplazmi spermija i jajne ćelije očigledno dolazi do dominacije mitohondrijskih molekula DNK majčinog porijekla u zigoti. Kao rezultat toga, mitogenom je samo i isključivo determinisan onim što je primio od jajne ćelije. Također, pretpostavlja se da postoje i neki specifični mehanizmi koji prepoznaju i uklanjaju očinsku mtDNK ako ipak dospije u citoplazmu zigote.

Sve do sada navedene osobine, a naročito priroda nasljeđivanja majčinom linijom, čine mtDNK unikatnim i učinkovitim oruđem za čestu primjenu u forenzičkoj DNK analizi, posebno u slučajevima kada je dostupna mala količina DNK ili se uzorak nalazi u degradiranom stanju pa se očekuje da će i molekula DNK biti fragmentirana.



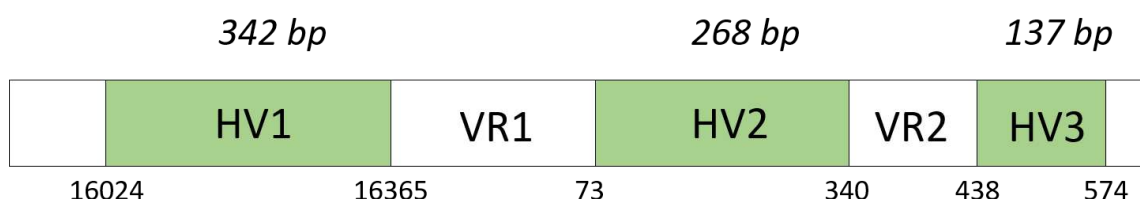
Slika 3.35. Nasljeđivanje autosomalnih i mtDNK gena

Postoje određene prednosti zbog kojih je analiza mitohondrijske DNK zaživjela kao metoda u praksi. Jedna od glavnih prednosti analize mtDNK je njena brojnost u svakoj ćeliji s aerobnim metabolizmom. Mitohondrije su brojnije u ćeliji u odnosu na jedro, a svaka mitohondrija sadrži od 1 do 15, a u prosjeku 5 molekula mtDNK. Osim toga, dijelovi mtDNK koji se analiziraju dugi su svega tristotinjak parova baza, što povećava vjerovatnoću uspješnoga “preživljavanja” ciljnog dijela molekule u uslovima kojima mogu biti izloženi uzorci koji trebaju biti analizirani. Također, molekula mtDNK je cirkularna, te je manje podložna djelovanju nukleaza, za razliku od linearne nukleusne DNK, čiji su krajevi slobodni pa samim tim i podložniji degradaciji.

Ipak, analiza ima i nekoliko nedostataka. Jedan od osnovnih je ograničena mogućnost pozitivne identifikacije. Analizom samo hipervarijabilnih regiona može se u slučaju podudarnosti teško sa sigurnošću utvrditi pozitivna identifikacija, a najviša vjerovatnoća koja se postiže kreće se oko 0,995. Razlog za to je činjenica da se, iako je varijabilnost ovih regiona velika, radi o vezanim regionima DNK te se sve mutacije nasljeđuju zajedno kao jedan lokus. Naime, uprkos povećanoj varijabilnosti HV regiona, u slučaju čestih haplotipova nije moguće razlikovati potječu li mtDNK profili od iste majčine linije ili od različitih majčinskih linija. Noviji pristup, kojim se povećava

diskriminativnost i vjerojatnoća pozitivnog nalaza, jest analiza većeg broja polimorfizama pojedinačnih nukleotida (SNP). Sekvenciranjem čitavog mitohondrijskog genoma uzima se u obzir svaki pojedini nukleotid, čime se povećava i vjerojatnoća podudaranja do maksimuma. Međutim, zbog složenosti i, za sada, visoke cijene analize, ova metoda još uvijek nije zaživjela u praksi. S obzirom na nisku varijabilnost, mitohondrijska DNK je znatno osjetljivija na kontaminaciju uzorka u odnosu na STR markere. Ovo je još jedan praktični nedostatak metode koji se može značajno umanjiti striktnim pridržavanjem laboratorijskih protokola.

Do pojave sekvenciranja nove generacije (NGS), tipična analiza mtDNK podrazumijevala je sekvenciranje *Sanger* metodom, koju je opisao Frederick Sanger (1918–2013). Metoda se zasniva na selektivnoj ugradnji dideoksinukleotida, prilikom čega dolazi do zaustavljanja sinteze lanca i stvaranja fragmenata različitih veličina koji se potom razdvajaju metodom kapilarne elektroforeze. Nakon PCR amplifikacije HV1 i HV2 regiona, slijedi sekvenciranje i analiza dobijenih sekvenci HV1 (324 bp) i HV2 (268 bp) za svaki uzorak (slika 3.36). Naredni korak je poređenje sekvenci s revidiranom *Cambridge* referentnom sekvencom (engl. *Revised Cambridge Reference Sequence – rCRS*) koja se još naziva i Andersonova sekvenca po autoru koji je sa saradnicima 1981. godine prvi put sekvencirao ljudsku mtDNK.



Slika 3.36. Kontrolni region mtDNK

Ova sekvenca je resekvincirana 1999. godine od strane *Andrewsa* i saradnika i predstavlja revidiranu Andersonovu sekvencu koja se danas koristi kao standard za komparaciju s analiziranim HV1 i HV2 sekvencama. Rezultat sekvenciranja je mtDNK profil (haplotip) u kojem su naznačene razlike (zamjene nukleotida, delecije ili insercije) u odnosu na rCRS. Razlike se označavaju korištenjem standardizirane nomenklature koju je kroz svoje preporuke 2019. godine objavila Naučna radna skupina za metode analize DNK (engl. *Scientific Working Group on DNA Analysis*

Methods – SWGDAM), uz raniju preporuku Međunarodnog društva za forenzičku genetiku (engl. *International Society for Forensic Genetics* – ISFG). Ove smjernice forenzičkoj zajednici osiguravaju dosljednost izvještavanja o dobijenim rezultatima, čime je olakšana i usporedba, tj. interpretacija rezultata u kontekstu nekog forenzičkog slučaja.

Pored HV1 i HV2, može se analizirati i treći hipervarijabilni region (HV3), koji je dug 137 bp, što je ponekad ključno za utvrđivanje razlika među uzorcima koje nisu detektovane analizom regiona HV1 i HV2. Uvođenje tehnologije nove generacije sekvenciranja (NGS) olakšalo je analizu kompletnog mitohondrijskog genoma forenzički relevantnih uzoraka, a dodatna prednost takve analize je što je moguće detektovati i mutacije izvan kontrolnog regiona. Upotreba NGS-a za analizu mtDNK omogućila je različite pristupe analize: korištenje midi i mini strategija umnožavanja za analizu cijelog genoma mtDNK, analizu polimorfizama u jednom nukleotidu (SNP multipleksi) i korištenje metoda “hvatanja” DNK (primjenom dužih prajmera i hibridizacije proba). Takvim pristupima omogućena je analiza jako degradiranih uzoraka te je povećana diskriminatorsna snaga rezultata.

Postoji nekoliko faktora koji mogu zakomplikovati interpretaciju rezultata analize mtDNK. Najznačajnija je heteroplazmija, koja predstavlja pojavu različitih molekula mtDNK kod jedne osobe. Pri tome, dvije ili više različitih molekula mtDNK se javljaju unutar jedne ćelije ili unutar jedne mitohondrije. Štaviše, smatra se da sve osobe imaju heteroplazmatične ćelije, ali to ne utiče značajno na analizu jer se većina heteroplazmija uglavnom ne detektuje. Zbog toga je preporuka da se kao heteroplazmija interpretiraju one varijante čija je učestalost veća od 20%. Heteroplazmija se javlja uslijed grešaka tokom replikacije i tačkastih mutacija, što rezultira promjenom slijeda ili dužine slijeda. Do promjene dužine slijeda dolazi najčešće u homopolimernim regionima HV1 i HV2 koji su bogati citozinom. Heteroplazmija se najčešće detektuje pojavom dva nukleotida (pika) na jednoj poziciji.

Naredni problem prilikom interpretacije rezultata analize mtDNK je interpretacija miješanih tragova. Naime, kod miješanih uzoraka, dobijeni elektroferogrami su veoma zahtjevni za interpretaciju i izuzetno je teško razlikovati više individualnih haplotipova.

I konačno, jedan od najvećih problema prilikom interpretacije rezultata mtDNK je što su pojedini haplotipovi veoma učestali u nekoj populaciji, što značajno otežava interpretaciju rezultata mtDNK u forenzičkim istražnim postupcima, jer je ponekad nemoguće isključiti više osoba kao potencijalne počinioce zločina. Ovaj problem se pokušava prevazići sekvenciranjem kompletnog mitogenoma, pri čemu i dalje nije moguće napraviti razliku između srodnika po majčinoj liniji.

3.3.5.1 Mitohondrijske haplogrupe

Skup mitohondrijskih haplotipova čije varijante ukazuju na vjerovatno zajedničko porijeklo čine određenu mitohondrijsku haplogrupu. Iako su se u početku analizirale korištenjem restrikcijskih enzima koji daju fragmente koje je moguće razvrstati u glavne haplogrupe, danas se analiza mt-haplogrupa zasniva na analizi polimorfizama HV regiona mtDNK, kao i kompletnog mitogenoma. Sve mt-haplogrupe označene su velikim slovima od A do Z (tabela 3.5).

Za razliku od Y-haplogrupa koje su naziv dobijale na osnovu vremena pojavljivanja, mt-haplogrupe su dobijale naziv po redoslijedu po kojem su otkrivene. Tako je prva otkrivena haplogrupa A, čija se starost procjenjuje na oko 30.000–40.000 godina, dok je najstarija haplogrupa L, za koju se smatra da se pojavila prije oko 100.000–230.000 godina na istoku Afrike. Ona se još naziva i mitohondrijska Eva jer se smatra najvjerovatnijim zajedničkim pretkom (engl. *Most Recent Common Ancestor* – MRCA) od koje su nastale sve ostale današnje mt-haplogrupe. Od haplogrupe L su se odvojile tri makrohaplogrupe (M, N i R) od kojih vode porijeklo sve ostale današnje haplogrupe.

Danas se za gotovo svaku svjetsku populaciju zna sastav i frekvencija pojedinih haplogrupa. Tako su na evropskom kontinentu najzastupljenije mt-haplogrupe H, I, J, K, T, U, W i X, ali je učestalost pojavljivanja specifična za svaku evropsku populaciju. U Bosni i Hercegovini je najzastupljenija mt-haplogrupa H (oko 48%), nakon koje slijedi mt-haplogrupa U (oko 20%), J (oko 7%) dok ostalih 25% otpada na rjeđe zastupljene mt-haplogrupe (V, T, K, I, W i X).

Haplogrupa H najvjerovatnije vodi porijeklo od makrohaplogrupe R, od koje se odvojila prije više od 25.000 godina. Smatra se da dolazi s Bliskog Istoka, a da je u Evropu stigla prije oko 20.000 godina. Ovu haplogrupu je imalo 19% neolitskih evropskih farmara, dok je u vrlo maloj frekvenciji bila prisutna kod mezolitskih evropskih lovaca skupljača.

Tabela 3.5. Osnovne mt-haplogrupe sa procijenjenom starosti, mogućim mjestom porijekla te rasprostranjenosti u modernoj ljudskoj populaciji

mt-haplogrupa	Procijenjena starost (godine)	Moguće mjesto porijekla	Najveća rasprostranjenost
A	10.000–40.000	Azija	Azija, Aljaska, Grenland
B	~50.000	južna Azija	jugoistočna Azija, Amerika (starosjedioci)
C	~36.500	centralna Azija	sjeveroistočna Azija, Amerika
D	40.000–60.000	istočna Azija	Amerika, Azija
E	8.000–35.000	Borneo ili Fuijan	morski dio jugoistočne Azije
F	~43.500	Azija	istočna Azija
G	~35.700	istočna Azija	istočna Azija
H	20.000–25.000	zapadna Azija (najvjerojatnije Kavkaz)	Evropa, sjeverna Afrika, Bliski Istok
I	Oko 21.000	zapadna ili jugozapadna Azija	istočna Afrika, Evropa, zapadna i južna Azija
J	~45.000	bliski Istok, Kavkaz	bliski Istok, Evropa, Kavkaz, sjeveroistočna Afrika
K	4.300–26.700	zapadna Azija	centralna, južna, sjeverna Evropa, Somalijsko poluostrvo, južna i zapadna Azija
L	150.000–230.000	istočna Afrika	supraharska Afrika, južna, sjeverna i zapadna Afrika, Amerika
M	55.000–65.000	južna, jugozapadna, jugoistočna Azija ili istočna Afrika	Azija
N	50.000–65.000	Azija ili istočna Afrika	Evropa, Azija, Amerika
P	~50.000	jugoistočna Azija	Okeanija
Q	~50.000	Okeanija	Pacifički obruč, Australija (starosjedioci)
R	14.500–70.000	južna, jugoistočna Azija	Australazija, Amerika, Azija, sjeverna Afrika, Somalijsko poluostrvo
S	47.000–64.000	Australija	Australija
T	4.500–25.000	Bliski istok i/ili Kavkaz	zapadna i centralna Azija, Evropa
U	3.300–46.000	zapadna Azija, Kavkaz	zapadna Euroazija, sjeverna Afrika i južna Azija
V	~14.000	Bliski istok, zapadna Azija, Anadolija	sjeverozapadna Afrika
W	~24.000	zapadna Azija	Evropa, zapadna i južna Azija
X	20.000–40.000	Azija ili istočna Afrika	Amerika, Evropa, zapadna Azija, Sjeverna Amerika
Y	12.000–33.000	sjeveroistočna Azija	istočna Azija
Z	22.000–34.000	centralna Azija	istočna i centralna Azija

Haplogrupa U je jedna od najstarijih haplogrupa, pojavila se prije oko 46.000 godina, najvjerojatnije negdje u zapadnoj Aziji. Skeletni ostatak star oko 45.000 godina, pronađen na prostoru zapadnog Sibira, pripadao je ovoj haplogrupi. Smatra se da je u Evropu došla prije neolitskih farmera, prije oko 9.000 godina. Danas oko 11% starosjedilaca Evrope ima ovu haplogrupu, a u BiH je druga najzastupljenija (19%).

Mitohondrijska DNK *haplogrupa J* vodi porijeklo od haplogrupe JT, od koje se odvojila prije oko 45.000 godina, mutacijom koja se dogodila kod ženske osobe koja je živjela na Bliskom Istoku ili na Kavkazu. Predstavlja marker genskog toka koji je neolitskim ekspanzijama stigao u Evropu s Bliskog Istoka. Do kraja posljednjeg ledenog perioda (prije oko 12.000 godina), haplogrupa J se razgranala u sedam glavnih potklasa. Danas je u najvišim frekvencijama zastupljena u sjevernoj, sjeveroistočnoj Evropi, Srednjem Istoku i među nekim etničkim skupinama na području Kavkaza. Haplogrupa J pronađena je među mumijama drevnih Egipćana (iz perioda Novog egipatskog kraljevstva, između 16. i 11. vijeka prije nove ere) pronađenim na arheološkom lokalitetu Abusir el-Meleq na području srednjeg Egipta.

3.3.6 Izazovi u forenzičkoj analizi STR markera

Prilikom analize bioloških tragova s mjesta zločina istraživači se vrlo često susreću s različitim izazovima, koji se uglavnom odnose na malu količinu tragova i degradirani biološki materijal. Štaviše, na mjestu zločina mnogo su češći ovakvi tragovi, koji su izazovniji za analizu DNK od tragova koji sadrže velike količine DNK. Faktor vremena i okolišni uticaji ključni su za uspješnost analize, ali je čak i iz uzoraka koji dugo stoje i koji su bili izloženi raznim uslovima spoljašnje sredine moguće dobiti upotrebljive, pa čak i potpune DNK profile. Analiza degradirane molekule DNK, miješani tragovi, prisustvo inhibitora PCR reakcije u uzorku, kao i mutacije predstavljaju najčešće izazove u interpretaciji rezultata molekularnogenetičkih analiza bioloških tragova.

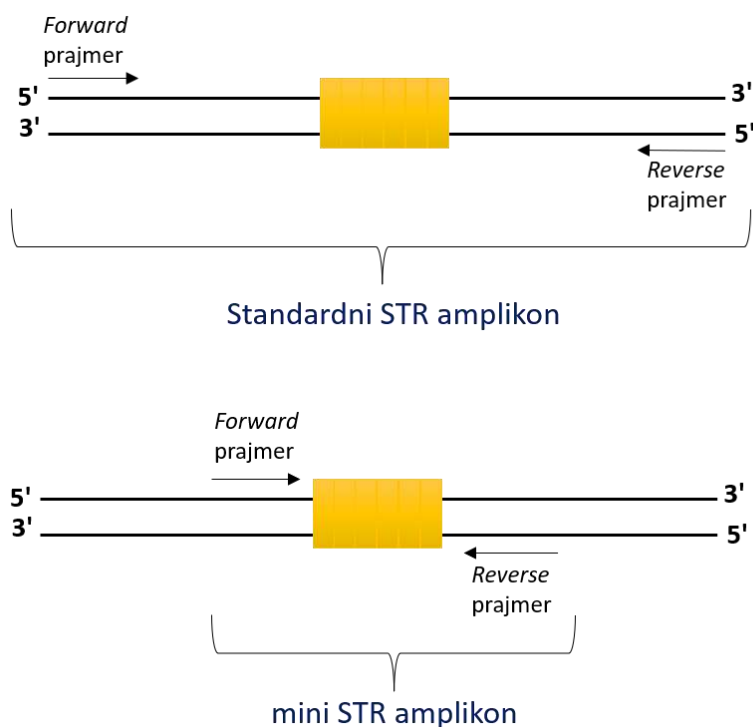
3.3.6.1 Analiza degradirane molekule DNK

Degradacija bioloških tkiva (autoliza) i molekula započinje čim nastupi smrt. Djelovanjem hidrolitičkih enzima razgrađuju se sve velike biomolekule, nakon čega, pod djelovanjem endonukleaza, dolazi i do fragmentacije molekula DNK. Enzimi nukleaze kataliziraju hidrolizu fosfodieterske veze u nukleotidima, pri čemu nastaju oligonukleotidni i mononukleotidni

fragmenti molekule DNK. Nakon smrti, molekula DNK je izložena i djelovanju egzonukleaza, porijeklom od mikroorganizama i nekih invertebrata iz spoljašnje sredine. Dodatno, egzogeni faktori poput vode i toplote ubrzavaju destrukciju tkiva i degradaciju molekule DNK. Tako je u uslovima visoke temperature i vlažnosti degradacija molekula DNK znatno brža nego u hladnim i suhim uslovima. Konačan rezultat destruktivnih autolitičkih procesa i različitih faktora spoljašnje sredine, kojima je izložena molekula DNK nakon smrti, jest fragmentacija molekule DNK, tj. cijepanje molekule na manje dijelove.

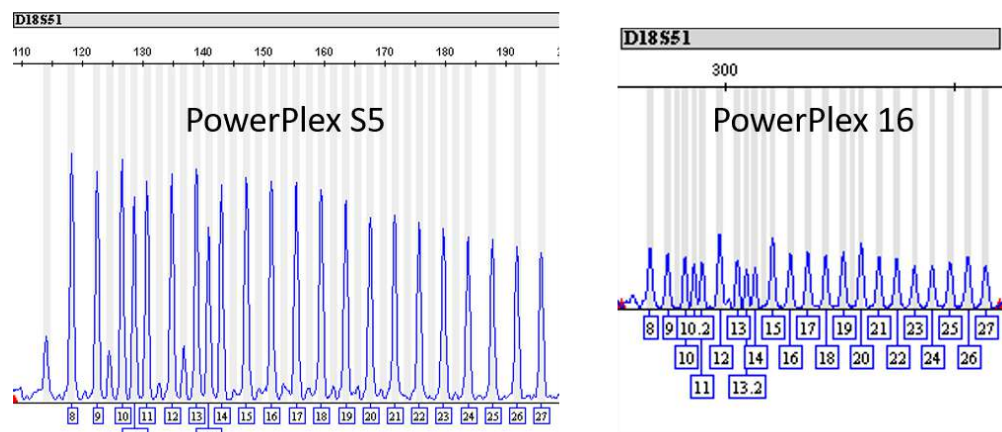
Uspješnost forenzičke analize fragmentirane molekule DNK postala je značajno veća s upotrebom STR markera. Prijašnje analize zasnovane na primjeni minisatelitnih markera (VNTR) nisu mogle biti primjenljive ako je molekula DNK bila fragmentirana ili su za analizu bile dostupne male količine DNK. Kao što je već rečeno, minisatelitni markeri sadrže velike ponavljajuće fragmente (20–100 bp) pa se primjenom ovih markera mogu detektovati samo velike količine DNK.

Poznato je da se za uspješnu analizu *forward* i *reverse* prajmeri moraju vezati za fragment DNK koji će se amplificirati. S obzirom na to da su ovi fragmenti kod VNTR markera veliki, a degradirana DNK je fragmentirana, često se dešava da izostaje PCR amplifikacija upravo zbog toga što se prekid dogodio na lokaciji vezivanja prajmera na VNTR markere. Kako su STR markeri manji (<10 bp) u odnosu na VNTR markere (>100 bp), to je veća uspješnost analize fragmentirane DNK primjenom STR markera. Također, analiza STR markera je uspješna za količine DNK manje od 1 ng, dok je za analizu VNTR markera neophodna količina 100 ng i više. Ipak, STR markeri u analizi degradirane molekule DNK nisu apsolutno učinkoviti. Zbog male količine DNK na generiranim DNK profilima i dalje se očekuje pojava učestalog ispadanja alela. Veličina markera i ovdje ima značajnu ulogu pa je na većim STR lokusima (koji imaju više od 300 bp) učestalija pojava ispadanja alela. To su lokusi Penti E, Penta D, TPOX i CSF1PO. S druge strane, na manjim lokusima (100–300 bp) kao što su D5S818, TH01, vWA, manja je vjerovatnoća da će doći do ispadanja alela. Ovaj problem je moguće prevazići upotrebom *miniSTR* setova koji sadrže STR markere reducirane veličine. Smanjivanje veličine markera postiže se pomjeranjem mjesta vezivanja PCR prajmera za nekoliko pozicija bliže ponavljajućem regionu STR markera (slika 3.37).



Slika 3.37. Redukcija veličine STR markera: a – standardni STR marker, b – STR marker reducirane veličine – mini STR marker

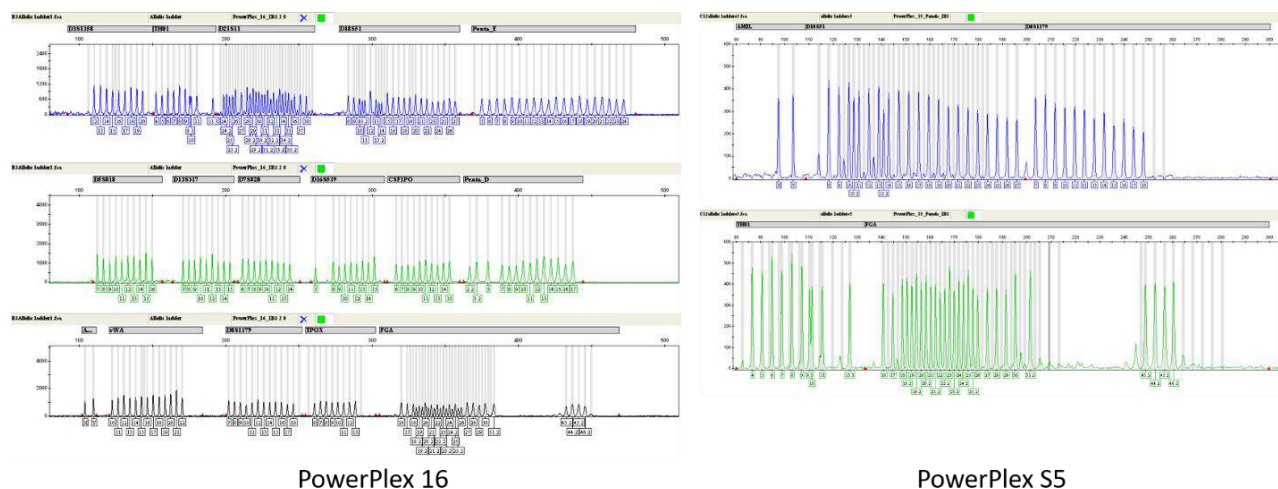
Na taj način ukupna veličina STR markera smanji se za i do nekoliko stotina baznih parova. Na primjer, veličina STR markera D18S51 iznosi 290–366 bp, dok veličina njegove “mini verzije” iznosi 123–199 bp (slika 3.38).



Slika 3.38. Uporedni prikaz veličine lokusa D18S51 u mini STR setu (PowerPlex S5) i standardnom multipleksnom setu (PowerPlex 16), gdje je jasno uočljivo smanjenje STR markera za više od 100 bp

Ipak, forenzička analiza fragmentirane molekule DNK korištenjem mini STR setova ima nekoliko nedostataka. Najveći je da se samo nekoliko STR lokusa može simultano amplificirati u ovim setovima. Smanjivanje veličine standardnog STR markera podrazumijeva pomjeranje mjesta vezivanja prajmera koji su kod mini STR markera bliže ponavljajućem regionu. Zbog toga se smanjuje broj lokusa koji se mogu analizirati u jednoj boji jer se veličina svih mini STR lokusa kreće od oko 100 do 200 bp.

Dakle, iako neki *megapleks* sadrži veći broj STR markera, njegov korespondentni *minipleks* će imati značajno manji broj markera (slika 3.39) kako bi se izbjeglo preklapanje STR markera. Drugi problem je što može doći do pojave ispadanja alela kao rezultat mutacija koje mogu da pogode fragment molekule DNK izvan mjesta vezivanja prajmera. Tada dolazi ili do odsustva detekcije alelne varijante ili do detekcije drugačije alelne varijante. U takvim slučajevima provode se studije konkordantnosti između minipleksa i megapleksa, kojima se dokazuje sporna alelna varijanta.



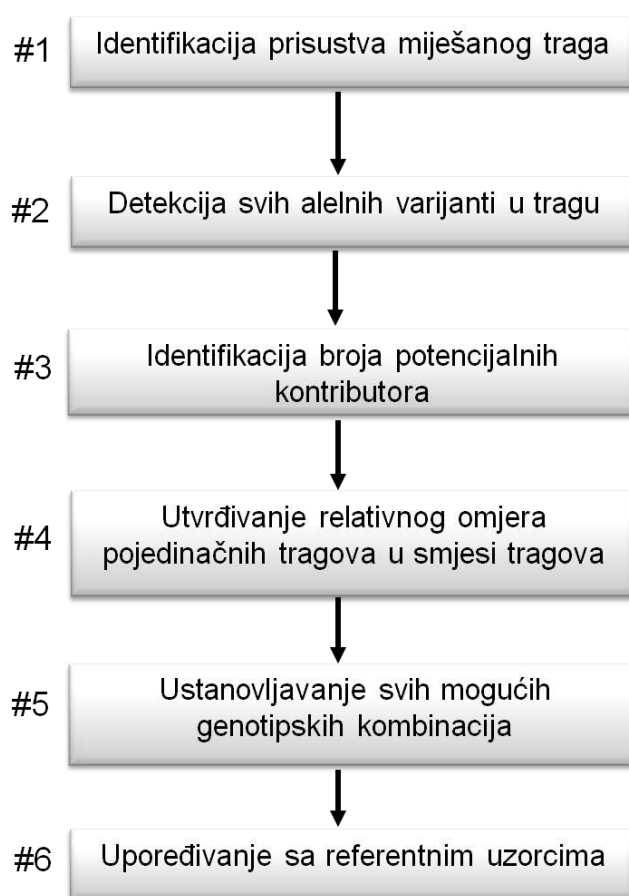
Slika 3.39. Razlika u broju STR lokusa u standardnom STR setu (PowerPlex 16) koji sadrži 16 lokusa i mini STR verziji (PowerPlex S5) koja sadrži 5 lokusa

3.3.6.2 Miješani DNK profili

Miješani DNK profili sadrže alelne varijante dvije ili više osoba. Nastaju kao rezultat kontaminacije uzoraka uslijed slučajnog transfera “strane” DNK, koji se može desiti:

- u toku zločina (jedna ili više žrtava, jedan ili više počinitelja, odnos žrtva – počinitelj),

kontaminaciju malim koncentracijama DNK. Prisustvo smjese nastale tokom laboratorijskog rada dokazuje se *negativnim kontrolama*, koje se postavljaju tokom postupka izolacije DNK (negativna ekstrakcijska kontrola) i prilikom postavljanja PCR reakcije (negativna PCR kontrola). Negativne kontrole se pripremaju na isti način kao i za uzorke, samo što se u njima ne dodaju uzorci. Za negativnu PCR kontrolu, umjesto rastvora DNK, u tubicu se dodaje ista količina sterilne vode. Prilikom interpretacije miješanih DNK profila neophodno je slijediti šemu koju su 1998. godine predložili *Clyton* i saradnici (slika 3.41).

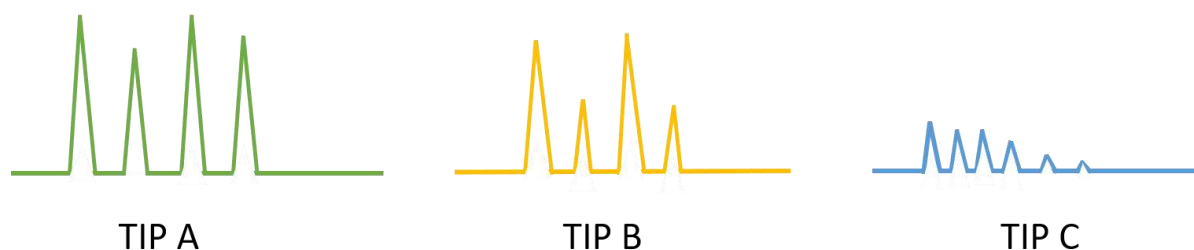


Slika 3.41. Šematski prikaz koraka u analizi miješanih tragova prema Clyton i sar.

Prije samog početka analize miješanog traga, neophodno je isključiti postojanje artefakata koji mogu navesti na pogrešan zaključak da se radi o miješanom profilu. To se prije svega odnosi na potvrđene zaostajuće pikove, nul-alele i trialelne varijante koje nastaju kao rezultat hromosomskih aberacija (npr. trisomija) ili duplikacije regiona hromosoma.

Zaostajući pikovi predstavljaju poseban izazov u analizi miješanih tragova, posebno ako se radi o malim količinama molekula DNK. Tada je češća pojava uvećanih zaostajućih pikova koji se lako mogu zamijeniti za stvarne alelne varijante. Također, prilikom analize potrebno je isključiti produkte nespecifične amplifikacije kao uzrok pojave dodatnih pikova na lokusu. Oni nastaju kao rezultat različitih fizičko-hemijskih pojava koje nastaju u toku detekcije fluorescencije. Tek kada se svi artefakti isključe kao uzrok detekcije više od dva alela na lokusima, pristupa se analizi miješanog DNK profila.

Naredni korak je određivanje broja potencijalnih kontributora u smjesi tragova. Ako miješani trag čine dva kontributora, onda je maksimalan broj pikova koji se mogu detektovati na STR lokusu četiri, ako su obje osobe heterozigoti. Više od četiri detektovana pika na jednom STR lokusu čini *kompleksni miješani DNK profil*, koji čine više od dvije osobe. Ovaj tip miješanog profila mnogo je teži za analizu, ali i nešto rjeđi u forenzičkoj praksi. Miješani tragovi se razlikuju zavisno od odnosa visina pikova u smjesi. Dokazano je da se količine molekula DNK u smjesi zadržavaju tokom PCR amplifikacije, pa omjer veličine i visine pikova na elektroferogramu u većini slučajeva može predstavljati omjer količina molekula DNK u smjesi. Prilikom analize elektroferograma razlikujemo dva tipa miješanog traga: tip A i tip B, dok se tip C ponekad može pogrešno interpretirati kao miješani trag, a ustvari predstavlja DNK profil uzorka koji sadrži veoma malu količinu DNK (slika 3.42). Dodatni pikovi, detektovani na elektroferogramima tipa C, nastaju kao rezultat slučajnih događaja (stohastičkog efekta) tokom amplifikacije, kao što su: uvećani stateri, nul-aleli i produkti nespecifične amplifikacije.



Slika 3.42. Šematski prikaz različitih tipova miješanog DNK profila

Smjesa tipa A sadrži pikove iste visine (omjer 1 : 1) i u ovom tipu smjese nije moguće odrediti glavnog donora genetičkog materijala. Analiza ovog tipa smjese nešto je zahtjevnija u odnosu na smjesu tipa B, gdje se razlikuje glavni od slabijeg kontributora u smjesi. Prilikom analize smjese tipa A, neophodno je prvo analizirati lokuse na kojima se detektuje najveći broj pikova (alelnih varijanti) pa tek onda lokuse s manjim brojem detektovanih pikova. Ako se na lokusu detektuju tri alelne varijante za dva donora (A, B i C), mogućih je šest različitih kombinacija genotipova (AA i BC, BB i AC, CC i AB, AB i AC, BC i AC, AB i BC).

Međutim, ako su na jednom lokusu detektovane četiri alelne varijante (A, B, C i D), onda su, pod pretpostavkom da se radi o dva kontributora smjese, moguće samo četiri kombinacije genotipa: AB i CD, AC i BD, AD i BC. S druge strane, u smjesama gdje su detektovane samo dvije alelne varijante, genotipovi mogu sadržavati homozigotne varijante (AA ili BB) i/ili istu heterozigotnu varijantu AB.

Završni korak u analizi DNK profila miješanih tragova je uspoređivanje dobijenih genotipova s referentnim uzorcima. Ako se pokaže da se referentni uzorak osumnjičenog poklapa s pikovima kontributora smjese na analiziranom DNK profilu, onda se ta osoba ne može isključiti kao potencijalni kontributor DNK profila u miješanom tragu.

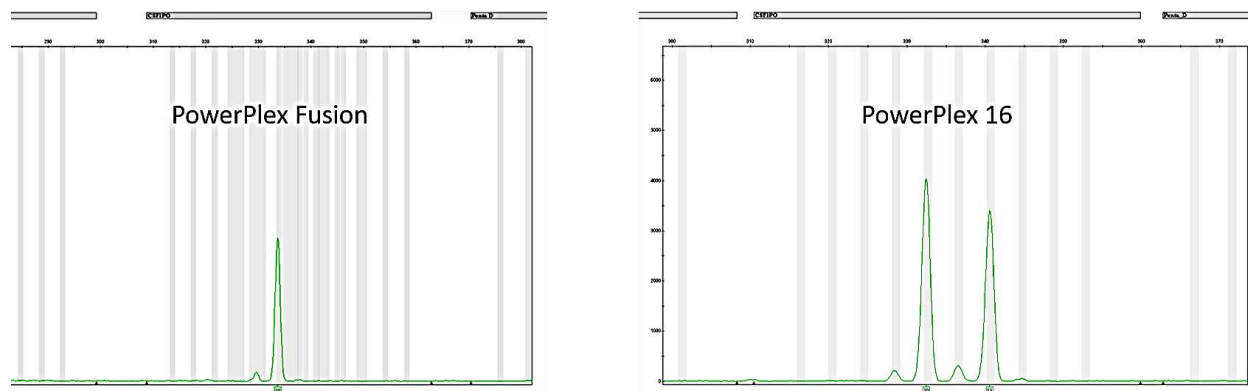
Prilikom analize miješanih tragova, amelogenin je posebno informativan marker za procjenu broja muških i ženskih kontributora. Konkretno, procjenom odnosa amplificiranih X i Y pikova moguće je procijeniti broj mogućih kontributora. Tako je omjer visine pikova srazmjeran broju X i Y-hromosoma. Na primjer, ako je u smjesi 10 ženskih osoba i jedna muška, onda je omjer 21 : 1 jer je broj X-hromosoma $(10 \times 2) + 1$ od muškarca i 1 Y-hromosom. Ako je u smjesi jedan ženski kontributor i više muških, onda je omjer nešto niži jer se s povećanjem broja muških kontributora povećava i broj X-hromosoma. Tako će, na primjer, u smjesi gdje su kontributor jedna ženska i 20 muških osoba omjer biti 1,1 : 1 jer imamo $2 + 20$ X-hromosoma i 20 Y-hromosoma. U ovakvim slučajevima omjer je veći što je broj kontributora manji pa je za 1 žensku i dvije muške osobe omjer 2 : 1.

Generalno, u slučajevima miješanih tragova preporučljivo je uraditi analizu spolno vezanih markera, a posebno Y-STR markera, na osnovu kojih je moguće dobiti jasne rezultate u slučajevima kada smjesa sadrži jednu mušku i jednu žensku frakciju.

3.3.6.3 Analiza malih količina DNK

Analiza malih količina DNK predstavlja poseban izazov u forenzičkoj analizi. Za malu količinu DNK u uzorku u literaturi se navode skraćenice LCN DNA (engl. *Low Copy Number DNA*) ili LT DNA (engl. *Low Template DNA*). Osim navedenih, upotrebljava se i pojam kontaktna DNK (engl. *touch DNA*), međutim ovaj pojam bi se trebao koristiti za kontaktne tragove koji ne moraju nužno sadržavati male količine DNK (npr. otisak krvi nastao direktnim kontaktom krvavoga dijela tijela s površinom). S druge strane, veliki broj tragova s mjesta zločina sadrži male količine molekule DNK iako nisu kontaktni tragovi (npr. kosti lobanje, izrazito male količine krvi koje se dokazuju luminolom i dr.).

Analiza malih količina DNK odnosi se na analizu tragova koji sadrže količine DNK manje od 200 pg (optimalna količina DNK je od 200 pg do 3 ng). Analiza malih količina DNK ima nekoliko slabih tačaka. Kao prvo, veća je vjerojatnoća pojave greške u odnosu na analizu dovoljnih količina DNK. Osim toga, češće se javljaju greške u interpretaciji rezultata koje nastaju uslijed umetanja ili ispadanja alela (slika 3.43), neizbalansiranosti pikova i pojave uvećanih *stuttera*.



Slika 3.43. Primjer ispadanja alela. Primjenom PowerPlex Fusion seta na lokusu *CSF1PO* detektovan je samo jedan pik koji predstavlja alelnu varijantu 10. U ponovljenoj reakciji s PowerPlex 16 setom na istom lokusu detektovana je i alelna varijanta 12.

Dodatno, zbog male količine DNK najčešće nije moguće ponoviti analizu, što onemogućava provjeru dobijenih rezultata. Interpretacija miješanih profila koji sadrže male količine DNK je posebno problematična. Za analizu ovakvih uzoraka ne postoje ni opisane procedure, kao ni

validacijske studije, što dodatno otežava interpretaciju rezultata. Osim toga, analiza malih količina DNK posebno je osjetljiva na kontaminaciju, jer čak i vrlo male količine strane DNK mogu dodatno zakomplikovati interpretaciju rezultata. Zbog svega navedenog, tragovi koji sadrže male količine DNK ne mogu biti korišteni na sudu kao oslobađajući dokaz.

Međutim, često su tragovi s malim količinama DNK krucijalni za rješavanje zločina pa je dobijanje reproducibilnog rezultata i DNK profila koji se može pouzdano interpretirati od ključnog značaja. Neke od strategija su:

- a) Povećanje broja ciklusa PCR reakcije – npr. standardnih 28 ciklusa potrebno je povećati na 31–34 ciklusa;
- b) Primjena *nested* PCR – to je modificirani PCR koji uključuje dvije amplifikacije: prvu u kojoj je matrica genomska DNK i drugu u kojoj je matrica PCR produkt prve reakcije;
- c) Smanjenje volumena reakcije, kako bi se dobio koncentriraniji produkt PCR-a;
- d) Dodatno pročišćavanje (purifikacija) produkta PCR;
- e) Modifikacija jednog ili više segmenata fragmentalne analize (povećanje vremena injektiranja uzorka, pojačavanje fluorescentnog signala, korištenje formamida niže provodljivosti);
- f) Optimizacija protokola izolacije DNK.

I pored primjene neke od navedenih strategija za dobijanje kvalitetnih DNK profila tragova koji sadrže male količine DNK, veoma je važno da su rezultati analize reproducibilni (ponovljivi). Sve ovo navodi na zaključak da je uvijek neophodno uraditi dvije amplifikacije molekule DNK istog uzorka (traga), s ključnim pravilom da se očitani pik na elektroferogramu ne može smatrati alelnom varijantom ako se ne prikaže i na elektroferogramu ponovljene analize.

3.3.6.4 *Inhibitori*

Inhibitori su komponente koje na tri načina utiču na analizu DNK: 1. remete lizu ćelije tokom postupka izolacije DNK, 2. razlažu nukleinske kiseline ili zaustavljaju njihovu izolaciju i 3. sprečavaju enzimatsku amplifikaciju ciljanog regiona DNK na način da zaustavljaju aktivnost enzima polimeraza. Inhibitori su široko rasprostranjeni u spoljašnjoj sredini (ioni kalcija, metali,

huminska i fulvične kiseline (iz humusa)), ali i neke endogene komponente mogu inhibirati PCR reakciju. Takvi su, na primjer, hemoglobin, heparin, fenoli i flavonidi, žučne soli i dr. (tabela 3.6). Rezultat amplifikacije uzorka koji sadrži inhibitore ogleda se u DNK profilima na kojima nedostaju jedan ili više pikova na pojedinačnim lokusima ili čak na svim analiziranim lokusima. Takvi DNK profili izgledaju vrlo slično DNK profilima degradiranih uzoraka.

Kako bi se razlikovalo da li se radi o uzorku koji sadrži degradiranu molekulu DNK ili inhibitore, moguće je uraditi kvantifikacijsku analizu korištenjem metode zasnovane na 5' nukleaznoj ili *TaqMan*[®] tehnologiji (opisane u dijelu Detekcija količine izolovane DNK).

Tabela 3.6. Najčešće inhibitorske komponente i neki od njihovih mehanizama djelovanja

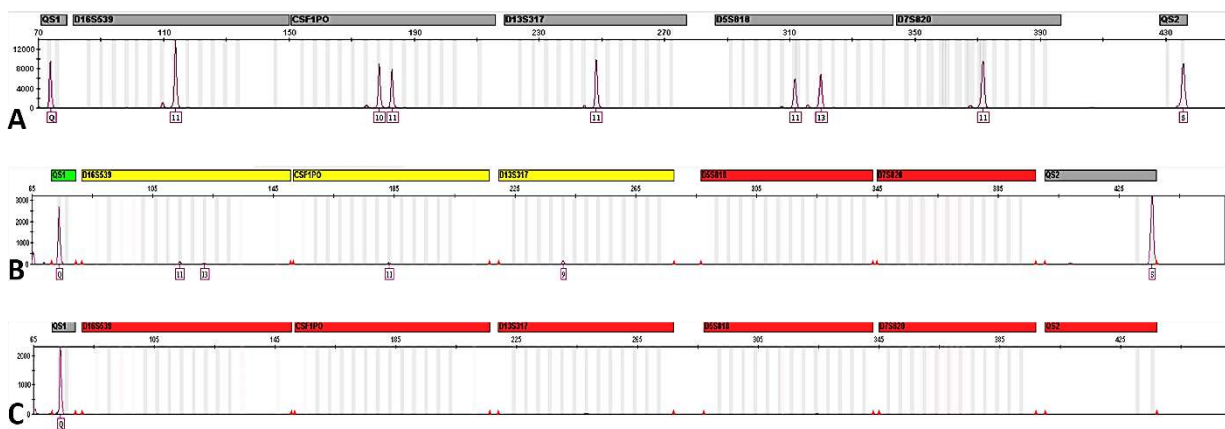
Inhibitor	Mehanizam djelovanja
Polifenoli i polisaharidi	Koprecipitacija s nukleinskim kiselinama; smanjenje mogućnosti resuspenzije istaložene RNK; promjene u hemijskim osobinama nukleinskih kiselina
Bakterije	Degradacija / odvajanje nukleinskih kiselina
Huminska kiselina	Adsorpcija nukleinskih kiselina
Hematin	Inhibicija denaturacije DNK
Metalni ioni	Smanjenje afiniteta prajmera za specifično vezivanje
Kalcijevi ioni	Inhibicija aktivnosti DNK polimeraze ili aktivnosti reverzne transkriptaze
Deterdženti	Degradacija DNK polimeraze
EDTA	Heliranje metalnih iona, uključujući i magnezijeve ione

Kao što je već rečeno, ovi kvantifikacijski setovi sadrže interne PCR kontrole (IPC), koje dokazuju inhibitore u reakciji. Uslijed djelovanja inhibitora PCR reakcije dolazi do degradacije komponente IPC, što ukazuje na činjenicu da je mala količina ili odsustvo detekcije DNK rezultat prisustva inhibitora. Međutim, ako se komponenta IPC amplificira, dokazuje se odsustvo inhibitora, a dobijeni parcijalni DNK profili rezultat su degradirane molekule DNK. Neke kompanije su kreirale amplifikacijske STR setove koje sadrže interne kontrole čije odsustvo na DNK profilu ukazuje na prisustvo inhibitora, čime je značajno pojednostavljena i olakšana detekcija inhibitora u parcijalnim DNK profilima (slika 3.44).

Ako uzorak sadrži inhibitore, moguće je problem riješiti na jedan od sljedećih načina:

- razblaživanjem izolata genomske DNK, što će rezultirati smanjenjem koncentracije inhibitora, nakon čega se ponavlja amplifikacija;
- purificiranjem izolata genomske DNK prije amplifikacije korištenjem specijalnih filtera (*Centricon 100* i *Microcon 100*) i
- korištenjem mini STR amplifikacijskih setova.

Neki autori preporučuju dodavanje većih količina enzima DNK polimeraze u PCR, jer se polimeraza vezuje za neke inhibitorske molekule i na taj način ih uklanja iz reakcije. Također, istraživanja su pokazala da dodavanje albumina goveđeg seruma ili betaina minimizira inhibiciju PCR reakcije.



Slika 3.44. U posljednjem panelu amplifikacijskog seta Investigator® 24plex QS sadržane su interne kontrole (Q i S) čije prisustvo ukazuje na uspješnu amplifikaciju: A – detekcija obje interne kontrole i generirani puni DNK profil, B – detekcija obje interne kontrole i generiran parcijalni DNK profil (mala količina DNK), C – detekcija samo jedne interne kontrole (Q) i odsustvo pikova ukazuje na prisustvo inhibitora

3.3.7 Statistička analiza

Da bi rezultati forenzičke analize DNK bili validni na sudu, moraju biti statistički obrađeni i iskazani kao vjerojatnoća da je neka pretpostavka vjerovatnija od one koja joj je suprotstavljena. Štaviše, tokom razvoja DNK tehnologija i njihove primjene u forenzičke svrhe, upravo je

statistička analiza dala legitimitet DNK analizi te je bila krucijalna za njeno prihvatanje kao rutinske metode u forenzičkoistražnim postupcima. Pouzdanost rezultata statističke analize zasniva se na genetičkoj jedinstvenosti informacije sadržane u DNK profilu osobe u kontekstu neke (po mogućnosti lokalne) populacije. DNK profil jedinstven je za svaku osobu (isključujući jednojajčane blizance), a alelne varijante analiziranih STR markera naslijeđene su po jedna od svakog roditelja. Ove dvije činjenice osnova su svih statističkih proračuna primijenjenih u forenzičko-genetičkoj analizi.

Nakon generiranja DNK profila i njegove vizualne analize, u svakom forenzičkom slučaju ili slučaju testiranja srodstva moguća su i sljedeća tri ishoda: 1. isključenje osumnjičenog / biološkog srodnika, 2. nedovoljno informativan rezultat i 3. nemogućnost isključenja osumnjičenog / biološkog srodnika. U slučaju isključenja, ne primjenjuje se statistička analiza.

U slučaju nedovoljno informativnog rezultata, neophodno je uraditi dodatne molekularnogenetičke analize, a sve s ciljem dobijanja jasnog i nedvosmislenog rezultata. U posljednjem slučaju, tek statističkom evaluacijom dobijenog rezultata i prikazivanjem vrijednosti vjerovatnoće da je polazna pretpostavka tačna, rezultat dobija svoju dokaznu snagu. Tek tada se može tvrditi da dobijeni genotip ne pripada nekoj drugoj, nasumično odabranoj osobi u populaciji. Ovaj rezultat se zasniva na analizi učestalosti pojavljivanja alelnih varijanti STR markera u nekoj populaciji. Uzmimo, na primjer, da neka osoba ima na lokusu TH01 alelnu varijantu 9 i mikrovarijantu 9.3. Učestalost pojavljivanja alelne varijante 9 na ovom lokusu u bosanskohercegovačkoj populaciji je 0,195 (19,5%), a mikrovarijante 9.3 0,33 (33%). Vjerovatnoća da neka osoba ima istu kombinaciju¹² na ovom lokusu je $2 \times 0,195 \times 0,33$ što iznosi 0,1287 (12,87%). Ako u analizu uključimo još jedan marker, ukupna vjerovatnoća će biti još manja. Na primjer, maloprije spomenuta osoba ima na lokusu FGA alelne varijante 23 (1,55%) i 26 (2,5%). Vjerovatnoća da neka druga osoba na ova dva lokusa ima iste alelne varijante iznosi 7,75%, a da na oba analizirana lokusa (TH01 i FGA) ima iste alelne varijante još je manja i iznosi 0,99%. Dodatno se vjerovatnoća smanjuje s uključivanjem sve većeg broja lokusa u analizu i za npr. 15 analiziranih STR lokusa iznosi i do 10^{-23} .

¹² 2pq

Također, vjerovatnoća je manja što je na DNK profilu detektovano više alelnih (mikro)varijanti koje su rijetke u populaciji. Kao što se vidi iz navedenog primjera, za provođenje statističke analize neophodno je poznavati učestalost (frekvencije) pojavljivanja alelnih varijanti u nekoj populaciji. Kako bi se utvrdile frekvencije alelnih varijanti u populaciji, neophodno je provesti analizu na referentnom uzorku populacije i kreirati bazu alelnih frekvencija za datu populaciju, pri čemu se moraju uzeti u obzir osnovni postulati populacijske genetike.

3.3.7.1 Baze alelnih frekvencija u humanim populacijama

Svaku humanu populaciju, između ostalog, karakteriziraju specifičnosti u frekvencijama alelnih varijanti genetičkih markera. Prilikom kreiranja baza alelnih frekvencija potrebno je obratiti pažnju na dvije stvari. Prva su karakteristike baze, kao što su njena veličina i reprezentativnost za odgovarajuću populaciju, a druga je problem subpopulacije. U prvom slučaju, vrlo je važno uključiti dovoljno veliki broj ispitanika. U idealnim uslovima to bi bio svaki pojedinac iz populacije, što bi rezultiralo izuzetno pouzdanim rezultatima frekvencija alelnih varijanti. Međutim, takva analiza je preobimna, posebno za velike populacije, pa je potrebno odrediti minimalni broj ispitanika koji je dovoljan za reprezentativnost baze. Donedavno je obavezni minimum bio 100–200 ispitanika, međutim u posljednje vrijeme se teži da, bez obzira na veličinu populacije, broj uzoraka u populacijskoj studiji bude što veći (više od 500). Povećanje broja individua povećava preciznost rezultata, ali ne utiče na tačnost broja alela. Broj alela koji su česti u populaciji neće se povećati s povećanjem broja ispitanika, ali je vjerovatnije da će u većem uzorku biti detektovane rijetke alelne (mikro)varijante. Detekcija rijetke varijante ukazuje na to da je uzorak dovoljno velik pa je obuhvatio i rijetke alelne varijante, što ga čini pouzdanim za dalje analize. U populaciji bi se rijetka alelna frekvencija trebala detektovati minimalno pet puta pa se minimalna alelna frekvencija izračunava s $5/2N$, gdje je N broj individua koji se množi s brojem 2, što predstavlja dva hromosoma koji se nasljeđuju jedan od majke, jedan od oca. Zbog toga, ako je neka alelna varijanta u uzorku od, na primjer, 100 odabranih ispitanika detektovana samo jednom, vrijednost minimalne alelne frekvencije neće biti $1/2 \times 100 = 0,005$, nego će biti $5/200$ što iznosi 0,025. Posljedično, vrijednost minimalne alelne frekvencije za veći broj ispitanika uključenih u analizu će biti manja pa tako za 1000 ispitanika iznosi 0,0025, a za 10.000 iznosi 0,00025.

Pored veličine uzorka, vrlo je važno procijeniti kolika je varijabilnost unutar jedne populacije, koja nastaje kao rezultat zastupljenosti genetičkih podstruktura (subpopulacija) unutar neke populacije te kolika je genetička varijacija među različitim populacijama. Za procjenu varijabilnosti izračunava se fiksacijski indeks (F_{ST}) koji predstavlja odnos varijanse frekvencije alela među različitim subpopulacijama (σ_s^2) i varijanse alelnog stanja u ukupnoj populaciji (σ_T^2):

$$F_{ST} = \sigma_s^2 / \sigma_T^2.$$

Niska vrijednost F_{ST} indeksa ukazuje na male, a visoka na velike razlike unutar/između populacije. Za forenzičke svrhe vrlo je važno da se odredi postojanje subpopulacija unutar jedne populacije, jer ako postoje jasno determinirane subpopulacije, to se mora uzeti u obzir prilikom primjene statističke obrade dobijenog rezultata. Osim toga, za validaciju svake baze alelnih frekvencija neophodno je primijeniti testove koji se odnose na nezavisnu segregaciju alela. To su testovi za izračunavanje *Hardy-Weinberg ravnoteže* (HWE) i neravnoteže vezanih gena (engl. *Linkage Disequilibrium* – LD).

Primarna svrha računanja Hardy-Weinberg (HW) ravnoteže je da se odredi da li su aleli unutar jednog lokusa nezavisni jedni od drugih. Ako je lokus genetički stabilan, frekvencije alelnih varijanti ne bi se trebale značajno mijenjati kroz niz generacija. S obzirom na to da se aleli nasljeđuju po mendelijanskim principima, njihove frekvencije u populaciji pojavljuju se u predvidljivoj vjerojatnosti. Ako se dva alela A i a javljaju u frekvencijama p i q , onda će frekvencija homozigotnog genotipa AA biti p^2 , a heterozigotnog genotipa Aa $2pq$. Uz analizu alelnih frekvencija neke populacije, računa se i očekivana frekvencija genotipova, koja se potom uspoređuje s dobijenom frekvencijom genotipova. Ako su ove dvije vrijednosti identične, populacija se nalazi u HW ravnoteži. HW ravnoteža se javlja:

- u velikim populacijama u kojima je zastupljen veliki broj alelnih populacija,
- uslijed odsustva uticaja prirodne selekcije za dati genski lokus, gdje svaki alel ima podjednaku šansu da se prenese u narednu generaciju,
- uslijed odsustva mutacija jer se ne javljaju nove alelne varijante,
- uslijed odsustva migracija jer nema “dolaska / odlaska” alelnih varijanti i
- slučajnim parenjem, gdje je svaka alelna kombinacija moguća.

Zbog toga je jasno što se humane populacije ne nalaze u apsolutnoj HW ravnoteži. Ipak, većina njih veoma malo odstupa od HW ravnoteže i male vrijednosti odstupanja su sasvim prihvatljive za svaku populacijsku bazu podataka. Ako je odstupanje malo veće ($p = 0,05$), primjenjuje se *Bonferroni* korekcija, koja najčešće smanjuje p vrijednost. Ako se ni nakon primjene *Bonferroni* korekcije p vrijednost ne smanji, populacija nije u HW ravnoteži.

Tri su osnovna razloga za odstupanje od ravnoteže: 1) sparivanje srodnih osoba, kojim se povećava broj homozigota u populaciji, 2) postojanje subpopulacija unutar populacije i 3) prirodna selekcija kojom se različiti genotipovi ne prenose podjednako u naredne generacije. Zbog svega navedenog, prilikom kreiranja populacijske baze neophodno je odabrati reprezentativnu veličinu uzorka, analizirati osobe koje se ne nalaze u blisko srodnim odnosima i uzeti u obzir postojanje subpopulacija unutar jedne populacije.

Neravnoteža vezanih gena (LD) mjera je zavisnosti alela na različitim lokusima, koja se može definisati kao neslučajna povezanost alela na različitim lokusima jednog haplotipa. Nastaje kao rezultat činjenice da se dva alela nalaze jedan blizu drugog pa se među njima ne dešava *crossing over* ili kao rezultat selekcije, mutacija, migracija i genetičkog drifta.

Ako se aleli na dva različita lokusa prenose nezavisno jedan od drugoga tokom mejoze, oni su u ravnotežnoj povezanosti (engl. *Linkage Equilibrium* – LE). S druge strane, lokusi su u neravnotežnoj povezanosti ako je učestalost asocijacija njihovih alela veća i manja od očekivane u uslovima slučajnog i nasumičnog povezivanja. LD se može izračunati poređenjem frekvencija uočenih haplotipova u odnosu na očekivane u uslovima ravnotežne povezanosti (LE). Ako analiziramo frekvenciju haplotipa ab u populaciji, a pri tome a je alel na lokusu 1, a b je alel na lokusu 2, onda se frekvencija ovog haplotipa određuje prema formuli:

$$f(ab) = f(a) \times f(b) + \Delta,$$

gdje je $f(ab)$ frekvencija haplotipa ab , a $f(a)$ i $f(b)$ i frekvencija alelnih varijanti a i b . Ako postoji ravnoteža povezanosti, onda je $\Delta = 0$, što znači da ne postoji asocijacija između a i b . Međutim, ako postoji zavisnost između alela na lokusima 1 i 2, onda je $\Delta \neq 0$, a za lokuse se smatra da su u neravnotežnoj povezanosti. Za izračunavanje frekvencija haplotipova čiji su markeri u neravnotežnoj povezanosti (LD) potrebno je odrediti njihovu frekvenciju u analiziranoj populaciji, a ne preračunavati na osnovu Δ za svaku alelnu kombinaciju, posebno u slučajevima multialelnih

lokusa. Za forenzičke analize vrlo je važno raspolagati i informacijama o forenzičkoj efikasnosti DNK markera koji se koriste za rješavanje kriminalističkih i slučajeva srodstva. To uglavnom podrazumijeva analizu parametara zasnovanih na unikatnim alelima i njihovim frekvencijama u nekoj populaciji.

Neki od tih parametara su:

- *Diverzitet gena* (engl. *Gene Diversity* – GD) koji predstavlja vjerojatnoću da su dva nasumično odabrana alela u populaciji različita. Izračunava se prema formuli koju je dao Nei (1987):

$$GD = n / (n - 1) (1 - \sum p_i^2),$$

gdje je n broj kopija gena, a p_i frekvencija i alela u populaciji;

- *Vjerovatnoća poklapanja* (engl. *Match Probability* – PM) koja se definiše kao vjerovatnoća da dvije nesrodne osobe imaju isti genotip, a računa se prema sljedećoj formuli (Fisher, 1951):

$$PM = \sum G_i^2,$$

gdje je G_i frekvencija genotipa i za dati lokus u populaciji. PM ustvari predstavlja sumu svih vjerovatnoća poklapanja za sve analizirane genotipove. Ako je populacija u HW ravnoteži, onda se PM računa na osnovu alelnih frekvencija te populacije.

- *Snaga isključenja* (engl. *Power of Discrimination* – PD) je vjerovatnoća isključenja između dvije nesrodne osobe, što je u korelaciji s PM te se računa:

$$PD = 1 - PM.$$

- *Informacioni sadržaj polimorfizma* (engl. *Polymorphism Informative Content* – PIC) je predikcija vjerovatnoće prenošenja roditeljskih alelnih varijanti na potomka. U dva slučaja nije moguće predvidjeti ovu vjerovatnoću: kada je jedan roditelj homozigot i kada su oba roditelja i potomak heterozigoti (Botstein et al., 1980):

$$PIC = \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

gdje p_i i p_j predstavljaju alelne frekvencije.

- *Vjerovatnoća isključenja očinstva* (engl. *probability of excluding paternity* – Q) (Ohno et al., 1982)

$$Q = \sum_{i=1}^n p_i(1 - p_i + p_i^2)(1 - p_i)^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n p_i p_j (1 - p_i + p_j^2)(p_i + p_j)$$

gdje p_i i p_j predstavljaju alelne frekvencije.

- *Snaga isključenja očinstva* (engl. *Power of Exclusion* – PE) je vjerovatnoća isključenja bilo koje nasumično odabrane osobe u populaciji kao biološkog oca i računa se prema formuli koju su predložili Brenner i Morris (1990):

$$PE = h^2 \times (1 - 2 \times h \times H^2),$$

gdje h predstavlja proporciju heterozigota, a H proporciju homozigota u populaciji.

- *Indeks očinstva* (engl. *Paternity Index* – PI) je vjerovatnoća da aleli detektovani kod djeteta pripadaju njegovom biološkom ocu, a ne nekoj drugoj nasumično odabranoj osobi u populaciji. *Kombinovani indeks očinstva* (engl. *Combined Paternity Index* – CPI) je produkt svih izračunatih PI vrijednosti za analizirane lokuse.
- *Vjerovatnoća isključenja očinstva* (engl. *Probability of Paternity Exclusion* – PPE) je vjerovatnoća da će nasumično odabrani muškarac u populaciji biti isključen kao biološki otac.

3.3.7.2 Statistička analiza frekvencije / individualnosti DNK profila

U različitim istražnim postupcima veoma je važno odrediti vjerovatnoću da trag pronađen na mjestu zločina pripada osumnjičenom, a ne nekoj drugoj nasumično odabranoj osobi u populaciji. Dva su pristupa u računanju vjerovatnoće: prvi je izračunavanje frekvencije DNK profila, a drugi izračunavanje omjera vjerovatnoće.

Frekvencija DNK profila u populaciji se izražava kao *vjerovatnoća slučajnog podudaranja* (engl. *Random Match Probability* – RMP), a računa se na osnovu frekvencija genotipa za svaki analizirani lokus. Frekvencija homozigotnih genotipova računa se na osnovu p^2 , a heterozigotnih $2pq$. Nakon što se izračunaju vrijednosti za svaki pojedinačni lokus, dobijene vrijednosti se množe kako bi se dobila konačna vrijednost RMP, tj. frekvencija analiziranog DNK profila u nekoj konkretnoj populaciji. Pri tome, kao što je već ranije rečeno, za računanje vrijednosti RMP

neophodno je poznavati alelne frekvencije za datu populaciju, koje su sadržane u populacijskoj bazi alelnih frekvencija. Dobijene vrijednosti RMP su izuzetno male i zavise od broja STR lokusa uključenih u analizu (npr. za 13 lokusa vrijednosti iznose 10^{-19} , a za 20 lokusa 10^{-34}), kao i pojave rijetkih alelnih varijanti (tabela 3.7). U tabeli je plavo obojena RMP vrijednost dobijena za lokus na kojem su detektovane alelne varijante koje su česte u bosanskohercegovačkoj populaciji u odnosu na crveno obojenu RMP vrijednost izračunatu za lokus koji sadrži dvije rijetke alelne varijante.

Tabela 3.7. *Primjer računanja RMP vrijednosti za NN osobu kao pokazatelja individualnosti DNK profila. Dobijena ukupna RMP vrijednost iznosi $3,008 \times 10^{-25}$ što pokazuje koliko je mala vjerovatnoća da u ukupnoj ljudskoj populaciji postoji osoba s DNK profilom identičnim DNK profilu NN osobe.*

STR LOKUS	NN	Formula	Alelne frekvencije	RMP
D3S1358	16 17	$2pq$	$p (0,246), q (0,210)$	0,103
TH01	8 9.3	$2pq$	$p (0,105), q (0,280)$	0,059
D21S11	32.2 32.2	p^2	$p (0,099)$	0,010
D18S51	13 20	$2pq$	$p (0,120), q (0,024)$	0,006
PENTA E	12 12	p^2	$p (0,162)$	0,026
D5S818	13 13	p^2	$p (0,175)$	0,031
D13S317	12 12	p^2	$p (0,268)$	0,072
D7S820	9 11	$2pq$	$p (0,162), q (0,215)$	0,070
D16S539	10 12	$2pq$	$p (0,053), q (0,309)$	0,033
CSF1P0	10 11	$2pq$	$p (0,287), q (0,295)$	0,169
PENTA D	7 17	$2pq$	$p (0,002), q (0,004)$	0,00002
VWA	16 18	$2pq$	$p (0,217), q (0,197)$	0,085
D8S1179	11 14	$2pq$	$p (0,062), q (0,245)$	0,030
TPOX	11 12	$2pq$	$p (0,254), q (0,028)$	0,014
FGA	20 22	$2pq$	$p (0,121), q (0,212)$	0,051
Amelogenin	X X	-	-	-
RMP				$3,008 \times 10^{-25}$

U forenzičkoistražnim postupcima vrijednosti RMP jasno ilustriraju dokaznu snagu RMP jer pokazuju koliko je mala šansa da sporni trag s mjesta zločina pripada nekoj drugoj osobi iz populacije, a ne osumnjičenom.

Ipak, potrebno je s oprezom interpretirati vjerovatnoću slučajnog poklapanja, koja ne predstavlja:

1. vjerovatnoću da je neko drugi kriv ili da je neko drugi ostavio trag na mjestu zločina,
2. vjerovatnoću da optuženi nije kriv niti
3. vjerovatnoću da je neko drugi počinio zločin.

RMP je samo procjena u kojoj je frekvenciji očekivano da se neki DNK profil pojavi u populaciji. Na RMP se može gledati kao na teoretsku šansu da nasumično odabrana osoba u populaciji ima isti DNK profil kao i osumnjičeni. Ako su osumnjičeni i stvarni počinilac u rodbinskim odnosima neophodno je primijeniti drugačije proračune vjerovatnoće, jer DNK profili bioloških srodnika imaju više sličnosti nego oni nesrodnih individua. Preporuke za računanje vjerovatnoće u takvim slučajevima, koje je dao Odbor nacionalnog istraživačkog vijeća za DNK forenzičku nauku (NRC), iz 1996. godine prikazane su u tabeli 3.8.

Drugi pristup u računanju vjerovatnoće poklapanja DNK profila je omjer vjerovatnoće (LR), čija analiza podrazumijeva komparaciju vjerovatnoća događaja pod dvije alternativne pretpostavke (hipoteze). Ove dvije hipoteze predstavljaju dvije strane događaja: jednu, koju zastupa tužilaštvo, da DNK s mjesta zločina pripada osumnjičenom, i drugu, koju zastupa odbrana, da se DNK profil traga s mjesta zločina slučajno poklapa s DNK profilom osumnjičenog, a ustvari pripada nekoj drugoj nepoznatoj osobi u ukupnoj populaciji. LR je ustvari omjer vjerovatnoća ove dvije hipoteze. Matematički se to prikazuje kao:

$$LR = H_p/H_d,$$

gdje je H_p – prva hipoteza (da je osumnjičeni ostavio trag na mjestu zločina), a H_d – druga hipoteza (da je neka druga osoba iz iste populacije ostavila trag na mjestu zločina). Prva hipoteza da je osumnjičeni počinio zločin iznosi $H_p = 1$ (100%). S druge strane, s obzirom na to da se drugom hipotezom tvrdi da je neka druga osoba u populaciji počinila zločin onda je $H_d = 2pq$ za heterozigote, odnosno $H_d = p^2$ za homozigote. Dakle:

$$LR = H_p/H_d = 1/2pq \text{ ili } 1/p^2.$$

LR se izračunava za svaki lokus, a ukupni LR predstavlja produkt svih pojedinačnih LR. Ako je izračunata ukupna vrijednost LR veća od jedan ($LR > 1$), prihvata se prva hipoteza (H_p), a ako je LR manji od 10, smatra se da dokaz ima ograničenu dokaznu snagu. Vrijednost LR veća od 1000

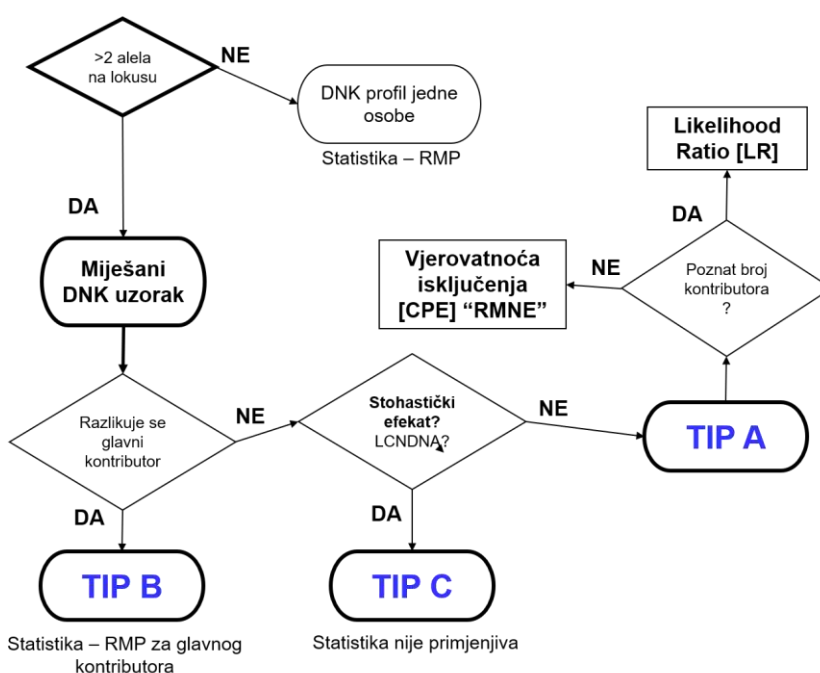
smatra se dovoljno visokom vjerojatnošću za prihvatanje hipoteze tužilaštva. Kao i kod vrijednosti RMP, i vrijednosti LR zavise od broja analiziranih STR lokusa i prisustva rijetkih alelnih varijanti. Što je njihov broj veći, i vrijednosti LR su veće.

Tabela 3.8. Formule za računanje vjerojatnoće poklapanja u različitim tipovima srodstva

Odnos	Formule vjerojatnoće poklapanja	
	Homozigoti (A_IA_I)	Rezultati s TH01 6,6
Braća i sestre	$\frac{(1+p_I)^2 + (7+7p_I-2p_I^2)\Theta + (16-9p_I+p_I^2)\Theta^2}{4(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0.38921
Roditelj i dijete	$\frac{2\Theta + (1-\Theta)p_I}{(1+\Theta)}$	0.24700
Polubraća/ polusestre	$\frac{[2\Theta + (1-\Theta)p_I][2+4\Theta + (1-\Theta)p_I]}{2(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0.27479
Prvi rođaci	$\frac{[2\Theta + (1-\Theta)p_I][2+11\Theta + 3(1-\Theta)p_I]}{4(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0.10888
Nesrodni	$\frac{[2\Theta + (1-\Theta)p_I][3\Theta + (1-\Theta)p_I]}{4(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0.06283
	(NRC II, 4.10a)	P ² =0.05373
	Heterozigoti (A_IA_J)	Rezultati sa D13 11,14
Braća i sestre	$\frac{(1+p_I+p_J+2p_Ip_J) + (5+3p_I+3p_J-4p_Ip_J)\Theta + 2(4-2p_I-2p_J+p_Ip_J)\Theta^2}{4(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0,35955
Roditelj i dijete	$\frac{2\Theta + (1-\Theta)(p_Ip_J)}{2(1+\Theta)}$	0,19977
Polubraća/ polusestre	$\frac{(p_I+p_J+4p_Ip_J) + (2+5p_I+5p_J+8p_Ip_J)\Theta + (8-6p_I-6p_J+4p_Ip_J)\Theta^2}{4(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0,11921
Prvi rođaci	$\frac{(p_I+p_J+12p_Ip_J) + (2+13p_I+13p_J-24p_Ip_J)\Theta + 2(8-7p_I-7p_J+6p_Ip_J)\Theta^2}{8(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0,07893
Nesrodni	$\frac{2\Theta[+(1-\Theta)p_I][\Theta + (1-\Theta)p_J]}{(1+\Theta)(1+2\Theta)}$	0,03864
	(NRC II, 4.10b)	2pq=0,03259

3.3.7.3 Statistička analiza miješanih tragova

Kao što je već ranije rečeno, miješani tragovi predstavljaju smjesu dva ili više tragova, a na DNK profilima detektuju se pojavom više od dvije alelne varijante na više STR lokusa. Statistička analiza koja se primjenjuje za interpretaciju miješanih tragova zavisi od toga da li se u smjesi razlikuje dominantni kontributor smjese (smjesa tipa B), ili je pak riječ o smjesi u kojoj nije moguće odrediti dominantnog kontributora. Za svaki tip smjese neophodno je primijeniti odgovarajući statistički obrazac i izračun vjerovatnoće da se događaj desio (slika 3.45).



Slika 3.45. Šematski prikaz koraka u primjeni statističkih obrazaca u različitim slučajevima miješanih DNK profila

Vjerovatnoća isključenja (PE) predstavlja procjenu koliko neka populacija ima genotipova s makar jednom alelnom varijantom detektovanom na miješanom DNK profilu. Ako se na jednom lokusu nalaze tri alelne varijante (A, B, C), onda je vjerovatnoća isključenja (PE) za taj lokus:

$$P = p_a + p_b + p_c$$

$$Q = 1 - P$$

$$PE = Q^2 + 2Q(1 - Q),$$

gdje je: P – suma frekvencija svih alelnih varijanti detektovanih na lokusu, a Q – kombinacija svih frekvencija alelnih varijanti koje nisu detektovane.

Kombinovana vjerovatnoća isključenja (CPE) se računa:

$$CPE = 1 - [(1-PE_1) \times (1-PE_2) \times \dots (1-PE_n)],$$

gdje je: PE_1 – vjerovatnoća isključenja za lokus 1, PE_2 – vjerovatnoća isključenja za lokus 2, PE_n – vjerovatnoća isključenja za lokus n.

Vjerovatnoća isključenja nema dokaznu snagu kao vrijednost LR, ali je idealna u slučajevima kada nije poznat broj kontributora u smjesi, jer uzima u obzir sve ostale alele detektovane u nekoj populaciji. Osim toga, ovom se analizom isključuju svi pojedinci koji imaju alelne varijante koje nisu detektovane na svim analiziranim lokusima miješanog DNK profila nekog traga.

Primjer računanja:

Na lokusu TH01 su detektovane alelne varijante 6, 8 i 9, a njihove frekvencije za bosanskohercegovačku populaciju iznose 0,285, 0,105 i 0,219.

$$P = 0,258 + 0,105 + 0,219 = \mathbf{0,582}$$

$$Q = 1 - 0,582 = \mathbf{0,418}$$

$$PE = (0,418)^2 + 2 \times 0,418(1 - 0,418) = 0,175 + 0,486 = \mathbf{0,661}$$

Omjer vjerovatnoća (LR) se primjenjuje za računanje vjerovatnoće da genotip u miješanom DNK profilu pripada osumnjičenom / žrtvi u odnosu na vjerovatnoću da pripada nekoj drugoj, nasumično odabranoj osobi iz populacije. Primjenjuje se za DNK profile u kojima se razlikuje dominantni kontributor. Ako se na lokusu DNK profila detektuju četiri alelne varijante A, B, C i D, pri čemu A i B pripadaju žrtvi, a C i D osumnjičenom, onda je argument tužilaštva da trag potiče od žrtve i osumnjičenog. S druge strane, odbrana tvrdi da trag potiče od žrtve i neke nepoznate osobe. Vjerovatnoća da se desio događaj koju tužilaštvo zastupa na sudu je 100% (odnosno 1), dok vjerovatnoća da se desio događaj koji zastupa odbrana varira u zavisnosti od nekoliko faktora kao što su broj potencijalnih kontributora u smjesi. Dakle, vrijednost LR predstavlja omjer vjerovatnoća da su se ove dvije tvrdnje desile.

Zavisno od broja detektovanih alelnih varijanti na lokusu miješanog DNK profila i genotipa osumnjičenog, vrijednost LR se izračunava na osnovu formula prikazanih u tabeli 3.9.

Tabela 3.9. *Formule za računanje omjera vjerovatnoća u različitim slučajevima kombinacija generiranih DNK profila porijeklom sa mjesta zločina i od osumnjičenog*

Mjesto zločina	Osumnjičeni	Omjer vjerovatnoća
$A_1A_2A_3A_4$	A_1A_2	$\frac{1}{12p_1p_2}$
$A_1A_2A_3$	A_2A_3	$\frac{p_1+2p_2+2p_3}{12p_2p_3(p_1+p_2+p_3)}$
$A_1A_2A_3$	A_1	$\frac{1}{6p_1(p_1+p_2+p_3)}$
A_1A_2	A_1A_2	$\frac{(p_1+p_2)^2}{2p_1p_2(3p_1p_2+2p_1^2+2p_2^2)}$
A_1A_2	A_1	$\frac{2p_1+p_2}{2p_1(3p_1p_2+2p_1^2+2p_2^2)}$

Za analizu miješanih DNK profila preporučuje se korištenje nekog od dostupnih softvera koji daju mogućnost statističke analize tragova. Jedan od njih je *LRmix studio* koji je besplatan i kreiran za interpretaciju kompleksnih miješanih tragova. Ovaj program omogućuje mjerenje dokazne vrijednosti bilo kojeg (autosomalnog STR) forenzičkog DNK profila.

LRmix Studio koristi model omjera vjerovatnoća (LR), a rezultati se prikazuju kao vjerovatnoća da je osumnjičeni donor genetičkog materijala u smjesi. Također, često se koriste *DNAxs* i *DNA mixtures* softveri, međutim, oni nisu besplatni.

3.3.7.4 Statistička analiza parcijalnih DNK profila

U slučajevima kada se generiraju parcijalni DNK profili, kao rezultat male količine DNK, statistička analiza može se provesti samo za one lokuse na kojima su detektovane alelne varijante. Za takve uzorke, rezultati statističke analize imaju značajno manju pouzdanost u odnosu na uzorke za koje je dostupna veća količina DNK. Ipak, statistička vrijednost se povećava s povećanjem

broja amplificiranih lokusa pa je veoma važno provesti sve prethodno opisane strategije za povećanje uspješnosti amplifikacije malih količina DNK (mini STR setovi, povećanje broja ciklusa PCR reakcije, *nested* PCR i dr.). Međutim, čak i ako se raspolaže sa samo nekoliko amplificiranih lokusa, moguće je dobiti važne informacije koje mogu pomoći u rasvjetljavanju konkretnog slučaja. Postoje dva modela koja se koriste u interpretaciji parcijalnih profila: biološki i statistički, ali samo statistički rezultatima daje vjerodostojnost. Biološki model podrazumijeva najmanje dva ponavljanja analize jednog uzorka te u obzir uzima samo one pikove koji su se amplificirali u svim ponavljanjima, a koji se nazivaju *konsenzus* pikovi. Na ovaj način se isključuju artefakti koji se javljaju kao rezultat stohastičkih efekata amplifikacije malih količina DNK, kao što su umetanje alela, ispadanje alela, povećani zaostajući pikovi i dr. Statistički model uzima u obzir stohastičke efekte prilikom računanja vjerovatnoće.

Statistička analiza se zasniva na izračunavanju omjera vjerovatnoća (LR) koji testira dvije hipoteze (da trag potiče od osumnjičenog ili da trag ne potiče od osumnjičenog) ili na računanju RMNE (engl. *Random Man Not Excluded*) vrijednosti, koja predstavlja vjerovatnoću da trag pripada bilo kojoj nasumično odabranoj osobi u populaciji, a ne osumnjičenom. Ipak, mnogi autori preporučuju korištenje pristupa računanja LR, jer RMNE ne uzima u obzir pojavu ispadanja i umetanja alela. Danas su dostupni različiti softverski programi za statističku analizu parcijalnih DNK profila i svi računaju vrijednost LR. Neki od najpoznatijih su *Forensim*, *TrueAllele*, *likeLTS*, *STR mix* i dr.

3.3.7.5 Statistička analiza utvrđivanja biološkog srodstva

Analiza utvrđivanja srodstva na osnovu STR markera zasniva se na činjenici da svaki pojedinac nasljeđuje po jednu alelnu varijantu od majke i od oca, i jednu od dvije alelne varijante prenosi svojoj djeci. Na osnovu principa Mendelove segregacije moguće je izračunati količinu dijeljene genetičke informacije među bliskim srođnicima koja za odnose roditelj – dijete iznosi 50%, prve rođake 25%, druge rođake 12,5%, itd. Prilikom utvrđivanja roditeljstva, očinstvo ili majčinstvo se smatra pozitivnim ako dijete i testirani roditelj dijele po jednu zajedničku alelnu varijantu na svim analiziranim STR lokusima. Postoje slučajevi (i to češće kod očinstava) kada se ustanovi nepoklapanje na jednom ili dva analizirana STR lokusa, što je posljedica mutacija, i to najčešće jednostepenih, pa se roditeljstvo ne može isključiti, nego se u statističku analizu uključuju statistički obrasci koji uzimaju u obzir učestalost pojavljivanja mutacija na datom lokusu.

Ako se ustanovi nepoklapanje na više od dva analizirana STR lokusa, roditeljstvo se isključuje i u tom slučaju se ne radi statistička analiza. Ako se testirana osoba ne može isključiti kao biološki roditelj, primjenjuje se statistička analiza računanja indeksa očinstva (engl. *Paternity Index* – PI) ili majčinstva (engl. *Maternity Index* – MI). Vrijednost PI, odnosno MI, predstavlja odnos vjerovatnoća da je testirana osoba biološki roditelj (otac ili majka), a ne neka druga nasumično odabrana osoba iz populacije.

$$PI (MI) = X/Y,$$

gdje je X vjerovatnoća da je testirana osoba biološki roditelj, a Y vjerovatnoća da je neka druga, nasumično odabrana osoba iz populacije roditelj. Zavisno od toga da li su u analizu uključena oba ili jedan roditelj, razlikujemo potpuno očinstvo i bezmajčinsko očinstvo / majčinstvo.

3.3.7.5.1 Potpuno očinstvo

Potpuno očinstvo je tip analize u kojem se sporni muškarac testira kao potencijalni biološki otac. Pri tome, majka je uključena u analizu te je poznato koje je alelne varijante dijete naslijedilo od majke. Na taj način moguće je odrediti koje alelne varijante *mora* imati potencijalni otac ako je biološki otac djeteta. Ovi aleli se nazivaju *obligatni aleli*.

Na primjer, ako na STR lokusu majka ima alelne varijante AB, a dijete ima AD, onda biološki otac mora imati alelnu varijantu D, jer je dijete od majke naslijedilo alelnu varijantu A.

U slučaju potpunog očinstva vjerovatnoća da je testirani muškarac prenio obligatni alel može biti 50% ako je dijete heterozigot, ili 100% ako je dijete homozigot. Dakle u formuli $P = X/Y$, X iznosi ili 0,5 ili 1. Vjerovatnoća da obligatni alel potiče od neke druge, nasumično odabrane osobe iz populacije (Y) predstavlja ustvari frekvenciju obligatnog alela u nekoj populaciji. PI vrijednost se računa za svaki analizirani STR marker, a formula za računanje zavisi od kombinacije genotipova za tri analizirane osobe i prikazane su u tabeli 3.10.

Produkt svih pojedinačnih PI vrijednosti predstavlja kombinovani indeks očinstva (engl. *Combined Paternity Index* – CPI). Vjerovatnoća očinstva (engl. *Paternity Probability* - PP) najčešće se izražava procentualno, a izračunava prema formuli:

$$PP = (CPI/CPI + 1) \times 100.$$

Vjerovatnoća očinstva je najčešće veća od 99,99% te zavisi od broja analiziranih STR markera uključenih u analizu, prisustva rijetkih alelnih varijanti i detektovanih mutacija.

Tabela 3.10. *Formule za računanje indeksa potpunog očinstva za različite kombinacije genotipova uključenih u analizu*

Majka	Dijete	Pretpostavljeni otac	PI
AA	AA	AB	$0,5/a$
AA	AB	AB	$0,5/b$
AA	AB	BC	$0,5/b$
AB	AA	AB	$0,5/a$
AB	AA	AC	$0,5/a$
BC	AB	AB	$0,5/a$
BC	AB	AC	$0,5/a$
BD	AB	AC	$0,5/a$
AA	AA	AA	$1/a$
AB	AA	AA	$1/a$
BB	AB	AA	$1/a$
BC	AB	AA	$1/a$
AB	AB	AC	$0,5/(a+b)$
AB	AB	AA	$1/(a+b)$
AB	AB	AB	$1/(a+b)$

3.3.7.5.2 Bezmajčinsko očinstvo / majčinstvo

U slučajevima kada je u analizu uključen samo jedan roditelj, onda se mijenjaju i statistički obrasci računanja PI ili MI vrijednosti. Pored toga, za razliku od potpunog očinstva, komparacijom alelnih varijanti na analiziranim DNK profilima dvije testirane osobe traži se *zajednički alel*, odnosno alel koji imaju obje testirane osobe, a za koji se pretpostavlja da vodi porijeklo od testiranog roditelja.

Prilikom računanja PI vrijednosti za svaki STR marker, a s obzirom na to da nije poznato koju je alelnu varijantu dijete naslijedilo od kojeg roditelja, pri računanju vrijednosti X uzimaju se u obzir vjerovatnoće da je zajednički alel porijeklom od jednog ili od drugog roditelja.

Za računanje vrijednosti Y uzimaju se u obzir vjerovatnoće da alelna varijanta pripada jednom od roditelja ili nekoj nasumično odabranoj osobi iz populacije. Zavisno od kombinacije genotipova dvije testirane osobe primjenjuju se odgovarajući statistički obrasci za svaki analizirani STR marker (tabela 3.11).

Tabela 3.11. Formule za računanje indeksa očinstva/majčinstva za različite kombinacije genotipova uključenih u analizu

Dijete	Potencijalni roditelj	PI
AB	AC	$0,25/a$
AB	AB	$(a+b)/4ab$
AB	AA	$0,5/a$
AA	AC	$0,5/a$
AA	AA	$1/a$

Pri tome, indeks očinstva (PI) ili majčinstva (MI) za svaki pojedinačni lokus, kao i vrijednosti vjerovatnoće očinstva / majčinstva u ovim slučajevima, budu značajno niže nego kad se u analizu uključe oba roditelja (tabela 3.12).

Vjerovatnoća se dodatno smanjuje ako je u analizu uključen manji broj STR markera, ako su kod analiziranih osoba detektovani učestali aleli, kao i uslijed prisustva mutacija. U takvim slučajevima sugerise se analiza većeg broja STR markera i uključivanje majke u analizu.

Tabela 3.12. Uporedni prikaz vjerovatnoća za potpuno i bezmajčinsko očinstvo. Vrijednosti CPI i PP su manje u slučajevima kada majka nije uključena u analizu.

Potpuno očinstvo						Bezmajčinsko očinstvo			
STR LOKUS	Dijete	Majka	Obligatni alel	Potencijalni otac	PI	Dijete	Potencijalni otac	Zajednički alel	PI
D3S1358	15 15	15 15	15	15 15	3,571	15 15	15 15	15	3,571
TH01	9.3 9.3	7 9.3	9.3	9 9.3	1,515	9.3 9.3	9 9.3	9.3	1,515
D21S11	28 28	28 29	28	28 29	3,030	28 28	28 29	28	3,030
D18S51	13 20	19 20	13	13 19	4,545	13 20	13 19	13	2,273
PENTA E	10 10	10 12	10	10 10	6,061	10 10	10 10	10	6,061
D5S818	11 11	11 11	11	11 12	1,333	11 11	11 12	11	1,333
D13S317	12 14	12 13	14	11 14	11,111	12 14	11 14	14	5,556
D7S820	8 11	8 10	11	10 11	2,703	8 11	10 11	11	1,351
D16S539	11 12	11 11	12	12 12	3,571	11 12	12 12	12	1,786
CSF1P0	11 12	12 12	11	11 13	2,041	11 12	11 13	11	1,020
PENTA D	9 13	9 12	13	9 13	3,333	9 13	9 13	13	2,687
vWA	17 19	17 18	19	19 19	15,385	17 19	19 19	19	7,692
D8S1179	14 14	14 15	14	14 14	4,762	14 14	14 14	14	4,762
TPOX	10 11	8 10	11	8 11	1,923	10 11	8 11	11	0,962
FGA	21 22	21 26	22	22 22	5,263	21 22	22 22	22	2,632
CPI	325841960					1026049			
PP (%)	99,99999969					99,9999			

U slučajevima kada se detektuje mutacija na jednom ili dva lokusa, neophodno je za konkretan lokus primijeniti odgovarajuće formule koje pored alelnih frekvencija uključuju i stopu mutacije za dati lokus (tabela 3.13).

Tabela 3.13. Formule za računanje mutacija detektovanih na STR lokusima

Majka	Dijete	Potencijalni otac	Formula
17 17	17 18	19 (20)	$\mu/(4P_{19})$ ako je mutacija jednostepena, $\mu/(40P_{20})$ ako je mutacija dvostepena, itd.
17 17	17 18	19 19	$\mu/(2P_{18})$
12 14	12 14	15 16	$\mu/(4(P_{12}+P_{14}))$
12 14	12 14	13 15	$3\mu/4(P_{12}+P_{14})$
15 16	15 17	15 16	$\mu/(1+1/3.5)/(4P_{17})$
////	20.2 23	21.2 23.2	$\mu/(8P_{20.2})$
Otac	Dijete	Potencijalna majka	Formula
17	17 18	19	$\mu/(2 \times 3.5 \times P_{18})$

* μ -stopa mutacije za dati lokus

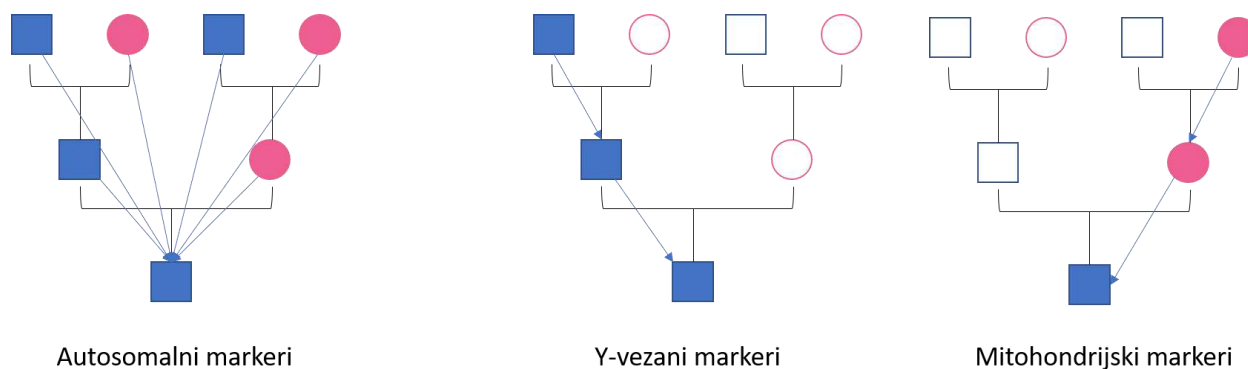
3.3.7.5.3 DNK analiza biološkog srodstva

Prilikom računanja srodstva, dobijene vrijednosti vjerovatnoće nakon provedene statističke analize nisu toliko jednostavne za interpretaciju kao u slučajevima računanja roditeljstva. Naime, u slučaju analize srodstva, srodnici mogu da dijele jedan, oba ili niti jedan alel na analiziranim STR markerima. Također, analizu dodatno otežava činjenica da ne postoji konsenzus oko broja analiziranih STR markera na kojima je detektovano nepoklapanje da bi se srodstvo isključilo. Ipak, što su dvije osobe u bližem srodstvu, to je i veća vjerovatnoća da će dijeliti zajednički alel pa je i pouzdanost rezultata statističke analize veća (tabela 3.14).

Za računanje vjerovatnoće srodstva, a posebno između udaljenih srodnika, češće se primjenjuju markeri koji se nasljeđuju po očevoj (Y-STR markeri) ili majčinoj (mtDNK) liniji od autosomskih markera (slika 3.46). Naime, ovi se markeri nepromijenjeni prenose s roditelja na potomke i kao takvi visoko su informativni za dokazivanje srodstva, s tim da ne daju informacije o kojem tipu i stepenu srodstva se radi. Ako se DNK analiza srodstva radi primjenom autosomskih STR markera, onda se za računanje vjerovatnoće primjenjuje omjer vjerovatnoća (LR). Prilikom računanja vrijednosti LR uspoređuju se dvije hipoteze: prva hipoteza je vjerovatnoća da su dvije osobe u srodstvu i druga hipoteza je vjerovatnoća da dvije osobe nisu u srodstvu.

Tabela 3.14. Vjerovatnoća dijeljenja nijednog, jednog ili oba alela u različitim stepenima srodstva (koeficijent povezanosti k). Što je srodstvo udaljenije, to je manja pouzdanost rezultata analize.

Visoko ↓ Nisko	Odnos	0 alela (k_0)	1 alel ($2k_1$)	2 alela (k_2)
	Roditelj-dijete	0	1	0
	Braća i sestre	1/4	1/2	1/4
	Polubraća i polusestre	1/2	1/2	0
	Ujak/stric-nećak	1/2	1/2	0
	Djed/baka-unuk	1/2	1/2	0
	Prvi rođaci	3/4	1/4	0



Slika 3.46. Sumarni prikaz nasljeđivanja autosomalnih markera koji se nasljeđuju po jedan od oba roditelja, a u naredne generacije se prenosi samo jedna naslijeđena alelna varijanta i markera koji se nepromijenjeni nasljeđuju od jednog roditelja (Y- markeri od oca, mt – markeri od majke) i kao takvi se prenose u naredne generacije.

U slučajevima srodstva, LR se izražava i kao indeks povezanosti (engl. *Relationship Index* – RI) ili indeks srodstva (engl. *Kinship Index* – KI). Računa se za svaki analizirani STR marker, a vjerovatnoća srodstva se izražava kao produkt svih pojedinačnih vrijednosti RI (engl. *Combined Relationship Index* – CRI). Ako je vrijednost CRI manja od 1, srodstvo se odbacuje. S druge strane,

što je veća vrijednost CRI, veća je i pouzdanost rezultata utvrđivanja srodstva. Kao i u slučajevima testiranja roditeljstva, formule za računanje vrijednosti RI za svaki analizirani STR marker različite su za različitu kombinaciju genotipova osoba uključenih u analizu (tabela 3.15). Osim toga, u analizu se uključuju i koeficijenti povezanosti koji predstavljaju vjerovatnoće da dvije osobe ne dijele niti jedan alel (k_0), dijele jedan alel (k_1) ili dijele obje alelne varijante (k_2) (tabela 3.14).

Tabela 3.15. Faktori vjerovatnoće u vezi s dvije suprotne hipoteze $H_p: (Y, Z) \sim (k_0, 2k_1, k_2)$ nasuprot $H_d: (Y, Z) \sim (1, 0, 0)$

Y	Z	Faktor vjerovatnoće (LR)
AA	AA	$k_0 + 2k_1/p_a + k_2/p_a^2$
AA	AB	$k_0 + k_1/p_a$
AA	BB	k_0
AA	BC	k_0
AB	AB	$k_0 + k_1(p_a + p_b)/(2p_a p_b) + k_2/(2p_a p_b)$
AB	AC	$k_0 + k_1/(2p_a)$

Najveći problem kod interpretacije rezultata analize srodstva primjenom autosomskih markera jest taj da, što je srodstvo udaljenije, to je veća i nepouzdanost rezultata. Naime, u slučajevima analize roditeljstva, isključena je svaka mogućnost lažno pozitivnih, odnosno lažno negativnih rezultata. Međutim, što su dvije osobe u daljem stepenu srodstva, veći je broj “graničnih slučajeva”, tj. slučajeva u kojima dobijene vjerovatnoće nisu dovoljno visoke ili niske da bi se potvrdilo ili isključilo potencijalno srodstvo. Situacija se dodatno komplikuje za manje, lokalne populacije. S druge strane, što je veći broj STR lokusa uključenih u analizu i što više rijetkih alelnih varijanti dijele dvije testirane osobe, to je veća i vjerovatnoća da će se dobiti precizniji rezultati, čime je znatno olakšana interpretacija rezultata. Zbog svega navedenog, a posebno u slučajevima udaljenijih srodnika, prednost se daje analizi markera koji se nasljeđuju po roditeljskoj liniji, među kojima su i spolno vezani STR markeri.

3.3.7.5.4 Statistička analiza spolno vezanih STR markera

U slučajevima utvrđivanja očinstva, analiza Y-STR markera pouzdana je samo za isključivanje očinstva. Ako dvije osobe imaju identičan Y-haplotip nije moguće tvrditi da su u srodstvu tipa otac – sin, nego samo da su u srodstvu po muškoj liniji. U slučajevima kada se radi o daljim ili čak dalekim srodniciima, analiza Y-STR markera je metoda izbora.

S obzirom na to da se Y-hromosom prenosi nepromijenjen iz generacije u generaciju, čak i nakon nekoliko desetina generacija, dva će srodnika po očevoj liniji imati identičan Y-haplotip. Za statističku interpretaciju rezultata Y-STR analize neophodno je imati referentnu bazu Y-haplotipova jer se podaci o frekvenciji haplotipova dobijaju iz populacijske baze podataka. Pri tome, frekvencija određenog Y-haplotipa predstavlja odnos utvrđenog broja konkretnog Y-haplotipa u bazi u odnosu na ukupan broj Y-haplotipova u bazi.

Kao što je već prethodno navedeno, jedna od najvećih baza haplotipova je YHRD (engl. *Y Haplotype Reference Database*). Prilikom računanja srodstva, računa se omjer vjerovatnoća (LR) koji uzima u obzir frekvencije haplotipova osoba za koje se testira srodstvo i broj generacija koji dijeli te dvije osobe.

Analiza X-STR markera u slučajevima utvrđivanja srodstva ima niz prednosti u odnosu na analizu autosomskih i Y-vezanih STR markera. Međutim, zbog činjenice da je za analizu X-vezanih STR markera neophodno uzeti u obzir i rekombinacijsku stopu i frekvenciju haplotipova, statistička analiza koja se primjenjuje za ove markere značajno je drugačija i od one za analizu autosomskih, kao i Y-vezanih STR markera vezanih za Y-hromosom. Također, za statističku analizu ovih markera neophodno je uzeti u obzir vrijednosti vezanosti gena (engl. *genetic linkage*) i neravnoteže vezanosti gena (engl. *Linkage Disequilibrium* – LD). Vezani geni se nalaze na istom hromosomu i nasljeđuju se zajedno. Tokom profaze I u mejozi, među njima ne dolazi do rekombinacije. S druge strane, neravnoteža vezanosti gena mjeri neslučajnu povezanost dva ili više alela koji se ne moraju nalaziti jedan blizu drugog na hromosomu, a procjenjuje se na osnovu frekvencije alela i haplotipova. U forenzičkoj i populacijsko-genetičkoj analizi koriste se X-STR markeri grupisani u 4 vezane grupe (engl. *Linkage Group* – LG) koje sadrže po tri STR markera te se smatraju haplotipovima: LG1 – DXS10148, DXS10135, DXS8378; LG 2 – DXS7132, DXS10079, DXS10074; LG 3 – DXS10103, HPRTB, DXS10101 i LG 4 – DXS10146, DXS10134, DXS7423. Za statističku analizu srodstva primjenom X-STR markera računa se omjer vjerovatnoća (LR), ali se u obzir uzima i rekombinacijska stopa i frekvencija haplotipova.

Danas je dostupno nekoliko softvera za izračunavanje vjerovatnoće srodstva primjenom X-STR markera, ali je *FamLinkX* jedan od najpouzdanijih, jer prilikom izračunavanja LR u obzir uzima sve relevantne faktore: vezanost gena, neravnotežu vezanosti gena te vjerovatnoću mutacija.

Literatura

- Alaeddini, R., Walsh, S.J., Abbas, A. (2010). Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA—a review. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), 148-157.
- Alonso, A., García Fernández, O. (2007). Real-time Quantitative PCR in Forensic Science. In R. Rapley, D. Whitehouse (Eds.), *Molecular Forensics* (1st Edition), (pp 59-70). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Brookes, C., Bright, J.-A., Harbison, S.A., Buckleton, J. (2012). Characterising stutter in forensic STR multiplexes. *Forensic Science International: Genetics*, 6(1), 58-63.
- Budowle, B., Eisenberg, A.J., van Daal, A. (2009). Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croatian Medical Journal*, 50(3), 207-217.
- Butler, J.M. (2006). Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. *Journal of Forensic Sciences*, 51(2), 253-265.
- Clayton, T.M., Guest, J.L., Urquhart, A.J., Gill, P.D. (2004). A genetic basis for anomalous band patterns encountered during DNA STR profiling. *Journal of Forensic Sciences*, 49(6), 1207-1214.
- Clayton, T.M., Whitaker, J.P., Sparkes, R., Gill, P. (1998). Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Science International*, 91(1), 55-70.
- Crouse, C.A., Rogers, S., Amiot, E., Gibson, S., Masibay, A. (1999). Analysis and interpretation of short tandem repeat microvariants and three-banded allele patterns using multiple allele detection systems [ispravka objavljena u *Journal of Forensic Sciences*, 44(3), 667]. *Journal of Forensic Sciences*, 44(1), 87-94.
- Čakar, J., Dzehverovic, M., Pilav, A. (2020). DNA analysis of thirty-eight years old stillborn's skeletal remains in case of disputed maternity. *Forensic Science International: Genetics*, 47, 102294.
- Diegoli, T.M. (2015). Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, 140-151.
- Dzehverovic, M., Čakar, J. & Bujak, E., Pilav, A., Ramic, J., Kalajdzic, A., Pojskic, N. (2021). DNA analysis of skeletal remains of an important historical figure from the period of mediaeval Bosnia. *International Journal of Osteoarchaeology*, 31(5), 857-865.
- Dzehverovic, M., Jusic, B., Pilav, A., Lukic, T., Čakar, J. (2023). Kinship analysis of skeletal remains from the Middle Ages. *Forensic Science International: Genetics*, 63, 102829.
- Fan, H., Chu, J.Y. (2007). A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 5(1), 7-14.
- Gomes, I., Pinto, N., Antão-Sousa, S., Gomes, V., Gusmão, L., Amorim, A. (2020). Twenty Years Later: A Comprehensive Review of the X Chromosome Use in Forensic Genetics. *Frontiers in Genetics*, 11, 926.
- Jusic, B., Dzehverovic, M., Pilav, A., Terzic, S., Zukić, S., Bujak, E., Čakar, J. (2022). Sex determination of medieval skeletal remains: evaluation of anthropological, odontological and genetic methods. *Journal of Bioanthropology*, 2(2), 37-44.
- Jusic, B., Pilav, A., Dzehverovic, M., Čakar, J. (2023). Analysis of aborted fetal material using autosomal STR markers in forensic cases of sexual assault. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 94, 102468.

- Krawczak, M. (2007). Kinship testing with X-chromosomal markers: mathematical and statistical issues. *Forensic Science International: Genetics*, 1(2), 111-114.
- Malyarchuk, B.A., Grzybowski, T., Derenko, M.V., Czarny, J., Drobnić, K., Miścicka-Sliwka, D. (2003). Mitochondrial DNA Variability in Bosnians and Slovenes. *Annals of Human Genetics*, 67(5), 412-425.
- Marjanović, D., Primorac, D., Doğan, S. (Eds.) (2018). *Forensic Genetics – Theory and Application*. Sarajevo, Bosna i Hercegovina: International Burch University.
- National Research Council (US) Committee on DNA Forensic Science: An Update. (1996). *The Evaluation of Forensic DNA Evidence*. Washington (DC), USA: National Academies Press (US).
- Nwawuba Stanley, U., Mohammed Khadija, A., Bukola, A.T., Omusi Precious, I., Ayeubomwan Davidson, E. (2020). Forensic DNA Profiling: Autosomal Short Tandem Repeat as a Prominent Marker in Crime Investigation. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 27(4), 22-35.
- Primorac, D., Škaro, V., Projić, P., Missoni, S., Horjan Zanki, I., Merkaš, S., Šarac, J., Novokmet, N., Ledić, A., Makar, A., Lauc, G., Andelinović, Š., Bašić, Ž., Kružić, I., Neuberg, M., Smolić, M., Smolić, R., Hrستیć, I., Trivanović, D., Konjhodžić, R., Salihefendić, L., Babić Jordamović, N., Marjanović, D. (2022). Croatian genetic heritage: an updated Y-chromosome story. *Croatian Medical Journal*, 63(3), 273-286.
- Roewer, L. (2019). Y-chromosome short tandem repeats in forensics—Sexing, profiling, and matching male DNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, 1(4), 1336.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., John, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026.
- Steele, C., Balding, D. (2014). Statistical Evaluation of Forensic DNA Profile Evidence. *Annual Review of Statistics and Its Application*, 1(1), 361-384.
- Tillmar, A.O., Kling, D., Butler, J.M., Parson, W., Prinz, M., Schneider, P.M., Egeland, T., Gusmão, L. (2017). DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG): Guidelines on the use of X-STRs in kinship analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 29, 269-275.
- Tvedebrink, T., Eriksen, P.S., Mogensen, H.S., Morling, N. (2009). Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics. *Forensic Science International: Genetics*, 3(4), 222-226.
- Van Nieuwerburgh, F., Goetghebeur, E., Vandewoestyne, M., Deforce, D. (2009). Impact of allelic dropout on evidential value of forensic DNA profiles using RMNE. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(2), 225-229.
- Viguera, E., Canceill D., Ehrlich D.S. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *The EMBO Journal*, 20(10), 2587-2595.
- Wyner, N., Barash, M., McNevin, D. (2020). Forensic Autosomal Short Tandem Repeats and Their Potential Association With Phenotype. *Frontiers in Genetics*, 11, 884.
- Yang, Q., Shen, Y., Shao, C., Liu, Y., Xu, H., Zhou, Y., Liu, Z., Sun, K., Tang, Q., Xie, J. (2020). Genetic analysis of tri-allelic patterns at the CODIS STR loci. *Molecular Genetics and Genomics*, 295(5), 1263-1268.



4. **FORENZIČKA ANTROPOLOGIJA**

SAMRA TERZIĆ
SELMA ZUKIĆ

Antropologija je naučna oblast koja se bavi izučavanjem čovjeka u najširem smislu riječi, kako u prošlosti, tako i u sadašnjosti. Dijeli se na nekoliko naučnih oblasti, među koje spada i fizička / biološka antropologija. Forenzička antropologija je naučna disciplina koja se bavi izučavanjem i identificiranjem ljudskih skeletnih ostataka individua čija se smrt desila u nerazjašnjenim okolnostima. I sama sintagma “forenzička antropologija” upućuje na to da je riječ o disciplini koja stoji dvojako između fizičke / biološke antropologije i forenzike. Specifičnost forenzičke antropologije jeste što je ova primijenjena naučna disciplina u najužoj vezi s pravnim problemima i što nastoji odgovoriti na postavljena pravna pitanja. Stoga forenzički antropolozi u najvećem broju slučajeva rade zajedno s nadležnim institucijama za sprovedbu zakona i pod njihovom jurisdikcijom te usko sarađuju s forenzičkim arheolozima, sudskim vještacima i odontolozima.

Nakon pronalaska skeletnih ostataka na mjestu zločina, zadatak forenzičkog antropologa je, prije svega, da odredi da li su u pitanju životinjske ili ljudske kosti. Ako je riječ o ljudskim skeletnim ostacima, analizi prethodi priprema u vidu pranja ili čišćenja te slaganje kostiju u anatomske položaj, što je polazna tačka u procesu utvrđivanja biološkog profila individue od koje potiču skeletni ostaci. Forenzički antropolog će prilikom slaganja kostiju ustanoviti također minimalan broj individua na slučaju koji obrađuje.

Miješanje kostiju je veoma često u slučajevima prirodnih nesreća, avionskih nesreća ili u masovnim grobnicama, tako da se veoma često može desiti dupliciranje kostiju na slučaju. S tim u vezi, prilikom obrade slučaja nužno je odrediti koliko se osoba nalazi na slučaju koji se obrađuje. Minimalan broj individua se određuje tako što, ako na slučaju forenzički antropolog ustanovi dva lijeva humerusa (nadlaktične kosti), najmanji broj individua koji se nalazi na slučaju jeste dva. Ili na primjer, ako se na slučaju nalaze tri desna radijusa (palčane kosti) i dva lijeva femura (butne kosti), minimalan broj individua iznosiće tri (slika 4.1). Prema tome, neophodno je veoma dobro vladati osteologijom (grč. *osteo* – kost + *logos* – nauka), kako bi se vršila dalja antropološka analiza. Antropolog ima za cilj da individualizira ljudske skeletne ostatke tako što će izvući maksimalan broj informacija koje mu pruža osteološka građa.

Zadatak forenzičkog antropologa je da kreira biološki profil individue, koji podrazumijeva:

1. određivanje spola,
2. određivanje starosti,

3. određivanje visine i
4. bilježenje svih promjena na kostima u vidu antemortalnih (povrede koje su se desile i zarasle za života individue), perimortalnih (povrede koje su se desile neposredno pred smrt individue) ili postmortalnih (povrede koje su se desile nakon smrti individue) trauma, kao i svih patoloških promjena koje bi doprinijele identifikaciji individue.

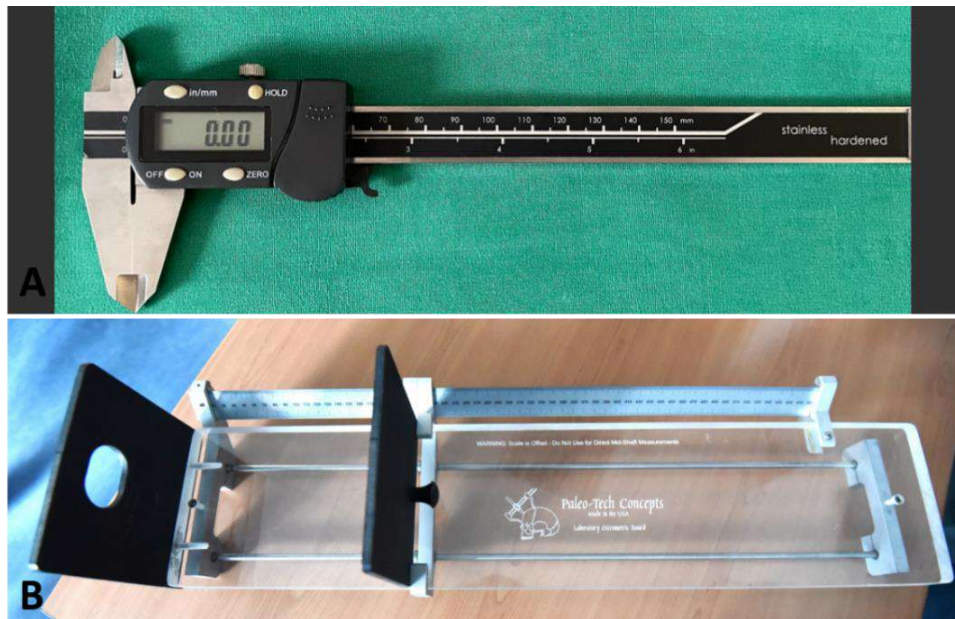


Slika 4.1. Na fotografiji su prikazani desna tibija, tri desna femura, dvije lijeve ulne, mandibula i dvije lijeve klavikule. Minimalan broj individua određuje se na osnovu maksimalnog broja kostiju koje se dupliciraju. U ovom slučaju minimalan broj individua je tri, na osnovu tri desna femura. Maksimalan broj individua, pak, može biti devet, odnosno da svi navedeni skeletni elementi pripadaju različitim individuama.

Određivanje porijekla (etnološkog ili rasnog) može također da bude dio biološkog profila individue. Međutim, antropolozi *Jonathan Bethard* i *Elizabeth Di Gangi* doveli su u pitanje metode i interpretaciju ove kategorije te pozvali zajednicu forenzičkih antropologa SAD da se napusti određivanje rase / porijekla kao jedne od metoda koja će pomoći pri identifikaciji individue, s obzirom na to da su te metode i teoretski i politički sporne.

Metode koje se koriste prilikom antropološke obrade mogu se svrstati u četiri velike kategorije: antroposkopija, osteometrija, hemijske i histološke metode. Antroposkopija podrazumijeva vizualni pregled skeleta, katkad uz pomoć rendgenskih zraka ili ručnih povećala.

Osteometrija podrazumijeva mjerenje ljudskih kostiju (u milimetrima ili centrimetrima) uz pomoć kalipera (slika 4.2. A) ili na osteometrijskim pločama (slika 4.2. B).



Slika 4.2. Osteometrijski instrumenti: A – digitalni kaliper (klizni mjerač), B – osteometrijska ploča

Hemijske metode podrazumijevaju analizu hemijskog sastava određenih struktura na skeletu ili materija koje stoje u vezi sa skeletom (poput zemlje na kojoj se nalazio skelet). Histološkom metodom se proučava mikrostruktura kosti i zuba. Ova metoda podrazumijeva uzorkovanje i bojenje uzetog uzorka te promatranje pod mikroskopom kako bi se odredile demografske karakteristike (starosna dob naročito).

Najčešće dvije metode koje se koriste jesu antroposkopija i osteometrija i korištenjem ove dvije metode može se odrediti biološki profil individue.

4.1 PROCJENA SPOLA

Kreiranje biološkog profila individue uglavnom započinje procjenom spola. Spol se s mnogo većom sigurnošću određuje nakon što individua dosegne spolnu zrelost, mada se funkcionalne razlike u morfologiji skeleta počinju razvijati još i prije rođenja.

Dvije su analize kojima se spol određuje:

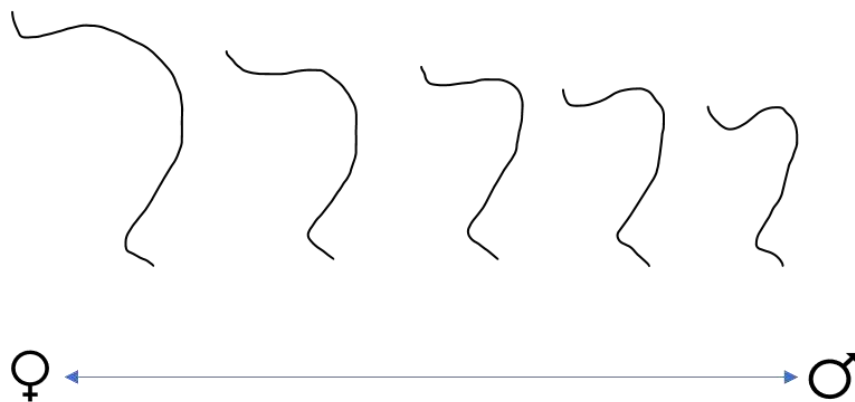
1. vizualnim pregledom morfoloških obilježja skeleta i
2. statističkom analizom izmjerenih vrijednosti različitih dijelova skeleta, pri čemu se najčešće upotrebljavaju diskriminantno-funkcijske statističke analize.

Najuočljivije morfološke razlike muških i ženskih individua nalaze se na zdjeličnoj kosti i glavi. Niz je antropoloških pokazatelja kojima se muška zdjelica razlikuje od ženske (slika 4.3). Pelvis (zdjelica) ženske individue je manji i manje robustan nego muški, ali je širi.



Slika 4.3. Morfološki izgled pelvisa kod muškaraca i žena

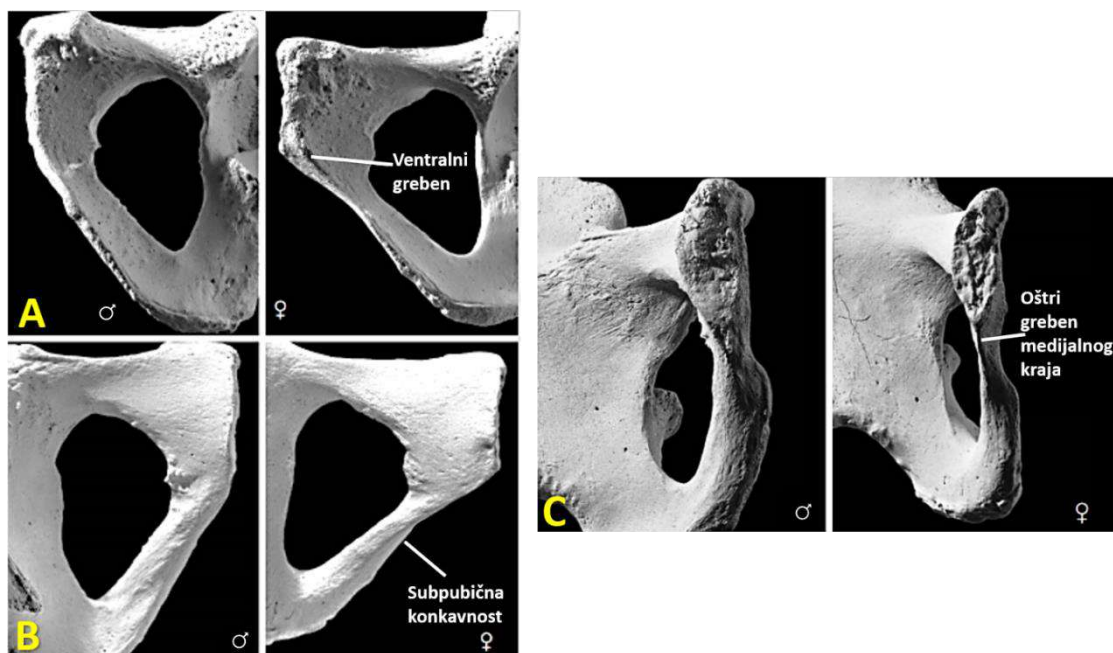
Sjedni urez kod žena je širi i zatvara ugao od 60 stepeni, dok je kod muškaraca taj ugao dosta uži i zatvara ugao od 30 stepeni (slika 4.4). Žene, također, imaju duži trup pubične (stidne) kosti, uključujući i superiorni pubični ramus. Subpubični ugao, koji se formira između donjih krajeva dva inferiorna pubična ramusa, veći je kod žena nego kod muškaraca.



Slika 4.4. Oblik sjednog ureza kod muškarca i žene

Tri su još izuzetno značajna antropološka pokazatelja spolnog dimorfizma na pubičnoj kosti: ventralni greben, subpubična konkavnost te izgled ishiopubičnog ramusa (slika 4.5. A). Ventralni greben je zakrivljeni greben na inferiornoj (ispod posmatranog objekta) površini pubične kosti lateralno (prema vani) od pubičnog zgloba. Javlja se samo kod žena. Subpubična konkavnost se

nalazi na donjoj grani pubične kosti, odmah ispod pubične simfize (vezivno-hrskavični spoj između dvije stidne kosti u prednjem dijelu zdjelice). Subpubična konkavnost jako je izražena kod žena, dok kod muškaraca ta karakteristika nedostaje (slika 4.5. B). Medijalni kraj, koji povezuje pubičnu kost i ishium, kod muškaraca je širok i ravan, dok je kod žena prisutan uski oštri greben (Slika 4.5. C).



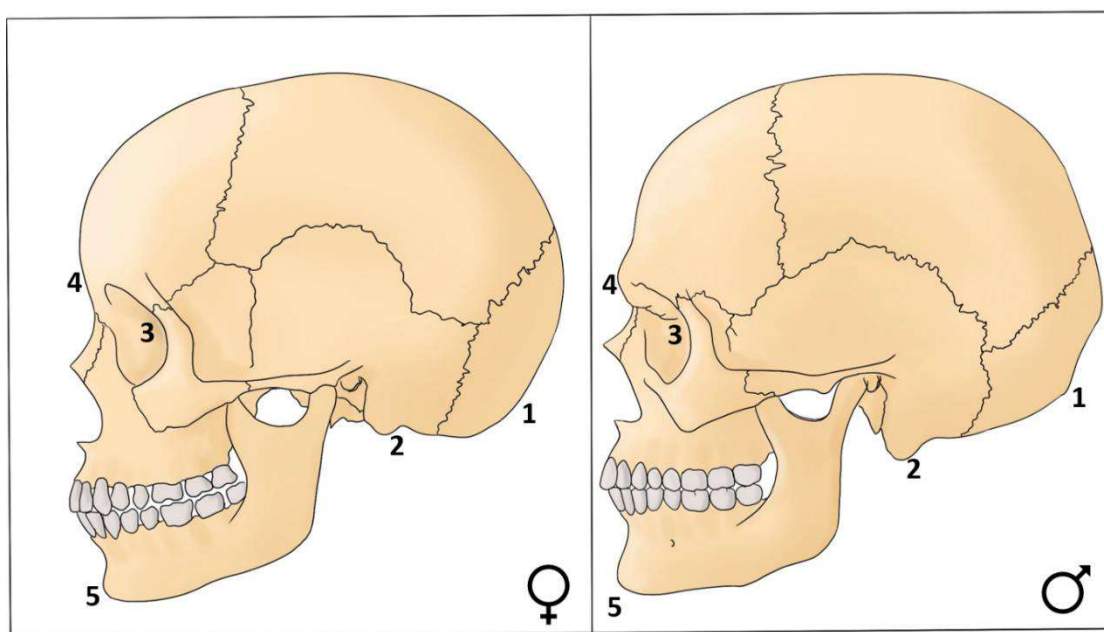
Slika 4.5. Morfološko-fizičke karakteristike pomoću kojih se razlikuju ženska od muške karlične kosti

Lobanje individua također se koriste u procjeni spola. Potrebno je, prije svega, reći da lobanje muškaraca uglavnom karakterizira veća robusnost (slika 4.6), međutim, samo ta karakteristika ne može da bude dovoljna za procjenu spola, s obzirom na to da varira od populacije do populacije.

Nekoliko je antropoloških karakteristika koje ukazuju na spolni dimorfizam:

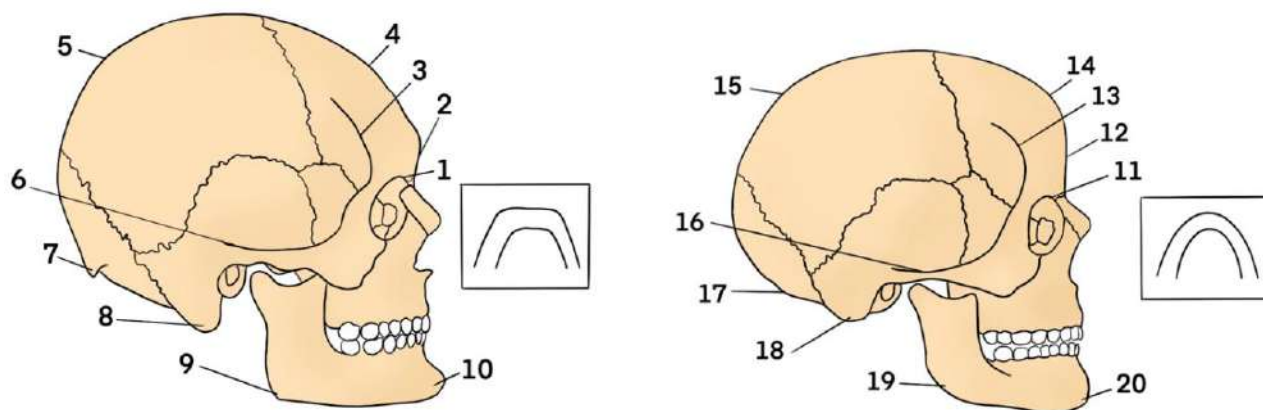
1. nugalni greben – na lateralnoj strani okcipitalne kosti nalaze se hvatišta za mišiće vrata. Koštane brazde od kojih polaze ti mišići jače su izražene kod muškaraca;
2. mastoidni proces – koštana izbočina koja se nalazi na inferiornom (prema dolje, dok je prema gore superiornom) dijelu temporalnih kostiju. Razvija se u vezi s mišićem *musculus sternocleidomastoideus* pa je prema tome robusniji kod muškaraca;

3. supraorbitalna margina – kod žena su orbite (očna šupljina) tanke i oštre, dok su kod muškaraca deblje, zaobljene i s krivinama
4. *glabella* / supraorbitalni greben – kod žena, frontalna (čeona) kost je glatka s malim ili nikakvim izbočenjem, odnosno neravninom, dok su kod muškaraca nadočni lukovi veoma izraženi.
5. mentalna eminencija – ova antropološka tačka se nalazi na mandibuli i očituje se u vidu izbočenja. Kod žena je to izbočenje neznatno, dok je kod muškaraca ono dosta izraženo.



Slika 4.6. Šematski prikaz razlika između ženske i muške lobanje s označenim antropološkim karakteristikama na osnovu kojih se utvrđuje spol: 1 – nuchalni greben, 2 – mastoidni proces, 3 – supraorbitalna margina, 4 – supraorbitalni greben, 5 – mentalna eminencija

Bitno je istaći i da je mandibula kod muškaraca veća i deblja nego kod žena te da je četvrtastog oblika. Na krajevima donje čeljusti nalaze se krakovi koji se nazivaju ramusi. Ramusi mandibule muških individua širi su nego kod žena te zajedno s tijelom mandibule zatvaraju ugao između 90° i 120° , dok je kod žena ugao između 110° i 140° (slika 4.7).



Slika 4.7. Šematski prikaz razlika muške (lijevo) i ženske (desno) lobanje.

Muška lobanja: 1 – debeli rub orbite, 2 – naglašena glabella, 3 – dobro naglašene linije hvatišta mišića, 4 – prema nazad položeno čelo, 5 – velika kalvarija, 6 – zigomatični luk završava iza vanjskog otvora slušnog kanala, 7 – naglašena vanjska potiljačna protuberancija, 8 – veliki naglašen mastoidni nastavak, 9 – angulus mandibule oko 90°, 10 – četvrtasta brada (mentum).
Ženska lobanja: 11 – oštar gornji rub orbite, 12 – slabo razvijena glabella, 13 – linije hvatišta mišića glatke, 14 – uspravno izbočeno čelo, 15 – manja kalvarija, 16 – uža zigomatični luk koji završava ispred ili u nivou vanjskog otvora slušnog kanala, 17 – neizražena vanjska potiljačna protuberancija, 18 – mali mastoidni nastavak, 19 – angulus mandibule tup, oko 125°, 20 – zaobljen mentum.

Određivanje spola na osnovu ostalih skeletnih elemenata, osim pelvisa i glave, dosta je teže s obzirom na to da spolni dimorfizam na njima nije toliko naglašen kao na prethodno navedenim skeletnim elementima. Pa ipak, stručnjaci su razvili metode kojima se spol na postkranijalnom skeletu (skelet bez glave) može odrediti na osnovu diskriminantno-funkcijskih analiza. Dva su bitna preduvjeta za razvijanje diskriminantne funkcije: dovoljan uzorak i već poznat spol. Važno je istaći da nije bitno samo imati dovoljan velik uzorak već da on mora biti iz iste populacije i iz istog vremenskog perioda. Naime, s obzirom na to da način života, kvaliteta prehrane, uvjeti života i eventualne migracije ostavljaju posljedice na skeletnim elementima, jasno je da postoje razlike između savremenih i populacija iz prošlosti. Tako se, na primjer, ne može očekivati da će dužine kostiju (na primjer femura) biti iste kod savremenih populacija i kod populacija iz 19. stoljeća.

Nekoliko stručnjaka je usaglasilo funkcije za određivanje spola na metakarpalima (kosti zapešća), metatarzalima (kosti donožja), humerusu, ulni, kalkaneusu (petna kost), tibiji (goljenjača) i femuru (bedrena kost). Detaljne upute o svim metričkim radnjama – tačkama koje se mjere, tehnikama mjerenja, kao i instrumentima kojima se mjeri – predstavljene su u uputstvima koja su objavila dva antropologa Jane Ellen Buikstra (1945–) i Douglas H. Ubelaker (1946–) pod nazivom *Standardi za prikupljanje podataka s ljudskih skeletnih ostataka* (engl. *Standards for data collection from human skeletal remains*). Naposljetku valja naglasiti da se diskriminantne funkcije moraju testirati i na drugim populacijama kako bi se pokazala njihova valjanost i tačnost, a ne samo na uzorku na kojem je ta funkcija izrađena. Kada su u pitanju djeca, kod njih se ne određuje spol s obzirom na to da do sada nisu razvijene metode za određivanje spola kod djece koje su općeprihvaćene od strane većine osteologa.

4.2 PROCJENA ŽIVOTNE DOBI

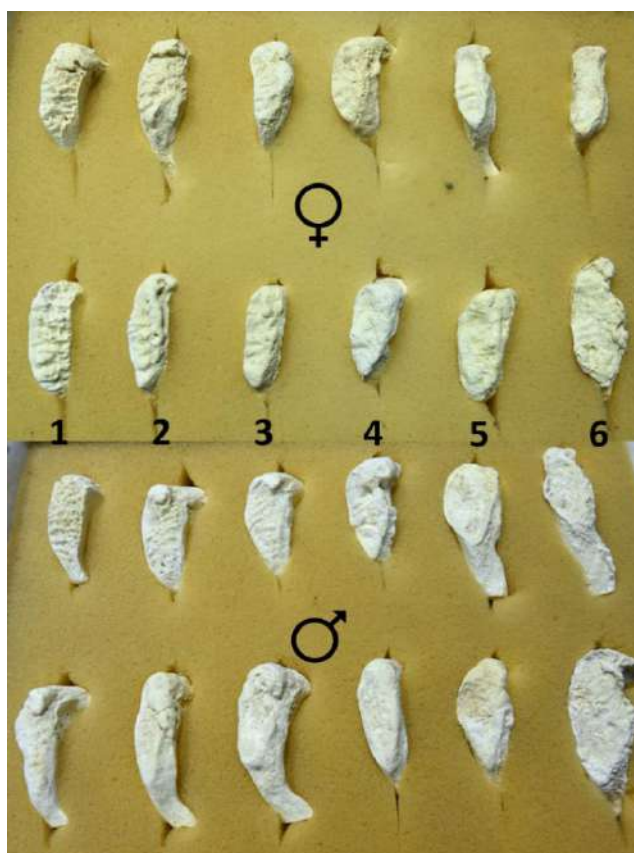
4.2.1 Procjena životne dobi kod osoba koje su završile rast

Procjena životne dobi predstavlja jednu od najvažnijih analiza u forenzičkoj antropologiji i jednu od ključnih značajki pri identifikaciji individue. Niz je antropoloških tačaka i metoda kojima se procjenjuje životna dob. Međutim, bitno je imati na umu da sve metode imaju svoje prednosti i nedostatke te da je, ako je moguće, potrebno primijeniti što više metoda. Također, neophodno je sagledati cijeli skelet i moguće morfološke promjene na pojedinim skeletnim elementima.

Kod osoba koje su završile rast, primjenjuju se druge metode u procjeni starosti, za razliku od individua čiji rast nije bio završen u času smrti. Četiri su glavne metode za procjenu starosti:

1. morfološke promjene na pubičnim simfizama;
2. morfološke promjene na aurikularnim ploham;
3. morfološke promjene na sternalnim krajevima rebara;
4. fuzija (srastanje) kranijalnih sutura.

Najprihvaćenija metoda za određivanje starosti na pubičnim simfizama je metoda *Suchey-Brooks*. Po ovoj metodi razlikuje se šest faza u metamorfozi pubične simfize. Svakoj od tih faza dat je raspon godina tokom kojih se određena faza javlja (slika 4.8).



Slika 4.8. Suchey-Brooks metoda određivanja starosti na pubičnim simfizama. Faza 1: žene 15–24 godine, muškarci 15–23 godine; Faza 2: žene 19–40 godina, muškarci 19–34 godine; Faza 3: žene 21–53 godine, muškarci 21–46 godina; Faza 4: žene 26–70 godina, muškarci 23–57 godina; Faza 5: žene 25–83 godine, muškarci 27–66 godina; Faza 6: žene 42–87 godina, muškarci 34–86 godina

Prema navedenoj metodi, u fazi 1 lice pubične simfize ima talasastu površinu (grebene i brazde), koja seže do pubičnog tuberkula. Horizontalni grebeni su dobro definisani, a pojavljuje se ponekad i ventralno zakošenje. Mada se koštani noduli katkad mogu pojaviti na gornjem dijelu plohe, ovu fazu karakterizira činjenica da gornji i donji dio pubične simfize nisu izdefinisani.

U fazi 2, ploha i dalje može imati grebene, ali su manje izraženi nego u prvoj fazi. U ovoj fazi počinju da se razdvajaju gornji i donji dio pubične simfize s koštanim nodulima ili bez njih. Katkad se u ovoj fazi počinje javljati ventralni bedem.

U trećoj fazi, donji dio pubične simfize odvojen je od gornjeg, a proces stvaranja ventralnog bedema je završen. Koštani noduli nalaze se na gornjoj polovici simfize i uz ventralni rub. Ploha je glatka. Samo se sporadično javljaju plitki grebeni. Dorzalna ploha je formirana. Ovu fazu karakterizira odsustvo hipertrofične promjene, odnosno dodatnog okoštavanja na rubnom dijelu kosti (*lipinga*) na dorzalnom rubu.

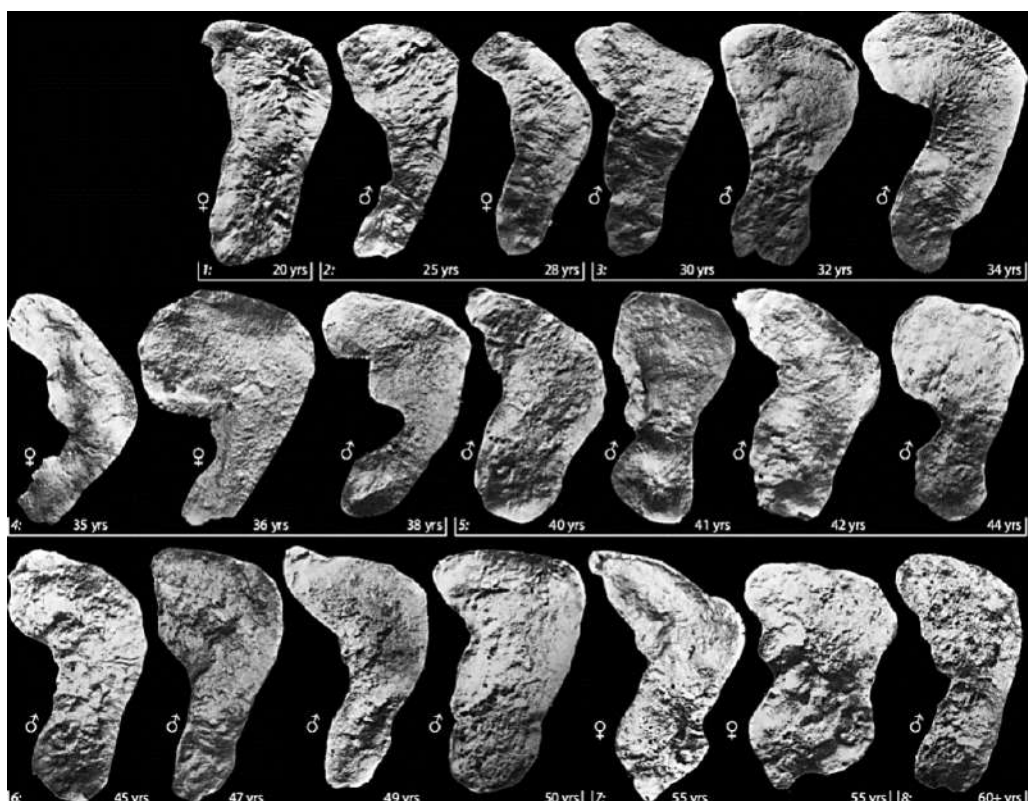
U četvrtoj fazi plohu karakterizira fino zrnasti izgled, mada se sporadično javljaju ostaci horizontalnih grebena. Ovalni izgled plohe najznačajnija je karakteristika ove faze, mada se može pojaviti prorez (*hiatus*) na gornjem ventralnom obodu. Pubični tuberkul je u potpunosti odvojen od simfize time što je gornji dio u potpunosti formiran. Na inferiornom dijelu ventralne strane simfize počinje se javljati hipertrofična kost. Na dorzalnoj strani se katkad može pojaviti blagi liping.

U fazi 5, cijela ploha pubične simfize obrubljena je tankim bedemom i pomalo udubljena u odnosu na rub. Na dorzalnoj strani javlja se umjereni liping, a na ventralnom rubu koštani izrasci. Na koštanom rubu oko simfize nema erozije ili je ona neznatna.

U šestoj fazi ploha pubične simfize još više se udubljuje shodno eroziji ruba. Na ventralnoj strani su prisutne naglašene koštane egzostoze. U većini slučajeva, u ovoj fazi se pubični tuberkul javlja kao zasebni koštani čvor. Lice pubične simfize je porozno ili rupičasto. Pubična simfiza poprima nepravilan izgled.

Pored morfoloških promjena na pubičnim simfizama, na karličnim kostima je prisutan još jedan antropološki pokazatelj doživljene starosti individue. Riječ je o aurikularnoj površini. Lovejoy i saradnici su 1985. godine razvili metodu procjene starosti na aurikularnim površinama po kojoj se razlikuje osam faza u metamorfozi aurikula (slika 4.9).

U fazi 1, aurikularnu plohu karakterizira talasast i fino zrnast izgled. U fazi 2, počinje da se gubi talasast izgled plohe i počinju se javljati strije. Aurikularnu površinu u ovoj fazi karakterizira blagi grubozrnasti izgled. U trećoj fazi, aurikularna ploha u potpunosti gubi valovit, a poprima grubozrnasti izgled. Strije su sada uveliko prisutne. Moguća je blaga aktivnost u retroaurikularnom području, kao i pojava mikroporoznosti.

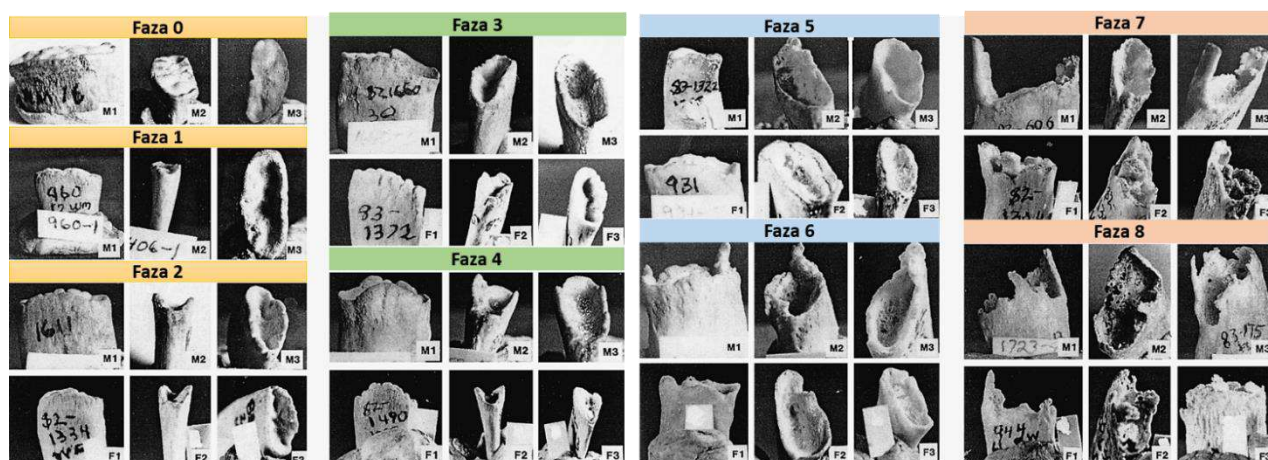


Slika 4.9. Metoda procjene starosti po Lovejoy i sar. Faza I: 20–24 godine; Faza II: 25–29 godina; Faza III: 30–34 godine; Faza IV: 35–39 godina; Faza V: 40–44 godine; Faza VI: 45–49 godina; Faza VII: 50–59 godina; Faza VIII: 60+ godina

U četvrtoj fazi nestaju strije, a ploha ima jednoobrazan grubozrnasti izgled. U retroaurikularnom području može doći do određenih aktivnosti. Na *apexu* se javljaju neznatne promjene. Javlja se i blaga mikroporoznost. U petoj fazi počinju se javljati “otočići” guste tvrde kosti. Grubozrnasta površina plohe se gubi. U retroaurikularnom području odvija se neznatna do umjerena aktivnost. Na *apexu* se također uočavaju blage promjene. Javlja se mikroporoznost, a katkad i makroporoznost.

U šestoj fazi “otočići” guste tvrde kosti” zamjenjuju grubozrnastu površinu. Uočavaju se još veće promjene u retroaurikularnom području, kao i na *apexu*, koji sada dobija nepravilne rubove. Javlja se makroporoznost. U sedmoj fazi aurikularna površina je tvrda i ima nepravilan izgled. U retroaurikularnom području odvijaju se velike morfološke promjene, kao i na *apexu*, koji sada ima nepravilne rubove. Makroporoznost je naglašena.

U posljednoj, osmoj fazi, aurikularna površina je tvrda i ima nepravilan izgled s naglašenim uništenjem subhondralne kosti. Izrazito velike promjene odvijaju se u retroaurikularnom području. Na apexu se javljaju liping i osteofiti. Makroporoznost je naglašena. Također, procjena starosti se može vršiti na osnovu morfoloških promjena na četvrtom rebru (slika 4.10).

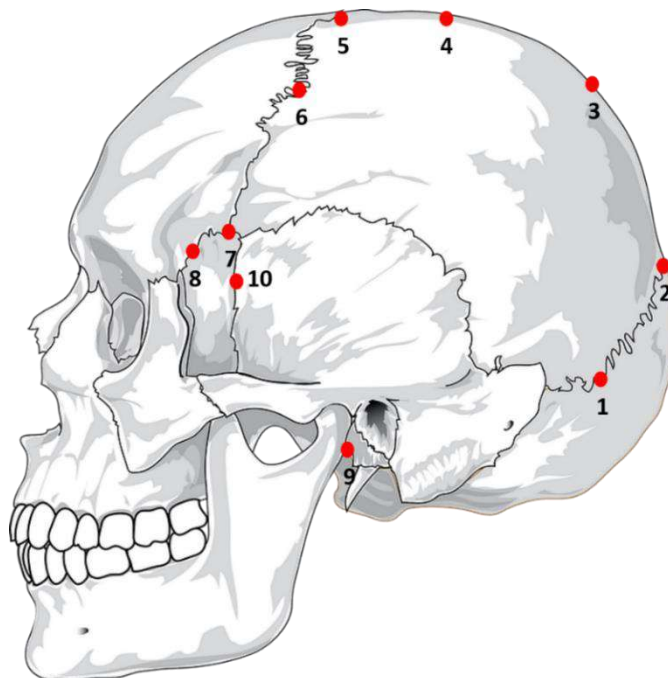


Slika 4.10. Morfološke promjene na četvrtom rebru. Faza 0: <17 godina; Faza 1: 17–19 godina; Faza 2: 20–23 godine; Faza 3: 24–28 godina; Faza 4: 26–32 godine; Faza 5: 33–42 godine; Faza 6: 43–55 godina; Faza 7: 56–64 godine; Faza 8: >64 godine

Metamorfoza sternalnog kraja rebra počinje nakon što se završi rast, tačnije oko 14 godine kod žena i 17. godine kod muškaraca. Metoda po Išcanu i Lothu razlikuje devet faza promjene. Prvu, odnosno nultu fazu karakterizira odsustvo linije srastanja te početak stvaranja jamice na skoro ravnoj talasastoj površini sternalnog kraja rebra. S godinama, sternalni kraj poprima izgled slova “V”. Vremenom, jama se produbljuje i proširuje, pri čemu poprima izgled širokog slova “V” ili slova “U”. Sredinom 30-ih godina starosti krajevi počinju da se tanje i oštre. Kako individua stari, obod postaje nepravilan, unutrašnjost jame porozna, a kvaliteta kosti propada.

Pored gore navedenih metoda, pri procjeni starosti koristi se i metoda na osnovu srastanja ektokranijalnih sutura / šavova. Ovu metodu su predložili autori Meindl i Lovejoy, a kako i sami ističu, njome se može dobiti dobra procjena starosti ako se koristi zajedno s drugim metodama. Deset je tačaka na lobanji čiji se stepen srastanja procjenjuje, a raspon srastanja ide od 0 do 3. Nulom je označena faza gdje nema tragova srastanja, brojem jedan minimalno ili umjereno

srastanje, brojem dva značajno srastanje pri kojem samo neki dijelovi tačke koja se promatra nisu u potpunosti srasli, dok se brojem tri označava srastanje u potpunosti. Nakon što se odrede faze srastanja za svaki šav, potrebno je sabrati brojeve dodijeljene za sljedeće šavove: pterion, midkoronalni, sfenofrontalni, inferiorni sfenotemporalni te superiorni sfenotemporalni šav (slika 4.11).

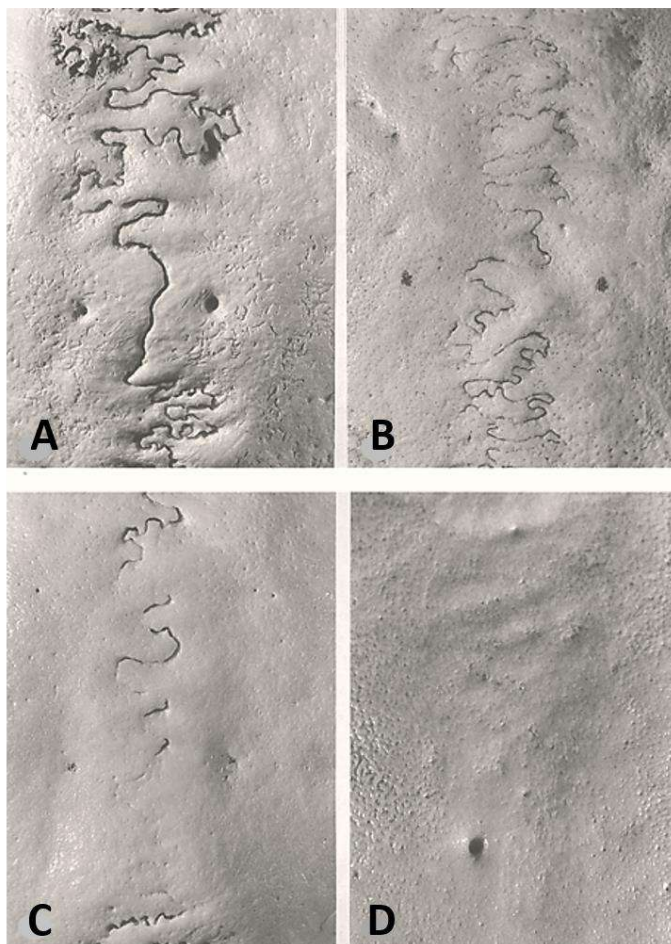


Slika 4.11. Brojevi od 1 do 10 označavaju šavove na lobanji na kojima se posmatra faza srastanja: 1 – midlambdoidalni, 2 – lambda, 3 – obelion, 4 – anteriorni sagitalni, 5 – bregma, 6 – midkoronalni, 7 – pterion, 8 – sfenofrontalni, 9 – inferiorni sfenotemporalni, 10 – superiorni sfenotemporalni

Za broj 1 raspon godina je 20–43, za zbir 2 raspon je 29–45, za brojeve od 3 do 5 raspon godina je 28–51, za zbir 6 raspon godina je 30–54, za zbrove 7 i 8 raspon se kreće od 35 do 56, za zbrove 9 i 10 raspon godina je 40–60+ te za zbrove od 11 do 14 raspon godina je 49–60+.

Sabiranje se vrši za još jednu skupinu šavova: midlambdoidalni, lambda, obelion, anteriorni sagitalni, bregmu, pterion i midkoronalni šav. I u ovoj se skupini brojevi koji označavaju fazu srastanja navedenih šavova sabiru te je, zavisno od dobijenog zbira, određen raspon godina.

Za zbirove 1–2: 18–44 godine, za zbirove 3–6: 23–45 godina, za zbirove 7–11: 28–44 godine, za zbirove 12–15: 31–60 godina, za zbirove 16–18: 35–59 godina te za zbirove 19–20: 34–60 godina (slika 4.12).



Slika 4.12. *Srastanje šava na obelionu: A – otvoren, B – minimalno srastanje, C – značajno srastanje, D – kompletno srastanje*

Pri procjeni starosti odrasle individue treba se posmatrati cijeli skelet i promjene koje se dešavaju na kostima, poput trošenja zuba, histoloških promjena na zubima i kostima te osteoartrične promjene. Treba imati na umu da nijedna metoda procjene starosti ne daje stopostotnu tačnost te da je najbolje upotrijebiti što je više moguće metoda.

4.2.2 Procjena životne dobi kod individua koje nisu završile rast

Pri procjeni starosti djece i adolescenata koriste se nešto drugačije metode nego kod odraslih individua. Najpouzdaniji indikator starosti su zubi. Rast zuba mnogo je povezaniji s hronološkom starosti nego što su to drugi skeletni elementi. Osim toga, na rast zuba veoma malo utiču vanjski faktori, kao što su bolesti ili pothranjenost. Još jedna od prednosti jeste činjenica da se zubi dosta dobro očuvaju tokom godina pa su odličan materijal u forenzičkom, arheološkom i paleontološkom kontekstu. Bitno je napomenuti da postoji razlika u hronologiji nicanja stalnih zuba između dječaka i djevojčica: djevojčice su naprednije od dječaka za otprilike šest mjeseci.

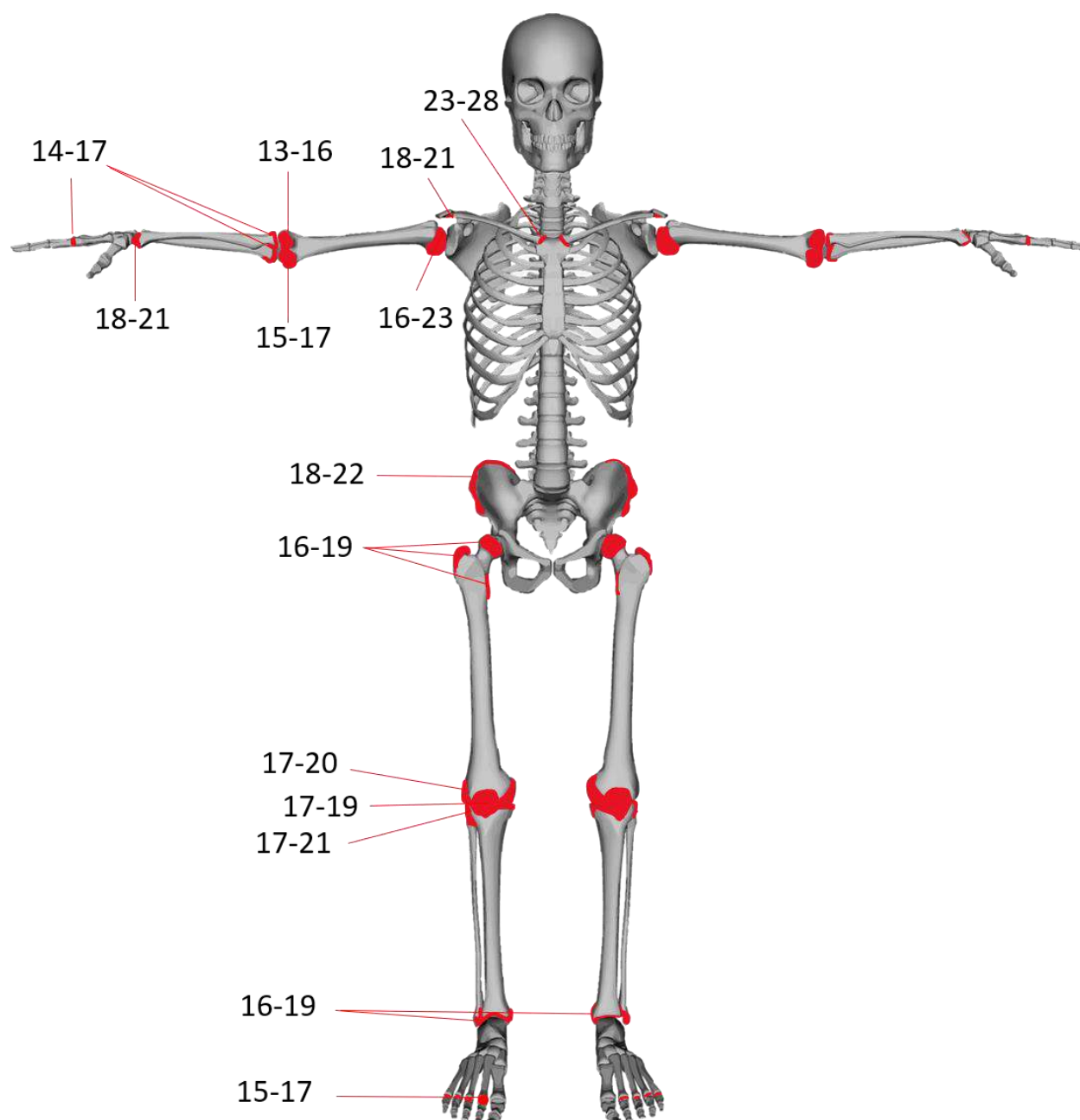
Pored zuba, doživljena starost kod djece može se procijeniti na osnovu drugih skeletnih elemenata. Stručnjaci su prethodno izvršili istraživanja na osnovu kojih se pomoću prethodno izmjenjenih dužina kostiju može odrediti zaživotna dob subadulta. U tabeli 4.1 može se vidjeti primjer kako se određuje zaživotna dob na osnovu dužine femura.

Jedan od nedostataka ove metode procjene starosti jeste to što, za razliku od zuba, na rast dugih kostiju mnogo više utiču vanjski faktori poput pothranjenosti ili bolesti pa su mnogo veće šanse da starost subadulta koju je odredio forenzički antropolog bude manje precizna. Dodatna mogućnost za pogrešku jeste ako se formule izrađene za modernu populaciju primjenjuju na arheološkoj populaciji.

S obzirom na to da kost raste iz nekoliko osifikacijskih centara, odnosno da se sastoji iz nekoliko dijelova, koji će se rastom spojiti u jednu kost, dijete ima više kostiju nego odrasla osoba. Pri rođenju, dijete ima oko 450 osifikacijskih centara, koji će se vremenom i rastom spajati i formirati u 206 kostiju, koliko ima odrastao čovjek, čiji je biološki rast završen. Tako, na primjer, femur se kod djeteta sastoji od dijafize (središnji dio kosti) i četiri epifize (okrajak duge kosti): glava femura, veliki trochanter, mali trochanter i distalni dio epifize. Do dvadesete godine čovjekovog života, ove epifize se spajaju s dijafizom i čine potom jednu kost (slika 4.13).

Tabela 4.1. *Određivanje starosti subadulta na osnovu rendgenogramskih mjera femura prema Cunningham, Scheuer, Black (2016)*

Dob (godine)	Muškarci			Žene		
	n	srednja vrijednost	SD	n	srednja vrijednost	SD
<i>Dužina dijafize</i>						
0,125	59	86,0	5,4	68	87,2	4,3
0,25	59	100,7	4,8	65	100,8	3,6
0,50	67	112,2	5,0	78	111,1	4,6
1,00	72	136,6	5,8	81	134,6	4,9
1,5	68	155,4	6,8	84	153,9	6,4
2,0	68	172,1	7,3	84	170,8	7,1
2,5	72	187,2	7,8	82	185,2	7,7
3,0	71	200,3	8,5	79	198,4	8,7
3,5	73	212,1	11,4	78	211,1	10,0
4,0	72	224,1	9,9	80	223,2	10,1
4,5	71	235,7	10,5	78	235,5	11,4
5,0	77	247,5	11,1	80	247,0	11,5
5,5	73	258,2	11,7	74	257,0	12,2
6,0	71	269,7	12,0	75	268,9	13,5
6,5	72	280,3	12,6	81	279,0	13,8
7,0	71	291,1	13,3	86	288,8	13,6
7,5	76	301,2	13,5	83	299,8	15,2
8,0	70	312,1	14,6	85	309,8	15,6
8,5	72	321,0	14,6	82	318,9	15,8
9,0	76	330,4	14,6	83	328,7	16,8
9,5	78	340,0	15,8	83	338,8	18,6
10,0	77	349,3	15,7	84	347,9	19,1
10,5	76	357,4	16,2	75	356,5	21,4
11,0	75	367,0	16,5	76	367,0	22,4
11,5	76	375,8	18,1	75	378,0	23,4
12,0	74	386,1	19,0	71	387,6	22,9
<i>Ukupna dužina uključujući epifize</i>						
10,0	76	385,1	17,0	83	382,8	21,1
10,5	76	394,2	17,9	75	392,6	23,7
11,0	75	405,2	17,9	76	403,5	24,8
11,5	77	414,8	19,4	75	415,4	25,2
12,0	77	425,6	20,6	74	427,9	25,2
12,5	71	437,1	19,6	67	437,9	23,9
13,0	73	447,4	21,5	69	447,2	24,1
13,5	73	458,4	24,0	63	453,1	22,0
14,0	75	470,8	24,1	64	459,9	22,5
14,5	69	478,9	25,2	41	464,5	20,8
15,0	61	489,0	23,5	57	464,4	21,4
15,5	52	498,5	23,4	12	471,5	26,0
16,0	60	502,8	22,8	40	466,7	24,0
16,5	38	504,5	24,9	3	-	-
17,0	50	508,9	23,2	18	462,9	26,2
18,0	28	511,7	24,4	4	-	-



Slika 4.13. Šematski prikaz hronologije spajanja epifiza s dijafizama nekih kostiju na skeletu muškarca

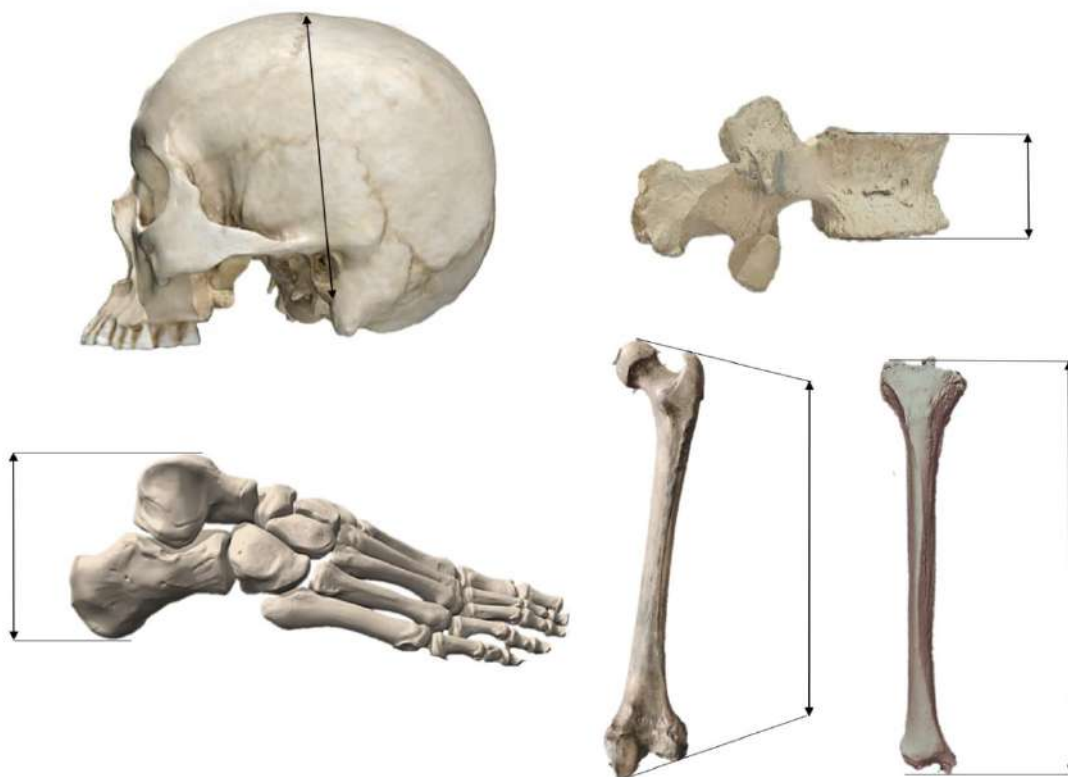
Početkom puberteta dijafize postepeno počinju srastati s epifizama. Različiti skeletni elementi u različito vrijeme počinju sa srastanjem pa je na osnovu faze srastanja moguće procijeniti doživljenu starost individue (tabela 4.2).

Tabela 4.2. Određivanje starosti kod adolescenata i postadolescenata. Hronologija srastanja epifiza na skeletu muškarca i žene prema Schaefer, Black i Scheuer (2009)

Srastanje epifize		Otvoreno		Parcijalno		Sraslo	
		Muškarci	Žene	Muškarci	Žene	Muškarci	Žene
Humerus	Proksimalni kraj	≤20	≤17	16–21	14–19	≥18	≥16
	Medijalni kraj	≤18	≤15	16–18	13–15	≥16	≥13
	Distalni kraj	≤15	≤15	14–18	11–15	≥15	≥12
Radius	Proksimalni kraj	≤18	≤15	14–18	12–16	≥16	≥13
	Distalni kraj	≤19	≤18	16–20	14–19	≥17	≥15
Ulna	Proksimalni kraj	≤16	≤15	14–18	12–15	≥15	≥12
	Distalni kraj	≤20	≤18	17–20	15–19	≥17	≥15
Šaka	Metakarpali i falange	≤17	≤15	14–18	11–16	≥15	≥12
Femur	Glava	≤18	≤15	16–19	14–17	≥16	≥14
	Veliki trohanter	≤18	≤15	16–19	14–17	≥16	≥14
	Mali trohanter	≤18	≤15	16–19	14–17	≥16	≥14
	Distalni kraj	≤19	≤16	16–20	14–19	≥17	≥17
Tibia	Proksimalni kraj	≤18	≤17	16–20	14–18	≥17	≥18
	Distalni kraj	≤18	≤17	16–18	14–17	≥16	≥15
Fibula	Proksimalni kraj	≤19	≤17	16–20	14–17	≥17	≥15
	Distalni kraj	≤18	≤17	15–20	14–17	≥17	≥15
Stopalo	Kalkaneus	≤16	≤12	14–20	10–17	≥16	≥14
	Metatarzali i falange	≤17	≤13	14–16	11–13	≥15	≥11
Skapula	Korako-glenoid	≤16	≤16	15–18	14–18	≥16	≥16
	Akromion	≤20	≤18	17–20	15–17	≥17	≥15
	Inferiorni ugao	≤21	≤21	17–22	17–22	≥17	≥17
	Medijalni rub	≤21	≤21	18–22	18–22	≥18	≥18
Pelvis	Acetabulum	≤16	≤14	14–18	11–16	≥15	≥14
	Ant. inf. ilijačna krijesta	≤18	≤14	16–18	14–18	≥16	≥15
	Ishijalni tuber	≤18	≤15	16–20	14–19	≥17	≥16
	Ilijačna krijesta	≤20	≤16	17–22	14–21	≥18	≥18
Sakrum	Aurikularna površina	≤21	≤20	17–21	15–21	≥18	≥18
	S1-S2 tijela	≤27	≤27	19–30+	14–30+	≥25	≥25
	S1-S2 krila	≤20	≤19	16–27	11–26	≥19	≥19
	S2-S5 tijela	≤20	≤20	16–28	12–26	≥20	≥20
	S2-S5 krila	≤16	≤14	16–21	10–19	≥16	≥13
Pršljenovi	Prstenovi	≤21	≤21	14–23	14–23	≥18	≥18
Rebra	Glave	≤21	≤21	17–22	17–22	≥19	≥19
Klavikula	Medijalni kraj	≤23	≤23	17–30	17–30	≥21	≥21
Manubrium	Prvi rebreni usjek	≤23	≤23	18–25	18–25	≥21	≥21

4.3 PROCJENA UKUPNE TJELESNE VISINE

Procjena visine individue jedno je od najzahtjevnijih područja naučnog istraživanja forenzičkih antropologa. Dvije najčešće metode za izračunavanje visine jesu anatomska i matematička. Anatomska metoda podrazumijeva mjerenje visine lobanje, pršljenova (izuzev atlasa), dužine femura i tibije i visine članka (slika 4.14). Visina se dobija zbirom svih ovih mjera, pri čemu se dodaje i korekcijski faktor za meka tkiva (tabela 4.3).



Slika 4.14. Šematski prikaz mjerenja lobanje, femura, pršljenova, tibije i članka

Tabela 4.3. Korekcijski faktor za meka tkiva pri primjeni anatomske metode izračunavanja visine individua prema Byers (2005)

Izmjerena visina (u cm)	Muškarci (cm)	Žene (cm)
153,5 ili manje	10,0	9,2
Preko 153,5, ali manje od 165,4	10,5	9,7
165,5 ili više	11,5	10,6

Iako je veoma precizna, najveći nedostatak ove metode je što se u praksi cjeloviti skeleti dosta rjeđe pronalaze. Zbog toga je razvijena matematička metoda koja podrazumijeva mjerenje dugih kostiju na skeletu (humerus, radius, ulna, femur, tibia i fibula – lisna kost). Ove mjere se zatim ubacuju u formule za izračunavanje visine (tabela 4.4).

Ako se primjenjuje ova metoda, mora se imati na umu da tjelesne proporcije variraju među populacijama (na primjer, tjelesne proporcije meksičke i norveške populacije nisu i ne mogu biti iste) pa je neophodno primijeniti odgovarajuću formulu. Također, neophodno je znati spol individue. Sve ove karakteristike pomažu kako bi se pogreška svela na minimum. Ako su spol i populacijska pripadnost nepoznati, onda se primjenjuje generalna formula, koja s tim u vezi dovodi i do manje preciznosti.

Tabela 4.4. *Formule za izračunavanje visine na osnovu mjerenja dugih kostiju koje su predložile Trotter i Gleser; preuzeto od Byers (2005)*

Muškarci bijele puti						Muškarci crne puti							
St=	3,08	*	Hum	+	70,45	4,05	St=	3,26	*	Hum	+	62,10	4,43
St=	3,78	*	Rad	+	79,01	4,32	St=	3,42	*	Rad	+	81,56	4,30
St=	3,70	*	Uln	+	74,05	4,32	St=	3,26	*	Uln	+	79,29	4,42
St=	2,38	*	Fem	+	61,41	3,27	St=	2,11	*	Fem	+	70,35	3,94
St=	2,52	*	Tib	+	78,62	3,37	St=	2,19	*	Tib	+	86,02	3,78
St=	2,68	*	Fib	+	71,78	3,29	St=	2,19	*	Fib	+	85,65	4,08
Žene bijele puti						Žene crne puti							
St=	3,36	*	Hum	+	57,97	4,45	St=	3,08	*	Hum	+	64,67	4,25
St=	4,74	*	Rad	+	54,93	4,24	St=	2,75	*	Rad	+	94,51	5,05
St=	4,27	*	Uln	+	57,76	4,30	St=	3,31	*	Uln	+	75,38	4,83
St=	2,47	*	Fem	+	54,74	3,72	St=	2,28	*	Fem	+	59,76	3,41
St=	2,90	*	Tib	+	59,24	3,66	St=	2,45	*	Tib	+	72,65	3,70
St=	2,93	*	Fib	+	59,61	3,57	St=	2,49	*	Fib	+	70,90	3,80
Muškarci azijskog porijekla						Muškarci hispanskog porijekla							
St=	2,68	*	Hum	+	83,19	4,25	St=	2,92	*	Hum	+	74,94	4,24
St=	3,54	*	Rad	+	82,00	4,60	St=	3,55	*	Rad	+	80,71	4,04
St=	3,48	*	Uln	+	77,45	4,66	St=	3,56	*	Uln	+	74,56	4,05
St=	2,15	*	Fem	+	72,57	3,80	St=	2,44	*	Fem	+	58,67	2,99
St=	2,40	*	Fib	+	80,56	3,24	St=	2,50	*	Fib	+	75,44	3,52

Ako su, na primjer, na skeletu odraslog muškarca iz Evrope (Njemačka) prisutne i očuvane sve duge kosti, visina će se odrediti na osnovu formule koja je izrađena za muškarce bijele puti (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Dužine dugih kostiju odraslog muškarca iz Evrope (Njemačka) izražene u centimetrima

Dužine dugih kostiju izražene u centimetrima	
<i>Lijevi humerus</i>	33,4
<i>Lijeva ulna</i>	28,2
<i>Lijevi radius</i>	25,5
<i>Lijevi femur</i>	47,7
<i>Lijeva tibia</i>	40,5
<i>Lijeva fibula</i>	39,8
<i>Desni humerus</i>	33,9
<i>Desna ulna</i>	28,4
<i>Desni radius</i>	25,8
<i>Desni femur</i>	47,9
<i>Desna tibia</i>	41,1
<i>Desna fibula</i>	40,0

Ako se gore navedene dužine dugih kostiju primijene na formuli za izračunavanje visine odraslih muških individua bijele puti, dobiće se vrijednosti prikazane u tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Primjer računanja visine odrasle muške individue bijele puti primjenom formula koje su predložile Trotter i Gleser

3,08 x	33,4 +	70,45	=173,32	+/- 4,05
3,08 x	33,9 +	70,45	=174,86	+/- 4,05
3,78 x	25,5 +	79,01	=175,4	+/- 4,32
3,78 x	25,8 +	79,01	=176,53	+/- 4,32
3,7 x	28,2 +	74,05	=178,39	+/- 4,32
3,7 x	28,4 +	74,05	=179,13	+/- 4,32
2,38 x	47,7 +	61,41	=174,93	+/- 3,27
2,38 x	47,9 +	61,41	=175,41	+/- 3,27
2,52 x	40,5 +	78,62	=180,68	+/- 3,37
2,52 x	41,1 +	78,62	=182,19	+/- 3,37
2,68 x	39,8 +	71,78	=178,44	+/- 3,29
2,68 x	40 +	71,78	=178,98	+/- 3,29

Kada se procjenjuje visina, uzima se najveća vrijednost s najmanjom devijacijom. U ovom slučaju to je proračun za desni femur. Prema tome, visina individue bi iznosila 172,4–178,68 cm.

No, kada bi gore navedene dužine dugih kostiju pripadale muškoj odrasloj individui moderne bosanske populacije, onda bi se primijenila formula koju su izradili *Sarajlić* i saradnici 2006. godine, za modernu bosansku populaciju (tabela 4.7). Tu su dati proračuni i za zbirne dužine femura i tibije i femura i fibule.

Tabela 4.7. Formula za izračunavanje visine muškaraca moderne bosanske populacije prema *Sarajlić i sar. (2006)*

	FORMULA				SE	R
STATURE=	$0,268 \times \text{Femur}$	+	48,62	+/-	4,44	0,83
STATURE=	$0,329 \times \text{Tibia}$	+	48,69	+/-	4,01	0,86
STATURE=	$0,345 \times \text{Fibula}$	+	42,79	+/-	3,57	0,89
STATURE=	$0,160 \times (\text{Femur} + \text{Tibia})$	+	37,89	+/-	3,62	0,89
STATURE=	$0,163 \times (\text{Femur} + \text{Fibula})$	+	35,53	+/-	3,48	0,90
STATURE=	$0,106 \times \text{Femur} + 0,221 \times \text{Tibia}$	+	39,86	+/-	3,83	0,90
STATURE=	$0,069 \times \text{Femur} + 0,274 \times \text{Fibula}$	+	37,52	+/-	3,51	0,90

Ako se primijeni gore navedena formula za zbirne dužine femura i tibije te femura i fibule (tabela 4.5), dobiće se iznosi prikazani u tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Primjer računanja visine odrasle muške individue iz bosanskohercegovačke populacije primjenom formule koju su predložili *Sarajlić i saradnici (2006)*

L femur + L tibia	$0,160 \times$	88,2	+ 37,89	= 179,01	+/- 3,62
L femur + L fibula	$0,163 \times$	87,5	+ 35,53	= 178,15	+/- 3,48
D femur + D tibia	$0,160 \times$	89	+ 37,89	= 180,29	+/- 3,62
D femur + D fibula	$0,163 \times$	87,9	+ 35,53	= 178,81	+/- 3,48

Na osnovu navedenog proračuna, visina individue se kreće u rasponu od 176.67 do 183.91 cm. Mada proračuni femura i fibule imaju manju devijaciju, proračun za femur i tibiju ima prednost.

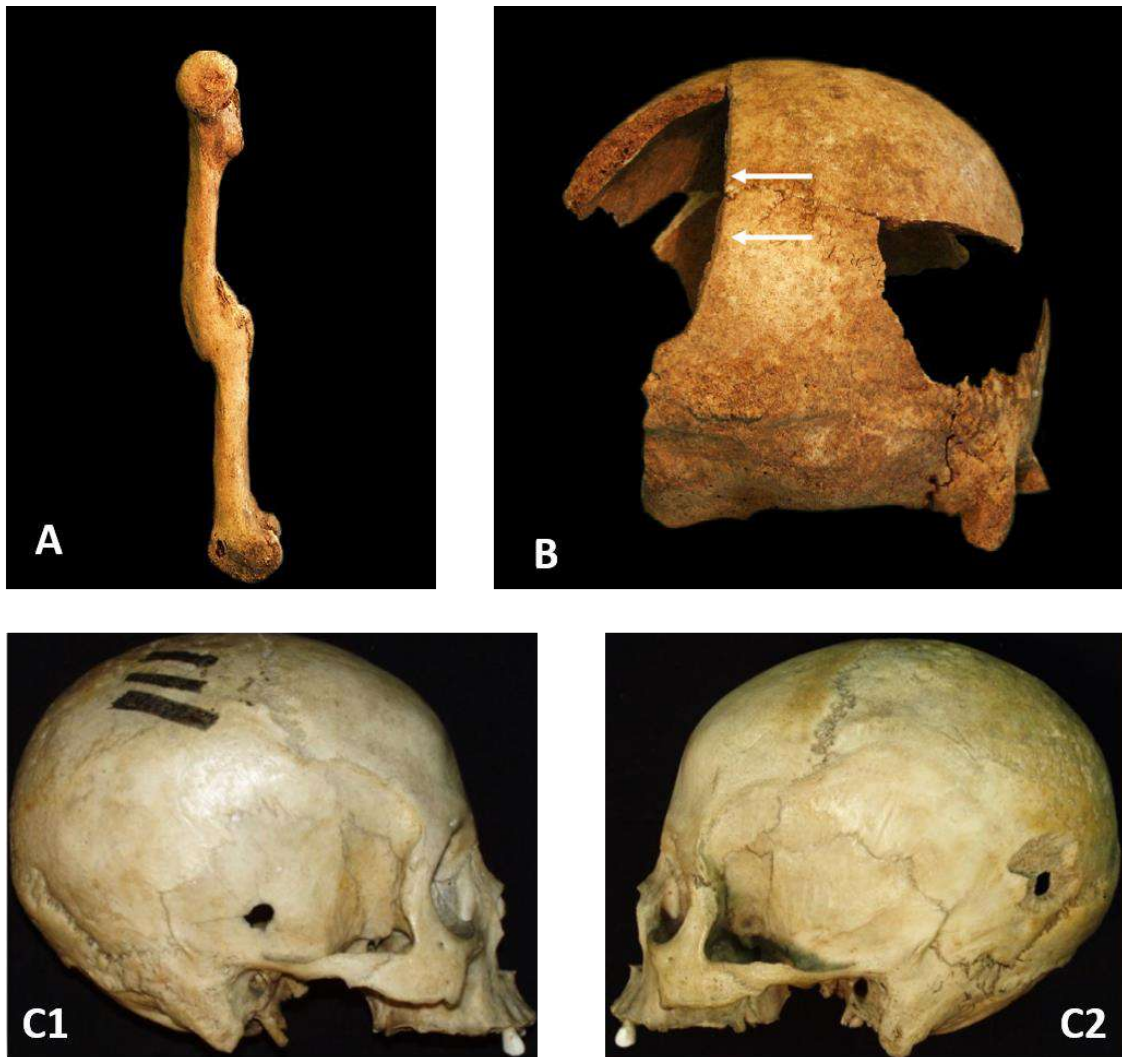
Pored navedenih metoda, istraživači su ponudili i metode za izračunavanje visine na osnovu nekih drugih skeletnih elemenata, poput metakarpala ili metatarzala. Međutim, te metode ne nude toliko precizan proračun. Neophodno je spomenuti i da se visina kod subadulta ne izračunava s obzirom na njihov konstantan i brz rast, a samim tim i veoma brzu zastarjelost proračuna.

4.4 TRAUME NA SKELETNIM OSTACIMA

Nakon kreiranja biološkog profila individue, od izuzetnog je značaja identificirati eventualno prisutne traume na skeletu. Jedno od gorućih pitanja koje se tada nameće jeste kada se trauma dogodila. S tim u vezi postoje tri vrste trauma:

1. *Antemortem* traume – ozljede koje su se desile prije smrti. Ovakva vrsta trauma može biti od pomoći pri identifikaciji individue. Ozljede koje su se desile mnogo prije smrti karakterizira remodeliranje kosti, s obzirom na to da se koštano tkivo regenerira pa su rubovi frakture zatvoreni i obli (slika 4.15. A i B).
2. *Perimortem* traume – ozljede koje su se dogodile u času smrti ili neposredno pred smrt. Ova vrsta trauma je od značaja pri otkrivanju uzroka smrti individue. Kod perimortalnih trauma nema tragova zacjeljivanja na kosti. Rubovi frakture su oštri, a boja kosti na rubovima frakture ista je kao i boja okolne kosti (slika 4.15. C).
3. *Postmortem* traume – ozljede koje su se desile mnogo poslije smrti. Postmortalne traume pružaju informacije o sudbini tijela u periodu između časa smrti i časa pronalaska. Kod ove vrste trauma kost je fragmentirana s oštrim krajevima te ima drugačiju boju u odnosu na ostatak kosti (slika 4.16).

Također, u forenzičkoj je nauci od osobite važnosti identificirati vrstu nanese traume i oružje koje ju je uzrokovalo. S tim u vezi postoji nekoliko vrsta trauma: posjekotine, nagnječenja, nagnječno-razderne rane, razderotine, ubodi i prostrelne rane.



Slika 4.15. A – antemortalna trauma dijafize desnog femura, koja se manifestuje loše zaraslim kalusom praćen blagim zaraslim osteomijelitisom, B – masivna perimortalna trauma, posjekotina, na lijevoj parietalnoj i okcipitalnoj kosti, C – perimortalne traume na desnoj temporalnoj i lijevoj parietalnoj kosti. Vrsta traume: prostrelna rana. Na slici C1 je ulaz projektila, na slici C2 je izlaz projektila.



Slika 4.16. *Postmortalno oštećenje donje čeljusti djeteta: čeljusti nedostaje lijevi dio.*

Srednjovjekovno groblje Markov Kamen, Zenica

4.5 PATOLOŠKE PROMJENE NA KOSTIMA

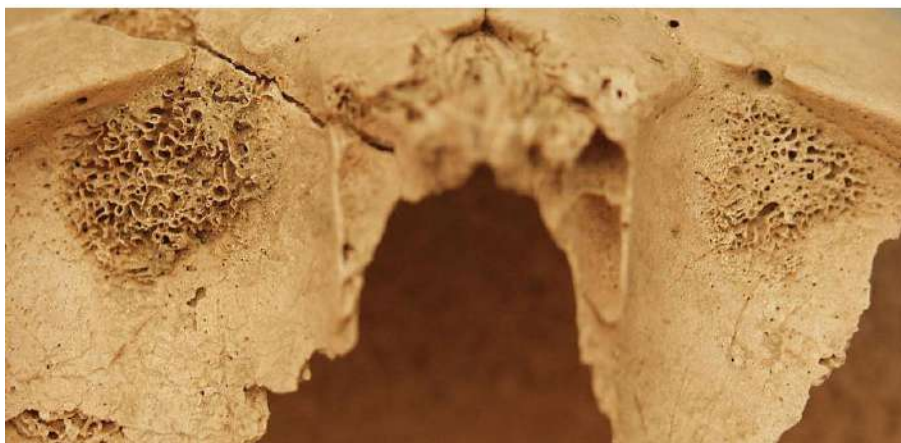
Patologija je naučna oblast koja se bavi bolestima, njihovim uzrocima, procesima, razvojem i njihovim posljedicama. Patologija je veoma široka naučna oblast, a patološke promjene na kostima proučavali su mnogi istraživači te su dostupne mnogobrojne studije koje se bave ovim problemom.

Najveći problem s kojim se suočavaju antropolozi jeste činjenica da veliki broj bolesti ne napada koštano tkivo te da smrt često nastupi prije nego što se patološke promjene stignu proširiti na kost. Patološka stanja zavise od dosta faktora, poput endokrinih poremećaja, loše prehrane, kongenitalnih deformacija te infekcijskih bolesti. Ustanovljene su mnoge kategorizacije patoloških promjena koje se uočavaju na skeletnim ostacima. Prema Burnsvoj podjeli razlikujemo:

1. promjene na kostima uzrokovane starenjem i hormonalnim disbalansom (u ovu vrstu promjena spadaju osteoarthritis, osteomalacia, osteoporoza itd.);
2. metaboličke promjene na kostima uzrokovane neadekvatnom prehranom (u ovu vrstu promjena spadaju hipoplazija zubne cakline, promjene na svodovima orbita lobanje (*cribra orbitalia*), rahitis itd.);
3. bakterijske infekcije (u bakterijske infekcije spadaju periostitis, osteitis, osteomijelitis, sifilis, tuberkuloza, lepra itd.);
4. neoplazme (*osteoma* – benigni koštani tumori i *osteosarcoma* – maligni tumori kosti).

S druge strane, postoje mnogo iscrpnije kategorizacije antemortalnih skeletnih stanja. Prema autorima Ortner i Putshar, patološka stanja na kostima manifestuju se u tri forme: litičkoj, proliferativnoj i deformativnoj. Litičke lezije podrazumijevaju nenormalan gubitak kosti kao što su erozije te uništenje kortikalne ili trabekularne kosti.

Najčešća bolest koja uzrokuje litičke promjene na kostima je anemija. Anemija na kostima uzrokuje stanje koje se naziva porotička hiperostoza, a manifestuje se u vidu pora uglavnom na okcipitalnoj, ali se sreće i na parietalnim kostima, frontalnoj kosti ili bilo kojoj kosti lica (slika 4.17). Drugi, jako čest litički defekt, jeste odumrlost kosti, odnosno nekroza. Ovu vrstu defekta uzrokuje svaki faktor koji sprečava dolazak krvi do određenog dijela kosti.



Slika 4.17. *Umjerena cribra orbitalia nastala anemijom*

Rezultat ovog poremećaja je odumrlost kosti, koja ostavlja šupljinu na kosti, a ponekad i slobodnoplutajući osteološki fragment. Tipičan primjer ove patološke promjene su *Šmorlovi defekti* (slika 4.18).

Proliferativne lezije, s druge strane, podrazumijevaju pretjeranu depoziciju kosti na različitim lokacijama skeleta. Najčešća proliferativna patološka stanja javljaju se na tijelima pršljenova u vidu osteofita (slika 4.19), što je usko povezano s osteoartritisom. Deformativne lezije podrazumijevaju abnormalne oblike kosti. Dva najčešća tipa deformativnih lezija su ekološkog i kongenitalnog porijekla. Rahitis kod djece te osteomalacija kod odraslih su najrepresntativniji predstavnici ove vrste lezija. U kongenitalne deformitete spadaju kifoza i skolioza.



Slika 4.18. Šmorlov defekt na lumbalnom pršljenu.

Srednjovjekovno groblje u Milima, Visoko

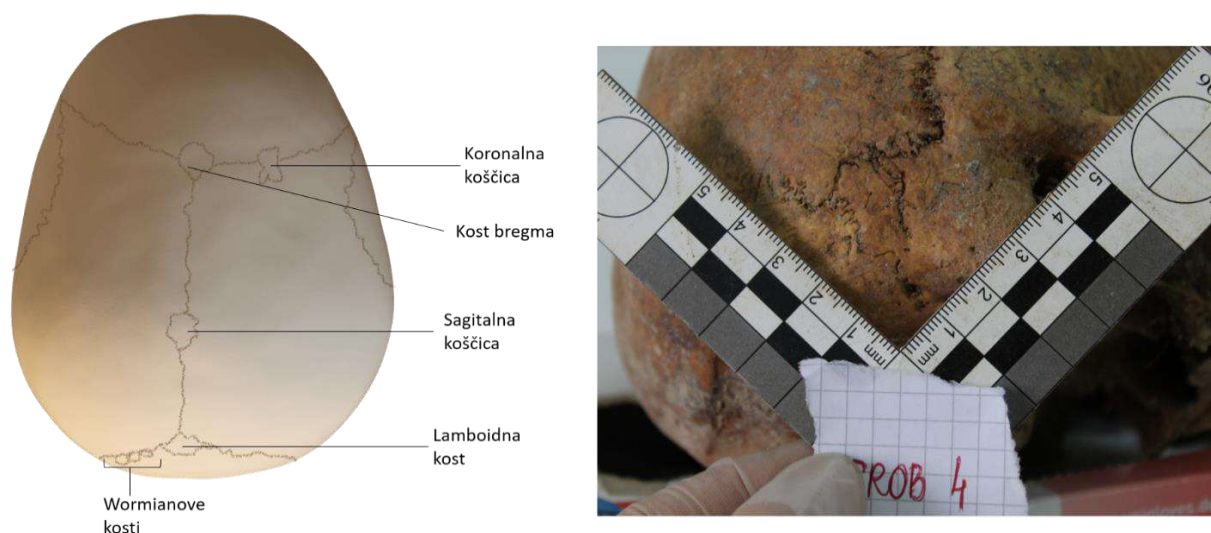


Slika 4.19. Osteofit na lumbalnom pršljenu.

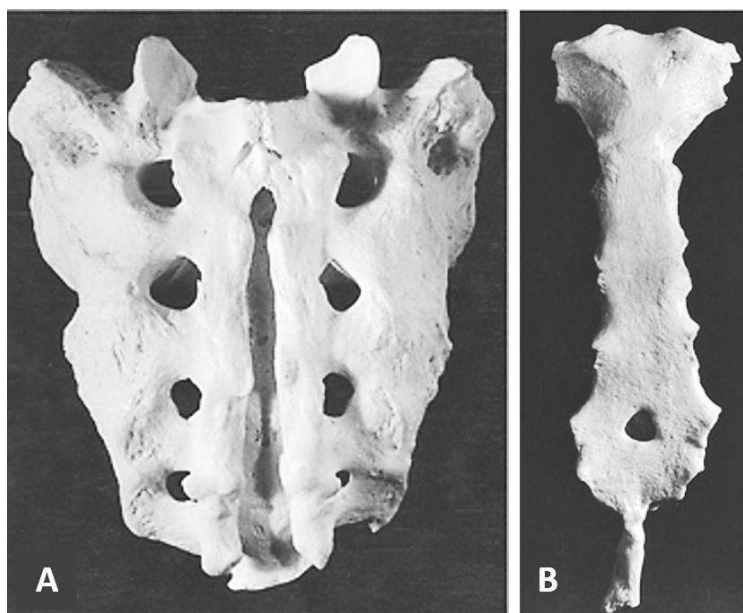
Srednjovjekovno groblje u Milima, Visoko

Pored navedenih patoloških stanja, neophodno je spomenuti i skeletne anomalije, koje ne spadaju u patološke promjene. Te anomalije se javljaju u četiri forme: dodatna okoštavanja, nesrastanje kosti, dodatna foramina te raznovrsne anomalije. Dodatna okoštavanja zapravo predstavljaju dodatne kosti na skeletu, koje inače nisu uobičajene. Na lobanji se najčešće javljaju oko šavova (slika 4.20).

Još jedna česta pojava na ljudskom skeletu jesu anomalije nesrastanja kosti. Manifestuju se tako što osifikacijski centri ne srastu tokom godina, kao što bi inače trebali. U ovu vrstu anomalija spada *spina bifida* (slika 4.21. A), kongenitalna anomalija, kod koje desni i lijevi dio posteriornog dijela sakruma ne sraste, a koji bi inače trebao da sraste i da formira neuralni luk. Dodatna foramina na skeletu predstavlja dodatne otvore na kosti, koji inače nisu uobičajeni (slika 4.21. B). Dosta često se javljaju na kostima lica.



Slika 4.20. Dodatna okoštavanja na lobanji, koja nisu uobičajena, ali nisu ni patološka stanja (šema lijevo). Desno je prikazano dodatno okoštavanje između okcipitalne, desne temporalne i desne parietalne kosti koje se naziva asterionska kost. Srednjovjekovno groblje Divičani kod Jajca



Slika 4.21. Anomalije nesrastanja kosti: A – spina bifida, B – kongenitalna perforacija sternuma (grudne kosti), koju studenti početnih godina osteologije greškom karakteriziraju kao prostrijelnu traumu

U ostale anomalije spadaju *trepanacije*, odnosno veće ili manje rupe na kostima glave, koje su nastale kao rezultat operacije mozga. Slične trepanacije su amputacije, gdje se dio kosti odstranjuje (slika 4.22).



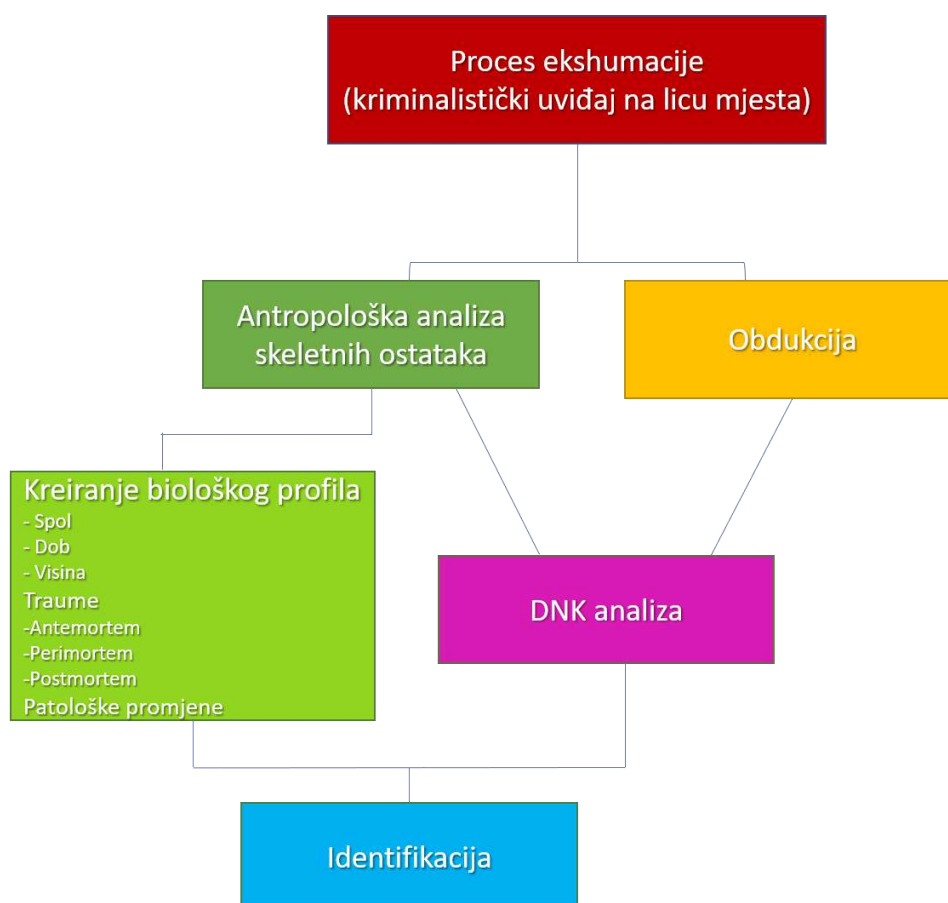
Slika 4.22. Velika trepanacija desne temporalne, desne sfenoidne (klinaste) i desne parietalne kosti, koja je prethodila hirurškom odstranjenju dijela mozga

4.6 FORENZIČKA ANTROPOLOGIJA U PRAKSI U BOSNI I HERCEGOVINI

U prethodnom dijelu teksta navedene su teoretske činjenice i metode koje se primjenjuju u forenzičkoj antropologiji, a koje imaju za cilj kreiranje biološkog profila individue koja je bila predmetom analize. Po pronalasku mjesta zločina, pristupa se istraživanju lokacije i iskopavanju skeletnih elemenata. Istraga zapravo predstavlja kriminalistički uviđaj lica mjesta, koji se obavlja po zakonima države u kojoj se obavlja istražna radnja. Uviđaju prisustvuju ovlašteni stručnjaci, među kojima i forenzički arheolozi i antropolozi. Po završetku iskopavanja i kriminalističkog uviđaja, pristupa se antropološkoj analizi skeletnih setova u za to predviđenim prostorijama. Kao što je već navedeno, zadatak antropologa je kreiranje biološkog profila individue, što podrazumijeva procjenu spola, dobi u trenutku smrti, visine, porijekla i postmortalnog intervala. Također, forenzički antropolozi konstatuju prisustvo povreda koje su dovele do smrti te

eventualnih ranijih trauma i biljega koji mogu pomoći u identifikaciji individue. Za pouzdanu identifikaciju osobe u obzir se uzimaju rezultati genetičke analize (DNK profiliranje).

Ipak, u nekim slučajevima antropološka analiza donosi krucijalne činjenice o identitetu osobe, što posebno dolazi do izražaja u slučajevima masovnih grobnica i sekundarnih i tercijarnih grobnica, kada rezultati DNK analize veoma često nisu dovoljno informativni ili mogu navesti na pogrešan zaključak. Konkretno, analizom DNK može se potvrditi da skeletni ostatak pripada nekoj osobi, međutim, ako su skeletni ostaci relocirani ili pomiješani, onda antropolog može zaključiti tek da li se radi o jednoj osobi ili monozigotnim blizancima. Isto tako, analizom DNK može se potvrditi da se dvije osobe nalaze u srodstvu roditelj – dijete, ali u slučajevima kada je u analizu uključeno više djece, ovom analizom se ne može ustanoviti koje je tačno dijete u pitanju (slika 4.23).



Slika 4.23. Šematski prikaz identifikacije skeletnih ostataka

Neophodno je naglasiti da se u Bosni i Hercegovini forenzička antropologija primjenjuje samo u slučajevima ratnog zločina. U slučajevima koji nisu vezani za osobe nestale u periodu 1992–1995, forenzički antropolozi se ne angažuju. Uviđaju u tim slučajevima prisustvuje ovlašteni specijalista sudske medicine. Ovdje navedeni primjer iz prakse naglašava značaj antropološke analize u identifikaciji žrtava rata.

Naime, u vihoru ratnih dešavanja u Bosni i Hercegovini (1992–1995) nestala su tri brata. Jedan je imao 24 godine, drugi 31, a treći 33 godine. U primjeru se neće navoditi identiteti individua, već će biti označeni kao Prvi Brat, Drugi Brat i Treći Brat. Osobe su prijavljene kao nestale i srodnici su ovlaštenim institucijama pružili sve potrebne informacije koje bi dalje mogle poslužiti pri njihovom pronalasku i identifikaciji. Od potrebnih informacija date su i, između ostalog, fizičke karakteristike nestalih osoba, poput starosti u momentu kada je osoba nestala, visine, boje kose, svih antemortalnih povreda, zdravstvenih poteškoća (poput informacije na primjer da je kod jedne individue jedna noga bila zakrivljena), intervencija na zubima itd. Takve informacije se definišu kao antemortem informacije i služe za usporedbu s postmortalnim informacijama, koje dobiju forenzički antropolozi analizom skeleta. Srodnici su dali referentne uzorke krvi za analizu DNK. Nekoliko godina poslije, sve tri individue su ekshumirane iz masovnih grobnica te su obavljene odontološka, antropološka i DNK analiza. S obzirom na to da su srodnici dali referentne uzorke krvi, urađena je komparacija DNK profila dobijenih za skeletne ostatke i DNK profila srodnika, međutim, na osnovu provedene genetičke analize nije bilo moguće utvrditi individualne identitete trojice braće. Zbog toga je bilo neophodno provesti dodatne antropološke analize kako bi se te tri individue u konačnici i identificirale. S obzirom na činjenicu da se radilo o braći, visine su im bile približne: Prvi Brat je bio visok 180 cm, Drugi Brat 178 cm, a Treći Brat 177 cm. S druge strane, procjena tjelesne visine prikazuje se u određenom rasponu pa antropolozi nisu mogli iskoristiti dobijene informacije pri daljnjoj individualizaciji, s obzirom na to da je za svu trojicu braće raspon visine obuhvatao sve prethodno navedene iznose.

Međutim, druge antropološke značajke su bile od koristi. Tako, na primjer, kako je Prvi Brat imao 24 godine u času smrti, na skeletu su uočena dva značajna pokazatelja. Prvo je uočeno da su prvi i drugi segment sakruma (krstačne kosti) parcijalno srasli, što je ukazivalo na to da individua ima manje od 27 godina. Drugi pokazatelj bila je klavikula (ključna kost), koja je također bila parcijalno srasla, što je pokazatelj da je individua bila starosti između 17 i 28 godina. Imajući u

vidu da su druga dvojica braće bila starija, na osnovu antropometrijskih procjena ustanovljen je identitet Prvog Brata. Za Drugog Brata su pak srodnici dali dva značajna antemortalna podatka, a to je da je on u djetinjstvu imao nezgodu, prilikom koje je slomio desnu nogu, te da je imao intervenciju na zubima 43 i 44, u vidu vještačkih dentalnih krunica. I zaista, na skeletu se uočila zacijeljena trauma na desnoj tibiji (goljeničnoj kosti) te intervencija na zubima. Na taj način je identificiran i Drugi Brat. Analiza skeleta Trećeg Brata bila je najsloženija. Važno je spomenuti da su Prvi i Drugi brat pronađeni na istoj lokaciji, za koju su forenzički arheolozi i antropolozi utvrdili da se radi o primarnoj masovnoj grobnici. Treći Brat je pronađen na sasvim drugoj lokaciji, ali njegovo tijelo nije bilo cjelovito. Pronađen je samo njegov donji dio tijela. Pored izvještaja DNK analize, koji je nedvojbeno ukazivao na to da je riječ o njemu, antropološki rezultati su još i poduprli tu činjenicu. Forenzički antropolozi su na osnovu karličnih kostiju ustanovili da je riječ o muškoj individui, procijenjene životne starosti između 30 i 35 godina. Gornji dio tijela pronađen je na drugoj lokaciji, gdje su torzo i ruke pronađene u majici i jakni.

U forenzičkom kontekstu, nije isto kada je odjeća pronađena uz skeletne ostatke i kada su skeletni ostaci pronađeni u odjeći. Kada se odjeća pronađe uz skeletne ostatke, to ne mora značiti da pripada konkretno tim skeletnim ostacima, pogotovo kada je riječ o sekundarnim i tercijarnim grobnicama, jer tu dolazi do perturbacije sadržaja grobnice. Međutim, kada se skeletni ostaci pronađu u odjeći, to znači da je taj skeletni set cjelovit i da pripada jednoj individui, odnosno da je odjeća sačuvala integritet i konzistentnost tog skeletnog seta. Zato je jako važno te informacije navesti u arheološkim i u antropološkim formularima te u obdukcionim nalazima.

U konkretnom slučaju, u unutrašnjem džepu jakne pronađena su lična dokumenta na ime neke druge individue. Antropološkom analizom, a naročito analizom rebara, ustanovljeno je da morfološke promjene na rebrima odgovaraju fazi IV na osnovu koje se procjenjuje da životna starost individue iznosi između 28 i 36 godina, što se nije poklapalo s podacima u ličnim dokumentima, s obzirom na to da je druga individua bila dosta starija od navedenog raspona. Nakon što je DNK analiza postala rutinska metoda u identifikaciji skeletnih ostataka, ona se obavezno provodi bez obzira na to da li se uz individuu pronađu lična dokumenta ili ne. Isto je urađeno i u ovom slučaju te je ustanovljeno da dijelovi skeleta s dvije lokacije pripadaju jednom od trojice braće. Nakon toga, forenzički antropolozi su pristupili reasocijaciji, tj. pridodavanju dijelova tijela.

Pridodavanje (reasocijacija) je sastavljanje dijelova skeleta jedne osobe s više različitih slučajeva i predstavlja dosta kompleksnu radnju, koja zahtijeva mnogo pažnje i koncentracije. Tom prilikom se obraća pažnja na svaki skeletni element koji se pridodaje, provjeravaju se eventualne duplikacije skeletnih elemenata, zatim da li skeletni elementi artikuliraju jedan s drugim onako kako bi trebali na jednom skeletu te da li su određeni skeletni elementi antimerni jedni s drugim, odnosno da li morfološko-fizički jedni drugim odgovaraju. Nakon što je obavljeno neophodno pridodavanje, skelet je kompletiran. Konačno, forenzički antropolozi su još jednom pregledali skelet kako bi utvrdili je li skelet konzistentan te odgovaraju li antropološke značajke antemortalnim podacima koje su srodnici dali ovlaštenim institucijama. Kako je već prethodno navedeno, na osnovu karličnih kostiju, odnosno morfoloških promjena na aurikularnim površinama i pubičnim simfizama, procijenjena zaživotna starost individue iznosila je između 30 i 35 godina. Morfološke promjene na sternalnim krajevima rebara su, pak, ukazivale na to da je procijenjena zaživotna starost individue iznosila između 28 i 36 godina. Ovi rasponi su se dobro uklapali s antemortalnim podatkom o starosti Trećeg Brata u momentu kada je nestao. Pored toga, na skeletu nisu ustanovljene nikakve antemortalne povrede, tako da su rezultati antropološke analize isključili mogućnost da se radi o Drugom Bratu. Kako je Prvi Brat bio dosta mlađi, mogućnost da se radi o njemu je odmah eliminisana. Svi prethodno navedeni podaci, kao i činjenica da su prethodna dva brata već identificirana, ukazivali su na to da je nedvojbeno riječ o Trećem Bratu.

Pored identifikacije, ustanovljeno je još i to da je Treći Brat u jednom momentu života obukao jaknu neke druge individue te s njom ponio i lične dokumente te osobe, što je mogao biti pogrešan trag da se identifikacija radila samo na osnovu fizičkih dokaza i tradicionalnog prepoznavanja. Druga, mnogo važnija informacija jeste potvrda i s antropološkog aspekta da je grobnica u kojoj je pronađen Treći Brat uznemiravana, odnosno da je došlo do naknadnog prekopavanja i izmještanja dijela grobnice na neku drugu lokaciju.

4.7 OSNOVE FORENZIČKE STOMATOLOGIJE / ODONTOLOGIJE

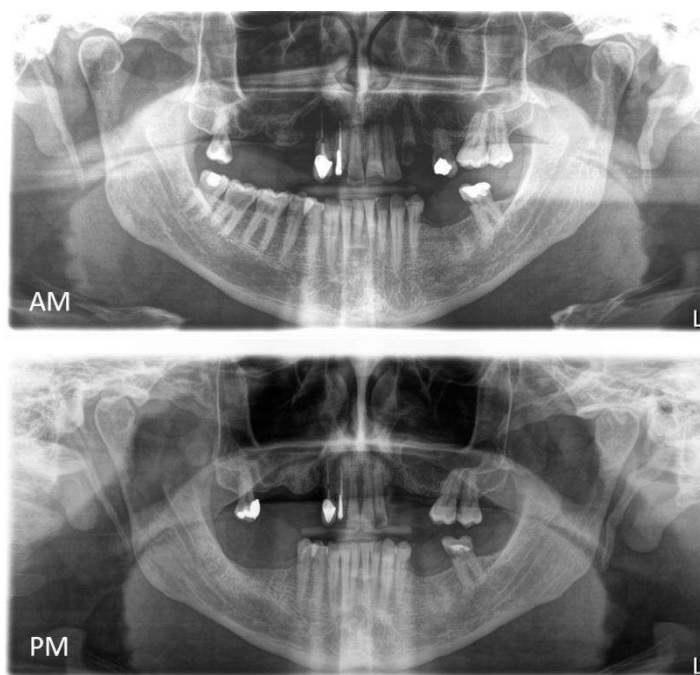
U analizu skeletnih ostataka mogu biti uključeni i forenzički stomatolozi, naročito u slučajevima kada su u pitanju nekompletni skeletni ostaci, te kada osnovu identifikacije čini analiza zuba i čeljusti. Korištenjem specifičnog stomatološkog znanja *dentalnom analizom* dobija se veliki broj informacija jedinstvenih za pojedinu osobu. Ipak, forenzička stomatologija nije ograničena samo

na analizu skeletnih ostataka već je njen predmet proučavanja bilo koji forenzički slučaj u kojem je neophodno stručno mišljenje vještaka stomatologa / odontologa. Postoji mnogo definicija koje opisuju područja djelovanja forenzičke stomatologije / odontologije. Sam naziv potiče od latinske riječi *forens*, što znači “javan, pred forumom, na trgu”, i grčkih riječi *stoma*, što znači “šupljina”, i *logos*, što znači “nauka”. Dakle, radi se o nauci koja istražuje oralnu / usnu šupljinu u forenzičkim slučajevima. S druge strane, odontologija je riječ grčkog porijekla od *odus*, *odontus*, što znači “zub” i već gore spomenute *logos* – “nauke” te se odnosi na nauku kojom se analiziraju zubi u užem smislu. Jedna od najšire prihvaćenih definicija forenzičke stomatologije jeste da je to “nauka, grana stomatologije koja se u interesu prava i pravde bavi pravilnim rukovanjem (postupanjem), pregledom i analizom stomatoloških dokaza (engl. *dental evidence*) te pravilnom evaluacijom i prezentacijom nalaza (engl. *dental findings*)”. Ovu definiciju formulisao je Sören Keiser-Nielsen još davne 1970. godine. Ukratko rečeno, forenzička stomatologija koristi specifično stomatološko znanje u zakonskopravnom sistemu. Područja djelovanja ima više, od identifikacije živih i preminulih osoba, preko vještačenja tragova ugriza, do medicinskopravnih vještačenja. U slučajevima identifikacija živih i preminulih osoba, forenzička stomatologija / odontologija analizira zube, oralnu šupljinu i perioralne strukture i tkiva radi potvrđivanja identiteta ili uspostavljanja identiteta osobe. Situacije kada je potrebna identifikacija živih osoba uključuju slučajeve kao što su dementne osobe bez identifikacijskih podataka, ilegalne migracije, utvrđivanje punoljetstva kod osoba bez identifikacijskih dokumenata i sl.

4.7.1 Identifikacija preminulih osoba putem dentalnih metoda

Ako se radi o identifikacijama preminulih osoba, forenzička stomatologija / odontologija nekada može biti prva stepenica u utvrđivanju identiteta. Posebnu važnost dentalna identifikacija ima u slučajevima kada se tijela nađu u uznapređovalom stadiju raspadanja, spaljenih tijela, pronalaska samo skeleta, kao i u slučajevima pronalaska više tijela te u slučajevima masovnih stradanja. Sam proces identifikacije putem dentalnih metoda može ići u dva pravca. Prva mogućnost je da postoje indicije o mogućem identitetu preminule osobe, kao i stomatološka dokumentacija nastala zaživotno. U takvim slučajevima radi se komparacija podataka prikupljenih iz stomatološke dokumentacije, prvenstveno stomatološkog kartona, s podacima prikupljenim postmortalno, pregledom zuba i usne šupljine preminule osobe. Ove komparativne metode zasnivaju se na

općeprihvaćenim činjenicama da je status zuba jedinstveno obilježje svake osobe, toliko jedinstveno da se uspoređuje s otiskom prsta. Odrasla osoba ima 32 zuba, sa 147 zubnih površina, a uz mogućnost da je neki zub izgubljen, a neka površina restaurirana stomatološkim tretmanom, dobija se ogroman broj mogućih kombinacija. Zbog toga se smatra da je nemoguće da dvije osobe imaju isti status zuba. Čak i u slučajevima kada su prisutni svi zubi, bez ikakvih restauracija, veličina zuba, oblik zuba, njihov položaj, karakteristike alveolarne kosti i drugi pokazatelji u kombinaciji daju jedinstveno obilježje svakog pojedinca. Pri utvrđivanju identiteta komparacijom antemortem i postmortem statusa zuba uspoređuju se prisutni / izgubljeni zubi, restaurirani zubi, vrsta restauracije, površine koje su restaurirane itd. (slika 4.24). Svaki od ovih detalja se posebno evaluira.



Slika 4.24. Rendgen snimci antemortem (AM) i postmortem (PM) statusa zuba

4.7.1.1 Evaluacija dentalnih karakteristika

Za evidentiranje dentalnih karakteristika koriste se različiti obrasci (formulari), među kojim je vjerovatno najčešće korišten formular kreiran i usvojen od strane INTERPOL-a. Ovi formulari se koriste kako u pojedinačnim slučajevima identifikacije, tako i u slučajevima masovnih stradanja, kada je neophodno u kratkom vremenskom roku identificirati veliki broj preminulih osoba.

Sami obrasci, kao i vodič za njihovo ispunjavanje i korištenje, dostupni su na zvaničnoj stranici INTERPOL-a¹³. Formulari su kreirani u dvije boje, žuti za unos antemortem (prijesmrtnih) podataka i ružičasti za unos postmortem (poslijesmrtnih) obilježja. Podijeljeni su u segmente označene velikim slovima engleskog alfabeta, a svaki od tih segmenata sadrži određene podatke koji se prikupljaju u postupcima identifikacije, od općih podataka, preko antropoloških, do odontoloških i sl.

Segmenti A i B razlikuju se na žutim i ružičastim formularima, jer se odnose na lične podatke nestale osobe / moguće žrtve u žutim formularima, a u ružičastim formularima na podatke o mjestu pronalaska tijela preminule osobe. Sekcija C odnosi se na dokaze vezane za okolnosti nestanka / smrti osobe, sekcija D koristi se za opis fizičkih dokaza, a u sekciju E unose se medicinske karakteristike (dokazi), te ih ispunjava patolog, specijalista sudske medicine, i/ili forenzički antropolog. Dio ove sekcije (E4) sadrži podatke vezane za analizu DNK. Sekcija F služi za unos dentalnih karakteristika, a postoji dio formulara u koji je moguće unijeti i dodatne informacije. Svaki od tih segmenata ispunjava odgovarajući forenzički ekspert koji je dio tima za identifikaciju. Forenzički stomatolog ispunjava dentalne podatke koji su sastavni dio segmenta F formulara. Segment F čine obrasci F1 i F2, pri čemu obrazac F1 sadrži opće podatke, a F2 specifične dentalne karakteristike (slika 4.25). Za ispunjavanje obrasca F2, u koji se unose sve dentalne karakteristike, koriste se troslovni kodovi, tzv. *sys codes*, kreirani prema nazivima tih karakteristika na engleskom jeziku. Tako, na primjer, za zub koji ima kompozitni ispun stavlja se kôd *cof* od *composit filling*, amalgamski ispun s *amf* od *amalgam filling*, uz dodavanje oznaka površina zuba koje su restaurirane velikim štampanim slovima (M – *mesial*, D – *distal*, F – *facial*, L – *lingual*, I – *incisal*, O – *occlusal*). Za zub koji nosi metal-keramičku krunicu stavlja se kôd *mcc* od *metal ceramic crown* itd. Za zub koji nedostaje evidentira se kôd *miss* (od engl. *missing*).

Dentalne karakteristike koje su vidljive isključivo na rendgenogramima uvijek završavaju slovom x, pa tako na primjer zub koji ima kanalsko punjenje ima kôd *rfx* od *root filling* uz slovo x jer je takvo punjenje vidljivo na snimcima. Središnji dio formulara F2 je odontogram, grafički prikaz svih zuba i njihovih površina. U tom grafičkom prikazu križanjem se precrtavaju zubi koji nedostaju, a bojenjem različitim bojama evidentiraju zubne površine koje su restaurirane, tj.

¹³ <https://www.interpol.int/How-we-work/Forensics/Disaster-Victim-Identification-DVI>

stomatološki tretirane za života. Različite boje sugeriraju različitu vrstu materijala koji je korišten za restauracije. Grafički prikaz (odontogram) olakšava selekciju antemortem i postmortem podataka za komparaciju ako se ona radi manuelno, naročito u slučajevima masovnih stradanja. Komparacija dentalnih karakteristika može se raditi i korištenjem kompjuterskih programa koji mogu biti različiti, s tim da je svaki takav program baziran na odgovarajućim obrascima. Tako je za INTERPOL-ove obrasce razvijen komercijalni kompjuterski sistem *KMD PlassData DVI*.¹⁴ Postoje i drugi automatizirani programi za identifikaciju poput programa *DAVID*, *ADIS*, *WinID* i sl.

The image shows two INTERPOL DVI forms side-by-side. The left form is titled 'INTERPOL DVI Form - Missing Person' and the right form is titled 'INTERPOL DVI Form - Unidentified Human Remains'. Both forms are designed for recording dental findings and personal information. The 'Missing Person' form includes a section for 'Specific data' (638) and 'Quality check' (660). The 'Unidentified Human Remains' form includes a section for 'Specific data' (636) and 'Quality check' (660). Both forms include a 'Collected by' section at the bottom.

Slika 4.25. F2 obrasci INTERPOL-a za unos dentalnih obilježja: AM (lijevo) i PM (desno)

¹⁴ <https://www.kmd.net/solutions-and-services/data-and-ai/kmd-plassdata-dvi>

4.7.1.2 Identifikacija na osnovu dentalnih karakteristika

Nakon evaluacije i komparacije, zaključak se izvodi na osnovu broja podudarajućih elemenata i odsustva nelogičnih diskrepancija. Prema preporukama INTERPOL-a zaključak može biti da je odontološki identitet uspostavljen, vjerovatan i moguć. Ovdje je važno naglasiti da princip komparativne odontološke identifikacije podrazumijeva da se dentalne karakteristike prikupljene iz stomatološke dokumentacije uspoređuju s dentalnim karakteristikama preminule osobe. Pri poređenju se najprije odgovara na pitanja da li dentalni statusi antemortem i postmortem generalno odgovaraju jedan drugom, a zatim se radi poređenje sličnosti svake pojedinačne karakteristike. Nekada se pri komparaciji ustanovi postojanje diskrepanci (neslaganja) u antemortem i postmortem podacima te u tim slučajevima forenzički stomatolozi daju tumačenje i eventualno pojašnjenje. Primjer takvih neslaganja može biti zaživotno evidentirana restauracija jedne površine nekog zuba, a da poslije smrti uočimo restauraciju na dvije ili više površina. Takvo neslaganje može biti objašnjeno vremenom proteklim od evidentiranja dentalnog statusa u stomatološkom kartonu i trenutka smrti, greškama pri evidentiranju restauriranih površina i sl. Ako neslaganja podataka ne mogu biti objašnjena, onda se mora isključiti identitet, odnosno logično zaključiti da se ne radi o istoj osobi. Problem može predstavljati i nedostatak stomatološke evidencije, prvenstveno stomatoloških kartona kao izvora antemortem podataka. Takav primjer nalazimo u brojnim slučajevima identifikacija žrtava rata u Bosni i Hercegovini. Migracije stanovništva uslijed ratnih prilika, uništavanje arhiva medicinskih ustanova, izostanak informacija o mogućem ordinirajućem ljekaru stomatologu, nepostojanje standardiziranih pisanih načina evidencije dentalnih karakteristika i sl., stvorili su situaciju u kojoj je bilo nemoguće doći do stomatološke dokumentacije koja bi bila izvorom prijesmrtnih dentalnih obilježja kao osnove za komparativnu identifikaciju dentalnim metodama.

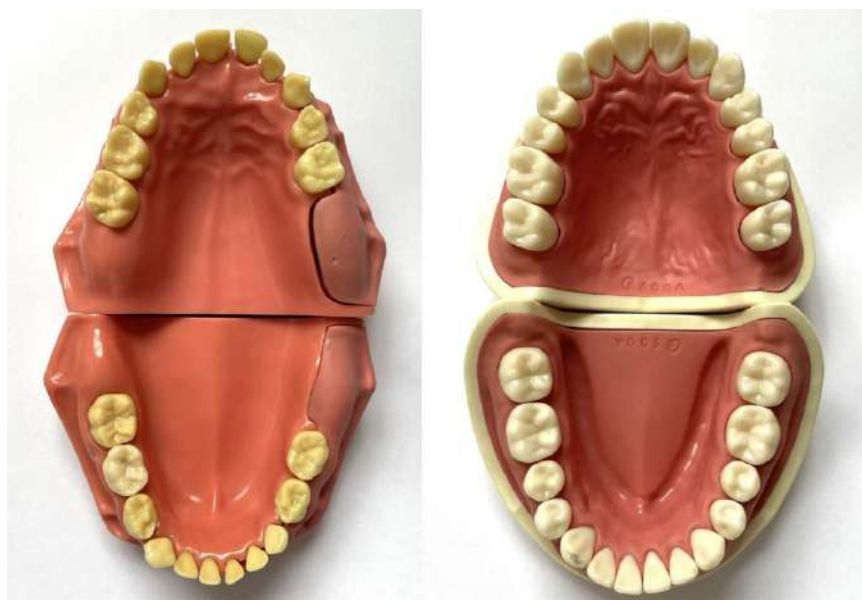
Zakonska obaveza trajnog čuvanja stomatoloških kartona trebala bi danas omogućiti korištenje komparativnih dentalnih metoda u identifikacijama. Ipak, i dalje postoji problem nedostatka standardizacije u vođenju stomatoloških kartona i čuvanja radiografskih snimaka zuba i vilica koji su urađeni tokom života.

4.7.2 *Biološko profiliranje primjenom dentalnih metoda*

Postoje situacije kada nema indicija o mogućem identitetu osobe. U tim slučajevima radi se tzv. profiliranje, odnosno prikupljanje podataka postmortem pregledom, kada se formira biološki profil. To je drugi pravac kojim identifikacija može ići. Takve dentalne metode nazivaju se *rekonstruktivnim metodama*. Biološki profil, kao što je već poznato, uključuje procjenu dobi, spola, rase, odnosno geografskog porijekla, kao i druge specifične karakteristike koje mogu pomoći u uspostavljanju identiteta preminule osobe.

4.7.2.1 *Procjena dentalne dobi*

Analizom morfoloških i fizioloških parametara zuba možemo procijeniti dentalnu dob. Sama procjena se može raditi na različite načine, zavisno od perioda u kojem se procjena vrši. Ti periodi se mogu podijeliti na prenatalni period (period prije rođenja), period novorođenčeta i malog djeteta, period adolescencije te period odrasle dobi. Za samu procjenu potrebno je poznavati osnove karakteristike zuba. Svi zubi jedne osobe nazivaju se *denticija*. Čovjek ima dvije denticije, mliječnu i stalnu (permanentnu) (slika 4.26).



Slika 4.26. Modeli denticija čovjeka: mliječna denticija s izniklim prvim stalnim molarom (lijevo) i stalna denticija bez trećih molara (desno)

Mliječnih zuba ima 20, a trajnih 32. Svi zubi, s obzirom na izgled (morfologiju), dijele se u grupe, pa tako razlikujemo sjekutiće (incizive), očnjake (kaninuse), pretkutnjake (premolare) i kutnjake (molare). U mliječnoj denticiji postoji 8 sjekutića, 4 očnjaka i 8 kutnjaka. U stalnoj denticiji postoji 8 sjekutića, 4 očnjaka, 8 pretkutnjaka i 12 kutnjaka. Njihov rast i razvoj te erupcija (pojavljivanje u usnoj šupljini) dešavaju se u različitom vremenskom periodu, što predstavlja osnovu za procjenu dentalne dobi. Prvi znakovi razvoja zuba mogu se uočiti već u 6. nedjelji intrauterinog života. Zubi se od tog trenutka razvijaju tokom intrauterinog perioda tako da se procjena biološke dobi na osnovu razvoja zuba u prenatalnom periodu može raditi histološkim pregledom (pravljenjem presjeka i histoloških preparata zuba) i radiografskim pregledom (pravljenjem radiografskih snimaka vilica).

U radiografskoj analizi koristi se činjenica da od 5. mjeseca intrauterinog života započinje mineralizacija mliječnih zuba, što se može vidjeti na radiografskim snimcima. Za radiografsku analizu najčešće se koriste metode atlasa, odnosno poređenja stepena razvoja zuba, njihove mineralizacije s atlasima, a među najpoznatijima je metoda po Schouru i Massleru, u kojoj se prati razvoj zuba od 5. mjeseca intrauterinog života pa sve do odrasle dobi. U neonatalnom periodu, periodu oko vremena rođenja, procjena dentalne dobi radi se na osnovu stepena mineralizacije mliječnih zuba. U trenutku rođenja u vilicama se već nalaze mineralizirane krunice svih mliječnih zuba te početak razvoja krunica prvih stalnih kutnjaka. Zato se i u ovom periodu može raditi radiografska analiza i histološki pregled. Pri histološkom pregledu, na svim krunicama zuba koji se mineraliziraju u ovom periodu može se vidjeti tzv. *neonatalna linija*. Radi se o području slabije mineralizacije krunice uslijed prilagođavanja na vanjske uslove života te se ova linija može koristiti u utvrđivanju da li je dijete živorođeno ili ne.

U periodu djeteta nastavljaju se intenzivni procesi rasta i razvoja te se procjena dentalne dobi može vršiti na osnovu erupcije zuba i radiografskog pregleda. Mliječni zubi počinju erupciju oko 6. mjeseca postnatalnog života i to određenim redoslijedom, da bi oko 2. godine života bila kompletirana mliječna denticija.

Od trenutka kompletiranja mliječne denticije do početka nicanja stalnih zuba, oko 6. godine, u usnoj šupljini nisu vidljive promjene broja zuba. Ipak, i dalje se odvijaju intenzivni procesi rasta i razvoja. Ti procesi uključuju rast vilica te razvoj i mineralizaciju zametaka stalnih zuba koji se

nalaze u vilicama. U šestoj godini prvi stalni zub, kutnjak, niče distalno od zadnjeg mliječnog zuba. Redosljed razvoja i nicanja stalnih zuba je različit, a obično se završava do 12, odnosno 14. godine života, kada su svi mliječni zubi zamijenjeni stalnim zubima. U ovom periodu procjena dentalne dobi također se radi radiografski (slika 4.27).



Slika 4.27. Ortopantomogram djeteta u periodu mješovite denticije. Prema izniklim stalnim zubima i stepenu razvijenosti zametaka stalnih zuba procijenjena dentalna dob djeteta je $7 (\pm 2)$ godina.

Važno je napomenuti da se, osim metoda atlasa, često koriste i metode tzv. *scoring sistema*. U ovim metodama se svakom zubu, s obzirom na stepen njegovog razvoja (fazu razvoja u kojoj se trenutno nalazi), dodjeljuje određeni skor, odnosno broj, a sabiranjem tih skorova dobije se brojčana vrijednost, koja se poređenjem s tablicama razvoja i percentilnim krivuljama za djevojčice, odnosno za dječake, prevodi u odgovarajuću starost, tj. dentalnu dob. Jedna od najpoznatijih i najčešće korištenih metoda iz ove grupe metoda jeste metoda po Demirijanu. Za procjenu dentalne dobi ovom metodom koristi se pregled sedam stalnih zuba donjeg lijevog kvadranta, odnosno sedam zuba lijeve strane donje vilice.

Imajući u vidu činjenicu da se i stepen razvoja tih zuba *procjenjuje*, a s ciljem objektiviziranja procjene, uvedene su i metrijske metode u kojima se vrši mjerenje odgovarajućih dimenzija zubnih zametaka / zuba, a rezultati tih mjerenja unose se u formule za izračunavanje dentalne dobi. Jedna od najpoznatijih takvih metoda je metoda po Cameriereu.

Za procjenu dobi ovom metodom koristi se također sedam stalnih zuba, od prvog sjekutića do drugog kutnjaka donje lijeve strane mandibule. Za svaki zub pojedinačno mjere se visina zubnog zametka / zuba i širina apikalnog otvora korijena na nivou do kojeg je razvijen korijen. Sve te mjere unose se u formule za izračunavanje dentalne dobi, koje su razvijene na osnovu podataka prikupljenih za dječake, odnosno djevojčice, poznate dobi. Kako su procesi rasta i razvoja intenzivni u ovim periodima, tako je procjena dentalne dobi tačnija i pouzdanija.

U periodu adolescencije, svi mliječni zubi su zamijenjeni stalnim zubima čiji apeksi korijenova također postepeno završavaju svoj razvoj. U ovom periodu procjena dentalne dobi postaje nešto teža i bazira se na razvoju trećih kutnjaka (slika 4.28).



Slika 4.28. Ortopantomogram adolescenta. Prema stepenu razvoja trećih molara (kutnjaka) procijenjena dentalna dob je 16–17 godina.

Najpoznatije metode za procjenu dentalne dobi na osnovu razvoja trećih kutnjaka su metoda po Schmelingu i saradnicima, a radi se o metodi koja predstavlja modifikaciju metode po Demirijanu i razvojnih stadija primijenjenih na treće kutnjake. Kako su to zubi koji su varijabilni u svom razvoju, neke osobe ih i nemaju (ageneza trećih molara), te je tačnost i pouzdanost procjene dobi u ovom periodu lošija pa se preporučuje koristiti je u kombinaciji s drugim metodama procjene dobi, poput metoda za procjenu skeletalne dobi na osnovu radiografske analize šake ili kralježaka cervikalne kičme.

I pored svih nedostataka koje imaju metode bazirane na analizi razvoja trećih kutnjaka, one su ipak nezaobilazne u današnje vrijeme intenzivnih migracija te su nerijetko metode izbora za procjenu punoljetstva za ilegalne migrante bez identifikacijskih dokumenata.

Nakon 20. godine života, u periodu odrasle dobi, za procjenu dobi koriste se dentalne metode bazirane na starosnim / regresivnim promjenama. Regresivne promjene koje se javljaju na zubima su: atricija / abrazija, apozicija sekundarnog dentina, transparentcija / translucencija korijenskog dentina, apozicija celularnog cementa korijena zuba, resorpcija korijena i retrakcija periodoncija. Prvi koji je opisao ove promjene i njihovu vezu sa starosnom dobi bio je Gustafson, a kasnije ih je modificirao Johanson. Ova metoda za procjenu dentalne dobi kod odraslih osoba radi se na histološkim uzdužnim presjecima zuba, a svakoj od pobrojanih regresivnih promjena dodjeljuje se određeni skor, koji se unosi u formulu za procjenu dobi razvijenu regresionom analizom zuba osoba poznate dobi i spola.

Drugi autori su kasnije razvijali metode u kojima su koristili nekoliko regresionih promjena, ali ne sve (neki čak i samo jednu). Tako je Lamendin razvio formulu za procjenu dentalne dobi na osnovu mjerenja translucencije korijenskog dentina i regresije periodoncija, a njegovu metodu kasnije je modificirao Ubelaker. Ove metode su posebno značajne jer su jednostavne za izvođenje i ne zahtijevaju pravljenje histoloških preparata, već se regresivne promjene mogu mjeriti i analizirati na ekstrahiranim zubima bez invadiranja samog uzorka zuba.

U slučajevima kada se pronađe samo skelet preminule osobe, propadanjem mekih tkiva, zubi su olabavljeni u zubnim čašicama / alveolama te se oni koji imaju samo jedan korijen jednostavno mogu izvaditi, analizirati i vratiti u alveolu. S obzirom na to da se regresivne (starosne) promjene na zubima dešavaju sporije u odnosu na promjene koje prate rast i razvoj zuba kod djece, teže su uočljive kroz kraće vremenske periode, te je samim tim procjena dentalne dobi kod odraslih osoba nešto teža.

Postoji mnogo morfoloških metoda za procjenu dentalne dobi kod odraslih osoba, neke koriste mjerenja direktno na zubima, druge opet mjerenja na radiografskim snimcima za promjene koje su na taj način uočljive. Na samu procjenu dentalne dobi utiču populacijske razlike, spol i tip zuba koji je korišten za analizu.

Osim morfoloških, postoje i druge metode za procjenu dentalne dobi kod odraslih osoba. Među njima su najčešće spominjane biohemijske metode, od kojih je najpoznatija metoda racemizacije aspartatne kiseline iz zubnog dentina. Radi se o metodi kojom se mjeri odnos dva izomera D i L-izomera aspartatne kiseline koji se mijenja kroz vrijeme. Korijenski dentin tek formiranih zuba sadrži samo L-formu, a sa starenjem dolazi do procesa nazvanog racemizacija tokom kojeg L-forma prelazi u D-formu. S obzirom na to da je poznata brzina te promjene, mjerenjem odnosa ove dvije forme može se procijeniti dentalna dob s visokim nivoom tačnosti.

U savremenoj literaturi spominje se i određivanje dobi putem mjerenja radioaktivnog ugljika (^{14}C), jer se on deponuje u caklini zuba tokom stvaranja i maturacije zuba. Ipak, ova metoda se tek treba detaljno testirati.

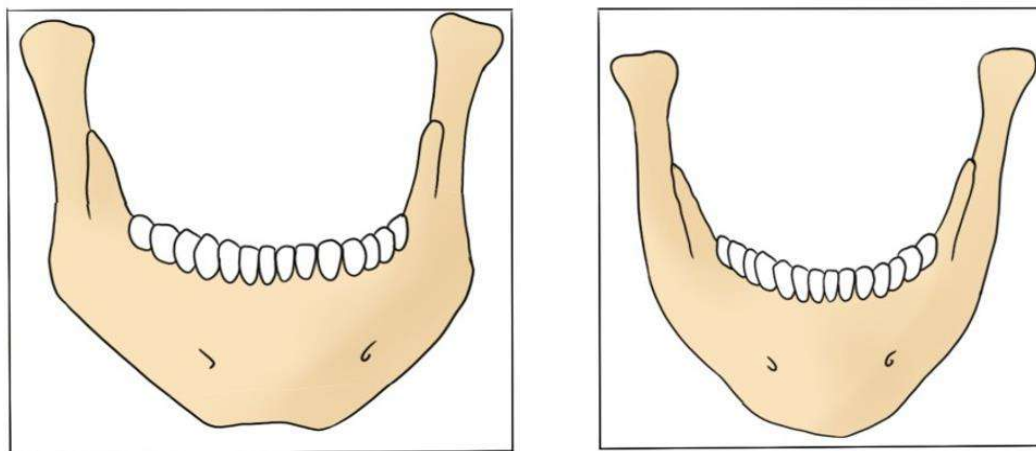
4.7.2.2 Procjena spola na osnovu zuba i čeljusti

Procjena spola metodama forenzičke odontologije dosta je zahtjevnija od procjene dentalne dobi. Bazirana je na odontometriji, mjerenju različitih dimenzija zuba te poređenju s prosječnim mjerama zuba za osobe muškog, odnosno ženskog spola. Za takva poređenja neophodno je imati populacijske standarde i znati s kojeg geografskog područja potječe osoba za koju se radi procjena spola. Osim toga, dimenzije zuba mogu se mijenjati tokom vremena, pa nije svaka dimenzija jednako pouzdana. Primjer za to je promjena cervikoincizalnog promjera (visine) krunice zuba, koja se smanjuje s funkcionalnim trošenjem zuba tokom godina. Stoga savremena istraživanja na ovu temu preporučuju korištenje bukooralnog promjera (debljine) krunice zuba, kao i izražavanje mjerenja putem indeksa (odnosima dvije dimenzije). Najčešće spominjana je procjena spola na osnovu tzv. *indeksa mandibularnih očnjaka*. Formula za izračunavanje indeksa mandibularnih kaninusa (MCI) glasi:

$$\text{MCI} = \frac{\text{meziodistalna širina krunice mandibularnog kaninusa}}{\text{interkanina distanca donjih očnjaka}}$$

Procjena spola se radi izračunavanjem relativnog odnosa meziodistalnog promjera (širine) donjeg očnjaka i interkanine, odnosno interkuspidalne distance (udaljenosti između vrhova kvržica donjih očnjaka), čime se dobija određena vrijednost indeksa, na osnovu koje se određuje spolna pripadnost. Za korištenje ove metode neophodno je postojanje populacijskih standarda s vrijednostima indeksa za osobe muškog i ženskog spola u datoj populaciji.

Odontometrijska procjena spola stoga je pomoćna metoda, uz antropološku procjenu spola na osnovu čeljusti. Antropometrijska mjerenja dimenzija čeljusti mogu se, ako postoje populacijski standardi i formule, koristiti za procjenu spola. Osnova takve procjene leži u premisi da su dimenzije čeljusti veće kod osoba muškog spola. U takvim metodama mjere se standardne dimenzije donje čeljusti, kao linearni razmaci između standardnih antropoloških tačaka. Kao antropološki standard uvijek se mjeri lijeva strana mandibule, osim za unilateralne dimenzije (bigonijalne distance – udaljenosti između oba gonijalna ugla mandibule, bikondilarne distance – udaljenosti između kondila mandibule, te bikondilarne distance – udaljenosti između vrhova koronoidnih nastavaka mandibule), te kod mandibula koje su fragmentirane. Problem takve procjene spola leži u mogućnosti da u nekim dimenzijama dolazi do preklapanja između spolova, pa tako robusnije osobe ženskog spola mogu imati dimenzije čeljusti veće u odnosu na dimenzije čeljusti gracilnijih muškaraca. Stoga se mnogo češće koriste morfološka obilježja čeljusti za razlikovanje spolova (slika 4.29).



Slika 4.29. Šematski prikaz razlika muške i ženske mandibule (donje čeljusti). Lijevo je muška mandibula: robusnija, sa hrapavim hvatištima mišića i everzijom gonijuma (u području angulusa mandibule, s “trouglastim” područjem mentuma (brade)). Desno je ženska mandibula: manje robusna, slabije izraženih hrapavosti na područjima hvatišta mišića, bez everzije gonijuma, sa zaobljenom bradom (mentumom).

Donja čeljust, mandibula, kod osoba muškog spola je robusnija, više kvadratična, s oštrijim gonijalnim uglom 90–120° koji je obično evertiran (usmjeren k lateralno), kvadratičnim zubnim lukovima, izraženom širokom *emineciom mentalis* (vrhom brade) te grubljim hvatištima mišića. Kod osoba ženskog spola donja čeljust je sveukupno manja, manje robusna i zaobljenija, s tupljim gonijalnim uglom u rasponu 110–140°, bez everzije, te ušiljenom *emineciom mentalis*, poluelipsastim zubnim lukovima i manje grubim površinama koje odgovaraju hvatištima mišića. Izvrtanje (everzija) ugla mandibule (gonijuma) i savijanje (fleksija) stražnje ivice ramusa mandibule najčešće su korištene morfološke karakteristike čeljusti u procjeni spola.

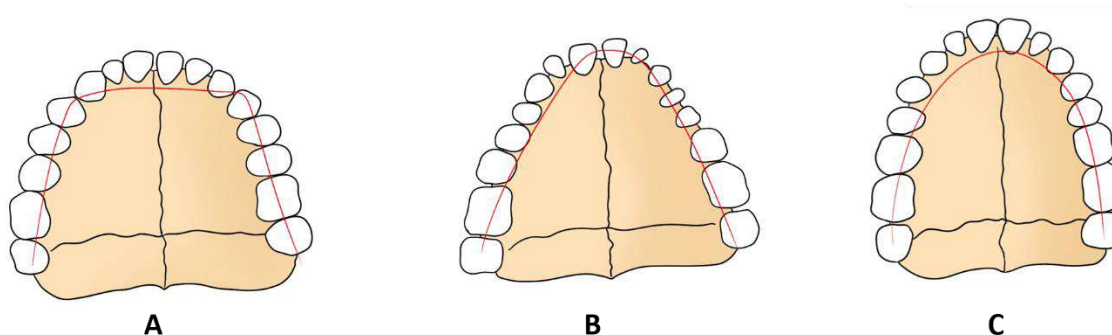
Fleksija zadnje ivice ramusa mandibule, prema metodi po Lothu i Hennebergu, često je korištena morfološka metoda za procjenu spola te se pokazala kao tačna u visokom procentu, posebno kada se radi o procjeni muškog spola. Radi se o posmatranju postojanja konkavитета zadnje ivice ramusa mandibule na nivou linije projekcije okluzalnih površina donjih kutnjaka. Posmatranje se vrši na obje strane (desno i lijevo) te vrednuje brojčano na sljedeći način: 0 – nema fleksije, +1 – postoji fleksija na nivou okluzalne projekcije, –1 – fleksija postoji, ali nije na nivou okluzalne projekcije. Sabiranjem vrijednosti desno i lijevo moguće je dobiti rezultate –2, –1, 0, +1 ili +2. One mandibule koje imaju rezultat –1 ili –2 klasificiraju se kao ženske, dok se mandibule sa skorom od 0 do +2 klasificiraju kao muške. Savremenija istraživanja pokazala su da je najbolje koristiti kombinaciju kranijalnih morfoloških karakteristika, od kojih se svaka klasificira prema stepenu izraženosti u pet kategorija, i to: 1 – *hyperfeminine*, 2 – *feminine*, 3 – *indeterminate*, 4 – *masculine*, 5 – *hypermasculine*, kao što je predložio Walker 1994. godine. Korištenjem kombinacije ovako evaluiranih morfoloških detalja lobanje u CHAID (engl. *chi-squared automated interaction detection*) moguće je dobiti rezultat procjene spola u vjerovatnoći determinacije, kao što su to pokazali Svenson i saradnici 2009. godine.

Iz svega navedenog, logično je zaključiti da bi kombinacija antropološke analize čeljusti i zuba, uključujući i metrijske i morfološke metode, mogla dati najtačniju procjenu spola. Naravno, iznad svega treba imati na umu da su zubi izvrstan materijal za ekstrakciju DNK, jer je ona zaštićena čvrstim omotačem mineraliziranih zubnih tkiva. Tom vrstom analize može se dokazati prisustvo Y-hromosoma, odnosno utvrditi spol, a u određenim okolnostima i identitet osobe.

4.7.2.3 Procjena geografskog porijekla na osnovu karakteristika zuba i čeljusti

Određena dentalna morfološka obilježja mogu se smatrati karakteristikama koje ukazuju na geografsko porijeklo osobe za koju se radi dentalno profiliranje. Ta morfološka obilježja detaljno su opisana u sistemu ASUDAS (engl. *Arizona State University Dental Anthropology System*) uz gradaciju njihove izraženosti. Tako se dugo vremena smatralo da je *Carabelli* obilježje,¹⁵ koje se javlja na prvim maksilarnim trajnim kutnjacima, specifično za kavkazoide, a lopatasti sjekutići¹⁶ i caklenske ekstenzije¹⁷ za azijske.

Osim lopatastih sjekutića i caklenskih ekstenzija, za azijsko geografsko porijeklo smatraju se indikativnim i sljedeće morfološke karakteristike: dodatni distalni korijen mandibularnih prvih kutnjaka, *dens evaginat* na donjim pretkutnjacima,¹⁸ polueliptični gornji zubni luk sa zaravnjenim nepcem, vertikalni široki ramusi mandibule i ravna donja ivica mandibule (slika 4.30). Za kavkazoidno geografsko porijeklo, osim *Carabelli* kvržice, smatra se specifičnim pojava zbijenosti zuba, uski izduženi i parabolični zubni lukovi s visokim nepcem itd.



Slika 4.30. Shematski prikaz razlika u obliku nepca i zubnih lukova kod osoba različitog geografskog porijekla: A – široko nepce oblika potkovice i zubni luk oblika slova U – azijsko geografsko porijeklo, B – usko izduženo nepce oblika parabole i zubni luk oblika poluelipse i parabole – evropsko porijeklo, C – dugačko nepce paralelnih strana, oblik zubnih lukova izdužen poluelipsast- afričko geografsko porijeklo

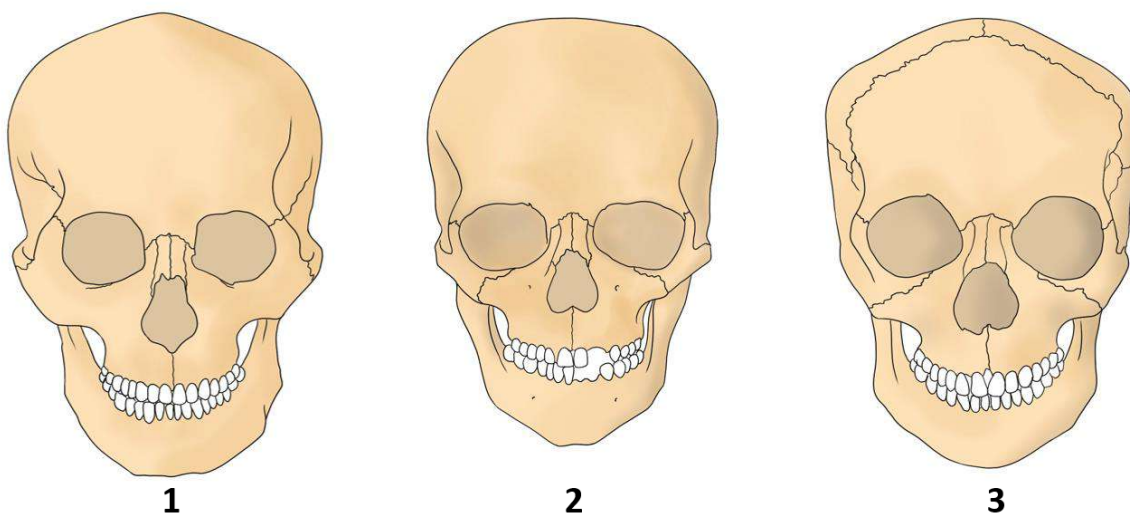
¹⁵ obilježje na oralnoj površini gornjih kutnjaka, koje može biti u obliku kvržice, nabora, brazde ili jamice

¹⁶ naglašeni marginalni grebeni na oralnim površinama sjekutića

¹⁷ produžeci cakline koji se pružaju k vratu zuba, najčešće k furkacijama / račvištu korijenova

¹⁸ dodatna kvržica na griznoj površini

Međutim, savremena antropološka istraživanja pokazala su da bi za takve tvrdnje morale postojati opsežne populacijske studije. Osim toga, globalizacija i migracije ljudi doveli su do promjena u pojavi i izraženosti određenih morfoloških obilježja. Stoga bi se dentalna antropološka obilježja trebala koristiti u kombinaciji s morfološkim obilježjima kranija da bi se formirao zaključak o geografskom porijeklu (slika 4.31).



Slika 4.31. Šematski prikaz lobanja različitog geografskog porijekla: A – evropsko geografsko porijeklo (zaobljena lobanja, s ravnim / neutralnim profilom, uskom nosnom aperturom, ovalnim orbitama koje se spuštaju k lateralno), B – afričkog geografskog porijekla (kvadratična, izdužena, s bimaksilarnim prognatizmom, širokom nosnom aperturom, kvadratičnim orbitama), C – azijskog geografskog porijekla (četvrtasta skraćena, sa umjerenim prognatizmom, okruglih orbita, zaobljenom srednje širokom nosnom aperturom)

4.7.3 Izvođenje zaključka identifikacije putem dentalnih metoda i pisanje izvještaja

Bez obzira na to da li su za identifikaciju putem zuba korištene komparativne ili rekonstruktivne dentalne metode, nakon analize svih prikupljenih podataka radi se evaluacija i izvođenje zaključka identifikacije. U slučajevima identifikacije kada su korištene komparacije antemortem i postmortem dentalnih karakteristika potrebno je isključiti postojanje nelogičnih diskrepanci. Ako postoje nelogičnosti koje ne mogu biti objašnjene, mora se izvesti zaključak da se ne radi o istoj osobi. Ako nema nelogičnih neslaganja, utvrđuje se ukupan broj slaganja pojedinačnih dentalnih

detalja. Ako postoji 12 ili više nespecifičnih dentalnih detalja, može se izvesti zaključak da je uspostavljen odontološki identitet. U slučaju da postoji od 6 do 12 nespecifičnih dentalnih detalja koji se slažu, izvodi se zaključak da je odontološki identitet vjerovatan, a u slučaju manje od 6 nespecifičnih dentalnih detalja, zaključak je da je odontološki identitet moguć.

U slučajevima identifikacije preminule osobe, kada nema podataka o mogućem identitetu, odnosno postoji nedostatak antemortem podataka, objedinjuju se podaci analize procjene dentalne dobi, spola i mogućeg geografskog porijekla osobe, kao i eventualnih drugih dentalnih karakteristika, te se daje zaključak profila da se radi o osobi određenog uzrasta, spola i porijekla. Primjer takvog zaključka je sljedeći: “Biološkim profiliranjem, a na temelju dentalnih karakteristika, radi se o osobi ženskog spola, starosti 25 do 35 godina, kavkazoidnog porijekla, slabijeg životnog socijalnog standarda, s prijesmrtnim prijelomom donje čeljusti.”

Proces odontološke identifikacije, zajedno sa zaključkom, dio je zvaničnog antropološkog izvještaja. Sam izvještaj treba sadržavati podatke o nadležnoj instituciji ili osobi po čijem je zahtjevu sprovedeno prikupljanje podataka i analiza te kome se podnosi izvještaj. Dakle, mora biti jasno vidljiv lanac nadležnosti. Zatim se navodi evidencioni broj pod kojim je materijal zaprimljen te koji materijal za analizu je dostavljen uz odgovarajuću dokumentaciju. Neophodno je navesti jesu li ili nisu bili poznati ostali podaci, poput mjesta pronalaska tijela, postojanja indicija o načinu i okolnostima vezanim za smrt osobe i sl. U izvještaju se navodi mjesto, datum i vrijeme analize, ime i prezime osobe (jedne ili više osoba) koja je radila analizu. Ako je prilikom analize zatražena pomoć drugih eksperata, moraju biti navedena i njihova imena, kao i podaci o odobrenju kojim je tim ekspertima dozvoljen pristup materijalu te razlozi zašto je bio neophodan njihov angažman. Nakon toga slijedi opis materijala, stanje očuvanosti, da li su i koje fotografije i rendgenogrami napravljeni, navodi se koji zubi su prisutni, a koji nedostaju. Slijedi opis svakog pojedinačnog dentalnog detalja, metode koje su korištene za analizu i procjene (na primjer, dentalni status je analiziran vizualnom inspekcijom i radiografskim pregledom, a za procjenu dentalne dobi korištena je metoda *Kvaal Solheim*, dok je za procjenu spola korištena radiografska analiza fleksije zadnje ivice ramusa mandibule). Nakon toga se navode opisi eventualnih trauma, patoloških stanja te specifičnih karakteristika. Navodi se broj specifičnih i nespecifičnih dentalnih detalja na osnovu kojih je izveden zaključak, kao i sam zaključak izvještaja.

Iako se za sam opis analize koristi profesionalna terminologija, zaključak izvještaja mora biti napisan jasno i jednostavno kako bi bio razumljiv svakoj osobi koja ga pročita. Ako je moguće, a prema preporukama međunarodnih i nacionalnih agencija i asocijacija za forenzičku stomatologiju, važno je navesti na koji je način osigurana kvaliteta same analize i izvedenog zaključka. Finalni izvještaj mora biti potpisan i odgovarajuće protokolisan.

U forenzičkim slučajevima, kada se izvještaji o identifikacijama koriste u sudskim procesima, važno je imati na umu da se uvijek postavlja pitanje sigurnosti izvedenog zaključka. To znači da bi smo trebali znati s kojim procentom vjerovatnoće tvrdimo ono što smo naveli u zaključku. U tom smislu problem predstavlja nepostojanje epidemioloških studija kojim bi se utvrdila učestalost pojavnosti svake dentalne karakteristike u generalnoj populaciji. Ako postoje dvije ili više karakteristika, vjerovatnoća njihovog zajedničkog javljanja predstavlja proizvod pojedinačnih vjerovatnoća za svaki od tih detalja po formuli $P_n = P_1 \times P_2 \times \dots \times P_n$.

Iako je već navedeno da je teško dati tačan procent sigurnosti izvedenog zaključka, važno je naglasiti da je forenzički odontološki izvještaj najčešće sastavni dio zajedničkog izvještaja komparacije, skupa s policijskim, antropološkim i genetičkim izvještajem o identifikaciji osobe. Važnost postojanja zajedničkog izvještaja ogleda se u međusobnoj povezanosti svih gore navedenih segmenata, ali i specifičnim ograničenjima koje zasebno imaju.

4.7.4 Analiza tragova ugriza

Tragovi ugriza se najjednostavnije definišu kao tragovi koji nastaju u kontaktu zuba i susjednih struktura s različitim supstratima. Iako se mogu naći na različitim materijalima, za forenzičku stomatologiju najveću važnost imaju tragovi zuba na koži (slika 4.32). Najčešće se pronalaze u slučajevima zlostavljanja, fizičkih napada i silovanja. S obzirom na to da je koža supstrat koji se brzo obnavlja, analiza tragova ugriza umnogome zavisi od pravovremenog djelovanja u prikupljanju dokaznog materijala.

Kada govorimo o analizi tragova ugriza, to podrazumijeva sljedeće korake: identifikaciju / prepoznavanje tragova ugriza, adekvatno dokumentovanje dokaza, prikupljanje i čuvanje dokaza o tragovima ugriza, dentalno profiliranje osumnjičenog te analiza, komparacija i evaluacija.

U prepoznavanju / identifikaciji tragova ugriza prvi korak je razlikovanje ljudskog od životinjskog ugriza. Osim oblika, veličine i rasporeda tragova zuba te oblika dentalnih lukova, važan je parametar i prisustvo tragova “usisavanja” koji obično govore u prilog tome da se radi o tragovima ljudskih zuba.

Adekvatno dokumentovanje podrazumijeva dokumentovanje vezano i za osumnjičenog i za žrtvu. Pri dokumentovanju tragova ugriza na tijelu žrtve obavezno se opisuje anatomska lokalizacija, konture, iznad kojih je tkiva, oblik, boja, dimenzije tragova ugriza. U ovom koraku neophodno je fotografisanje tragova ugriza s mjernom skalom, poštujući principe forenzičke fotografije. Detaljna historija, s intraoralnim i ekstraoralnim pregledom osumnjičenog, radi se u ovoj fazi.



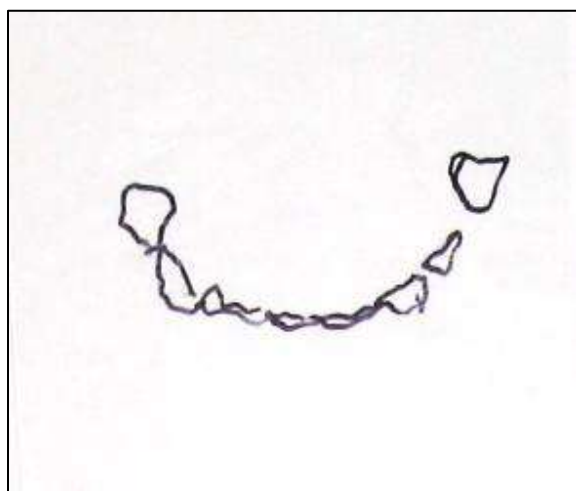
Slika 4.32. *Trag ugriza na koži sa specifičnim rasporedom zuba koji su ostavili trag*

U okviru prikupljanja dokaza najprije je neophodno uzeti bris radi provjere eventualnog prisustva tjelesnih tečnosti, prije svega pljuvačke, a koji, u tom slučaju, služi za određivanja krvne grupe i DNK profila počinioca. Nakon toga, mogu se uzeti otisci tragova ugriza s tijela žrtve u alginatu ili drugoj otisnoj masi veće preciznosti, kao i eventualno isječki tkiva za patohistološku analizu. Od osumnjičenog se uzimaju otisci zuba i zagrizi u vosku (više registracijskih zagrizi) (slika 4.33). Svi dokazni materijali moraju se sakupljati i čuvati isključivo u skladu s dozvolama nadležnih autoriteta u istrazi.



Slika 4.33. Komparacija testnih tragova ugriza u vosku (lijevo) i gipsani model (desno) zuba osumnjičenog

U analizi, komparaciji i evaluaciji koriste se stručna znanja stomatologa na osnovu kojih se tragovi zuba na ugrizu uspoređuju sa zubima osumnjičenog. Pored direktne i indirektne tehnike poređenja, najčešće je primjenjivana tehnika izrade tzv. *overleja* (slika 4.34).



Slika 4.34. Primjer obrisa zuba ocrtanih na overleju

Overleji su ocrtni obrisi zuba (odnosno tragovi koje ostavljaju zubi, tj. njihove sječivne ivice i kvržice) na acetatnoj prozirnoj foliji. Oni se mogu izraditi manuelno ili kompjuterski, a zatim se postavljaju iznad tragova ugriza ili fotografije traga (izrađene u omjeru 1 : 1) te se radi analiza i komparacija vjerovatnoće da su trag ugriza mogli ostaviti zubi osumnjičenog. Nakon provedene analize, komparacije i evaluacije izvodi se zaključak. Analiza tragova ugriza vjerovatno je najkontroverznije područje forenzičke stomatologije.

Kritike ovog područja, prije svega, uključuju subjektivnost analize, nedostatak naučne sigurnosti u zaključak analize te osporivost zaključka na sudu. Mogućnost identifikacije počinioca na osnovu DNK analize tragova tjelesnih tečnosti, prvenstveno pljuvačke s tragova ugriza, gotovo je u potpunosti potisnula klasičnu analizu tragova ugriza u kojoj se komparacijom s denticijom osumnjičenog daje zaključak o počiniocu.

4.7.5 Forenzička stomatologija u medicinskopравnim slučajevima

Forenzička stomatologija ima ulogu i u medicinskopравnim vještačenjima, u slučajevima dokazivanja nehaja doktora dentalne medicine / stomatologije i nadoknade šteta te pri slučajevima trauma oralnih tkiva. Doktor dentalne medicine može biti sudski vještak, a nekada može biti i svjedok ekspert. U takvim slučajevima očekuje se da doktor dentalne medicine posjeduje izuzetno veliko specifično stomatološko znanje koje stavlja u službu suda i pravde. U ovom djelokrugu rada forenzičkog stomatologa, možda najčešći su slučajevi nadoknade šteta i dokazivanje greške i nehaja doktora dentalne medicine. S obzirom na to da ova područja izlaze iz okvira forenzičke antropologije, ovdje neće biti više govora o njima.

Literatura

- Bethard, J.D., DiGangi, E.A. (2020). Letter to the Editor - Moving Beyond a Lost Cause: Forensic Anthropology and Ancestry Estimates in the United States. *Journal of Forensic Sciences*, 65(5), 1791-1792.
- Brkić, H. i saradnici (2000). *Forenzična stomatologija*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
- Brkić, H. (Ed.) (2021). *Textbook of forensic odonto-stomatology by IOFOS*. Jastrebarsko, Hrvatska: Naklada Slap.
- Buikstra, J.E., Ubelaker, D. (1994). Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains: *Proceedings of a Seminar at the Field Museum of Natural History*. Fayetteville, Arkansas, USA: Arkansas Archeological Survey Research Series No. 44.
- Byers, N.S. (2004). *Introduction to Forensic Anthropology: A Textbook* (2nd Edition). Boston, USA: Allyn & Bacon.
- Cameriere, R., Ferrante, L., Liversidge, H.M., Prieto, J.L., Brkić, H. (2008). Accuracy of age estimation in children using radiograph of developing teeth. *Forensic Science International*, 176, 173-177.
- Chowdhry, A. (Ed.) (2018). *Handbook of forensic odontology - An Indian perspective* (1st Edition). New Delhi, India: Century Publications.
- Cunningham, C., Scheuer, L., Black, S. (2016). *Developmental Juvenile Osteology* (2nd Edition). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Demirijan, A., Goldstein, H. (1976). New System for dental maturity based on seven and four teeth. *Annals of Human Biology*, 3(5), 411-421.
- Garvin, H., Passalacqua, N., Uhl, N., Overbury, S.R., Desina, R.G., Cabo, L.L. (2012). Developments in Forensic Anthropology: Age-at-Death Estimation. In D.C. Dirkmaat (Ed.), *A Companion to Forensic Anthropology* (1st Edition). New Jersey, USA: Blackwell Publishing Ltd.
- İşcan, M., Loth, S.R. (2000). Morphological Age Estimation. In J.A. Siegel (Ed.), *Encyclopedia of Forensic Sciences*, (pp 242-252). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Lovejoy, C.O., Meindl, R.S., Pryzbeck, T.R., Mensforth, R.P. (1985). Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: a new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1), 15-28.
- Meindl, R.S., Lovejoy, C.O. (1985). Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral-anterior sutures. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1), 57-66.
- Ramey Burns, K. (1999). *Forensic Anthropology Training Manual*. New Jersey, USA: Prentice Hall.
- Sarajlić, N., Cihlarz, Z., Klonowski, E.E., Selak, I. (2006). Stature estimation for Bosnian male population. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 6(1), 62-67.
- Sarvesvaran, R., Knight, B.H. (1994). The examination of skeletal remains. *The Malaysian Journal of Pathology*, 16(2), 117-126.
- Sauer, J.N., Lackey L.W. (2000). Anthropology Skeletal Analysis. In J.A. Siegel (Ed.), *Encyclopedia of Forensic Sciences*, (pp 261-270). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.

- Schaefer, M., Black, S., Scheuer, L. (2009). *Juvenile Osteology: A Laboratory and Field Manual*. Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Scianò, F., Bramanti, B., Manzon, V.S., Gualdi-Russo, E. (2020). An investigative strategy for assessment of injuries in forensic anthropology. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 42, 101632.
- Scott, R.G., Irish, J.D. (Eds.) (2013). *Anthropological Perspectives on Tooth Morphology - Genetics, Evolution, Variation*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Senn, D.R., Stimson, P.G. (Eds.) (2010). *Forensic dentistry* (2nd Edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Šlaus, M. (2006). *Bioarheologija - Demografija, zdravlje, traume i prehrana starohrvatskih populacija*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
- Ubelaker, D.H., Khosrowshahi, H. (2019). Estimation of age in forensic anthropology: historical perspective and recent methodological advances. *Forensic Sciences Research*, 4(1), 1-9.
- White, D.T., Folkens, A.P. (2005). *The Human Bone Manual*. Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- White, D.T., Black, M.T., Folkens, P.A. (2012). *Human osteology* (3rd Edition). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.

The background of the entire page is a photograph of laboratory glassware, specifically Erlenmeyer flasks, arranged in rows. The flasks are filled with a green, plant-like material, possibly algae or small aquatic plants, submerged in a liquid. The lighting is soft, creating a slightly blurred effect in the background flasks, while the foreground flasks are more in focus. A semi-transparent dark green rectangular overlay is positioned in the center of the image, serving as a background for the text.

5. FORENZIČKA BOTANIKA

SABINA DAHIJA
LEJLA LASIĆ
VELIDA BAKIĆ
JASMINA ČAKAR

Botanika je nauka koja proučava biljke. Naziv dolazi od grčke riječi *botane*, koja označava grmlje, travu, bilje koje raste na livadama. Za ovu nauku upotrebljava se i naziv fitologija (grč. *fiton* – biljka). Iako je jedna od najstarijih bioloških nauka, čiji korijeni potiču iz perioda antičke Grčke, forenzička botanika predstavlja relativno novu interdisciplinarnu oblast, nastalu kao rezultat potrebe za primjenom konkretnih saznanja ove naučne oblasti u različitim pravnim i istražnim postupcima.

Forenzička botanika se definiše kao upotreba dokaza biljnog porijekla na sudu. Podijeljena je na nekoliko botaničkih subdisciplina koje uključuju: anatomiju biljaka, biljnu sistematiku, palinologiju, ekologiju biljaka i limnologiju. Bazira se na korištenju biljaka ili biljnog materijala koji bi pomogao istražiteljima u rješavanju različitih forenzičkih slučajeva. U istražnim postupcima biljke mogu biti tretirane kao izvor toksičnih komponenti koje se detektuju primjenom toksikoloških analiza, ili kao dokazni materijal, koji pronađen čak i u tragovima može pomoći forenzičarima da povežu osumnjičene s mjestom zločina. Prepoznavanje, prikupljanje i čuvanje botaničkih dokaza ključno je za uspješnost laboratorijskih ispitivanja. Ako se prvi koraci u procesu istraživanja ne izvode pravilno, prihvatanje dokaza na sudu može biti dovedeno u pitanje. Kao i kod drugih oblika forenzičkih dokaza, biljni materijal se može analizirati primjenom mikroskopije ili sofisticiranih genetičko-molekularnih metoda. Prema tome, forenzička botanika zahtijeva identifikaciju biljne vrste analizom morfoloških i/ili genetičkih karakteristika vizualnom opservacijom, primjenom tehnika mikroskopije ili molekularne biologije.

Tragovi biljaka mogu biti nađeni gotovo svugdje, a njihova raznovrsnost ima veliku važnost u forenzičkim analizama. Tako se na primjer na vozilima često nalaze fragmenti biljaka nenamjerno prikupljeni prolaskom kroz određeno stanište. Ponekad dijelovi biljaka mogu biti bačeni zajedno s tijelom ili se mogu naći na odjeći žrtve ili osumnjičenika. Prisutnost nekoliko vrsta biljaka može ukazivati na određeno stanište s kojim je prethodno bio povezan osumnjičenik, tijelo, vozilo itd. Biljke se mogu identificirati analizom kompletnih biljaka ili dijelova biljke (stabljika, listovi, cvjetovi ili sjemenke). Primjeri biljnog materijala, odnosno biljnih tragova koji mogu biti korišteni kao dokaz su: komadi drveta, sjemenke, plodovi, lišće, grančice, biljne dlačice, polen, spore i ćelije algi.

Prvi slučaj korištenja botaničkog dokaza na sudu datira još iz 1932. godine kada su, u slučaju otmice i smrti sina Charlesa Lindbergha, korištene drvene ljestve za koje je mikroskopskom analizom utvrđeno da su izrađene od vrsta *Pinus ponderosa* (žuti bor), *Pseudotsuga menziesii* (obična američka dulgazija) te vrsta iz roda *Betula* (breza). Usporedbom godova i obrazaca na ljestvama s dijelom drveta pronađenim na tavanu osumnjičenoga, utvrđeno je da se obrasci u potpunosti podudaraju, što je dokazalo hipotezu tužilaštva da je taj dio drveta korišten za izradu ljestvi. Ovaj slučaj je primjer upotrebe anatomije i sistematike biljaka u pružanju ključnih podataka povezanosti osumnjičenoga s otmicom.

Na osnovu vrste i količine dostupnih biljnih tragova za forenzičku analizu, primjenjuju se različite metodologije determinacije vrste koje obuhvataju znanja iz oblasti morfologije i anatomije biljaka, sistematike, ekologije, palinologije i limnologije. Za povezivanje biljnih tragova s mjestom zločina, primjena jedne metode ne isključuje druge. Štaviše, za determinaciju biljne vrste poželjno je upotrijebiti što više metoda, pri čemu su danas molekularnogenetičke metode nezaobilazne i visoko preporučljive u analizi biljnih tragova, kada je god to moguće.

5.1 ANATOMIJA I MORFOLOGIJA BILJAKA U FORENZICI

Poznavanje biljne morfologije i anatomije veoma je važno za determinaciju vrste, što značajno olakšava forenzičarima povezivanja osoba s krivičnim djelom. Anatomija biljaka (grč. *anatemno* – sjeći) jedna je od temeljnih i najstarijih botaničkih disciplina, a proučava građu i funkciju biljnih ćelija i tkiva. Kao naučna disciplina počela se razvijati tek u 17. stoljeću otkrićem mikroskopa. Naučne spoznaje o unutrašnjoj građi biljaka, koje su do tada temeljene na posmatranjima, opisivanjima i usporedbama, dodatno su produbljene i proširene.

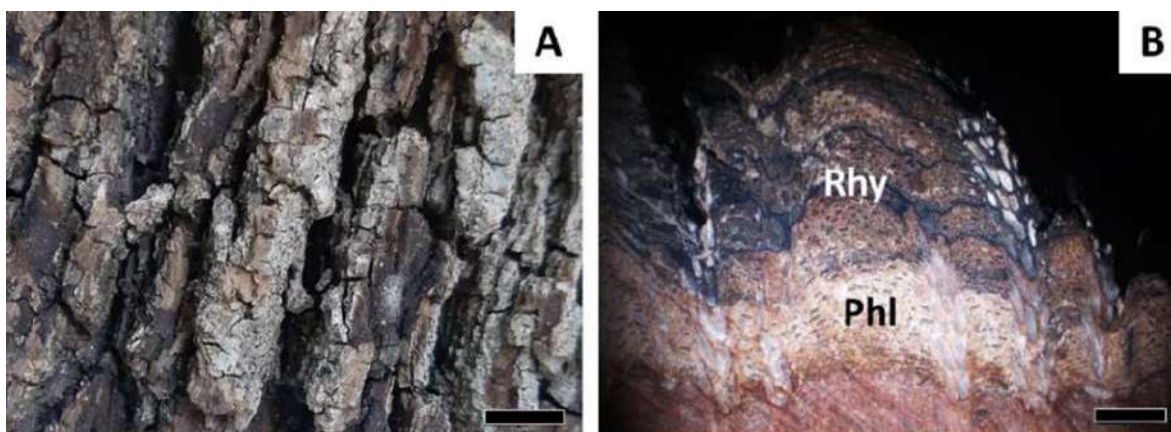
Kako su se mikroskopi razvijali, tako je analiza biljne ćelije dobijala nove dimenzije. Danas je svjetlosni mikroskop nezaobilazan u forenzičkoj analizi biljnog materijala. Dobro dokumentovana povijest biljne anatomije, zajedno s dugogodišnjim pristupom vizualnog uspoređivanja nepoznatih ćelija s poznatim, čini osnovu forenzičke analize biljnog materijala, čiji su rezultati generalno vrlo dobro prihvaćeni na sudovima. Na mjestu zločina često se nađu biljni tragovi u fragmentima pa je poznavanje biljne anatomije i histologije ključno za determinaciju vrste, povezivanje osumnjičenih s mjestom zločina te u konačnici za rješavanje forenzičkih slučajeva.

Forenzička identifikacija različitih biljnih vrsta često zavisi od poznavanja biljnih tkiva i organa, kao i različitih tipova biljnih ćelija. Iako botanički dokazi mogu biti značajni u rješavanju slučaja, fragmenti biljnog materijala mogu biti iznimno mali i zahtijevati temeljito mikroskopsko analiziranje kako bi se prvo utvrdilo o kojem se dijelu biljke radi. S druge strane, biljni makroostaci (sjemenke, plodovi, cvjetovi, listovi i drugi vegetativni dijelovi i/ili njihovi fragmenti) moćan su alat za povezivanje tijela ili drugih dokaza s primarnim mjestom zločina, jer mogu pružiti detaljne informacije o ekološkoj i geografskoj lokaciji na kojoj se osoba nalazila. U poređenju s analizom polena, biljne makroskopske ostatke lakše je prikupiti i obraditi, manje su sklone kontaminaciji, a i metode analize su jeftinije.

S druge strane, njihova je identifikacija često problematična čak i za iskusne taksonome, posebno kada se pojavljuju u fragmentima ili u degradiranom stanju. Među biljnim dijelovima, reproduktivne strukture obično pružaju maksimalnu količinu taksonomskih informacija; međutim, na mjestu zločina se češće mogu naći druge strukture, posebno one najotpornije i one koje su izravno izložene uticaju okoline, kao što je kora drveća i grmlja. S obzirom na to da kora dolazi u direktni kontakt s vanjskom sredinom i otporna je na raspadanje, ona predstavlja značajan identifikacijski alat u forenzici.

Poznato je da se kora sastoji od mnogo slojeva različitog porijekla koji mogu ili ne moraju biti prisutni kod različitih vrsta biljaka. Nastaje kao rezultat aktivnosti živog meristema (felogena) koji stvara dva različita tkiva, feloderm prema unutra i felem (pluto) prema vani. Ova tkiva zajedno tvore periderm. Tokom života drvenastih biljaka, pluto se zamjenjuje mrtvom korom (ritidoma). Ritidoma može uključivati mrtve ćelije iz različitih tkiva kao što su floem ili parenhim: sitaste ćelije, vlakna i više ili manje modificiran felem. Navedene makroskopske anatomske značajke kore korisne su za identifikaciju vrsta i imaju značajnu primjenu u forenzičkim istraživanjima (slika 5.1).

Primjena anatomije i morfologije biljaka pomogla je u rješavanju mnogobrojnih forenzičkih slučajeva. Jedan od primjera je slučaj koji se dogodio u sjevernoj Italiji, gdje su prilikom rekonstrukcije ubistva analizirani fragmenti kore drveta pronađeni na žrtvi. U augustu 2010. godine pronađeno je tijelo 20-godišnjaka u šumi, koji je bio poznati vođa mafijaškog klana, a kojeg su otela dvojica muškaraca prerušena u policajce.



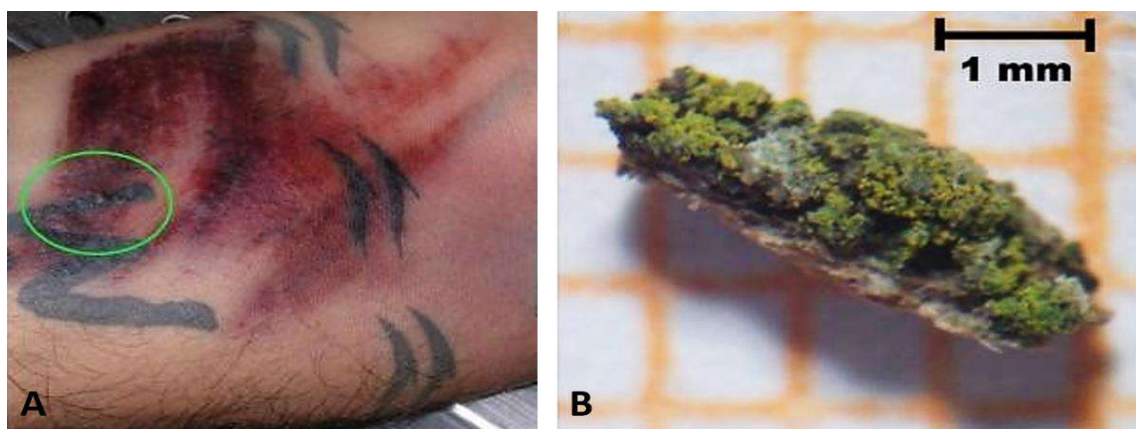
Slika 5.1. Struktura kore vrste *Quercus rotundifolia*: A – opći izgled ritidome, B – floem (Phl) i ritidoma (Rhy) na poprečnom presjeku

Tijelo je pronađeno sljedećeg jutra pored drveta, s mnogo ogrebotina na licu, zapešćima i podlakticama. Svjedok je izjavio da je žrtva bila vezana lisicama za drvo, upucana, te da je tijelo ostavljeno u blizini stabla. Međutim, tužitelj je zatražio da se provjere ovi navodi s obzirom na to da lisice nisu pronađene u blizini žrtve. To je bilo posebno važno kako bi se provjerila pouzdanost konkretnog svjedoka koji je tvrdio da je bio prisutan, a tek naknadno odlučio sarađivati s policijom. Međutim, ono što se činilo važnijim za patologa na mjestu događaja i nakon obdukcije bilo je nekoliko malih fragmenata tragova botaničkog porijekla pronađenih na koži žrtve, s unutrašnje strane podlaktica. Fragmenti su prikupljeni s kože i analizirani s namjerom da se utvrdi potiču li od kore stabla uz koje je tijelo pronađeno. Hipoteza je bila da su ostaci kore i ozljede nađene na podlakticama ostali uslijed vezanja ruku lisicama oko stabla.

Za potrebe analize fragmenata kore napravljeni su identifikacijski ključevi za određivanje biljnih rodova ili vrsta, na temelju anatomskih svojstava cijele kore, te dodatno identifikacijski ključ zasnovan na osobinama vanjske kore. Uzorci kore za analizu primjenom identifikacijskih ključeva uzeti su sa 16 vrsta stabala koja su uobičajena u nizijama sjeverne Italije. Odabrane vrste su bile: *Acer campestre* L., *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn., *Alnus incana* (L.) Moench., *Betula pendula* Roth, *Castanea sativa* Mill., *Quercus robur* L., *Fagus sylvatica* L., *Fraxinus excelsior* L., *Pinus sylvestris* L., *Populus nigra* L. i *Sambucus nigra* L., porijeklom iz nizijskih / planinskih šuma, zatim *Prunus serotina* Ehrh. i *Robinia pseudoacacia* L., invazivne vrste vrlo česte u nizijskim šumama, i na kraju dominantne vrste na mjestu ubojstva: *Ginkgo biloba* L., *Juglans nigra* L. i

Juglans regia L., koje se često uzgajaju kao ukrasne vrste u parkovima i vrtovima. Svi uzorci su analizirani posmatranjem kroz stereomikroskop, pri čemu su bile analizirane glavne makroskopske karakteristike vanjskog dijela stabla (od sekundarnog floema do površine). Prvi identifikacijski ključ pripremljen je na temelju svih anatomskih svojstava vidljivih kroz stereomikroskop. Drugi identifikacijski ključ pripremljen je na osnovu osobina vanjske kore, koja predstavlja dio koji se odvaja od debla i koji se javlja kao biološki trag u konkretnom slučaju (mali fragmenti biljnog tkiva s unutrašnje strane podlaktice leša) (slika 5.2. A). Identifikacija komadića kore prikupljenih s tijela izvršena je i putem identifikacijskih ključeva i putem vizualne usporedbe s vanjskom korom prikupljenom s obližnjih stabala vrste *Robinia pseudoacacia* L.

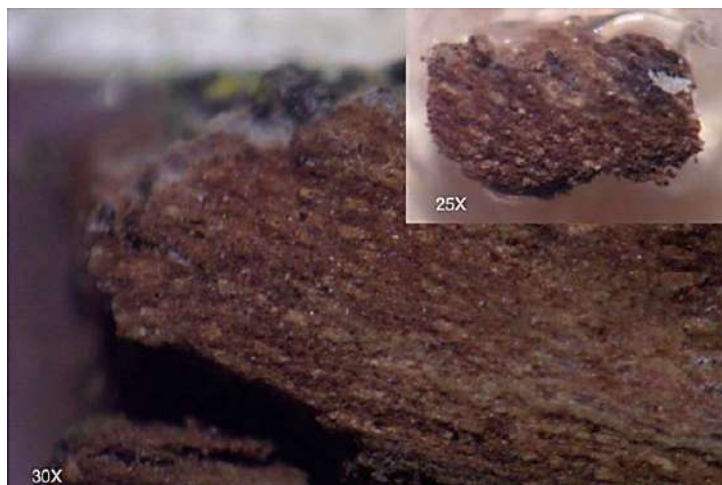
Fragmenti pronađeni na tijelu bili su vrlo mali (između 2 i 8 mm) pa nije mogla biti opisana cijela kora, nego samo vanjski dio kore (ritidoma) (slika 5.2. B). Unutar ritidome moglo se uočiti mrtvo tkivo floema sa svijetlim pravouglim vlaknima. Uzorkovane vrste pokazale su vrlo varijabilnu strukturu kore, posebno u pogledu debljine i izgleda vanjske kore (ritidome).



Slika 5.2. A – fragment kore prikupljen obdukcijom sa unutrašnje površine lijeve podlaktice žrtve u istraživanom slučaju, B – uvećani prikaz fragmenta

Prvi identifikacijski ključ omogućio je razlikovanje svih sakupljenih vrsta osim *Juglans nigra* i *J. regia* koje se, iako vizualno različite, nisu mogle međusobno razlikovati na temelju odabranih osobina. Poređenja s korom dominantne vrste drveća na mjestu zločina, *Robinia pseudoacacia*, pokazala su gotovo identične osobine vanjske kore (slika 5.3), karakterizirane sekundarnim floemom s radijalno raspoređenim vlaknima, koja su dominantna osobina i u svjetlijoj unutrašnjoj

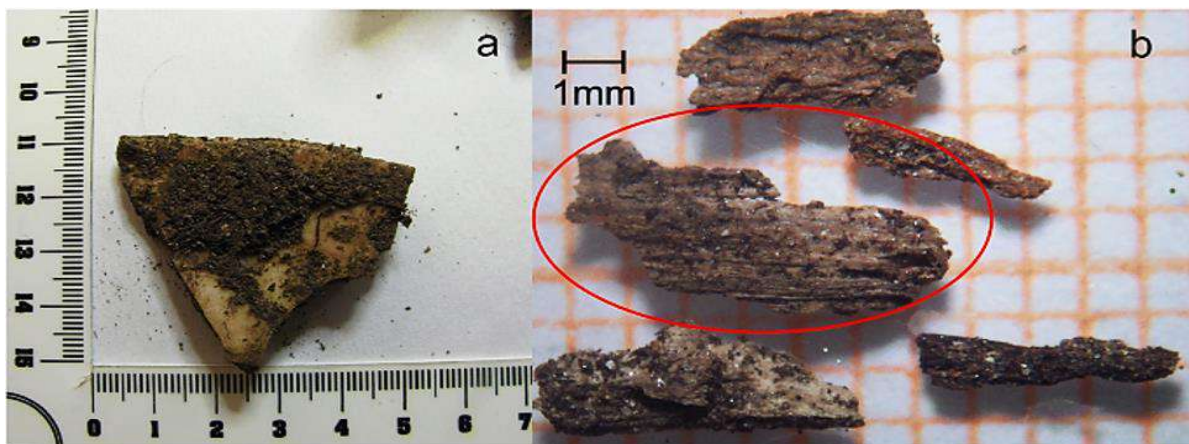
kori, izmjenjujući se s umetnutom peridermom koja se nije pojavljivala u fragmentima pronađenim na tijelu. Prvi identifikacijski ključ nije bilo moguće primijeniti zbog odsustva ekspanzijskog tkiva te je pojednostavljeni drugi ključ omogućio tačnu identifikaciju uzoraka. Ovaj nalaz je potvrdio i polaznu hipotezu i vjerodostojnost svjedoka.



Slika 5.3. *Usporedba između poprečnog presjeka vanjske kore vrste Robinia pseudoacacia sakupljene na mjestu zločina i fragmenata pronađenih na tijelu*

Još jedan primjer primjene znanja iz anatomije i morfologije biljaka opisan je u slučaju koji se dogodio u junu 2010. godine na šumskom području kantona Ticino (Švicarska), gdje su pronađeni ljudski ostaci. Nakon antropološke i genetičke analize, ustanovljeno je da ostaci potiču od djevojke koja je nestala prethodne godine, samo nekoliko sati nakon što je upoznala mladića. Kako bi se temeljito istražilo mjesto gdje je pronađena žrtva te se dobile informacije o eventualnom pomjeranju tijela s mjesta zločina, obavljena su i botanička istraživanja. Mjesto zločina pregledao je forenzički botaničar koji je izvršio uzorkovanje i identifikaciju biljnih vrsta i biljnih fragmenata (detritus) na tom lokalitetu. Pronađeni biljni tragovi identificirani su usporedbom s referentnim zbirkama i dihotomnim ključevima koji predstavljaju alat koji se koristi u taksonomiji za identifikaciju bioloških uzoraka, a na osnovu vizualno uočljivih karakteristika. Ovi ključevi sadrže seriju izjava s po dvije opcije, od kojih svaka vodi do narednog koraka (izjave) s druge dvije opcije i na kraju do identifikacije uzorka. Svi analizirani tragovi u navedenom slučaju bili su u skladu s cjelokupnom vegetacijom šume. Nadalje, analiza kostiju žrtve otkrila je botaničke tragove koji su

bili u skladu s biljnim vrstama pronađenim na mjestu zločina, što ukazuje na to da tijelo nije bilo pomjerano s primarnog mjesta zločina. Na lobanji, na liniji prijeloma duž frontalnog regiona lobanje, pronađeni su fragmenti drveta (slika 5.4. A), premali za tipičnu mikroskopsku analizu poprečnih, radijalnih i tangencijalnih presjeka, ali je optičkom mikroskopijom uspješno utvrđena kompatibilnost fragmenata s vrstom *Castanea sativa* (kesten) (slika 5.4. B).



*Slika 5.4. A – fragment kosti koji pripada prednjem dijelu žrtvine lobanje, B – komadići drveta povezani s prijelomom žrtvine lobanje. Fragment zaokružen crveno, mikroskopski je analiziran i identificiran kao *Castanea sativa*.*

Antropološkom analizom fragmenata lobanje ustanovljeno je da je smrt nastupila kao posljedica traumatske ozljede lobanje uzrokovane tupim predmetom. Prisutnost fragmenata drveta u frakturi lobanje i zaključak antropologa o vrsti ozljede doveli su do zaključka da je kao oružje ubistva korišten drveni predmet. Naknadna usporedna analiza fragmenta drveta prikupljenih s lobanje i posječenih dijelova kestena koji su se nalazili u blizini mjesta zločina pokazala je potpunu kompatibilnost, nakon čega je zaključeno da je upravo to bilo oružje kojim je počinjeno ubojstvo.

5.2 TAKSONOMIJA BILJAKA U FORENZICI

Taksonomija biljaka je nauka o opisivanju i imenovanju organizama i grupa organizama te o njihovoj klasifikaciji unutar hijerarhijskog sistema. Identifikacija određene vrste iznimno je važna u slučajevima koji uključuju otrove i konzumaciju nedopuštenih droga. Ovaj postupak predstavlja prvi korak u forenzičkom radu s biljnim dokazima.

Da bi naučnici koji se bave forenzičkom botanikom mogli učinkovito komunicirati, potrebno je poznavanje latinskog naziva vrste biljaka prilikom evidentiranja podataka. Zbog velikog broja različitih biljnih vrsta, tačan naziv zahtijeva razumijevanje sistema binarne nomenklature koju je uveo Carl von Linné (1707–1778). Taksonomija biljaka obično uključuje identifikaciju biljaka do nivoa porodice, roda ili vrste na temelju njihove anatomije i/ili morfologije. U nekim slučajevima neophodna je primjena toksikološko-hemijske analize, posebno kada se radi o identifikaciji potencijalno otrovnih biljaka ili biljaka povezanih s ilegalnim drogama, ili genetičke analize, kada su dostupni fragmenti biljaka.

Determinirati biljnu vrstu primjenom anatomske / morfološke analize mogu samo profesionalni botaničari. Međutim, s obzirom na to da se biljni tragovi na mjestu zločina često nađu u malim količinama ili u degradiranom stanju, preporuka je da se primijene molekularnogenetičke metode (PCR, sekvenciranje) za determinaciju vrste analizom molekularnih markera (mikrosatelitni markeri, SNP polimorfizmi).

Samo jedan od primjera upotrebe klasične taksonomije u forenzičkim istražnim postupcima je slučaj koji se desio u urbanom dijelu glavnog grada Tajvana (Taipei), gdje je pronađeno tijelo mlade žene u kanalu pored puta (slika 5.5. A). Prije obdukcije, zbog nedostatka vidljivih prijeloma kostiju, mislilo se da je žrtva preminula od posljedica udarca. Jedna od pretpostavki bila je da je žrtvu udarilo vozilo, nakon čega je tijelo bačeno u kanal kako bi se prikrila nesreća. Pregledom tijela od strane patologa pronađen je biljni materijal (mala bobica i dio stabljike) u kosi žrtve (slika 5.5. B). Na temelju ograničenih morfoloških karakteristika biljnih tragova, pretpostavilo se da biljni trag pripada rodu *Solanum* koji je neuobičajen za floru tog područja. Naknadno su istražitelji uočili saksije na rubu ograde iznad kanala, u kojima su se nalazile biljke vrste *Solanum nigrum* L., a koje su se podudarale s botaničkim dokazima iz kose žrtve (slika 5.5. C). Na osnovu toga, istražitelji su zaključili da je žena pala s vrha zgrade, pri čemu je došla u kontakt s biljkama na ogradi tokom pada, te je na taj način došlo do transfera dijelova biljaka na žrtvinu kosu. Rezultati obdukcije su potvrdili da je smrt posljedica ozljeda nastalih pri padu s velike visine, a dodatno su rođaci žrtve izjavili da je mlada žena patila od depresije i da je prije toga već pokušala da izvrši samoubojstvo.



Slika 5.5. A – fotografija ulice u kojoj je pronađeno tijelo žrtve, B – maleni fragment bobice i stabljike pronađen u kosi mlade žene, C – fizičko podudaranje između slomljenih krajeva stabljike s biljke na ogradi i slomljene stabljike iz kanala

Još jedan primjer primjene botanike i taksonomije u rješavanju slučaja smrti pod nerazjašnjenim okolnostima je slučaj koji se dogodio u zimu 2010. godine u južnoj Italiji. Naime, starija žena, oboljela od demencije s vremensko-prostornom dezorijentacijom i amnezijom, nestala je iz njegovališta te je pronađena mrtva sljedećeg dana u blizini obale rijeke koja se ulijeva u Jonsko more, a koja je tekla ispod željezničke pruge. Očevidom i vanjskim pregledom žrtve utvrđene su traumatske ozljede koje se mogu pripisati padu. Do mjesta na kojem je pronađena žrtva postojala su dva puta: put A je strma staza koja je vodila od željezničke stanice, a put B je bila željeznička pruga (slika 5.6). Analiza kretanja žrtve bila je ključna u rješavanju okolnosti pod kojima je smrt nastupila jer bi se povezivanjem žrtve s kretanjem putem A moglo isključiti ubistvo i samoubistvo. Na odjeći starice pronađene su biljke koje su identificirane kao vrsta *Xantium orientalis* subsp. *italicum* (slika 5.7). Usporedbom biljnih tragova pronađenih na odjeći i vrsta pronađenih na putu A utvrđeno je da je starica išla upravo ovim putem.



Slika 5.6. A – staza B i mjesto zločina, B – staza A i ispitivanje tla



Slika 5.7. A – biljne vrste pronađene na stazi A, B – *Xanthium orientalis* na odjeći žrtve

Patolog je ustanovio da su ozljede na tijelu žrtve bile karakterizirane *ekskorijacijama* (ogrebotinama) te *ekhimozama* (potkožnim krvarenjem) na rukama i koljenima, a rekonstrukcijom događaja je zaključeno da je žrtva išla stazom A, okliznula se i skotrljala u provaliju, gdje je ubrzo i podlegla povredama nastalim kao posljedica pada. Ovaj i mnogi drugi primjeri pokazuju kako su znanja iz taksonomije i botanike važan dio slagalice u rješavanju kompleksnih forenzičkih slučajeva te predstavljaju ključni faktor za rasvjetljavanje okolnosti pod kojima je nastupila smrt.

5.3 EKOLOGIJA BILJAKA U FORENZICI

Ekologija biljaka je naučna disciplina koja proučava rasprostranjenost i bioraznolikost biljaka i biljnih zajednica, uticaj faktora spoljašnje sredine na prisustvo biljaka u određenom području, kao i interakcije između biljaka i njihove odnose s drugim organizmima. Ljudi su oduvijek koristili ekološka znanja u praktičnom smislu. Drevni narodi su metodom pokušaja i pogrešaka pronalazili korisnu hranu i ljekovite biljke te naučili izbjegavati otrovne biljke. Ti su se podaci prenosili s koljena na koljeno usmenom predajom.

Za razliku od dokaza iz anatomije i taksonomije biljaka, gdje su biljke glavni, a ponekad i jedini dokaz koji se razmatra, ekolog mora posjedovati znanje o svim živim bićima (biljke, životinje, gljive, bakterije) i njihovim međusobnim interakcijama, kao i s neživim ili abiotskim okolišem (tj. tlo, voda, zrak, hemikalije itd.). Ekologija biljaka je našla široku primjenu u forenzičkoistražnim postupcima pa se konvencionalnom ekološkom evaluacijom pojedinci mogu dovesti u vezu s mjestom zločina. Poznavanje ekologije biljaka bilo je krucijalno u lociranju masovnih grobnica u nekoliko forenzičkih slučajeva.

Naime, na takvim mjestima često rastu korovske vrste koje se razlikuju od tipične vegetacije okolnog staništa. Neki od najčešćih primjera primjene znanja iz ekologije biljaka odnose se na slučajeve traženja nestalih osoba i neotkrivenih grobnica.

Jedan takav primjer je nestanak studentice, koja je posljednji put viđena dok je tokom noći hodala ulicom u Boulderu u Coloradu. Naime, grupa mladića je otela i seksualno napastvovala djevojku. Djevojka je uspjela da pobjegne, a svjedok otmice prijavio je policiji dio registarske oznake kombija. Vozilo je ubrzo pronađeno i zaplijenjeno, ali to nije bilo dovoljno da se osumnjičeni dovedu u vezu s krivičnim djelom. Forenzičari su prilikom pretrage vozila sakupili tragove biljaka iz unutrašnjosti automobila, i to s prednjih i stražnjih sjedala, tepiha, papučica automobila, kao i s guma. Ove tragove su usporedili s uzorcima vegetacije koja raste na mjestu zločina. Mjesto zločina je bilo na višoj nadmorskoj visini od mjesta gdje su živjeli napadači, a vegetacija na ovoj nadmorskoj visini značajno se razlikovala od vegetacije na nižim područjima. Na osnovu toga, zaključeno je da su osumnjičeni vrlo vjerovatno bili na tom području, što je bio samo jedan od dokaza na osnovu kojih su optužene sve osobe uključene u ovaj zločin.

Primjer primjene konvencionalne ekologije je i slučaj dvadesetpetogodišnje Michelle Wallace koja je nestala tokom planinarenja centralnim planinama Colorada, u ljeto 1974. godine. Nakon bezuspješno provedene pretrage područja kojim se kretala Michelle, istražni organi su dobili dojavu da je djevojka posljednji put viđena u društvu Roya Melansona, kod kojeg je prilikom pretresa pronađen njen novčanik. Tokom ispitivanja Melanson je tvrdio da je ukrao njezin auto sa stvarima u njemu te da je djevojka bila živa kada ju je posljednji put vidio. U tom trenutku nije bilo ključnih dokaza koji bi doveli u vezi osumnjičenog s nestankom djevojke. Pet godina kasnije, planinari su nedaleko od područja na kojem je Michelle posljednji put viđena pronašli tjemne s pletenicama kose, što je zbog proceduralnih propusta analizirano tek 12 godina kasnije.

Prilikom pregleda pronađene su smrekove iglice upletene u pletenicu, a botaničar / ekolog uključen u istragu ustanovio je da iglice pripadaju vrsti *Picea engelmannii* (Engelmanova smreka). Ova vrsta raste na strmim padinama viših nadmorskih visina. Zahvaljući njegovom poznavanju okolnih biljnih zajednica uključenih u istragu, botaničar je dao lokaciju na kojoj raste Engelmanova smreka (slika 5.8), što je upravo lokacija na kojoj je žrtva viđena s Melansonom.

Nakon obimne pretrage navedenog područja, godinu dana kasnije, pronađena je lobanja, a analiza zubnog kartona je pokazala da pripada nestaloj Michelle Wallace. U vrijeme kada je tijelo otkriveno, osumnjičeni Melanson je služio kaznu zbog pljačke te je nakon ispitivanja priznao ubistvo Michelle Wallace.



Slika 5.8. Habitus vrste Picea engelmannii Engelm.

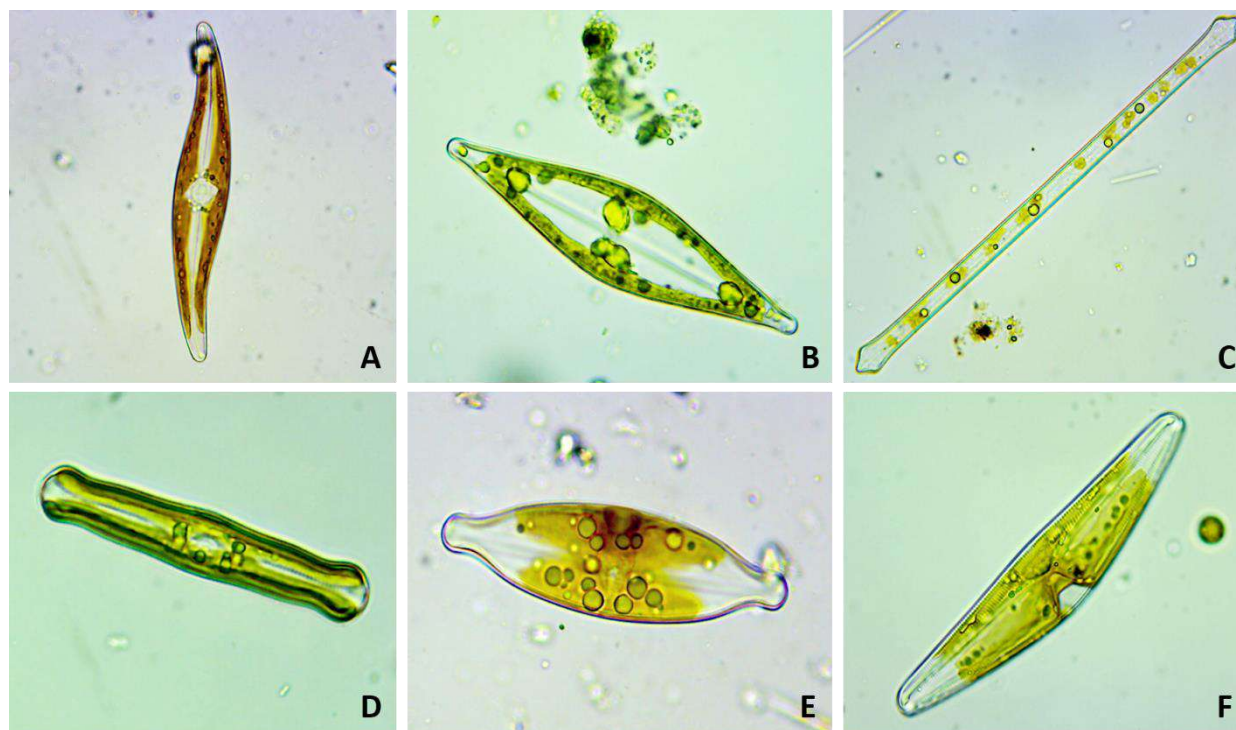
5.4 LIMNOLOGIJA U FORENZICI

Limnologija je grana slatkovodne ekologije koja proučava alge, koje se u forenzici analiziraju u uzorcima prikupljenih sa žrtava, počinitelaca zločina i s mjesta zločina. Među algama poseban forenzički značaj imaju silikatne alge ili dijatomeje (Bacillariophyta), koje su jednoćelijski eukariotski fotosintetski mikroorganizmi zastupljeni u svim kopnenim, slatkovodnim i morskim ekosistemima (slika 5.9).

Ćelije su im obično manje od 100 μm (iako mali broj vrsta može biti veći), a odlikuju se posjedovanjem različito strukturiranih, uglavnom bipartitnih, silikatnih ćelijskih zidova (frustula), čija se konstrukcija najbolje vidi pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM). Iako su kao skupina široko rasprostranjene, pojedinačne vrste dijatomeja reaguju karakteristično na uslove

okoliša, tako da su tipična različita staništa kolonizirana različitim vrstama, a mogu postojati i sezonske varijacije u rastu pojedinih vrsta, što ih čini pogodnim materijalom u forenzičkoj analizi.

Od svih algi, dijatomeje se najviše koriste u forenzičkoj nauci pri otkrivanju zločina, povezivanju krivca s mjestom zločina ili eliminisanju osumnjičenih osoba. Štaviše, neki autori koriste pojam *forenzička dijatomologija* naglašavajući važnost proučavanja dijatomeja u istražnopravnim postupcima. Prvenstveno zbog svoje jedinstvene građe, velike raznolikosti vrsta te činjenice da su kao dokazni materijal vjerodostojne, silikatne alge mogu biti multifunkcionalan dokaz jer se, pored navedenog, pojavljuju u određenim ekosistemima u određeno vrijeme. Čvrsti ćelijski zid im je građen od silicijevog dioksida (SiO_2), zbog čega je otporan na degradaciju te zadržava dijagnostičke karakteristike koje omogućuju identifikaciju vrsta i forenzičku usporedbu u uslovima u kojima većina forenzički relevantnih dokaza veoma brzo propada.



Slika 5.9. Primjeri slatkovodnih dijatomeja uključujući dva kolonijalna oblika posmatrana svjetlosnim mikroskopom. A – *Gyrosigma acuminatum*, B – *Craticula cuspidata*, C – *Synedra capitata*, D – *Pinnularia* sp., E – *Anemoeoneis sphaerophora*, F – *Cymbella aspera*

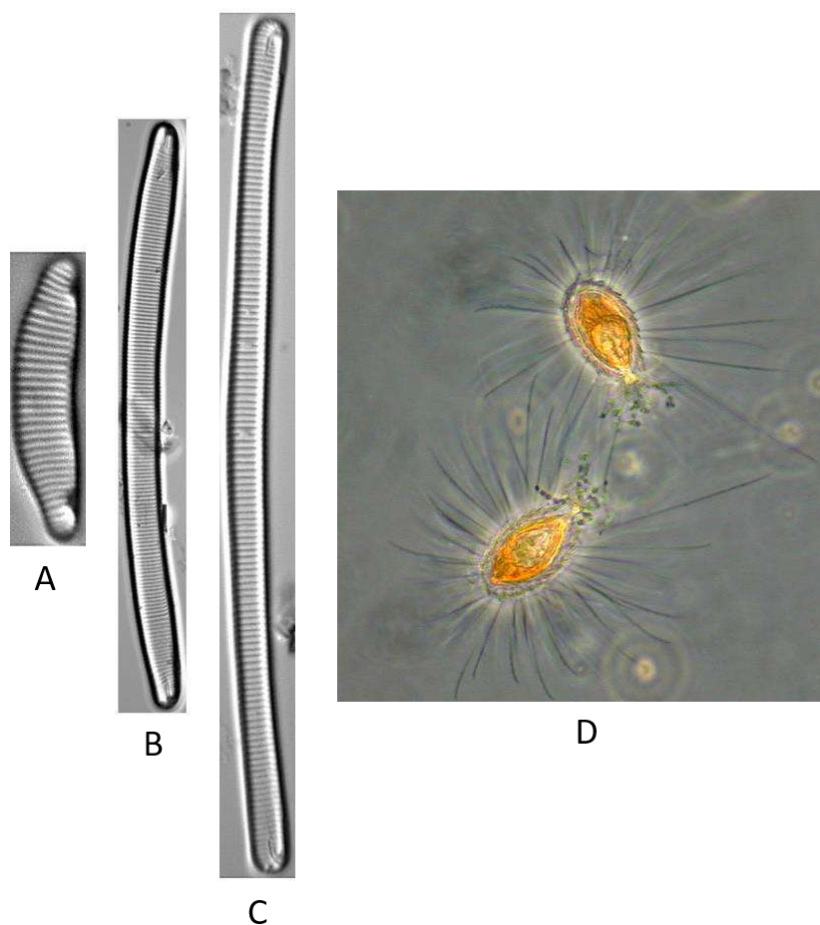
Nadalje, mikroskopska priroda dijatomeja povećava njihov potencijal za korištenje u forenzičkim analizama. Vrlo je mala vjerovatnoća da će počinitelj prepoznati prijenos tragova dijatomeja s mjesta zločina, što povećava mogućnost pronalaska dijatomeja kao dokaza. Osim što su odličan dokaz u povezivanju osumnjičenih s mjestom zločina i otkrivanju mjesta zločina, kao materijalni dokaz u forenzici dijatomeje se najviše koriste u slučajevima utapanja osoba. U forenzičkim istragama u kojima je tijelo izvađeno iz vode potrebno je dokazati je li smrt nastala utapanjem ili ne. Pri tome, postavlja se pitanje je li osoba bila živa u trenutku utapanja (*antemortem* utapanje) ili je bačena mrtva u vodu (*postmortem* utapanje). Da bi se odgovorilo na ova pitanja, primjenjuje se *dijatomejski test* koji se smatra najboljim pokazateljem utapanja. Test se zasniva na detekciji silikatnih algi u uzorcima tkiva, a na osnovu činjenice da kod smrti koja je nastala utapanjem dolazi do aspiracije vode koja, između ostalog, sadrži dijatomeje. Aspirirane dijatomeje dospijevaju krvotokom iz pluća do tkiva različitih organa. Izolacija silikatnih kućica dijatomeja iz uzorka žrtve može pomoći pri otkrivanju stvarnog uzroka smrti žrtve. Detektovane silikatne alge u tkivu želuca ukazuju na to da je voda potencijalno progutana prilikom utapanja, iako se u želucu može naći i zbog pasivnog ulaska nakon smrti. Nalaz dijatomeja u plućima govori u prilog pretpostavci da je osoba udahнула vodu, iako voda i u pluća može ući pasivno. Pozitivan nalaz u koštanoj srži, krvi i perifernim organima ukazuje na to da je voda udahnuta dok je osoba još bila živa. Većina istraživača utvrdila je pouzdanost dijatomejskog testa uzimajući u obzir kvalitativne i kvantitativne kriterije. Nekoliko studija je pokazalo pozitivnu korelaciju između dijatomeja ekstrahiranih iz koštane srži i mekih tkiva udaljenih organa sa smrti koja je nastupila kao posljedica utapanja. U istim studijama, u slučajevima gdje je smrt nastupila pod drugim okolnostima, a tijelo naknadno dospjelo u vodu, dijatomeje nisu detektovane u navedenim tkivima.

Osim za dijagnozu / potvrđivanje smrti nastale utapanjem, silikatne alge se koriste za povezivanje osumnjičenih s mjestom zločina, kao i s počinjenim krivičnim djelom. Kao što smo rekli, neke vrste dijatomeja su specifične za tačno određeno područje te su vrlo osjetljive na promjene u okolišu, kao što su promjene temperature i dostupnosti nutrijenata, zbog čega njihova koncentracija i sastav variraju od staništa do staništa. Zbog toga je moguće, najčešće analizom sedimenta, a na osnovu sastava i količine različitih vrsta silikatnih algi, odrediti mjesto s kojeg potiče analizirani sediment. Jedan od pozitivnih primjera primjene analize dijatomeja u rješavanju forenzičkog slučaja je slučaj koji se dogodio tokom jula 1991. godine, kada su dva mladića

brutalno napadnuta od strane nekoliko tinejdžera dok su pecali na ribnjaku u predgrađu Connecticuta. Nakon što su napadnute nožem, žrtve su vezane ljepljivom trakom, pretučene bejzbolskom palicom i bačene u ribnjak. Srećom, jedna se žrtva uspjela osloboditi, spasiti svog ozlijeđenog prijatelja te pozvati u pomoć mještane. Očigledni motiv za napad bio je krađa bicikala žrtvi. Iscrpna istraga dovela je do brzog hapšenja trojice osumnjičenih. U pokušaju da osumnjičenike povežu s mjestom zločina, istražitelji su pribavili brojne materijalne dokaze koje su napadači ostavili na mjestu događaja. Vizualnim pregledom svih materijalnih dokaza, kao i odjeće žrtava i osumnjičenika, uočen je sedimentni talog na unutrašnjoj i vanjskoj površini obuće koji je poslan na analizu u referentnu laboratoriju. Za svaki uzorkovani trag je napravljena kvalitativna procjena vrsta dijatomeja i hrizofita. Dodatno, relativni broj od tri vrste iz roda *Eunotia* (slika 5.10) prebrojan je za svaki uzorak te je primijenjena statistička analiza kvantificiranja sličnosti između uočenih omjera populacije ovih algi. Svi uzorci sadržavali su brojne primjerke i dijatomeja i hrizofita. U ispitivanim uzorcima identificirano je ukupno 25 vrsta iz 15 rodova algi. Od ovog broja, 14 vrsta je bilo zajedničko svim uzorcima. Sve pronađene vrste bile su indikativne za slatkovodno stanište. Prisutnost ljuski vrste *Mallomonas caudata* u svakom od uzoraka ograničila je istragu na slatkovodno stanište kao što su ribnjak ili jezero, ali ne i na potok ili rijeku, jer je ova vrsta ograničena u svojoj distribuciji na slatkovodna jezera i ribnjake. Veliki postotak perifitskih dijatomeja dodatno je upućivao na plitko slatkovodno mjesto obraslo vegetacijom. Uočene su izrazite sličnosti u sastavu vrsta u svakom uzorku s referentnim uzorkom sedimenta. Stoga je kvalitativna analiza zajednica dijatomeja i hrizofita prisutnih u prikupljenim uzorcima sedimenta snažno ukazala na zajednički izvor slatke vode, najvjerovatnije plitko, vegetirano jezerce.

Osim prethodno opisane kvalitativne analize, urađena je i kvantitativna procjena tri vrste slatkovodnih dijatomeja iz roda *Eunotia*. Detektovano je pedeset primjeraka vrsta iz roda *Eunotia* u uzorcima sedimenta uzorkovanog s tenisica osumnjičenika i sedimenta iz ribnjaka. Osamnaest primjeraka vrsta iz roda *Eunotia* identificirano je iz blata tenisica koje su pripadale žrtvama. Smatra se da je manji broj primjeraka u uzorku sa žrtvinih tenisica rezultat manje količine samog uzorka. Identificirane vrste iz ovog roda bile su *E. incisa*, *E. pectinalis* i *E. flexuosa*, koje su pronađene u svakom od ispitivanih uzoraka (slika 5.10. A-C).

Vrsta *Mallomonas caudata* (slika 5.10. D) zastupljena je kao dominantna vrsta hrizofita u vodenom toku sjeveroistoka Sjedinjenih Američkih Država. Međutim, *M. caudata* bila je najzastupljenija vrsta hrizofita na tenisicama osumnjičenika, žrtava, kao i u referentnom uzorku iz ribnjaka, što dalje ukazuje na to da svaki uzorak najvjerojatnije potiče s istog lokaliteta.



Slika 5.10. A – *Eunotia incisa*, B – *E. pectinalis*, C – *E. flexuosa*, D – *Mallomonas caudata*

U maju 1992. godine sva trojica osumnjičenika su se izjasnila krivim za niz optužbi za kaznena djela koja proizlaze iz njihove umiješanosti u ovaj slučaj. Svaki je osuđen na dugotrajnu robiju. Iako su različiti istražni napori i forenzičke analize rezultirali uspješnim rješenjem ovog slučaja, jedinstvena uloga koju je ekologija vodene zajednice odigrala u povezivanju žrtava i osumnjičenika sa zajedničkim izvorom slatke vode vrijedna je pažnje.

Ovaj slučaj još jednom potvrđuje da bogatstvo i raznolikost vrsta karakterističnih za zajednice slatkovodnih dijatomeja i hrizofita, u kombinaciji s otpornom prirodom njihovih silikatnih ćelijskih zidova, čini ih idealnim za primjenu u forenzici.

5.5 PALINOLOGIJA U FORENZICI

Palinologija je nauka koja se bavi proučavanjem polena, spora i drugih palinomorfoza u palinomorfološkom spektru koje su mikroskopske veličine (od 5 μm do 500 μm). Dominantni elementi u palinomorfološkom spektru su zrna polena, zbog čega se i najintenzivnije proučavaju u okviru palinologije. Prvi je Carl von Linné 1751. godine uveo termin polen kao stručni naziv za fertilizacioni element cvijeta, dok su autori Hyde i Williams 1944. godine prvi uveli termin palinologija u biološku literaturu.

Palinologija je kao nauka podijeljena na bazičnu i primijenjenu palinologiju. Bazična palinologija bavi se proučavanjem citologije, genetike, morfologije, kao i hemijskim osobnostima polenovih zrna. Primijenjena palinologija podrazumijeva upotrebu znanja bazične palinologije u cilju rekonstrukcije flore proteklih geoloških perioda (paleopalinologija), rekonstrukcije klimatskih uslova, analize botaničkog i geografskog porijekla meda (melisopalinologija), kriminalističkih rekonstrukcija (forenzička palinologija), kao i praćenja koncentracija alergenog polena u atmosferi (aerobiologija).

5.5.1 Bazična palinologija

5.5.1.1 Struktura i osobine polenovog zrna

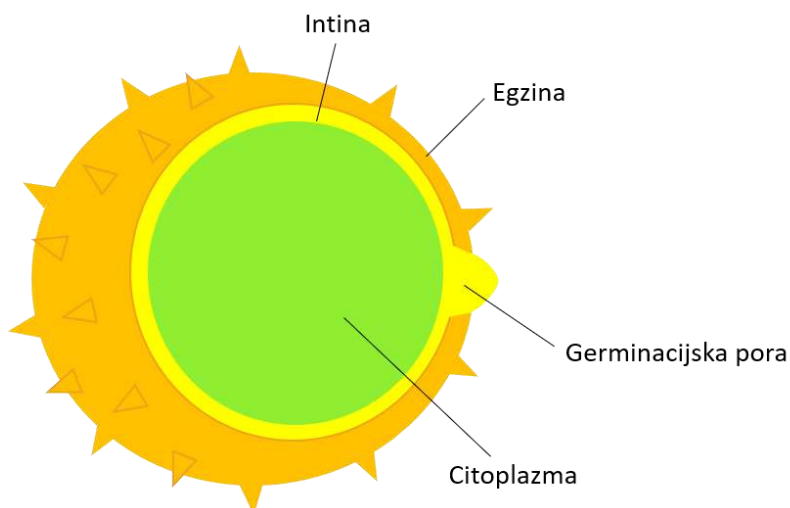
Polen ili cvjetni prah je reducirani muški gametofit skrivenosjemenica i golosjemenica. Strukturalnu komponentu polenovog zrna čine dva segmenta: složena sporoderma i citoplazma u kojoj se nalazi nasljedni materijal (haploidna garnitura, n). Složena sporoderma je građena od dva sloja: vanjskog sloja eksine i unutrašnjeg sloja intine (slika 5.11).

U hemijskom smislu eksina je građena od sporopolenina i manje količine polisaharida, dok je intina građena od polisaharida. Sporopolenin je hemijski najotpornije organsko jedinjenje koje se razlaže oksidacijom i pripada terpenima. Krajem šezdesetih godina otkriveno je da sporopolenin nastaje oksidativnom polimerizacijom karotenoida i karotenoidnih estera. Procentualni udio

sporopolenina varira kod različitih vrsta pa tako na primjer polenovo zrno vrsta roda *Pinus* sp. sadrži 2,4% pa do 3,5% sporopolenina kod roda *Phleum* sp., a spore roda *Equisetum* sp. sadrže ga tek 1,8%.

Postoje dva načina podjele eksine polenovog zrna. Prema jednoj definiciji eksina se sastoji od slojeva ekteksine i endeksine, a prema drugoj definiciji eksinu čine slojevi seksina i neksina. Tetrade koje se formiraju nakon mejoze prolaze faze sazrijevanja i diferencijacije. Četiri ćelije u svom zreлом stadiju najčešće sazrijevaju pojedinačno pa se takva zrna zovu monade. U nekim rodovima ili porodicama otpuštaju se u paru, pa se zovu dijade, ili, ako ostanu zajedno, tetrade (mnoge vrste porodica Ericaceae i Typhaceae). Kod nekih vrsta iz porodice Orchidaceae zrna se povezuju u veće aggregate, polijade. Većina vrsta porodice Pinaceae ima sakatna polenova zrna, odnosno zrna sa zračnim vrećicama, koje nastaju odvajanjem seksine od neksine. Svako zrno polena pokazuje odgovarajuću polarnost, što je posljedica njegovog prvobitnog položaja u okviru tetrade. Dok je polen još u tetradama, polenova zrna pokazuju svojstvo polariteta, koji zavisi od položaja polenovog zrna.

Polenova zrna mogu biti simetrična ili u manjem procentu asimetrična. Simetrična polenova zrna koja imaju tri ili više vertikalnih ravni simetrije su radiosimetrična. Bisimetrična polenova zrna imaju dvije vertikalne ravni simetrije, uključujući bilateralna zrna s ekvatorijalnim osama koje nisu jednake dužine i izobilateralna / biradijalna zrna s ekvatorijalnim osama iste dužine.

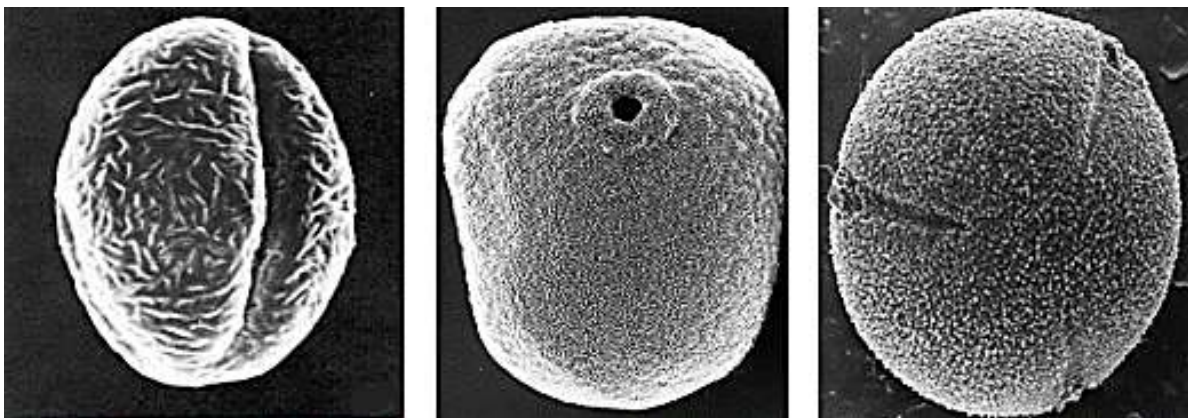


Slika 5.11. Šematski prikaz građe polenovog zrna

5.5.1.2 Identifikacija polenovih zrna

Mikromorfološka struktura polenovog zrna predstavlja osnovni parametar u biološkoj determinaciji vrste. Determinacijom osnovnih karakteristika koje određuju polen: vrsta, broj i položaj apertura, oblik i veličina polenovog zrna, ornamentalne karakteristike ekteksine i druge karakteristike, te njihovom sintezom determiniramo tip polenovog zrna, što ima za cilj identifikaciju vrste polena.

Aperture su tanki ili potpuno odsutni dijelovi eksine koji omogućuju klijanje peludne mješine nakon što dospije na kompatibilnu njušku tučka. Polenova zrna prvobitnih skrivenosjemenica imaju samo slabo naznačena mjesta za klijanje (leptomata), a tek kasnije su u evoluciji nastale jasno ograničene aperture. Aperture se mogu pojaviti u dva oblika: pore (porus) i brazde (kolpus). Polenova zrna koja imaju samo pore označavaju se kao poratna, a ona koja imaju samo kolpuse kao kolpatna (slika 5.12).



Slika 5.12. Tipovi apertura na polenovom zrnu. U sredini je poratno, a lijevo i desno su kolpatna polenova zrna.

U slučaju da polenova zrna sadrže i pore i kolpuse u istoj aperturi nazivaju se heterokolpatna (kolporatna). Polenova zrna koja nemaju aperture označavaju se kao inaperturatna. Vrsta, broj i položaj apertura na polenovom zrnu veoma su bitna obilježja koja se koriste u determinaciji vrste polenovih zrna.

Oblik i veličina polenovih zrna važna su osobina zrna prilikom identifikacije. Veličina polenovih zrna varira od 5 μm do 200 μm . S obzirom na veličinu, polenova zrna podijeljena su u sljedeće

kategorije: jako mala zrna ($< 10 \mu\text{m}$), mala ($10\text{--}24 \mu\text{m}$), srednje velika ($25\text{--}49 \mu\text{m}$), velika ($50\text{--}99 \mu\text{m}$), jako velika ($100\text{--}200 \mu\text{m}$) i gigantska ($> 200 \mu\text{m}$). Oblik polenovog zrna uslovljen je omjerom polarne i ekvatorijalne osi (P/E). Prema vrijednostima omjera P/E postoje različiti oblici polena: perpolatan, prolatan, subprolatan, sferičan, suboblatan itd. Ornamentika ektegzine, koja čini skulpturirani dio eksine, jedan je od najvažnijih parametara pri identifikaciji polenovog zrna. Prema obliku i vrsti pojedinog ornamenta nazvan je i tip polenovog zrna. Ornamentika može varirati od vrlo glatkih površina (psilatno) do vrlo izraženih elemenata (ehinatno, klavatno itd.), ali je specifična za svaku biljnu vrstu (slika 5.13).



Slika 5.13. Izgled polenovih zrna kod različitih biljnih vrsta: A – *Bellis perennis* L., B – *Pinus* sp., C – *Sambucus nigra* L.

Neki od tipova specifične ornamentike su: rugulatni (ornamentaciju čine izduženi elementi duži od $1 \mu\text{m}$, smješteni u nepravilnom uzorku), ehinatni (elementi visine veće od $1 \mu\text{m}$), perforatni (elementi s porama u tektumu koje imaju promjer manji od $1 \mu\text{m}$), retikulatni (elementi čine mrežasti tektumom), bakulatni (cilindrični slobodno stojeći elementi viši i uži od $1 \mu\text{m}$) itd.

5.5.2 Forenzička palinologija

Forenzička palinologija bavi se proučavanjem polena i spora recentnih i fosiliziranih biljaka u cilju rasvjetljenja kriminalističkih događaja. Primjena forenzičke palinologije u istragama zločina počela je pedesetih godina prošlog stoljeća, nakon rasvjetljenja ubistva u Austriji 1959. godine. Naime, muškarac je nestao na izletu pored rijeke Dunav u blizini Beča, ali njegovo tijelo nije pronađeno. Osumnjičeni muškarac s potencijalnim motivom ubistva je uhapšen i optužen, ali bez

priznanja ili tijela činilo se da će slučaj tužitelja ostati neriješen. U toku istrage pronađeno je blato na cipelama osumnjičenog koje je proslijeđeno na analizu palinologu Wilhelmu Klausu iz Odjela za paleobotaniku Univerziteta u Beču. Klaus je utvrdio da blato s cipela sadrži polen vrbe (*Salix* sp.) i johe (*Alnus* sp.), ali i 20 miliona godina stara fosilna zrna polena, koja su porijeklom iz sedimenata iz doba miocena. Kako se ovakvi nalazi polena mogu naći samo na uskom području oko 20 km sjeverno od Beča, uz rijeku Dunav, bilo je sigurno da se osumnjičeni kretao u tom području. Kad je osumnjičeni informisan o rezultatima analize, priznao je zločin i odveo policiju na tačno mjesto na koje je zakopao tijelo.

5.5.2.1 *Polen kao biološki trag*

Od sredine 20. vijeka do danas palinologija je dobijala sve veći značaj u okviru forenzičkih istraživanja i pomogla je u rasvjetljavanju velikog broja ubistava, fizičkog i seksualnog nasilja, oružanih pljački, trgovine drogom itd. Primjena forenzičke palinologije upotpunjuje i olakšava analizu krivičnih djela jer biljke na kosi, koži, odjeći i obući ostavljaju jedinstven trag poput otiska prsta. Tog jedinstvenog otiska na sebi, kao potvrde našeg prisustva na nekom mjestu, nismo ni svjesni jer se prisustvo polenovih zrna može detektovati jedino mikroskopskom analizom, zbog njihove veličine.

Interpretacija rezultata identificiranog polenskog spektra trebala bi obuhvatiti botaničku i ekološku analizu. Analiza na botaničkom nivou podrazumijeva identifikaciju biljne vrste na osnovu prisutnih polenovih zrna, jedinstvenih i specifičnih za svaku biljnu vrstu. Ekološka analiza podrazumijeva analizu i razumijevanje prostorne distribucije biljnih vrsta (čiji je polen identificiran u uzorku), uvažavajući njene ekološke zahtjeve (abiotičke i biotičke), tako da je za tačnu interpretaciju rezultata i analizu eventualnog forenzički relevantnog događaja, vrlo važno poznavati ekologiju, horologiju¹⁹ i fenologiju²⁰ identificiranih biljnih vrsta na osnovu polenskog spektra.²¹ Prethodno navedeno ilustruje primjer u kojem je jedna evropska kompanija izvozila mašine u Aziju, a njihov transport vršila brodovima. Brod se na putu do konačne lokacije zaustavljao u velikom broju luka, gdje su različiti tereti unošeni i iznošeni. Mašine su bile

¹⁹ naučna disciplina koja proučava zakonitosti rasprostranjenja biljnih i životinjskih vrsta i njihovih zajednica

²⁰ naučna disciplina koja se bavi registrowanjem fenoloških pojava i proučavanjem njihove zavisnosti od spoljašnje sredine

²¹ Polenski spektar čini procentualni udio polenovih zrna svi biljnih vrsta identificiranih u uzorku.

zapakovane u velike drvene sanduke i dostavljene na konačno odredište. Nakon otvaranja sanduka utvrđeno je da su, umjesto potrebnih mašina, zapakovane samo vreće u kojima je bila zemlja. Istražitelji su poslali zemlju na polensku analizu. Nakon provedene polenske analize identificirane su biljne vrste koje su porijeklom iz Južne Afrike. Analizom popisa luka utvrđeno je da je transporter pristajao u luku u Capetownu te je bilo jasno gdje je izvršeno otuđivanje mašina. Nakon sprovedene istrage mašine su pronađene u hangarima luke u Capetownu u Južnoj Africi.

Prilikom interpretacije podataka polenske analize mora se uzeti u obzir da se u palinomorfološkom spektru može naći polen s različitih lokacija kretanja. Nekada se u spektru, pored polena s primarnog mjesta zločina, može naći i polen sa sekundarnog mjesta, koji nas može uputiti na pogrešne dokaze ili može dati kompletniju sliku toka krivičnog dijela. Na primjer, u jednom slučaju zaplijenjena je pošiljka od 500 grama kokaina u New Yorku. Sprovedena je polenska analiza u nadi da će možda postojati tragovi kretanja zaplijenjenog sadržaja. Nakon polenske analize utvrđene su tri različite grupe polenskih zrna s obzirom na njihovo fitoekološko porijeklo: jedna grupa polena bila je porijeklom od biljaka koje rastu u Boliviji i Kolumbiji, odakle biljka koke (*Erythroxylum coca* Lam.) i potiče; druga grupa polena porijeklom od biljaka koja rastu samo u nekoliko regiona Sjeverne Amerike, gdje je kokain vjerovatno bio obrađen i zapakovan, i treću grupu polena su predstavljale korovske biljke koje obično rastu u perifernim naseljima New Yorka, gdje je sadržaj vjerovatno ponovno rezan, pakovan i distribuiran.

Polenova zrna se, s obzirom na vanjsku ornamentiku i hemijski sastav, mogu pričvrstiti za odjeću, kosu i druge predmete tako da ih pranjem nije moguće potpuno odstraniti pa uvijek jedan broj zrna ostaje na površini ili inkorporiran u samu tkaninu. Međutim, polenova zrna se za različite vrste materijala mogu pričvrstiti u različitom broju i različitom brzinom. Tako tkanine od vune, pamuka ili poliestera vežu veliki broj zrna, dok plastični i glatki materijali vrlo mali broj zrna. Jedna od karakteristika odjeće je da djeluje kao pasivna klopka za polen, jer u tkanini može biti “zarobljeno” više od 1.400 zrna po cm². Ovo ukazuje na to da se odjeća ponaša kao kumulativni kolektor polena tokom 24 sata. Rezistencija polenovih zrna u prirodi se zbog prisustva jedne od najotpornijih molekula – sporopolenina može mjeriti milionima godina, što predstavlja jednu od vrlo važnih osobina polena kao dokaznog materijala. Ova osobina, visoka rezistencija polena, omogućila je i rješavanje nekih ratnih zločina. U julu 1995. godine na širem području općine Srebrenica u Bosni i Hercegovini desio se masakr civila koji su pokopani u sedam masovnih grobnica. Tri mjeseca

kasnije, tijela su iskopana, transportovana i zakopana na nekoliko novih lokacija u pokušaju da se sakriju dokazi o počinjenom masakru. Ponovnu ekshumaciju je započeo Međunarodni krivični tribunal Ujedinjenih nacija za bivšu Jugoslaviju (ICTY) u periodu od 1997. do 2002. godine. Cilj palinoloških i drugih forenzičkih analiza bio je odrediti ekološki profil lokaliteta na kojima su sekundarne i primarne grobnice, dokazati prisustvo polena s lokaliteta primarnih u sekundarnim grobnicama i pokušati predvidjeti postojanje drugih primarnih grobnica. Detaljno je istraženo pet primarnih grobnica i 19 sekundarnih grobnica. Preuzeti su uzorci iz primarnih i sekundarnih grobnica, okolne vegetacije te tijela ili dijelova tijela žrtava, kao i iz sedimenta koji okružuju masovne grobnice. Prikupljeno je i obrađeno preko 240 uzoraka s različitih lokacija, kako bi se odredio palinološki i ekološki profil svakog mjesta. Mikroskopske analize su pokazale da su primarne masovne grobnice imale drugačiji palinološki i geološki profil, na osnovu čega su se razlikovale od sekundarnih grobnica. Rezultati su pokazali da su polen, spore, ali i sedimenti iz primarnih masovnih grobnica preneseni zajedno s tijelima u brojne sekundarne grobnice i da čak neki botanički dokazi iz primarnih grobnica ukazuju na mikrolokaciju na kojoj je izvršeno ubistvo. Palinološki spektar s lokaliteta primarnih grobnica činili su polen trava (Poaceae), borova (*Pinus*), smrče (*Picea*), šaša (Cyperaceae), bukve (*Fagus*) i oraha (*Juglans*), kao i uzgojenih kultura kukuruza (*Zea mays*) i pšenice (*Triticum* sp.). Determinirane različite vrste polena u polenskom spektru, kao i drugi botanički dokazi pronađeni u sekundarnim grobnicama iz primarnih, dokazuju premještanje tijela žrtava i pokušaj sakrivanja dokaza. Vjerodostojnost rezultata analize polenskih spektara s 24 lokaliteta potvrđuje i veliki broj drugih forenzičkih dokaza koji su predstavljeni na sudu.

5.5.2.2 Forenzička analiza polena

Broj polenovih zrna biljne vrste u životnoj sredini zavisi od velikog broja faktora kao što su: način polinacije, vegetacijska sezona, fizičke barijere, ali i abiotički ekološki faktori (udari vjetra, srednje temperature, količina padavina itd.). Disperzija polenovih zrna u životnoj sredini može biti od nekoliko metara do 2 km od izvora, a u najvećem broju slučaja je oko 100 m. S obzirom na način polinacije, postoje: anemofilne (oprašivanje vjetrom), zoofilne (pomoću životinja), hidrofilne (pomoću vode), autogamne (samooprašivanje) i kleistogamne biljne vrste.

S aspekta forenzičke palinologije, najveći značaj ima polen anemofilnih i zoofilnih, a nešto manji značaj ima polen hidrofilnih biljnih vrsta. Anemofilne biljne vrste produciraju najveći broj polenovih zrna. Tako, na primjer, mnoge vrste porodice Poaceae, Pinaceae, Betulaceae i Fagaceae proizvode od 10.000 do 100.000 zrna po anteri, koja se, s obzirom na visoku aerodinamičnost zrna i klimatske uslove, mogu prenositi i više desetina kilometara od izvora. Zoofilne biljne vrste produciraju do 1000 polenovih zrna po anteri, dok preostali tipovi produciraju manje od 1000 polenovih zrna po anteri. Zbog toga je prilikom interpretacije rezultata vrlo važno znati da frekvencija polenovih zrna u uzorku nije uvijek odraz abundance biljnih vrsta u životnoj sredini, već svih navedenih uslova disperzije polena.

Prilikom prikupljanja dokaznog materijala mora se uzeti u obzir distribucija biljnih zajednica u okruženju, način disperzije, klimatski uslovi, ali i mikromorfološke osobine polenovih zrna. Poželjno je da pristup mjestu zločina bude dostupan forenzičkim palinolozima što je prije moguće kako bi se izbjegla kontaminacija drugim polenom. Planiranje procedure prikupljanja polena kao dokaznog materijala zavisi od krivičnog dijela i za svaki takav događaj prikupljanje se mora detaljno planirati kako bi se izbjegla moguća uništavanja ili kontaminacija uzoraka polena. Nakon prikupljanja dokaza, pristupa se laboratorijskoj obradi koja podrazumijeva izradu preparata i mikroskopsku analizu.

U laboratoriji je neophodno obezbijediti uslove u cilju osiguranja pouzdanosti uzorka, sterilan pribor za izolaciju polena i adekvatan mikroskop za determinaciju. Analiza podrazumijeva kvalitativno-kvantitativnu obradu na osnovu koje se izrađuju polenski spektri potrebni za interpretaciju rezultata.

5.6 BILJNI OTROVI U FORENZICI

Biljke sadrže metabolite koji nisu esencijalni za njen rast i razviće, nego imaju ulogu u adaptaciji biljke na uslove spoljašnje sredine. Oni nisu produkti primarnog metabolizma biljke pa se zovu *sekundarni metaboliti*. Sekundarni metaboliti su uglavnom bioaktivne komponente koje imaju različite efekte na zdravlje ljudi. Mnogi od njih su ljekoviti te su poznati fitoterapeutici, dok su neki od njih izrazito toksični i kao takvi forenzički relevantni. Međutim, za svaku komponentu je veoma važno imati na umu da doza odvaja otrov od lijeka te da je i svaka fitokomponenta u dovoljno visokoj koncentraciji toksična. U nekim situacijama čak i mnoge hranjive biljke mogu

biti toksične. Na primjer, gomolj krompira (*Solanum tuberosum*) koji je dugo izložen svjetlosti postaje zelen uslijed formiranja visokih koncentracija solanina koji je termostabilan (ne uništava se kuhanjem) pa njegova konzumacija može potencijalno imati letalan ishod.

Različite vrste biljnih toksičnih sekundarnih metabolita često imaju katastrofalne posljedice po zdravlje ljudi i životinja. Većina biljnih toksičnih metabolita je od forenzičkog značaja jer se mogu koristiti u svrhu utvrđivanja uzroka i odgovornosti za nastalo trovanje, posebno tamo gdje je uključena i neka kriminalistička aktivnost. Do trovanja komponentama biljnog porijekla može doći na tri načina: slučajno trovanje, namjerno trovanje i trovanje kao posljedica zloupotrebe biljaka. Do slučajnog trovanja najčešće dolazi kod djece ili kod odraslih osoba uslijed zamjene s jestivim vrstama, dok su namjerna trovanja zabilježena u slučajevima ubistava i samoubistava. Upravo je ovaj drugi aspekt forenzički najrelevantniji. Rezultati analize prisustva toksičnih supstanci u tjelesnim tečnostima i tkivu mogu razjasniti okolnosti pod kojima su se desila neka krivična djela te povezati konkretne događaje s počiniocima krivičnih djela.

Identifikacijom / kvantifikacijom i analizom učinaka toksina na ljudsko zdravlje u krivičnopravnim postupcima bavi se *forenzička toksikologija*. Jedna od značajnih primjena forenzičke toksikologije je i detekcija prisustva psihoaktivnih komponenti, koje mogu biti u konzumirane kao kompletne biljke (marihuana) ili derivati biljke (opium).

Toksikološke analize, u svrhu forenzičkoistražnih postupaka, provode se na biološkim uzorcima kao što su krv, urin, tkiva, dlaka kose, nokti, želučani sadržaj i tkiva nekih organa (jetra i mozak). Krv se koristi za bilo koju vrstu analiza kod živih osoba te kao primarni uzorak za toksikološku analizu u slučaju smrti. Isto kao i urin, veoma često se koristi za dokazivanje prisustva opojnih i rekreacijskih droga. Dlaka kose i nokti se najčešće koriste za dokazivanje prisustva opojnih droga, a prisustvo je moguće dokazati i nakon dužeg vremena od posljednjeg korištenja zbog činjenice da se aktivne komponente duže zadržavaju u keratiniziranim ćelijama dlake i noktiju. U noktima na nožnim prstima moguće je detektovati specifične toksine i 10 mjeseci nakon njihove konzumacije, dok se u dlaci kose zadržavaju i do 12 mjeseci.

Zavisno od situacije u kojoj je došlo do intoksikacije, kao i stanja pacijenta, primjenjuju se različiti pristupi za detekciju biljnih otrova. Ako je poznato šta je uzrokovalo trovanje ili se pacijentu dijagnosticiraju simptomi trovanja, provodi se simptomatska terapija. Ako se pokaže uspješnom,

najčešće se ne provode dodatna testiranja. Međutim, ako nastupe koma ili smrt, a nisu poznate okolnosti pod kojima su se dogodile, onda je neophodno provesti toksikološke analize. Za detekciju i kvantifikaciju toksičnih komponenti i jedinjenja u biološkim uzorcima najčešće se koriste preliminarni (kvalitativni) testovi i kvalitativno-kvantitativne instrumentalne analitičke metode kojima se identificira komponenta i određuje njena koncentracija. Kvalitativni testovi se koriste za brzu detekciju supstance u uzorku i to su najčešće:

- kolorimetrijski testovi – prisustvo komponente u uzorku se određuje na osnovu promjene boje,
- imunotestovi – zasnivaju se na vezivanju specifičnih antitijela za komponentu koja se detektuje u uzorku i
- mikrodifuzijski test – koji se koristi za brzu detekciju isparljivih komponenti (etanol, metanol, ugljični monoksid).

Od kvalitativno-kvantitativnih metoda najčešće se koristi hromatografija. To je analitička metoda koja se zasniva na razdvajanju komponenti smjese između dvije faze: stacionarne i mobilne. U forenzičkoj toksikologiji se koriste različiti tipovi gasne hromatografije (GC) i tečne hromatografije visokih performansi (HPLC). Ranije se koristila i tankoslojna hromatografija (TCL), ali je s razvojem gasne i tečne hromatografije uglavnom potisnuta iz upotrebe, izuzev u slučajevima dokazivanja prisustva tetrahidrokanabinola (THC) iz kanabisa u uzorku. Kako bi se dobili precizniji rezultati, uz gasnu i tečnu hromatografiju se radi i masena spektrofotometrija (MS). Metode GC-MS i HPLC-MS predstavljaju najčešće korištene metode za detekciju i kvantifikaciju toksičnih komponenti, ali izbor metode zavisi od supstance koja se detektuje, kao i od biološkog uzorka koji se analizira (tabela 5.1).

Gasna hromatografija s masenom spektrofotometrijom najviše se koristi za detekciju opijata u biološkim uzorcima jer s velikom preciznošću detektuje prisustvo i količinu hemijske supstance. Ipak, metoda nije toliko učinkovita za analizu lako isparljivih komponenti pa je zbog toga njena upotreba u analizi biljnih preparata koji sadrže isparljive komponente manje pouzdana. Osim toga, metoda nije pogodna za termolabilne biljne metabolite. S druge strane, primjenom HPLC i HPLC-MS detektuju se termolabilne komponente, a iako nisu pouzdane za analizu visoko isparljivih komponenti, daju odlične rezultate u detekciji slabo i malo isparljivih komponenti. Glavni otrovni

spojevi prisutni u biljkama su najčešće iz skupine alkaloida, diterpena, flavonoida, tanina, srčanih i cijanogenih glikozida, proantocijanidina, fenilpropanoida, lignana, spojeva koji sadrže azot, smole, oksalate te određeni proteini ili aminokiseline.

Tabela 5.1. Najčešće korištene analitičke metode za analizu različitih tipova bioloških tragova

Redni broj	Autori	Uzorci	Korištena metoda
1	Bynum i sar.	Urin i krv	Laser-diodno-termalno-desorpciona masena spektrometrija (LDTD-MS)
2	Carlier i sar.	Krv	Tečna hromatografija visokih performansi s masenom spektrometrijom (HPLC-MS)
3	Dienes-Nagy i sar.	Krv	Tečna hromatografija s elektrosprejnom masenom spektrometrijom
4	Fenton i sar.	Urin	Enzimski imunotest i gasna hromatografija s masenom spektrometrijom (GC-MS)
5	Ishii i sar.	Različiti biološki uzorci	Gasna hromatografija s površinsko-ionizacijsko organskom masenom spektrometrijom
6	Kauert i sar.	Različiti biološki uzorci	Hemijska ionizacijska masena spektrometrija
7	Kharbouche i sar.	Kosa	Gasna hromatografija s negativno hemijsko-ionizacijskom masenom spektrometrijom
8	Marquet	Krv i urin	Tečna hromatografija s masenom spektrometrijom
9	Maurer	Krv, plazma, serum ili urin	Tečna hromatografija s masenom spektrometrijom
10	Ojanpera i sar.	Različiti biološki uzorci	Masena spektrometrija visokih performansi
11	Van Bocxlaer i sar.	Različiti biološki uzorci	Tečna hromatografija s masenom spektrometrijom

5.6.1 Alkaloidi kao biljni toksini

Alkaloidi se obično definišu kao bazni azotni produkti biljaka koji imaju specifično djelovanje na organizam ljudi i životinja. Krajem 18. i početkom 19. vijeka započela je nova epoha u medicini, farmaciji i hemiji koja je neraskidivo povezana s historijatom alkaloida i alkaloidnih droga. Najčešći alkaloidi koji se koriste kao otrovi su: kolhicin, konin, strihnin, atropin, akonitin i solanin.

5.6.1.1 Kolhicin

Mrazovac (*Colchicum autumnale* L.) (slika 5.14) je biljka koja sadrži veliki broj različitih alkaloida (preko 40 jedinjenja). Najvažniji alkaloid je kolhicin koji ima benzo-cikloheptanotropolonsku strukturu i djeluje kao inhibitor ćelijske diobe. Naime, kolhicin sprečava stvaranje diobenog vretena neophodnog za pravilnu diobu ćelije. Svi dijelovi biljke mrazovca sadrže kolhicin, pri čemu je najveća koncentracija u sjemenkama (0,2 do 0,8%) i u lukovici (0,4 do 0,6%), dok je u listovima najniža.

Konzumacija samo 5 g sjemenja mrazovca izaziva smrt kod odraslih osoba. Kolhicin se brzo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta te se transportuje vezivanjem za proteine plazme. Najviše se akumulira u bubrezima, jetri, slezeni, gastrointestinalnom zidu i leukocitima, a jetra je glavni put eliminacije kolhicina. Kolhicin prolazi placentu i izlučuje se u majčino mlijeko.

Za kolhicin nema poznatog protuotrova, a pristup liječenju je isključivo simptomatski. Primjena aktivnog (medicinskog) uglja je učinkovita prva dva sata nakon indigestije kolhicina, međutim, čak i nakon toga se kolhicin detektuje u visokim koncentracijama u stomahnom sadržaju.



Slika 5.14. *Colchicum autumnale* L.

Trovanje kolhicinom se najčešće odvija u tri faze: gastrointestinalna faza, koja nastupa prvi dan nakon indigestije i koja je praćena pojavom mučnine, povraćanja, abdominalnim bolovima i krvavim dijarejama. Nakon toga nastupa faza sistemskog otkazivanja organa, do koje dolazi najkasnije do sedam dana nakon trovanja, pri čemu se javlja aritmija, konvulzije, otkazivanje jetre,

metaboličke promjene (prvenstveno acidoza i smanjenje koncentracije elektrolita) te neki neurološki simptomi. Smrt nastupa najčešće dva do tri dana nakon indigestije uslijed respiratornog i srčanog zastoja. Do trovanja najčešće dolazi kao rezultat slučajnog trovanja uslijed pogrešne administracije lijeka.

Jedan takav primjer je slučaj akutnog trovanja kolhicinom u kojem je šezdesetšestogodišnji muškarac, koji je bolovao od hipertenzije, dijabetesa tipa 2, hronične opstruktivne pulmonarne bolesti i depresije doveden na odjel hitne pomoći nakon što je uzeo 90 tableta kolhicina (1125 mg/kg) 12 sati prije medicinske evaluacije. Po dolasku u hitnu pomoć, nisu mu dijagnosticirani ozbiljniji simptomi izuzev blage vrtoglavice. Hemodinamički je bio stabilan sa svim parametrima u fiziološkim granicama. Pacijent je negirao bolove u abdomenu, povraćanje i dijareje. Odmah mu je uključen medicinski ugalj te je poslan na odjel intenzivne njege. Devet sati po prijemu pacijenta, nastupili su simptomi druge faze trovanja, nakon čega je veoma brzo došlo do srčanog zastoja i smrti.

5.6.1.2 Konin

Još jedna biljka čija su otrovna svojstva poznata još od antičke Grčke je otrovna kukuta, *Conium maculatum* L., iz porodice Apiaceae (slika 5.15). Količina od 100 mg (što je oko 6–8 listova biljke) smrtonosna je za odraslu osobu težine 60 kg. Toksičnost ove biljke je poznata od davnina, a u staroj Grčkoj jedan od načina izvršenja smrtne kazne bio je ispijanje čaja od otrovne kukute. Takav način smrti je odabrao i veliki filozof *Sokrat*, koji je bio osuđen na smrt zbog “kvarenja” atenske mladeži.

Njegov učenik Platon svjedočio je njegovoj smrti i detaljno opisao faze djelovanja ovog otrova u svom djelu *Fedon (o besmrtnosti duše)*. U prvim fazama trovanja koninom nastupa paraliza donjih ekstremiteta koja se širi prema glavi. Usput se javljaju nespecifični simptomi kao što su abdominalna bol, dijareja i povraćanje. Smrt nastupa kao posljedica respiratornog zastoja uslijed paralize pluća. Moderna medicina poznaje samo simptomatsko liječenje.



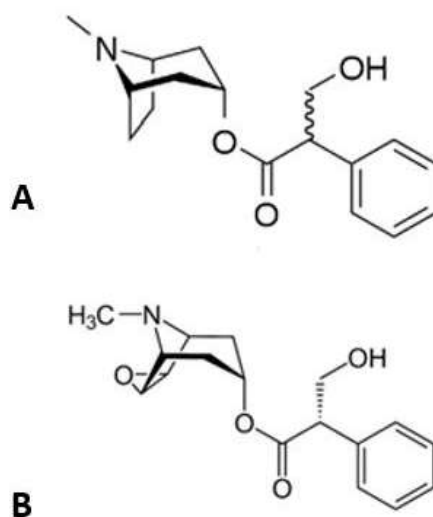
Slika 5.15. *Conium maculatum L.*

5.6.1.3 Tropanski alkaloidi

Biljke *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*, *Hyoscyamus niger* (slika 5.16) i *Brugmansia* spp. izvori su nekoliko halucinogenih i smrtonosnih tropanskih alkaloida kao što su skopolamin, atropin i hiosciamin (slika 5.17). Sve ove biljke pripadaju porodici Solanaceae u koju spadaju i značajne poljoprivredne kulture kao što su krompir i paradajz.



Slika 5.16. A – *Atropa belladonna L.*, B – *Datura stramonium L.*, C – *Hyoscyamus niger L.*



Slika 5.17. Struktura tropanskih alkaloida: A – atropin, B – skopolamin

Skopolamin ili “đavolji dah” je derivat nekih biljaka iz porodice Solenaceae kao što su *Atropa belladonna*, *Mandragora officinarum* i *Datura stramonium*. U malim koncentracijama se čak nalazi i u paradajzu (*Solanum lycopersicum*). Skopolamin ima antiholinergijsko djelovanje²² pa se koristi u terapiji bolesti kretanja te protiv postoperativne mučnine i povraćanja. S obzirom na to da djeluje na centralni nervni sistem, u toksičnim koncentracijama, koje su veoma niske (2–4 mg), izaziva vizualne halucinacije, mentalnu ekscitaciju, mentalnu konfuziju i komu. Naziva se *đavolji dah* jer je u Južnoj Americi, a posebno u Kolumbiji, korišten za onesposobljavanje žrtava koje navodno nakon inhalacije praha skopolamina izgube osjetila i samokontrolu, nakon čega ostaju u nesvjesnom stanju duži vremenski period.

Atropin je u najvišim koncentracijama zastupljen u biljkama vrste *A. belladonna*. Djeluje na autonomni nervni sistem, i to na parasimpatikus, na način da se veže za muskarinske receptore (na koje se inače vezuje acetilholin), uzrokujući njihovu blokadu. Kao lijek se koristi za liječenje bradikardije, smanjenja salivacije i bronhijalnog sekreta prije operacije ili kao protuotrov kod trovanja gljivama i nekim nervnim otrovima i pesticidima. Do teških trovanja može doći pri pokušajima samoubistava ili namjernih izazivanja halucinacija te slučajnim konzumiranjem plodova koji se zamijene s plodovima neke jestive vrste (aronija, borovnica, trešnja itd.). Simptomi

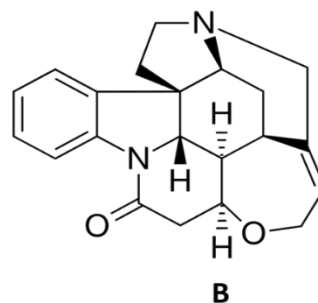
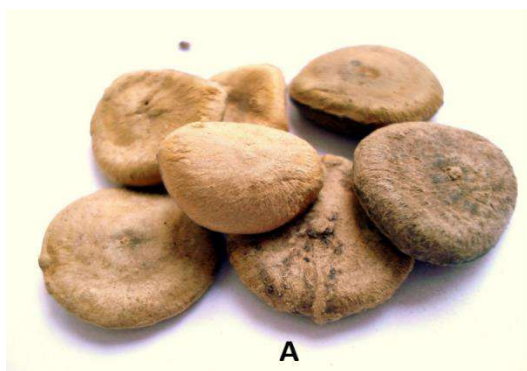
²² blokira neurotransmiter acetilholin

trovanja su: suha usta, proširene zjenice, tahikardija, navala krvi u lice i crvenilo, aritmija, uznemirenost, halucinacije i delirij koji može da traje i do sedmicu dana. Smrtonosan je u dozi većoj od 10 mg. U slučaju trovanja treba odmah izazvati povraćanje i što prije potražiti stručnu medicinsku pomoć.

Hioscamin je izomer atropina i zastupljen je u najvećim koncentracijama u sjemenu biljke crna bunika (*Hyoscyamus niger* L.). Djelovanje mu je slično skopolaminu i atropinu, a najčešći simptomi intoksikacije su halucinacije, tahikardija, konvulzije, hipertenzija i ataksija.

5.6.1.4 Ostali alkaloidi

Strihnin je snažan alkaloid (slika 5.18. B) iz skupine neurotoksina koji blokira holinergičke receptore u skeletnim mišićima. Dobija se iz sjemena biljke *Strychnos-nux vomica* L. (slika 5.18. A), drvenaste vrste koja raste u Indiji i jugoistočnoj Aziji. Upotreba strihnina datira od šesnaestog stoljeća, kada je prvi put upotrebljen kao rodenticid²³ u Njemačkoj. Izuzetno je toksičan za ljude, a smrtonosan u koncentraciji od 32 mg/kg tjelesne težine. Strihnin inhibira postsinaptičke receptore glicina, što rezultira nevoljnim, veoma bolnim grčenjem skeletnih mišića. Simptomi se pojavljuju 10–20 minuta nakon indigestije, inhalacije ili apsorpcije strihnina preko očiju i usta, kada dolazi do grčenja mišića lica i vrata, nakon čega se konvulzije šire na cijelo tijelo. Grčenje se pogoršava i završava opistotonusom (ukočen vrat s glavom i nogama zabačenim natrag, dok je ostali dio tijela izbočen poput luka).

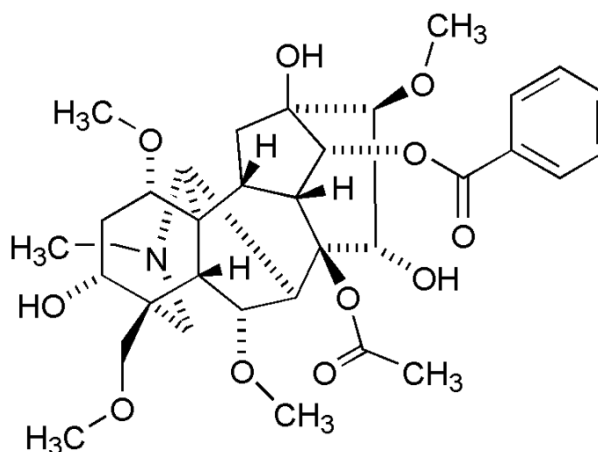


Slika 5.18. A – sjeme biljke *Strychnos-nux vomica* L., B – strukturna formula strihnina

²³ otrov za glodavce

Smrt najčešće nastupa 2–3 sata nakon uzimanja otrova kao rezultat paralize nerava koji kontrolišu disanje ili uslijed iscrpljenosti od konvulzija. Za trovanje strihninom ne postoji protuotrov, a liječenje je moguće samo ako se na vrijeme otkrije trovanje. Trovanje se liječi intravenskom primjenom barbiturata, miorelaksantnih lijekova, hloral-hidrata i diazepama. Početkom dvadesetog vijeka bio je jedan od glavnih uzroka slučajnog trovanja kod djece te je zabilježen veliki broj slučajnog i namjernog trovanja kod odraslih osoba. Danas veoma rijetko dolazi do trovanja strihninom, a najčešći slučajevi trovanja su rezultat miješanja s uličnim narkoticima (heroin, kokain, LSD), kao i s biljnim i homeopatskim pripravcima.

Akonitin (slika 5.19. B) je alkaloid koji je izolovan iz biljnih vrsta roda *Aconitum* (slika 5.19. A). Svi dijelovi biljke su iznimno otrovni, a posebno korijen. Apsorbuje se oralno ili preko kože pa do trovanja može doći već prilikom branja biljka ovog roda.

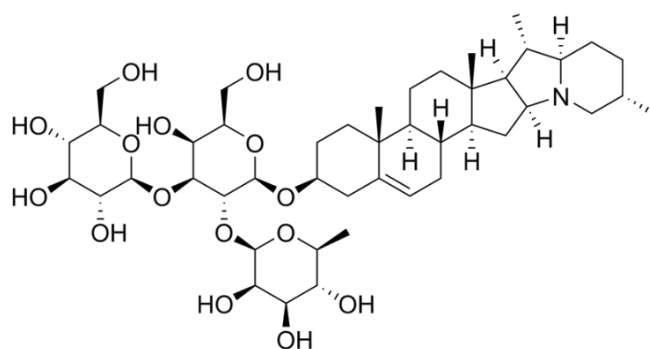
**A****B**

Slika 5.19. A – *Aconitum napellus* L., B – strukturna formula akontina

Vrste *A. carmichaelii* i *A. kusnezoffii* koriste se u kineskoj narodnoj medicini kao antipiretik, antireumatik, kardiotonik te za liječenje nekih neuroloških poremećaja. U visokim koncentracijama akonitin je kardiotoksičan i neurotoksičan. Toksično djelovanje je rezultat njegovog uticaja na natrijeve kanale ćelijskih membrana živaca, mišićnih tkiva i miokarda, pri čemu dolazi do hiperekscitabilnosti ovih tkiva.

Simptomi trovanja se mogu podijeliti na: neurološke (senzorne – parastezija i utrnulost lica i jezika, i motorne – mišićna slabost), kardiovaskularne (hipotenzija, bradikardija, bol u grudima, ventrikularna tahikardija i ventrikularna fibrilacija) te gastrointestinalne (mučnina, povraćanje, abdominalni bol i proljev). U dozi od 32 mg/kg tjelesne težine akonitin je smrtonosan, a ako se na vrijeme potraži pomoć, daje se aktivni ugalj, emetici, ili se vrši ispiranje želuca. Liječenje je suportivno, a za liječenje ventrikularne aritmije daju se antiaritmici. Bradikardija se liječi primjenom atropina.

Solanin (slika 5.20. B) je glikoalkaloid koji se nalazi u biljkama iz porodice Solanaceae, posebno u paradajzu, patlidžanu i krompiru (slika 5.20. A). U toksičnim koncentracijama se nalazi u gomolju krompira (*Solanum tuberosum* L.) koji pokazuje znakove zelenila, klijanja, truljenja ili fizička oštećenja.

**A****B**

Slika 5.20. A – *Solanum tuberosum* L., B – strukturna formula solanina

Solanin posjeduje fungicidna i pesticidna svojstva i jedan je od prirodnih repelenata. Konzumiranje krompira s visokim sadržajem solanina i glikoalkaloida hakonina dovodi se u vezu s brojnim trovanjima, od kojih su neka bila i sa smrtnim ishodom. Simptomi trovanja su najčešće gastrointestinalne i neurološke prirode, a uključuju: mučninu, dijareju, povraćanje, abdominalne grčeve, srčanu disritmiju, glavobolju, vrtoglavicu, upalne procese i bolove u zglobovima. U dozama od 3 do 6 mg/kg tjelesne težine može biti letalan.

5.6.2 Glikozidi

Glikozidi su složena organska jedinjenja sastavljena iz dvije komponente, šećera i aglikona. Široko su rasprostranjeni u prirodi kod različitih biljaka. Koriste se često u medicinske svrhe, posebno *kardiotonični glikozidi*, koji imaju specifično djelovanje na srce. Glikozidi ili heterozidi su konjugirana organska jedinjenja sastavljena od šećera – glikona i nešećerne komponente – aglikona (genin). Veoma su rasprostranjeni među različitim biljnim vrstama, a u ćelijama su otopljeni u ćelijskom soku. Nalaze se u nadzemnim dijelovima (lišće, cvijet, plod, sjeme) i podzemnim dijelovima (korijen, podanak, lukovica, gomolj). U jednoj biljci može biti nekoliko hemijski različitih glikozida. Poznato je da imaju antibakterijska, antifungalna, antiinflamatorna, antioksidativna, antiviralna i antitumorska svojstva, zbog čega su značajni u farmaciji, kao farmakološki aktivne tvari, dok se u hrani nalaze samo u tragovima. Nalaze se u manjim količinama u plodovima voća i povrća, dok su u sjemenkama prisutni u nešto većim koncentracijama kao amigdalinalin, limetin, kao i auranciamarin (u pokožici). Dijelevu se u 11 klasa, među kojima su najznačajniji srčani glikozidi, cijanogeni glikozidi, kumarini, saponini, flavonoidi i drugi. Cijanogeni glikozidi sadrže cijanovodoničnu kiselinu, a u hrani su najčešći amigdalinalin, linamarin i durin. Neke vrste začinskih biljaka sadrže tioglikozide, pa tako sjeme gorušice sadrži alil – gorušičino ulje, ili luk koji sadrži alicin. Poznatiji glikozid u kojem je aglikon iz grupe fenolnih spojeva je salicin. Postoje također kumarinski glikozidi, koji su nekad nalazili primjenu u prehrambenoj industriji, ali se pokazalo da su hepatotoksični. Flavonoidni glikozidi kao aglukon imaju derivat benzopirana (flavan). Tu spadaju kalkoni, flavanoni, flavananoli, flavoni, flavanoli itd.

U farmaciji se kao terapeutici najviše koriste srčani glikozidi, i to za liječenje bolesti srca i drugih organa. Rod *Digitalis* sadrži visoke koncentracije ovog glikozida pa je po njemu dobio ime i lijek koji se koristi kod srčanih zatajenja. Saponini sadrže steroidna ili triterpenska jedinjenja kao aglikone. Imaju sposobnost da pjene, a dobili su ime po biljkama iz roda *Saponaria* čiji se korijen od davnina koristio kao sapun. Saponini su nezaobilazan sastojak šampona, losiona i sličnih kozmetičkih sredstava. Antraglikozidi sadrže jedinjenja antracena konjugirana sa šećerima. Postoje i drugi gorki glikozidi koji podražuju osjet okusa, pa refleksnim putem stimuliraju sekreciju želučanog soka i poboljšavaju lučenje žuči, što dovodi do boljeg probavljanja hrane.

5.6.2.1 Digoksin

Digoksin je srčani glikozid ekstrahiran iz vrsta roda *Digitalis* (Scrophulariaceae) (slika 5.21). Povećava kontraktilnu funkciju srca te smanjuje broj otkucaja u jedinici vremena. Vrlo je tanka granica između terapijske i toksične doze, što usložnjava njegovu upotrebu u medicinske svrhe.

Trovanje digoksinom ima gastrointestinalnu (mučnina, povraćanje, abdominalni bolovi i dijareja) i kardijalnu manifestaciju, koja je najčešće i kobna. Također, zabilježeni su neurološki simptomi trovanja, pri čemu je jedan od simptoma *ksantopsia*, vrsta vizualne manifestacije u kojoj se sve vidi žuto.

Mnogi stručnjaci vjeruju da je slikar Vincent van Gogh (1853–1890) konzumirao biljku naprstak (*Digitalis* sp.), što objašnjava dominaciju žute boje u njegovim kasnim djelima. Mehanizam djelovanja digoksina ogleda se kroz blokiranje natrijeve / kalijeve ATPazne pumpe, zbog čega dolazi do smanjenja arterio-venske provodljivosti. Također, dolazi do povećanja iona kalcija u međucelijskom prostoru miocita srca, što dovodi do povećanja kontraktilnosti srčanog mišića.



Slika 5.21. *Digitalis* sp.

5.6.2.2 Cijanogeni glikozidi

Cijanid inhibira mitohondrijski enzim citohrom c oksidazu i zaustavlja ćelijsko disanje, što dovodi do smrti nekoliko minuta nakon konzumacije. Često se u prošlosti koristio kao otrov za ubistva, samoubistva i masovna ubistva. Može se aplicirati kao plin (vodikov cijanid) ili oralno u obliku spoja (npr. kalijev cijanid, natrijev tiocijanat). Iako su izvori cijanida najčešće sintetski, više od

1.500 biljnih vrsta, uglavnom angiospermi, proizvode cijanogene glikozide, i to najčešće u svrhu odbrane protiv predatora. Iako cijanogeni glikozidi u ovim biljkama mogu proizvesti neugodne učinke kod ljudi, koncentracije su veoma male da bi bile smrtonosne.

Tokom suša, nedostatak vode povećava koncentracije cijanogenih glikozida te su biljke u tom periodu toksičnije za insekte i druge grabežljivce koji se hrane lišćem, stabljikom ili korijenjem. Cijanogeni glikozidi mogu se naći u mnogim plodovima jestivih biljaka, uključujući jabuke, breskve, kruške, maline, trešnje i šljive, te su posebno koncentrirani u sjemenu. Od cijanogenih glikozida prisutnih u biljci najpoznatiji je amigdalín iz ploda badema (*Prunus dulcis*). Postoje dvije vrste badema: slatki (raznovrsna skupina) i gorki (sorta amara, također poznata pod nazivom gorki badem). Amigdalín iz gorkog badema se u organizmu ljudi i životinja enzimatski razlaže na benzaldehid i toksičnu cijanovodoničnu kiselinu te može izazvati trovanje ako se za kratko vrijeme pojede velika količina badema. Koristi se kao alternativni antitumorski patentirani lijek pod nazivom vitamin B17, iako se ne radi o vitaminu. Osim toga, ne postoje studije koje dokazuju antitumorsko djelovanje amigdalina. Toksičnost amigdalina je rezultat njegovog razlaganja do cijanovodonične kiseline, koja se vezuje za ione trovalentnog željeza citohrom oksidaze, što narušava prijenos elektrona kroz transportni lanac te rezultira ćelijskom hipoksijom i acidozom. U prevelikom dozama (0,5 mg/kg tjelesne mase) javljaju se simptomi trovanja cijanidom: glavobolja, tahikardija, slabost i mučnina, a u težim slučajevima trovanja dolazi do cijanoze, kome, konvulzija, srčanog zastoja i smrti. Trovanje najčešće nastupa kao posljedica uzimanja prevelike doze amigdalina kao alternativnog lijeka (vitamin B17) kod onkoloških pacijenata.

5.6.3 Toksični biljni lektini

Lektini su proteini bogati ugljikohidratima. Fitohemaglutinin je lektin prisutan u biljkama porodice Fabaceae (mahunarkama), a u sjemenkama gotovo svih jestivih mahunarki (grah, grašak, bob) nalazi se u malim koncentracijama. U visokim koncentracijama izaziva aglutinaciju eritrocita, a kuhanjem se smanjuje njegovo štetno djelovanje. Dva vrlo otrovna biljna lektina su ricin i abrin. Ricin je izrazito otrovni glikoprotein koji se može izolovati iz endosperma sjemenki biljke ricinusa (*Ricinus communis* L.) (slika 5.22). Vrlo je toksičan ako se udahne ili proguta (letalna doza = 22 µg/kg tjelesne težine), inhibira sintezu proteina, a za trovanje ricinom ne postoji protuotrov.

Sjemenka ricinusa sadrži između 1–5% ricina i relativno je laka njegova ekstrakcija. Sjemenke su ukusne, zbog čega mogu biti zamijenjene za jestive sjemenke, što predstavlja poseban problem kod djece jer je za njih najčešće smrtonosan.



Slika 5.22. Izgled biljke i sjemenka vrste *Ricinus communis* L.

Simptomi akutnog trovanja zavise od toga je li ricinus progutan ili inhaliran. Prilikom oralne primjene, nakon nekoliko sati dolazi do pojave mučnine, povraćanja, stomaknih bolova, dijareje te povišene temperature. U težim oblicima trovanja dolazi do masovnog krvarenja, nakon čega nastupa šok i smrt. Zbog njegove velike i jednostavne dostupnosti postoji velika zabrinutost zbog potencijalne upotrebe u bioterorizmu. Jedan od primjera je i slučaj kada je bugarski politički egzilant Georgi Markov u Londonu 1978. godine ubijen injekcijom ricina. Injekcija se nalazila skrivena u modificiranom kišobranu kojim ga je slučajni prolaznik udario po nozi. Četiri dana nakon tog Markov je preminuo od gastroenteritisa i otkazivanja organa. Iako ricin nikada nije otkriven u njegovom tijelu, mrtvozornik je izjavio da je to sigurno bio otrov koji je usmratio Markova.

Glavni izvor abrina je *Abrus precatorius* L. (slika 5.23), invazivna tropska biljka porijeklom iz Indije. Abrin također inhibira sintezu proteina te je mnogo toksičniji od ricina. Toksična oralna doza za odraslog čovjeka iznosi 10–1000 µg/kg, dok inhalacijska toksična doza iznosi 3,3 µg/kg.



Slika 5.23. Abrus precatorius L.

5.6.4 Toksini iz gljiva

Trovanje toksinima iz gljiva naziva se micetizam i predstavlja vrlo čest oblik trovanja. Iako je broj smrtno otrovnih gljiva u Evropi veoma mali (samo 7), broj smrtnih slučajeva kao rezultat trovanja gljivama iznosi i do nekoliko hiljada godišnje. Neke od najznačajnijih otrovnih gljiva su *Amanita muscaria* (muhara), *A. phalloides* (zelena pupavka), *A. pantherina* (panterova muhara), *Boletus satanas* (ludara) i druge (slika 5.24). Najčešće do trovanja dolazi slučajno, zbog nepoznavanja morfologije gljiva, uslijed čega se jestive gljive veoma lako zamijene s otrovnim.

Najpoznatiji toksini iz gljiva su amatoksini, a nalaze se u nekoliko rodova gljiva, uključujući rod *Amanita* po kojem su i dobili ime. Amatoksini ometaju sintezu proteina inhibiranjem enzima RNK polimeraze II. Procijenjena smrtonosna doza za odraslog čovjeka je oko 100 µg/kg tjelesne težine. Također, u nekim vrstama roda *Amanita* zastupljen je muscimol, psihotični alkaloid koji je mnogo manje toksičan od amatoksina. To je moćan antagonist GABA receptora i uzrokuje probleme vizualne percepcije kao i slušne halucinacije. Smrtonosna doza za 50% ispitivanih životinja (LD50) kod miševa iznosi 3,8 mg/kg tjelesne težine.

S obzirom na brzinu pojave simptoma i težinu kliničke slike, razlikuju se dva tipa micetizma: prvi karakterizira brza pojava simptoma već 1–4 sata od indigestije otrovnih gljiva, dok kod drugog tipa do pojave prvih simptoma dolazi nakon 5, 12, 24 i više sati. Kod prvog tipa se javljaju gastrointestinalni simptomi (mučnina, povraćanje, dijareja i abdominalni bolovi) te ima dobru prognozu, dok kod drugog tipa dolazi do pojave žutice, vrtoglavice, halucinacija, grčeva mišića, a

u kasnijim fazama i teškog oštećenja jetre i bubrega te najčešće završava letalnim ishodom. Za trovanje gljivama ne postoji specifični protivotrov, a liječenje je simptomatsko.



Slika 5.24. *Otrovne gljive: A – Amanita muscaria, B – A. phalloides, C – A. pantherina, D – Boletus satanas*

5.7 MOLEKULARNOGENETIČKA ANALIZA TRAGOVA BILJNOG PORIJEKLA

U mnogim slučajevima morfološke i anatomske karakteristike korištene za identificiranje biljnog materijala mogu biti nedovoljne ili neprimjenljive pa biljni uzorak nije moguće identificirati. U takvim slučajevima, biljna vrsta se identificira korištenjem genetičkih alata koji mogu dati vrijedne informacije o taksonomskoj pripadnosti vrste i na taj način uveliko povećati dokaznu vrijednost botaničkih uzoraka. Genetičke analize mogu pomoći istražiteljima na način da identificiraju vrste, odrede porijeklo izvorne populacije samog uzorka, kao i da povežu osumnjičeno lice sa žrtvom i/ili mjestom zločina. Zavisno od vrste uzorka, pitanja na koja je potrebno odgovoriti i raspoloživih resursa, istražitelji mogu odabrati odgovarajuće genetičke analize i markere koje će primijeniti za rješavanje konkretnog slučaja.

5.7.1 DNK analiza biljnih tragova

Širok spektar biljnih tkiva može se koristiti za genetičku analizu u forenzičkim istražnim postupcima. U toku forenzičke istrage, svi biljni uzorci se prikupljaju s mjesta zločina, pri čemu se naknadno utvrđuje njihova podobnost za daljnju analizu.

Poželjno tkivo za analizu DNK su listovi biljke pa ih većina forenzičkih botaničara koristi u rutinskim analizama. Ako se prikupljaju svježi listovi s biljaka, treba odabrati jedan ili dva zdrava, zelena lista (zavisno od veličine, ukupne površine oko 2 cm²). Treba izbjegavati listove sa znakovima truljenja, infekcije ili najezde insekata. Iako se mogu koristiti i uvenuli listovi za analizu, veća je vjerojatnoća da će izolovana molekula DNK biti u degradiranom stanju pa će i stopa uspješnosti za ove uzorke biti prilično niska. Ako listovi nisu dostupni, mogu biti od koristi i druga tkiva. Cvjetovi, bilo svježi ili osušeni, također mogu biti prikladan uzorak i dati dovoljnu količinu kvalitetne DNK za analize. S druge strane, mala je vjerojatnoća uspješne izolacije molekule DNK iz čvrstog tkiva drveta, mada su novija istraživanja pokazala da je moguće dobiti dobre rezultate i iz ove vrste tkiva. Ipak, koncentracija DNK obično bude niža nego iz tkiva listova, a dodatni problem predstavljaju i različiti biljni metaboliti koji inhibiraju lančanu reakciju polimeraze (PCR). Sjemeni i plodovi voća, pa čak i korijenje, mogu dati zadovoljavajuću koncentraciju DNK za analize. Ukratko rečeno, gotovo svako biljno tkivo ima potencijal da bude dobar izvor molekula DNK. Ipak starost, stanje i početna količina DNK u tkivu predstavljaju ključne faktore za uspješnost analize. Forenzički botanički uzorci ne zahtijevaju posebne metode za prikupljanje ili skladištenje, a većina uzoraka može se dugoročno sačuvati za kasnije analize ako naknadno postanu relevantni za istragu. Međutim, treba voditi računa da DNK u nepropisno čuvanom uzorku može brzo degradirati, čime njena forenzička vrijednost u velikoj mjeri postaje ograničena. Pravilno prikupljanje i čuvanje uzoraka povećava njihovu upotrebljivost za uspješnu analizu DNK. Kada se uzorci osuše, stabilni su na sobnoj temperaturi dugi niz godina. Jedna od najjednostavnijih metoda očuvanja biljnih uzoraka za analizu DNK je sušenje uzoraka u silika-gelu (slika 5.25). Uklanjanjem vlage iz uzoraka inhibiraju se enzimi koji razgrađuju molekulu DNK i druge ćelijske komponente. Osušeni uzorci su također manje podložni rastu gljivica. Biljni uzorci se pohranjuju u zatvorenoj papirnoj ambalaži, pri čemu se nekoliko grama silika-gela direktno dodaje u vrećicu s uzorkom. Dodavanje indikacijskog silika-gela može pomoći za utvrđivanje da li je silika-gel iscrpljen i treba li ga zamijeniti.



Slika 5.25. *Skladištenje bilnog materijala u silika-gelu*

Skladištenje u silika-gelu primjenljivo je za većinu uzoraka. Iako se osušeni uzorak lista ili drveta može produženo čuvati bez silika-gela, njegovim dodavanjem produžuje se vrijeme za uspješnu ekstrakciju DNK i smanjuje se mogućnost propadanja uzorka. Uzorcima s izuzetno visokim sadržajem vlage, kao što su kaktusi ili sukulenti, potrebno je nekoliko puta zamijeniti silika-gel. Kada god je moguće, treba izbjegavati skladištenje na sobnoj temperaturi ako uzorak nije pravilno osušen. Ako sušenje silika-gelom nije primjenljivo, uzorci koji će se analizirati u roku od nekoliko dana mogu se čuvati na +4°C (u hladnjaku). Zamrzavanje na –20°C pogodno je za svježije uzorke koje treba čuvati nekoliko mjeseci, a skladištenje na –80°C sačuvat će svježije uzorke i nekoliko godina. U svim ovim slučajevima uzorke treba čuvati u hermetički zatvorenim plastičnim vrećicama ili kontejnerima. S obzirom na to da su ove metode skladištenja primjenljive za male količine uzoraka, jer je prostor za zamrzavanje obično ograničen, najčešće se biljni materijal skladišti na sobnoj temperaturi, pa ga je neophodno prethodno osušiti.

5.7.2 Metode genotipizacije biljnih tragova

Molekularnogenetička analiza biljnih tragova uveliko se razlikuje od molekularnogenetičke analize humanih i animalnih tragova. Prije svega, biljna ćelija sadrži tri genoma: nukleusni, mitohondrijski i plastidni. Sva tri genoma mogu sadržavati gene od interesa i za forenzičku analizu je od velike važnosti raspolagati informacijama koji će se geni analizirati. Ako se identifikacija biljne vrste vrši primjenom barkodinga, analiza samo mitohondrijskih gena neće dati pouzdane

rezultate jer je kod biljaka mitohondrijski genom izuzetno konzerviran i vrlo malo varijabilan pa time i neprimjenljiv za determinaciju vrste. Dva najčešće analizirana mitohondrijska gena kod biljaka (*trnH-psbA* i *trnL-trnF*) pokazuju samo 60% varijabilnosti među različitim biljnim vrstama, što je nedovoljno za determinaciju biljne vrste. Za ovu vrstu analize najčešće se analiziraju geni hloroplastnog genoma (cpDNK), od kojih najčešće gen za ribulozo-1,5-bifosfat karboksilazu-oksigenazu (tzv. RuBisCo), enzim uključen u fiksaciju ugljičnog dioksida u procesu fotosinteze. Analiza ovog gena (*rbcL*) omogućava taksonomsku karakterizaciju do nivoa porodice i ima veoma malu diskriminatornu snagu u slučajevima određivanja roda i vrste. U nekim slučajevima ovaj problem je moguće riješiti kombinovanom analizom gena *rbcL* sa sekvencama na nukleusnoj DNK (geni za ribosomske podjedinice 18S, 26S kao i sekvenca ITS – *Internal Transcribed Spacer*).

Drugi problem kod analize biljnih tragova jest nepostojanje univerzalnih markera i nedostatak informacija o genomu rijetkih i endemičnih vrsta. Za brojne endemične i rijetke vrste ne postoje dizajnirani mikrosatelitni lokusi. Osim toga, u analizi tragova biljnog porijekla veliki nedostatak primjene mikrosatelita je njihova osobina visoke intraspecifičnosti. Međutim, ako postoji bilo koja indicija koja bi mogla uputiti na neku vrstu, mogućnost unakrsne amplifikacije između bliskosrodnih vrsta i vrsta iz jednog roda mogla bi prevazići navedeno ograničenje. Podaci iz literature navode do 90% uspješnosti unakrsne amplifikacije istih mikrosatelitnih lokusa na nivou podrodova i preko 70% između različitih vrsta unutar jednog roda.

U analizi biljnih tragova dodatni problem predstavlja i veličina biljnih genoma koja je različita kod različitih vrsta. Da bi se procijenila veličina genoma, koristi se metoda protočne citometrije, pri čemu je za analizu nepoznatog uzorka neophodan interni standard. Interni standard predstavlja poznatu veličinu na osnovu koje će se mjeriti veličina genoma istraživane vrste.

Za ispravno određivanje veličine genoma preporuka je koristiti standarde čija je veličina genoma približna ciljanoj vrsti, stoga bi trebalo imati stalno dostupan veći broj internih standarda te izvršiti serije mjerenja.

Još jedan od izazova u analizi biljnih tragova predstavlja poliploidija, koja je veoma česta kod biljnih vrsta u odnosu na životinjske vrste. Naime, kao rezultat interspecijske hibridizacije (ukrštanjem različitih vrsta), što se naziva aloploidija ili uvišestučavanje vlastitog genoma

(autopoliploidija), nastaju poliploidi čija je analiza posebno izazovna jer se pri analizi većine markera detektuje više alela na lokusu, dok samo jedna detektovana alelna varijanta ne isključuje poliploide. S druge strane, za razliku od diploida, poliploidi daju raznolike SSR profile na manjem broju mikrosatelitnih lokusa. Također, nivo polimorfizma je veći kod poliploida upravo zbog njihove veće količine genoma. Genotipizacija poliploida sekvenciranjem također ima niz interpretacijskih izazova koji se javljaju kao rezultat dupliciranja genoma i nemogućnosti razlikovanja intergenomskih i intragenomskih polimorfizama.

Zbog svega navedenog, veoma je važno pravilno odabrati ciljane gene, tj. genetičke markere koji će se primjenjivati u konkretnom slučaju forenzičke analize biljnog traga. Također, bez obzira na genetičke markere koji se primjenjuju u analizi, neophodno je primijeniti standardne metode i mjere opreza kako bi se spriječila kontaminacija uzorka te se dobili kvalitetni, pouzdani i nedvosmisleni rezultati.

Izbor genetičkih markera zavisi prije svega od ciljeva analize, ali i od raspoloživih laboratorijskih kapaciteta i finansijskih sredstava. Najčešće korišteni markeri su mikrosateliti, koji su primjenljivi za širok spektar analiza, ali zavisno od cilja same analize, često se primjenjuju i druge vrste markera. Kada se odabere markerski sistem koji će se koristiti za analizu prikupljenih uzoraka, prvo je potrebno optimizirati procedure genotipizacije, korištenjem svježeg materijala iste ili srodne biljne vrste. Ovo je veoma važno, posebno u slučajevima kada je dostupna vrlo mala količina biljnog biološkog traga ili kada se trag nalazi u degradiranom stanju. Ako su prikupljeni tragovi ostataka lišća, trebalo bi analizirati ostatke lišća slične starosti. Na ovaj način povećava se vjerovatnoća uspjeha analize spornih uzoraka. Također je važno utvrditi da je odabrani genetički marker dovoljno polimorfan, odnosno da postoji visok stepen varijacije među individuuama jedne populacije, u suprotnom je neophodno odabrati drugi marker.

Nakon što se uspostave protokoli za genotipizaciju biljnog materijala i odaberu pouzdani markeri, može se pristupiti analizi dokaznog biljnog materijala. Također, strogo se mora voditi računa da se spriječi unakrsna kontaminacija uzoraka pa je najbolje raditi vremenski i prostorno odvojene analize različitih uzoraka. Ako je dostupna dovoljna količina dokaznog materijala, onda svaki uzorak treba raditi u tri nezavisne analize.

Skoro sve metode koje će biti spomenute u nastavku oslanjaju se na primjenu PCR analize za dobijanje fragmenata DNK koji će biti genotipizirani. PCR je osjetljiv na sekundarne spojeve i fragmentiranu DNK, a može rezultirati pojavom nul-alela (engl. *allelic drop-out*), što može dati netačne rezultate te u konačnici uticati na interpretaciju rezultata.

5.7.3 Ekstrakcija DNK iz biljnih tragova

Osnovni cilj svake laboratorije jeste obezbijediti jednostavnu, jeftinu, brzu i efikasnu proceduru za ekstrakciju DNK iz biljnog materijala. Izbor odgovarajuće metode može biti veoma izazovan kada se radi o biljnom tkivu. Razlog tome leži u činjenici da prisustvo različitih sekundarnih metabolita, posebno fenola, alkaloida, polifenola i polisaharida, utiče na kvalitetu izolovane DNK, jer sve ove komponente imaju tendenciju da precipitiraju s molekulom DNK i na taj način onemogućavaju daljnje korake analize. Svi gore navedeni sekundarni metaboliti poznati su inhibitori PCR. Osim sekundarnih metabolita, na uspješnost izolacije DNK utiču i endogene nukleaze koje degradiraju molekulu DNK, a koje su prisutne u samoj ćeliji. U nekim slučajevima molekula RNK se simultano izoluje s molekulom DNK, što također značajno može da utiče na interpretaciju rezultata.

Kako bi se to izbjeglo, potrebno je obratiti pažnju na pH ekstrakcijskog pufera jer previše kisela pH sredina najčešće rezultira koekstrakcijom molekule RNK. Izolacija polisaharida se lako prepoznaje po velikoj viskoznosti, kao i smeđoj obojenosti rastvora. Stoga danas postoji veliki broj različitih ekstrakcijskih protokola koji se primjenjuju na različite biljne uzorke koji zbog hemijske heterogenosti mogu zahtijevati i različite pristupe u uklanjanju inhibitornih komponenti prilikom ekstrakcije nukleinskih kiselina.

Također, biljne ćelije (za razliku od animalnih i humanih) sadrže krute ćelijske zidove koje je neophodno narušiti mehanički, primjenom različitih tehnika koje se uglavnom zasnivaju na dodavanju tečnog azota. Tečni azot brzo smrzava tkivo koje zbog toga postaje krto i lako se razara, pri čemu se tkivo pretvara u prah. Pored tretmana brzim smrzavanjem tkiva, moguće je primijeniti maceraciju ili grindanje tkiva u različitim puferima koji sadrže deterdžent. Nakon mehaničkog narušavanja strukture ćelijskog zida, u uzorak se dodaje ekstrakcijski pufer koji sadrži deterdžente za destrukciju ćelijske i jedarne membrane, čime se omogućava liza ćelija i oslobađanje DNK iz

njih te uklanjanje neželjenih spojeva. Završni korak je taloženje molekula DNK u otopini alkohola i soli, prečišćavanje DNK i rastvaranje izolovane DNK u vodi ili puferu.

Za izolaciju nukleinskih kiselina iz biljnih tragova najčešće korišteni izolacijski protokol je protokol *CTAB Soltis Lab*. Ovaj protokol se bazira na primjeni cetiltrimetilamonijevog bromida (CTAB), ionskog deterdženta koji služi za narušavanje strukture ćelijskih membrana. U narednim fazama izolacije DNK primjenjuje se hemijska ekstrakcija primjenom hloroforma, nakon čega slijedi precipitacija DNK primjenom izopropanola. Iako se ovaj protokol smatra zlatnim standardom za izolaciju DNK iz biljnih tkiva, on ipak ima mnogo ograničenja koja zavise od istraživane biljne vrste i sastava njenih sekundarnih metabolita (slika 5.26).



Slika 5.26. Izolacija DNK iz biljnog materijala primjenom *CTAB Soltis Lab* (Doyle&Doyle, 1987) protokola: A – gornja faza koja sadrži DNK, međufaza s ćelijskim ostacima i donja faza koja sadrži hloroform, B – izolovana DNK koja je manje (lijevo) ili više (desno) opterećena sekundarnim metabolitima

Mnogi istraživači preferiraju komercijalne setove za ekstrakciju DNK iz biljnog materijala. Najčešće se koriste ekstrakcijski setovi poput seta *QiagenDNeasy Plant mini extraction*. Iako upotreba komercijalnih setova nudi veću standardizaciju i ponekad daje kvalitetniju DNK, njihov nedostatak leži u činjenici da su manje podložni modifikacijama. Svakako, metoda ekstrakcije DNK iz biljnog materijala zavisi od preferencija samog laboratorija i uspješnosti izolacije na probnim uzorcima koji su slični prikupljenom dokaznom materijalu.

5.7.4 Molekularni markeri u analizi biljnih tragova

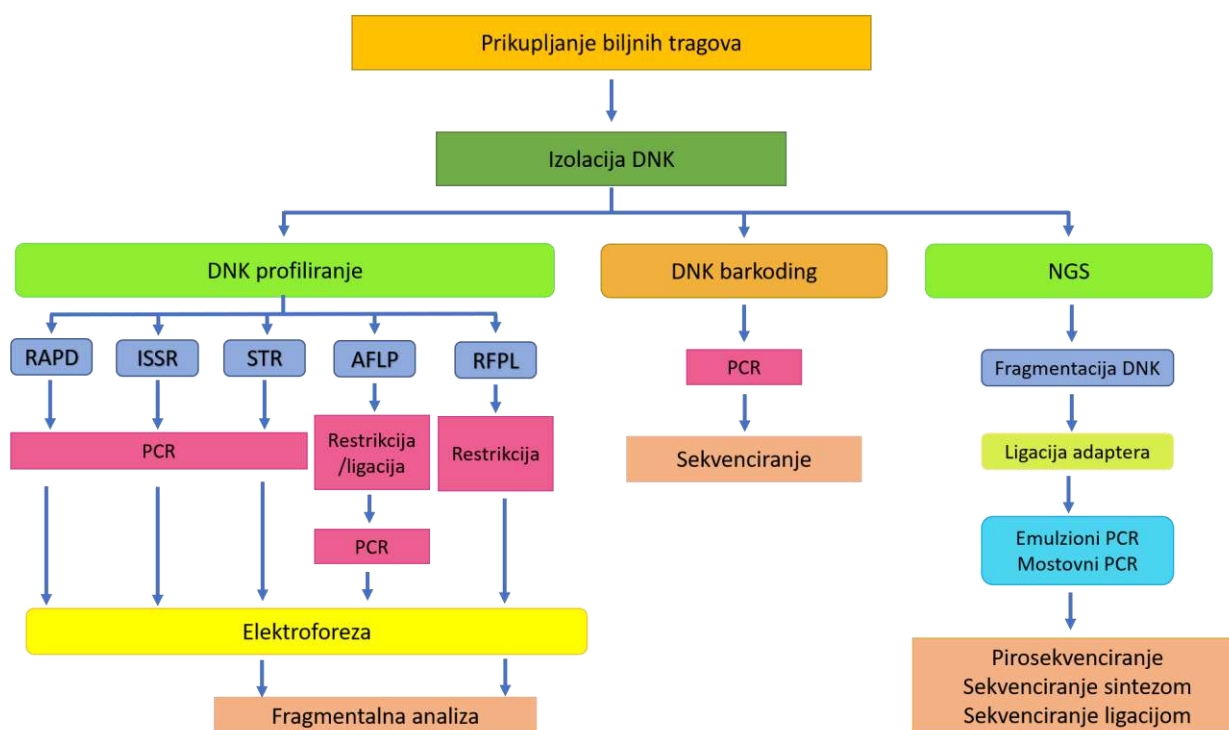
Molekularni markeri koji se primjenjuju u analizi biljnih tragova mogu se klasificirati u tri kategorije prema hronološkom redoslijedu njihovog razvoja:

- *Prva generacija markera* su markeri bazirani na metodama hibridizacije. Nazivaju se tako jer se DNK profil vizualizira hibridizacijom DNK s radioaktivno obilježenim probama poznate sekvence.
- *Druga generacija markera* su markeri temeljeni na PCR metodologiji, što podrazumijeva amplifikaciju ciljane sekvence koristeći arbitrarne ili specifične prajmere.
- *Markeri treće generacije* su polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP). Bazirani su na poznavanju informacija o samoj sekvenci. U posljednjih nekoliko godina, s napretkom na polju sekvenciranja DNK, ovi markeri su postali vrlo popularni u analizi biljnog materijala (tabela 5.2).

Tabela 5.2. Tipovi molekularnih markera temeljeni na hronologiji razvoja različitih vrsta tehnika

I generacija markera (bazirani na hibridizaciji)	II generacija markera (bazirani na PCR)	III generacija markera (bazirani na metodama sekvenciranja DNK)
	RAPD (engl. <i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>)	
	AFLP (engl. <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	
RFLP (engl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	SSR (engl. <i>Simple Sequence Repeats</i>)	SNP (engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
	ISSR (engl. <i>Inter-Simple Sequence Repeats</i>)	
	VNTR (engl. <i>Variable Number Tandem Repeat</i>) itd.	

Izbor odgovarajućeg markera zavisi od specifičnih ciljeva istraživanja, a svaki odabrani marker ima niz prednosti, ali i nedostataka. To su prije svega: vrijeme i troškovi potrebni za realizaciju istraživanja primjenom odgovarajućeg markera, potrebna količina i kvaliteta izolovane DNK, informativnost, robusnost, reproducibilnost i veličina analiziranog genoma. Svaki od ovih parametara, pojedinačno ili u kombinaciji s drugim, može biti ključan za primjenu u nekom konkretnom slučaju (slika 5.27).



Slika 5.27. Uporedni prikaz faza analize bioloških tragova u zavisnosti od odabranih genetičkih markera koji se koriste za analizu

5.7.4.1 RFLP – Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata

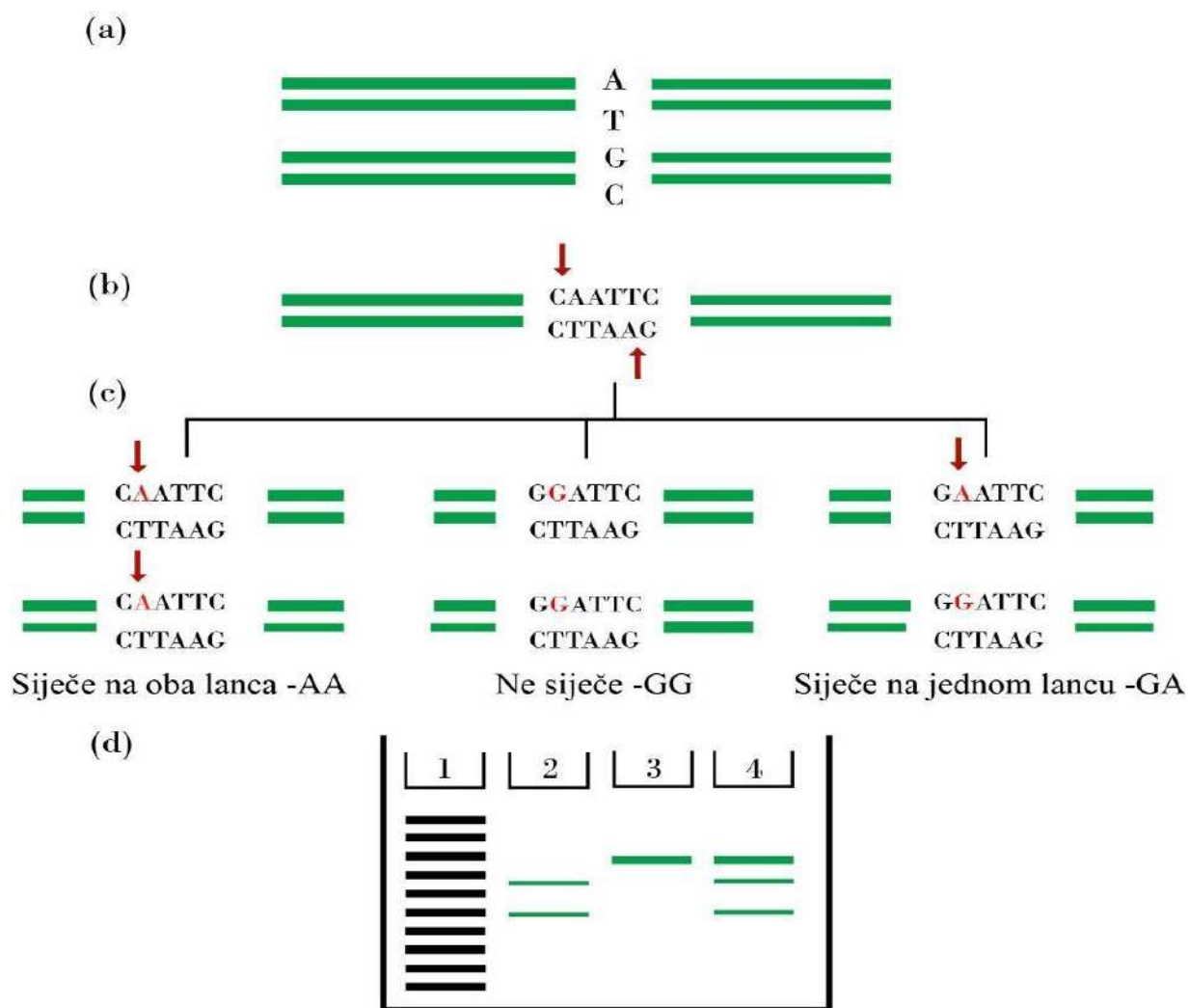
Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata ili RFLP (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*) tehnika je koju je 1979. godine primijenio engleski naučnik Alec Jeffreys za detekciju razlika u genu globina među nesrodnim osobama. Nakon toga, 1984. godine je uočio da među nesrodnim individuama postoje razlike u broju repetitivnih ponavljanja dijelova humanog genoma (engl. *Variable Number Tandem Repeats* – VNTR) te da je broj ponavljanja nasljedan. Analiza VNTR markera primjenom RFLP analize omogućila je individualizaciju pojedinaca, što je bilo od velikog značaja u forenzičkoj praksi. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata koristi se za analizu varijacije u okviru sekvence DNK i to isključivo na mjestu djelovanja restrikcijskih enzima.

Restrikcijske endonukleaze su enzimi koji vrše isijecanje sekvence DNK na specifičnom mjestu, pri čemu kao finalni produkt nastaju restrikcijski fragmenti. Svaka restrikcijska endonukleaza cilja različite nukleotidne sekvence u lancu DNK i stoga siječe sekvencu na različitim mjestima. Mnoga

restriksijska mjesta imaju redoslijed baza u 5'–3' i 3'–5' komplementarnom lancu. Restriksijski enzimi mogu sjeći DNK na dva različita načina: između istog para baza u komplementarnim lancima, kada nastaju fragmenti s ravnim krajevima, i stepenasto u simetričnim nukleotidnim parovima sekvence, kada nastaju ljepljivi krajevi s dužim 5' ili 3' krajevima. Polimorfizam se javlja kao posljedica različitih položaja restriksijskih mjesta kod različitih genoma / genotipova. Promjena položaja restriksijskog mjesta može nastati zbog delecije ili insercije segmenta DNK između restriksijskih mjesta, mutacija u tački koje dovode do nastanka novih restriksijskih mjesta i promjenljivog broja isijecanjem obuhvaćenih netranskribujućih sekvenci koje se nazivaju repetitivnom DNK (VNTRs) unutar restriksijskog fragmenta. Udaljenost između mjesta siječenja određene restriksijske endonukleaze razlikuje se među individuama. Stoga će se dužina fragmenata DNK, proizvedenih djelovanjem restriksijskog enzima, razlikovati kako kod pojedinih organizama, tako unutar i vrste. Kako danas postoji veliki broj poznatih restriksijskih enzima, prilično se jednostavno može pronaći grupa enzima koji omogućavaju jasnu diferencijaciju unutar vrste ili grupe organizama (slika 5.28).

Metoda se izvodi tako što se molekula DNK tretira poznatim restriksijskim endonukleazama. Mjesta prepoznavanja ovih enzima obično su dužine 4 do 6 baznih parova. Enzimi koji prepoznaju restriksijska mjesta s 4 baze sijeku molekulu DNK na približno svakih 256 baza, odnosno stvaraju fragmente DNK dužine 256 baza. Ovi enzimi su mnogo češći od enzima koji prepoznaju restriksijska mjesta sa 6 (fragmenti DNK oko 4000 bp) ili 8 baza (fragmenti DNK oko 64000 bp). Drugim riječima, što je prepoznata sekvenca kraća, to je broj fragmenata generiranih djelovanjem enzima veći. Na primjer, ako postoji kratki niz GAGC koji se ponavlja u uzorku DNK, restriksijska endonukleaza koja prepoznaje GAGC sekvencu siječe DNK pri svakom ponavljanju GAGC obrasca. Ako jedan uzorak sadrži GAGC sekvencu 4 puta, a drugi 2 puta, dužina fragmenata koje generira enzim bit će za dva ponavljanja različita kod ova dva uzorka.

Restriksijski fragmenti nastali tokom digestije DNK s restriksijskim enzimom analiziraju se pomoću agarozne gel-elektroforeze vizualizacijom fragmenata pod ultravioletnim svjetlom. Kada jedan enzim siječe identične genome, uvijek nastaje identičan broj restriksijskih fragmenata, koji su identične dužine.



Slika 5.28. Šematski prikaz RFLP metodologije primjenjene na diploidnom genomu. Osnovni koraci u RFLP analizi su ekstrakcija DNK, digestija DNK restriksijskim endonukleazama i detekcija rezultata na agaroznom gelu. Na šemi je prikazan primjer djelovanja *EcoRI* endonukleaze. Promjena nukleotida A→G u restriksijskom mjestu *EcoRI* enzima (GAATTC) rezultira njegovim uklanjanjem, zbog čega enzim nije u stanju prepoznati to mjesto, što se manifestuje razlikom u dužini nastalih restriksionih fragmenata. Restriksijska endonukleaza proizvodi tri vrste genotipova. AA genotip ima dva fragmenta (sječen, džep 2), GG genotip ima jedan fragment (nesječen, džep 3), a GA genotip ima tri fragmenta (heterozigot) koji pokazuju i sječene i nesječene oblike DNK (džep 4). Džep 1 predstavlja veličinski standard koji služi za analizu veličine dobijenih fragmenata.

Nedostaci ove metode zavise od niza faktora. Među prvim su svrha testiranja i preciznost (rezolucija) rezultata. Tako, na primjer, niska frekvencija polimorfizma kod poliploidnih organizama smanjuje efikasnost primjene RFLP metode. Nadalje, za ovu analizu je potrebna velika količina DNK visoke kvalitete, što nekada nije dostupno, posebno u slučajevima kada se biološki trag pronađe u malim količinama ili u degradiranom stanju. Osim toga, troškovi analize, kao i kadrovska i tehnička osposobljenost laboratorije, mogu predstavljati određeni nedostatak primjene ove analize. Analiza RFLP zahtijeva dugotrajno laboratorijsko angažovanje koje znatno poskupljuje ovu metodu. S druge strane, prednosti korištenja ovih markera su da se nasljeđuju kodominantno pa je moguće pouzdano analizirati razlike među testiranim uzorcima. Tehnika se može lako primijeniti na bilo koju vrstu ako postoje referentne informacije o RFLP markerima koji za datu vrstu nastaju siječenjem molekule DNK specifičnim restriktivnim enzimima na tačno određenim restriktivnim mjestima u genomu. Osim toga, metoda pruža mogućnost nezavisnog ponavljanja analize u drugim laboratorijama.

Klasična RFLP metoda danas je zamijenjena metodom PCR-RFLP, koja zapravo predstavlja spoj tehnika PCR i RFLP. U ovoj metodi ciljani dio genoma se umnoži tokom PCR-a korištenjem specifičnih prajmera, nakon čega se umnoženi segment (amplikon) podvrgne digestiji restriktivnim enzimima. Konačni ishod je identičan, a to je identifikacija varijacije na nivou sekvence, s tim da je sama metoda znatno brža, preciznija, rezultati su lakši za interpretaciju, a i sama metoda ne zahtijeva veliku količinu DNK. Metoda je idealna za identifikaciju vrsta u mješovitom uzorku. Sam princip analize je jednostavan i sastoji se iz nekoliko koraka: prvo se ciljani region umnoži primjenom odgovarajućih prajmera (PCR), nakon toga slijedi tretiranje restriktivnim enzimima kako bi se dobili fragmenti jedinstveni za analizirani uzorak (biljnu vrstu), koji se vizualiziraju primjenom gel-elektroforeze. Iako se ova metoda obično ne koristi u forenzičkoj analizi biljnih tragova, ona ima potencijal da bude vrijedan alat na polju forenzičke botanike, npr. u slučajevima analize smjese biljnih tragova. Ipak, zbog činjenice da je za RFLP analizu potrebna velika količina visoko kvalitetne DNK, koja je rijetko dostupna u istražnim postupcima, gdje se biljni tragovi nalaze prije u tragovima, nego u velikim količinama i češće u degradiranom, nego očuvanom stanju, ova analiza se danas veoma rijetko primjenjuje u forenzičkoj botanici.

5.7.4.2 Metoda slučajnog umnožavanja polimorfne DNK – RAPD

Metoda slučajno umnožene polimorfne DNK (engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA* – RAPD) metoda je koja se temelji na PCR analizi. Analizira varijabilnost u cijelom proučavanom genomu, ne zahtijeva prethodno znanje o analiziranoj sekvenci niti posebno dizajnirane prajmere za hibridizaciju, zbog čega je pronašla brojne primjene u populacijskogenetičkim i filogenetskim studijama. Ova metoda je 1990-ih bila u širokoj upotrebi, a kasnije su je djelomično zamijenile modernije metode, poput analize mikrosatelitne DNK ili tehnika sekvenciranja DNK.

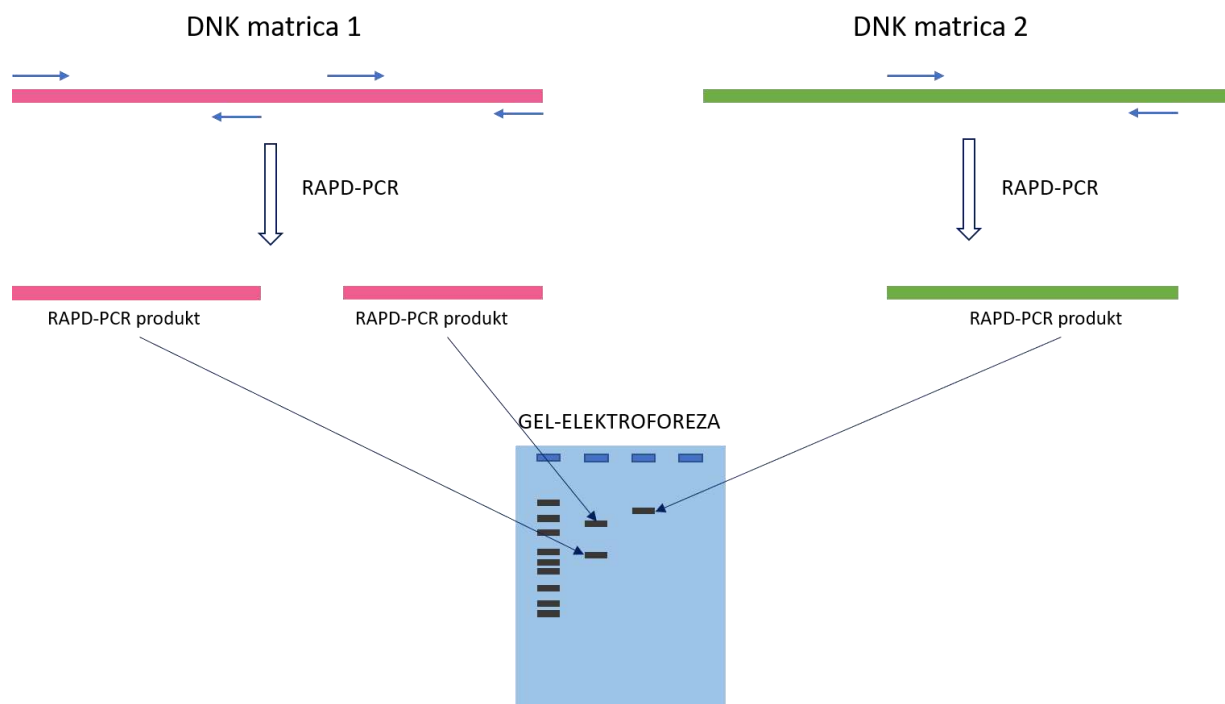
Za RAPD analizu, PCR reakcija se provodi korištenjem kratkih, slučajno odabranih prajmerskih sekvenci (veličine od oko 10 nukleotida). Oni služe kao *forward* i reverzni prajmeri i amplificiraju više fragmenata simultano. Veličina amplificiranih fragmenta kreće se u rasponu od 500 baznih parova pa do 5 kilobaza. Pri odgovarajućoj temperaturi tokom PCR-a, prajmeri se nasumično vežu za komplementarne sekvence genomske DNK koje služe kao matrica, nakon čega dolazi do amplifikacije sekvenci. Profil amplificirane DNK prvenstveno zavisi od toga kolika je homologija prisutna između matrice DNK i prajmera, jesu li prajmeri u pravilnoj orijentaciji jedan naspram drugog i je li udaljenost među njima dovoljno velika. Amplificirani fragmenti mogu se razdvojiti i vizualizirati pomoću elektroforeze u agaroznom gelu gdje se jednostavno generira *RAPD fingerprint* za konkretni oligonukleotid (slika 5.29).

Varijacija se detektuje kao prisustvo ili odsustvo produkta PCR reakcije, tj. uočenog benda na agaroznom gelu. Varijacija je uzrokovana mutacijom na mjestu vezivanja samog prajmera, bilo da je riječ o insercijama / delecijama (INDEL-ima) ili klasičnim supstitucijama.

Neke od osnovnih prednosti metode RAPD jesu: brza i laka analiza, ne zahtijeva prisustvo visoko kvalitetne DNK, nisu potrebne prethodne informacije o sekvencama, po PCR reakciji generira se veliki broj bendova, mogućnost istovremene analize većeg broja uzoraka, nema potrebe za korištenjem skupe i visoko specijalizirane opreme, mogućnost analize pomoću više različitih prajmera te primjenljivost na svaki organizam.

Neki od nedostataka ovog markerskog sistema su da su oni dominantni markeri (heterozigoti se ne mogu detektovati), reproducibilnost je niska jer se rezultati uveliko razlikuju u zavisnosti od različitih reakcijskih uslova, različiti uslovi PCR amplifikacije (poput temperature vezivanja prajmera, slučajno odabranih prajmerskih sekvenci, koncentracije hemikalija itd.) mogu uticati na

uspješnost analize, zatim je moguća pojava produkata koji nisu rezultat amplifikacije matrice DNK te nije moguće kvantificirati uočene razlike. Ovi nedostaci, a prije svega nemogućnost detekcije heterozigota, značajno ograničavaju interpretaciju rezultata.



Slika 5.29. Princip RAPD metodologije. U prvoj fazi se vrši amplifikacija DNK sa slučajno odabranim kratkim prajmerskim sekvencama koje su dizajnirane na osnovu sekvence DNK. PCR reakcija rezultira amplifikacijom različitih regiona u genomu. U drugoj fazi se vrši detekcija i vizualizacija amplificiranih fragmenata pomoću agarozne gel-elektroforeze. Strelice označavaju mjesta vezivanja prajmera.

Na bazi RAPD markera razvijen je specifičniji marker koji se zove SCAR (engl. *Sequence-Characterized Amplified Region*), koji je prvi put primijenjen u istraživanju gena salate odgovornih za otpornost na stres. Kako je analiza SCAR markera bazirana na RAPD-u, jednom utvrđeni polimorfni RAPD bend isiječe se iz gela, amplificira i sekvencira, a zatim se na osnovu te sekvence kreiraju specifični prajmeri koji se koriste u daljem skriningu istraživane vrste, procjeni diverziteta i sl.

Ova metodologija omogućava pregled velikog broja uzoraka u kraćem vremenskom periodu uz veliku pouzdanost. Međutim, ograničavajući faktor u ovoj analizi može biti neophodnost sekvenciranja koja nije dostupna nekim laboratorijama.

Smatra se da je prva upotreba DNK analize biljnih tragova primijenjena u slučaju ubistva u Arizoni iz 1992. godine. Upravo u ovom slučaju primijenjena je analiza RAPD markera za determinaciju sjemena mahune parkinsonije (*Cercidium* sp.) koje je pronađeno na sjedištu kamioneta osobe osumnjičene za ubistvo. Analiza je pokazala da se genetički profil mahuna pronađenih u kamionetu podudara s genetičkim profilom stabla parkinsonije u blizini pronađenog tijela, te je na taj način dovela u vezu osumnjičenog s mjestom zločina. Štaviše, u ovom slučaju RAPD analizom je uspješno identificirano 12 pojedinačnih stabala koja su se također nalazila na mjestu zločina te su uzorci iz kamioneta povezani s tačno određenim stablom parkinsonije.

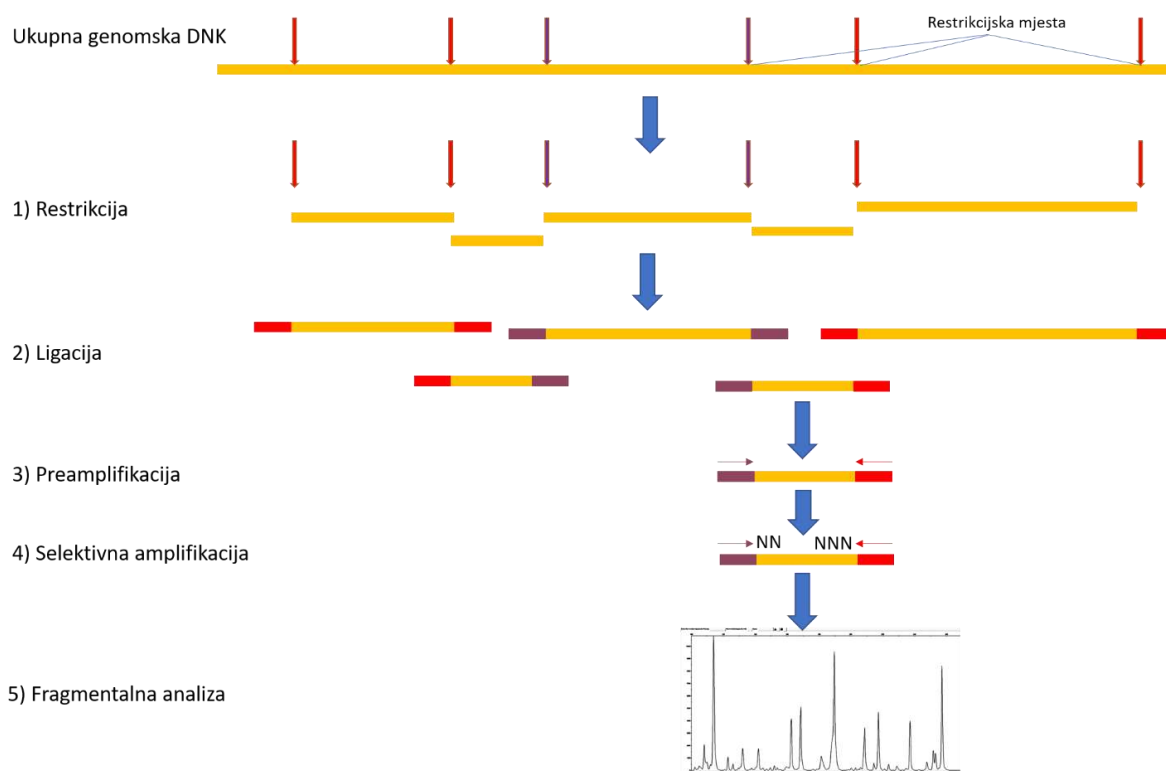
Analiza RAPD markera uspješno je bila primijenjena i u slučaju neautorizovane prodaje patentiranog varijeteta jagode (Marmolada®) koja je registrovana u Italiji 1984. godine, a koja ima veliku tržišnu vrijednost jer je otporna na niske temperature te se može uzgajati u kontinentalnim krajevima. Krajem 90-ih godina prošlog vijeka pokrenut je sudski proces protiv farmera koji su neovlašteno uzgajali i prodavali ovaj varijetet. Primjenom RAPD metode od 31 analiziranog uzorka jagode detektovano je 13 Marmolada® varijeteta. Rezultati analize su dali nedvosmislen dokaz da su neki farmeri bez dozvole uzgajali i prodavali ovaj vrijedni kultivar, čime se dokazala primjenjivost analize i u identifikaciji aseksualno reprodukovanih biljnih sorti.

5.7.4.3 Polimorfizam dužine amplificiranih fragmenata – AFLP

Analiza polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata (engl. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP) bazirana je na PCR amplifikaciji odabranih restrikcijskih fragmenata iz ukupne genomske DNK. Fluorescentno obilježeni amplificirani produkti razdvajaju se kapilarnom elektroforezom, a dobijeni fragmenti DNK kreću se u rasponu od 60 do 500 bp. Metoda analize AFLP markera ima sve osobine dobrog markerskog sistema, izuzev činjenice da su AFLP dominantni markeri. Ipak, primjenom ove metode moguće je detektovati visoku stopu polimorfizma. Također, izuzetno dobre strane AFLP metode su što ne zahtijeva *a priori* podatke o sekvenci DNK, mnogo markera može biti simultano analizirano u kratkom vremenskom periodu i za analizu je potrebna mala količina DNK.

Sušтина AFLP metode je dizajniranje i sinteza specifičnih prajmera i njihovo vezivanje za ciljanu sekvencu DNK u procesu ligacije. Ovi specifični prajmeri nazivaju se adapteri. To su, ustvari, poznate sekvence duge do 20 nukleotida. Ciljane sekvence DNK su fragmenti molekule DNK koji su generirani upotrebom dva restrikcijska enzima (*MseI* i *EcoRI*) koji daju fragmente DNK različitih veličina. Nakon toga, adapteri se ligiraju na svaki kraj restrikcijskog fragmenta upotrebom ligaze i koriste kao vezujuća mjesta za amplifikaciju u PCR-u. AFLP markeri predstavljaju polimorfizam restrikcijskih mjesta pa kao dominantni markeri ne omogućavaju detekciju heterozigota. Međutim, veliki broj fragmenata daje uvid u varijacije u cijelom genomu, koji onda pruža dobru sliku o nivou genetičke varijacije istraživanog organizma. AFLP metoda se sastoji od četiri uzastopna koraka: restrikcija / ligacija, preamplifikacija, selektivna amplifikacija i kapilarna elektroforeza (slika 5.30).

Restrikcija ukupne genomske DNK postiže se korištenjem dva različita restrikcijska enzima: *MseI* koji češće pronalazi četverobazno restrikcijsko mjesto u genomskoj DNK i *EcoRI* čije je šestobazno restrikcijsko mjesto nešto rjeđe. Uloga enzima *MseI* je generiranje manjih fragmenata koji se dobro amplificiraju i koji imaju raspon veličina optimalan za detekciju na gelu, dok je uloga enzima *EcoRI* da ograniči broj fragmenata koji će se amplificirati. Restrikcija i ligacija se obično odvijaju u istoj reakciji. Dvostruki lanac adaptera sastoji se od osnovnog dijela i enzim-specifičnog dijela sekvence. Adapteri su specifični ili za *EcoRI* ili za *MseI* mjesto. Ligacijom adaptera na izrezane fragmente DNK sprečava se ponovna restrikcija nakon postupka ligacije. Osnovni dio sekvence adaptera sastoji se od poznate sekvence DNK duge do 20 nukleotida, koja će se kasnije koristiti kao dio prajmera u PCR reakciji. Preamplifikacija je korak PCR reakcije u kojem se adapteri koriste kao prajmeri. Ovaj korak omogućava prvu selekciju fragmenata amplificirajući samo one restrikcijske fragmente DNK koji su se ligirali za adaptere. Uz poznatu adaptersku sekvencu, prajmeri korišteni u preselektivnoj amplifikaciji imaju po jednu dodatnu bazu. Ova baza omogućava selekciju amplificirajući $\frac{1}{4}$ fragmenata koji su ligirali oba adaptera. Nakon preamplifikacije slijedi korak selektivne amplifikacije. Cilj selektivne amplifikacije jeste da ograniči nivo polimorfizma i da fluorescentno obilježi ciljanu DNK. U ovom procesu, dodaju se još dva do tri nukleotida na 3' kraj prajmerske sekvence korištene u preamplifikaciji.



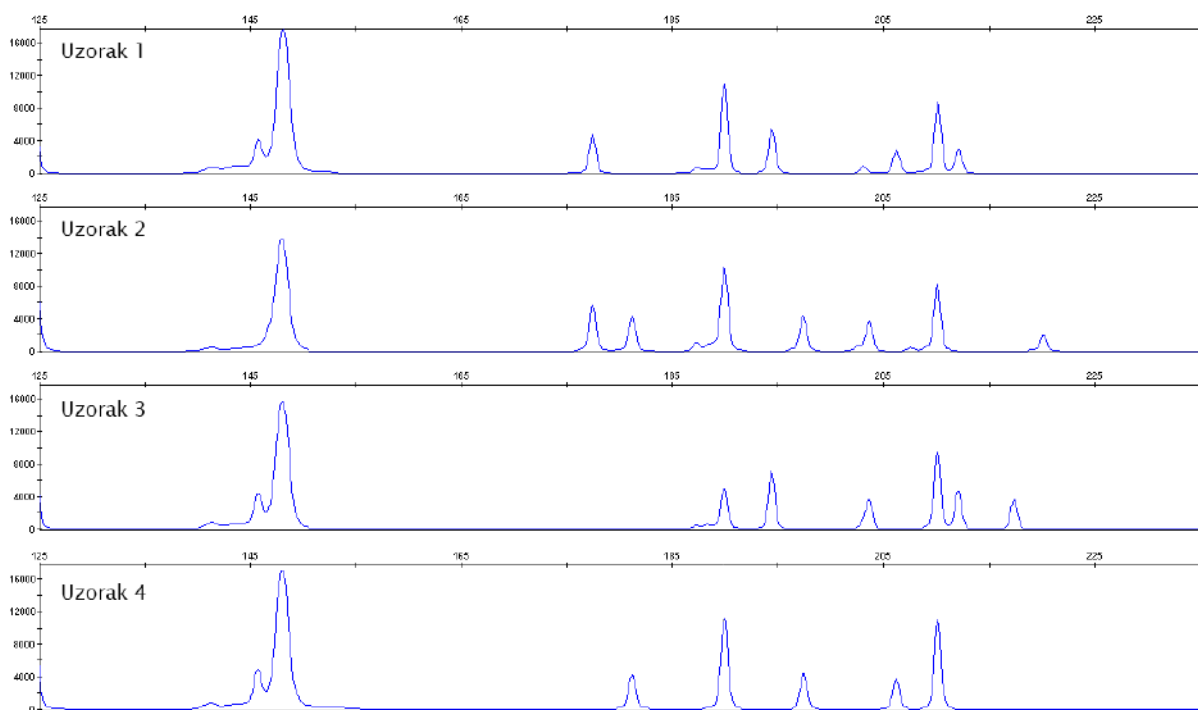
Slika 5.30. Šematski prikaz AFLP tehnologije. U prvoj fazi vrši se digestija genomske DNK s dva različita restriksijska enzima (crvene i ljubičaste strelice pokazuju restriksijska mjesta za dva različita enzima). U drugoj fazi se dodaju (ligiraju) adapteri na krajeve DNK fragmenata. U trećoj fazi (preamplifikacija) slijedi umnožavanje fragmenata. U četvrtoj fazi se dodaju 2–3 selektivna nukleotida (N) na 3' krajeve amplificiranih fragmenata. Peta faza je detekcija rezultata.

Ako istraživane biljne vrste imaju veće genome, na adaptore se dodaju po tri nukleotida kako bi se ograničio broj fragmenata u selektivnoj amplifikaciji. Dodatni nukleotidi čine amplifikaciju “selektivnijom”, odnosno smanjuju broj amplificiranih fragmenata. Po jedan prajmer iz prajmerskog para obilježen je fluorescentnom bojom, obično *EcoRI* prajmer, čime se omogućava vizualizacija DNK tokom migracije u gelu.

Izbor broja i sekvence prajmera koji će se koristiti u selektivnoj amplifikaciji važan je korak u metodi AFLP, budući da od pravilnog izbora zavisi određivanje nivoa polimorfizma detektovanog u istraživanoj vrsti. Na primjer, od osam obilježenih *EcoRI* prajmera i osam *MseI* prajmera, moguće je isprobati 64 kombinacije prajmera za selektivni PCR.

Testiranjem nekih od njih, može se pružiti uvid u interpopulacijski i intrapopulacijski polimorfizam. Dobar prajmerski par mora razlikovati jedinke koje dolaze iz različitih populacija, ali bi trebali biti i dovoljno polimorfni na nivou populacije tako da precizno identificiraju klonove.

Nakon selektivne amplifikacije, PCR produkti analiziraju se kapilarnom elektroforezom. Uslovi elektroforeze koji se koriste u analizi fragmenata moraju biti takvi da mogu razdvojiti fragmente DNK koji se razlikuju u samo jednom baznom paru. Fragmenti se razdvajaju zavisno od veličine, tako da se manji fragmenti pojavljuju prvi. Laser detektuje svaki fragment prema boji koja je vezana za prajmer i koja odašilje fluorescentni signal. Rezultati fluorescencije se vizualiziraju kao pikovi na elektroferogramu (slika 5.31). Amplificirani fragmenti kreću se u rasponu od 30 do 500 baznih parova.



Slika 5.31. Jedinstveni AFLP profili, odnosno specifični fingerprint četiri analizirana uzorka iz jedne populacije dobijena selektivnom amplifikacijom fragmenata koristeći kombinaciju prajmera *EcoRI*-A-GAG (6-FAM)/*MseI*-CAC

Nedostatak upotrebe metode AFLP u forenzičke svrhe jeste nemogućnost razlikovanja smjese uzoraka i uzoraka koji potiču iz jednog izvora. S obzirom na to da analizom AFLP markera nastaje veliki broj fragmenata, poznavanje njihove sekvence DNK bilo bi korisno za određivanje njihove hromosomske lokacije kako bi se uspostavile genetičke veze između analiziranih fragmenata. Razumijevanje odnosa između fragmenata neophodno je za izračunavanje visoko diskriminirajuće statističke vjerovatnoće slučajnog podudaranja koja se računa množenjem frekvencija alela na svim lokusima (alelna frekvencija na lokusu 1 x alelna frekvencija na lokusu 2 itd.), što je analogno STR profiliranju kod ljudi. Međutim, bez informacija koje se odnose na genetičku povezanost između različitih fragmenata AFLP, može se koristiti konzervativna metoda brojanja (detektovani broj alelnih varijanti / ukupan broj u populaciji) za određivanje forenzičke značajnosti podudaranja DNK profila kod ispitivanih uzoraka.

S obzirom na to da AFLP markeri imaju veliku diskriminatornu moć, analiza zahtijeva samo male količine DNK. Osim toga, metoda je reproducibilna, zbog čega je pogodna za primjenu u različitim istražnim slučajevima. Poseban je fokus na primjenu ove metode u praćenju klonalno proizvedene marihuane, gdje naredne generacije biljke imaju identične genetičke profile kao i matična biljka. *Miller Coyle* i saradnici su analizirali primjenljivost metode na genetičko profiliranje usjeva marihuane u oblasti Nove Engleske s ciljem povezivanja s jednom od dvije matične biljke od kojih vode porijeklo sve ostale biljke. Analiza je jasno pokazala da biljke imaju identične AFLP profile te povezala zaplijenjene uzorke marihuane preko matične biljke s distributerima, uz zaključak da se klonalno razmnoženi primjerci marihuane mogu povezati lokacijski te da im se može odrediti genetičko porijeklo. Rezultati istraživanja su stavljeni na raspolaganje istražnim organima Sjedinjenih Američkih Država za provođenje istražnih postupaka prilikom praćenja uobičajenih izvora marihuane, kao i za povezivanje izvora, distributera i korisnika.

Ipak, ono što uveliko ograničava rutinsku primjenu metode AFLP jest nepostojanje standardne baze podataka, kao izvora genetičkog diverziteta vrste, neophodne za statističku evaluaciju i interpretaciju rezultata.

5.7.4.4 Mikrosatelitni markeri

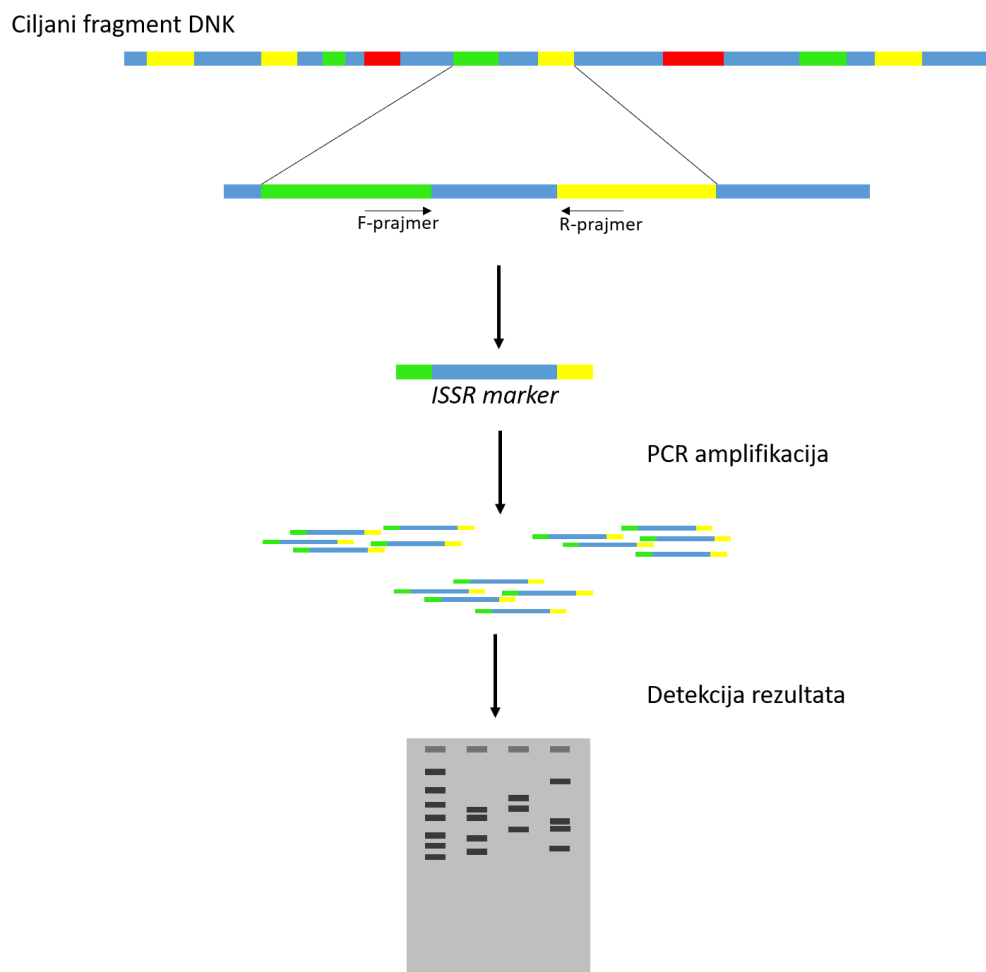
U forenzičkoj analizi tragova humanog porijekla, mikrosatelitni (STR) markeri su zlatni standard za generiranje jedinstvenog individualnog profila. S druge strane, jedan od izazova primjene mikrosatelita u forenzičkim istragama biljnih tragova je taj što u većini slučajeva ne postoje univerzalni mikrosatelitni markeri za biljke. Kod biljaka su mikrosateliti (STR ili *Simple Sequence Repeats* – SSR) specifični za vrstu pa svaka analiza ovih markera kod neke konkretne vrste zahtijeva početno ulaganje u identifikaciju pouzdanih markera specifičnih za vrstu od interesa. To najčešće obuhvata pretraživanje različitih baza podataka i drugih izvora kako bi se dobile informacije o dostupnim mikrosatelitnim markerima, nakon čega slijedi optimizacija protokola za analizu odabranih markera. Genotipizacija korištenjem mikrosatelita može biti posebno složena kod poliploidnih vrsta, jer kod poliploida broj alela po lokusu može varirati od individue do individue, što je posebno problematično za statističku analizu, a posebno izračunavanje vjerovatnoće identiteta (engl. *Probability of Identity* – P_{ID}) i informacionog sadržaja polimorfizma (engl. *Polymorphic Informative Content* – PIC). Ipak, kao rezultat sve većeg broja provedenih istraživanja genoma različitih biljnih vrsta upotrebom mikrosatelitnih markera, povećava se količina dostupnih informacija, što otvara vrata primjeni ovih markera u istražnim postupcima. Osim toga, mikrosateliti su izuzetno varijabilni, što ih čini sjajnim kandidatima za forenzičke analize. Korištenjem mikrosatelita moguće je razlikovati vrste, ali i individue unutar iste vrste. Nasljeđuju se kodominantno po Mendelijanskim principima nasljeđivanja, što omogućava preciznu i pouzdanu statističku analizu vjerovatnoće porijekla traga.

Primjena ovih markera pokazala se vrlo učinkovitom u forenzičkoj analizi tragova hrasta vrste *Quercus geminata* pronađenih u slučaju koji se dogodio u centralnoj Floridi u SAD. Naime, ubijena trudnica i njeno nerođeno dijete pronađeni su u plitkom grobu natkrivenom s tri zimzelena hrasta spomenute vrste. Botaničar koji je bio angažiran na slučaju identificirao je dva osušena lista pronađena u automobilu osumnjičenog kao *Q. geminata* i treći, koji je pripadao blisko srodnoj vrsti hrasta. Istraživači su koristili mikrosatelitne markere za genotipizaciju listova pronađenih u automobilu, kao i listova stabala na mjestu zločina. Istraživači su testirali i uspješno amplificirali STR markere koji su razvijeni za DNK profiliranje vrsta *Q. macrocarpa* i *Q. petraea*, pokazujući da se, u nekim slučajevima, STR markeri mogu uspješno primijeniti i za srodne vrste. U ovom slučaju analizirana su 24 uzorka *Q. geminata* stabala koja su prikupljena u krugu od 10 km oko

mjesta ukopa žrtava. Upotrebom četiri mikrosatelitna lokusa istraživači su uspjeli determinirati svaki od prikupljenih uzoraka. Na temelju prikupljenih uzoraka i alelnih frekvencija za svaki lokus, vrijednost vjerovatnoće identiteta (P_{ID}) je iznosila $2,06 \times 10^6$, što znači da bi otprilike jedno od 500.000 stabala dijelilo isti genotip. Ipak, analiza je pokazala da se STR profili uzoraka listova hrasta iz auta osumnjičenog ne podudaraju s uzorcima listova prikupljenim s mjesta ukopa. Ova studija je, iako nije dovela do optužbe osumnjičenog, pokazala da primjena STR markera u analizi biljnog materijala ima veliki potencijal u rješavanju različitih kriminalističkih i civilnih slučajeva, ako ništa onda u procesu isključivanja osumnjičene osobe kao potencijalnog počinitelja.

Još jedan primjer primjene STR markera u forenzičkoj botanici je slučaj ubistva koji se desio u Finskoj. Naime, u ovom slučaju trojica osumnjičenih su viđeni kako izlaze iz kafića sa žrtvom koja je kasnije pronađena mrtva. Prilikom forenzičke analize na njihovim cipelama, odjeći i u automobilu su pronađeni uzorci biljnih tragova koji su identificirani kao mahovine vrsta *Ceratodon purpureus*, *Brachythecium albicans* i *Calliergonella lindbergii*. Na mjestu zločina pronađene su sve tri vrste, ali su samo *B. albicans* i *C. lindbergii* uzete u obzir za analizu jer se razmnožavaju klonalno. S obzirom na to da spolno razmnožavanje rezultira pojavom genetičke varijacije, vrsta *C. purpurens*, koja se razmnožava seksualnim putem, isključena je iz analize. Analizom RAPD i SSR markera ustanovljeno je da uzorci vrste *B. albicans*, pronađeni na cipelama osumnjičenih, najvjerojatnije potiču s mjesta zločina, dok se za uzorke *C. lindbergii* nije moglo s velikom vjerovatnoćom potvrditi da potiču s mjesta zločina.

Za analizu biljnih genoma mnogo češće se koriste ISSR (engl. *Inter Simple Sequence Repeats*) markeri. Nalaze se između SSR sekvenci (slika 5.32). Nasljeđuju se dominantno te za analizu nije potrebno prethodno znanje o genomu organizma koji se proučava. Metoda je jednostavna za primjenu, relativno jeftina i jednostavna za izvođenje. Analiza ovih markera zasniva se na primjeni PCR analize u kojoj se umnožavaju nasumične sekvence genoma veličine 16–25 bp koje se nalaze između dvije identične mikrosatelitne repetitivne sekvence. Rezultat analize su fragmenti DNK različitih dužina koji se detektuju manualno na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu ili automatski, kapilarnom gel-elektroforezom korištenjem fluorescentno obojenih prajmera. Koriste se u proučavanju genetičke raznolikosti, filogenije, mapiranja genoma i u evolucijskoj biologiji. Nedostaci ove metode ogledaju se u mogućoj nehomologiji fragmenata slične veličine.



Slika 5.32. Šematski prikaz ISSR metodologije. Prvi korak uključuje dizajniranje ISSR prajmera na način da se vezuju na mikrosatelitne regione koji se nalaze između dva različita genomska segmenta. Zatim slijedi PCR amplifikacija. Posljednji korak jeste detekcija rezultata pomoću gel-elektroforeze, te se dobijeni fragmenti vizualiziraju i analiziraju.

5.7.4.5 DNK barkodiranje

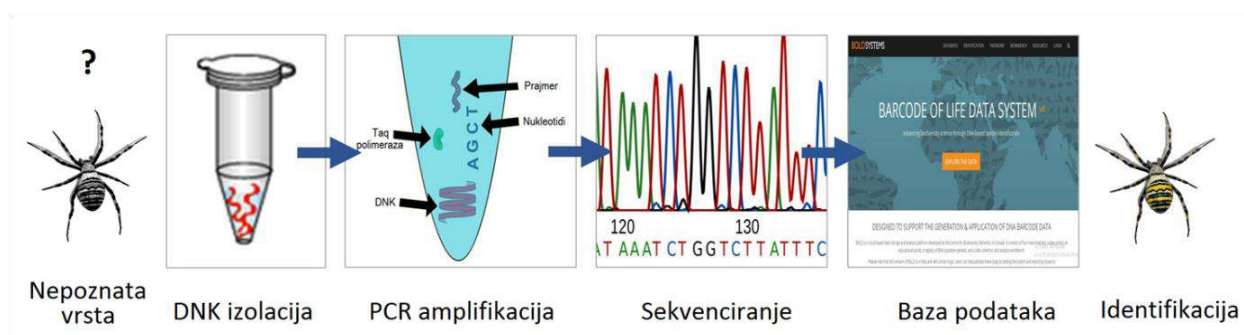
Kada se uzorak ne može pozitivno identificirati na temelju morfoloških ili anatomskih analiza, jer nedostaju dijagnostičke karakteristike ili su pronađeni samo mali fragmenti tkiva, tada postoji mogućnost identificiranja vrste pomoću sekvenciranja molekule DNK. Sekvenciranjem DNK molekule određuje se redoslijed DNK baza određenog segmenta genoma organizma. Sekvenciranje istog segmenta iz različitih uzoraka omogućuje usporedbu uzoraka radi otkrivanja sličnosti i razlika. DNK barkodiranje (engl. *DNA barcoding*) je metoda koja se brzo razvija, a

podrazumijeva sekvenciranje standardiziranog skupa regiona DNK. Koristi se za identificiranje (do nivoa vrste) nepoznatog uzorka na temelju usporedbe s bazom podataka poznatih uzoraka. Temeljna ideja DNK barkodiranja sadržana je u činjenici da se visoko konzervirani regioni DNK, bilo kodirajući ili nekodirajući, tokom evolucije ne mijenjaju te se jako malo razlikuju unutar vrsta. DNK barkod sekvence karakterizira neznatan stepen različitosti (varijabilnosti) između individua unutar jedne vrste. Intraspecifične divergencije su obično manje od 2%, a mnogo je veći stepen različitosti između pojedinih vrsta. Najčešće korišteni barkod region kod životinja je mitohondrijski citohrom c oksidaza podjedinica 1 (*COI*; *cox1*) region, i to njegov ~648 bp dug fragment. S druge strane, za biljke se još uvijek raspravlja o regionima (genima ili dijelovima genoma) koji su najpogodniji za barkodiranje. Izbor odgovarajućeg gena koji će služiti kao barkod region za biljke mnogo je kompleksniji nego što se moglo pretpostaviti. Pri tome, sekvenca *COI* nije se pokazala pogodnom za barkodiranje kod većine biljnih vrsta uslijed mnogo manje mutacijske stope ovog gena kod biljaka nego kod životinja. Nakon niza istraživanja i saradnje velikog broja istraživača na pitanju pronalaženja gena koji bi dao bolje rezultate u DNK barkodiranju biljaka, najpogodniji su se pokazali hloroplastni geni *rbcL*²⁴ i *matK*,²⁵ kao i *trnH-psbA* intergenska razmaknica te nukleusni ITS region. Ustvari, danas postoji opći konsenzus koji kaže da kombinacija gena *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* i ITS sekvenci predstavlja najpogodnije regione za barkodiranje biljaka. Uspješnost u identifikaciji vrsta koristeći pojedinačne barkodove je velika; 99% s *matK*, 95% s *trnH-psbA*, a zatim *rbcL* sa 75%. Upotreba kombinacije ova tri barkod regiona rezultirala je s >98% tačnih identifikacija kod 296 vrsta drveća, grmova i palmi. Istraživači koji se bave DNK barkodingom biljaka (*CBOL Plant Working Group*, 2009) preporučuju korištenje *rbcL* i *matK* zajedno, kao dva odgovarajuća hloroplastna gena za barkoding biljaka. S obzirom na to da se u forenzičkim slučajevima analizira relativno mala količina botaničkih uzoraka, preporuka bi bila uključiti sva četiri genska lokusa u analizu jer bi to povećalo šanse za preciznu identifikaciju vrste. Za svaki lokus dostupni su univerzalni prajmeri. Ipak, preporučuje se da istraživači redovno pretražuju literaturu jer se sekvence prajmera neprestano dorađuju, a mnogi lokusi zahtijevaju parove prajmera koji su specifični za srodne biljne vrste ili više taksonomske skupine kao što su porodice ili rodovi (npr. *matK* je najbolje amplificirati različitim prajmerima za različite rodove

²⁴ gen za ribulozo bisfosfat karboksilazu (RuBisCo)

²⁵ plastidni gen maturaza

biljaka). Identifikacija vrsta koristeći metodologiju DNK barkodiranja počinje od uzorkovanja jedinki iz različitih izvora (sakupljenih na terenu, iz kolekcija i zbirki pohranjenih u muzejima, zoološkim vrtovima, botaničkim baštama, iz banki sjemena itd.). Zatim se u laboratoriji uzima mali dio tkiva uzorka iz kojeg se izoluje DNK. Kroz proces PCR amplifikacije generiraju se produkti koji se nakon toga sekvenciraju. Dobijena sekvenca predstavlja barkod istraživane vrste i uspoređuje se sa sekvencama pohranjenim u bazama podataka. Dobijeni rezultat predstavlja najveću vjerovatnoću da pretraživana sekvenca pripada nekoj vrsti (slika 5.33).



Slika 5.33. Šematski prikaz koraka u identifikaciji vrste primjenom DNK barkodiranja

U svim slučajevima uslijed nedostatka dovoljne količine biljnog materijala za potrebe morfoloških i anatomskih analiza, DNK barkodiranje otvara nove mogućnosti u forenzičkoj botanici. Istražitelji moraju biti svjesni potencijala ove metode te prikupljati i čuvati sve dostupne uzorke tokom istražnih postupaka. Svi ti uzorci, primjenom metode DNK barkodiranja, mogu pomoći u identifikaciji velikog broja biljnih vrsta te na taj način pomoći u rješavanju različitih forenzičkih slučajeva. Jedan od primjera uspješne primjene DNK barkodiranja u forenzičkoj botanici je slučaj ubistva djevojke, koji se desio u ruralnom vlažnom području Kine. U blizini kuće njenog dečka pronađene su pantalone s osušenim blatom i fragmentima biljnog materijala. Uzorci su prikupljeni s pantalona, ali i uzoraka iz zemlje s mjesta ubistva. Za amplifikaciju i sekvenciranje korišten je hloroplastni gen *rbcL*. Nakon bioinformatičke obrade podataka identificirane su različite vrste, rodovi ili porodice biljaka u uzorku s pantalona i uzorku blata. Komparativnom analizom je ustanovljeno da je sastav fragmenata biljnog tkiva u uzorku s pantalona osumnjičenog identičan sastavu biljnog tkiva u blatu pronađenom na mjestu ubistva, čime je osumnjičeni doveden u vezu s mjestom zločina i samim tim i zločinom.

Ovaj slučaj implicira da biljna DNK iz okoliša predstavlja važan izvor forenzički relevantnih dokaza koje je moguće analizirati primjenom DNK barkodiranja zbog čega ova analiza ima veliki potencijal za široku primjenu u forenzičkoj botanici.

5.7.4.6 Polimorfizam jednog nukleotida – SNP

Polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) nastaje kao rezultat tačkastih mutacija u kojima jedan nukleotid biva zamijenjen drugim na posmatranom lokusu ili fragmentu molekule DNK. Ovi polimorfizmi su najčešći razlog genetičke varijacije kod biljaka i životinja. Velika prednost primjene SNP markera jeste njihov veliki broj i velika rasprostranjenost u genomu. Osim toga, evolucijski su stabilni jer ne dolazi do značajnih promjena iz generacije u generaciju. Unutar područja forenzičke botanike, SNP polimorfizmi mogu se koristiti za razlikovanje spornog uzorka od poznatog referentnog materijala. S porastom popularnosti SNP-ova, mnogi istraživači i kompanije kreirali su različite tehnike analiziranja i mapiranja SNP-ova koristeći visoko sofisticirane metode. Većina metoda genotipizacije SNP-ova temelji se na: alel-specifičnoj hibridizaciji, ligaciji oligonukleotida, ekstenziji prajmera ili korištenju strukturno specifične Flap endonukleaze za siječenje trodimenzionalnog kompleksa formiranog hibridizacijom alel-specifičnih preklapajućih oligonukleotida s ciljanom sekvencom DNK koja sadrži SNP polimorfizam. Hibridizacija oligonukleotida komplementarnog SNP alelu u ciljnoj sekvenci DNK pokreće siječenje oligonukleotida termostabilnom Flap endonukleazom. Ovo siječenje je vrlo osjetljivo na nepoklapanja između specifičnih oligonukleotida i ciljane sekvence DNK i može se koristiti za ispitivanje SNP-ova s visokim stepenom specifičnosti. Ove inovativne tehnike pokazuju ubrzani napredak DNK tipizacije biljnog materijala.

Jedna od popularnijih metoda za detekciju SNP polimorfizama je tehnologija *Affymetrix* čipa. To je metoda koja omogućava genotipizaciju visoke kvalitete uz dobijanje ogromne količine podataka, reproducibilnost među laboratorijama uz olakšanu analizu velikih količina podataka i kreiranje javnih baza. Uključuje korištenje mikročipa u koji su ugrađene hiljade oligonukleotidnih proba. Princip se bazira na fluorescentnom označavanju DNK koja se nakon amplifikacije veže za čip te hibridizira s probom proizvodeći luminiscentni signal koji ukazuje na prisutnost SNP-a. S velikim potencijalom da jedan čip otkrije hiljade SNP-ova, jasno je da ova metoda može biti moćan alat za analizu biljnih tragova u forenzičke svrhe.

Iako se ova tehnologija trenutno ne koristi u forenzičkoj botanici, stopa kojom tehnologija i istraživanja SNP polimorfizama napreduju predviđa mogućnost korištenja ove metodologije u rješavanju forenzičkih slučajeva u ne tako dalekoj budućnosti.

Nedostatak metode ogleda se u činjenici da je za svaku testiranu biljnu vrstu potrebno uraditi jako puno reakcija sekvenciranja i kreirati veliku bazu podataka. Za razliku od ljudske baze podataka (SNP Consortium Ltd.), koja se može jednako primijeniti na sve ljude, kod biljnih tragova je situacija mnogo kompleksnija jer je svaka biljna vrsta drugačija. Pored toga, cijena proizvodnje jednog mikročipa može biti skupa zbog tehnološki napredne opreme potrebne za njegovu ispravnu izradu.

5.7.5 Interpretacija rezultata molekularnoforenzičke analize biljnih tragova

Nakon što se uzorci biljnih tragova laboratorijski obrade i dobiju rezultati, postoji nekoliko načina za statističku analizu i interpretaciju rezultata. Pri tome, najjednostavniji način za interpretaciju jeste analiza genetičkog podudaranja između dokaznog materijala i referentnog uzorka. Važno je utvrditi da podudaranje ima određeni statistički značaj i da se ne može pripisati samo slučaju. U takvim slučajevima računa se *vjerovatnoća podudaranja*, i to na osnovu alelnih frekvencija na svakom pojedinom lokusu kao i za svaki genotip, što se računa množenjem frekvencija alela detektovanih na svakom lokusu. Ovo je, međutim, pretjerano pojednostavljenje i zanemaruju se efekti strukture populacija kao i neravnoteža vezanosti gena (engl. *Linkage Disequilibrium* – LD). Iako se veći dio literature koja se bavi ovom temom temelji na humanoj forenzici, o čemu postoji mnoštvo podataka, populacijski genetičari i molekularni ekolozi također su se pozabavili tim problemom. Postoje softverski paketi koji mogu pomoći istraživačima u ispravljanju proračuna. Pored toga, program *GIMLET* ima algoritme koji pomažu u otkrivanju nul-alela i drugih grešaka u genotipizaciji. Forenzičke istrage se, međutim, ne bi trebale oslanjati samo na ove metode otkrivanja nul-alela, a za posebno zahtjevne uzorke nul-aleli bi trebali biti očekivani i uzeti u obzir prilikom traženja podudaranja.

Tipičan pristup u forenzičkim DNK istragama je povezivanje dokaza s jednom biljkom, što svakako nije uvijek moguće. U mnogim situacijama možda ne postoji takva biljka. U ovakvim slučajevima metode koje se zasnivaju na grupisanju populacija i dalje mogu pružiti vjerodostojne i vrijedne forenzičke informacije. Metode grupisanja imaju tendenciju da se temelje na genetičkim

distancama (izračunate na razne načine), a uzorci klastera se temelje na ukupnoj genetičkoj sličnosti. Ovo može istražiteljima omogućiti da kažu da uzorak najvjerojatnije dolazi iz određene populacije. Novije metode, koje se obično označavaju metodama dodjele populacija, omogućavaju statističko dodjeljivanje uzoraka populacijama nezavisno od prethodnih pretpostavki strukture populacije. Uzorci s različitih lokacija mogu se analizirati zajedno sa spornim uzorkom, kako bi se utvrdila najvjerojatnija ancestralna populacija uzorka.

Literatura

- Aquila, I., Ausania, F., Di Nunzio, C., Serra, A., Boca, S., Capelli, A., Magni, P., Ricci, P. (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: case report and review of literature. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 820-824.
- Bhardwaj, N., Sharma, C., Mandotra, S.K., Ahluwalia, A.S. (2021). Potential of Golden Brown Algae in Forensic Analysis: A Review. In S.K. Mandotra, A.K. Upadhyay, A.S. Ahluwalia (Eds.), *Algae: Multifarious Application for a Sustainable World*, (pp 353-373), Singapur: Springer.
- Bock, J.H., Norris, D.O. (2016). *Forensic Plant Science*. Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.
- Brown, A.G. (2006). The use of forensic botany and geology in war crimes investigations in NE Bosnia. *Forensic Science International*, 163(3), 204-210.
- Caccianiga, M., Caccia, G., Mazzarelli, D., Salsarola, D., Poppa, P., Gaudio, D., Cappella, A., Franceschetti, L., Tambuzzi, S., Maggioni, L., Cattaneo, C. (2021a). Common and much less common scenarios in which botany is crucial for forensic pathologist and anthropologists: a series of eight case studies. *International Journal of Legal Medicine*, 135(3), 1067-1077.
- Caccianiga, M., Compostella, C., Caccia, G., Cattaneo, C. (2021b). Contribution of plant anatomy to forensic investigation: Tree bark morphology. *Forensic Science International*, 318, 110598.
- Caeiro, D. (2021). Acid Digestion Method for Extraction of Diatoms in Drowning Cases: A Review. *Kristu Jayanti Journal of Core and Applied Biology (KJCAB)*, 1(1), 33-36.
- Cain, M.L., Bowman, W.D., Hacker, S.D. (2011). *Ecology* (2nd Edition). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Cameron, N.G. (2004). The use of diatom analysis in forensic geoscience. *Geological Society, London, Special Publications*, 232(1), 277-280.
- Carlier, J., Guitton, J., Romeuf, L., Bévalot, F., Boyer, B., Fanton, L., Gaillard, Y. (2015). Screening approach by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the blood quantification of thirty-four toxic principles of plant origin. Application to forensic toxicology. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 975, 65-76.
- Congiu, L., Chicca, M., Cella, R., Rossi, R., Bernacchia, G. (2000). The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Molecular Ecology*, 9(2), 229-232.
- Craft, K.J., Owens, J.D., Ashley, M.V. (2007). Application of plant DNA markers in forensic botany: genetic comparison of *Quercus* evidence leaves to crime scene trees using microsatellites. *Forensic Science International*, 165(1), 64-70.
- Cutler, R.W.P. (2003). *The Mysterious Death of Jane Stanford*. Stanford, California, USA: Stanford General Books.
- D'Amato, G., Spieksma, F.T., Bonini, S. (1991). *Allergenic Pollen and Pollinosis in Europe*. New Jersey, USA: Blackwell Scientific Publications.
- Dang, T., Nguyen, C., Tran, P.N. (2017). Physician Beware: Severe Cyanide Toxicity from

- Amygdalin Tablets Ingestion. *Case Reports in Emergency Medicine*, 2017, 4289527.
- Erdtman, G. (1971). *Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms (An Introduction to Palynology)*. Štokholm, Švedska: Almqvist & Wiksell.
- Evert, R.F. (2006). *Esau's Plant Anatomy: Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function and Development* (3rd Edition). New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Gurevitch, J., Scheiner, S.M., Fox, G.A. (2006). *The Ecology of Plants* (2nd Edition). Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates.
- Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S. (2009). *Pollen Terminology: An illustrated handbook*. Beč, Austrija: Springer.
- Holland, J.G. (2008). *The Life of Abraham Lincoln*. Whitefish, Montana, USA: Kessinger Publishing.
- Horton, B.P., Boreham, S., Hillier, C. (2006). The development and application of a diatom-based quantitative reconstruction technique in forensic science. *Journal of Forensic Sciences*, 51(3), 643-650.
- Johnson, C.E., Premasuthan, A., Satkoski Trask, J., Kanthaswamy, S. (2013). Species identification of Cannabis sativa using real-time quantitative PCR (qPCR). *Journal of Forensic Sciences*, 58(2), 486-490.
- Jordan, D., Mills, D. (2021). Past, Present, and Future of DNA Typing for Analyzing Human and Non-Human Forensic Samples. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 646130.
- Korpelainen, H., Virtanen, V. (2003). DNA fingerprinting of mosses. *Journal of Forensic Sciences*, 48(4), 804-807.
- Kowalczyk, M., Sekuła, A., Mleczko, P., Olszowy, Z., Kujawa, A., Zubek, S., Kupiec, T. (2015). Practical aspects of genetic identification of hallucinogenic and other poisonous mushrooms for clinical and forensic purposes. *Croatian Medical Journal*, 56(1), 32-40.
- Kumar, M., Deshkar, J., Naik, S., Yadav, P.K. (2012). Diatom test-past, present and future: a brief review. *The Indian Journal of Research and Reports in Medical Sciences*, 2, 28-32.
- Lancia, M., Conforti, F., Aleffi, M., Caccianiga, M., Bacci, M., Rossi, R. (2013). The use of *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst in the estimation of minimum postmortem interval. *Journal of Forensic Sciences*, 58, 239-242.
- Laurence, A.R., Bryant, V.M. (2014). Forensic Palynology. In G. Bruinsma, D. Weisburd (Eds.), *Encyclopedia of Criminology and Criminal Justice*, (pp 1741-1754). New York, USA: Springer.
- Levin, E.A., Morgan, R.M., Scott, K.R., Jones, V.J. (2017). The transfer of diatoms from freshwater to footwear materials: An experimental study assessing transfer, persistence, and extraction methods for forensic reconstruction. *Science & Justice*, 57(5), 349-360.
- Levine, M., Ruha, A.M., Graeme, K., Brooks, D.E., Canning, J., Curry, S.C. (2011). Toxicology in the ICU: part 3: natural toxins. *Chest*, 140(5), 1357-1370.
- Mason A.S. (2015). Challenges of genotyping polyploid species. In J. Batley (Ed.), *Plant Genotyping (Methods in Molecular Biology Book Series, vol. 1245)*, (pp 161-168). New York, USA: Humana Press.
- Mayuri, K., Mahipal, S.S., Manisha, N., Kirti, S., Rajeev, K. (2017). Role of Forensic Palynology in Crime Investigation. *IJournals: International Journal of Social Relevance & Concern*, 5(3), 1-13.
- Mildenhall, D. (2008). Civil and criminal investigations. The use of spores and pollen. *SIAM-Journal – Zeitschrift für*

- Polizeiwissenschaft und polizeiliche Praxis*, 4, 35-52.
- Mildenhall, D.C., Wiltshire, P.E., Bryant, V.M. (2006). Forensic palynology: why do it and how it works. *Forensic Science International*, 163(3), 163-172.
- Miller Coyle, H., Ladd, C., Palmbach, T., Lee, H.C. (2001). The Green Revolution: botanical contributions to forensics and drug enforcement. *Croatian Medical Journal*, 42(3), 340-345.
- Miller Coyle, H., Lee, C. L., Lin, W.Y., Lee, H.C., Palmbach, T.M. (2005). Forensic botany: using plant evidence to aid in forensic death investigation. *Croatian Medical Journal*, 46(4), 606-612.
- Miller Coyle, H., Palmbach, T., Juliano, N., Ladd, C., Lee, H. C. (2003). An overview of DNA methods for the identification and individualization of marijuana. *Croatian Medical Journal*, 44(3), 315-321.
- Miller, R.B. (1994). Identification of wood fragments in trace evidence. *Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of Trace Evidence*. U.S. Department of Justice Federal Bureau of Investigation (Quantico, Virginia, USA; June 24-28, 1994), (pp 91-111).
- Milne, L.A., Bryant Jr., V.M., Mildenhall, D.C. (2004). Forensic Palynology. In Miller Coyle, H. (Ed.), *Forensic Botany: Principles and Applications to Criminal Casework*, (pp 217-252). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Moore, P.D., Collison, M., Webb, J.A. (1994). *Pollen Analysis* (2nd Edition). New Jersey, USA: Blackwell Scientific Publications.
- Norris, D.O., Bock, J.H. (2000). Use of fecal material to associate a suspect with a crime scene: report of two cases. *Journal of Forensic Sciences*, 45(1), 184-187.
- Norris, D.O., Bock, J.H. (2001). Method for examination of fecal material from a crime scene using plant fragments. *Journal of Forensic Identification*, 51(4), 367-377.
- Peabody, A.J., Cameron, N.G. (2010). Forensic science and diatoms. In J.P. Smol, E.F. Stoermer (Eds.), *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences* (2nd Edition), (pp 534-539). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Peternel, R. (2011). Utjecaj sezonskih fluktuacija i prostorne raspodjele peludnog spektra na učestalost peludnih alergija u Zagrebu i Zagrebačkoj županiji (Doktorska disertacija). Zagreb, Hrvatska: Sveučilište u Zagrebu.
- Phillips, G. (2004). *Alexander the Great: Murder in Babylon*. London, UK: Virgin Books.
- Roberts, M.F., Wink, M. (1998). *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*. New York, USA: Springer.
- Rohn, E.J., Frade, P.D. (2006). The Role of Diatoms in Medicolegal Investigations I: The History, Contemporary Science, and Application of the Diatom Test for Drowning. *Forensic Examiner*, 15(3), 10-15.
- Schweingruber, F.H., Börner, A., Schulze, E.-D. (2011). *Atlas of Stem Anatomy in Herbs, Shrubs and Trees* (Volume 1). Berlin, Heidelberg, Njemačka: Springer.
- Scott, K., Morgan, R., Jones, V., Dudley, A., Cameron, N., Bull, P. (2016). The Value of an Empirical Approach for the Assessment of Diatoms as Environmental Trace Evidence in Forensic Limnology. *Archaeological and Environmental Forensic Science*, 1(1), 49-78.
- Scott, K.R., Morgan, R.M., Cameron, N.G. and Jones, V.J. (2019). Freshwater diatom transfer to clothing: Spatial and temporal influences on trace evidence in forensic reconstructions. *Science & Justice*, 59(3), 292-305.

- Seixas, R., Lopes, D., Couto, M., Pereira, J., Paiva, J. (2021). Severe Colchicine Intoxication: A Case Report and Review of Literature in Adults. *Cureus*, 13(10), 19151.
- Singh, R., Deepa, R., Kaur, R. (2013). Diatomological mapping of water bodies--a future perspective. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 20(6), 622-625.
- Siver, P.A. (1991). *The Biology of Mallomonas: Morphology, Taxonomy and Ecology (Developments in Hydrobiology Book Series, vol. 63)*. Dordrecht, Nizozemska: Kluwer Academic Publishing, Springer.
- Siver, P.A. (2011). The distribution of scaled chrysophytes along a pH gradient. *Canadian Journal of Botany*, 67(7), 2120-2130.
- Siver, P.A., Lord, W.D., McCarthy, D.J. (1994). Forensic Limnology: The Use of Freshwater Algal Community Ecology to Link Suspects to an Aquatic Crime Scene in Southern New England. *Journal of Forensic Sciences*, 39(3), 847-847.
- Sousa, V., Ferreira, J.P.A., Miranda, I., Quilhó, T., Pereira, H. (2021). Quercus rotundifolia Bark as a Source of Polar Extracts: Structural and Chemical Characterization. *Forests*, 12(9), 1160.
- Tatić B., Petković, B. (1998). *Morfologija biljaka*. Beograd, Srbija: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd.
- Uitdehaag, S., Dragutinović, A., Kuiper, I. (2010). Extraction of diatoms from (cotton) clothing for forensic comparisons. *Forensic Science International*, 200(1-3), 112-116.
- Verma, K. (2013). Role of Diatoms in the World of Forensic Science. *Journal of Forensic Research*, 4(2), 181-184.
- Wiltshire, P.E.J. (2009). Forensic Ecology, Botany, and Palynology: Some Aspects of Their Role in Criminal Investigation. In K. Ritz, L. Dawson, D. Miller (Eds.), *Criminal and Environmental Soil Forensics*, (pp 129-149). Dordrecht, Nizozemska: Springer.
- Zavada, M.S., McGraw, S.M., Miller, M.A. (2007). The role of clothing fabrics as passive pollen collectors in the north-eastern United States. *Grana*, 46(4), 285-291.
- Zaya, D.N., Ashley, M.V. (2012). Plant genetics for forensic applications. In N. Sucher, J. Hennell (Eds.), *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding (Methods in Molecular Biology Book Series, vol. 862)*, (pp 35-52). New York, USA: Humana Press.



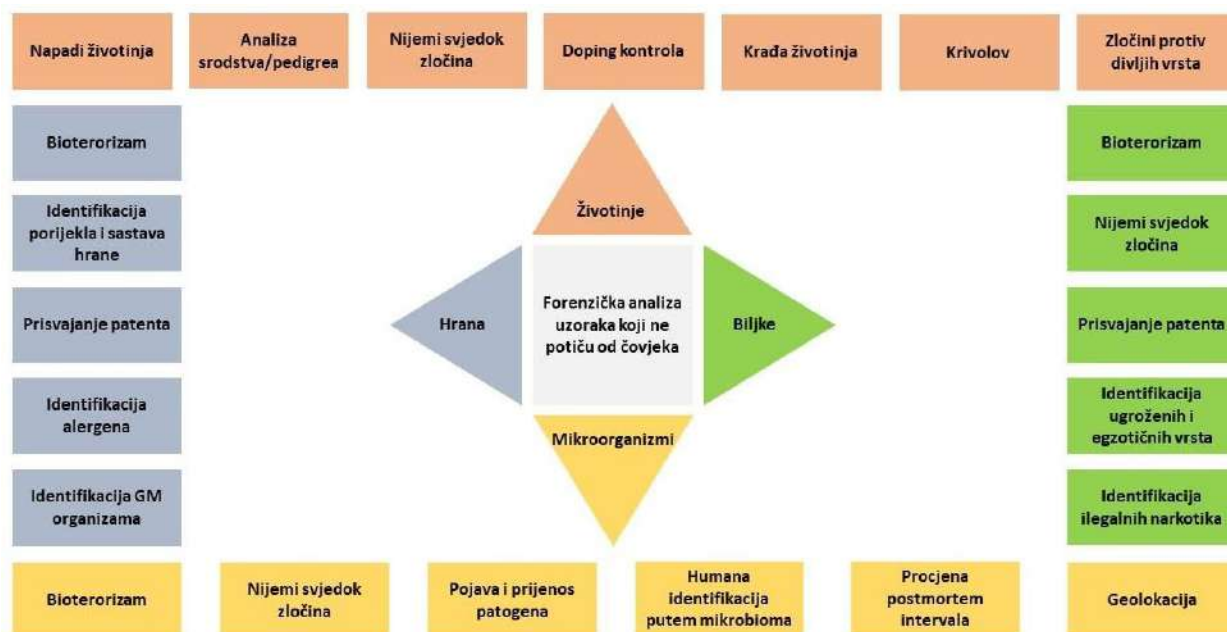
6. ANIMALNA FORENZIKA

BELMA KALAMUJIĆ STROIL
ADI VESNIĆ
AMINA HADŽIEMRIĆ

Kada se posmatra pozicija čovjeka u prirodi koja ga okružuje, u njenom užem i širem kontekstu, iznenađuje činjenica da je historijski razvoj forenzičke nauke u svom najvećem dijelu bio antropocentričan, odnosno posvećen isključivo humanoj genetici. Razlog dijelom leži i u tome što su oduvijek postojala različita neslaganja u pitanjima koja su inherentno povezana s tragovima koji ne potiču od čovjeka, pa čak i kada se radi o slučajevima koji se direktno tiču ljudi (poput identifikacije ubice). U takvim slučajevima, dokazi koji nisu humanog porijekla mogu biti presudni za njihovo rješavanje ili čak biti jedina vrsta dostupnih dokaza (kao, na primjer, u poznatom slučaju mačke *Snowball*, kada je počinitelj ubistva povezan s tragovima nađenim na mjestu zločina na osnovu analize dlake njegovog kućnog ljubimca te na osnovu tih dokaza osuđen za zločin). Stoga *Forensic Science International: Genetics*, prvi naučni časopis posvećen isključivo forenzičkoj genetici, forenzičku nauku definiše kao “primjenu genetike u analizi tragova koji vode porijeklo od čovjeka i drugih bioloških vrsta (u naučnom kontekstu, s ciljem proučavanja nasljednih osobina u analizi međupopulacijskih i unutarpopulacijskih razlika) za rješavanje pravnih sporova”.

U posljednjoj deceniji, detekcija i analiza dokaznog materijala životinjskog porijekla sve je češća i u istragama zločina počinjenih na ljudima. Jednostavno objašnjenje za to leži u činjenici da veliki broj domaćinstava danas, posebno u razvijenim zemljama, ima makar jednog kućnog ljubimca, najčešće mačku ili psa. *D'Andrea* i saradnici su 1998. godine dokazali da je, posljedično, zbog velikog broja opalih životinjskih vlasi, nemoguće izbjeći njihov pasivni prijenos na ljude koji se kreću u datom kućanstvu. Preneseno u forenzički kontekst, počinitelj zločina ne može napustiti neku kuću, a da na svojoj odjeći i/ili obući ne ponese životinjsku vlas. Kako životinjski biološki dokazi nisu izuzeti iz Locardova principa transfera, to uveliko pomaže istražiteljima da na osnovu ovakvog tipa dokaza uspostave vezu između počinitelja, žrtve i mjesta zločina.

Posmatrajući u širem kontekstu analizu biološkog materijala koji nije humanog porijekla, najčešći vidovi njene primjene mogu se grupisati na način prikazan na slici 6.1. Analitički pristup zavisiće od toga pripadaju li analizirane životinje skupini kičmenjaka (vertebrata) ili beskičmenjaka (invertebrata).



Slika 6.1. Najčešći vidovi primjene analize uzoraka koji nisu humanog porijekla u kontekstu zoologije, botanike, mikrobiologije i analize hrane

Ako, pak, razmatramo samo primjenu forenzičke analize biološkog materijala koji potiče od vertebratnih životinja, onda se ona može podijeliti u četiri osnovne kategorije:

1. Slučajevi u kojima su životinje tzv. pasivni svjedoci zločina,
2. Slučajevi u kojima su životinje žrtve zločina,
3. Slučajevi u kojima su životinje počinitelji zločina,
4. Slučajevi analize životinjskog materijala u uzorcima hrane.

Životinjski biološki materijal može igrati ključnu ulogu u istraživanju različitih krivičnih sporova s ciljem identifikacije osobe (ili više njih) koja je počinila neki zločin. Naravno, treba naglasiti da ovakav tip dokaza može dati ključne elemente za rekonstrukciju zločina koji se desio, ali ne i obezbijediti apsolutnu individualizaciju osumnjičenog, te ih je stoga potrebno dopuniti i drugim oblicima materijalnih dokaza. Historijski gledano, prva primjena forenzičke analize animalnih bioloških tragova u krivičnim slučajevima odnosila se na situacije u kojima je ovaj tip materijala bio “nijemi svjedok zločina”, tj. kada je dokaz nastao kao rezultat pasivnog transfera biološkog životinjskog traga sa žrtve ili mjesta zločina na počinioca ili obratno. Ovakav tip dokaza posebno

je važan u kriminalističkim slučajevima u kojima počinioči pažljivo izbjegavaju ostavljanje vlastitih bioloških tragova na mjestu zločina. Međutim, kako su kućni ljubimci izuzetno uobičajeni u modernim domaćinstvima, može se desiti da počinilac zločina, na primjer, nehotice ostavi dlake svojih ljubimaca na mjestu zločina ili, obrnuto, pokupi na svoju odjeću ili obuću biološki trag ljubimca žrtve.

6.1 METODE IDENTIFIKACIJE VERTEBRATA U ANIMALNOJ FORENZICI

U zavisnosti od okolnosti slučaja (da li je životinja počinitelj ili žrtva zločina) i svrhe forenzičke analize, analizom je potrebno ili identificirati pojedinačnu životinju s visokim stepenom sigurnosti (individualizacija) ili je ponekad dovoljno samo identificirati životinje ili životinjske proizvode do nivoa vrste (npr. u slučajevima trgovine zaštićenim vrstama, analize lažno deklariranih životinjskih proizvoda i sl.). Tehnike identifikacije kičmenjaka mogu se podijeliti u tri široke kategorije: fizičke, molekularne i hemijske. Fizičke tehnike su one koje se oslanjaju na promatranje karakterističnih osobina životinje, njenog izmeta ili umjetnih artefakata, kao što su ušne markice ili uređaji za praćenje. Molekularne tehnike uključuju genotipizaciju odabranih molekularnih markera i sekvenciranje životinjskog genoma. Iako u ovu kategoriju spadaju i proteinske i imunološke metode, s obzirom na to da se danas samo ponekad koriste u analizi, one neće biti razmatrane u ovom poglavlju. Hemijske tehnike uključuju analizu hemijskog sastava životinje. Neke od ovih metoda ne omogućavaju identifikaciju vrste, ali često mogu pružiti dobar dokaz o geografskom porijeklu životinje ili životinjskog proizvoda.

6.1.1 Fizičke metode u analizi kičmenjaka u animalnoj forenzici

Ove tehnike obuhvataju analizu ukupnih morfoloških karakteristika životinje, fecesa, žigova, ušnih markica, mikročipova te osobina dlake.

6.1.1.1 Morfološka analiza tijela i skeleta

Kičmenjake, a posebno sisare, obično je moguće identificirati do nivoa vrste na osnovu njihove grube morfologije, čak i određeno vrijeme nakon uginuća. Identifikacija skeletiziranih ostataka do nivoa vrste za mnoge kičmenjake je također dosta laka ako je dostupna lobanja životinje (slika 6.2).



Slika 6.2. Izgled lobanje psa (*krupnija*) i mačke (*sitnija*)

Ipak, ako postoji samo nekoliko manjih kostiju, onda identifikacija može biti ograničena samo do nivoa roda ili porodice. Nadalje, gotovo je nemoguće identificirati vrstu prema morfološkim karakteristikama nakon što je životinja prerađena za hranu. Međutim, ovaj analitički pristup posebno je problematičan ako je potrebno napraviti individualizaciju pojedinačne životinje. Na primjer, psa ili drugu životinju odgovornu za napad ili izazivanje nesreće koja je nakon toga pobjegla bilo bi vrlo teško kasnije identificirati samo na osnovu izjava svjedoka. Većina ljudi, kada bi bili zamoljeni da opišu psa, ne bi mogla dati više od nejasnog opisa, što nije od velike koristi kao dokaz na sudu.

6.1.1.2 Analiza tragova ujeda

Ujedi na tijelu žrtve mogu se naći kao posljedica direktnog napada životinje ili kao rezultat postmortalnog strvinarenja nad lešom. O prvom slučaju biće govora u ostatku poglavlja, pa ćemo ovdje razmotriti analizu tragova ujeda koji nastanu nakon smrti osobe.

Domaće i divlje životinje rijetko usmrćuju ljude u sjevernoj Evropi te su mnogo češći slučajevi strvinarenja (hranjenja lešom). Strvinarenje neminovno dovodi do ozbiljnog oštećenja tijela žrtve i može navesti istražitelja da u početku pretpostavi da je osoba koja je umrla prirodnom smrću ili izvršila samoubistvo bila žrtva brutalnog ubistva. Odjeća rijetko predstavlja prepreku životinjama da rastrgaju leš ili da se njime hrane. Tako razbacivanje odjeće i uklanjanje genitalija / genitalnih regiona s leša kao posljedica aktivnosti strvinara može lažno navesti istražitelje da posumnjaju na

seksualni napad. Prema tome, štetu koju nanose psi i druge strvinarske vrste treba razlikovati od štete koju je prouzročio ubica u trenutku smrti ili tokom postmortalne disartikulacije tijela žrtve.

Kičmenjaci koji su u forenzičkim istragama najčešće zabilježeni da se hrane leševima su psi i drugi veliki karnivori, pacovi i drugi glodavci, svinje, ptice te ribe i drugi vođeni kičmenjaci. Međutim, čak i kičmenjaci koji se inače smatraju biljojedima, kao što su vjeverice (crvene i sive), ovce i krave, mogu glodati kosti, posebno ako žive u sredini siromašnoj nutrijentima. Postmortalna oštećenja na tijelu žrtve, nastala kao posljedica strvinarenja, zavisice od vrste životinje i posljedično njene veličine, tipa zubne formule, načina hranjenja itd., što se sve uzima u obzir prilikom analize mjesta zločina i samoga leša.

Ugrizne rane nanese nakon smrti, kao i sve postmortalne rane, obično ne krvare u velikoj mjeri pa se takve krvne mrlje razlikuju od onih nastalih prskanjem krvi iz rane nanese živoj osobi. Ugrizne rane ponekad ukazuju na karakteristične tragove zuba, dok ogrebotine od kandži mogu ukazivati na veličinu šape. Ovo može omogućiti ne samo identifikaciju vrste već nekada i pojedinačne životinje. Potonje je posebno slučaj kada osoba umre u zatvorenom prostoru u kojem su također bile zatvorene životinje za koje se sumnja da su nanijele povrede na tijelu žrtve. Osim tragova zuba, dok se hrane, životinje mogu ostaviti i dlake s njuške, čije se individualne karakteristike, zajedno s ekstrahiranom DNK, mogu koristiti za identifikaciju. Sadržaj želuca kućnih ljubimaca i domaćih životinja također se može ispitati kako bi se utvrdilo jesu li se hranili tijelom, ali je rijetko moguće uhvatiti divlje ili odbjegli životinje kako bi se provela takva analiza. Veličina, oblik i distribucija tragova zuba u otisku ujeda mogu dati indikaciju veličine životinje koja ih je nanijela. Kanide i felide uvijek žvaču jednom stranom usta jer njihovi veliki očnjaci onemogućuju žvakanje s jedne na drugu stranu. Različite vrste tragova zuba obično se mogu razlikovati od oštećenja nastalih rezanjem ili piljenjem uzrokovanih različitim alatima i ne izazivaju zakošene ili koncentrične ili zrakaste frakture kao što su one uzrokovane ranama od vatrenog oružja ili traumama uzrokovanim tupim ili ostrim oruđem.

6.1.1.3 *Analiza fecesa*

Određeni broj sisara i drugih kičmenjaka proizvodi karakteristično formiran feces (izmet). Morfološka analiza izmeta može se koristiti za identifikaciju prisutnosti životinje na lokalitetu i često je provode ekolozi za praćenje brojnosti i kretanja životinja koje se rijetko viđaju uživo (npr.

zbog njihove plahovitosti ili noćnog načina života). U forenzičkom kontekstu, izmet ukazuje na prisustvo životinje (npr. tokom utvrđivanja ilegalne trgovine živim životinjama) ili aktivnost strvinarskih vrsta. Psi i druge kanide često gutaju dijelove odjeće s leša zajedno s njegovim mesom pa se vlakna odjeće posljedično mogu naći u fecesu životinje. Fragmenti kostiju, pa čak i cijeli prsti i zubi mogu proći kroz probavni sistem pasa, lisica i drugih mesoždera i izlučiti se izmetom. U slučaju strvinarenja nad skeletom malog djeteta ishod će biti drugačiji, jer su im kosti manje i slabije i lakše se razgrađuju u želucu zbog nižeg sadržaja kalcija. Prstenje i drugi nakit, posebno zlatni, proći će kroz probavni sistem uglavnom neoštećeni, ali će obično pokazivati znakove djelovanja stomačne kiseline. Stoga analiza fekalnih naslaga u blizini mjesta zločina i svih jazbina u slučajevima zločina na otvorenom može otkriti nedostajuće kosti i nakit umrlog.

Analiza izmeta pruža informacije i o zdravlju životinje i hrani koju je konzumirala. Izmet također može biti izvor DNK za potvrdu identiteta vrste ili, u nekim slučajevima, identifikaciju pojedinačne životinje. Ipak, treba imati na umu da je sigurnost identifikacije vrsta putem analize morfoloških karakteristika izmeta ograničena u zemljama s relativno velikom raznolikosti vrsta sisara. Uspješnost ove metode ograničena je i činjenicom da na oblik izmeta utiču zdravlje i veličina životinje te izloženost vremenskim prilikama, a do zabune može doći i na teritorijama gdje životinje dijele sličnu ishranu. U slučajevima kada je potrebna potvrda identifikacije, izmet ipak treba podvrgnuti analizi DNK.

6.1.1.4 *Žigosanje*

Iako se to smatra nehumanom metodom, domaće životinje kao što su goveda i konji i danas se u nekim zemljama žigošu kao sredstvo individualne identifikacije. Hladni žig smatra se humanijim od žigosanja vrućim gvožđem i dovodi do toga da na mjestu žiga rastu bijele dlake (zbog primjene tečnog azota prilikom žigosanja), a ne one normalne boje. Prednost žigosanja koju navode njegovi zagovarači je to što je jeftino, trajno i nemoguće je sakriti ili obrijati žig. Hladni žig se također može koristiti na ribama i rezultira promjenom boje krljušti. Nažalost, efikasnost žigosanja često je ugrožena lošim vođenjem evidencije i poteškoćama u prenošenju informacija između zainteresovanih strana. Osim toga, kada se životinja zakolje i skine joj se koža, sredstva za identifikaciju se gube.

6.1.1.5 Ušne markice

Prema Pravilniku o izmjenama i dopunama pravilnika o označavanju i kontroli kretanja životinja u Bosni i Hercegovini (Službeni glasnik BiH, 52/2015), obavezno je označavanje goveda, svinja, ovaca i koza na farmama putem ušnih markica. Ipak, ograničenost ove metode identifikacije životinja je u tome što se ušne markice lako uklanjaju i zamjenjuju, što olakšava krađu stoke i ilegalni transport životinja unutar i između zemalja.

6.1.1.6 Mikročipovi

Kućni ljubimci i domaće životinje visoke vrijednosti mogu imati mikročip ubrizgan ispod kože koji daje jedinstven identifikacioni broj. Čip (transponder) se očitava pomoću posebnog uređaja za skeniranje. Iako vrlo efikasna metoda kao sredstvo identifikacije, ograničenje joj je u tome što zahtijeva prisustvo cijele životinje – žive ili mrtve – i skener.

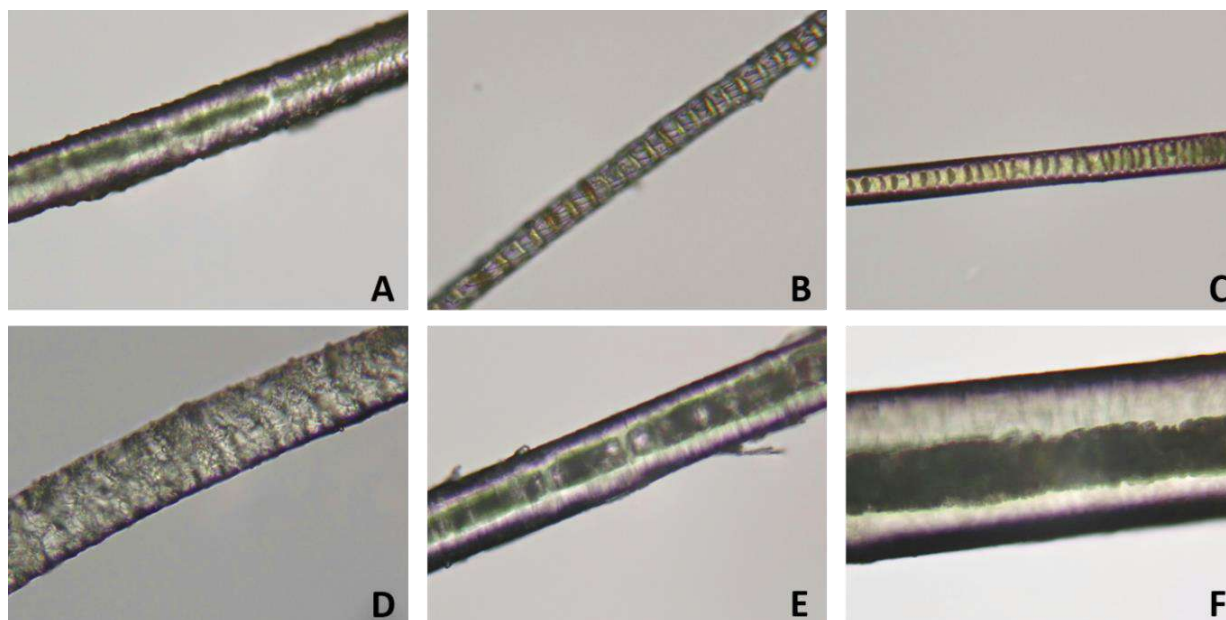
6.1.1.7 Dlake

Životinjske dlake često su karakteristične za datu vrstu i također mogu pružiti informacije o obojenosti krzna. Međutim, samo njihovo prisustvo daje slab dokaz povezanosti s bilo kojom pojedinačnom životinjom, osim ako to nije podržano drugim dokazima kao što je DNK. Dlake se razlikuju po dužini i boji između različitih dijelova tijela i to bi trebalo imati na umu prilikom prikupljanja uzoraka ili tumačenja dokaza (slika 6.3). Također treba biti svjestan činjenice da životinjske dlake mogu poticati i od krznene odjeće – ove dlake su često obojene, podrezane i nemaju korijen.

Dlaku karakterizira kombinacija spoljašnjih i unutrašnjih karakteristika. Skenirajuća elektronska mikroskopija može pružiti izuzetne detalje obrasca kutikularnih ljuskica i drugih vanjskih karakteristika dlačica zajedno s njihovim trodimenzionalnim oblicima, iako je svjetlosna mikroskopija također adekvatna za većinu analiza.

Analiza dlake svjetlosnim mikroskopom podrazumijeva postavljanje dlake na sloj vlažnog laka na predmetno mikroskopsko stakalce, pazeći da jedan kraj dlake viri izvan laka kako bi se olakšalo njeno uklanjanje. Nakon što se lak stisne, dlačica se nježno uklanja, ostavljajući za sobom svoj odljev koji se može promatrati pomoću svjetlosnog mikroskopa. Da bi se analizirao oblik dlake,

sekcije dlake se režu standardnim histološkim tehnikama. Unutrašnja struktura se otkriva postavljanjem dlake na mikroskopsko stakalce koristeći privremeni ili trajni medij i pokrivanjem pokrovnim stakalcem. Primjeri primjene životinjskih dlaka u rješavanju forenzičkih slučajeva dati su kasnije u poglavlju.



Slika 6.3. Izgled dlake različitih životinjskih vrsta pod svjetlosnim mikroskopom (40x):

A – krava, B – kunić, C – mačka, D – ovca, E – pas, F – konj

6.1.2 Molekularne tehnike u analizi kičmenjaka u animalnoj forenzici

Konvencionalne metode koje su se koristile u animalnoj forenzici uključivale su mikroskopiranje, analize na bazi proteina, izoelektrično fokusiranje i enzimsko vezani imunoapsorbirajući esej (ELISA). Do osamdesetih godina prošlog stoljeća, primjena forenzičkih protokola u analizi dokaza koji potiču od životinja uglavnom je bila ograničena na identifikaciju potencijalne porodice, roda i vrste od koje potiču krvne mrlje i dlake pronađene na mjestima zločina počinjenih na ljudima. No, kako su te analize bile zasnovane na primjeni ELISA testova i relativno nespecifičnih antiseruma te mikroskopskim komparacijama morfoloških karaktera (npr. dlake), rezultati nisu bili posebno pouzdani niti korisni u pokušaju povezivanja osumnjičenog, žrtve i mjesta zločina.

Nakon što su *Jeffreys* i saradnici 1985. godine demonstrirali učinkovitost primjene visoko ponavljajućih minisatelitnih lokusa u kreiranju individualno specifičnog humanog DNK profila,

primjena DNK analize znatno je učestala u području forenzičke nauke. Primjenom iste tehnike, ova skupina istraživača pokazala je i mogućnost dobijanja multilokusnog DNK profila mačke ili psa, što je omogućilo ekspanziju primjene DNK metodologije i u analizama uzoraka koji ne potiču od ljudi. Uobičajeni životinjski biološki uzorci koji se koriste kao izvor materijala za analize DNK u animalnoj forenzici su mišići, dlaka, koža, izmet, urin, rogovi i unutrašnji organi. Materijali kao što su krzno, perje, vuna ili tragovi životinja (otisci, pljuvačka i krv) također se mogu koristiti kao dokazni materijal. U analizi tragova animalnog porijekla podjednako se koriste molekularni markeri mitohondrijske DNK kao i jedarne (nukleusne) DNK. Pri analizi jedarne DNK analiziraju se i autosomalni i spolno vezani (X-vezani i Y-vezani) markeri. Analiza polimorfizama ovih markera može se vršiti na nivou fragmenta molekule DNK (STR markeri) ili na nivou pojedinačnih baza (SNP markeri).

6.1.2.1 *Markeri na mitohondrijskom genomu*

Odabir markera za analizu DNK zavisiće od konačnog cilja analize te količine i stanja dostupnog uzorka. Životinje, na primjer, imaju tendenciju prirodnog odbacivanja telogenih ili nerastućih dlaka koje često ne sadrže folikularni materijal. Takvi uzorci obično daju premalo nukleusnog genetičkog materijala za uspješno autosomalno STR ili SNP profiliranje. U takvim slučajevima, uspjeh analize biće vjerovatniji ako se primijene markeri na mitohondrijskom genomu. Razlog tome je veća otpornost mitohondrijske DNK (mtDNK) na degradaciju zbog postojanja visokoproteinske membrane oko mitohondrija te prisustva velikog broja ovih organela u pojedinačnim ćelijama. S obzirom na to da srodnici po ženskoj liniji imaju identičan mitohondrijski genom (uslijed matrilinearnog nasljeđivanja), obično su dva ili više nukleotidnih neslaganja potrebna za nepodudarnost ili isključenje individua. No, upravo zbog načina nasljeđivanja, mtDNK nije podesna kao marker za individualizaciju uzoraka (identifikaciju jedinki), već se obično koristi za identifikaciju vrsta, testiranje porijekla ili pripadnosti populaciji i analizu prehrambenih proizvoda.

Za potrebe identifikacije vrste često se koriste regioni mitohondrijskog genoma poput kontrolnog regiona (D-petlja, engl. *D-loop*), regiona 12S i 16S rRNK, citohrom b (*cytb*) gena, ili citohrom c oksidaze podjedinice I (*COI*) gena. Identifikaciju vrsta pomoću nukleotidnih sekvenci ovih regiona olakšava i dostupnost miliona genskih sekvenci pohranjenih u svjetskim bazama podataka, poput

BOLD,²⁶ GenBank²⁷ ili ENA,²⁸ koje se mogu koristiti za komparaciju sekvenci. Marker *cytb*, ponekad u kombinaciji s *COI*, preporučuje se u taksonomiji i identifikaciji animalnih vrsta, dok se sekvence D-petlje često koriste u slučajevima kada je potrebna diferencijacija blisko srodnih vrsta. Problemi s markerima mtDNK u forenzičkoj analizi divljih životinja mogu nastati u slučajevima analize mješovitih ili kontaminiranih uzoraka (univerzalni prajmeri ne obezbjeđuju specifičnost pa rezultati mogu biti nepouzdati), hibridnih jedinki (zbog načina nasljeđivanja mtDNK moguće je dobiti samo informaciju o majčinskoj vrsti) ili postojanja heteroplazmije (situacija u kojoj dvije ili više varijanti mtDNK postoje u istoj ćeliji).

6.1.2.2 *STR (engl. Short Tandem Repeats) markeri*

Slično kao u humanoj forenzici, nukleusni markeri DNK obično se koriste za individualnu identifikaciju životinja. Tipizacija DNK uglavnom se postiže korištenjem visoko polimorfnih kratkih tandemske ponavljajućih (STR) molekularnih markera (tzv. mikrosatelita), na osnovu jedinstvenog genetičkog profila životinje. Paneli za analizu različitih životinjskih vrsta, razvijeni na osnovu STR-ova, počivaju na njihovoj karakteristici visoke diskriminatornosti koja rezultira visokom stopom isključenja roditelja ili identifikacije. Vrijednosti vjerovatnoće isključenja (engl. *Probability of Exclusion* – PE) veće od 0,99 kod mnogih vrsta mogu se dobiti kombinacijom približno 15 polimorfnih STR markera u jednoj multilokusnoj (multipleksnoj) PCR reakciji.

Za ekonomski važne vrste životinja poput pasa, goveda i konja dostupni su i različiti komercijalni markerski kompleti koji najvećim dijelom sadrže STR markere preporučene od strane ISAG-a (tabela 6.1). Do danas, nijedan od komercijalnih kompleta za genotipizaciju životinjskih vrsta ne sadrži alelnu ljestvicu (engl. *allelic ladder*). Naime, životinjski STR lokusi su visoko polimorfni, a svaki alel ima previše varijanti da bi se napravila univerzalna alelna ljestvica. Ipak, pojedine laboratorije kreirale su alelnu ljestvicu na bazi komercijalnih kompleta koje koriste u radu s ciljem poboljšanja tačnosti i pouzdanosti analize podataka (npr. alelna ljestvica za analizu pasa). Neki komercijalni kompleti dostupni su i za analizu sobova (*COrDIS Rangifer*, *GORDIZ*) i losova (*COrDIS Alces*, *GORDIZ*), sa 16 odnosno 10 lokusa.

²⁶ <http://www.boldsystems.org>

²⁷ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

²⁸ <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>

Tabela 6.1. Pregled komercijalno dostupnih kompleta STR markera za različite vrste životinja. ISAG – International Society for Animal Genetics, FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, AKC – American Kennel Club

Naziv kompleta	Proizvodač	Broj lokusa	Preporučeni od
<i>Goveda</i>			
<i>StockMarks™ for Cattle Genotyping Kit, bovine</i>	ThermoFisher Scientific	11	ISAG
<i>Bovine Genotypes Panel 1.2 Kit</i>		12	ISAG
<i>Bovine Genotypes Panel 2.2 Kit*</i>		6	ISAG/FAO
<i>Bovine Genotypes Panel 3.1 Kit</i>		18	12 ISAG + 6 FAO
<i>COrDIS Cattle</i>	GORDIZ	15	ISAG
<i>Konji</i>			
<i>StockMarks™ for Horses 17-Plex Genotyping Kit, equine</i>	ThermoFisher Scientific	17	ISAG
<i>Equine Genotypes Panel 1.1 Kit</i>		17	9 ISAG + 8 dodatnih lokusa za testiranje roditeljstva konja
<i>COrDIS Horse</i>	GORDIZ	17	ISAG
<i>Ovce</i>			
<i>COrDIS Sheep</i>	GORDIZ	12	ISAG
<i>Svinje</i>			
<i>COrDIS PIG</i>	GORDIZ	15	ISAG
<i>Psi</i>			
<i>StockMarks™ for Dogs Genotyping Kit, canine</i>	ThermoFisher Scientific	10	AKC
<i>Canine Genotypes Panel 1.1 Kit</i>		19	ISAG
<i>Canine Genotypes Panel 2.1 Kit**</i>		19	

*Panel 2.2 je namijenjen da se koristi kao dopuna Bovine Genotypes Panel 1.2 Kit kada je potrebno analizirati više STR lokusa za rješavanje slučajeva roditeljstva.

** Ovi markeri su prošli veliku studiju razvoja i validacije i standardizovani su za upotrebu u forenzici.

Pored ovih komercijalno dostupnih kompleta, postoji čitav niz panela STR markera za različite vrste, koje su razvile istraživačke laboratorije i vladine institucije i koje se mogu koristiti u testiranju srodstva i individualizaciji poput *MeowPlex* panela razvijenog za genotipizaciju domaće mačke i drugih pripadnika porodice Felidae, forenzičkog STR panela tetranukleotidnih markera ili *DogFiler* panela za profiliranje DNK pasa u forenzičkim slučajevima.

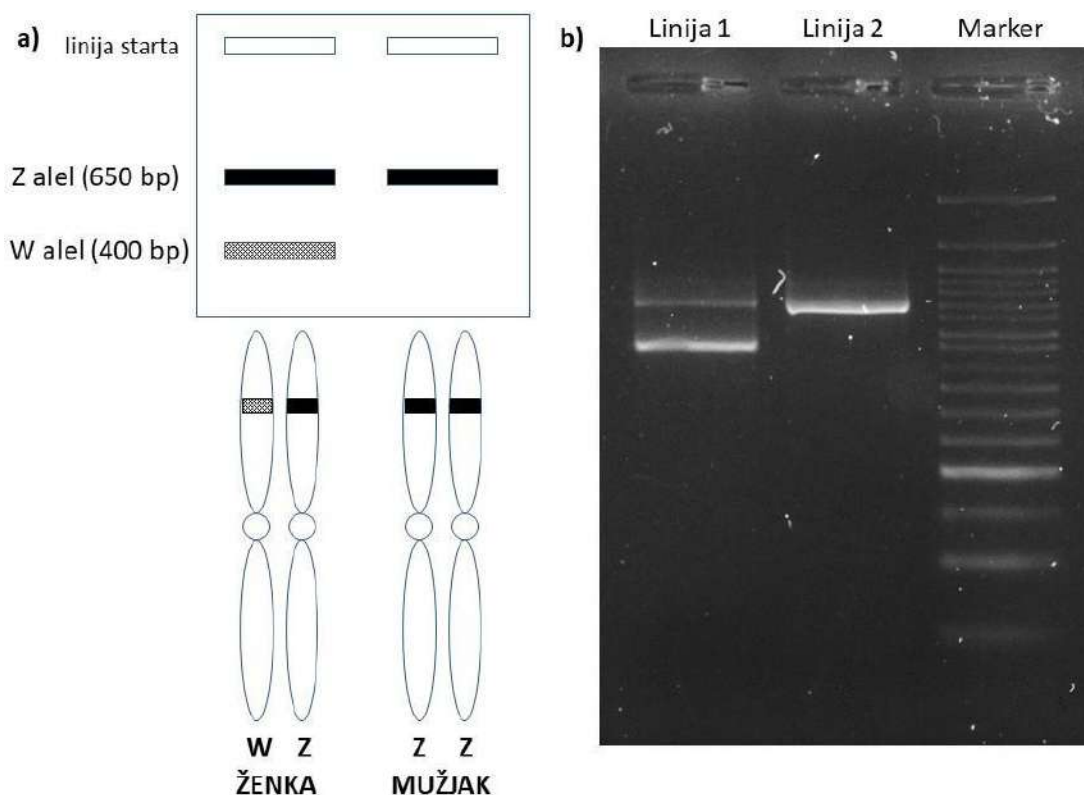
Kao i za svaki markerski sistem, i za ostvarenje punog potencijala primjene STR markera, važno je postojanje referentnih baza podataka. S obzirom na to da u nacionalnim forenzičkim bazama podataka širom svijeta postoje milioni ljudskih STR profila, ovaj tip markera još uvijek ostaje primarni alat za testiranje ljudskog identiteta. No, kada su u pitanju forenzičke animalne STR baze podataka, situacija je drugačija. Iako neke manje ili veće baze postoje, one su obično u vlasništvu laboratorija koje su ih generirale kao npr. ona CaDNAP (engl. *Canine DNA Profiling group*) grupe, i mogu biti dostupne drugim laboratorijama samo ako su postavljene na javne domene kao što je STRBase²⁹ koju održava Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (NIST) Ministarstva trgovine SAD.

6.1.2.3 Markeri na X i Y-hromosomu

Kao i markeri mtDNK, i markeri vezani za Y-hromosom nasljeđuju se samo od jednog roditelja, ali za razliku od mtDNK koja se nasljeđuje majčinom linijom, Y-vezani markeri nasljeđuju se muškom linijom. Međutim, kao i mtDNK, zbog uniparentalnog načina nasljeđivanja, analize zasnovane na markerima Y-hromosoma također imaju ograničenu korist za individualizaciju uzorka. STR markeri na spolnim hromosomima mogu biti korisni u animalnoforenzičkim analizama, međutim, i dalje nisu razvijeni za mnoge životinjske vrste. Y-hromosom sisara koristi se za identifikaciju spola, utvrđivanje očinstva i porodičnih struktura uz primjenu u forenzičkim istragama. Razvoj STR kompleta za X-hromosom pasa 2010. godine bio je obećavajući korak u ovom polju, ali, nažalost, nisu ga pratili slični radovi na drugim vrstama. U identifikaciji spola kod vrsta iz porodice mačaka uglavnom su se koristili markeri u zink-finger regionu X i Y-hromosoma (Zfx i Zfy) te amelogeninski genski region. *Pilgrim* i saradnici su analizom sekvenci domaće mačke (*Felis silvestris*), risa (*Lynx rufus*), pume (*Puma concolor*) i euroazijskog risa (*Lynx lynx*) utvrdili da region Zfy ima deleciju od 3 bp u poređenju sa Zfx. Kod domaćih mačaka, amelogeninski gen na Y-hromosomu (AMELY) ima deleciju od 20 bp u poređenju s kopijom na X-hromosomu (AMELX). Oba regiona se nalaze izvan pseudoautosomalnog regiona Y-hromosoma, a delecije u Zfy i AMELY omogućavaju identifikaciju spola. Markeri na spolnim hromosomima kod ptica uglavnom se koriste za određivanje spola, što je posebno primjenljivo kod vrsta koje ne ispoljavaju spolni dimorfizam kao što su mnoge vrste papagaja ili za analizu

²⁹ <https://strbase.nist.gov/index.htm>

veoma mladih jedinki. Spolni hromosomi (Z i W) ptica razlikuju se od onih kod sisara, jer su ženke ptica heterozigotne (ZW), a mužjaci homozigotni (ZZ). Spolna identifikacija zasniva se na razlici u veličini introna hromodomen helikaza DNK-vezujućeg gena (CHD) između Z i W-hromosoma. Amplifikacija CHD genskog segmenta kod muških ptica proizvodi samo jedan amplikonski fragment (~650 bp), dok kod ženki daje dva fragmenta (~650 bp i 400 bp), koji se veličinski razlikuju zbog razlika u dužini amplificiranih introna (slika 6.4).



Slika 6.4. a – šematski prikaz dijagnostičkih fragmenata CHD regiona na W i Z hromosomima kod ptica (prilagođeno iz Purwaningrum et al., 2019), b – rezultat elektroforetskog razdvajanja amplikona CHD regiona kod papagaja. Linija 1 – ženka, linija 2 – mužjak, marker – 50 bp DNA Ladder (NEB)

6.1.2.4 Polimorfizam jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism – SNP)

Uzevši u obzir dobro uspostavljen, validiran, standardiziran i ekonomičan proces primjene STR markera u humanoj forenzici, malo je vjerovatno da će ovaj tip markera izgubiti primat nad SNP markerima u skorijoj budućnosti u oblasti forenzičkih analiza humanih uzoraka. Međutim, ovaj scenarij mogao bi biti drugačiji kada je u pitanju animalna forenzika, posebno imajući u vidu nepostojanje velikih nacionalnih baza podataka za sve životinjske vrste koje mogu biti predmet forenzičke analize. Tome svakako doprinosi i kontinuiran tehnološki razvoj sekvencera nove generacije (engl. *Next-Generation Sequencers* – NGS) i njihova sve veća dostupnost većem broju laboratorija. Stotine SNP-ova sada se mogu genotipizirati po otprilike istoj cijeni kao STR genotipizacija, a SNP genotipizacija je pogodnija za robotsku automatizaciju, koja može povećati efikasnost i tačnost testiranja. Za SNP-ove, smanjena varijabilnost (dva alela na SNP lokusu naspram potencijalno mnogo alela na STR lokusu) rezultira nižom snagom rezolucije, što znači da je potrebno više SNP-ova da bi se obezbijedila ista diskriminirajuća moć u analizi roditeljstva u poređenju sa STR panelom. S obzirom na to da neke studije ukazuju na to da je razina informativnosti SNP markera adekvatna onoj STR-a (između dva i tri SNP markera u odnosu na jedan STR lokus postižu ekvivalentnu moć isključenja kod goveda), moguće je da će informativni SNP paneli polako zamijeniti STR markere u animalnim forenzičkim analizama.

Prelazak na primjenu SNP markera u utvrđivanju roditeljstva i identifikaciji ekonomski važnih vrsta aktuelna je tema, a u toku je razvoj panela za mnoge vrste. Kompanija *Illumina* već je razvila nekoliko SNP panela za testiranje roditeljstva kod goveda, poput *TruSeq® Bovine Parentage Sequencing Panel*, koji sadrže SNP-ove preporučene od strane ISAG-a. No, niti jedan od ovih panela do sada nije validiran za forenzičke svrhe. Kao i kod svih ranije razvijenih tehnologija, i ovdje je glavno pitanje koliko je markera potrebno uključiti u analizu srodstva da bi se dobila velika vjerovatnoća da je prijavljeno roditeljstvo tačno. Za testiranje roditeljstva, ISAG preporučuje SNP panel od 100 SNP (ISAG100) za koji je prijavljena vjerovatnoća isključenja roditelja (PE) >0,999, dok ISAG200 panel (200 SNP) ima PE >0,9999999.³⁰ Mnoge grupe širom svijeta prvenstveno ili samo koriste ISAG100 ili ISAG200 panel za početnu validaciju goveđeg roditeljstva, a neke grupe koriste i manji broj SNP markera. Ipak, neke studije su pokazale da

³⁰ <http://www.isag.us/>

korištenje SNP panela niže gustine kao što su ISAG100 i ISAG200 može rezultirati lažno pozitivnim validacijama u analizama velikih populacija i predlažu primjenu mnogo većeg broja SNP markera (≥ 500) i uspostavu dobro razvijene metodologije kontrole kvalitete. S ciljem standardizacije genotipizacije i panela genetičkih markera za identifikaciju mačaka, ISAG je 2019. godine proveo komparativno testiranje 121 SNP markera na 20 uzoraka DNK. Različite univerzitetske i komercijalne laboratorije u testiranju su primijenile različite tehnologije genotipizacije SNP-a, uključujući DNK čipove (engl. *DNA array*), genotipizaciju sekvenciranjem (engl. *genotyping-by-sequencing*) i masenu spektrometriju. Kao rezultat ove standardizacije, odabran je robustan i efikasan panel od 101 SNP-a kao osnovni ISAG panel za mačke. SNP-ovi su raspoređeni na svim hromosomima, uključujući dva na X-hromosomu i XY pseudoautosomalni spolni marker (zinc-finger XY; ZFX), a utvrđena PE vrijednost je $>0,9999$. S novim podacima o SNP-ovima za dodatne pasmine i populacije mačaka, preporučuje se razvoj sekundarnog panela koji bi pomogao u prevazilaženju problema u vezi s testiranjem roditeljstva u populacijama s visokom stopom parenja u srodstvu. Za forenzičke aplikacije, posebno bi vrijedno bilo razvijanje SNP panela s mitohondrijskim markerima, što bi omogućilo i analizu degradiranih uzoraka. Zbog svojih osobina (niska stopa mutacija između generacija; robusna interpretacija podataka; mogućnost automatizacije analize visoke propusnosti; mogućnost standardizacije prikaza rezultata genotipizacije) i stalnog tehnološkog razvoja u molekularnoj biologiji, SNP markeri će sigurno naći svoje mjesto i u forenzičkim animalnim analizama u doglednoj budućnosti.

6.1.3 Hemijske tehnike u analizi kičmenjaka u animalnoj forenzici

6.1.3.1 Rendgenska difrakcija

Difrakcija rendgenskih zraka zasniva se na mjerenju rasipanja (difrakcije) snopa X-zraka nakon što udari u uzorak. To je nedestruktivna tehnika i može otkriti ne samo kristalnu strukturu uzorka već i detalje o njegovom hemijskom sastavu i fizičkim svojstvima. Tehnika zahtijeva samo male količine materijala, a uzorak se analizira kao pojedinačni kristal ili prah. U forenzičkom kontekstu, uzorci su gotovo uvijek u obliku praha. Potrebna količina uzorka zavisi od mašine, prirode uzorka i vrste potrebnih informacija (manje od 1 μg do nekoliko mg). Ako uzorak sadrži mnogo različitih komponenti i potrebno ih je pojedinačno identificirati, onda je za analizu potrebno više materijala. Obično se koristi za analizu boja, tla, lijekova, metaka i ostataka metaka, metala, praha za koji se

sumnja da sadrže spore antraksa i sl. Rezultati se obično prikazuju kao obrazac vrhova i depresija koji se naziva difraktogram. Difraktogram predstavlja broj fotona rendgenskog zračenja kao funkciju ugla difrakcije. Difrakcija X-zraka može se, na primjer koristiti za razlikovanje roga nosoroga od roga drugih vrsta ili razlikovanje slonovače od jelenskih rogova. Na primjer, difraktogrami dobijeni analizom uzorka s poznatog roga nosoroga mogu se usporediti s onima nepoznatog da bi se utvrdila njihova sličnost.

6.1.3.2 *Analiza stabilnih izotopa*

Analiza omjera izotopa u tkivima kičmenjaka zasniva se na činjenici da se hemijske karakteristike tla na kojem životinja živi odražavaju na koncentracije hemijskih spojeva i njihovih izotopa prisutnih u dlaci, kostima i zubima životinje. Ovom metodom moguće je, recimo, identificirati geografsko porijeklo materijala i predmeta izrađenih od životinjskih tkiva poput slonovače i kosti. Međutim, da bi metoda bila potpuno učinkovita, potrebna je sveobuhvatna baza podataka hemijskih karakteristika tla iz onih dijelova svijeta za koje se smatra da životinja potječe. Stabilni omjeri izotopa također se mogu koristiti za razlikovanje ribe iz uzgoja od one iz divljih voda. Riba iz uzgoja često se hrane peletima koji sadrže visoke razine proteina i masti dobijenih od drugih riba, dok divlje jedinke u prirodi imaju raznovrsniju i manje koncentriranu ishranu. Shodno tome, uzgojene ribe imaju tendenciju da imaju više razine ^{13}C i ^{15}N u svojim tkivima, što omogućava njihovo razlikovanje od divlje ribe.

6.1.3.3 *Analiza hemijskog sastava tkiva*

Ponekad na hemijski sastav životinjskih tkiva (npr. na udio masnih kiselina i mineralni sastav riba) utiče ishrana, što se može koristiti za identifikaciju okolnosti pod kojima je životinja uzgajana. Ovo je važno jer se obično vjeruje da je divlja ulovljena riba hranljivija i boljeg okusa i nije neobično da se takva riba prodaje i do duplo skuplje od uzgojene ribe. Istraživanje profila masnih kiselina i omjera izotopa $^{13}\text{C} : ^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N} : ^{14}\text{N}$ i $^{18}\text{O} : ^{16}\text{O}$ provedeno između 2005. i 2006. godine u Ujedinjenom Kraljevstvu na uzorcima riba kupljenih u supermarketima i trgovinama širom zemlje otkrilo je da između 10 i 15% analiziranih uzoraka koji se prodaju kao “divlji” definitivno potiče iz ribogojilišta. Slične brige odnose se i na označavanje domaćih životinja i usjeva iz slobodnog i organskog uzgoja.

6.1.4 Statistički parametri koji se koriste u animalnoj forenzici

U animalnoj forenzici, kao i u humanoj forenzici, snagu DNK dokaza treba procijeniti korištenjem rigoroznog statističkog pristupa prije nego što se dokaz može smatrati prihvatljivim za korištenje u sudskom procesu. Stoga su za ovaj zadatak ključne referentne populacijske baze podataka jer pružaju mogućnost izračuna alelnih frekvencija i drugih genetičkih parametara potrebnih za izračunavanje snage isključenja (engl. *Power of Discrimination* – PD), vjerovatnoće identiteta (engl. *Probability of Identity* – P_{ID}), vjerovatnoće slučajnog podudaranja (engl. *Random Match Probability* – RMP), očinstva i indeksa srodstva. Snaga isključenja (PD) je mjera koja pokazuje snagu markera ili seta markera da razlikuju bilo koje dvije jedinke odabrane nasumično iz populacije. Procjena P_{ID} važna je radi izračuna vjerovatnoće da će dvije individue izvučene nasumično iz populacije imati identične multilokusne genotipove po principu slučajnosti. Dodatno je uz ove analize uputno uraditi i procjenu da li broj odabranih lokusa korištenih u analizi daje prihvatljivo nisku P_{ID} vrijednost za analiziranu populaciju, čime se postiže dovoljna diskriminatorska moć za identifikaciju jedinki tokom forenzičke analize.

U animalnoj forenzici potrebno je uzeti u obzir još jedan parametar, a to je parenje u srodstvu (engl. *inbreeding*). Naime, u humanoj populaciji inbriding je nizak i igra zanemarljivu ulogu u forenzičkim formulama za izračun vjerovatnoće podudaranja. Međutim, u sistemu parenja divljih i domestificiranih vrsta efekat osnivača (engl. *founder effect*) i mala veličina populacije mogu značajno uticati na nivoe inbridinga, stoga je u animalnoj forenzici potrebno uključiti procjenu koeficijenta inbridinga (F_{IS}) u izračunavanje parametara za procjenu težine DNK dokaza.

6.1.5 Izazovi i preporuke u animalnim forenzičko-genetičkim istraživanjima

Iako se isti markerski sistemi poput STR, SNP i mtDNK uporedo koriste u analizi ljudskog i životinjskog materijala, postoje značajne razlike u njihovoj primjeni u humanoj i animalnoj forenzici. Da bi bili prihvatljivi kao dokazi u sudskom postupku, dokazi prikupljeni i obrađeni u laboratorijama koje provode animalnoforenzičke analize moraju odgovarati standardima kvalitete dokaza generiranih iz humanih uzoraka. To prije svega uključuje programe osiguranja kvalitete (engl. *quality assurance*) i kontrole kvalitete (engl. *quality control*), kao i postojanje standardnih operativnih protokola te priručnika o kvaliteti, kontroli, upravljanju, obuci i testiranju.

Jedan od najvećih izazova s kojima se laboratorije suočavaju u postizanju ovih osnovnih ciljeva jeste broj različitih vrsta koje se susreću u animalnoj forenzici u poređenju sa samo jednom vrstom koja je predmet analize u humanim forenzičkim testiranjima. Genetički markeri i softverski programi koji se koriste za analizu podataka u animalnoj forenzici također su raznovrsniji i rijetko su standardizirani među vrstama, dok se u forenzičkoj identifikaciji ljudi mogu koristiti samo standardizirani i validirani analitički protokoli. Stoga su na osnovu zaključaka radionice Stalnog komiteta za forenzičku genetiku životinja Međunarodnog društva za forenzičku genetiku ISAG (*International Society for Animal Genetics*) iz 2004. godine, Budowle i saradnici (2005) dali set minimalnih smjernica za: (i) evaluaciju podataka, nomenklaturu i označavanje alela te statističku analizu u forenzičkoj STR analizi; (ii) obradu predmeta, dosjea i izvještavanje i (iii) laboratorijsku validaciju i testiranje stručnosti za laboratorijsko osoblje.

Cilj ovog skupa smjernica jeste osiguranje tačnosti, preciznosti i ponovljivosti forenzičke analize uzoraka i poboljšanje laboratorijskog rada. Nadogradnju ovih smjernica dali su Linacre i saradnici 2011. godine kao rezultat zaključaka s 23. konferencije Međunarodnog društva za forenzičku genetiku ISFG (*International Society for Forensic Genetics*) (tabela 6.2).

Početkom 2013. godine, Naučna radna grupa za forenzičku nauku o divljim životinjama (*the Scientific Working Group for Wildlife Forensic Science* – SWGWILD) izradila je skup konsenzusnih standarda i smjernica za pravilno rukovanje fizičkim dokazima, kao i korištenje genetičkih i morfoloških tehnika u zločinima protiv divljih životinja (SWGWILD, 2013). Konačno, Evropska mreža institucija forenzičke nauke (*European Network of Forensic Science Institutions*, ENFSI) izdala je 2015. godine Priručnik najbolje prakse za primjenu molekularnih metoda za forenzičko ispitivanje bioloških tragova koji ne potiču od ljudi.

6.1.6 *Primjena animalne forenzike u slučajevima u kojima su životinje pasivni svjedoci zločina*

Slučajevi u kojima su životinje tzv. pasivni svjedoci zločina uglavnom podrazumijevaju slučajeve kada ljudska DNK nije dostupna kao dokaz (npr. kada počinitelji zločina posvete posebnu pažnju da uklone ili ne ostave iza sebe vlastite biološke tragove) ili nije jednostavno primjenljiva kao dokaz (poput slučajeva prevara u trgovini, farmaciji i drugim sektorima).

Tabela 6.2. Preporuke za dobru laboratorijsku praksu u animalnoforenzičkim studijama prema Linacre i sar. (2011)

Preporuka br. 1	<i>Iste procedure za osiguranje integriteta i sljedivosti dokaza trebale bi se primijeniti u prikupljanju i ispitivanju životinjskih uzoraka kao što se poduzimaju za bilo koju drugu forenzičku istragu.</i>
Preporuka br. 2	<i>Studije validacije nepripitomljenih vrsta trebale bi koristiti uzorke vaučera gdje je to moguće. Ako to nije moguće, potrebno je opravdati tip uzorka koji se koristi.</i>
Preporuka br. 3	<i>Izbor lokusa koji se koriste u identifikaciji vrsta, kao što su, ali ne isključivo, mitohondrijski geni cytb, COI i region D-petlje, treba biti opravdan na osnovu sposobnosti da se identifikuju nepoznate vrste među onima koje su bliski genetički srodnici.</i>
Preporuka br. 4	<i>Nukleotidna sekvenca i mapa koja pokazuje lokaciju prajmera koji se koriste u ispitivanju vrsta moraju biti javno dostupni ili upućivati na prethodno objavljen članak.</i>
Preporuka br. 5	<i>Potrebno je napraviti intraspecijske i interspecijske studije za svaki novi set prajmera koji se koristi u identifikaciji vrsta. Potrebno je obezbijediti proces validacije testa, uključujući, ali ne isključivo, studije o osjetljivosti, specifičnosti, reproducibilnosti i miješanim uzorcima.</i>
Preporuka br. 6	<i>Prajmere koji se koriste za amplifikaciju polimorfne DNK treba testirati kako bi se osigurala specifičnost i reproducibilnost i trebali bi biti javno dostupni.</i>
Preporuka br. 7	<i>Ako se za individualizaciju koriste polimorfni lokusi zasnovani na tandemsom ponavljanju, prvenstveno bi se trebali koristiti tetramerni STR markeri.</i>
Preporuka br. 8	<i>Sekvenciranje alelna ljestvice je neophodno za precizno označavanje alela i treba ih koristiti u svim STR tipizacijama. Osnova za izvještavanje o rezultatima bi trebao biti broj ponavljanja, a ne koristiti samo veličinu zasnovanu na broju parova baza bilo kojeg testiranog uzorka.</i>
Preporuka br. 9	<i>U testiranju srodstva, treba procijeniti vjerovatnoće mutacije STR alela ako se uoče, ili barem treba uzeti u obzir vjerovatnoću da se dogodi mutacijski događaj kada postoji genetička nedosljednost na jednom ili nekoliko lokusa dok svi ostali lokusi pokazuju genetičku konzistentnost.</i>
Preporuka br. 10	<i>Treba procijeniti relevantne populacijske i forenzičke genetičke parametre uključujući učestalost (frekvencije) alela.</i>
Preporuka br. 11	<i>Faktor srodstva treba odrediti i primijeniti u svakom proračunu. Vrsta primijenjenog faktora srodstva treba biti jasno navedena te dato opravdanje za primijenjeni faktor.</i>
Preporuka br. 12	<i>Treba voditi sveobuhvatan spis predmeta. Pristup omjera vjerovatnoće je preporučeni način za procjenu težine dokaza, uzimajući u obzir više od jedne tvrdnje.</i>
Preporuka br. 13	<i>Potrebno je izvršiti akreditaciju laboratorije ako će rutinski provoditi DNK testiranje animalne DNK za određenu svrhu.</i>

6.1.6.1 *Životinje kao pasivni svjedoci u slučajevima ubistava ili nasilnih zločina*

Zbog nečega što stručna literatura naziva “CSI efekat”, odnosno činjenice da je medijska popularizacija forenzičke nauke uslovila da šira javnost upozna osnovne postulate forenzičke analize, i počinitelji zločina postali su itekako svjesni “snage” bioloških tragova. Stoga u pojedinim slučajevima posvete posebnu pažnju da iza sebe ne ostave vlastiti inkriminirajući biološki materijal koji bi kasnije mogao poslužiti kao izvor DNK u forenzičkoj analizi. Međutim, skoncentrirani na vlastiti biološki trag, nesvjesno sa sobom “ponesu” jedan drugi tip dokaza koji ih kasnije može dovesti u vezu sa žrtvom ili mjestom zločina – životinjski biološki materijal. Naime, prema podacima za 2020. godinu, broj domaćinstava u Evropi s jednim ili više kućnih ljubimaca dosegao je 88 miliona (38%). Procjena navodi da s ljudima u evropskim domovima obitava oko 110 miliona mačaka, 90 miliona pasa, 52 miliona ptica, 30 miliona malih sisara, 15 miliona akvarija i 9 miliona reptila. Za istu godinu, podaci su pokazali da 63,4 miliona domaćinstava u SAD ima psa, a 42,7 miliona makar jednu mačku. Zbog stalnog odbacivanja dlake i obnavljanja krzna, ovaj tip biološkog materijala nalazi se gotovo posvuda u takvim domaćinstvima, pa je gotovo nemoguće izbjeći kontakt s njim, bilo primarnim ili sekundarnim prijenosom (transferom). Pored dlaka, biološki materijal koji se može nesvjesno prenijeti na odjeću i obuću čovjeka jeste slina, izmet i drugo. Uzevši u obzir da najveći procenat kućnih ljubimaca otpada na pse i mačke, jasno je da su ove životinje i najčešći pasivni svjedoci u kriminalističkim slučajevima. Okviri ovog poglavlja svakako nisu dovoljni da bi obuhvatili sve slučajeve u kojima je ovaj tip dokaza bio ključan ili makar veoma važan u njihovom rješavanju, ali dosta dobar pregled dao je Kanthaswamy 2015. godine. U nastavku će, pak, biti opisan slučaj koji je postavio pravni presedan za uvođenje automatizirane STR genotipizacije dlaka kućnih ljubimaca u forenzičkim slučajevima – slučaj mačke Snowball.

6.1.6.1.1 Slučaj Snowball

Slučaj se odnosio na 32-godišnju ženu koja je 3. oktobra 1994. nestala iz svog doma u Richmondu, na Ostrvu princa Edvarda u Kanadi. Njen napušteni automobil otkriven je za nekoliko dana, a pokazalo se da krv pronađena unutra odgovara žrtvi. Tri sedmice kasnije, 8 km od žrtvine kuće, u šumi je otkrivena muška kožna jakna umrljana krvlju žrtve, u čijoj postavi je pronađeno nekoliko bijelih dlaka domaće mačke. Tijelo žrtve je otkriveno u plitkoj grobnici 6. maja 1995. godine, a

žrtvin bivši partner je uhapšen i optužen. Osumnjičeni je živio s roditeljima i kućnom mačkom pasmine bijela američka kratkodlaka po imenu Snowball. Komparativna analiza DNK profila na 10 STR markera dobijenih iz dokaznog materijala i iz nespornog uzorka krvi Snowballa, kao i statistički parametri, pokazali su da dlaka nađena u postavi jakne blizu mjesta zločina zaista pripada mački Snowball. Na osnovu rezultata analize predstavljenih Vrhovnom sudu Ostrva princa Edvarda, porota je optuženog osudila za drugostepeno ubistvo 19. 7. 1999. godine.

6.1.6.1.2 Slučaj Bird

Bjeloćubi kakadu (*Cacatua alba*) po imenu Bird pripadao je Kevinu Butleru iz Dallasa u Texasu, koji je ubijen tokom pljačke u svojoj kući na Badnje večer 2001. godine. Kako je istraga kasnije pokazala, tokom borbe između napadača i žrtve, Bird je nasrnuo na napadača i raskrvario ga u pokušaju da odbrani svog vlasnika. Napadač je rukom obrisao krv, a zatim dodirnuo prekidač za svjetlo, ostavljajući ključne DNK dokaze na mjestu zločina. DNK dokazi pronađeni su i na kljunu i kandžama kakadua, te na dva krvava noža pronađena na mjestu događaja. Tokom uviđaja, papagaj je također pronađen mrtav, proboden viljuškom, a nedostajala mu je i jedna noga. Za ubistvo su osumnjičeni Daniel Torres i Johnny Serna, koji je bio bivši zaposlenik u kompaniji za izgradnju bazena gospodina Butlera, s kojim je bio u svađi. Obojica osumnjičenika poricala su bilo kakvu umiješanost u zločin dok rezultati forenzičke analize DNK nisu pokazali podudaranje DNK profila dobijenog iz dokaza prikupljenih s Birdovog kljuna i uzorka uzetog od Torresa nekoliko mjeseci ranije. Obojica osumnjičenih osuđeni su na doživotni zatvor. Iako je na mjestu zločina nađeno dovoljno drugih dokaza koji bi osigurali presudu, dokazi koji su dobijeni zahvaljujući tome što se Bird umiješao u borbu svakako su imali važan značaj u istrazi.

6.1.6.2 Životinje kao pasivni svjedoci u slučajevima privrednih prevara

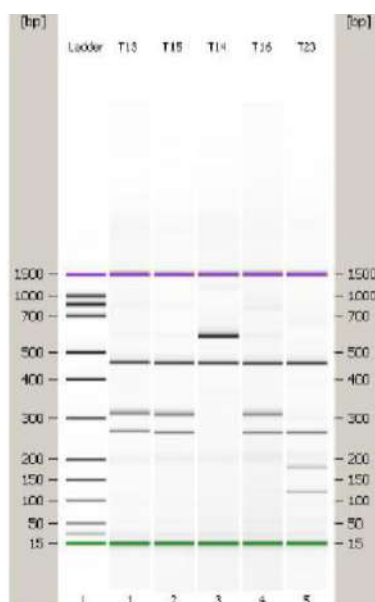
Pored kategorije nasilnih zločina, postoji čitav niz slučajeva koji mogu biti predmetom sudskog spora u kojima životinje mogu biti pasivni svjedoci, poput slučajeva raznih prevara u različitim privrednim sektorima (trgovina, farmacija, ribarstvo, sport – doping itd.). U ovu skupinu, po svojoj prirodi, spada i primjena životinjske DNK u kontroli porijekla i sastava prehrambenih proizvoda, ali će oni u ovom poglavlju biti zasebno opisani.

6.1.6.2.1 Slučaj prevare u sektoru akvakulture

U Laboratoriju za molekularnu genetiku prirodnih resursa (LMG) Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu došao je zahtjev od jednog ribogojilišta u Hercegovini za provjeru autohtonosti riblje mlađi potočne pastrmke (*Salmo trutta* L.) kupljene od jednog dobavljača. Dobavljač im je datu riblju mlađ prodao uz izjavu da se radi o ribi autohtonog neretvanskog genetičkog porijekla koja je podesna za poribljavanje neretvanskog sliva u Bosni i Hercegovini. Da bi provjerili dati navod i opravdanost vlastitog finansijskog ulaganja, obratili su se LMG-u sa zahtjevom da se izvrši molekularnogenetičko testiranje. Istraživači LMG-a primijenili su jednostavnu metodu PCR – RFLP za traženu analizu mlađi. PCR – RFLP predstavlja metodu detekcije polimorfizma homolognih sekvenci DNK, na osnovu prisustva ili odsustva fragmenata različite veličine, nakon digestije molekule DNK specifičnim restrikcijskim enzimima. Metoda podrazumijeva umnožavanje dijela sekvence DNK od interesa metodom PCR i korištenjem specifičnih prajmera, a potom restrikciju (siječenje) amplikona odgovarajućim endonukleazama tipa II. Ovi enzimi prepoznaju specifična mjesta u sekvenci i cijepaju lanac na tačno određenom i unaprijed poznatom mjestu (tzv. restrikcijska mjesta). Stoga promjene u sekvenci DNK, uslijed indela (INsercija / DElecija), supstitucija baza ili rearanžmana koji uključuju restrikcijska mjesta, mogu rezultirati nastankom, gubitkom ili relokacijom restrikcijskog mjesta. Kao rezultat digestije nastaje niz restrikcijskih fragmenata, čiju je veličinu moguće odrediti metodom elektroforeze, uz vizualizaciju adekvatnim bojenjem. Broj i veličina nastalih fragmenata variraju između individua, populacija i vrsta, na čemu se i zasniva njihova upotreba u molekularnogenetičkim istraživanjima. Na osnovu rezultata sekvenciranja kontrolnog regiona potočne pastrmke koje je napravio Bernatchez sa saradnicima, Giuffra i saradnici su identificirali dijagnostička restrikcijska mjesta, te pokazali da je digestivnom aktivnošću endonukleaznog enzima *AluI* moguće jasno diferencirati četiri haplotipa mtDNK karakteristična za pojedine evolutivne linije potočne pastrmke (dunavski / atlantski / mediteranski i jadranski / neretvanski), glavatice (*marmoratus*) i mekousne pastrmke (*obtusirostris*). Ova četiri haplotipa jasno se međusobno razlikuju prema broju restrikcijskih fragmenata i njihovoj veličini (tabela 6.3, slika 6.5).

Tabela 6.3. Procijenjena veličina fragmenata (bp) haplotipova različitih evolutivnih linija salmonida (Da – dunavska linija, At – atlantska linija, Me – mediteranska linija, AdN – jadranska / neretvanska linija, Ma – marmoratus linija, Ob – obtusirostris linija)

Da/At/Me	AdN	Ma	Ob
	563	563	
464	464		464
		413	
311			
252			252
			182
			129



Slika 6.5. Pojedinačni haplotipovi kontrolnog regiona mtDNK različitih evolutivnih linija salmonida analizirani metodom elektroforeze na Agilent 2100 Bioanalyzeru (Agilent Technologies, SAD) uz korištenje DNA 1000 kit (Agilent Technologies, SAD). Linije 1, 2 i 4 – Da/At/Me haplotip; linija 3 – AdN haplotip; linija 5 – obtusirostris (Ob) haplotip; L – DNK veličinski marker

Od slučajno odabranih jedinki iz populacije riblje mlađi, istraživači LMG-a uzorkovali su tkivo za analizu DNK uzimajući manji odsječak trbušnog peraja (biopsija) od živih riba, vodeći računa da se ne odsijeca peraje blizu korijena (slika 6.6).

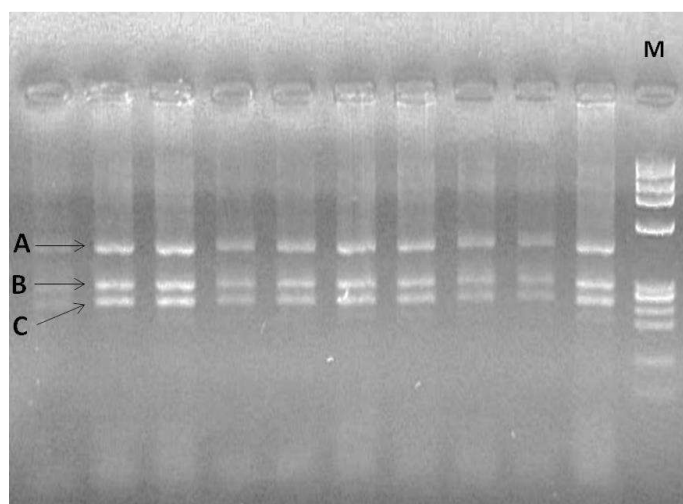


Slika 6.6. Uzorkovanje tkiva trbušnog peraja ribe

Tako tretirana peraja ne predstavljaju smetnju ribi pri plivanju, a u prirodnim uvjetima peraja se uspješno regeneriraju. Jedinke su obrađivane pojedinačno, kako ne bi došlo do miješanja sluzi i unakrsne kontaminacije uzoraka, s obzirom na to da i sluz sadrži DNK. Između svake biopsije, disekcioni pribor je brižljivo čišćen rastvorima varikine i alkohola, a potom i vodom. Nakon izolacije DNK, umnožavanja kontrolnog regiona mtDNK i digestije restrikcijским enzimom *AluI*, uzorci su analizirani metodom agarozne gel-elektroforeze. Rezultati su pokazali da su sve analizirane jedinke imale haplotip Da/At/Me (slika 6.7).

Literaturni podaci ukazuju na to da je AdN haplotip potočne pastrmke autohton za neretvanski sliv u Bosni i Hercegovini, dok je Da/At/Me linija strana (alohtona) i ne bi se smjela unositi u prirodne habitate. Uzimajući u obzir dobijene rezultate analize mlađi, utvrđeno je da izjava dobavljača nije bila tačna te da je ribogojilište kupilo mlađ potočne pastrmke koja je zbog svoje genetičke strukture neprikladna za poribljavanje bilo kojeg vodotoka unutar neretvanskog sliva, što za sobom povlači finansijski gubitak za dato ribogojilište.

Ovdje svakako treba napomenuti da je zbog osobina mitohondrijskog genoma (uniparentalni način nasljeđivanja i skoro potpuni izostanak rekombinacija) bilo potrebno izvršiti dodatne analize primjenom nukleusnih markera kako bi se utvrdilo da li su analizirane jedinke pripadnici “čiste” evolutivne linije ili se pak radi o križancima (hibridima). No, i ovaj prvi korak u analizi bio je dovoljan za donošenje zaključka da prvobitna izjava dobavljača nije bila tačna.



Slika 6.7. Rezultati analize kontrolnog regiona mtDNK kod spornih uzoraka mladi. A – alel 464 bp, B – 311 bp, C – alel 252 bp, M – veličinski DNK marker (DNA Molecular Weight Marker IX, 72-1353 bp, Roche)

6.1.7 Primjena animalne forenzike u slučajevima u kojima su životinje žrtve zločina

6.1.7.1.1 Slučaj krivolova divljih životinja

Globalni izvještaj *Living Planet Index* (WWF, 2020) pokazuje prosječan pad u veličini populacija sisara, ptica, vodozemaca, gmizavaca i riba od 68% između 1970. i 2016. godine. Od različitih antropogenih pritisaka koji dovode do smanjenja veličine populacija divljih životinja, posebno je značajan krivolov zaštićenih i ugroženih vrsta te svih vrsta tokom perioda zabrane lova (koja se obično poklapa s periodom parenja životinja). Ilegalni lov i krijumčarenje divljih životinja uglavnom se provodi zbog prodaje životinja, bilo zbog njihove medicinske vrijednosti ili trofejne vrijednosti ukrasnih dijelova tijela.

Kako bi se zaustavio ovaj negativni trend, donesen je čitav niz nacionalnih i međunarodnih zakona i propisa, poput Konvencije o zaštiti evropskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Bernska konvencija) i Konvencije o međunarodnoj trgovini ugroženim vrstama divljih životinja i biljaka (CITES), koje je ratificirala i Bosna i Hercegovina. Nažalost, praksa pokazuje da ugrožene životinjske vrste nisu izuzete od ilegalnog lova čak ni kada se nalaze u zaštićenim područjima i rezervatima. Ilegalno ulovljene životinje često se krijumčare i prodaju u različitim amorfnim oblicima: kao usitnjeno meso, štavljena koža, kosti i rogovi, proizvodi od slonovače i slično, što

čini identifikaciju na osnovu morfoloških karakteristika neizvodljivom. Posebno u ovom kontekstu, analiza na bazi DNK pruža dosta pouzdan i brz sistem identifikacije na nivou vrste. No, iako su analize DNK danas vrlo precizne, molekularna forenzika divljih životinja i dalje je složena. S obzirom na to da su predmet forenzičkih slučajeva koji uključuju divlje životinje najčešće zaštićene i rijetke vrste, pribavljanje reprezentativnih genetičkih populacijskih podataka za uspostavu referentnih baza podataka dosta je otežano. No, ako su zadovoljene sve pretpostavke (set informativnih molekularnih markera, referentna baza podataka, primjena odgovarajućih statističkih modela), analiza DNK predstavlja moćan alat u krivičnom postupku kao što je jasno iz primjera istrage krivolova zaštićene vrste sardinskog muflona korištenjem STR profiliranja. U pokrajini Ogliastra na Sardiniji u Italiji, šumarski službenici su prilikom rutinske kontrole u cilju suzbijanja krivolova zaustavili lokalnog uzgajivača ovaca. U njegovom su vozilu otkrili leš životinje sakriven iza vozačkog sjedišta, ali u vozilu nisu našli oružje. S leša su bili uklonjeni koža, iznutrice i svi ostali dijelovi lešine koji su mogli pomoći da se otkrije o kojoj vrsti životinje se radi. Tokom ispitivanja, uzgajivač je tvrdio da se radi o lešu jedne od njegovih ovaca koja je slučajno uginula. Službenici su zaplijenili leš, zadržali osumnjičenog i vratili se s njim u tor da traže dokaze koji bi potvrdili ili opovrgli njegove izjave. Na istraživanom lokalitetu pronašli su tragove svježe krvi pomiješane sa zemljom na kamenju, lišću i grančicama. Leš i prikupljeni dokazi su dostavljeni laboratoriji na obdukciju i molekularnu analizu. Obdukcijom su otkriveni tragovi prostrelnih rana na lešini. Referentna baza podataka za izračunavanje alelnih frekvencija napravljena je analizom pune krvi od 96 ovaca s nekoliko farmi na Sardiniji te 58 tkivnih uzoraka muflona prikupljenih tokom godina od slučajno uginulih životinja i od živih jedinki tokom veterinarskih pregleda. Svi uzorci korišteni za uspostavu referentne baze podataka kao i sporni uzorci (krvne mrlje i tkivo s leša) genotipizirani su na 16 polimorfnih, nevezanih, mikrosatelitnih lokusa. DNK profili dobijeni iz devet analiziranih krvnih mrlja s potencijalnog mjesta zločina savršeno su odgovarali DNK profilu dobijenom analizom tkiva lešine. Međutim, kako je već napomenuto, prije nego što se neki tipizirani biološki trag može smatrati prihvatljivim dokazom u sudskom procesu, potrebno je provesti niz dodatnih, rigoroznih, statističkih analiza. Pripadnost spornog uzorka jednoj od analiziranih populacija (muflona i domaćih ovaca) u opisanom slučaju testirana je tzv. testom pripadnosti (engl. *assignment test*). Prag vjerovatnoće pripadnosti (qI) postavljen je na 90% iz razloga što se mufloni mogu križati s domaćim ovcama. Tome pomaže i činjenica da sardinski

farmeri obično dozvoljavaju svojim ovcima da pasu u divljini. Na taj način povremeno u populaciju muflona ulaze i križanci (hibridi), uzrokujući unos ovčijih alela u genofond muflona (tzv. introgresija). Leš iz opisanog slučaja pripisan je populaciji muflona s vjerovatnoćom od $qI > 99\%$, što je pokazalo da je uzgajivač ovaca bio neiskren kada je tvrdio da lešina pripada jednoj od životinja iz njegovog stada. Vrijednosti parametara vjerovatnoće identiteta (P_{ID}) i vjerovatnoće slučajnog podudaranja (RMP) za opisani slučaj dati su u tabeli 6.4.

Tabela 6.4. Vrijednosti P_{ID} i RMP za istraživanu populaciju muflona, uz primjenjenu vrijednost koeficijenta inbridinga (F_{IS}) od 0,19. U zagradama su dati omjeri vjerovatnoće (prilagođeno iz Lorenzini et al., 2011).

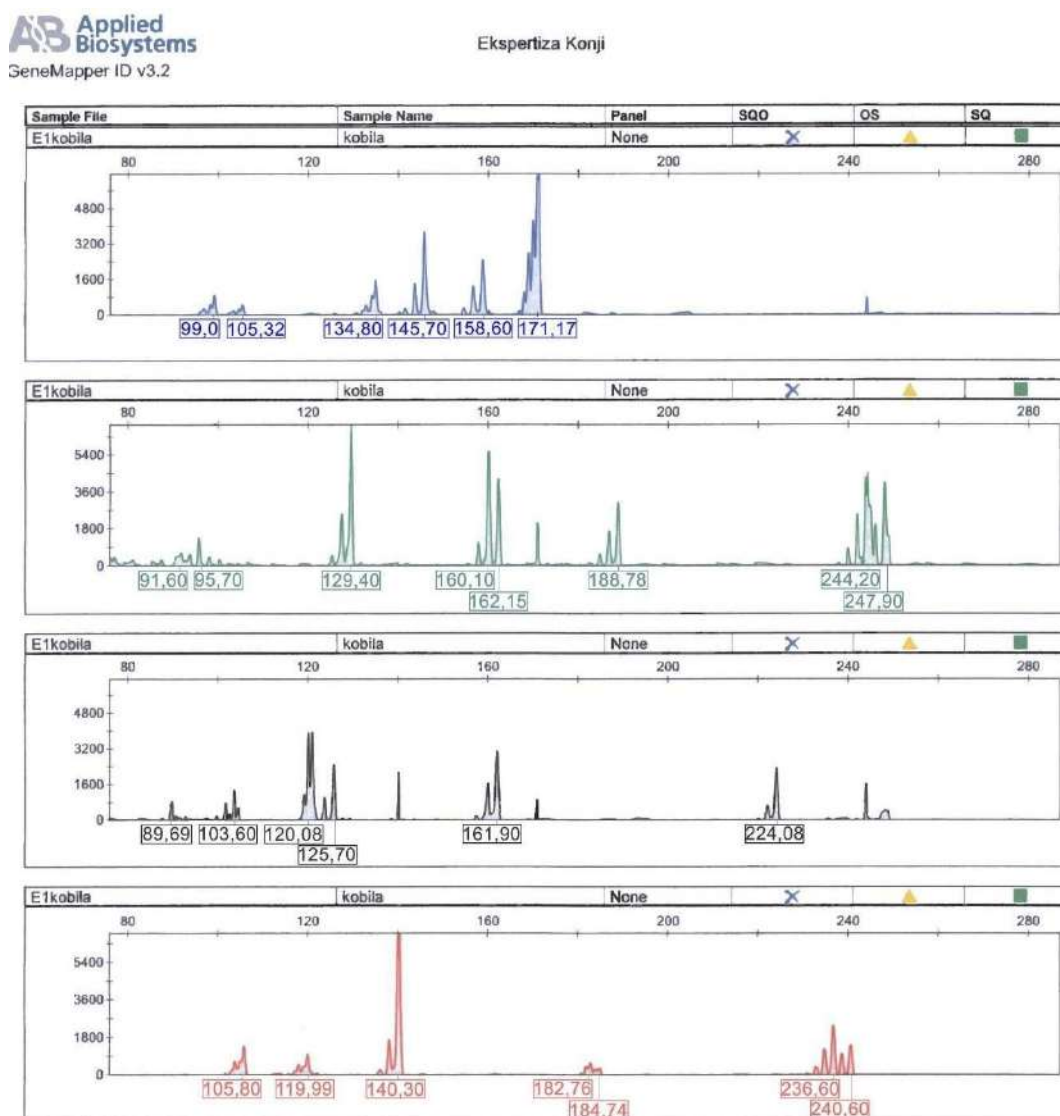
Kategorija	P_{ID}	RMP
Nesrodne jedinke	$4,6 \times 10^{-8}$ (1 u 22 miliona)	$3,0 \times 10^{-11}$ (1 u 33 milijarde)
Nesrodne jedinke (uz uključen F_{IS})	$5,0 \times 10^{-8}$ (1 u 20 miliona)	$1,2 \times 10^{-8}$ (1 u 80 miliona)
Roditelj / potomak	$4,3 \times 10^{-5}$ (1 u 23.000)	$1,9 \times 10^{-6}$ (1 u 526000)
Srodnici (braća / sestre)	$4,4 \times 10^{-4}$ (1 u 2300)	$1,8 \times 10^{-4}$ (1 u 5600)

Procijenjena vjerovatnoća da bilo koje dvije nesrodne jedinke muflona slučajno dijele isti multilokusni genotip bila je oko 1 prema 22 miliona i samo je neznatno manja (1 na 20 miliona) kada je u proračun uključena procijenjena vrijednost F_{IS} od 0,19. Uzevši u obzir procjenu da populacija sardinskog muflona iznosi oko 3000 grla, dobijene vrijednosti P_{ID} čine vrlo malo vjerovnim da bi bilo koje dvije individue uzete nasumično iz ove populacije pokazale isti profil na 16 analiziranih lokusa, čak i u slučaju da su u bliskom srodstvu. Vrijednosti vjerovatnoće podudaranja (RMP) bile su 1 : 33 milijarde za nesrodne jedinke i 1 : 80 miliona kada je u izračun uključen i F_{IS} . Prema scenariju srodnika tipa braća i sestre, RMP je bio 1 : 5600, što znači da, čak i kada se uzme u obzir vrlo konzervativna gornja granica, dokazi pokazuju da je 5600 puta vjerovatnije da su nađene krvne mrlje potekle od lešine oduzete od uzgajivača, a ne od drugog muflona u populaciji. Sumirajući sve dobijene rezultate provedenih molekularnih i statističkih analiza, možemo vidjeti da su rezultati analize nađenog životinjskog leša nedvojbeno otkrili da je riječ o muflonu, a ne ovci iz stada. Nadalje, utvrđena je pozitivna podudarnost između lešine i raznih krvnih mrlja prikupljenih na potencijalnom mjestu zločina. Konačno, zbirni dokazi doveli su do toga da je osumnjičeni optužen za nezakonito ubijanje zaštićenih divljih životinja.

6.1.7.1.2 Slučaj krađe životinja

U jesen 2013. godine, sedam konja ukradeno je tokom noći s imanja u Rogatici u Bosni i Hercegovini, i to tri konja pasmine lipicanac i četiri pasmine bosanski brdski konj. Imanje je pripadalo dvojici braće koji su vodili obrt turističkih vožnji fijakerom Alejom na Vrelu Bosne u Sarajevu. Krađu su, naravno, prijavili policiji. Nakon određenog vremena, pregledajući oglase za prodaju konja na internetskoj stranici, braća su uočila oglas koji je sadržavao sliku konja koji je jako sličio jednoj od ukradenih životinja pasmine bosanski brdski konj. Sumnju su prijavili, pa je nalogom suda u Višegradu Laboratorija za molekularnu genetiku prirodnih resursa (LMG) Instituta za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju Univerziteta u Sarajevu (INGEB) dobila nalog da uradi testiranje srodstva kako bi se utvrdilo radi li se zaista o ukradenom konju. Razlog zbog kojeg je bilo moguće provesti ovakav tip analize bila je činjenica da su kobile koje su bile majke ukradene ždrebadi legalno prodane pa je njihova lokacija bila poznata. Nadležni veterinar, u prisustvu policijskih službenika, uzeo je uzorak pune krvi kobile za koju se pretpostavljalo da je potencijalna biološka majka konja koji je bio predmet sudskog spora. Ovaj uzorak predstavljao je nesporni uzorak u ovom slučaju. Na isti način uzet je uzorak krvi konja za kojeg se sumnjalo da je bio predmet krađe u datom slučaju. Uzorci su šifrirani i dostavljeni u LMG na dalju analizu. Urađena je izolacija ukupne genomske DNK te primijenjen komercijalni komplet mikrosatelitnih markera *StockMarks™ for Horses 17-Plex Genotyping Kit* kako bi se dobili DNK profili analiziranih jedinki (slika 6.8). Kao baza podataka za izračunavanje statističkih parametara korištena je baza podataka konja ranije analiziranih u okviru istraživanja LMG-a, koja je sadržavala i uzorke pasmine bosanski brdski konj.

Utvrdjivanje majčinstva kod kičmenjačkih vrsta slijedi ista pravila koja vrijede u dokazivanju majčinstva kod ljudi. Ako je potomak za neki lokus homozigot, tada postoji jedan obligatni (obavezni) alel, dok za lokuse na kojima ispoljava heterozigotni genotip postoje dva obligatna alela. Jedinka biva isključena kao biološka majka analizirane potomačke jedinke ako nema niti jedan od obligatnih alela koje ima dijete. Ako, pak, ženka ima najmanje po jedan obligatni alel na svim analiziranim lokusima, u tom slučaju je se ne može isključiti kao potencijalnu biološku majku analizirane jedinke. U datom slučaju, analizirana kobilica dijelila je najmanje po jedan obligatni alel s analiziranim ždrijebetom na svim testiranim lokusima (tabela 6.5) te je se nije moglo isključiti kao biološku majku.



Slika 6.8. DNK profil analizirane kobile dobijen umnožavanjem 17 mikrosatelitnih lokusa u *StockMarks™ for Horses 17-Plex Genotyping Kit*

Dodatnu potvrdu ovakvih rezultata forenzičke analize dali su i izračunati statistički parametri. Kao i kod utvrđivanja majčinstva kod ljudi, ti parametri su bili neisključenost slučajno odabrane ženke iz opće populacije, RFNE (engl. *Random Female Not Excluded*), kombinovana neisključenost slučajno odabrane ženke iz opće populacije, CRFNE (engl. *Combined Random Female Not Excluded*), $1/CRFNE$ (Bayesova vjerovatnoća majčinstva) te indeks majčinstva koji se izračunava po formulama ranije objašnjenim u ovoj knjizi.

Tabela 6.5. Aleli dobijeni na 17 STR lokusa iz referentnog uzorka analizirane ženke i iz spornog uzorka ždrijebeta. Veličina alela data je u baznim parovima.

Lokus	Nesporni uzorak – DNK profil kobile	Sporni uzorak – DNK profil ždrijebeta
VHL20	98/104	98/104
HTG4	134/134	130/134
AHT4	146/158	158/158
HMS7	171/171	171/179
HTG6	91/95	83/95
AHT5	128/128	128/128
HMS6	160/162	160/162
ASB23	188/188	188/188
ASB2	243/247	241/243
HTG10	89/103	89/103
HTG7	126/126	124/126
HMS3	162/162	162/162
HMS2	224/224	222/224
ASB17	106/120	96/120
LEX3	139/139	139/139
HMS1	182/184	176/182
CA425	236/240	236/240

6.1.8 Primjena animalne forenzike u slučajevima u kojima su životinje počinitelji zločina

Od slučajeva u kojima su životinje napadači, najveći broj otpada na slučajeve ujeda pasa lotalica ili vlasničkih pasa, kada je potrebno izvršiti tačnu identifikaciju životinje koja je počinila napad. U ovim slučajevima, DNK profiliranje obično se provodi na najčešćem tipu uzorka koji se nađe na takvom mjestu zločina, a to su dlaka, krv i pljuvačka.

Jedan takav slučaj je ujed psa u Poljskoj, koji se desio u gradskom parku u kojem je u trenutku napada bilo prisutno nekoliko pasa pasmine njemački ovčar, od kojih niti jedan nije bio na povocu. Žena koju je ugrizao pas, prema opisu, ukazala je na psa čiji je vlasnik negirao incident i umjesto toga ukazao na drugog psa. Stoga su prikupljene tri skupine dokaza: sporni uzorak sadržavao je tragove prikupljene sterilnim brisevima s pantalona žrtve s vidljivim mrljama koje je mogao napraviti pas, dok su nesporni uzorci uzeti od oba osumnjičena psa. Uzorci su tipizirani primjenom 21 autosomnog mikrosatelitnog markera preporučenog od strane ISAG-a i amelogeninskog lokusa. Za izračun PD i P_{ID} , za sve markere, odabrane su dvije pasmine pasa: njemački ovčar i

irski vučji hrt, odnosno najbrojnija i najmanje brojna rasa pasa u Poljskoj. Za procjenu RMP-a korištena je baza podataka pasa koja se sastojala od 845 jedinki pasa različitih rasa, uključujući naravno i njemačkog ovčara. DNK profil dobijen iz dokaznog materijala (tabela 6.6, sporni uzorak) nije odgovarao psećem DNK profilu dobijenom iz referentnog uzorka psa 2. Podudaranje je uočeno samo za lokuse AHTK253, CXX279 i INU005, dok su za sve ostale markere genotipovi bili različiti, pa je osumnjičeni pas 2 isključen kao učesnik u istraživanom napadu. Međutim, DNK profil dobijen iz spornog uzorka u potpunosti se poklapao s DNK profilom dobijenim analizom nespornog uzorka osumnjičenog psa 1, što je ukazalo na to da je ovaj pas mogao biti umiješan u incident. Izračunati statistički parametri također su poduprli ovakav zaključak, pokazavši da je 10^{21} puta veća vjerovatnoća da DNK profil dobijen iz dokaznog materijala prikupljenog s pantalona žrtve pripada osumnjičenom psu 1 nego bilo kojem drugom slučajno odabranom psu.

Tabela 6.6. Aleli dobijeni na 21 STR lokusu iz uzorka s mjesta zločina i od dva osumnjičena psa.

Veličina alela data je u baznim parovima (Radko et al., 2022)

Lokus	Sporni uzorak uzet s pantalona žrtve	Nesporni uzorak pas 1	Nesporni uzorak pas 2
AHT121	102/104	102/104	80/102
AHT137	137/137	137/137	131/131
AHTH171	219/223	219/223	233/233
AHTH260	238/238	238/238	242/252
AHTK211	89/91	89/91	89/89
AHTK253	288/288	288/288	288/288
CXX279	116/116	116/116	116/116
FH2054	168/172	168/172	160/160
FH2848	240/240	240/240	240/242
INRA21	91/95	91/95	99/99
INU005	126/126	126/126	126/126
INU030	144/150	144/150	150/150
INU055	214/218	214/218	210/220
REN162C04	206/206	206/206	206/212
REN169D01	216/216	216/216	212/216
REN169O18	158/168	158/168	168/168
REN247M23	270/270	270/270	268/278
REN54P11	226/226	226/226	232/238
AHTH130	129/131	129/131	127/131
REN105L03	227/227	227/227	231/233
REN64E19	155/155	155/155	153/155

Naravno, animalni forenzičari nisu pozvani da rješavaju samo slučajeve u kojima su ljudi žrtve napada životinja, već i slučajeve u kojima životinje budu objekt napada drugih životinja. Jedan takav slučaj opisan je 2021. godine, u čijem je rješavanju primijenjen malo drugačiji pristup od ranije opisanog. Osmogodišnja ženka terijera Jack Russel, koja je bila smještena u pansionu za pse, pronađena je mrtva u dvorištu. Mreža kaveza u kojoj je bila smještena nađena je pokidana i izgledala je kao da je bila vučena iznutra. Veterinar koji je pozvan na mjesto događaja pretpostavio je da se uzrok smrti može pripisati traumatskim ozljedama koje su nanijele divlje životinje, poput lisica ili nutrija. Vlasnik pansiona za pse imao je tri psa rase Hovawart. Leš psa je ostavljen 18–20 h na ambijentalnoj temperaturi (prosječna dnevna temperatura 7,0°C), a zatim pohranjen na –18°C do obdukcije, koja je obavljena mjesec dana kasnije na zahtjev vlasnika.

Pregledom leša ustanovljeno je 14 ozljeda koje su odgovarale tragovima ugriza, a utvrđene su i unutrašnje povrede. Dodatno, nađene su brojne vlasi dlake u usnoj šupljini psa, između zuba, te zamršene na šapama, što je ukazalo na to da je došlo do borbe između žrtve i jednog ili više napadača. Prema izgledu vlasi i neprirodnom mjestu gdje su nađene ustanovljeno je da ne pripadaju napadnutom psu, pa su uzete kao materijal za genetičku analizu. Sve analize izvršene su prateći preporuke ISFG-a koje su ranije opisane u ovom poglavlju.

S obzirom na to da je količina početnog materijala za analizu bila mala (prikupljene su dlake) te je materijal bio pohranjen u frižideru mjesec dana prije same analize, vjerovatnoća dobijanja punog DNK profila primjenom nukleusnih markera bila je mala te je stoga analiziran region *cytb*. Kako je već opisano, ovaj marker nalazi se na mitogenu (otpornijem na degradaciju u odnosu na nukleusnu DNK) i podesan je za identifikaciju vrste. Produkti PCR-a sekvencirani su Sanger metodom, a dobijene sekvence uspoređene sa *cytb* sekvencama specifičnim za vrste dostupnim u bazi podataka GenBank.

Sve dobijene sekvence bile su identične, a rezultati analize pozitivne i negativne kontrole isključili su mogućnost kontaminacije. Pretraga baze GenBank rezultirala je poklapanjem sa sekvencama *Canis lupus* (vuk) i *Canis lupus familiaris* (pas) i to s 99% za dlake uzorkovane sa šapa žrtve i 100% za one uzorkovane iz usne duplje žrtve. Radi pojašnjenja ovakvog rezultata važno je naglasiti da je region *cytb* veoma konzerviran i stoga identičan kod pasa i vukova. Ovakav rezultat uklonio je sumnju da su napad napravile lisice ili nutrije, što je bila početna hipoteza. Mogućnost

napada od strane vukova također je odbačena s obzirom na to da ne obitavaju u području u kojem se desio incident, a ni vrste i lokacije rana na žrtvi nisu odgovarale obrascu vučijeg napada. Međutim, brojnost, tip i lokacije rana dovele su do pretpostavke da je napad izvršio jedan ili više pasa srednje do veće konstitucije. Idealna situacija za razjašnjenje slučaja bilo bi uzimanje brisa oko mjesta ujeda i STR analiza koja bi omogućila i individualizaciju profila. Nažalost, uzorci za forenzičku analizu uzeti su naknadno, nakon što je leš uklonjen s mjesta zločina i pohranjen u frižider, što je ostavilo dosta prostora za vanjsku kontaminaciju. Iako je sumnja pala na Hovawarte u posjedu vlasnika pansiona jer su morfometrijske karakteristike dlaka sakupljenih iz usne šupljine i sa šapa žrtve odgovarale dužini i boji njihove dlake, a ta tri psa su bili jedini koji su imali pristup posjedu, forenzičarima nije bilo dozvoljeno da uzmu nesporne uzorke od ovih pasa. Iako nisu uspjeli slučaj riješiti do kraja i identificirati krivca, forenzičari su ipak analizom citohrom b gena uspjeli razotkriti lažni napad divljih životinja što slučaj stavlja u potpuno drugačiju perspektivu.

6.1.9 Primjena animalne forenzike u kontroli porijekla i sadržaja prehrambenih proizvoda

Istraživanje biološkog sastava prehrambenih proizvoda s obzirom na vrstu, sortu ili pasminu i geografsko porijeklo od velikog je forenzičkog interesa. Takve istrage su relevantne za osiguranje izbora potrošača da biraju prehrambene proizvode u skladu sa svojim zdravstvenim problemima (npr. osjetljivost ili alergije), prehrambenim preferencijama (npr. vegetarijanci, vegani), vjerskim uvjerenjima (npr. halal i košer), ali i za otkrivanje prevara zamjene date vrste sličnom s nižom ekonomskom vrijednošću te certifikaciju autohtonosti prehrambenih proizvoda. Iako je deklarisanje hrane neophodno kako bi proizvođači, trgovci i potrošači prepoznali i potvrdili sastojke prehrambenih proizvoda, nažalost, etikete proizvoda često daju nedovoljne i/ili pogrešne informacije o tačnom sastavu.

Metodologija koja se koristi u ovim analizama slična je onoj koja se koristi u klasičnim istragama zločina. Izazovi su također slični, zbog potrebe za analizom potencijalno degradiranih uzoraka uslijed industrijskog procesuiranja sastojaka te prisustva različitih inhibitora PCR-a (npr. različitih aditiva koji se dodaju u hranu). U prvim studijama iz 90-ih godina korištene su klasične molekularne tehnike poput RAPD (engl. *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) i ISSR (engl. *Inter Simple Sequence Repeats*), no današnje analize koriste savremene metode za zaštitu i certifikaciju kvalitete i porijekla hrane (npr. DNK barkodiranje). Metode koje se široko

primjenjuju u analizi sljedivosti hrane s prednošću kvantifikacije svake pojedine komponente su *Real-Time* PCR, HRM (engl. *High Resolution Melting*), MPS (engl. *Multiple Parallel Sequencing*) i NGS. MPS je posebno koristan za analizu uzoraka koji predstavljaju složene mješavine jer se ne zahtijeva nikakvo prethodno znanje o ciljnom regionu DNK.

Kada je u pitanju primjena animalne forenzike u analizi porijekla i sastava hrane, ona se primarno odnosi na analizu mesa i mesnih, mlijeka i mliječnih prerađevina te analizu ribe i plodova mora i njihovih proizvoda.

Ispitivanje tačnosti deklaracije prerađenih mesnih proizvoda na tržištu Bosne i Hercegovine provedeno je u Laboratoriji za GMO i biosigurnost hrane, UNSA-INGEB 2014. godine. Analizirana su 73 nasumično odabrana prerađena mesna proizvoda (paštete, sudžuke, mesni naresci, kobasice, viršle) kupljena u maloprodajnim centrima u BiH u periodu 2013–2014. godina. Nijedan od uzoraka (41 domaći i 32 uvozna proizvoda) nije među sastojcima na deklaraciji imao navedeno konjsko meso. Analiziran je 153 bp dug fragment gena mitohondrijske podjedinice ATP sintaze 8 i gena podjedinice ATP sintaze 6. Ovaj fragment je vrlo specifičan i njegova mala veličina omogućava amplifikaciju iz visoko degradirane DNK. Konjska DNK otkrivena je u 28,77% (21 proizvod) od 73 analizirana prehrambena proizvoda. Od 13 testiranih uzoraka sudžuka, šest (46,15%) je bilo pozitivno na konjsko meso, što je rezultat koji bi mogao biti posebno zanimljiv za bh. potrošače uzevši u obzir da se radi o često korištenom proizvodu. Posmatrajući porijeklo testiranih proizvoda, 36,58% svih testiranih uzoraka proizvedenih u BiH bilo je pozitivno na prisustvo konjskog mesa, dok je pozitivno bilo 18,75% uvezenih proizvoda. Ovakve analize, iako bi mogle biti kategorisane kao pitanje pogrešnog deklarisanja, potencijalno imaju i značaj u kontekstu javnog zdravlja s obzirom na to da konjsko meso može sadržavati rezidue različitih lijekova koji su zabranjeni za ljudsku konzumaciju.

Iako su opisane brojne metode izolacije DNK, ne postoji univerzalan protokol primjenljiv na sve vrste uzoraka koji mogu biti predmet analize, upravo zbog njihove specifičnosti i kompleksnosti (degradiranost, miješani uzorci, prisustvo inhibitora itd.), pa je optimizacija pristupa često potrebna u svakoj novoj analizi. Ipak, genetički pristup u određivanju vrste ima ključnu prednost u odnosu na druge vrste dokumentarnih, materijalnih, fizičkih ili bioloških dokaza jer daje tačnu potvrdu vrste za identifikaciju ili sljedivost izvora u cijelom lancu opskrbe. Razvoj ove oblasti već

ide u smjeru mogućnosti kreiranja baza podataka pojedinačnih životinja iz proizvodnog procesa. Naime, kompanija Eurofins Genomics nudi uslugu DNA SourceTrackera koji podrazumijeva uzimanje uzorka od svake pojedinačne životinje, NGS sekvenciranje i generiranja DNK profila koji je jedinstven za svaki uzorak životinje. Ovi profili se zatim pohranjuju u prilagođenu bazu podataka koja olakšava poređenje uzoraka kroz cijeli lanac opskrbe. Ovakva tehnologija trebala bi omogućiti prehrambenoj industriji da eliminiše prijevare i krivotvorenje mesa u globalnim lancima snabdijevanja, štiteći na taj način brendove hrane i čuvajući lojalnost potrošača.

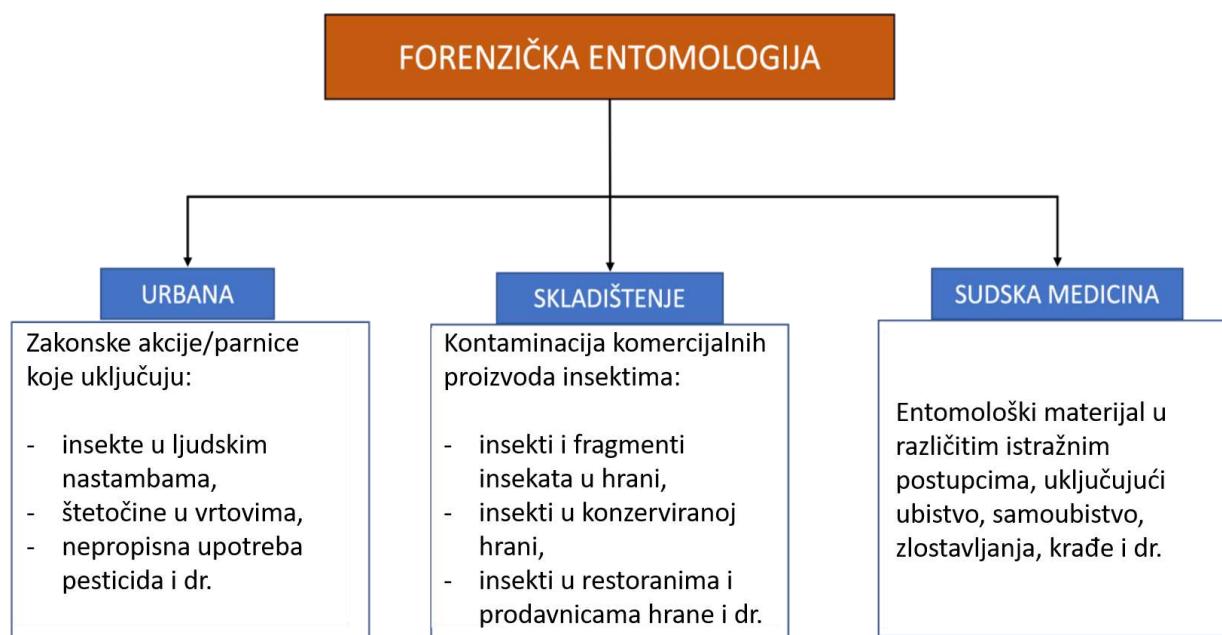
6.2 FORENZIČKA ENTOMOLOGIJA

Insekti predstavljaju najveću grupu organizama na planeti Zemlji. Oko jedne polovine do dvije trećine globalnog biodiverziteta otpada na insekte, što se u konačnici procjenjuje na oko 10 miliona vrsta, od kojih je opisano manje od dva miliona. Insekti su se prilagodili uslovima različitih staništa pa žive u vodi, zraku, raznim slojevima tla, neki čak i u staništima gdje vladaju nepovoljni uslovi za mnoge druge organizme (na primjer visoke nadmorske visine, vulkansko kamenje itd.). Insekti su na različite načine vezani za život čovjeka: važna su karika u lancu ishrane, polinatori su, razlagači otpada, simbiotički, bioindikatori te su medicinski, poljoprivredno i industrijski relevantni faktori. S druge strane, neki od najvećih štetočina, parazita i prenosnika bolesti dolaze iz klase insekata. Jedan od mnogobrojnih aspekata primjene insekata je u medicinskoj svrhu. Naime, poznavanjem biologije, a posebno životnog ciklusa pojedinih vrsta insekata, moguće je procijeniti prije svega vrijeme proteklo od trenutka smrti, ali i okolnosti pod kojima se desila smrt. Forenzička disciplina koja proučava insekte i druge artropode (pauci, škorpije, krpelji i dr.) u cilju rješavanja krivičnih djela naziva se *forenzička entomologija*.

Forenzička entomologija obuhvata širok spektar upotrebe insekata u različitim pravnim i regulacionim aspektima. U veterinarskoj medicini primjenjuje se za utvrđivanje infestacije stoke parazitima i u slučajevima zanemarivanja životinja. U doba globalizacije i visokih standarda sigurnosti hrane, forenzička entomologija nalazi svoju primjenu u prehrambenoj i transportnoj industriji.

Konkretno, u prehrambenoj industriji entomolozi vrše identifikaciju i određivanje dozvoljene količine insekata u hrani u tvornicama, skladištima, trgovinama, restoranima itd. Jedan od važnih aspekata je i primjena u urbanim regulacijama gdje se vrši monitoring i zaštita od infestacije

stambenih i drugih objekata. Ipak, najznačajnija primjena forenzičke entomologije je u procjeni vremena proteklog od nastupanja smrti te sličnih parametara vezanih za aktivnost insekta na leševima pronađenim u sumnjivim okolnostima (slika 6.9).



Slika 6.9. Šematski prikaz primjene forenzičke entomologije

Prvi zabilježen slučaj upotrebe forenzičke entomologije nalazimo u kineskoj medicinskoj knjizi, napisanoj u 13. stoljeću, u kojoj se opisuje slučaj ubistva u polju žita gdje je farmer pronađen izboden više puta. Slučaj je riješen tako što je od svih okolnih farmera traženo da donesu svoje srpove. Jedan srp je privukao muhe iz porodice Calliphoridae uslijed prisustva nevidljivih tragova krvi, nakon čega je vlasnik srpa priznao ubistvo. Smatra se da je forenzičku entomologiju prvi put primijenio francuski doktor medicine Bergeret d'Arbois (Louis François Étienne Bergeret, 1814–1893) u cilju određivanja postmortalnog intervala (PMI). On u svom radu prvi put navodi da je moguće dovesti u vezu razvojni ciklus insekata s određivanjem postmortalnog intervala. Štaviše, njegova analiza insekata pronađenih na tijelu mumificiranog djeteta iz 1885. godine, te zaključci izvedeni na osnovu provedenih dokaza, doveli su do uhićenja bračnog para koji je živio u kući pored koje je dijete bilo zakopano dvije godine ranije. Ovaj slučaj predstavlja prvi u Evropi koji je, na osnovu istraživanja na polju forenzičke entomologije, rezultirao uhićenjem osumnjičenih i

presudom za počinjeni zločin. Tek nakon objavljivanja knjige *Fauna leševa* 1894. godine, autora Jean-Pierrea Megnina (1828–1905), dolazi do popularizacije forenzičke entomologije, a Megninu se bez premca pripisuju najveće zasluge za razvoj ove naučne discipline.

Danas se forenzička entomologija najčešće koristi u identifikaciji insekata i nekih artropoda pronađenih na posmrtnim ostacima ili u njihovoj blizini. Zahvaljujući poznavanju životnog ciklusa insekata, forenzički entomolozi mogu procijeniti vrijeme i utvrditi mjesto smrti.

6.2.1 Forenzički bitni insekti

Svi insekti (Phylum: Arthropoda, Classis: Insecta) svrstavaju se u dvije potklase: Apterygota (beskrilni insekti) i Pterygota (krilati insekti). Sve artropode koje koloniziraju leš mogu se podijeliti u četiri kategorije:

1. nekrofagne vrste koje se hrane lešom;
2. predatori i paraziti koji se hrane nekrofagnim vrstama. Ova grupa sadrži *šizofagne* vrste koje se u fazi larve hrane lešinom, a kasnije postaju predatori;
3. omnivori koji se hrane strvinom i drugim člankonošcima poput mrava, osa i nekih tvrdokrilaca;
4. ostale vrste kao što su skokuni (Collembola) i pauci koji koriste leš kao dio svog prirodnog okruženja (tlo na kojem se leš nalazi).

Od artropoda, forenzički najznačajniji su redovi koji spadaju u potklasu Pterygota, i to: Diptera (dvokrilci, muhe) koji su najvažniji i najčešći insekti koji se koriste u forenzičkoj analizi, Coleoptera (tvrdokrilci), Lepidoptera (leptiri) i Hymenoptera (opnokrilci). Insekti iz reda Diptera koloniziraju leš u svježoj fazi raspada, dok se vrste iz ostalih redova najčešće nađu u suhoj fazi. Pored insekata, leš naseljavaju i druge artropode. U forenzičkoj entomologiji posebno su značajne prve dvije grupe insekata, među kojima su najčešće vrste iz reda Diptera (muhe) i Coleoptera (tvrdokrilci).

6.2.1.1 Red Diptera

6.2.1.1.1 Familija Calliphoridae (zunzare)

Po mnogim autorima, u ovu porodicu muha spadaju najvažniji insekti kada je u pitanju forenzička entomologija. Ove muhe su prepoznatljive po svojoj metalik zelenoj i plavoj boji (slika 6.10), a mogu da koloniziraju tijelo već pet minuta od nastupanja smrti.

Ipak treba imati na umu da brzina kojom ove vrste pronalaze leš zavisi od doba dana, okolišne temperature i doba godine. Forenzički bitne vrste iz ove porodice su: *Calliphora vicina* (u starijoj literaturi *Calliphora erythrocephala*), *Calliphora vomitoria*, *Lucilia sericata* i *Lucilia illustris*.

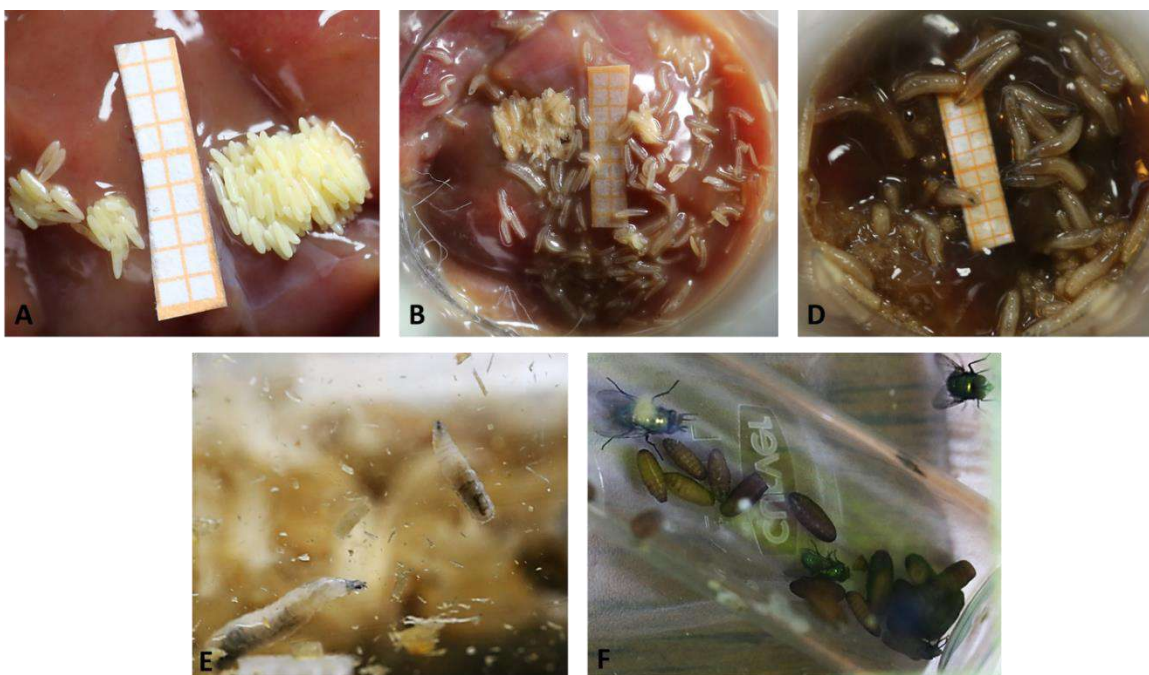


Slika 6.10. Adult muhe iz porodice Calliphoridae

Kod ovih vrsta muha, ženka polaže jaja na svježa tijela i leševe u ranim fazama raspadanja. Osim toga, odrasle se jedinke mogu naći i na skeletiniziranim ostacima. One su primarni kolonizatori na skoro svim leševima na površini zemlje, dok, prema većini literature, ne koloniziraju zakopana tijela, čak i ako je u pitanju plitak grob. Ako se larve pronađu na zakopanim leševima, onda se najčešće radi o polijeganju jaja prije ukopa. Ženke polažu jaja u skupinama od do 180 jedinki.

Nakon polijeganja razvijaju se larve prvog stadija, koje se brzo kreću i traže optimalne uslove za dalji razvoj. Nakon 24 do 48 sati larva prelazi u larvu drugog stadija te nakon 48–72 sata u larvu trećeg stadija koja nastavlja da se hrani i ubrzano se razvija tokom sljedeća tri do četiri dana (slika 6.11). Brzina prelaska larvi iz jednog stadija u drugi zavisi od temperature, vlažnosti i dostupnosti hrane. Također, dokazano je da se razvoj brže odvija u većim grupama larvi. Nakon završetka treće

faze razvoja, larva migrira dalje od leša u potrazi za mjestom na kojem će se učahuriti. To mjesto također može biti u blizini tijela, ali i na udaljenosti od nekoliko metara od leša. U zavisnosti od temperature, faza lutke može trajati od nekoliko dana do nekoliko mjeseci. Što je temperatura viša i stabilnija to je faza lutke kraća. Nakon postizanja faze adulta nastavlja se dalja migracija. Budući da primarno dobijaju energiju za let iz glikogenskih zaliha, muhe, za razliku od leptira, nisu sposobne da migriraju daleko.



Slika 6.11. Različiti stadiji larve vrste *Lucilia sericata*: A – jaja, B – larve prvog stadija, D – larve drugog stadija, E – larve trećeg stadija, F – lutke i adulti

6.2.1.1.2 Familija Sarcophagidae (mesaruše)

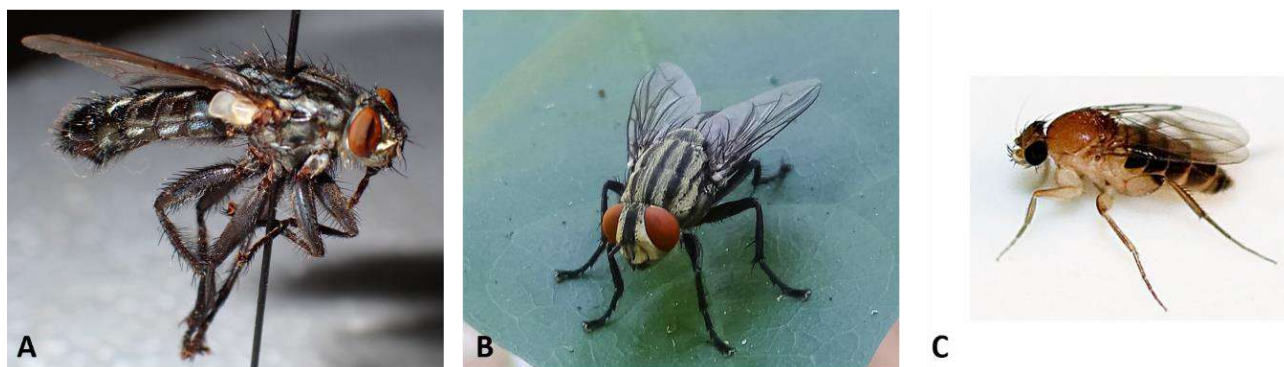
Sarcophagidae su još jedna od porodica muha koje među prvima koloniziraju leš. Karakteristične su po uzdužnim prugama na tijelu i “kariranom” abdomenu (slika 6.12. A). Njihova specifičnost jeste to što u ciklusu razvoja preskaču stadij jajeta, što znači da ženka polaže larve koje se izlegu već u njenom abdomenu. Za razliku od vrsta iz porodice Calliphoridae, sposobne su da lete i u vlažnijim uslovima što im omogućava koloniziranje leša u uslovima u kojima Calliphoridae ne mogu letjeti. Larve Sarcophagidae je lako razlikovati od ostalih jer imaju oblik nalik na izduženo bure kao i dosta tuberkula na zadnjem segmentu.

6.2.1.1.3 Familija Muscidae (muhe)

Ova porodica se najčešće javlja u nehigijenskim uslovima budući da se njene larve razmnožavaju u fecesu i drugim izlučevinama pa se mogu očekivati u tzv. nadutoj fazi raspadanja kao i na mjestima zločina na kojima su prisutni feces i druge izlučevine. Karakteriziraju ih uzdužne linije na toraksu te su dosta manje od predstavnika prethodne dvije porodice (slika 6.12. B). Budući da im je potrebna visoka temperatura za rast i razviće, kod nas se mogu očekivati u ljetnom periodu na otvorenom te tokom ostalih godišnjih doba, ako je leš pronađen u zatvorenom prostoru s konstantnom povišenom temperaturom.

6.2.1.1.4 Familija Phoridae (muhe mrtvačkih sanduka)

Muhe iz ove porodice karakteristične su po svojoj maloj veličini pa mogu da pristupe mjestima i objektima koji inače nisu dostupni robusnijim predstavnicima muha. Zbog toga su poznate i kao muhe mrtvačkih sanduka (engl. *coffin fly*). Cijele generacije se mogu potpuno smijeniti pod zemljom na zakopanom lešu, ali i na površini. Najznačajnija vrsta jeste *Conicera tibialis* koja ima sposobnost da detektuje zakopani leš čak i na dubini od preko jednog metra. *Megaselia scalaris* (slika 6.12. C) je još jedna od bitnih vrsta koja uzrokuje *mijazu* – infekciju živih tkiva drugim organizmima te se pojavljuje i u ranama živih ljudi. Vrste iz ove porodice su dominantne u toplijim klimama, mada se pojavljuju i u hladnijim klimatskim područjima. Zimu provode u zatvorenim prostorima. Neobično su prilagodljive i najčešće se nalaze na tijelima u odmaklim fazama raspada, tj. na suhim i skeletiniziranim ostacima.



Slika 6.12. A – adulti porodica Sarcophagidae, B – Muscidae (*Musca* sp.), C – Phoridae (*Megaselia* sp.)

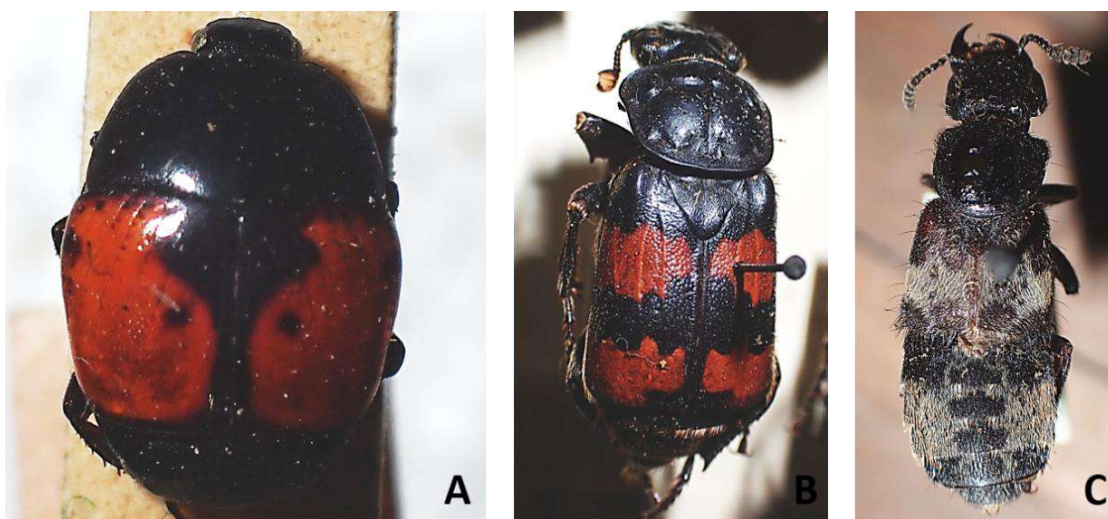
6.2.1.1.5 Familija Phiophilidae (sirne muhe)

Muhe iz ove porodice su male i crne, sa zelenim i plavim odsjajem. Karakteristične su za tijela u kasnim fazama raspada, a predstavnik *Phiophila casei* igra važnu ulogu i u grani forenzičke entomologije koja se bavi štetočinama prehrambenih namirnica jer je jedna od vrsta koje se najčešće pojavljuju u skladištima. Njihova vrlo zanimljiva karakteristika jeste što njihove larve trećeg stadija “skaču”, a neke čak i do visine od 23 cm.

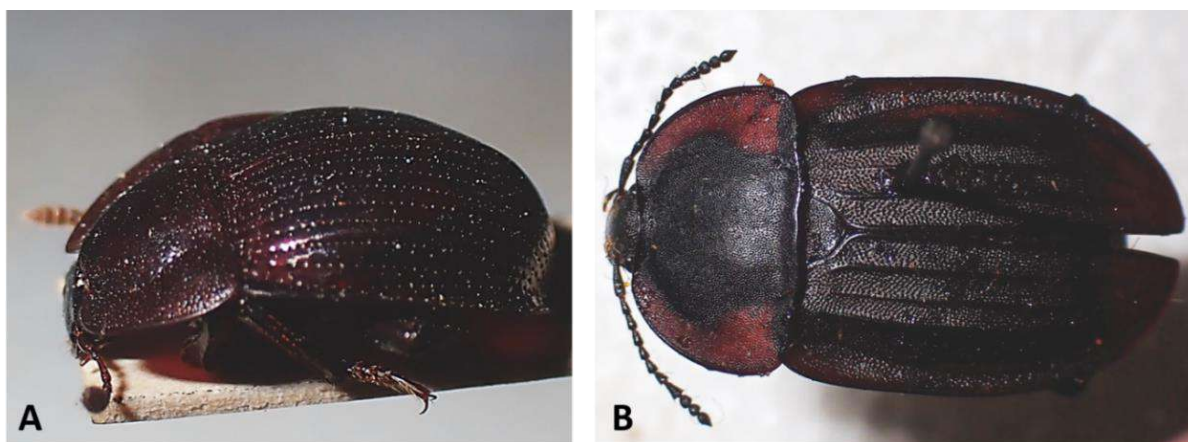
6.2.1.2 Red Coleoptera

Iako muhe predstavljaju primarni entomološki dokaz za određivanje PMI, insekti iz reda tvrdokrilaca također su važan entomološki nalaz posebno u kasnijim fazama raspadanja leša. Forenzički relevantni tvrdokrilci dolaze na leševe u različitim fazama raspada, i to najčešće u kasnim fazama, zavisno od prisustva hemijskih spojeva koji se oslobađaju tokom procesa raspadanja leša. Neke vrste tvrdokrilaca, kao što su kratkokrilci iz porodice Staphylinidae, predatorske su vrste koje se hrane larvama muha te se pojavljuju u ranim fazama raspadanja leša, dok je njihov izvor hrane još uvijek obiman. Neke druge vrste iz porodica Dermastidae i Trogidae dolaze u kasnijim fazama raspadanja leševa jer se hrane suhim ostacima leša. Zbog činjenice da se tvrdokrilci najčešće nađu u kasnim fazama raspadanja leša, vrste iz ovog reda su veoma važni indikatori procjene PMI nakon što se na leševima više ne nalaze vrste iz reda muha. Zato je poznavanje njihove biologije i životnog ciklusa izuzetno važno u forenzičkoj entomologiji.

Entomološki najvažnije vrste tvrdokrilaca su iz porodica Silphidae, Histeridae, Staphylinidae, Dermestidae, Cleridae, Trogidae i Scarabaeidae (slika 6.13). Na svježem lešu dominiraju predatori iz porodica Staphylinidae (*Creophilus maxillous*) (slika 6.13. C) i Histeridae (*Saprinus quadriguttatus* i *Saprinus sternifossa*) (slika 6.14. A). U nadutoj fazi leša najučestalije su vrste *Philonthus longicornis* (Staphylinidae), *Necrophila (Calosilpha) ioptera* (Silphidae) (slika 6.14. B) i *Saprinus optabilis* (Histeridae). Tokom poodmaklih faza raspadanja tijela, kada su prethodni kolonizatori pojeli većinu mekog tkiva, javljaju se sljedeće vrste tvrdokrilaca: *Pachylister bellicus* (Histeridae), *Necrophila (Calosilpha) ioptera* i *Necrophila (Calosilpha) cyaniventris* (Silphidae). U suhoj fazi najdominantniji je *Dermestes maculatus* (Dermestidae).



Slika 6.13. Neki predstavnici entomološki najvažnijih porodica tvrdokrilaca: A – Histeridae, B – Silphidae (*Nicrophorus vespilloides*), C – Staphylinidae (*Creophilus maxillous*)

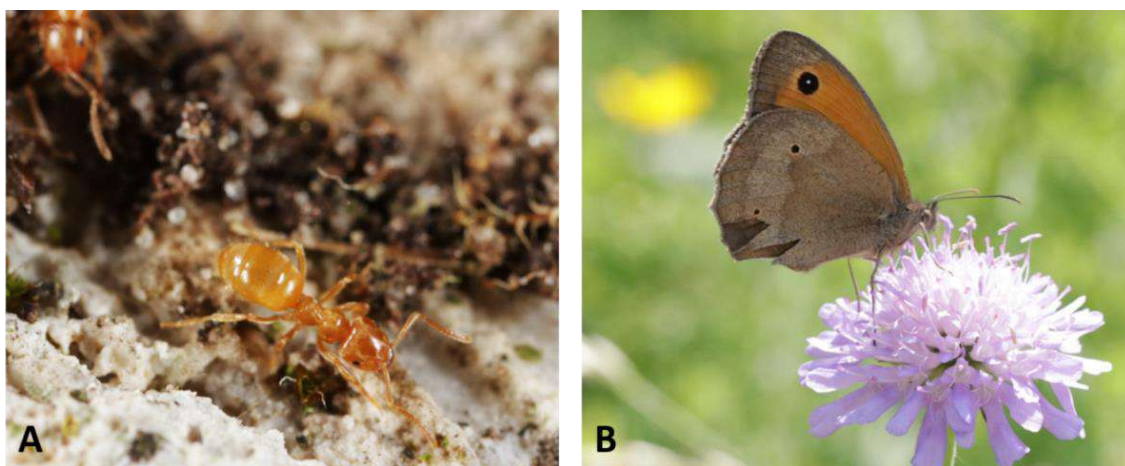


Slika 6.14. A – vrsta *Saprinus sternifossa* (fam. Histeridae) javlja se u svježoj fazi raspadanja leša, dok se B – vrsta *Necrophila* (*Calosilpha*) *ioptera* (Silphidae) najčešće javlja u nadutoj fazi raspadanja leša.

6.2.1.3 Ostale entomološki važne vrste u forenzici

Sukcesija insekata na lešu zavisi od nekoliko faktora, a posebno od uslova u kojima se leš nalazi. Pri tome je veoma bitno je li leš bio ukopan ili ne, ili je pronađen u vodi. Za razliku od neukopanih leševa, kod kojih se prvo javljaju insekti iz reda Diptera i Coleoptera, kod ukopanih leševa je mnogo manji diverzitet faune. Prije svega, kod zakopanih leševa muhe se veoma rijetko pojavljuju,

a među muhama je najčešća vrsta muha mrtvačkog sanduka (*Conicera tibialis*) iz porodice Phoridae koja se javlja na leševima u drvenim sanducima. U slučajevima pokopanih leševa mogu se naći i neke vrste tvrdokrilaca iz porodica Staphylinidae i Monotomidae. Također, veoma se često nađe fauna zemljišta u kojoj su vrlo česti pauzi iz porodica Uropodidae, Acaridae, kao i vrste iz reda skokuna (Collembola). Prema mnogim autorima, vrste iz reda leptira (Lepidoptera) i opnokrilaca (Hymenoptera), među kojima su najčešći mravi, nađu se u kasnijim fazama raspadanja leša (slika 6.15).



Slika 6.15. A – *Lasius fuliginosus*, B – *Maniola jurtina*

Pojava tvrdokrilaca veoma je česta u masovnim grobnicama pa predstavlja vrlo značajan nalaz za određivanje primarnih, sekundarnih i tercijarnih grobnica. U Bosni i Hercegovini je tokom posljednjeg rata (1992–1995) dokumentovano više primarnih, sekundarnih i tercijarnih masovnih grobnica. Masovne grobnice su bile prekopavane u svrhu uklanjanja tragova masovnih ubistava. Ostaci koji su pronađeni u takvim grobnicama bili su u različitim potfazama uznapredovale faze raspadanja.

Iako je prilikom iskopavanja fokus stavljen na forenzičku antropologiju i identifikaciju žrtava, na polju forenzičke entomologije i botanike došlo je do interesantnih zaključaka. Biljna vrsta koja je najčešće pokrivala lokalitete pokopa jeste *Artemisia vulgaris* L., a uz nju se često pojavljuju vrste leptira plavaca, što nije neuobičajena pojava jer se oni nerijetko hrane i skeletiziranim ostacima. Zabilježene su i vrste iz reda Coleoptera (*Trechus* sp. i *Bembidion* sp.), vrsta *Geotrupes vernalis* i

neidentificirane vrste mrava. Međutim, u slučajevima ovih masovnih grobnica i ekshumacije posmrtnih ostataka nije se moglo doći do konkretnih zaključaka na osnovu entomoloških dokaza budući da se nije vršilo entomološki fokusirano istraživanje.

6.2.2 Određivanje postmortalnog intervala (PMI)

Prilikom forenzičkih istraga veoma je bitno što preciznije odrediti vrijeme smrti. Nerijetko se koristi više metoda u procjeni postmortalnog intervala, a jedna od najčešćih je analiza sukcesije insekata na lešu i stadij larvi pronađenih na licu mjesta. Postmortalni interval (PMI) predstavlja vremenski interval između trenutka smrti i otkrivanja leša. Važno je naglasiti da postmortalni interval nije tačno određivanje vremena kada je smrt nastupila, nego predstavlja procjenu vremena smrti koja može da odstupa od tzv “legalnog” vremena smrti. Neki autori navode da bi se postmortalni interval mogao pogrešno protumačiti kao vrijeme proteklo od smrti pa sugerišu korištenje pojma minimalni postmortalni interval (mPMI) ili još bolje interval kolonizacije. Taj interval obuhvata period potreban za razvoj insekata koji se pojavi na lešu nakon smrti, što najčešće ne korespondira sa stvarnim vremenom smrti (izuzev kod smrti izazvane mijazama, bolestima uzrokovanim larvama dvorkrilaca, i to najčešće muha).

Analizom insekata kolonizatora leša, osim vremena smrti moguće je utvrditi način i uzrok smrti, je li došlo do pomjeranja leša te povezati osumnjičene s mjestom zločina. U forenzičkoentomološkoj praksi primjenjuju se dva načina za određivanje postmortalnog intervala: analiza razvojnog stadija i starosti larvi i praćenje smjene (sukcesija) insekata kolonizatora.

6.2.2.1 Određivanje PMI na osnovu razvojnog stadija insekata

Dužina trajanja pojedinih faza razvojnog ciklusa kolonizatora leša dobro je poznata entomolozima i, iako zavisi od okolišnih uslova, ne odstupa značajno od poznatog raspona. Poznavanjem razvojnog ciklusa kolonizatorskih vrsta moguće je procijeniti vrijeme smrti čak i nekoliko sedmica od nastupanja smrti.

Prvih nekoliko sati od smrti, vještaci medicinske struke utvrđuju vrijeme smrti na osnovu *znakova smrti* (lat. *signa mortis*). U prvim minutama nakon smrti prestaje cirkulacija krvi te, pod uticajem gravitacije, dolazi do slijeganja krvi u dijelove tijela koji se nalaze bliže podlozi.

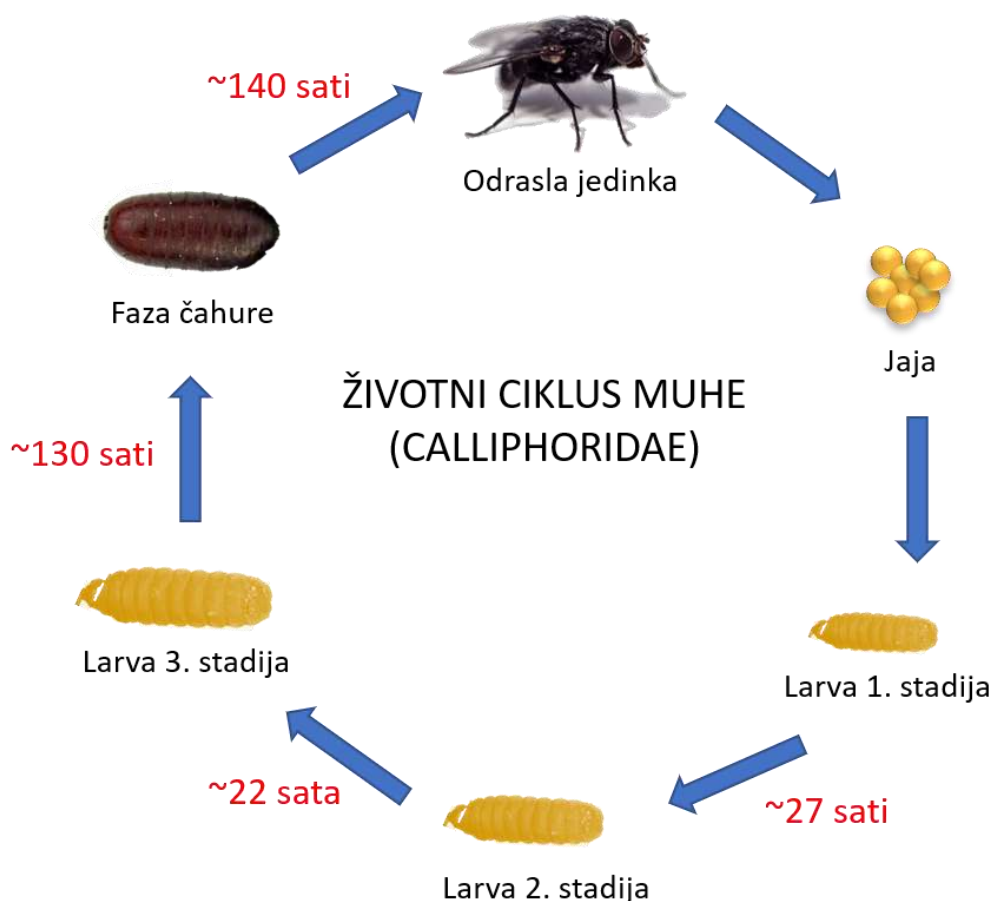
Kao rezultat toga, dolazi do pojave mrtvačkog bljedila (lat. *pallor mortis*) koje se javlja u prvim pola sata od trenutka smrti te traje narednih 8–12 sati. Jedan do šest sati nakon smrti, s prestankom cirkulacije, prestaje i sinteza adenozin tifosfata (ATP), uslijed čega se javlja mrtvačka ukočenost (lat. *rigor mortis*) koja nestaje 24–48 sati nakon smrti. Kao rezultat prestanka metaboličkih procesa u organizmu, kao i prestanka termoregulacije, u prva tri sata dolazi i do postepenog hlađenja tijela, a nakon 8–36 sati, zavisno od okolišnih uslova (a prije svega temperature), leš postaje hladan što je još jedan od ranih znakova smrti, a naziva se mrtvačka hladnoća (lat. *algor mortis*). Šest do 36 sati nakon smrti nastupa razgradnja ćelija, tj. autoliza (lat. *autolysis*), kao rezultat aktivacije ćelijskih enzima. Kada vrijednost pH postane bazna, kao rezultat razgradnje proteina, dolazi do heterolitičke razgradnje tkiva pod djelovanjem mikroorganizama iz probavnog sistema i ovaj proces se naziva putrefakcija (lat. *putrefactio*). Ovaj proces se dešava 36 do 72 sata nakon smrti, a zavisi od različitih vanjskih (temperature, vlažnosti, količine kisika) i unutrašnjih (starost, zdravstveno stanje, količina masnog tkiva) faktora.

Sve navedene znake smrti vještaci medicinske struke konstatuju te na osnovu njih procjenjuju vrijeme kada je nastupila smrt. Kod leševa starijih od tri dana nije moguće procijeniti vrijeme smrti na osnovu znakova smrti i u tim slučajevima se primjenjuje entomološka analiza. Oslobođene bakterije iz gastrointestinalnog trakta oslobađaju tekućinu i gasove kao što su sumporovodik, ugljični dioksid, metan, amonijak, sumporov dioksid i vodonik kao krajnji rezultat metaboličkih procesa. Ove isparljive komponente privlače različite insekte.

Štaviše, dokazano je da različite komponente koje se oslobađaju u različitim fazama raspadanja tijela privlače različite vrste insekata. Tako su, na primjer, jedinjenja bogata sumporom, koja se oslobađaju u prvim fazama truljenja leša, odgovorna za inicijalno privlačenje muha, dok polaganje jaja kod ovih insekata započinje u fazama kada dolazi do oslobađanja jedinjenja bogatih amonijem.

Kao što smo već rekli, najčešće su prvi insekti koji koloniziraju leš iz reda muha (Diptera). Nakon što odrasle jedinice muha dospiju na leš, one polažu jaja. Dvadeset tri sata nakon polaganja jaja razvija se larva 1. stadija i ova faza traje 27 sati. Nakon ove faze nastupa 2. stadij larve, a nakon 22 sata larva prelazi u 3. stadij. Za stadij pupe potrebno je da prođe do 130 sati, a iz pupe se nakon 140 sati razvija odrasla jedinka (slika 6.16).

Vremensko variranje pojedinih stadija zavisi od dostupnosti hrane i temperature. Kako je dostupnost hrane na leševima neupitna, temperatura ostaje jedini kritičan faktor za razvoj insekata kolonizatora te je brzina smjene faza razvoja proporcionalna vrijednostima temperature.



Slika 6.16. Šematski prikaz smjene i dužine trajanja razvojnih stadija muhe

6.2.2.2 Određivanje PMI na osnovu sukcesije insekta

Kao što je već rečeno, tijelo tokom raspadanja prolazi kroz različite fiziološke promjene koje su karakteristične za pojedine faze raspadanja leša. Okvirno se te faze mogu podijeliti u pet kontinuiranih faza: svježa faza, faza nadutosti, faza truljenja, suha faza i skeletinizirana faza s brojnim potfazama (tabela 6.7).

Fauna koja dopijeva na leševe dijeli se u karakteristične grupe nekrofagnih insekata (insekti koji se hrane leševima i nastanjuju ih), predatora nekrofagne faune, mesojeda i drugih organizama koji spadaju pod oportunističke kolonizatore. Navedena fauna se međusobno prepliće i ponekad je veoma izazovno definitivno razdvojiti pojedine faze raspadanja i izolovati insekte u karakterističnim razvojnim stadijima, jer se mnoge vrste insekata mogu pojaviti kao larve u npr. fazi nadutosti, koje zatim migriraju dalje te se ponovo identificiraju u suhoj fazi.

Tabela 6.7. Prikaz dominantne faune u različitim fazama raspadanja leša

Faza	Vremenski period	Opis	Dominantna fauna
<i>Svježa faza (autoliza)</i>	<i>Neposredno nakon smrti do 48 sati</i>	<i>Nije počela degradacija unutrašnjih organa</i>	<i>Calliphoridae, Sarcophagidae i Muscidae</i>
<i>Faza nadutosti</i>	<i>2 – 12 dana</i>	<i>Evidentni podlivi, izražena napuhanost leša</i>	<i>Calliphoridae, Sarcophagidae i Muscidae</i>
<i>Faza truljenja</i>	<i>12 – 20 dana</i>	<i>Ispuštanje gasova, „ispuhivanje“ leša</i>	<i>Završen prvi val kolonizacije. Dominantni kolonizatori: Staphylinidae i Histeridae</i>
<i>Suha faza</i>	<i>20 – 40 dana</i>	<i>Na skeletu je ostala samo hrskavica, koža i kosa</i>	<i>Dermestidae, Formicidae i Collembola</i>
<i>Skeletna faza</i>	<i>Više od 40 dana</i>	<i>Prisutne samo kosti i neke rožnate tvorevine</i>	<i>Prisutni samo kolonizatori tla. Nema više forenzički značajnih vrsta.</i>

Determinacija PMI praćenjem sukcesije insekata vrši se na osnovu uspoređivanja faune sakupljene u trenutku pronalaska leša s faunom posmatranom i uzgojenom u kontrolisanim uslovima (kontrolna grupa). Sastav faune u različitim fazama raspadanja leša prikazan je u tabeli 6.8.

Tabela 6.8. Prikaz sastava faune u različitim fazama dekompozicije leša prema Megnin (1894)

Talas kolonizacije	Prosječna starost leša	Fiziološke promjene na lešu koje privlače insekte	Fauna
<i>Prvi</i>	<i>Prva tri mjeseca</i>	<i>Svježa faza (promjenjivo sa periodom godine)</i>	<i>Diptera</i> <i>Calliphoridae</i> (<i>Calliphora vicina</i> , <i>C. vomitoria</i> , <i>Lucilia spp.</i>) <i>Muscidae</i> (<i>Musca domestica</i> , <i>M. autumnalis</i> , <i>Muscina stabulans</i>)
<i>Drugi</i>		<i>Pojava mirisa</i>	<i>Sarcophaga spp. (Dipt., Sarcophagidae)</i> (pojavljuje se i u prvom talasu) <i>Cynomya spp. (Dipt., Calliphoridae)</i>
<i>Treći</i>	<i>3-6 mjeseci</i>	<i>Putrefakcija</i>	<i>Dermestes (Col., Dermestidae)</i> <i>Aglossa (Lep., Pyralidae)</i>
<i>Četvrti</i>		<i>Buterna fermentacija, bakterijska fermentacija</i>	<i>Piophilidae</i> (<i>Piophilidae</i>) <i>Madiza glabra (Dipt., Piophilidae)</i> <i>Fannia (Dipt., Fanniidae)</i> <i>Drosophilidae (Dipt.)</i> <i>Sepsidae (Dipt.)</i> <i>Sphaeroceridae (Dipt.)</i> <i>Eristalis (Dipt., Syrphidae)</i> <i>Teichomyza fusca (Dipt., Ephydriidae)</i> <i>Corynetes, Necrobia (Col., Cleridae)</i>
<i>Peti</i>	<i>4-8 mjeseci</i>	<i>Amonijačna fermentacija</i>	<i>Ophyra (Dipt., Muscidae)</i> <i>Phoridae (Dipt.)</i> <i>Thyreophoridae (Dipt.)</i> <i>Nicrophorus (Col., Silphidae)</i> <i>Silpha (Col., Silphidae)</i> <i>blister (Col., Histeridae)</i> <i>Saprinus (Col., Histeridae)</i>
<i>Šesti</i>	<i>6-12 mjeseci</i>	<i>Suha faza</i>	<i>Acari</i>
<i>Sedmi</i>	<i>1-3 godine</i>	<i>Skeletinizirani ostaci</i>	<i>Magenta patio (Col., Dermestidae)</i> <i>Anthrenus museorum (Col., Dermestidae)</i> <i>Dermestes maculatus (Col., Dermestidae)</i> <i>Tineola biselliella (Lep., Tineidae)</i> <i>T. pellionella (Lep., Tineidae)</i> <i>Monopis rusticella (Lep., Tineidae)</i>
<i>Osmi</i>	<i>3 i više godina</i>		<i>Minus brunneus (Col., Ptinidae)</i> <i>Tenebrio obscurus (Col., Tenebrionidae)</i>

6.2.2.2.1 Svježa faza (0–48 sati)

Leš u svježoj fazi još uvijek posjeduje meka tkiva koja predstavljaju savršeno stanište za polaganje jaja nekim insektima, čijim larvama ta meka tkiva predstavljaju primarni izvor hrane tokom razvoja. Svježa faza počinje neposredno nakon smrti te su određene grupe artropoda prisutne već u prvih nekoliko minuta od smrti u zavisnosti od lokaliteta na kojem se nalazi tijelo. U ovoj fazi, vrijeme kada je nastupila smrt procjenjuje se na osnovu znakova smrti. Međutim, čak i u prvih nekoliko sati insekti kolonizatori mogu biti od velikog značaja za procjenu vremena smrti. Naime, istraživanja pokazuju da već nekoliko minuta od trenutka smrti muhe osjete mirise i počinju da koloniziraju leš. Osim toga, u ovoj su fazi prisutne larve prve generacija insekata. Razvoj insekta teče u 4 faze: jaje, larva, pupa, imago. Važno je napomenuti da je kod forenzički bitnih vrsta insekata stadij jajeta nerijetko odsutan, kao što je slučaj s vrstama muha mesaruša iz porodice Sarcophagidae kod kojih se jaja razvijaju u ženki te ženke poliježu larve.

Kada larva uđe u 3. stadij razvoja, ona u naredna tri dana veoma brzo dobija na masi i veličini. Tada je leš najčešće već u fazi nadutosti. Brzina prolaska insekta kroz navedene stadije u velikoj mjeri zavisi od temperature okoline i dostupnosti hranjivih materija, kao i broja položenih larvi, pri čemu se sve larve iz istog legla ne razvijaju istom brzinom. Fauna dominantna u ovoj fazi jesu insekti iz reda muha (Diptera) i porodica Calliphoridae, Sarcophagidae i Muscidae. Upravo su muhe iz porodice Calliphoridae prve koje koloniziraju tijelo, već od najranijih faza, što je demonstrirano u većini ključnih radova na ovom polju.

Najčešća mjesta na kojima se može evidentirati prisustvo larvi su usna duplja, oči, nos, reproduktivni organi te druga otvorena vlažna mjesta ako su dovoljno izloženi vanjskim uticajima, odnosno ako nisu prekriveni odjećom. Sposobnost insekata da lociraju leš u ovoj fazi vrlo je razvijena, što je dokazano u jednom slučaju kada je pronađena aktivnost larve iz porodice Calliphoridae (zunzare) na lešu u pećini na dubini od 10 metara.

6.2.2.2.2 Faza nadutosti (2–12 dana)

U ovoj fazi koža tijela već počinje da mijenja boju k zeleno-ljubičastoj te svi podlivi postaju evidentniji. Nusprodukti rada bakterija i nagomilavanje tečnosti javljaju se na površini kože u vidu čireva ispunjenih tečnošću. Gasoviti produkti se nagomilavaju unutar leša pa dolazi do nateknuća

cijelog tijela, izbočenja očiju i mrtvačkog “sjaja” kože. Daljim raspadom ćelija, intenziviraju se autokatalitički procesi, što je vidljivo na koži koja počinje da se guli, nokti se uvlače pod kožu te dolazi do ispadanja kose. Leš emituje gasove (amonijak – NH_4 , sumporovodik – H_2S , ugljični dioksid – CO_2) koji privlače nove valove insekata. Kolonizatori ove faze ne razlikuju se bitno od kolonizatora prve faze pa se ove dvije faze često grupišu u jednu fazu.

6.2.2.2.3 Faza truljenja (12–20 dana)

Dok se prethodne dvije faze isprepliću jedna s drugom, postoji definitivan fizički marker prelaska tijela u treću fazu raspada. Naime, kada djelovanje bakterija i insekata pri raspadanju rezultira napuknućem kože i ispuštanjem gasova koji su se nakupili u prethodnoj fazi, dolazi do “ispuhivanja” tijela. Ovu fazu karakterišu veoma jaki i neugodni mirisi. U ovoj fazi javlja se velika količina larvi iz reda Diptera koje sada naseljavaju veći dio leša, a prisutan je i veliki broj tvrdokrilaca iz porodica Staphylinidae i Histeridae koji su u prethodnim fazama vrlo rijetko ili nikako kolonizirali leš.

Larve vrsta iz porodica Sarcophagidae i Calliphoridae, koje su naselile tijelo u ranijim fazama, već su prošle kroz svoj razvojni ciklus i migrirale dalje, čime je završen prvi val kolonizacije ovih insekata. Larve koje se pronađu u ovoj fazi nisu mogle biti položene u svježoj fazi ako je u pitanju leš na veoma dostupnom mjestu u prirodi. Opet, bitno je spomenuti da brzina odvijanja razvojnih procesa larvi i u ovoj fazi zavisi od ekoloških faktora sredine u kojoj se nalazi leš.

6.2.2.2.4 Suha faza ili faza poslije truljenja (20–40 dana)

Budući da su u ovoj fazi larve konzumirale većinu unutrašnjih organa i tkiva, na tijelu ostaju samo koža, kosti i hrskavica. Muhe prestaju da budu dominantni insekti na lešu te ih zamjenjuju tvrdokrilci iz porodice Dermestidae i opnokrilci iz porodice Formicidae (mravi). Tvrdokrilci naseljavaju tijelo kao adulti u prethodnoj fazi, a u suhoj fazi su prisutni i adulti i larve koje konzumiraju preostalu kožu i hrskavicu ostavljajući samo kosti. U ovoj fazi, pored insekata, evidentan je i veći broj predatora insekata kao i faune koja naseljava tlo ispod leša (grinje i skokuni – Collembola) koji postaju determinirajuće vrste za određivanje PMI u skeletnoj fazi.

6.2.2.2.5 Skeletna faza

U ovoj fazi leš se sastoji samo od kostiju i nekih rožnatih tvorevina kao što je kosa. Tokom ove faze, pH tla se vraća u normalno stanje te taksonomski bitni insekti više nisu prisutni, a na lešu neće preostati nijedan organizam krucijalan za identifikaciju osim kolonizatora samog tla. Završetak skeletne faze nije moguće odrediti jer se na skeletima mogu pronaći grupe artropoda koje naseljavaju skeletne ostatke mjesecima pa čak i godinama nakon smrti. Samo neki od njih su od pomoći pri određivanju vremena smrti te u ovoj fazi, koristeći se samo entomološkim podacima, nije moguće sa sigurnošću odrediti postmortalni interval.

6.2.3 Faktori koji utiču na sukcesiju / razvoj insekata na lešu

6.2.3.1 Uticaj temperature i vlažnosti na razvoj insekata

Insekti su ektotermni i heterotermni organizmi, za razliku od sisara koji održavaju stalnu metaboličku temperaturu, što ih čini izotermnim organizmima. Mnogi metabolički i fiziološki procesi insekata zavise od temperature, uključujući oslobađanje hormona, brzinu metabolizma i mogućnost letenja. Od okolišne temperature zavisi i brzina razvoja insekata od stadija larve do adulta. Iz ovih razloga se pridaje velika pažnja mjerenju temperature tokom različitih faza uzorkovanja te vremenskim uslovima područja. Tri faktora utiču na veličinu larvi tokom njihovog razvoja:

- brzina rasta posljednje faze larve – određuje težinu koju individua može dostići u određenom vremenskom periodu i koja je u potpunosti zavisna od okolišne temperature,
- kritična težina ili konačna težina – predstavlja masu pri kojoj sekrecija hormona prestaje kod insekata i koja je nezavisna od temperature,
- interval prestanka rasta (engl. *interval to cessation of growth* – ICG) nakon što je postignuta kritična težina (tokom ovog perioda larva može udvostručiti svoju težinu) opada pri povećanju temperature.

Poznato je da svaki insekt ima optimalnu temperaturu, tj. temperaturu na kojoj jedinke dosežu veći raspon krila i generalno stvaraju naprednije potomstvo. Dokazano je da je promjena optimalne temperature u direktnoj vezi s uvećanjem ćelija organizma, kao i s povećanjem broja ćelija. Tokom razvoja, insekt može da uđe u stanje tzv. *dijapauze*, što predstavlja stanje uzrokovano okolišnim

promjenama kao što je pad temperature ispod optimalne za razvoj, pri kojoj se zaustavlja proces presvlačenja i rasta insekta dok se ponovo ne postigne povoljna temperatura. Pad temperature predstavlja okidač za ove procese, ali se isto tako razvoj brzo nastavlja pri postizanju optimalne temperature. Jedan od važnih faktora je i količina padavina koja uveliko utiče na brzinu dekompozicije leša, ali također može dovesti do ispiranja larvi s površine leša. Fiziologija insekata se u mnogim aspektima isprepliće s njihovom ekologijom, pogotovo u današnje vrijeme, kada se u obzir moraju uzeti i klimatske promjene koje su rezultat zagađenja životne sredine te kontinuiranog uništavanja okoline u kojoj, između ostalog, obitavaju i različite invazivne vrste insekata.

6.2.3.2 *Uticaj toksina na razvoj artropoda*

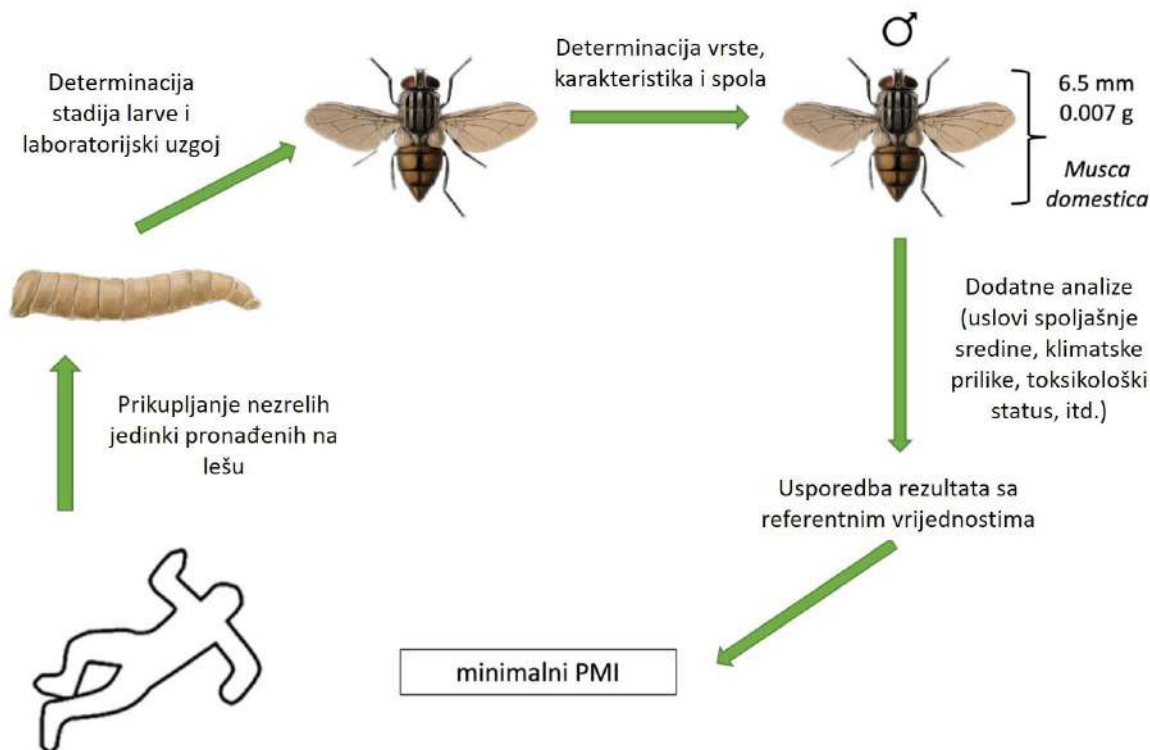
Toksikologija se, između ostalog, bavi uticajem toksina i opojnih sredstava na organizam. U posljednje vrijeme značajno se povećao broj smrtnih slučajeva uzrokovanih predoziranjima pa se u ovakvim slučajevima često događa da tijelo ostaje neotkriveno duži vremenski period, što rezultira uznapređovalim stadijima raspada leša te nesmetanom aktivnosti artropoda na lešu. U ovakvim slučajevima sukcesija artropoda se na lešu veoma često odvija u zatvorenim prostorima. U slučajevima kada nije moguće uzeti uzorke s leša, npr. ako je leš u uznapređovaloj ili skeletiniziranoj fazi raspada ili nisu dostupne tjelesne tečnosti za uzorkovanje, za detekciju toksina koriste se larve koje su se duži vremenski period hranile na tom lešu.

Entomotoksikologija predstavlja mladu nauku koja proučava toksine pronađene u larvama insekata pri medicinskoopravnim postupcima i njihovu relevantnost u određivanju uzroka smrti. Naime, za dokazivanje prisustva toksičnih komponenti u slučajevima kada su tijela u poodmaklim fazama raspadanja koriste se alternativni uzorci kao što su insekti i lutke pronađene na lešu. Prazne lutke, ostaci praznog egzoskeleta odraslih insekata (eksuvije) te fekalni materijal također se mogu koristiti za detekciju prisustva toksina. Ponekad se forenzičkim istraživanjima smrti divljih životinja koja je nastupila uslijed trovanja analiziraju nekrofagi i drugi insekti kod kojih se detektuju ksenobiotici poput lijekova i drugih toksina koji su u njihov organizam dospjeli lancem ishrane. Naime, larve insekata se aktivno hrane tkivom leša, pri čemu se ksenobiotici prenose u metabolički sistem larvi i dalje u predatorske vrste insekata koji se hrane insektima koji su u prethodnim fazama kolonizirali leš. Još jedan aspekt entomotoksikologije je i uticaj toksina na

razvoj insekata, što ima velikog značaja za tačno određivanje postmortalnog intervala. Tako na primjer, heroin i morfin koji se nađu u tkivima, a koje insekti unesu u organizam tokom hranjenja, ubrzavaju njihovo dostizanje kritične mase, ali usporavaju prelazak iz stadija lutke u stadij adulta. Zbog toga, na primjer, u slučaju larvi muha vrste *Boettcherisca peregrina* izloženih djelovanju nekim toksinima može doći do greške pri određivanju vremena razvoja larvi i do 29 sati, a od 18 do 38 sati pri određivanju vremena presvlačenja.

6.2.4 Sakupljanje entomološkog materijala i određivanje postmortalnog intervala (PMI)

Za određivanje PMI potrebno je imati specifične podatke o prisutnosti određenih grupa artropoda koje dolaze u kontakt s pronađenim lešom na području koje se istražuje. Iako su mnoge vrste muha i tvrdokrilaca kosmopolitske vrste, veoma rasprostranjene i naseljavaju većinu staništa na planeti, za što tačnije određivanje PMI neophodni su trenutni i što precizniji podaci o fauni određenog nalazišta. Osim tih podataka, kao što je ranije spomenuto, potrebni su i trenutni meteorološki podaci, kao i ostali podaci o konkretnim lokalitetima (slika 6.17).



Slika 6.17. Šema standardne metode za određivanja PMI u forenzičkoj entomologiji

Kao što je prikazano na slici 6.17, pri određivanju PMI prvi korak jeste sakupiti sve pronađene i dostupne uzorke i podatke. Zatim, treba odrediti svaku prisutnu vrstu pronađenih organizama uz pomoć taksonomskih ključeva za morfološke karakteristike insekata ili drugim molekularnim metodama, u zavisnosti od onoga što je prikladno ili dostupno u tom trenutku. Kada su vrste identificirane, potrebno je odrediti u kojoj se fazi raspada i u kojem periodu te faze analizirane vrste najčešće pojavljuju. Vrlo je važno uočiti u kojem se broju se svaka pojedina jedinka javlja jer je moguće da se u određenom broju ista jedinka pojavi i u kasnijim fazama raspada (tabela 6.8) ili kao larva u ranijim fazama, a kao adult u kasnijim fazama. Očito je da zaključak forenzičkog entomologa pri medicinskopravnim postupcima u velikom dijelu zavisi od lične opservacije i dostupnosti literature te poznavanja faune određenog lokaliteta. Forenzički entomolog će na osnovu svoga zaključka o postmortalnom intervalu biti pozvan da svjedoči na sudu i predstavi svoju metodologiju te da detaljno obrazloži određeni zaključak. Iz ovog razloga forenzički entomolog mora da bude koncizan, organizovan i siguran u svoje zaključke jer može navesti istragu u potpuno pogrešnom smjeru ako sve varijable nisu uzete u obzir.

Zbog obimnosti lokacija i različitosti uslova u kojima se mogu naći leševi, načini i brzina sakupljanja entomološkog materijala značajno variraju. Dodatna je prepreka to što forenzički entomolog skoro nikad nije prisutan na mjestu prikupljanja materijala te bi drugi forenzičari trebali biti obučeni za sakupljanje i dokumentovanje entomološkog dokaznog materijala. Vrlo je bitno da entomološki materijal bude među prvim dokumentovan jer prisustvo ljudi utiče na aktivnost insekata i drugih artropoda na lešu.

Dalje, entomolog koji analizira dostavljeni materijal treba da ima detaljne podatke o okolnostima u kojima je tijelo pronađeno, pristup meteorološkim podacima tog mjesta unazad i nekoliko godina (u zavisnosti od nivoa raspadanja tijela), detaljan opis i fotografije okoline leša te toksikološke podatke patologa i hemičara. Najbolji pristup za prikupljanje artropoda, kako bi se postiglo minimalno kompromitovanje ostataka, jeste da se na licu mjesta prikupi materijal s površine leša, ispod leša i okoline leša, dok se ostatak artropoda može sakupiti prilikom autopsije uz nadzor patologa. Fotografijom treba dokumentovati mjesta nakupljanja artropoda u krugu od minimalno 5 metara od leša i na lešu. Fotografisanje lokaliteta vrši se iz smjera svakog pola na kompasu uz pisanu dokumentaciju te uključuje i krupni kadar iznad tijela kako bi se dokumentovao nivo izlaganja tijela direktnoj sunčevoj svjetlosti i količini padavina.

Fotografija je vrijedna podrška pisanim opservacijama, jer često prikazuje materijal i podatke koji nisu uvijek prikupljeni prije pomicanja tijela, kao i one kojima inicijalno nije data velika važnost i nisu prema protokolu uvijek prikupljeni. Bitno je također sakupiti uzorke tečnosti tijela s područja glave, prsa i abdomena, dakle s područja gdje je najkoncentriranije meko tkivo. Forenzički entomolog mora sarađivati s ostalim forenzičarima kako na terenu tako i u laboratoriji te razmjenjivati podatke kako bi došao do što preciznijih zaključaka u određivanju PMI.

Nadalje, mora imati pristup profilu žrtve zbog moguće konzumacije opojnih sredstava koja su se u trenutku smrti mogla nalaziti u organizmu te shodno tome uticati na kolonizaciju artropoda. Bez obzira na artropode pronađene na lešu, forenzički entomolog uzima u obzir dokumentovane insekte na tom području, jer prisustvo / odsustvo određenih grupa, zajedno s drugim tragovima, može biti indikator da je leš pomjeren s primarnog lokaliteta odlaganja. Meteorološki podaci su ključni za određivanje trajanja razvojnog ciklusa artropoda. Vlažnost, temperatura, količina padavina te snježni pokrivač faktori su koji utiču na kolonizaciju i brzinu razvoja artropoda do faze adulta. Svi su ti faktori su veoma važni jer se njihovom analizom može potvrditi da li su uzorkovane prve, druga ili čak treća generacija adulta. Na terenu se mjeri trenutna temperatura zraka, temperatura površinskog sloja tla i na 10 cm dubine, temperatura površine leša, temperatura između tijela i tla, temperatura u centru nakupine larvi te naposljetku temperatura neposredno prije pomjerenja tijela.

6.2.4.1 Tehnike prikupljanja i identifikacije entomološkog materijala

Što se tiče načina prikupljanja samih insekata i drugih artropoda, leteći insekti se prikupljaju entomološkom mrežom. Larve insekata i drugih artropoda dovoljno je sakupiti tupim pincetama ili rukavicama. Nakon sakupljanja, insekti se za potrebe forenzičke analize prebacuju u etil alkohol određene koncentracije (slika 6.18). Ako će se uzorak identificirati koristeći tradicionalne taksonomske karakteristike, tj. morfološke karakteristike, preporučuje se korištenje minimalno 75% etil alkohola.

Međutim, ako će se larve identificirati korištenjem molekularnogenetičke analize, bolje je koristiti 99% etil alkohol jer je dokazano da se iz tako pohranjenog materijala izoluju veće količine DNK, za razliku od 75% etil alkohola koji značajno smanjuje kvalitetu i kvantitetu izolovane DNK.

Svaki prikupljeni uzorak treba biti adekvatno obilježen. To podrazumijeva lokaciju, vrijeme i datum uzorkovanja. Uzorci s različitih lokacija ne smiju se miješati! Različite razvojne faze artropoda trebalo bi prezervirati posebno. Larve se prezerviraju najbolje tako što se stave u prokuhanu vodu oko 60 sekundi pa u etil alkohol. Idealno bi bilo prezervirati nekoliko živih larvi jer ključevi za identifikaciju larvi nisu uvijek dovoljno precizni pa bi iste larve trebalo pustiti da se razviju do adulta, ako se mogu stvoriti povoljni uslovi u laboratoriji. Kod prikupljanja posebnu pažnju treba posvetiti otvorima tijela kao i genitalnom području jer su ta područja među prvim kolonizirana. Velika aktivnost larvi u genitalnom području, u velikom broju slučajeva, upućuje na traumu u tom predjelu. Kod leševa pronađenih u zatvorenim nastambama ili prostorima i predmetima druge vrste (plastične kese, kovčezi i dr.), gdje se leš nalazi u odmaklim fazama raspada, potrebno je posebnu pažnju posvetiti prikupljanju entomološkog materijala s otvora zatvorenog prostora. Naime, prilikom raspadanja tijela dolazi do pojave neprijatnog mirisa koji privlači artropode. U zatvorenim prostorima jedinice bivaju zaustavljene na otvorima kao što su štokovi vrata ili žlijeb prozora. Ustvari, i prije pronalaska leša, pojačana aktivnost artropoda na poklopcu nekog zatvorenog predmeta ili s vanjske strane stambenih jedinica može upućivati na prisustvo organske materije u fazi raspadanja. U takvim slučajevima entomološki podaci se interpretiraju drugačije.

Za početak, temperatura u zatvorenim prostorijama može biti znatno viša nego vanjska, naročito ako je i prostor izložen direktnom sunčevom svjetlu. To za posljedicu ima da se insekti i artropode mnogo brže razvijaju te dolazi i do brže smjene generacija, što može dovesti do grešaka u determinaciji PMI. Ako su već prisutni skeletinizirani ostaci ili je leš pronađen u kasnim fazama raspada, aktivnost insekata će biti evidentnija oko leša, dakle na prozorima, zidovima, ispod tepiha kao i oko izvora vode ili hrane. Pri prikupljanju materijala u ovakvim slučajevima veću pažnju treba posvetiti pronalasku čahura i determinaciji broja smijenjenih generacija. Ako dođe do dehidracije materijala (larvi) zbog neadekvatnih metoda



Slika 6.18. Morilica sa etil alkoholom

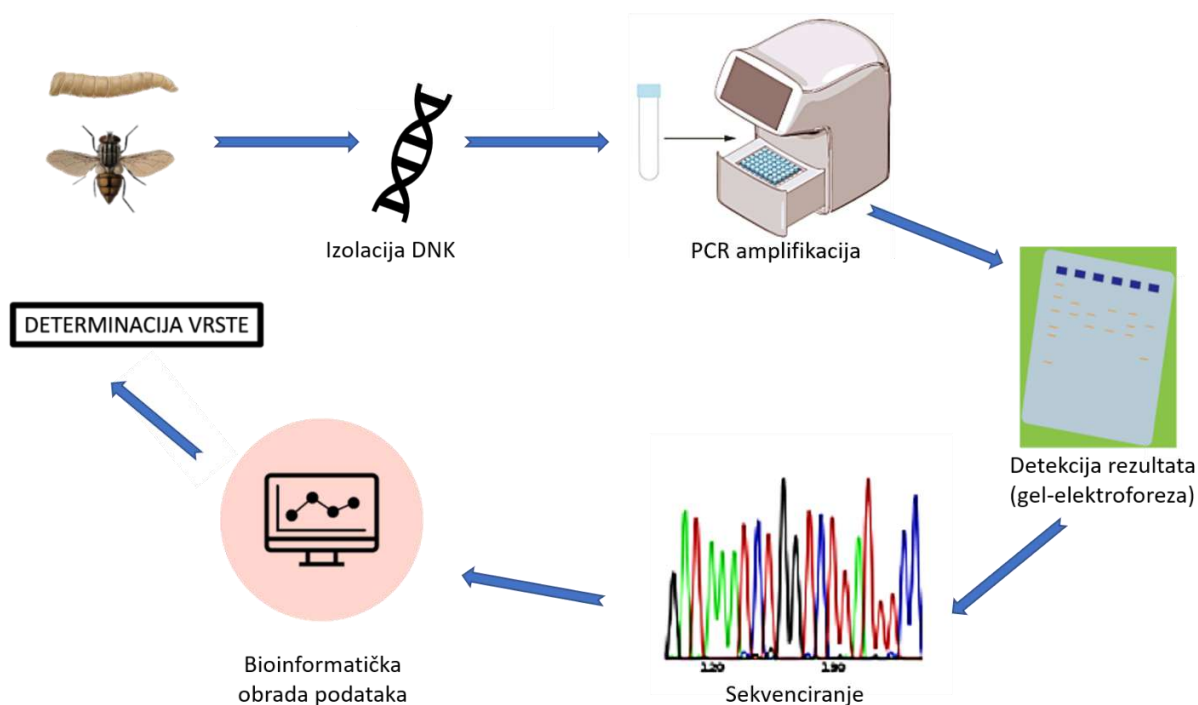
skladištenja, moguće ih je rehidrirati stavljanjem u 80% etil alkohol u trajanju do tri dana. Što se tiče akvatičnih sredina, sakupljanje artropoda vrši se zajedno sa supstratom. Treba napomenuti da su larve akvatičnih organizama često vrlo teško uočljive pa se posebna pažnja posvećuje prilikom prikupljanja jedinki insekata. Separacija jedinki od ostalog materijala najčešće se vrši u laboratoriji. Veličina larvi insekata (dužina, širina ili visina) ukazuje na relativni period razvoja. Međutim, na ove mjere utiču neki drugi faktori kao što su lijekovi, konkurencija, temperatura, očuvanje i greške mjerenja. Određivanje starosti stadija lutke mnogo je teže i stoga se, za precizniju procjenu starosti, analizira unutrašnja morfologija lutke. Histološkom analizom utvrđuju se unutrašnje morfološke promjene kao što su histoliza i histogeneza tkiva, tranzicije organa i prepoznavanje letećih mišića grudnog koša, čime se stvara hronologija razvoja. Optička tomografija i hiperspektralno snimanje pomažu u procjeni starosti živih stadija insekata bez potrebe za destruktivnom analizom. Također, skenirajuća elektronska mikroskopija i mikrokompjuterska tomografija koriste se za vizualizaciju morfološkog razvoja sačuvanih primjeraka. Kutikularni ugljikohidrat je korisno jedinjenje koje ima mnoge primjene u oblasti forenzičke entomologije, koja uključuje identifikaciju vrsta, određivanje geografskog porijekla uzorka i procjenu starosti pojedinačnih insekata za izračunavanje minimalnog PMI. U posljednje vrijeme primjenjuje se analiza ekspresije gena za određivanje razvojnog stadija individua.

6.2.4.2 Molekularnogenetička analiza entomološkog dokaznog materijala

U forenzičkoj entomologiji, molekularnogenetičke analize se najčešće primjenjuju za determinaciju vrsta. Ostale primjene obuhvataju identifikaciju sadržaja probavnog trakta insekata, kao i karakterizaciju populacijskogenetičke strukture vrste od interesa. Za spomenute aspekte primjene analizira se molekula DNK, međutim i analiza iRNK ima vrlo važnu primjenu, posebno u kontekstu određivanja PMI.

6.2.4.2.1 Determinacija vrste

Molekularnogenetička determinacija vrste je rutinska analiza koja se primjenjuje u forenzičkoj entomologiji (slika 6.19). Naime, u fazi larve veoma je teško precizno determinisati njenu taksonomsku pripadnost na osnovu anatomskih karakteristika, posebno na nivou vrste, zbog čega se za ove svrhe često primjenjuje analiza DNK.



Slika 6.19. Šematski prikaz molekularnogenetičke analize za determinaciju vrste

Pri tome, najčešće se analiziraju polimorfizmi na mtDNK, i to uglavnom geni za podjedinice I i II citohrom oksidaze (COI+II). Osim ove, koriste se još i analiza polimorfizama nasumično amplificirane DNK (RAPD), analiza 28S ribosomske podjedinice, analiza ribosomskog regiona ITS (engl. *Internal Transcribed Spacer*) te analiza podjedinice 5 NADH dehidrogenaze. Sve navedene analize rade se primjenom tehnologije PCR – RFLP ili tehnologije sekvenciranja. Samo jedan od primjera je slučaj u kojem je korištena analiza RAPD za determinaciju vrste *Oiceoptoma thoracicum* iz porodice Silphidae, pronađene na lešu u kasnim fazama raspadanja leša, za koji se drugim metodama nije moglo procijeniti vrijeme smrti.

Dokazivanje da larve pronađene na lešu pripadaju spomenutoj, a ne nekoj drugoj vrsti, omogućilo bi precizniju procjenu vremena kada je nastupila smrt. Primjenom RAPD analize generiran je DNK profil za koji je utvrđeno da pripada vrsti *Oiceoptoma thoracicum* koja je kolonizirala leš u kasnim fazama raspadanja.

6.2.4.2.2 Populacijskogenetička analiza

Smatra se da se većina strvinarskih vrsta insekata, kao što su npr. muhe zonzare (*Calliphoridae*), javlja u formi uniformne populacije u kojoj se individue nasumično pare. Međutim, neki autori navode da se kod nekih vrsta muha, kao što je vrsta muhe zonzare (*Phormia regina*), javlja populacijska diferencijacija zasnovana na geografskoj diferencijaciji. Naime, autori su ustanovili da postoje fenotipske, a samim tim i genotipske razlike između dvije populacije iste vrste na različitim lokalitetima međusobno udaljenim svega oko 70 km. Ova spoznaja bi mogla imati veliku važnost u kontekstu analize postmortalno relociranih trupala, gdje bi se primjenom populacijskogenetičkih analiza moglo utvrditi mjesto na kojem je nastupila smrt.

Iako se za populacijskogenetičke analize strvinarskih vrsta najčešće koriste AFLP, RFLP te polimorfizmi jednog nukleotida (SNP), upotreba mikrosatelita je zlatni standard, prije svega zbog mogućnosti precizne detekcije razlika u alelnim varijantama, ali i pouzdane interpretacije rezultata analize koji se zasnivaju na Mendelijansko-Hardy-Weinberg principima. Neki istraživači navode važnost utvrđivanja srodstva primjenom mikrosatelitnih markera u slučajevima pomjeranja leševa. Naime, dokazivanjem srodstva između larvi koje ostanu na primarnom mjestu zločina i odraslih jedinki pronađenih na lešu, moguće je dokazati da je došlo do pomjeranja leša.

Jedan od primjera primjene populacijskogenetičke analize je slučaj iz 1989. koji se desio u oblasti južne Italije. Naime, policija je u podrumu jedne seoske kuće, koja je pretraživana kao potencijalno mjesto zločina, pronašla larve muhe vrste *Chrysomya albiceps*, ali ne i tijelo žrtve. Nakon izvjesnog vremena u blizini je pronađeno i tijelo žrtve s kojeg su prikupljene odrasle jedinke ove vrste muhe. DNK analizom larvi pronađenih na mjestu zločina i odraslih jedinki prikupljenih s leša ustanovljeno je da izolovane DNK potiču od iste populacije, čime je dokazano da je tijelo pomjereno s mjesta zločina.

6.2.4.2.3 Genotipizacija sadržaja crijeva insekata

Analiza sadržaja crijeva insekata primjenom molekularnogenetičkih metoda ima nekoliko potencijalnih primjena u forenzičkoj analizi. Tako je, na primjer, analizom crijevnog sadržaja komaraca (*Culicidea*) moguće utvrditi genotip potencijalnog počinioca djela te ga povezati s mjestom zločina na kojem je pronađen komarac. Također, analizom crijevnog sadržaja stidne vaši

(*Pediculis pubis*) prenesene tokom seksualnog napada moguće je utvrditi počinioca krivičnog djela. U slučajevima kada se leš pronade u zatvorenom prostoru, moguće je izolovati DNK iz crijevnog sadržaja adulta, ali i larvi muha. Bez obzira na činjenicu da kod larvi muha dolazi do parcijalne peroralne digestije, moguće je dobiti DNK profil umrle osobe iz crijevnog sadržaja larve koristeći se komercijalnim setovima. To može biti od velikog značaja u slučajevima kada zbog različitih razloga nije moguće utvrditi identitet nastradale osobe. Međutim, ograničavajuća okolnost za rutinsku primjenu ovog aspekta molekularnogenetičke analize forenzički relevantnih insekata je brzina digestijskog procesa u probavnom traktu insekata koja kod većine vrsta završava nakon 24 sata. Zbog toga je od krucijalne važnosti veoma brzo prikupiti i sačuvati larve pronađene na mjestu zločina.

6.2.4.2.4 Analiza molekule RNK

Iako je analiza molekule DNK izuzetno korisna u forenzičkoj entomologiji, u posljednje vrijeme sve se više govori o primjeni analize molekule RNK u rješavanju forenzičkih slučajeva. Razlog što je molekula RNK bila tek drugi izbor u forenzičkim analizama jest činjenica da ona brže degradira u poređenju s molekulom DNK, zbog čega i sama analiza ima manji forenzički značaj. Analizom RNK moguće je determinirati aktivne gene u trenutku procesuiranja uzorka insekta prikupljenog s mjesta zločina. Tokom svog razvojnog ciklusa insekti prolaze kroz različite smjene oblika i veličina, međutim, u nekim fazama razvojnog ciklusa morfološke promjene su veoma diskretne, što otežava procjenu PMI. Tipičan primjer je treći stadij larve muhe zunzare, koji može trajati veoma dugo, a pri tome nije moguće razlikovati larve koje se hrane i one koje su prestale da se hrane. S obzirom na to da se ove dvije vrste larvi javljaju u različitim fazama trećeg larvenog stupnja, njihova precizna determinacija je vrlo važna za što preciznije određivanje PMI.

Iako je analiza unutrašnjih organa jedan od mogućih determinacijskih pristupa, veća se pažnja u naučnoj zajednici pridaje analizi genske ekspresije, mjerenjem nivoa iRNK u tkivima larvi. Naime, u tkivima larvi koje se hrane i onih koje se ne hrane, detektuje se različita koncentracija dva gena iRNK koja su uključena u metaboličke procese ovog larvenog stadija. Ipak, ovakve vrste analiza ne primjenjuju se rutinski u forenzičke svrhe prvenstveno zbog već spomenute činjenice da molekula RNK ima relativno nisku stabilnost tokom dužeg vremenskog perioda.

U novije vrijeme sekvencirani su transkriptomi (genomi RNK) nekoliko vrsta forenzički relevantnih insekata (*Sarcophaga peregrina*, *Aldrichina grahami*, *Chrysomya megacephala*), što bi moglo da ima značajnu primjenu u budućim postupcima preciznijeg određivanja minimalnog postmortalnog intervala.

Literatura

- Aarnes, S.G., Hagen, S.B., Andreassen, R., Schregel, J., Knappskog, P.M., Hailer, F., Stenhouse, G., Janke, A., Eiken, H.G. (2015). Y-chromosomal testing of brown bears (*Ursus arctos*): Validation of a multiplex PCR-approach for nine STRs suitable for fecal and hair samples. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 197-204.
- Ahatović, A., Brkić, I., Cokoja, L., Muhović, A., Durmić-Pašić, A. (2018). Incidence of horse meat in processed food on B&H market. *Genetics & Applications*, 2(2): 57-61.
- Alasalvar, C., Taylor, K.D.A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 79(2), 145-150.
- Almond, R.E.A., Grooten M., Petersen, T. (Eds.). (2020). *Living Planet Report 2020 - Bending the curve of biodiversity loss*. Gland, Švicarska: World Wildlife Fund (WWF).
- Amendt, J., Goff, M.L., Campobasso, C.P., Grassberger, M. (Eds.) (2010). *Current Concepts In Forensic Entomology*. Dordrecht, Nizozemska: Springer.
- Arenas, M., Pereira, F., Oliveira, M., Pinto, N., Lopes, A. M., Gomes, V., Carracedo, A., Amorim, A. (2017). Forensic genetics and genomics: Much more than just a human affair. *PLoS Genetics*, 13(9), 1006960.
- Benecke, M. (2001). A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120(1-2), 2-14.
- Benecke, M. (2005). Arthropods and Corpses. In M. Tsokos (Ed.), *Forensic Patology Reviews* (vol. 2), (pp 207-240). New Jersey, USA: Humana Press.
- Berger, B., Berger, C., Hecht, W., Hellmann, A., Rohleder, U., Schleenbecker, U., Parson, W. (2014). Validation of two canine STR multiplex-assays following the ISFG recommendations for non-human DNA analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 8(1), 90-100.
- Berger, B., Berger, C., Heinrich, J., Niederstätter, H., Hecht, W., Hellmann, A., Rohleder, U., Schleenbecker, U., Morf, N., Freire-Aradas, A., McNevin, D., Phillips, C., Parson, W. (2018). Dog breed affiliation with a forensically validated canine STR set. *Forensic Science International: Genetics*, 37, 126-134.
- Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. (1992). DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1(3), 161-173.
- Boehme, P., Spahn, P., Amendt, J., Zehner, R. (2013). Differential gene expression during metamorphosis: a promising approach for age estimation of forensically important *Calliphora vicina* pupae (Diptera: Calliphoridae). *International Journal of Legal Medicine*, 127(1), 243-249.
- Budowle, B., Garofano, P., Hellman, A., Ketchum, M., Kanthaswamy, S., Parson, W., van Haeringen, W., Fain, S., Broad, T. (2005). Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine*, 119(5), 295-302.
- Butler, J.M., David, V.A., O'Brien, S.J., Menotti-Raymond, M. (2002). The MeowPlex: A New DNA Test Using Tetranucleotide STR

- Markers for the Domestic Cat. *Profiles in DNA (Promega)*, 5(2), 7-10.
- Byrd, J.H., Castner, J.L. (2010). *Forensic entomology - The Utility of Arthropods in Legal Investigations* (2nd Edition). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Carracedo, A., Sobrino, B., Lareu, M.V. (2007). Forensic DNA typing technologies: a review. In M.J. Bogusz (Ed.), *Handbook of Analytical Separations* (vol. 7), (pp 560-623). Amsterdam, Nizozemska: Elsevier.
- Chown, S.L., Nicolson, S.W. (2004). *Insect Physiological Ecology—mechanisms and patterns*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Ciampolini, R., Cecchi, F., Spinetti, I., Rocchi, A., Biscarini, F. (2017). The use of genetic markers to estimate relationships between dogs in the course of criminal investigations. *BMC Research Notes*, 10, 414.
- Clarke, M., Vandenberg, N. (2010). Dog attack: the application of canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 6(3), 151-157.
- D'Andrea, E., Fridez, F., Conquoz, R. (1998). Preliminary experiments on the transfer of animal hair during simulated criminal behavior. *Journal of Forensic Science*, 43(6), 1257-1258.
- de Groot, M., Anderson, H., Bauer, H., Bauguil, C., Bellone, R.R., Brugidou, R., Buckley, R.M., Dovč, P., Forman, O., Grahn, R.A., Kock, L., Longeri, M., Mouysset-Geniez, S., Qiu, J., Sofronidis, G., van der Goor, L.H.P., Lyons, L.A. (2021). Standardization of a SNP panel for parentage verification and identification in the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Animal Genetics*, 52(5), 675-682.
- de Groot, M., van Haeringen, W.A. (2017). An evaluation of the International Society for Animal Genetics recommended parentage and identification panel for the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). *Animal Genetics*, 48(4), 431-435.
- De, S., Brahma, B., Polley, S., Mukherjee, A., Banerjee, D., Gohaina, M., Singh, K.P., Singh, R., Datta, T.K., Goswami, S.L. (2011). Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*, 22(5), 690-696.
- Denlinger, D.L., Lee, R.E.Jr. (Eds.) (2010). *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI). (2015). *Best Practice Manual for the Application of Molecular Methods for the Forensic Examination of Non-Human Biological Traces* (ENFSI-BPM-APS-01, v.01-2015).
- Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., Martín, R. (2010). A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species. *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), 408-21.
- Fernandez, M.E., Goszczynski, D.E., Liron, J.P., Villegas-Castagnasso, E.E., Carino, M.H., Ripoli, M.V., Rogberg-Munoz, A., Posik, D.M., Peral-Garcia, P., Giovambattista, G. (2013). Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd. *Genetics and Molecular Biology*, 36(2), 185-191.
- Fridolfsson, A.K., Ellegren, H. (1999). A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of Avian Biology*, 30(1), 116-121.
- Gennard, D.E. (2007). *Forensic Entomology: An Introduction*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Giuffra, E., Bernatchez, L., Guyomard, R. (1994). Mitochondrial control region and protein

- coding genes sequence variation among phenotypic forms of brown trout *Salmo trutta* from northern Italy. *Molecular Ecology*, 3(2), 161-171.
- Goff, L.M. (2001). *A fly for the prosecution—how insect evidence helps solve crimes*. Cambridge, Massachusetts, USA: Harvard University Press.
- Goff, M.L., Brown, W.A., Hewadikaram, K.A., Omori, A.I. (1991). Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. *Journal of Forensic Sciences*, 36(2), 537-542.
- Goncalves, J., Pereira, F., Amorim, A., van Asch, B. (2012). New method for the simultaneous identification of cow, sheep, goat, and water buffalo in dairy products by analysis of short species-specific mitochondrial DNA targets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(42), 10480-10485.
- Gunn, A. (2009). *Essential Forensic Biology* (2nd Edition). Chichester, UK: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd.
- Gupta, S.K., Thangaraj, K., Singh, L. (2006). A simple and inexpensive molecular method for sexing and identification of the forensic samples of elephant origin. *Journal of Forensic Science*, 51(4), 805-807.
- Harvey, M.L., Gasz, N.E., Voss, S.C. (2016). Entomology-based methods for estimation of postmortem interval. *Research and Reports in Forensic Medical Science*, 6, 1-9.
- Heaton, M.P., Harhay, G.P., Bennett, G.L., Stone, R.T., Grosse, W.M., Casas, E., Keele, J.W., Smith, T.P.L., Chitko-McKown, C.G., Laegreid, W.W. (2002). Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle. *Mammalian Genome*, 13(5), 272-281.
- Holl, H.M., Vanhnasy, J., Everts, R.E., Hoefs-Martin, K., Cook, D., Brooks, S.A., Carpenter, M.L., Bustamante, C.D., Lafayette, C. (2017). Single nucleotide polymorphisms for DNA typing in the domestic horse. *Animal Genetics*, 48(6), 669-676.
- James, S.H., Nordby, J.J. (Eds.) (2009). *Forensic science: An introduction to scientific and investigative techniques* (3rd Edition). Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Jeffreys, A.J., Morton, D.B. (1987). DNA fingerprinting of dogs and cats. *Animal Genetics*, 18(1), 1-15.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985). Individual-specific „fingerprints“ of human DNA. *Nature*, 316, 76-79.
- Joseph, I., Mathew, D.G., Sathyan, P., Vargheese, G. (2011). The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. *Journal of Forensic Dental Sciences*, 3(2), 89-91.
- Jugo, A., Muzaferović, Š. (2008). Neki podaci o primjeni forenzičke entomologije u Bosni i Hercegovini. *Prilozi fauni Bosne i Hercegovine*, 4, 40-47.
- Kanthaswamy, S. (2015) Domestic animal forensic genetics - Biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. *Animal Genetics*, 46(5), 473-484.
- Kim, J.Y., Lim, H.Y., Shin, S.E., Cha, H.K., Seo, J.H., Kim, S.K., Park, S.H., Son, G.H. (2018). Comprehensive transcriptome analysis of *Sarcophaga peregrina*, a forensically important fly species. *Scientific Data*, 5, 180220.
- Kumar, V., Chandra, K., Kundu, S., Tyagi, K., Laskar, B.A., Singha, D., Chakraborty, R., Pakrashi, A. (2019). Utility of mitochondrial DNA in wildlife forensic science: reliable identification of confiscated materials from Eastern India. *Mitochondrial DNA Part B*, 4(1), 583-588.

- Lee, M., Hwang, I.K., Jung, J.Y., Kim, J.Y., Chang, M., Moon, S. (2021). Construction of an in-house allelic ladder for Canine Genotypes™ Panel 2.1 Kit. *Journal of Forensic Science*, 66(6), 2362-2368.
- Linacre, A., Gusmão, L., Hecht, W., Hellmann, A. P., Mayr, W. R., Parson, W., Prinz, M., Schneider, P. M., Morling, N. (2011). ISFG: recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. *Forensic Science International: Genetics*, 5(5), 501-505.
- Liu, Z., Han, H., Meng, F., Jiang, Y., Cai, J. (2020). Dynamic transcriptome profiling exploring cold tolerance in forensically important blow fly, *Aldrichina grahami* (Diptera: Calliphoridae). *BMC Genomics*, 21(1), 92.
- Lorenzini, R. (2005). DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: A case study. *Forensic Science International*, 153(2-3), 218-221.
- Mafrá, I., Roxo, A., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P.P. (2007). A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *International Dairy Journal*, 17(9), 1132-1138.
- McClure, M.C., McCarthy, J., Flynn, J., Weld, R., Keane, M., O'Connell, K., Mullen, M.P., Waters, S., Kearney, J.F. (2015). SNP selection for nationwide parentage verification and identification in beef and dairy cattle. In Z. Kowalski, N. Petreny, M. Burke, P. Bucek, L. Journaux, M. Coffey, C. Hunlun, D. Radzio (Eds.), *Proceedings of the ICAR Technical Meeting held in Krakow, Poland, 10-12 June 2015* (ICAR Technical Series, no. 19) (pp 175-181). Rim, Italija: The International Committee for Animal Recording (ICAR).
- McClure, M.C., McCarthy, J., Flynn, P., McClure, J.C., Dair, E., O'Connell, D.K., Kearney, J.F. (2018). SNP Data Quality Control in a National Beef and Dairy Cattle System and Highly Accurate SNP Based Parentage Verification and Identification. *Frontiers in Genetics*, 9, 84.
- Menotti-Raymond, M.A., David, V.A., O'Brien, S.J. (1997). Pet cat hair implicates murder suspect. *Nature*, 386(6627), 774.
- Menotti-Raymond, M.A., David, V.A., Wachter, L.L., Butler, J.M., O'Brien, S.J. (2005). An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *Journal of Forensic Science*, 50(5), 1061-1070.
- Minakshi, P., Shafiq, M., Alisha, A., Ranjan, K., Kumar, P., Anshul, B., Singh, R., Basanti, Supriya, Prasad, G. (2013). Animal Forensics and Applications. In R.K. Salar, S.K. Gahlawat, P. Siwach, J.S. Duhan (Eds.), *Biotechnology: Prospects and Applications*, (pp 265-286). New Delhi, India: Springer.
- Pascal, G., Mahé, S. (2001). Identity, traceability, acceptability and substantial equivalence of food. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand)*, 47(8), 1329-1342.
- Pérez-Marcos, M., Arnaldos, M., García, M.D., Presa, J.J. (2017). Examining the sarcosaprophagous fauna in a natural mountain environment (Sierra Espuña, Murcia, Spain). *Annales de la Société Entomologique de France*, 52(5), 1-17.
- Pickering, T.R. (2001). Carnivore voiding: a taphonomic process with the potential for the deposition of forensic evidence. *Journal of Forensic Sciences*, 46(2), 406-411.
- Pilgrim, K.L., McKelvey, K.S., Riddle, A.E., Schwartz, M.K. (2005). Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 60-61.
- Primrose, S., Woolfe, M., Rollinson, S. (2010). Food forensics: methods for determining the

- authenticity of food stuffs. *Trends in Food Science & Technology*, 21(12), 582-590.
- Purwaningrum, M., Nugroho, H.A., Asvan, M., Karyanti, K., Alviyanto, B., Kusuma, R., Haryanto, A. (2019). Molecular techniques for sex identification of captive birds. *Veterinary World*, 12(9), 1506-1513.
- Radko, A., Podbielska, A., Wierzbowska, I.A. (2022). The assessment of the efficacy of STRs panels recommended by the ISAG for canine pedigrees analysis for forensic casework. *Annals of Animal Science*, 22(3), 885-889.
- Rivers, D.B., Dahlem, G.A. (2014). *The Science of Forensic Entomology*. Chichester, UK: Wiley - Blackwell, John Wiley & Sons, Ltd.
- Roccaro, M., Bini, C., Fais, P., Merialdi, G., Pelotti, S., Peli, A. (2021). Who killed my dog? Use of forensic genetics to investigate an enigmatic case. *International Journal of Legal Medicine*, 135(2), 1-6.
- Romain, N., Brandt-Casadevall, C., Dimo-Simonin, N., Michaud, K., Mangin, P., Papilloud, J. (2002). Post-mortem castration by a dog: a case report. *Medicine, Science, and the Law*, 42(3), 269-271.
- Rubinoff, D., Sperling, F.A.H. (2004). Mitochondrial DNA sequence, morphology and ecology yield contrasting conservation implications for two threatened buckmoths (Hemileuca: Saturniidae). *Biological Conservation*, 118(3), 341-351.
- Šatrović, A., Krkalić, L., Goletić, T., Hadžiomerović, F., Mulabdić, F. (2011). Forenzička entomologija. *Veterinarski Žurnal Republike Srpske (Banja Luka)*, 11(1), 69-75.
- Service, M. (2012). *Medical Entomology for Students* (5th Edition). Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Siva Prasad, M.S., Aneesh, E.M. (2022). Tools and techniques in forensic entomology- A critical review. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(4), 2785-2794.
- Smith, K.G.V. (1986). *A manual of forensic entomology*. London, UK: The Trustees of the British Museum (Natural History).
- Stern, D.B., Castro Nallar, E., Rathod, J., Crandall, K.A. (2017). DNA Barcoding analysis of seafood accuracy in Washington, D.C. restaurants. *PeerJ*, 5, 3234.
- Strucken, E.M., Lee, S.H., Lee, H.K., Song, K.D., Gibson, J.P., Gondro, C. (2015). How many markers are enough? Factors influencing parentage testing in different livestock populations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133(1), 13-23.
- Szpila, K., Richet, R., Pape, T. (2015). Third instar larvae of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) of forensic importance—critical review of characters and key for European species. *Parasitology Research*, 114(6), 2279-2289.
- Tsuji, A., Ishiko, A., Kimura, H., Nurimoto, M., Kudo, K., Ikeda, N. (2008). Unusual death of a baby: a dog attack and confirmation using human and canine STRs. *International Journal of Legal Medicine*, 122(1), 59-62.
- van Asch, B., Pinheiro, R., Pereira, R., Alves, C., Pereira, V., Pereira, F., Gusmão, L., Amorim, A. (2010). A framework for the development of STR genotyping in domestic animal species: characterization and population study of 12 canine X-chromosome loci. *Electrophoresis*, 31(2), 303-308.
- Van Eenennaam, A.L., Weaver, R.L., Drake, D.J., Penedo, M.C., Quaas, R.L., Garrick, D.J., Pollak, E.J. (2007). DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. *Journal of Animal Science*, 85(12), 3159-3169.
- Wasser, S.K., Joseph Clark, W., Drori, O., Stephen Kisamo, E., Mailand, C., Mutayoba, B., Stephens, M. (2008). Combating the illegal trade in African elephant ivory with DNA

- forensics. *Conservation Biology: The Journal of the Society for Conservation Biology*, 22(4), 1065-1071.
- Wells, J.D., Stevens, J.R. (2008). Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, 53, 103-120.
- Wictum, E., Kun, T., Lindquist, C., Malvick, J., Vankan, D., Sacks, B. (2013). Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework. *Forensic Science International: Genetics*, 7(1), 82-91.
- Wu, X.L., Xu, J., Li, H., Ferretti, R., He, J., Qiu, J., Xiao, Q., Simpson, B., Michell, T., Kachman, S.D., Tait, R.G., Jr, Bauck, S. (2019). Evaluation of genotyping concordance for commercial bovine SNP arrays using quality-assurance samples. *Animal Genetics*, 50(4), 367-371.
- Zhang, M., Yu, H., Yang, Y., Song, C., Hu, X., Zhang, G. (2013). Analysis of the transcriptome of blowfly *Chrysomya megacephala* (Fabricius) larvae in responses to different edible oils. *PLoS One*, 8(5), 63168.

The background of the entire page is a microscopic image of various bacterial cells. Some cells are arranged in long, thin chains, while others are in clusters or as individual spheres. The colors range from a deep teal to a bright, almost yellow-green, giving it a vibrant, scientific appearance.

7. FORENZIČKA MIKROBIOLOGIJA

RENATA BEŠTA-GAJEVIĆ

Mikrobiologija je kompleksna nauka koja proučava životne oblike veoma malih dimenzija koji se ne vide golim okom, odnosno nauka koja proučava mikroorganizme. Naziv mikrobiologija potiče od grčke riječi *micro* što znači “malen”, *bios*, što označava “život”, i riječi *logos*, koja znači “nauka”. Mikrobiologija se bavi izučavanjem morfologije, građe, fiziologije, uslova razvoja mikroorganizama, kao i drugih zakonitosti na kojima počiva život mikroba u prirodnim i vještačkim uslovima.

Mikroorganizmi su veoma heterogena skupina i na osnovu organizacije ćelije dijele se na *prokariote* i *eukariote*. U mikroorganizme s prokariotskom organizacijom ćelije spadaju domena *Bacteria* i *Archaea*, a u mikroorganizme koji imaju eukariotsku ćeliju ubrajaju se alge (jednoćelijske), gljivice (plijesni i kvasnice) i praživotinje (*Protozoa*). Osim ćelijskih oblika, mikrobiologija u okviru posebne naučne discipline – virologije – istražuje i acelularne, odnosno bezćelijske oblike koji obuhvataju viruse i subviralne infektivne agense.

Mikrobiologija se veoma brzo razvija i usavršava zahvaljujući novim istraživačkim metodama i brojnim otkrićima iz oblasti molekularne mikrobiologije, mikrobne fiziologije, mikrobiološke ekologije itd. Fundamentalna, odnosno bazična mikrobiologija pomaže u razumijevanju osnovnih mehanizama životnih procesa, dok se primijenjena ili aplikativna mikrobiologija bavi primjenom stečenih znanja iz mikrobiologije, kao i rješavanjem brojnih pitanja iz oblasti medicine, veterine, poljoprivrede, industrije, forenzike itd. U okviru aplikativne mikrobiologije razlikujemo medicinsku mikrobiologiju, veterinarsku mikrobiologiju, mikrobiologiju zemljišta, mikrobiologiju vode, sanitarnu i prehrambenu mikrobiologiju, industrijsku mikrobiologiju i biotehnologiju, okolišnu mikrobiologiju, molekularnu mikrobiologiju, forenzičku mikrobiologiju i dr.

Forenzička mikrobiologija je relativno nova i kompleksna naučna disciplina koja povezuje znanja opće i primijenjene mikrobiologije sa znanjima iz forenzike, a ima za osnovni cilj da na osnovu identifikacije i karakterizacije utvrdi izvor i porijeklo mikroorganizama kao biološkog traga u forenzičkoistražnim postupcima. Forenzička mikrobiologija je integracija mikrobiološke genomike, filogenetike, forenzičke informatike i osnovne mikrobiologije primijenjene u sudskim postupcima. Forenzička mikrobiologija ima široku primjenu u analizi mogućih bioterorističkih napada ili namjernog oslobađanja mikroorganizama i njihovih toksina, otkrivanju onih koji

pokušavaju mikroorganizme ili njihove toksine upotrijebiti s namjerom ozljeđivanja, razbolijevanja ili ubijanja ljudi ili životinja, zbog ličnih, političkih ili socijalnih razloga. Upravo veliki napredak i uzlet u razvoju i upotrebi savremenih metoda forenzičke mikrobiologije ostvaren je nakon bioterorističkog napada 2001. godine u SAD, kada su pisma, u kojima su se nalazile endospore uzročnika antraksa, upućena poštom na različite lokacije. Pored toga, ova naučna disciplina za cilj ima utvrđivanje porijekla biokriminala, uzroka i vremena smrti, a mikrobiološke tragove koristi kao dokazni materijal i u drugim zločinima.

7.1 BIOLOŠKO ORUŽJE I BIOTERORIZAM

Od 2001. godine u forenzičkoj zajednici raste interesovanje za mikrobiologiju, posebno u pogledu njene primjene u istraživanju bioterorizma. *Bioterorizam* je namjerno oslobađanje patogenih mikroorganizama i drugih životnih oblika s ciljem izazivanja masovnih bolesti i smrti ljudi, životinja i korisnih biljaka u epidemijskim razmjerima i slabljenja ratnih potencijala protivnika. Patogeni mikroorganizmi kao što su virusi, rikecije, bakterije, gljivice i protozoe, prirodne, izmijenjene ili sintetizirane (genetičkim inženjerstvom ili drugim biotehnološkim postupcima) i njihovi toksini, bez obzira na njihovo porijeklo i način dobijanja, ako su namijenjeni za nemiroljubive svrhe, predstavljaju *biološko oružje*. Prema Konvenciji o zabrani biološkog i toksinskog oružja iz 1972. godine, biološko i toksinsko oružje predstavlja mikrobnе i druge tvari koje sadržavaju biološke agense ili toksine bez obzira na njihovo porijeklo ili način proizvodnje, vrstu i količinu, a koji se ne upotrebljavaju u profilaktičke, zaštitne ili druge miroljubive svrhe. Namjerna zloupotreba mikroorganizama seže daleko u prošlost, pa je tako zabilježeno da su još u 4. vijeku prije nove ere Skiti koristili strijele koje su natopljavali krvlju oboljelih i umrlih od zaraznih bolesti. U srednjem vijeku su u gradove ubacivani leševi umrlih od zaraznih bolesti, pa su tako Mongoli ubacivali tijela umrlih od kuge u luku Kaffa u Feodosiji, a odatle su zaraženi evropski trgovci prenosili bolest širom Evrope, što je dovelo do razvoja pandemije kuge u Evropi od koje je umrlo preko 25 miliona ljudi. Istom metodom koristili su se Rusi 1710. godine u Revelu, te Estonci u napadu na Šveđane. U toku Prvog svjetskog rata intenzivno su upotrebljavani biološki agensi, i to prije svega uzročnici zoonoza. Intenzivni razvoj biološkog oružja razvijan je u mnogim zemljama. Upotreba bioloških agensa kao načina ratovanja prvi put je zabranjena Ženevskim protokolom 1925. godine. Razvoj, proizvodnju i skladištenje biološkog i toksinskog oružja

zabranjuje i Konvencija o zabrani biološkog i toksinskog oružja iz 1975. godine i Konvencija o zabrani hemijskog oružja iz 1993. godine. Prema Ženevskom protokolu, zabranjeno je korištenje bioloških supstanci, ali ne i njihovo istraživanje i posjedovanje u miroljubive svrhe.

Međutim, i dalje postoji veliki strah od moguće zlonamjerne upotrebe mikroorganizama u različitim aktivnostima. U posljednjih pedeset godina nekoliko puta je došlo do zloupotrebe mikroorganizama. Jedan od primjera je slučaj u kojem su pripadnici sekte “Order of the Rising Sun” 1972. godine imali namjeru da dodaju uzročnike tifusa u vodovod u SAD. Također, 1981. godine, ekstremistička grupa “Dark Harwest Commandos” endosporama antraksa je kontaminirala torbe nekih britanskih političara. Tri godine nakon toga, 1984. godine religijska sekta “Rajneesh” je u Oregonu (SAD) bakterijom *Salmonella typhimurium* zarazila hranu u desetak restorana. Ipak, najpoznatiji bioteroristički napad antraksom dogodio se u SAD 2001. godine, kada su pisma koja su sadržavala endospore antraksa poslata poštom predstavnicima medija, a zatim i dvojici američkih senatora.

7.1.1 Klasifikacija bioloških uzročnika koji se mogu koristiti u bioterorizmu

Prema Centru za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC) iz SAD, patogeni mikroorganizmi i njihovi toksini koji bi se mogli koristili u biološkom terorizmu prema potencijalnom riziku svrstavaju se u tri kategorije prema određenim kriterijima.

Prvu kategoriju čine agensi koji se mogu lako i efikasno diseminirati ili prenositi interhumano, s visokim letalitetom, a za adekvatno reagovanje zdravstvene službe potrebne su posebne pripreme. U ovoj kategoriji se nalaze *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Botulin toksin* (egzotoksin bakterije *Clostridium botulinum*), virus velikih boginja (variola), virus ebole, virus Marburg, virus Lassa, virus Junin i drugi.

Druga kategorija obuhvata agense koji se mogu relativno lako diseminirati i koji izazivaju umjereno visok morbiditet i nizak letalitet. U ovu kategoriju spadaju: *Coxiella burnetti*, *Brucella* sp., *Burkholderia mallei*, virus venecuelskog konjskog encefalitisa, virus istočnog i zapadnog konjskog encefalitisa, toksin *Clostridium perfringens*, stafilokokni enterotoksin B, *Salmonella* sp., *Shygella dysenteriae*, *Escherichia coli* 157:H7 i drugi.

Treća kategorija terorističkih bioloških agensa uključuje nove tzv. *emergentne* (engl. *emerging*) i već poznate patogene koji se mogu pripremiti za masovnu diseminaciju u budućnosti, koji se jednostavno proizvode i lako prenose te izazivaju visok morbiditet i letalitet. Ovdje spadaju: virus nipah, hantavirusi, virusi krpeljnih hemoragijskih groznica, virus krpeljnog meningoencefalitisa, virus žute groznice, multirezistentna bakterija *Mycobacterium tuberculosis* i drugi.

Genetičko inženjerstvo je unaprijedilo i razvilo potpuno nove tipove bioloških i toksinskih ratnih agensa, i to izmjenom određenog patogenog mikroorganizma, njegovom klasifikacijom u novi agens i proizvodnjom novih agensa koji omogućuju kombinacije tzv. “poželjnih osobina” kao što su kontrolisana virulencija i toksičnost patogena.

Kako se može zaključiti iz prethodnog dijela, veliki broj mikroorganizama može se potencijalno koristiti u biokriminalnim aktivnostima pa će u sljedećem dijelu biti govora o načinu širenja, identifikacije i determinacije izvora infekcije.

U slučaju pojave ili sumnje na oboljenje izazvano mikrobiološkim agensom, prvi korak je identifikacija uzročnika standardnim laboratorijskim procedurama. Većina oboljenja je posljedica prirodnih okolnosti, a ako krivicu ne preuzme pojedinac ili grupa, potrebno je provesti epidemiološku studiju da se utvrdi izvor infekcije i eventualna uključenost kriminalnih aktivnosti i dr. Ako se pojavi indicija za sumnju na biokriminal, važno je poduzimanje neophodnih istražnih radnji uz pomoć stručnih lica iz odgovarajuće oblasti.

U faktore koji upućuju na potencijalnu zlonamjernu upotrebu i širenje mikroorganizama ubrajaju se:

1. Višestruka i istovremena pojava pacijenata s istom kliničkom slikom;
2. Pismena ili usmena izjava predstavnika terorističke organizacije o preuzimanju odgovornosti za izveden bioteroristički napad;
3. Pojava izolovanog slučaja veoma rijetke bolesti bez očiglednog objašnjenja; npr., virus velikih boginja je od 1977. godine eliminisan u ljudskoj populaciji i danas se nalazi samo u laboratorijama, pa bi oboljenje samo jedne osobe bilo gdje u svijetu mogao biti indikator zlonamjernog oslobađanja;

4. Otkrivanje genetički modificiranih mikroorganizama – to može biti na primjer pojava soja bakterije *Bacillus anthracis* označenog kao Vollum 1B, koji je u SAD bio korišten u ekperimentalne svrhe;
5. Pojava oboljenja s neobičnim tokom ispoljavanja simptoma. U oko 95% slučajeva kod ljudi, antraks se javlja u kožnom obliku, dok se u samo 5% slučajeva bolest manifestuje u plućnoj formi koja se razvija nakon udisanja endospora bakterije *Bacillus anthracis*. Prema tome pojava plućnog oblika antraksa kod većeg broja ljudi može biti osnovana sumnja na zloupotrebu uzročnika antraksa;
6. Pojava bolesti koja je neobična ili netipična za određenu populaciju ili starosnu grupu, odnosno ispoljavanje sumnjive akutne kliničke slike u mlađih ljudi očuvanog zdravlja ili npr. epidemija bolesti koja se manifestuje pojavom osipa u starijih osoba (što ne bi bilo neobično kod djece);
7. Neuobičajeni obrazac morbiditeta ili smrtnosti kod ljudi ili životinja – rast broja uginulih životinja koji prethodi pojavama neobjašnjivih simptoma oboljenja u ljudi ili ih prati. Ovdje se može navesti primjer oboljenja ljudi uzrokovanog bakterijom *Burkholderia mallei*. Naime, ova bakterija izaziva veoma često oboljenje konja koje se naziva sakagija i primarno je bolest životinja, najčešće konja, mula i magaraca, a rijetko se javlja kod ljudi;
8. Rijetke bolesti ili uobičajene bolesti s atipičnim simptomima u geografski razdvojenim oblastima, na primjer, ako se u istom vremenskom periodu pojave bolesti sa sličnim simptomima na više prostorno razdvojenih lokaliteta;
9. Pojava velikog nivoa morbiditeta ili smrtnosti kod ljudi ili životinja koji se ne može objasniti i razvoj kliničke slike u atipičnom smjeru ili u smjeru pogoršanja. To može biti česta bolest koja pokazuje neobično visok nivo morbiditeta i/ili smrtnosti ili slučaj neuobičajene otpornosti na antibiotike te izostanak reakcije na rutinski medicinski tretman. Međutim, treba uzeti u razmatranje i antimikrobnu rezistenciju te mutacije i rekombinacije virusnog genoma;
10. Pojava bolesti s neuobičajenom geografskom ili sezonskom distribucijom. Određene zarazne bolesti su karakteristične za cijele kontinente, ili bar njihove velike dijelove; npr.,

kuga se javlja u dijelovima Indije i Afrike, ali pojava negdje drugo u svijetu mogla bi biti sumnjiva. Pri tome svakako treba uzeti u obzir i brze migracije stanovništva;

11. Dijagnoza nekoliko neobičnih ili neobjašnjivih bolesti istovremeno kod istog pacijenta, ali bez očiglednog objašnjenja. Na primjer, teški akutni respiratorni sindrom (engl. *Severe acute respiratory syndrome* – SARS) i botulizam kod iste osobe je izuzetno rijetka pojava. Međutim, nije neuobičajeno da se više bolesti javlja kod ugroženih pacijenata s oslabljenim imunim sistemom (imunokompromitovanih pacijenata) kao što su pacijenti sa sindromom stečene imunodeficijencije, tj. AIDS-om (engl. *Acquired Immunodeficiency Syndrome* – AIDS);
12. Pojava neobičnog oboljenja koja zahvata raznoliku populaciju. Tako, na primjer, izbijanje respiratorne bolesti u velikoj heterogenoj populaciji može izazvati sumnju na izlaganje inhaliranom patogenu ili hemijskom agensu. Ovo predstavlja potencijalni scenario oslobađanja mikroorganizma ili toksina u podzemni sistem ili u nekom manjem prostoru;
13. Pojava slučajeva oboljelih osoba koje su boravile u istom prostoru / mikroklimatskom okruženju, npr. isti klimatizirani sistem;
14. Pronalazak strojeva ili njihovih dijelova, uređaja, naprava ili sredstava pomoću kojih je može biti izvršena disperzija ili prijenos patogenog mikrobiološkog agensa.

7.1.2 Identifikacija uzročnika u bioterorizmu

U biokriminalističkoj istrazi važno je u što kraćem vremenskom periodu ustanoviti tačnu vrstu patogenog mikrobiološkog agensa, tačno mjesto ili mjesta, način, razmjere i vrijeme njegove slučajne pojave ili zlonamjernog oslobađanja ili ispuštanja u okoliš, moguće porijeklo infekcije i potencijalnog počinitelja ili krug počinitelja, kao i mogućnosti širenja i ponovnog zlonamjernog oslobađanja. Posebno je važno znanje i iskustvo stručnjaka iz oblasti *forenzičke mikrobiologije i epidemiologije* za identifikaciju mikrobiološkog agensa do nivoa vrste ili soja, za izbor metoda u istrazi, za utvrđivanje kretanja i širenja zaraze kako bi se ustanovio najvjerovatniji izvor i porijeklo patogenog mikrobiološkog agensa, tj. kako bi se konačno došlo do konkretne osobe, vektora (insekta ili životinje), prijenosnog sredstva (zaražene namirnice ili vode / napitka) itd.

Izolacija i identifikacija neke vrste mikroorganizma iz humanih i animalnih uzoraka ili životne sredine nezamjenljiva je u identifikaciji izvora i definisanja puteva transmisije bolesti. Međutim, nakon identifikacije patogena i sumnje na biokriminalne aktivnosti, pristupa se širim epidemiološkim istraživanjima da se odredi povezanost grupe bakterijskih izolata, tj. da se ti izolati tipiziraju ne samo do nivoa vrste i serotipa nego i preciznije, da bi se ustanovilo porijeklo određenog mikroorganizma i predikcija počinitelja kaznenog djela. Osnovni preduslovi za suzbijanje bilo koje zarazne bolesti upravo su određivanje izvora i puteva širenja infekcije.

U klasičnim mikrobiološkim metodama za identifikaciju mikroorganizama koriste se mikroskopske analize, kulturelna istraživanja, biohemijska istraživanja i serološki testovi. Kulturelne metode uključuju upotrebu adekvatnih podloga za predobogaćenje i obogaćenje selektivnih i diferencijalnih podloga za izolaciju, kao i njihovu potvrdu na osnovu vizualne detekcije rasta i morfoloških karakteristika kolonija. Ove metode zahtijevaju intenzivan rad i duži vremenski period, a dobijeni rezultati ne moraju biti uvijek pouzdani. Također se ne omogućava potpun uvid u strukturu mikrobne populacije kompleksnih zajednica zbog toga što mnoge vrste mikroorganizama nisu kultivabilne ili je kultivacija i izolacija vrlo teška.

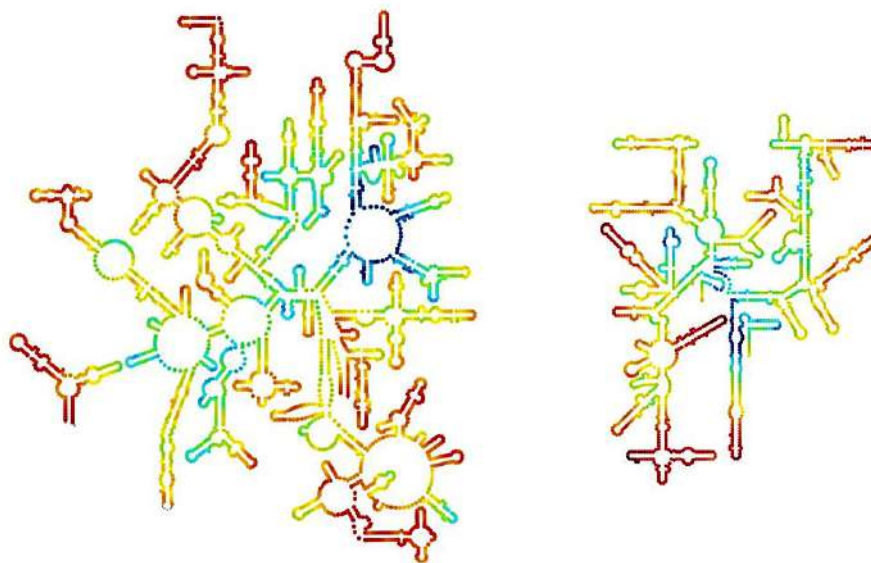
U epidemiološkim istraživanjima, diferencijacija unutar serotipa omogućava svrstavanje sojeva u tipove, utvrđivanje endemskih sojeva, incidence, prevalence, cirkulacije i evolucije patogenih sojeva u prostoru i vremenu, identifikaciju epidemiološki povezanih sojeva, utvrđivanje rezervoara i puteva prenošenja itd.

Važno je spomenuti da se npr. istraga pošiljki pisama 2001. godine oslanjala i na klasične mikrobiološke metode i na molekularne metode.

7.1.3 Molekularne metode identifikacije mikroorganizama u bioterorizmu

Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama temeljena na klasičnim mikrobiološkim metodama nadopunjena je razvojem i upotrebom molekularnih metoda koje na osnovu analiza izraženih u sličnosti molekula omogućavaju uvid u prokariotsku raznolikost. U istraživanju mikrobne populacije i bakterijske raznolikosti danas se koriste metode: fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH), protočna citometrija (FCM), elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa (denaturirajuća gradijent gel-elektroforeza – DGGE), polimorfizam veličine restrikcijskih

fragmenata (RFLP), polimorfizam dužine umnoženih fragmenata (AFLP), kvantitativni PCR (qPCR), molekularna tipizacija temeljena na sekvenciranju više lokusa (MLST) i analiza sekvenci više lokusa (MLSA). Ove metode su brze i jednostavne, a analizirani uzorci mogu biti u malim količinama. Osim toga, bakterije se mogu analizirati direktno iz okoliša, a dobijeni rezultati su reproducibilni. Za proučavanje bakterijske biološke raznolikosti najčešće se koriste probe koje su komplementarne ribosomalnim sekvencama 16S rRNK i 23S rRNK (slika 7.1).



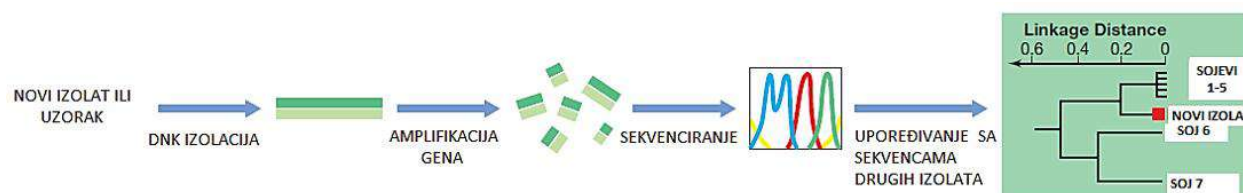
Slika 7.1. Sekundarna struktura 23S rRNK i 16S rRNK bakterije *Escherichia coli*

Identifikacija i filogenetska rekonstrukcija velikog broja bakterijskih vrsta uveliko je olakšana analizom sekvence 16S rRNK. Metagenomska identifikacija, bez kultiviranja i izolacije mikroorganizama, omogućava istraživanja strukture i dinamike mikrobne populacije bilo kojeg mikrobnog sistema. Takvim molekularnim pristupom moguće je izolovati ukupnu mikrobnu DNK (ili RNK), za što se koriste komercijalni setovi renomiranih proizvođača te lančana reakcija polimeraze (PCR). PCR je metoda koja samostalno ili u kombinaciji s klasičnim mikrobiološkim tehnikama pruža siguran dokaz uzročnika u materijalu. Najčešće se kod bakterija amplifikira 16S rRNK ili jedan od varijabilnih regiona (V1–V9) 16S rRNK, za čiju se amplifikaciju koriste univerzalni ili za rod specifični prajmeri (engl. *primer*).

16S rRNK sadrži regione koji su visoko očuvani i stoga mogu poslužiti kao ciljne sekvence za vezanje univerzalnih oligonukleotidnih prajmera. Prisutna je u gotovo svim bakterijama, sadrži varijabilne regione prema kojima se mikrobnii izolati mogu klasificirati do roda pa se koristi kao marker gen u istraživanjima bakterijske filogenije i taksonomije, a vrlo je koristan kod identifikacije bakterija koje se ne mogu kultivirati. Sekvenciranje gena 16S rRNK univerzalna je metoda koja se koristi za pouzdanu determinaciju mikrobnii izolata do razine roda ili vrste. Sekvenciranje gena 16S rRNK smatra se *zlatnim standardom* za procjenu bioraznolikosti bakterija i njihovu identifikaciju. Gen koji kodira 16S podjedinicu ribosoma dužine je 1,5 kb i sadrži konzervirane regione s devet hipervarijabilnih regiona koji pokazuju veliku različitost između bakterijskih vrsta. S druge strane, nedostaci sekvenciranja gena koji kodira 16S rRNK uočavaju se kod vrlo srodnih bakterijskih vrsta s velikom sličnošću sekvence.

Naime, broj polimorfnihi mjesta u 16S rRNK izrazito je mali, što otežava razlikovanje blisko srodnih vrsta pa u velikom broju slučajeva ovaj marker gen ne pruža informaciju o vrsti i soju, već samo o rodu. Ipak, ova metoda se najčešće koristi za identifikaciju nepoznatih bakterija. Pri tome se dobijena sekvenca 16S rRNK uspoređuje sa sekvencama 16S rRNK koje su dostupne u raspoloživim bazama podataka kao što su npr. *Ribosomal Database Project* (RDP), *Greengenes*, *Silva*, *GenBank*. Na osnovu komparativne analize 16S sekvenci bakterijskih vrsta pohranjenih u bazama podataka i 16S sekvence izolata koji želimo determinisati određuje se najveći postotak sličnosti, kako bi se utvrdila pripadnost vrsti ili soju. Ako više od jedne sekvence u bazi ima jednako visok postotak sličnosti, navodi se više jednakovrijednih rezultata identifikacije.

Filogenetske analize više gena ili čitavog genoma u slučaju identificiranja patogena koji su poznati po svom biološkom potencijalu omogućavaju uspoređivanje polimorfizama patogena s npr. poznatim izvornim mikrobiološkim laboratorijskim kulturama agensa. Metode tipiziranja, poput analize više genskih slijedova (engl. *MultiLocus Sequence Analysis* – MLSA), detaljno karakteriziraju strukturu mikroorganizma (slika 7.2). Upravo ova metoda je razvijena za potrebe identifikacije sojeva bakterije *Bacillus anthracis*, čije su endospore 2001. godine u vidu praha stavljene u pisma i upućene američkim senatorima i predstavnicima medija u SAD. Ova je metoda predstavljala prekretnicu u razvoju testova koji se zasnivaju na polimorfizmu jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP).



Slika 7.2. Šematski prikaz analize više genskih slijedova (engl. MultiLocus Sequence Analysis, *MLSA*)

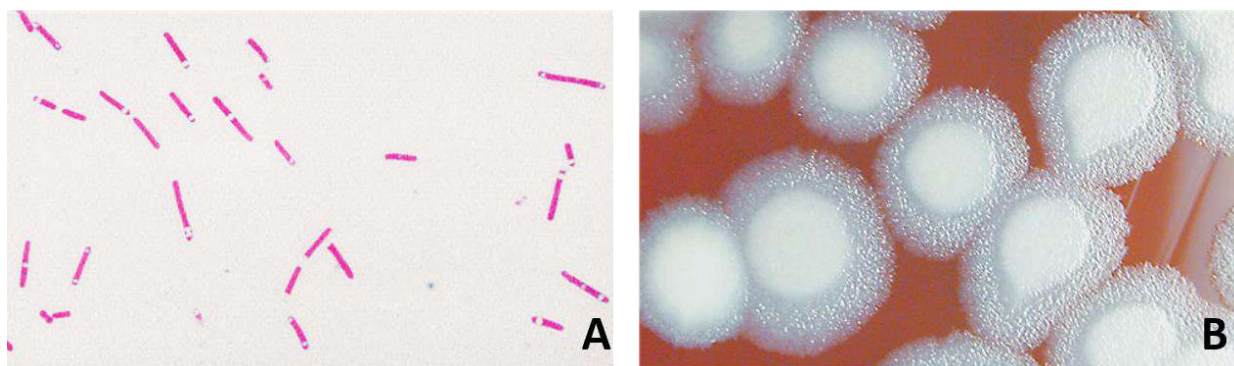
Pojedinačni nukleotidni polimorfizam je varijacija nukleotida u sekvenci DNK, a karakterističan je za pojedine pripadnike određene prokariotske i eukariotske biološke vrste te za različite sojeve unutar iste vrste mikroorganizma. Utvrđivanje pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama najčešće se provodi metodama sekvenciranja jednog dijela molekule DNK određenog organizma, ali i drugim molekularnim metodama analize genoma kao i analizom proteoma. Ovi testovi omogućavaju brzu dijagnostiku na nivou vrste, cjepnih sojeva pa čak i nekih varijeteta, koji čine različite genetičke grupe.

Tipiziranje na osnovu uzastopnih ponavljajućih slijedova pokazalo se jako korisno u razlikovanju infekcija, poput razlikovanja recidivirajućih od novih infekcija, dokazivanju i porijekla izvora infekcija, povezivanju različitih genotipova s različitim nivoima patogenosti te u procjeni stabilnosti pojedinih cjepnih pripravaka. Lokusi s različitim brojem uzastopnih ponavljanja (engl. *Variable Number Tandem Repeats* – VNTRs) prisutni su i u bakterijskim genomima, gdje su vrlo različiti čak i u monomorfni vrsta, kao što su vrste kompleksa *Mycobacterium tuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* ili bakterije roda *Brucella*. Nužno je analizirati izolate na razini soja, i to tehnikama koje se zasnivaju na analizi lokusa koji imaju vrlo visoki indeks polimorfnosti te visoku stopu mutacija. Najprikladnija je analiza broja uzastopnih ponavljanja na više lokusa (engl. *Multiple Locus Variable-number of Tandem Repeat Analysis* – MLVA), koja omogućava praćenje sojeva na lokalnoj razini te uspoređivanje s internacionalnim podacima, kako bi se utvrdilo kako je određeni soj dospio u pojedini region, odnosno lokaciju. Primjenom navedenih metoda moguće je ustanoviti i je li određena osoba zaražena prirodnim putem ili je u pitanju npr. neki modificirani ili laboratorijski soj mikroorganizma.

7.1.4 Mikroorganizmi u bioterorizmu

7.1.4.1 *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis je nepokretna, aerobna, sporogena, Gram-pozitivna bakterija štapićastog oblika koja izaziva oboljenje poznato pod nazivom antraks (slika 7.3).



Slika 7.3. A – štapićasti oblik Gram pozitivne bakterije *Bacillus anthracis* s vidljivim endosporama, B – izgled kolonija *Bacillus anthracis* na krvnom agaru

Endospore su veličine 1 μm i postavljene su centralno, veoma su otporne na isušivanje, ekstremne temperature, pH vrijednosti okolnog medija, ultraljubičasto zračenje i na mnoga dezinfekcijska sredstva; štaviše, mogu ostati aktivne i do 60 godina. Upravo zbog navedenih karakteristika, endospore ove bakterije mogu se upotrijebiti i kao biološko oružje. Antraks je zoonoza koja se može prenijeti sa životinje na čovjeka i uzrokovati lokalnu infekciju ili teško oboljenje, često praćeno i smrtnim ishodom. Glavni faktori virulencije *B. anthracis* su *kapsularni polipeptid* i *antraksni toksin*. Kapsula se sastoji od poli-D-glutaminske kiseline, a antraksni toksin se sastoji od tri faktora: protektivnog antigena, faktora edema i letalnog faktora. Glavni geni virulencije *B. anthracis* su sekvencirani. Oni se nalaze na dva plazmida koji su označeni kao pXO1, odnosno pXO2. Prvi plazmid pXO1 sadrži gene koji kodiraju produkciju kompleksa antraksnog toksina, dok je drugi obično odgovoran za proizvodnju kapsule. Za ispoljavanje virulencije neophodna je prisutnost oba plazmida. *B. anthracis* je izrazito genetički monomorfna vrsta te se tipizacija temelji na analizi varijabilnih regiona (VNTR). Oboljenje se manifestuje u dva klinička oblika, i to kao spoljašnji i unutrašnji antraks. Spoljašnji antraks se javlja kao maligna pustula ili maligni edem, dok se unutrašnji manifestuje kao gastrointestinalni, plućni ili kao antraksna sepsa. Maligna

pustula je najčešći klinički oblik antraksa i javlja se u oko 90% svih antraksnih infekcija. Na mjestu ulaska endospore antraksa u organizam kroz oštećenu kožu nastaju kožne promjene. Simptomi kožnog antraksa počinju nakon perioda inkubacije koji traje do pet dana. Pored kožnih promjena javljaju se i simptomi kao što su povišena temperatura, malaksalost, glavobolja i regionalna limfadenopatija. Ako se oboljenje adekvatno liječi, rijetko završava fatalno. Unutrašnji antraks je veoma težak oblik infekcije koja se odlikuje oblicima teške intoksikacije s hipotermijom i jako teškim kolapsnim stanjem. Gastrointestinalni oblik nastaje nakon ingestije termički nedovoljno obrađenog zaraženog mesa i mesnih proizvoda. Javljaju se simptomi povišene temperature, mučnine, povraćanja, malaksalosti te abdominalna bol i krvavoslužave stolice. Rana dijagnoza bolesti je veoma teška, a smrtnost je visoka bez obzira na primjenu odgovarajuće terapije. Plućni oblik antraksa obično se javlja veoma rijetko u pojedinačnim slučajevima, kao što je kod radnika u tekstilnoj ili vunarskoj industriji. Međutim, ovaj oblik je veoma značajan, zbog čega postoji strah od moguće upotrebe endospora antraksa kao biološkog oružja kada inhalacijom antraksnih endospora može da se zarazi veliki broj ljudi. Period inkubacije traje do šest dana, a u inicijalnom periodu simptomi se manifestuju u vidu slabosti, povišene temperature, glavobolje te neproduktivnog kašlja. Drugi stadij često završava letalno sa simptomima akutnog respiratornog distresa, obilnog znojenja, boli u grudima, krvavog sputuma, hipoksemijom i cijanozom. Kožni antraks se liječi penicilinom, ciprofloksacinom ili doksiciklinom, a teži oblici antraksa (na probavnim ili dišnim organima) najuspješnije ciprofloksacinom. Upotrebom klindamicina može se inhibirati stvaranje toksina. *B. anthracis*, kao infektivni biološki agens, predstavlja veliki rizik i potencijalnu opasnost za čovjeka i određene životinje, stoga postoji velika potreba za brзом i detaljnom identifikacijom i molekularnom tipizacijom izolata za potrebe epidemioloških istraživanja. Brojni biološki agensi mogu da budu korišteni kao biološko oružje, međutim *B. anthracis* spada u najozbiljnije uzročnike koji se namjerno mogu zloupotrijebiti. Jednostavna proizvodnja u laboratorijama i lako širenje putem infektivnog aerosola doveli su do straha i prijetnje od upotrebe ovog uzročnika u biokriminalnim aktivnostima.

Japanski apokaliptični kult *Aum Shinrikyo* ("Vrhovna istina") 1989. godine bio je službeno priznat kao vjerska organizacija koja se kasnije proširila i u druge zemlje, uključujući SAD, Njemačku i Rusiju. Osnivač i vođa kulta bio je Shoko Asahara, rođen 1955. godine (slika 7.4. A). Struktura ovog kulta imala je veoma složenu organizaciju, koja je za cilj imala zapošljavanje osoba od

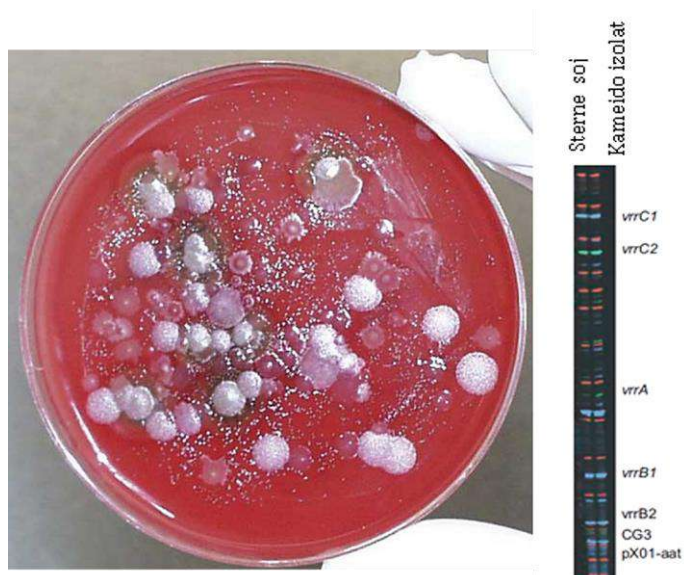
interesa, među kojima su bili i naučnici. Pripadnici ovog kulta su 1993. godine, u gradu Kameido u blizini Tokija, ispuštali disperzioni aerosol s endosporama bakterije *Bacillus anthracis* i botulin neurotoksinom bakterije *Clostridium botulinum* (slika 7.4. B).



Slika 7.4. A – fotografija Shoko Asahare iz 1990. godine, osnivača i vođe kulta pod nazivom Aum Shinrikyo što u prevodu znači “Vrhovna istina”, B – disperzioni aerosol ispuštan sa zgrade u Kameidou u Japanu

Nažalost, u to vrijeme zbog propusta u istrazi nije bilo utvrđeno oslobađanje mikroorganizama, pa tako ni veza s bioterorizmom. Potom su pripadnici ovog kulta 1995. godine izveli masovni napad veoma otrovnim hemijskim bojnim agensom *sarinom* na putnike tokijske podzemne željeznice, kada je stradalo 13, a hitnoj medicinskoj pomoći podvrgnuto oko 6.000 osoba. Tek poslije ovog tragičnog napada *sarinom* započinje detaljna istraga o prethodnim aktivnostima kulta. Upravo tada je utvrđeno da su članovi ovog kulta 1993. godine sa zgrade, koja je bila sjedište ove organizacije, ispuštali tečnu podlogu koja je sadržavala endospore antraksa pomoću aparata za disperziju. U to vrijeme lokalno stanovništvo se uglavnom žalilo na neugodan miris, međutim, nije bilo oboljelih osoba. Kako je stanovništvo nastavilo sa žalbama, intervencijom policije kult je napustio zgradu, ali tada se nije sumnjalo na biokriminalne aktivnosti. Njihove istinske namjere ustanovljene su tek nakon istrage koja je uslijedila zbog oslobađanja *sarina*. Na sreću, prikupljen je uzorak tečnosti iz zgrade u vrijeme incidenta u Kameidou, koji je analiziran tek nakon četiri godine. Mikroskopskom

analizom na preparatima koji bili obojeni mahit zelenom bojom i šafraninom uočene su endospore i štapićasti i drugi oblici bakterija. Nakon zasijavanja uzorka na krvni agar, ploče su inkubirane na 37°C i poslije perioda inkubacije je utvrđeno da je broj bakterija u uzorku iznosio oko 4×10^4 CFU u jednom mililitru. Na osnovu morfološkog izgleda, većina poraslih kolonija nije odgovarala uzročniku antraksa, ali je oko 10% kolonija koje su se razvile na krvnom agaru bilo tipično za *Bacillus anthracis*, odnosno takve kolonije su bile sive boje i na krvnom agaru nisu formirale niti jedan oblik hemolize. Molekularnogenetičkim analizama je potvrđena prisutnost *Bacillus anthracis* u analiziranom uzorku. Nakon klasične mikrobiološke identifikacije, molekularnom tipizacijom sojeva, primjenom MLVA metode, utvrđeno je da svih 48 izolovanih sojeva iz uzorka ima isti genotip. Osim toga, odabrani VNTR marker na plazmidu pX02 nije bio amplificiran niti kod jednog izolata, što je potvrdilo da se radi o soju antraksa označenom kao *Sterne 34F2* koji se koristio za pripremu vakcina (slika 7.5).



Slika 7.5. Kolonije bakterije *B. anthracis* iz prikupljenog uzorka na krvnom agaru (lijevo). Desno na slici prikazani su rezultati VNTR analize Kameido izolata i Sterne soja *B. anthracis* koji je korišten kao pozitivna kontrola.

Soj Sterne ima nisku virulenciju zbog nedostatka pX02 plazmida, odnosno gena koji kodira proizvodnju kapsule, glavnog virulentnog faktora *B. anthracis*. Kako je već prethodno naglašeno, sojevi antraksa se razlikuju po virulentnosti, pa tako virulentni sojevi sadrže dva plazmida, tj.

toksin plazmid i kapsularni plazmid, a za ispoljavanje virulentnosti potrebno je prisustvo oba plazmida. Sojevi koji sadrže samo jedan plazmid su avirulentni i upravo zbog toga se koriste za pripremu vakcina. Soj Sterne je pripadnik A3.b klastera i od 410 izolata koji su se nalazili u bazi podataka, a koji se javljaju prirodno, samo četiri izolata je imalo sedam istih marker gena kao soj Sterne. Sva četiri su bila i pX02 pozitivna, što je bila još jedna potvrda da su pripadnici kulta Aum Shinrikyo koristili upravo soj Sterne u biološkom napadu. Sterne 34F₂ je sintetički vakcinalni soj, komercijalno dostupan u Japanu za veterinarsku upotrebu. Kada su pripadnici kulta Aum Shinrikyo izveli napad antraksom, nisu znali da su sojevi koje su koristili bili avirulentni. Dodatno je utvrđeno da je aparat koji je kult koristio za disperziju proizvodio velike kapljice, a ne efikasni infektivni aerosol, pri čemu je i koncentracija endospora bila vjerovatno isuviše niska pa se pretpostavlja da ne bi bila efikasna čak ni kod virulentnijih sojeva.

Još jedan primjer je i slučaj koji se dogodio 2. oktobra 2001. godine, kada je utvrđena prisutnost bakterije *Bacillus anthracis* u cerebrospinalnoj tekućini i krvi Roberta Stevensa, radnika kompanije American Media u Boca Ratonu na Floridi. Robert je primljen na odjel za urgentnu medicinu sa simptomima groznice, povraćanja i dezorijentiranosti pa mu je, pod pretpostavkom bakterijskog meningitisa, analiziran uzorak njegove krvi i cerebrospinalne tečnosti. U cerebrospinalnoj tečnosti uočene su gram-pozitivne bakterije štapićastog oblika. Dodatnim bakteriološkim analizama potvrđeno je da se radi o vrsti *B. anthracis*, uzročniku antraksa. Stevens je imao plućni oblik antraksa koji je bio uzrokovan inhalacijom endospora. Skoro pa istovremeno je i Stevensov kolega Ernesto Blanko, radnik u poštanskom uredu American Media, potražio medicinsku pomoć zbog osjećaja dezorijentiranosti. Standardnim mikrobiološkim analizama nije bilo moguće potvrditi prisutnost bakterija. Međutim, upotrebom kvantitativnog imunotesta, odnosno metode vremenski odgođene fluorescencije (engl. *Time-Resolved Fluorescence immunoassay* – TRF), u pleuralnoj tečnosti je otkrivena visoka koncentracija inertnih antigena na *B. anthracis*, što je bila potvrda inhalacije bakterija. Čitav slučaj je izazvao veliku epidemiološku zabrinutost zbog toga što ovakav oblik antraksa nije bio zabilježen u SAD još od 1976. godine. Hitno su provedena epidemiološka istraživanja te su endospore antraksa pronađene na računaru koji je koristio Robert Stevens u svom kabinetu, što je bilo izuzetno sumnjivo i pokrenulo detaljnu dalju istragu. Detaljnom istragom je otkriveno najmanje pet pisama, koja su sadržavala vrlo fin prah svijetlosive boje, što su ustvari bile endospore patogene bakterije *Bacillus anthracis*.

Ova pisma su bila upućena poštom američkim senatorima, Patricku Leahyju i Thomasu Daschleu (slika 7.6) u Washingtonu, kao i predstavnicima medija u New York Cityju i Boca Ratonu na Floridi.



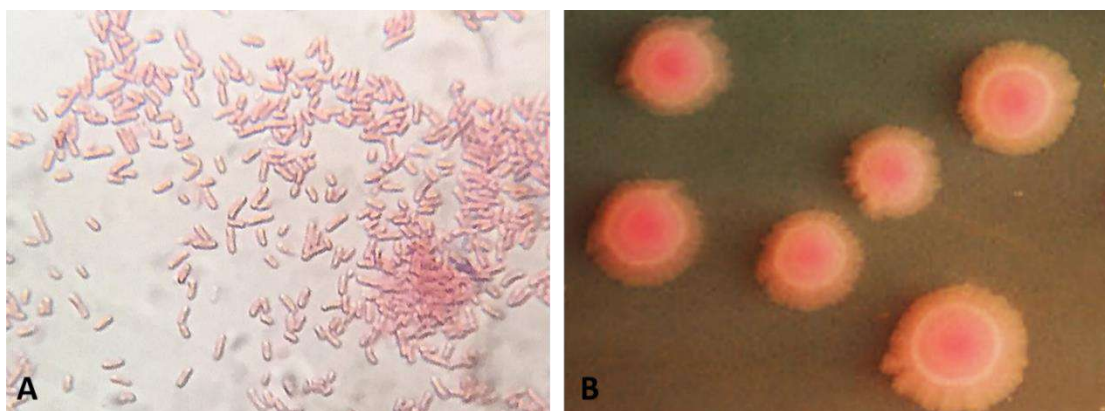
Slika 7.6. Pisma upućena tadašnjim američkim senatorima Tomu Brokawu i Thomasu Daschleu (lijevo) te naslovnice dnevnih novina koje su izvijestile o napadu

U ovom bioterorističkom napadu od antraksa je oboljelo 18 osoba s više smrtnih slučajeva. Sedam osoba je dobilo kožni antraks, ali su svi su preživjeli, dok se kod 11 osoba razvio plućni oblik antraksa, pri čemu je samo šest osoba preživjelo. Pisma su bila ručno adresirana i napisana, s uočljivim pravopisnim greškama, i to vjerovatno iz razloga da se posumnja na umiješanost stranih ekstremističkih organizacija. Na osnovu analize koverti ustanovljeno je da su pisma bila poslana iz Princetona u New Jerseyju. Pisma su bila dobro zatvorena, ali je praktično nemoguće spriječiti kontaminaciju spoljašnjih dijelova koverti, što je ukazivalo na to da je osoba koja je poslala pisma imala znanje iz oblasti mikrobiologije, kao i pristup specifičnoj laboratorijskoj opremi da se i sama ne bi zarazila tokom postupka. Molekularne analize su pokazale da su endospore pripadale soju antraksa pod nazivom Ames koji je izolovan 1981. godine u Texasu iz oboljele krave i upravo taj uzorak bio je pohranjen u Institutu Američke vojske za medicinska istraživanja zaraznih bolesti (engl. *United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases – USAMRIID*). Primjenom metode MLSA (posebno razvijene za potrebe ovog slučaja) utvrđeno je porijeklo korištenih endospora, odnosno ustanovljeno je da pripadaju soju antraksa označenom kao RMR-1029 koji je bio identičan endosporama izolovanim iz tikvica/erlenmajerica iz laboratorije u USAMRIID-u. Upravo ovaj slučaj bioterorizma pokreće dalji razvoj metoda forenzičke

mikrobiologije i tehnologija za istraživanje slučajeva terorizma. Na osnovu dobijenih rezultata krug istrage je bio usmjeren samo na one osobe koje su imale mogućnosti pristupa laboratoriju gdje su uzorci spomenutog soja bili pohranjeni. Istraga je pokazala da je dr. sc. Bruce E. Ivins, vojni stručnjak za mikrobiološku obranu u Fort Detricku u Marylandu, neposredno prije slanja pisama provodio jako puno vremena u laboratoriji, čak i tokom vikenda. Kako se nikada prije nije ponašao prema takvom radnom obrascu i kako nije imao legitimno (istražno prihvatljivo) objašnjenje, te prema saznanjima da je patio od stanovitih (navodno relevantnih) vrsta duševnih smetnji i poremećaja, zaključeno je kako je upravo on imao priliku i odgovarajući motiv, te na raspolaganju utvrđeni soj antraksa i sredstva za izvođenje bioterorističkog napada.

7.1.4.2 Bakterije roda *Shigella*

Prvi uzročnik bacilarne dizenterije otkriven je u Japanu. Izolovao ga je 1898. godine doktor Kiyoshi Shiga pa je cijeli rod dobio naziv *Shigella*. Pripadnici roda *Shigella* su fakultativno anaerobne, gram-negativne, štapičaste bakterije i duge do 3 μm , a široke 0,5 μm , nisu pokretne i ne formiraju endospore (slika 7.7).



Slika 7.7. A – *Shigella flexneri* bojenje po Gramu, B – izgled kolonija bakterije *Shigella flexneri* na MacKonkey agaru

Pripadaju porodici Enterobacteriaceae, zajedno sa salmonelama i nekim drugim bakterijama značajnim uzročnicima crijevnih infekcija ljudi. Na temelju antigene strukture i biohemijskih aktivnosti, šigele se dijele u četiri skupine: A, B, C i D. Unutar tih skupina ima više od 40 serotipova. Vrsta *Shigella dysenteriae* pripada grupi A koja obuhvata serotipove označene

brojevima od 1 do 10. Serotipovi se razlikuju na osnovu sposobnosti razlaganja triptofana za nutritivne potrebe djelovanjem enzima triptofanaze i stvaranja indola. Sojevi koji su označeni kao 2, 7 i 8 stvaraju indol, ostali serotipovi podgrupe A ne produciraju indol iz triptofana. U skupinu A pripada izrazito patogena *Shigella dysenteriae* tip 1. Ova bakterija se vrlo rijetko nalazi u životinja, izuzev primata. Obično je ima u vodi kontaminiranoj humanim fecesom. Vrsta *Shigella flexneri* pripada podgrupi B koja obuhvata serotipove od broja 1 do 6 i dva proizvoljna serotipa X i Y. *Shigella boydii* pripada podgrupi C koja obuhvata serotipove označene brojevima od 1 do 15. *Shigella sonnei* pripada podgrupi D i postoji samo jedan serotip. Šigele imaju kompleksnu antigenu strukturu s više od 40 različitih seroloških tipova, no mnogi somatski (O) antigeni šigela jednaki su O antigenima drugih pripadnika porodice Enterobacteriaceae. Svi sojevi posjeduju endotoksin koji predstavlja toksičnu komponentu somatskog antigena i nakon uginuća bakterija roda *Shigella* autokatalitičkim procesima dolazi do njegovog oslobađanja. *Shigella dysenteriae*, a posebno serotip 1, stvara jak termostabilan egzotoksin, tzv. *shiga toksin*, koji je veoma sličan toksinu (engl. *Shiga-like toxin*) veoma patogenog soja bakterije *Escherichia coli* O157:H7.

Ovaj toksin kod ljudi sprečava apsorpciju šećera i aminokiselina iz crijeva, a može uzrokovati i neurološke poremećaje djelujući na centralni nervni sistem i uzrokujući meningitis pa čak i komu. Ove bakterije su veoma infektivne, najčešće se prenose hranom, izmetom, muhama, kao i nečistim rukama. Infekcije šigelama ograničene su na gastrointestinalni trakt. Nakon invazije u epitel sluznice donjih dijelova ileuma i debelog crijeva, dolazi do razmnožavanja, i to rezultira stvaranjem mikroapscesa, ulceracije, krvarenja, odnosno destrukcije sluznice crijeva. Nakon perioda inkubacije do četiri dana, bolest počinje naglo s grčevima i enterokolitisom. Za izolaciju uzročnika uzima se svježa stolica, materijal se prenosi na odgovarajuću diferencijalnu podlogu, a u daljem toku ispituju se biohemijske osobine izolovanih sojeva.

Godine 1996. u bolnici St. Paul Medical u Dalasu (Teksas), dvanaest uposlenika je bilo namjerno zaraženo bakterijom *Shigella dysenteriae* tip 2, veoma rijetkim sojem šigele u SAD, koja uzrokuje tešku dijareju. Laboratorijsko osoblje je prethodno na e-mail primilo poruku u kojoj se poziva u prostoriju za odmor da se počaste kolačima. Ubrzo su uposlenici počeli da ispoljavaju simptome infekcije u vidu teškog enterokolitisa. Također, još jedna osoba naknadno je počela da ispoljava simptome, i to nakon konzumiranja kolača koje je jedan od laboratorijskih radnika donio kući. Četiri osobe su bile hospitalizovane, a pet je zatražilo hitnu ljekarsku pomoć, ali na sreću nije bilo

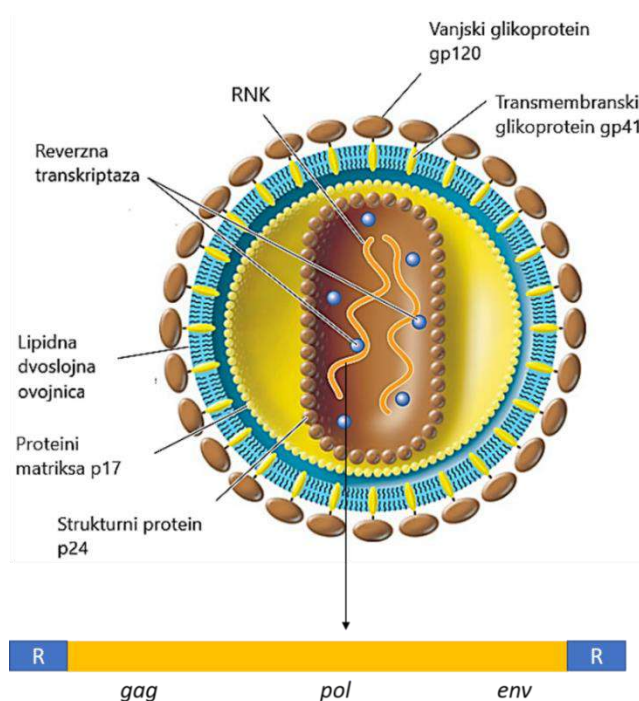
smrtnih slučajeva. Nakon laboratorijskih analiza ustanovljeno je da su pacijenti bili zaraženi bakterijom *S. dysenteriae* tip 2, ali je isto tako mikrobiološka analiza potvrdila prisutnost ove bakterije i u preostalim kolačima. Sumnja na zloupotrebu ove patogene bakterije bila je usmjerena na dvadesetpetogodišnju Diane Thompson koja je i sama bila uposlenik ove institucije i radila kao laboratorijski tehničar pa je imala je pristup svim laboratorijskim kulturama mikroorganizama. Tokom istrage je utvrđeno da je godinu dana prije ovog incidenta bivši Dianin partner isto tako često ispoljavao slične simptome, za šta je također preuzela odgovornost, priznavši da je bila odgovorna za njegovu bolest. Primjenom gel-elektroforeze u pulsirajućem polju (engl. *Pulse-Field Gel Electrophoresis* – PFGE) ustanovljeno je da je *Shigella dysenteriae* tip 2 izolovana iz stolice oboljelih pacijenata i kolača koje su konzumirali odgovarala pohranjenom laboratorijskom soju *Shigella dysenteriae*. PFGE omogućava razdvajanje velikih fragmenata DNK u pulsirajućem električnom polju. Ukupna DNK analiziranog mikroorganizma siječe se restrikcijskim enzimima čija su restrikcijska mjesta relativno rijetka u genomu, pri čemu se dobija 5–50 restrikcijskih fragmenata. Metoda je visoko diskriminativna s visokom stopom ponovljivosti. U konačnici, Diana je osuđena na 20 godina zatvora zbog zloupotrebe mikroorganizama i namjernog trovanja.

7.1.4.3 *Virus humane imunodeficijencije*

Virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus* – HIV) član je roda *Lentiviridae* unutar porodice *Retroviridae*. To je retrovirus koji uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije. Od početka epidemije, prije 35 godina, ovim virusom je inficirano više od 78 miliona ljudi, a preko 30 miliona je umrlo. Visoka genetička varijabilnost i brza evolucija HIV-a ključni su uzroci opstanka i globalnog širenja epidemije. Virus HIV je filogenetski klasificiran u dva tipa: HIV-1 i HIV-2. HIV-1 se filogenetski klasificira u četiri skupine: M, N, O i P koje predstavljaju tri nezavisna prijenosa vrsno specifičnog lentivirusa SIV-a (engl. *Simian Immunodeficiency Virus* – SIV) s čimpanzi na ljude (M, N i O) i jednog od gorile (P). Virus HIV uzrokuje sindrom stečene imunodeficijencije (SIDA, AIDS) kod ljudi, dok SIV generalno uzrokuje latentne infekcije u prirodnim domaćinima, što predstavlja evolucijsku adaptaciju koja omogućava mirnu koegzistenciju lentivirusa primata. Grupa M odgovorna je za većinu infekcija virusom HIV-1 u svijetu i dijeli se na devet podtipova (A, B, C, D, E, F, G, H, J i K), a ti podtipovi se dalje mogu dijeliti na varijante. Podtip C prevladava u dijelovima trećeg svijeta s najvišom prevalencijom

infekcije (Afrika, Indija), dok je podtip B dominantan podtip virusa HIV-1 u razvijenijim dijelovima svijeta (zapadna Evropa, Australija, Sjeverna i Južna Amerika) s relativno niskom prevalencijom infekcije. Skupine N, O i P ograničene su na zapadnu Afriku.

Virion virusa humane imunodeficijencije ima promjer oko 100 nm te sadrži dvije molekule jednolančane RNK koje su međusobno povezane na 5' kraju. Unutar virusne kapside, molekule RNK vezane su za virusne enzime i proteine nukleokapside (p7). Kapsida se sastoji od kapsidnog virusnog proteina (p24), a okružuje je ovojnica. Ovojnica virusa sastoji se od virusnog proteina matriksa (p17) i lipidne membrane koja sadrži 72 glikoproteinska kompleksa sastavljena od trimera veznog glikoproteina gp120 i transmembranskog proteina gp41. Genom HIV-1 veličine je 9,8 kb i sadrži tri glavna gena: *gag* (engl. *group-antigen*), *pol* (engl. *polymerase*) i *env* (engl. *envelope*) (slika 7.8).



Slika 7.8. Šematski prikaz građe virusa humane imunodeficijencije i genoma HIV-a s tri glavna gena: *gag*, *pol* i *env*

Geni *gag* i *env* kodiraju proteine nukleokapsidne i glikoproteinske virusne membrane, a gen *pol* kodira proteine proteazu, reverznu transkriptazu i integrazu. Genom HIV-1 ima još šest gena (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* i *nef*) koji doprinose njegovoj genetičkoj kompleksnosti.

Geni *nef*, *tat* i *rev* su eksprimirani u ranoj fazi replikacijskog ciklusa. *Tat* i *rev* su regulatorni proteini koji se nakupljaju unutar jezgre i vežu se na regione TAR (engl. *Trans-response elements*) unutar LTR (engl. *Long Terminal Repeat*) te na regione RRE (engl. *Rev Response Elements*) koji se nalaze unutar gena *env*. Protein *tat* je transkripcijski aktivator promotorskih regiona LTR i esencijalan je za virusnu replikaciju *in vitro*. *Tat* i *rev* stimuliraju transkripciju provirusne DNK u RNK, promoviraju njenu elongaciju, pospješuju transport HIV-1 RNK iz jezgre u citosol te su nužni za prevođenje virusne mRNK.

Najčešći putevi prijenosa HIV-1 su spolni odnosi, tjelesne tekućine (krv, majčino mlijeko) te vertikalni prijenos s majke na dijete. Primarna (akutna) infekcija HIV-om često je asimptomatska, dok se nakon nekoliko tjedana uspostavlja hronična doživotna infekcija. Tokom akutne infekcije dolazi do intenzivne replikacije virusa u organizmu te aktivacije brojnih mehanizama urođene i specifične imunosti.

Gastroenterolog doktor Richard J. Schmidt 1994. godine optužen je za zloupotrebu virusa humane imunodeficijencije. Naime, on je iskoristio HIV pozitivan uzorak krvi oboljelog pacijenta kada je bivšoj partnerici intramuskularno injektirao vitamin B. Nakon što je bivša partnerica ustanovila da je HIV pozitivna, započeta je forenzička i epidemiološka istraga. Žrtva je predočila historiju svojih partnera i nakon analize krvi utvrđeno je da su svi bili HIV negativni. Žrtva je bila medicinska sestra koja tokom svog rada nije imala incidentne situacije koje bi mogle biti uzrokom infekcije, ali je sredinom osamdesetih godina došla u kontakt s pljuvačkom HIV pozitivnog pacijenta, poslije čega je bila testirana i utvrđeno je da je HIV negativna. Dodatno, bila je dobrovoljni davatelj krvi, zbog čega je početkom 1994. godine bila testirana i rezultati su bili negativni. Upravo zbog toga, pažnja istražitelja bila je usmjerena na doktora s kojim je žrtva prethodno bila u vezi. Na osnovu medicinske evidencije ustanovljeno je da je posljednje uzimanje uzorka krvi HIV pozitivnog pacijenta bilo neposredno prije nego što je doktor žrtvi aplicirao vitamin B. Istražitelji su posumnjali da bi upravo taj pacijent mogao biti izvor HIV virusa kojim je žrtva bila zaražena. Uslijedila je detaljna analiza koja je uključivala prikupljanje uzoraka krvi HIV pozitivnog pacijenta, žrtve i kontrolnih uzoraka virusa. Nakon PCR amplifikacije fragmenta *env* gena veličine 858-bp i gena za reverznu transkriptazu (RT) veličine 1,147-bp virusa žrtve, pacijenta i drugih kontrolnih uzoraka, urađeno je sekvenciranje ciljanog gena i detaljne filogenetske analize. Na osnovu rezultata molekularno-filogenetskih analiza, koje služe za rekonstrukciju evolutivnih

odnosa između nukleotidnih sekvenci i proučavanje varijabilnosti virusa, potvrđeno je da su nukleotidne sekvence virusa žrtve bile najslićnije sekvencama HIV virusa izolovanog iz dotičnog pacijenta. Također je utvrđeno da su mutacije virusnih izolata iz žrtve i pacijenta povezane s *rezistencijom* na antiretrovirusni lijek *zidovudine*. Analize su izvođene u dvije nezavisne i odvojene laboratorije kako bi se spriječila mogućnost kontaminacije uzoraka ili neke druge moguće greške. Rezultati filogenetske analize u ovom slučaju predstavljaju i prvo korištenje kao dokaza na sudu u SAD. Na osnovu predočenih rezultata provedene istrage, doktor Schmidt je proglašen krivim za pokušaj ubistva i biokriminalne aktivnosti, nakon čega je kažnjen zatvorskom kaznom u trajanju od 50 godina.

7.2 MIKROBIOTA I MIKROBIOM

Pojam mikrobiota odnosi se na sve mikroorganizme prisutne u određenoj sredini. Ovaj termin su 2001. godine prvi put definisali Lederberg i McCray te su istaknuli ulogu mikroorganizama koji nastanjuju ljudski organizam u očuvanju zdravlja. Ekspanzija informacija o ljudskom mikrobiomu u posljednjih nekoliko godina predvođena je podacima prikupljenim kroz nekoliko velikih projekata poput evropskog projekata *The European Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MetaHIT) i američkog projekta *The Human Microbiome Project* (HMP).

Ljudski organizam nastanjuje veliki broj mikroorganizama koji čine normalnu fiziološku mikrobiotu, a nalaze se u usnoj šupljini, dijelovima respiratornog trakta (nos, grlo), dijelovima digestivnog trakta, urogenitalnog sistema, na konjuktivi oka, površini i dubokim slojevima kože, uključujući i mliječne žlijezde. Zajednica mikroorganizama koja uključuje bakterije, arheje, viruse i pojedine jednostanične eukariote, koji obitavaju u specifičnoj okolini, označava se kao *mikrobiota*. Drugi izraz koji se koristi je *mikrobiom*, međutim, on po definiciji označava sveukupan genetički materijal određene mikrobiote. Područje molekularnih istraživanja koja proučavaju složenost mikrobioma naziva se *metagenomika*.

Mikrobiota štiti organizam od patogenih mikroorganizama, potiče imuni sistem, pomaže u probavi hrane, proizvodi određene vitamine, učestvuje u metabolizmu itd. Broj ljudskih ćelija od kojih se čovjek sastoji iznosi otprilike 10^{13} , a broj bakterija koje se nalaze u ili na tijelu čovjeka iznosi oko 10^{14} . Koliko je mikrobiota čovjeka raznovrsna vidi se iz podatka da u odraslom organizmu koegzistira preko 1000 različitih vrsta bakterija, a na taj broj treba dodati i prisutne vrste gljivica i

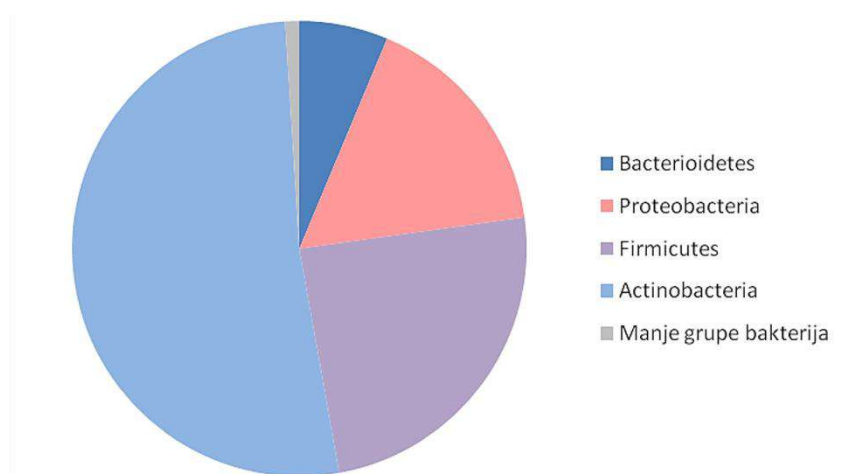
arheja. Ipak, njihov broj je mnogostruko manji, a dominantni predstavnici su rod *Candida* među gljivicama, kao i metanogene arheje iz rodova *Methanobrevibacter* i *Methanosphaera*.

Iako svaki pojedinac ima jedinstveni bakterijski profil, razlikuje se osnovni mikrobiom, tj. *jezgro mikrobioma* (engl. *microbiome core*). Ovaj mikrobiom odgovara bakterijskim zajednicama koje dijele svi pojedinci i nesumnjivo doprinosi bitnim funkcijama u ljudskom tijelu. Naglašava se i uloga mikroorganizama koji čine mikrobiotu takozvanu *funkcionalnu jezgru* (engl. *functional core*). Članovi jezgre mikrobioma možda nemaju direktnu interakciju s ljudskim domaćinom, ali doprinose stabilnosti (jezgre) mikrobioma kroz metaboličke uloge i funkcije mikrobiote na molekularnoj razini. Na individualnom nivou se mijenjaju tokom vremena, ali određene vrste i sojevi mogu naseljavati tijelo godinama.

7.2.1 Mikrobiom kože

Koža je važan ljudski organ koji prvenstveno ima ulogu u sprečavanju gubitka vlage i štiti organizam od nepovoljnih uticaja i patogena. Mikroorganizmi kože su također dio ljudskog mikrobioma. Iako je ukupan broj mikroorganizama na koži manji u odnosu na usnu šupljinu i gastrointestinalni sistem, molekularnogenetičke analize su pokazale da koža ima bogatu i raznovrsnu mikrobiotu zajednica bakterija i gljivica (prvenstveno kvasaca), čiji sastav zavisi od dijela kože.

Sekvenciranjem gena za 16s rRNK bakterija kože (s 20 različitih dijelova na tijelu kod deset zdravih pojedinaca) utvrđeno je 19 različitih bakterijskih filuma s preko 200 različitih rodova. Dominiraju četiri filuma: Actinobacteria (52%), Firmicutes (24%), Proteobacteria (16%) te dalje s učešćem od 6% i pripadnici filuma Bacteroidetes (slika 7.9). Oko 60% sekvenci povezano je sa samo tri roda: *Corynebacterium* (23%), *Propionibacterium* (23%) i *Staphylococcus* (17%). Mikrobiota je podijeljena u odnosu na dijelove kože koji su kategorisani kao: vlažni, masni i suhi dijelovi pa svaka mikrosredina ima svoju karakterističnu mikrobiotu. Masni dijelovi sadrže pretežno vrste rodova *Propionibacterium* i *Staphylococcus*. Na vlažnim mjestima dominiraju rodovi *Corynebacteria* i *Staphylococcus*. U suhim okruženjima dominira mješovita populacija Betaproteobacteria, *Corynebacteria* i Flavobacteriales. Međutim, kod svakog pojedinca postoje određene varijacije. Najmanje pet vrsta gljivica *Malassezia* spp. najčešće se nalaze na koži kod zdravih osoba. Povremeno je prisutan i lipofilni kvasac *Pityrosporum ovale*, i to na koži tjemena.



Slika 7.9. *Mikrobiološki sastav normalne mikrobiote kože čovjeka*

Iako mikrobiota u većini slučajeva ostaje manje ili više konstantna, različiti faktori okoline i domaćina mogu uticati na sastav mikroorganizama. Tako npr. uslovi spoljašnje sredine mogu znatno uticati na mikrobiotu kože, kao i povećanje temperature kože i vlažnosti, što povećava brojnost mikroorganizama kože. Starost domaćina ima efekta pa djeca imaju raznovrsniju mikrobiotu i više potencijalno patogenih gram-negativnih bakterija nego odrasle osobe. Lična higijena isto tako utiče na rezidencijalnu mikrobiotu pa osobe s lošim higijenskim navikama obično imaju veću brojnost mikroorganizama na koži.

7.2.2 Mikrobiom usne šupljine

Oralna šupljina je veoma složena i heterogena mikrobna sredina. U jednom mililitru (ml) pljuvačke može biti prisutno i oko 500 miliona bakterija. Zbog čestica hrane koje se zadržavaju na površini zuba i desni, stvaraju se povoljni uslovi za rast mikroorganizama. U usnoj šupljini prisutno je najmanje 750 vrsta aerobnih i anaerobnih mikroorganizama, uključujući i manju zastupljenost metanogenih arheja i gljivica.

Mikrobiom usne šupljine po svom je sastavu individualiziran. Bakterije pronađene u ustima tokom prve godina života (kada su zubi odsutni) pretežno su aerotolerantni anaerobi kao što su streptokoki i laktobacili. S nicanjem zuba dolazi i do promjene u sastavu mikroorganizama pa su prisutni i anaerobi koji su posebno prilagođeni rastu na površinama zuba i gingivalnih pukotina.

7.2.2.1 Gram-pozitivne koke

Od gram-pozitivnih koka, bakterije roda *Streptococcus* su najčešće zastupljene bakterije u oralnoj šupljini i izolovane su sa svih oralnih površina. Bakterije ovog roda u usnoj šupljini grupisane su u četiri skupine: *mutans*, *salivarius*, *anginosus* i *mitis*.

Vrste *S. mutans* i *S. sobrinus* najčešće se nalaze zajedno s vrstama *S. criceti* i *S. rattii* i koncentrirane su na zubnoj površini. Vrste *S. salivarius*, *S. thermophilus* i *S. vestibularis* nalaze se na svim površinama usne šupljine, ali one preferiraju kolonizaciju mukozne membrane, naročito jezika. Grupa *anginosus* obuhvata vrste: *S. constellatus*, *S. intermedius* i *S. anginosus* koje se najčešće nalaze na zubnom plaku u mukoznoj membrani. *S. mitis*, *S. oralis* i *S. sanguinis* su najčešće bakterije u usnoj šupljini, ali dominira vrsta *S. mitis*.

U usnoj šupljini prisutan je veliki broj vrsta roda *Streptococcus*, a pojedini sojevi ovih bakterija specifični su za svakog pojedinca. Od drugih gram-pozitivnih koka u usnoj šupljini nalazi se vrsta *Granulicatella adiacens*, bakterija koja kolonizira sve dijelove usne površine, te vrste *Abiotrophia defectiva*, *Gemella* sp., *Peptostreptococcus stomati*. Bakterije rodova *Staphylococcus* i *Micrococcus* rijetko se nalaze u usnoj šupljini, iako su obilno zastupljene na koži i nazalnoj mukoznoj membrani.

7.2.2.2 Gram-negativne štapićaste bakterije

Od gram-negativnih štapićastih bakterija, vrste roda *Actinomyces* su brojne u mikrobiomu zubnog plaka, a najčešće su prisutne *A. naeslundii* i *A. oris*. Vrste rodova *Eubacterium*, *Mogibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Slackia*, *Cryptobacterium*, *Shuttleworthia*, *Solobacterium* i *Bulleidia* izolovane su iz bukalnog mikrobioma, međutim, njihova prisutnost je najčešće povezana s peridontalnim oboljenjima. Vrste roda *Lactobacillus* i *Propionibacterium* (koji su obavezni anaerobi), *Arcanobacterium* i *Actinobaculum* često se nalaze u usnoj šupljini. Vrste *Corynebacterium matruchotti*, *Rothia dentocariosa* i *Bibacterium dentium* često se izoluju iz zubnog plaka, a *Rothia dentocariosa* i *B. dentium* se također nalaze na jeziku, dok bakterija *Alloscardovia omnicolens* obitava u oralnoj šupljini.

7.2.2.3 Gram-negativne koke

Od gram-negativnih koka, bakterije roda *Neisseria* nalaze se na svim površinama u usnoj šupljini u malim količinama. Najčešće pronađene vrste su *N. subflava*, *N. mucosa*, *N. flavescens* i *N. pharyngis*. Vrste roda *Veillonella*, koji su striktni anaerobi, uključujući *V. parvula*, *V. dispar*, *V. atypica*, *V. denticariosi* i *V. rogosae*, predstavljaju važan dio oralnog mikrobioma. Povremeno je u zubnom plaku prisutna i bakterija *Megasphaera* sp.

7.2.2.4 Gram-negativne štapičaste bakterije

Veliki broj gram-negativnih bacila nalazi se u zubnom plaku kao npr. *Haemophilus parainfluenzae*, koja je jedina vrste roda *Haemophilus* koja obitava u usnoj šupljini. Dalje su prisutne i fakultativno anaerobne vrste iz roda *Capnocytophaga*. Kokobacil pod nazivom *Kingella oralis* nalazi se na mnogim mjestima u oralnoj šupljini, kao i bakterija *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Vrste iz rodova *Simonsiella* i *Eikenella* koloniziraju epitelni sloj bukalne sluznice.

7.2.2.5 Mikoplazme

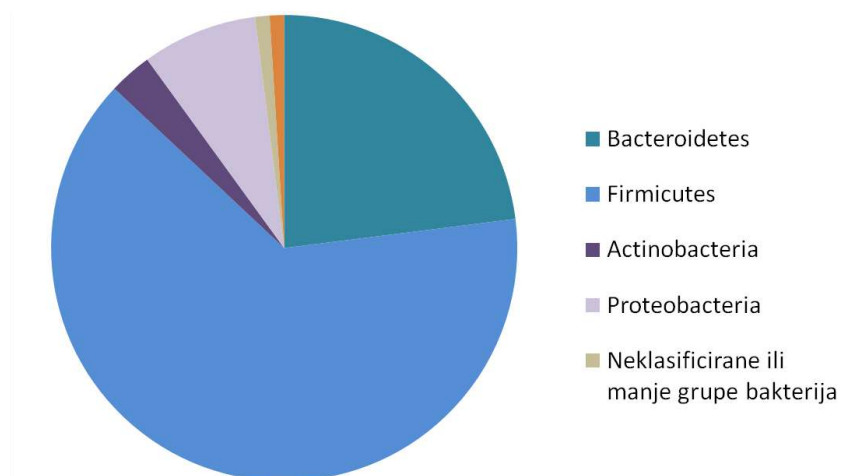
U usnoj šupljini u oko 32% ljudi nalaze se mikoplazme, i to vrste *Mycoplasma buccale*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium* i *M. hominis*. Posljednje tri vrste se nalaze u sastavu pljuvačke. Kada je u pitanju sastav mikrobioma usne šupljine, postoji međuindividualna varijabilnost i intraindividualna varijabilnost. Također, određene navike utiču na njen sastav pa je otkriveno da bakterije *Streptococcus sobrinus* i *Eubacterium brachy* postoje kod pušača, dok kod nepušača nisu otkrivene. Nadalje, brojnost i sastav bakterija će se razlikovati u zavisnosti od oralne higijene i uslijed parodontalnog oboljenja, pa su tako npr. rodovi bakterija *Centipeda*, *Johnsonella* i *Catonella* izolovani samo kod osoba s nekim oralnim oboljenjem.

7.2.3 Mikrobiom gastrointestinalnog trakta

Pojam *crijevna mikrobiota* definisan je kao zajednica mikroorganizama koji obitavaju u probavnom traktu. Ljudski probavni trakt je prirodno stanište za brojne, različite vrste mikroorganizama, pri čemu najveći dio od oko 90% čine bakterije, a skup njihove genetičke informacije naziva se *intestinalni mikrobiom*. Mikroorganizmi su prisutni cijelom dužinom

gastrointestinalnog trakta, a broj bakterija se povećava prema distalnom dijelu probavnog trakta. Normalna interakcija između bakterija koje se nalaze u crijevu i njihovog domaćina predstavlja simbiotski odnos koji donosi korist i bakterijama i domaćinu. Prije samog rođenja, mikroorganizmi nisu prisutni u gastrointestinalnom traktu, ali kolonizacija inicijalno sterilnog probavnog trakta počinje odmah tokom i nakon rođenja.

Prvo se dešava sukcesija mikrobioloških populacija dok se ne uspostavi stabilna mikrobiota. Izvor ranih kolonizatora još uvijek nije potpuno jasan, međutim, za neke vrste se zna da se prenose s majke na dijete. Fakultativni anaerobi su prvi kolonizatori intestinalnog trakta i oni stvaraju okolinu pogodnu za naseljavanje striktnih anaeroba poput vrsta roda *Clostridium* i *Bifidobacterium*. Crijevna mikrobiota novorođenčadi karakterisana je niskim stepenom raznolikosti i relativnom dominacijom filuma Proteobacteria i Actinobacteria. S vremenom dolazi do povećanja raznolikosti intestinalne mikrobiote s pojavom i prevladavanjem bakterija iz filuma Firmicutes i Bacteroidetes. Kod djece od dvije do pet godina crijevna mikrobiota ima sastav i raznovrsnost sličnu odraslima. Uspostavljena mikrobiota ostaje relativno stabilna, no ipak je podložna uticaju prehrane, bolesti, korištenja lijekova (posebno antibiotika) i starenja. Dinamičan razvoj mikrobiote zavisi od velikog broja faktora u okolišu i djetinjstvu. Faktori koji će pozitivno modulirati crijevnu mikrobiotu jesu vaginalni porod, dojenje i izlaganje mikroorganizmima, dok negativan učinak ima porod na carski rez, prijevremeni porod, dohrana i terapija antibioticima. Istraživanja su pokazala da djeca rođena carskim rezom imaju manje “dobročudnih” anaeroba kao što su bakterije filuma Bacteroides i Bifidobacterium, a više vrsta roda Clostridium u odnosu na djecu rođenu prirodnim putem. Također, dojena djeca, osim što dobijaju imunoregulatorne tvari iz majčinog mlijeka, imaju korist i od metaboličke i prebiotičke funkcije mlijeka, što modificira crijevnu mikrobiotu pa tako kod dojene dojenčadi dominiraju bakterije roda Bifidobacterium, dok se kod djece hranjene adaptiranim mlijekom nalazi širi spektar mikroorganizama, uključujući rodove Bifidobacterium, Bacteroidetes, Clostridium, Enterococcus i Streptococcus. Primjena antibiotika kod dojenčadi mijenja sastav mikrobiote pa su u tom slučaju više prisutne vrste iz rodova Klebsiella, Citrobacter i Enterobacter, a manji je broj rodova Bacteroides i Bifidobacterium. U intestinalnom traktu odrasle osobe zastupljeno je nekoliko bakterijskih filuma: Firmicutes (64%), Actinobacteria (3%), Proteobacteria (8%) te s učešćem od 23% pripadnici filuma Bacteroidetes (slika 7.10).

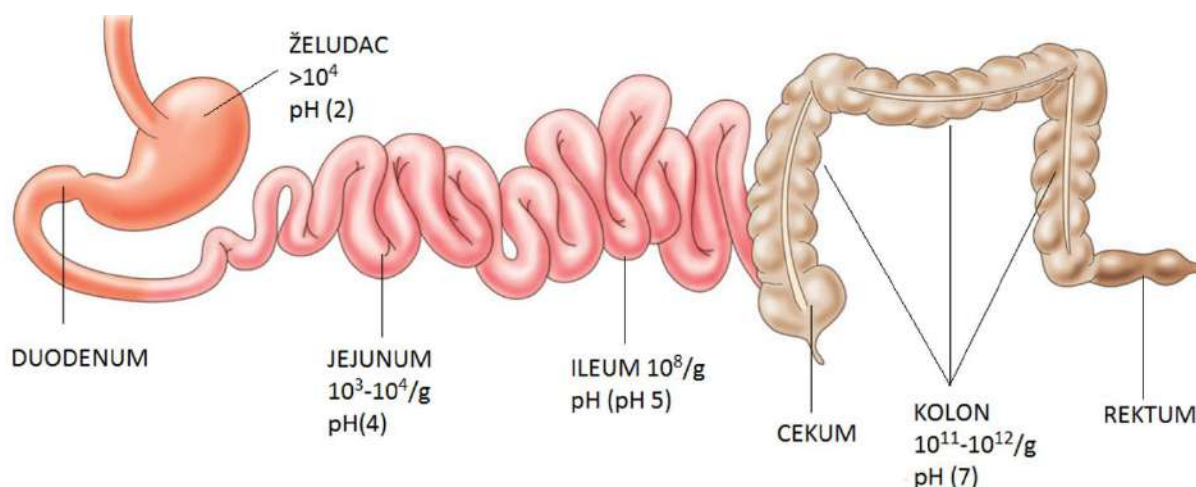


Slika 7.10. Mikrobni sastav debelog crijeva čovjeka na osnovu analize 16S rRNA genskih sekvenci izolovanih mikroorganizama

Pripadnici filuma Firmicutes i Bacteroidetes prevladavaju u debelom crijevu i čine više od 90% bakterijske populacije, dok su filumi Actinobacteria i Proteobacteria manje zastupljeni. U intestinalnom traktu anaerobnih bakterija ima 100–1000 puta više od aerobnih bakterija.

7.2.3.1 Mikrobiom želuca i dvanaestopalačnog crijeva

Sastav mikrobiote se razlikuje duž cijelog probavnog trakta prema koncentraciji bakterijskih stanica, od 10^1 stanica po gramu lumenalnog sadržaja jednjaka do 10^{12} po gramu sadržaja debelog crijeva, što je prikazano na slici 7.11. Želudac i dvanaestopalačno crijevo nastanjuje mali broj mikroorganizama, manje od 10^3 koloniformnih jedinica (engl. *Colony-Forming Units* – CFU) na gram crijevnog sadržaja. Razlog tome je želučana kiselina (pH 2), žuč i probavni enzimi koji nepovoljno djeluju na bakterije te je smanjena mogućnost njihovog prianjanja za epitel. Sekvenciranjem gena 16S rRNK ustanovljeno je da se želučana mikrobiota sastoji od nekoliko različitih filuma, ali velikog broja vrsta. Sastav mikrobiote želuca razlikuje se od pojedinca do pojedinca. Prisutno je nekoliko vrsta gram-pozitivnih bakterija, kao i vrste filuma Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria i Fusobacteria. Vrsta *Helicobacter pylori*, iako nije prisutna kod svih ljudi, ipak kolonizira zid želuca kod velikog broja ljudi, a kod osjetljivih pojedinaca ova bakterija može izazvati čireve. Također, ovdje mogu biti prisutne neke od bakterija iz usne šupljine koje se unose u želudac hranom.



Slika 7.11. Broj bakterija u pojedinim dijelovima gastrointestinalnog trakta ljudi. Broj bakterija predstavljen je ukupnim brojem bakterija po gramu intestinalnog sadržaja kod zdravih ljudi.

7.2.3.2 Mikrobiom jejunuma i ileuma

Broj bakterija od jejunuma prema ileumu proporcionalno se povećava i kreće se od 10^4 do 10^7 CFU po gramu sadržaja. Sredina u duodenumu je prilično kisela pa je mikrobiota po svom sastavu slična kao i u želucu. Distalno u ileumu vrijednost pH postepeno raste i povećava se broj prisutnih bakterija pa iznosi oko 10^5 – 10^7 po gramu intestinalnog sadržaja, iako sredina postepeno postaje anoksična.

7.2.3.3 Mikrobiom debelog crijeva

Debelo crijevo sadrži veliki broj mikroorganizama koji iznosi i do 10^{12} CFU po gramu sadržaja, pri čemu je prisutan veliki broj (500–1000) različitih vrsta bakterija (slika 7.11).

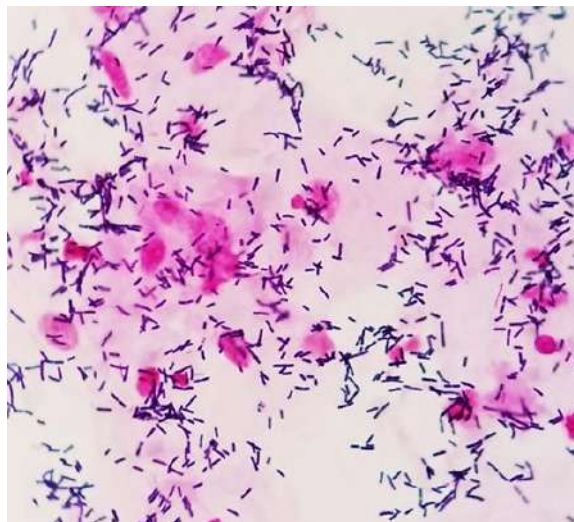
Fakultativni anaerobi kao što je vrsta *Escherichia coli* su prisutni, ali u manjem broju od oko 10^7 po gramu intestinalnog sadržaja u odnosu na druge vrste. Fakultativni anaerobi koriste preostali kisik i na taj način stvaraju anaerobne uslove koji su pogodni za razvoj striktnih anaeroba, uključujući vrste roda *Clostridium* i *Bacteroides*. Metanogena arheja pod nazivom *Methanobrevibacter smithii* prisutna je u velikom broju, dok se protisti ne nalaze u gastrointestinalnom traktu kod zdravih ljudi.

Novija istraživanja pokazuju da postoje interindividualne varijacije u sastavu mikrobiote koje, s obzirom na prisutne vrste i njihovu zastupljenost, prate određene obrasce prepoznatljive unutar ljudskih populacija. Takve varijacije su primijećene unutar populacija na temelju geografske različitosti, tjelesne konstitucije, zdravlja, ishrane te mnogih drugih faktora. Na primjer, osobe koje konzumiraju značajne količine mesa imaju veći broj bakterija roda *Bacteroides*, a manji broj koliformnih bakterija i bakterija mliječne kiseline nego osobe s vegetarijanskim načinom ishrane.

Za razliku od neznatne razlike u sastavu na nivou filuma, raznovrsnost rodova i vrsta u intestinalnom traktu sisara je velika. Na osnovu istraživanja bakterijskih sekvenci 16S rRNK uočeno je da se u intestinalnom traktu ljudi nalazi više od 1800 rodova, 16.000 vrsta i 36.000 sojeva mikroorganizama. Istraživanja koja su uključivala zdrave muškarce i žene starosti od 27 do 94 godine pokazala su interpersonalnu razliku u sastavu mikroorganizama i utvrdila da svaka osoba ima nekoliko stotina mikroorganizama koji su za nju karakteristični i da je takav sastav stabilan duži vremenski period. Komparativna istraživanja su pokazala da se sastav humanog mikrobioma razlikuje od mikrobioma drugih vrsta sisara te da je specifična mikrobiota karakteristična za svaku vrstu sisara.

7.2.4 Vaginalni mikrobiom

Laktobacili su dominantne bakterije u vaginalnoj mikrobioti. Opisano je oko 80 vrsta laktobacila za koje se smatra da čine 60–90% normalne vaginalne mikrobiote žena u reproduktivnom periodu. U vaginalnom sekretu dominira vrsta *Lactobacillus acidophilus*, ali se mogu izolovati i sljedeće vrste: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus salivarius* i *Lactobacillus jensenii* (slika 7.12). Pored laktobacila koji dominiraju, u normalnoj mikrobioti genitalnog trakta u malom broju se nalaze vrste iz rodova *Corynebacterium* spp., *Bacteroides* spp., kao i bakterije *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* i gljivice. Gram-negativne bakterije mogu biti sastavni dio genitalne mikrobiote u malom broju, ali ako se razmnože u velikom broju, mogu izazvati genitalne infekcije. U ovu grupu spadaju bakterije iz rodova: *Acinetobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* i *Pseudomonas*. Bakterije iz roda *Acinetobacter* su polimorfni obligatni aerobi, koji se javljaju kao sastavni dio mikrobiote čovjeka (koža, disajni putevi i genitalni trakt).

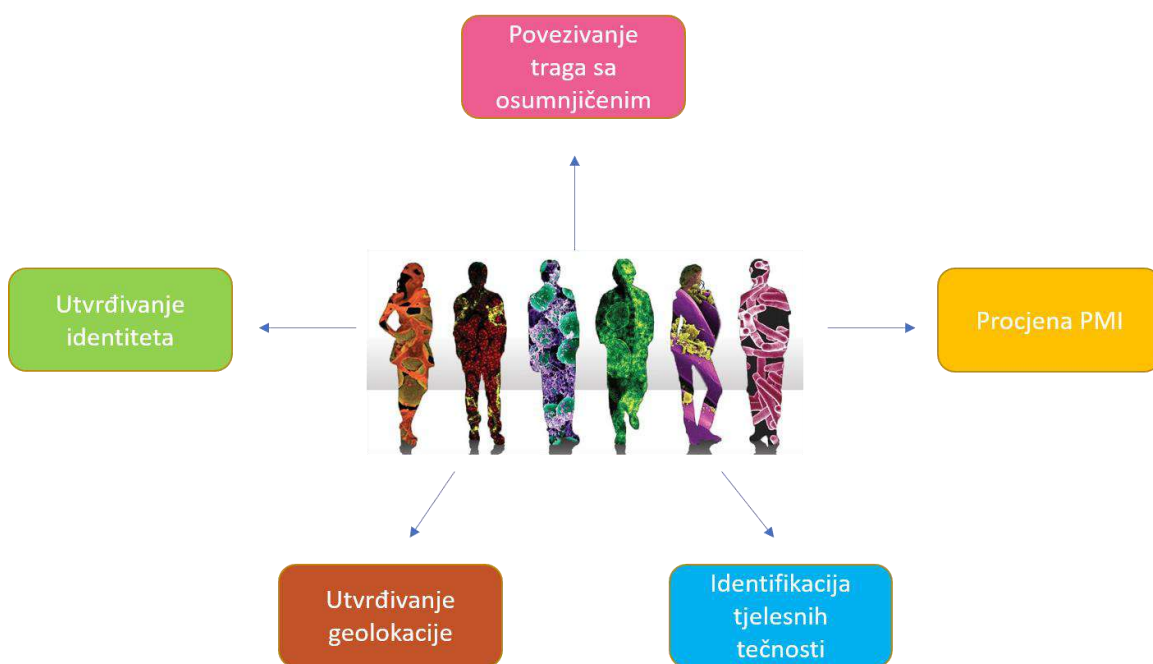


Slika 7.12. Analiza vaginalnog brisa s dominantnim rodом *Lactobacillus*

7.2.5 Primjena mikrobioma u forenzici

Prethodno je opisana priroda i sastav ljudskog mikrobioma, ali je dalje neophodno ilustrovati na koji način mikrobiomi mogu naći primjenu u forenzici. Kao što je već naglašeno, mikrobiomi su izuzetno raznovrsni i pokazuju intrapersonalne i interpersonalne varijacije, kako po brojnosti tako i po taksonomskoj strukturi. Mikrobiomi su trenutno najinteresantnije područje mikrobiologije te se smatra se da će rezultati daljih istraživanja u ovoj oblasti uticati na mnoga dosadašnja saznanja. Veliki potencijal za primjenu mikrobioma u forenzici rezultat je uvođenja metoda sekvenciranja nove generacije u identifikaciji mikroorganizama. To podrazumijeva umnožavanje i sekvenciranje specifičnih kratkih sekvenci gena te identifikaciju bakterija na temelju kratkog nukleotidnog slijeda gena 16S rRNK. Metabarkoding analize tehnički omogućavaju da se identificiraju svi mikrobijalni taksoni prisutni u istraživanom uzorku. Pored sekvenciranja određenih regiona, koristi se i pristup sekvenciranja i analize čitavih genoma mikroorganizama iz uzorka tzv. *metodom sačmarice* (engl. *shotgun*) ili neciljanog sekvenciranja. U ovom slučaju identifikacija se temelji na analizi stotina lokusa pa se dobijaju informacije o najnižim razinama taksonomske klasifikacije, odnosno o vrsti i soju, što se obično definiše kao metagenomika u užem smislu. Prema tome, ako bi mikroorganizmi bili dokazni materijal prikupljen na mjestu zločina, onda bi hipotetički bilo moguće koristiti DNK barkoding ili *shotgun* metagenomiku u cilju rješavanja istrage.

Kako je sastav mikrobioma visoko individualiziran, to znači i da bi potencijalno bilo moguće utvrditi identitet osobe na osnovu njenog specifičnog mikrobioma koji se naziva *mikrobiološki otisak*. Upravo zbog toga mikrobiom ima široku primjenu u forenzici. Mikrobiomi bi se mogli koristiti za povezivanja mikroorganizmama s eventualnim počiniteljem zločina, žrtvom ili mjestom zločina. To otvara brojne mogućnosti primjene profiliranja mikrobioma u forenzičkim istragama, ali i u medicini. Tako da bi u doglednoj budućnosti njegova primjena trebala biti dio rješavanja forenzičkih slučajeva, ali bi velike koristi mogla imati i u otkrivanju i liječenju različitih bolesti. Mikrobiom se u forenzici može koristiti kao potencijalni dokaz za utvrđivanje identiteta osobe, postmortalnog intervala, detekciju i identifikaciju tjelesnih tečnosti, odnosno bioloških tragova, određivanja geografske lokacije (slika 7.13) itd. Također, mikrobiomi pružaju uvid u informacije o životnom stilu osobe koje forenzičari mogu koristiti za identifikaciju porijekla nepoznatih uzoraka tokom kriminalističke istrage.



Slika 7.13. Primjena mikrobioma u forenzici

7.2.5.1 Utvrđivanje identiteta osobe na osnovu mikrobioma

Trenutne metode identifikacije ljudi u forenzičkoj nauci u velikoj se mjeri oslanjaju na analizu ljudske DNK. Međutim, degradacija i mala količina DNK, kao i neke druge okolnosti koje se često susreću u kriminalističkoj praksi i na mjestu zločina, ponekad mogu biti ograničavajući faktor u istragama. Ne smije se zanemariti ni činjenica da, zbog nasljedne istovjetnosti, metode DNK profiliranja ne mogu poslužiti za razlikovanje jednojajčanih blizanaca. Prema tome, jasna je neophodnost novih metodoloških pristupa na polju forenzike, odnosno mogućnost primjene svih bioloških resursa, među kojima su i mikroorganizmi.

Nekoliko je razloga zašto je bakterijska DNK zanimljiva u ovom kontekstu. Prije svega, bakterijska DNK je bolje zaštićena od ljudske DNK te je otpornija na degradaciju. Zbog toga je i postojanija duži vremenski period na nekoj površini. Analiza bakterijske DNK neće zamijeniti standardno DNK profiliranje, ali bi mogla biti komplementarna metoda na primjer u slučajevima kada su na mjestu zločina prisutne male količine tragova. U posljednje vrijeme su provedene brojne studije koje se odnose na *mikrobni otisak* na različitim predmetima kao što su telefoni, odjeća, vrata itd., koje su pokazale upotrebljivost analize mikrobioma u rješavanju forenzičkih slučajeva. Većina mikroorganizama čovjeka je autonomna, samoreplicirajuća, prenosiva te po broju i sastavu značajno varira između individua. Mikrobiom može predstavljati jedinstveni *otisak* koji se može koristiti u svrhu identifikacije ljudi. Ovo može biti posebno relevantno u istraživanjima gdje pronađeni trag ne sadrži dovoljne količine kvalitetne DNK da bi se dobio potpuno individualizirani DNK profil, što je posebno problematično u kontaktnim tragovima.

Upravo su studije u kojima su se analizirali predmeti na kojima ostaju kontaktni tragovi (mobilni telefoni, kompjuterska oprema i dr.) pokazale da je moguće identificirati korisnika uspoređujući sličnosti mikrobnog profila kontaktnog traga i kože ispitanika s preciznošću i do 93%. Ipak, za pouzdanu primjenu mikrobioma u forenzici, posebno u identifikacijske svrhe, potrebno je provesti obimne populacijske studije kako bi dobijeni rezultati imali preciznu statističku vrijednost i pouzdanu interpretaciju kroz isključivanje lažno pozitivnih rezultata.

7.2.5.2 Individualizacija na osnovu mikrobioma kože

Mikrobiom kože je visoko individualiziran, do te mjere da se ruke dvije osobe mogu razlikovati za više od 80% u pogledu sastava mikroba, zbog čega postoji potencijal za primjenu mikrobijalnih taksona u utvrđivanju ličnog identiteta. Ove personalizirane mikrobne zajednice mogu se prenijeti na objekte povezane s datom osobom, kao što su kompjuterska tastatura, kompjuterski miš, mobilni telefon i dr. Sastav personaliziranih mikrobnih zajednica kože općenito je stabilan tokom vremena. Sve u svemu, mikrobiomi kože imaju veliki potencijal da služe kao dokaz u istražnim postupcima, posebno u slučajevima kada se u isto vrijeme može prikupiti uzorak mikrobioma kože neke osobe i površine na kojoj je ostavljen trag. U takvim slučajevima veliki je potencijal primjene mikroorganizama kako bi se osoba dovela u vezu s predmetom koji je prethodno dodirнула. Dobna i spolna pripadnost imaju značajan uticaj na mikrobiološki sastav kože na rukama. Vrste filuma Firmicutes u velikom su broju prisutne na rukama djece, dok je na rukama odraslih osoba identificirano više propionibakterija.

S druge strane, na koži ruku osoba ženskog spola veća je bakterijska raznolikost, što bi se moglo dovesti u vezu s nižom pH vrijednosti kože muškaraca, kao i razlikama u hormonskim karakteristikama. Mikrobne zajednice kože relativno su stabilne tokom dužeg vremenskog perioda, a brojnost i sastav mikroorganizama na rukama vraća se u prvobitno stanje već nekoliko sati nakon detaljnog pranja ruku. Prema tome, postoji naučno uporište za primjenu mikroorganizama kože kao *jedinstvenog otiska* u forenzičkoj identifikaciji. Istraživači su uočili da se bakterije koje žive na koži lako prenose na predmete i da su otporne na mnoge vanjske faktore kao što su vlaga, povišena ili niska temperatura i UV zračenja. Međutim, još uvijek nema dovoljno podataka koji mogu da ukažu na to pod kojim bi se uslovima mikrobiomi kože mogli primijeniti u identifikaciji osobe.

7.2.5.3 Procjena postmortalnog intervala na osnovu mikrobioma

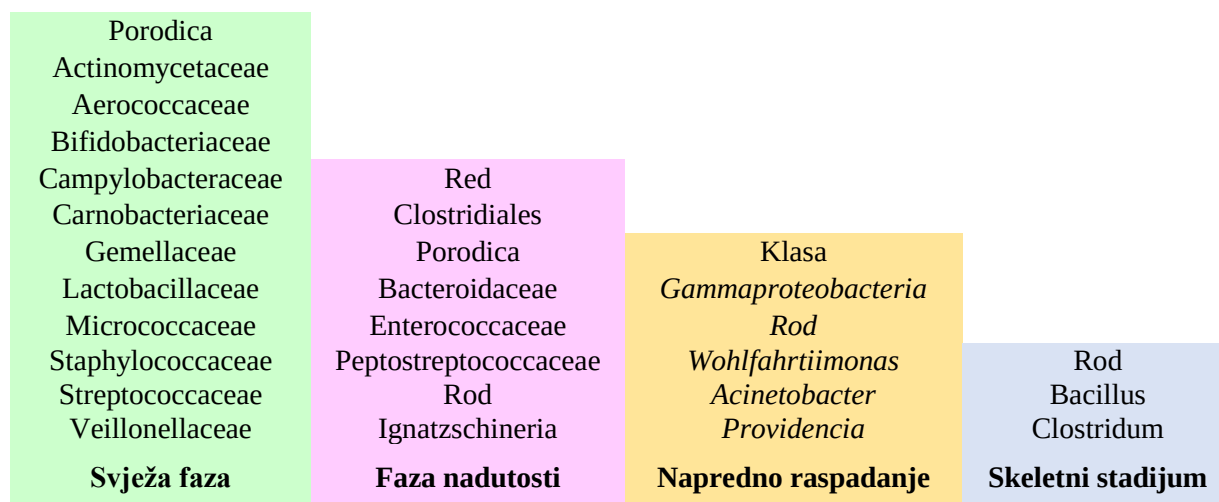
Određivanje vremena smrti, odnosno postmortalnog intervala – PMI, od krucijalnog je značaja u forenzičkom ispitivanju, jer je u velikom broju slučajeva utvrđivanjem PMI moguće razjasniti okolnosti nastanka smrti, dovesti u vezu počinioca sa zločinom, potvrditi / osporiti alibi itd. Prilikom procjene PMI u obzir se uzima što veći broj faktora kako bi se vremenski razmak u kojem se smrt dogodila što preciznije odredio ili suzio. Mikroorganizmi, kao pokretač postmortalne

razgradnje leša, mogu biti višestruko korisni u postmortalnim analizama. Sukcesija mikrobnih zajednica u tijelu nakon smrti odvija se po određenom predvidljivom i uobičajenom obrascu. Prema tome, sastav i dinamika ljudskog mikrobioma nakon smrti, kao i pridruženih mikrobnih zajednica u tlu (u slučaju mjesta zločina na otvorenom s tijelima koja leže na tlu), pokazali su se kao prikladan biomarker za procjenu postmortalnog intervala ljudskih leševa. Pored toga, analiza mikrobioma može pomoći u utvrđivanju uzroka smrti te dovesti do razjašnjenja brojnih drugih okolnosti vezanih za smrt.

Postmortalni mikrobiom može se podijeliti na *tanatomikrobiom* i *epinekrotični mikrobiom*. Prvi je sastavljen od bakterija i gljivica prisutnih u unutrašnjim organima, dok se epinekrotični mikroorganizmi nalaze na površini tijela (površinski epitel, oralna sluznica i distalni dio gastrointestinalnog trakta). Tanatomikrobiom je veoma stabilan te nije podložan djelovanju abiotičkih i biotičkih faktora. Mikroorganizmi se postmortalno premještaju iz organa i tkiva koja su prvobitno kolonizirali u velikom broju (najviše crijeva) u druga, do tada mikrobiološki nenastanjena područja. Taj proces naziva se *postmortalna translokacija* mikroorganizama. Studije su potvrdile da u toku prvih 48 sati nakon smrti mikrobiom ostaje stabilan s različitim zajednicama koje se nalaze na različitim dijelovima tijela. Dakle, da bi *antemortem* mikrobiom (mikrobiom žive osobe) postao *postmortem* mikrobiom (mikrobiom leša) potrebno je da prođe više od 48 sati. Kako razgradnja tkiva napreduje, diverzitet mikrobnih zajednica se smanjuje. Pri tome dolazi do smjene aerobnih bakterija (filum Bacteroidetes: Bacteroides i Parabacteroides; filum Firmicutes: Gemellaceae, Lactobacillaceae, Faecalibacterium, Phascolarctobacterium, Blautia i Lachnospiraceae incertae sedis) s anerobnim bakterijama iz filuma Firmicutes: Clostridium, Peptostreptococcus i Anaerosphaera; te dominiraju i gamaproteobakterije: Wohlfahrtiimonas, Ignatzschineria, Acinetobacter i Providencia (slika 7.14).

Nakon smrti, kako crijevna barijera nestaje, bakterije prvo ulaze u krvotok, pa u različite organe, uključujući jetru, perikardijalnu tečnost i slezenu. Perikardijalna tečnost ostaje najduže sterilna, dok jetra ostaje sterilna do pet dana nakon smrti. Obdukcija može otkriti bakterijske infekcije nakon smrti, uključujući respiratorne, abdominalne i druge (studija slučaja "Sally Clark").

U doglednoj budućnosti izradom i uspostavljanjem prateće baze podataka mikrobioma, koja će se zasnivati na sekvenciranju nove generacije (engl. *Next Generation Sequencing* – NGS), biće moguće povezati mikrobiom s preciznim vremenskim okvirom nastanka smrti, što će sigurno imati ogromnog značaja u forenzičkoistražnim postupcima.



Slika 7.14. Dinamika ljudskog mikrobioma u postmortalnom periodu

7.2.5.4 Određivanje geolokacije na osnovu mikrobioma

Ako određeno mjesto sadrži karakterističnu mikrobiotu koja se razlikuje od drugih lokacija, profiliranjem mikrobioma neke osobe moguće je eventualno ustanoviti i njegovo kretanje. Provedeno je nekoliko studija kako bi se okarakterisao urbani i tranzitni mikrobiom, te je utvrđeno da određena područja grada sadrže jedinstvene profile mikrobioma.

Mikrobne zajednice se razlikuju po sastavu i funkciji na različitim geografskim lokacijama, pa čak i do nivoa manjih lokacija (npr. gradova), kao rezultat klimatskih faktora, izvora energije dostupnih u okolini, ali i metaboličkih svojstava domaćina mikroorganizama. Tako se, na primjer, različiti sojevi bakterije *Helicobacter pylori* mogu povezati s određenim geografskim okruženjem. Dakle, poznavanje specifičnog sastava mikrobioma u/na domaćinu i njegovom okruženju može pomoći u određivanju njegove geografske lokacije. S tim u vezi, mora se spomenuti *Projekt mikrobioma Zemlje* (engl. *Earth Microbiome Project* – EMP) koji je pokrenut 2010. godine. Projektom je obuhvaćena analiza mikrobne zajednice tla s različitih lokacija u svijetu s ciljem razumijevanja biogeografskih varijacija i principa koji upravljaju mikrobnim zajednicama,

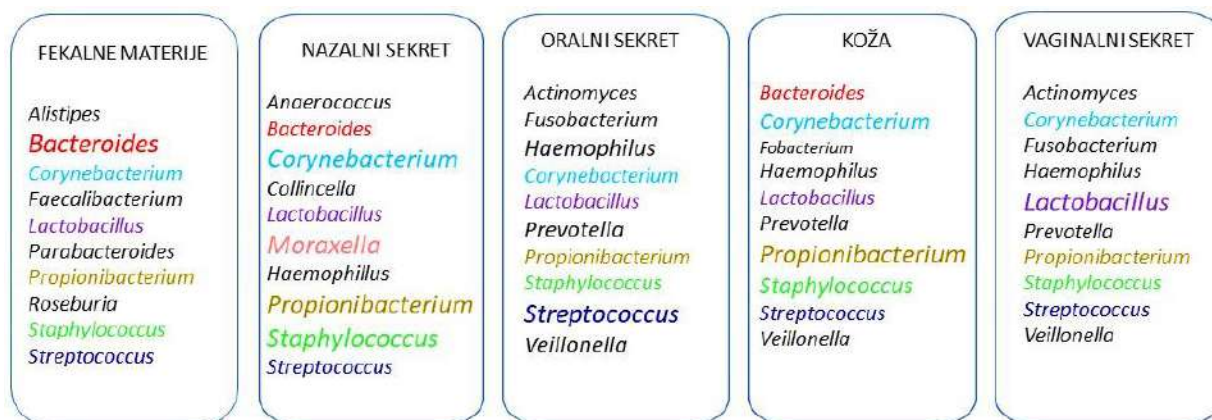
korištenjem standardiziranih protokola i deskriptora okoliša. Potencijal analize mikrobnih profila iz tla sve se više prepoznaje u forenzičkim mikrobiološkim istraživanjima. Rizosfera i mikrobiomi tla pokazuju visok nivo heterogenosti između različitih lokacija. Kao takvi, uz metodološko usavršavanje, uzorci mikrobioma tla mogli bi pružiti vrijedne biogeografske podatke za lokalizaciju porijekla uzorka tla.

Mikrobiom tla se razlikuje u zavisnosti od različitih faktora, uključujući geologiju, klimu i korištenje tla pa, shodno tome, dva uzorka tla nikada neće imati isti mikrobnii sastav. Još jedna potencijalna primjena profiliranja mikrobioma je u određivanju porijekla predmeta povezanih sa zločinom. U tom kontekstu, svaka inherentna razlika može biti dovoljno specifična da se identificira osoba ili dio dokaza na mjestu zločina. Mnoge su još potencijalne primjene mikrobioma, među kojima je posebno zanimljiva ona u pronalasku neotkrivenih grobnica.

7.2.5.5 Identifikacija tkiva / tjelesne tečnosti na osnovu mikrobioma

U forenzičkoj rekonstrukciji mjesta zločina, identifikacija bioloških tragova i njihovog tjelesnog porijekla prvi je korak u povezivanju osumnjičenog s mjestom zločina i počinjenim krivičnim djelom. Iako je u forenzičkoj praksi dostupno nekoliko testova za identifikaciju bioloških tragova, određena ograničenja u njihovoj specifičnosti i osjetljivosti naglašavaju potrebu za primjenom alternativnih metoda.

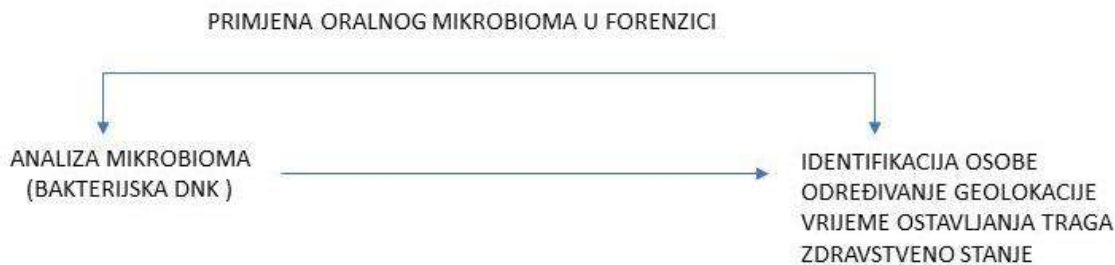
Bakterijski markeri predstavljaju novi pristup u forenzičkoj identifikaciji tjelesnih tečnosti i tkiva. Za većinu forenzički relevantnih ljudskih tkiva / tjelesnih tečnosti, mikrobiom je izvanredan biomarker, jer je zasnovan na razlikama u broju i sastavu taksona među odabranim uzorcima. Na osnovu relativne zastupljenosti taksona ili njihove brojnosti moguće je odrediti jesu li uzorci različiti ili slični. Trenutno nije determinisan takson koji je toliko jedinstven za neku tjelesnu tekućinu ili tkivo, ali se profiliranja oslanjaju na prilično stabilne obrasce zastupljenosti taksona u odabranom uzorku (slika 7.15). Forenzički motivisane studije uglavnom su se fokusirale na identifikaciju pljuvačke i vaginalne tečnosti na osnovu raznolikosti mikrobioma.



Slika 7.15. Deset dominantnih rodova mikrobioma u tjelesnim tečnostima / tkivima. Veličina teksta proporcionalna je zastupljenosti roda, a rodovi s velikom brojnošću prikazani su u odgovarajućoj boji.

7.2.5.5.1 Pljuvačka

Pljuvačka je tjelesna tečnost koja se često pronalazi na mjestu zločina. Može se naći na raznim predmetima, npr. cigaretama, čašama, tragovima ugriza, priboru za drogu i drugo. Iako postoje testovi za detekciju pljuvačke na osnovu enzima amilaze, oni vrlo često nisu specifični. Osim toga, pljuvačka se može nalaziti u tragovima. Međutim, čak i u vrlo malim količinama traga, pljuvačka sadrži veliku količinu različitih mikroorganizama, što je izuzetno relevantno u kontekstu forenzike. Naime, za razliku od sperme i krvi, pljuvačka nije sterilna. Ona sadrži čak 500 miliona bakterijskih ćelija po mililitru (ml) i najmanje 700 različitih vrsta bakterija. Također, mikrobiom pljuvačke je stabilan čak i nakon nekoliko mjeseci stajanja. Studije su pokazale da različite osobe imaju različite sojeve iste vrste streptokoka, pri čemu su mnogi sojevi jedinstveni za pojedince. Osim lokacije na tijelu, na raznovrsnost i sastav mikrobioma utiču i dob domaćina, prehrana, geografski položaj, higijenske navike, klimatski faktori, oralno zdravlje, pušenje itd. Geografski položaj, tj. mjesto gdje pojedinac živi, ima izuzetan uticaj na sastav mikrobioma pljuvačke, i to više i od drugih faktora. U nekoliko studija se naglašava tzv. *geografski potpis* oralnog mikrobioma. Zbog svega navedenog, analiza mikrobioma pljuvačke mogla bi naći primjenu u forenzičkoistražnim postupcima (slika 7.16).



Slika 7.16. *Primjena oralnog mikrobioma u forenzici*

7.2.5.5.2 Vaginalni sekret

Identifikacija vaginalne tekućine u kriminalističkoj istrazi slučajeva seksualnog napada veoma je poželjna. S druge strane, laboratorijska ispitivanja vaginalnog sekreta vrlo se rijetko provode. Mikrobnii markeri koji igraju važnu ulogu za identifikaciju vaginalne tečnosti su: *Lactobacillus* (87,5%), *Lachnospiraceae* (2,3%), *Prevotella* (1,1%), *Alcaligenaceae* (1,0%), *Erysipelatoclostridium* (0,9%), *Corynebacterium* (0,7%), *Peptoniphilus* (0,6%), *Bifidobacterium* (0,6%), *Anaerococcus* (0,5%), *Staphylococcus* (0,5%) te *Subdoligranulum* (2,3%), *Blautia* (1,7%), *Escherichia* (0,5%), *Anaerostipes* (0,4%) i *Stenotrophomonas* (0,3%). Potencijal primjene vaginalnog mikrobioma je ogroman, posebno u slučajevima seksualnog napada, jer je zbog specifičnosti vaginalnog mikrobioma moguće dovesti u vezu žrtvu i počinioca krivičnog djela.

7.2.5.6 Mikrobiom kao pokazatelj vremena kada je ostavljen biološki trag na mjestu zločina

Informacija o vremenu kada je na mjestu zločina ostavljen biološki trag može pomoći u procjeni alibija osumnjičenih i svjedoka ili obezbijediti istražni trag. Mnoga istraživanja su se fokusirala na mikrobiome pljuvačke, fecesa, vagine, s nedavnim publikacijama, koje se temelje na razlikovanju izvora krvi (menstrualna, venska, vaginalna i nazalna) i sperme. Identifikacijom bakterija koje su reprezentativne za usnu šupljinu moguće je razlikovanje obrazaca krvnih mrlja npr. isteklih mrlja od krvi (kao što su one koje su nastale protokom zraka iz nosa ili usta) i udarnih prskanja, pružajući dodatne informacije u istragama. Studije su pokazale da uzorci i nakon mjesec dana pokazuju specifične mikrobne potpise koji su karakteristični za mjesto porijekla. Stoga je ovaj pristup vrijedan alat koji bi trebalo dalje istražiti kako bi se testirala njegova primjenljivost i ograničenja u forenzici.

7.2.5.7 Primjena mikrobioma u druge forenzičke svrhe

Primjena mikrobioma u sudskoj medicini može uključivati identifikaciju načina smrti, kao što je utapanje, kardiovaskularne bolesti, smrti uzrokovane drogom i slično. S druge strane, genotipizacija mikroba odgovornih za spolno prenosive bolesti može biti korisna za praćenje izvora infekcije. Na primjer, može se povezati infektivni mikroorganizam kod osumnjičene osobe (tj. izvor infekcije) i žrtve (tj. zaražene osobe), što se pokazalo korisnim i u identifikaciji počinitelja u slučajevima seksualnog zlostavljanja.

Jedan od primjera je slučaj iz 2005. godine, kada je iz vaginalnog brisa maloljetnice izolovana bakterija *Neisseria gonorrhoeae*, uzročnik gonoreje. Gonoreja se gotovo uvijek prenosi seksualnim putem i, ako se detektuje kod maloljetnika, najčešće se sumnja na seksualno zlostavljanje. U spomenutom slučaju izolovana bakterija je uspoređena s uzorkom iz donjeg rublja osumnjičene osobe. Soj *N. gonorrhoeae* izolovan iz vaginalnog uzorka maloljetnice bio je identičan soju koji je izolovan iz donjeg rublja osumnjičenog. Iako ne postoji DNK baza podataka za *N. gonorrhoeae* u Velikoj Britaniji, dostupna je istraživačka baza podataka koja sadrži informacije za dva najvarijabilnija gena ove bakterije. Ova baza podataka naziva se NG-MAST (engl. *Multi-Antigen Sequence Typing database*) i sadrži podatke o sekvencama za više od 4000 vrsta bakterije *N. gonorrhoeae*. Zbog toga što je baza podataka NG-MAST mala i trenutno ne pruža pouzdanu indikaciju, činjenica da su ova dva soja identična bio je indirektan, tj. posredan dokaz, a ne siguran dokaz fizičkog kontakta. Ipak, suočen s ovim dokazima, osumnjičeni je priznao krivicu te je osuđen za počinjeno krivično djelo.

Još jedna od potencijalnih primjena je i u dijagnosticiranju rizika za razvoj iznenadne smrti. Sindrom iznenadne smrti dojenčadi (engl. *Sudden Infant Death Syndrome* – SIDS) vodeći je uzrok postneonatalne smrtnosti novorođenčadi u razvijenim zemljama. Može se grubo definisati kao neočekivana smrt naizgled zdravog odojčeta u postnatalnom periodu (tj. prvoj godini života). Potvrđeno je da su nedijagnosticirane infekcije odgovorne za 10% slučajeva SIDS-a. Najčešći mikroorganizmi povezani sa SIDS-om su: humani herpes virus, Epstein-Barrov virus, citomegalovirus, respiratorni sincicijski virus, adenovirus, humani metapneumovirus, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* i *Bordetella pertussis*. Značaj preciznih mikrobioloških analiza u slučaju sindroma iznenadne smrti dojenčadi pokazao se

krucijalnim u slučaju iznenadnih smrti beba u dojenačkoj dobi u Velikoj Britaniji 1999. poznat i kao *slučaj Sally Clark*. Naime, Sally Clark, majka dva dječaka koji su umrli iznenada, prvi s dva mjeseca, a drugi nakon dvije godine s osam sedmica, proglašena je krivom za čedomorstvo te je osuđena na zatvorsku kaznu. Četiri godine kasnije, utvrđeno je da forenzički patolog nije priložio mikrobiološki izvještaj s obdukcije koji je ukazao na prisutnost bakterije *Staphylococcus aureus* u cerebrospinalnoj tečnosti (stafilokokna septikemija i meningitis). Dodatno, i profil bijelih krvnih ćelija ukazivao je na bakterijsku infekciju. Bakterija *S. aureus* se normalno nalazi na površini kože i u nosu normalnih zdravih osoba i općenito se smatra bezopasnom i upravo zbog toga je patolog smatrao da nalaz nije relevantan te da je prisutnost ove bakterije samo posljedica kontaminacije. Međutim, bakterija *S. aureus* može da uzrokuje i različite infekcije i intoksikacije kao što su manje infekcije kože (npr. furunkul, karbunkul, infekcija rane itd.), ali može biti uzročnik i teških bolesti poput sepse, zapaljenja pluća, apscesa, meningitisa, sindroma toksičnog šoka itd. Nalaz vrste *S. aureus*, naročito u cerebrospinalnoj tečnosti, zajedno s nalazima u krvi, upućivao je na to da je smrt prvorodenog djeteta mogla biti posljedica meningitisa, a ne krivičnog djela. Na osnovu revidiranog izvještaja sudskog patologa, majka je oslobođena optužbi, a državni tužilac je naložio reviziju na hiljade sličnih slučajeva u Velikoj Britaniji, nakon čega su još dvije majke oslobođene optužbi za čedomorstvo.

Sve navedeno ukazuje na činjenicu da bi analiza mikrobioma mogla pružiti dodatne informacije tamo gdje konvencionalna analiza DNK ne može dati precizan odgovor te će se zbog toga primjena i implementacija metoda za profiliranje mikrobioma u forenzici izvan svake sumnje značajno povećati u narednom periodu.

7.2.6 Metode za proučavanje mikrobioma u forenzici

Istraživanje mikrobioma uz tehnološko unapređenje analitičkih metoda doživljava ekspanziju posljednjih godina posebno s razvojem tehnologije sekvenciranja nove generacije koja omogućava identifikaciju pojedinih vrsta mikroorganizama. Neki od najčešćih metodoloških pristupa u forenzičkoj analizi mikrobioma su sekvenciranje 16S rRNK te sekvenciranje kompletnog bakterijskog genoma.

7.2.6.1 Sekvenciranje 16S rRNK

Određivanje sastava mikrobne populacije sekvenciranjem zasniva se uglavnom na analizi varijabilnog gena koji kodira bakterijsku 16S rRNK, a taksonomska analiza se zasniva na uspoređivanju dobijenih podataka s referentnom bazom podataka koja sadržava 16S sekvence poznatih bakterija. Bakterijski gen 16S rRNK sadrži devet hipervarijabilnih regiona (V1–V9), od kojih se najčešće koriste regioni V3, V4 i V6 i V8, što je detaljno opisano u dijelu “Molekularne metode identifikacije mikroorganizama u bioterorizmu”.

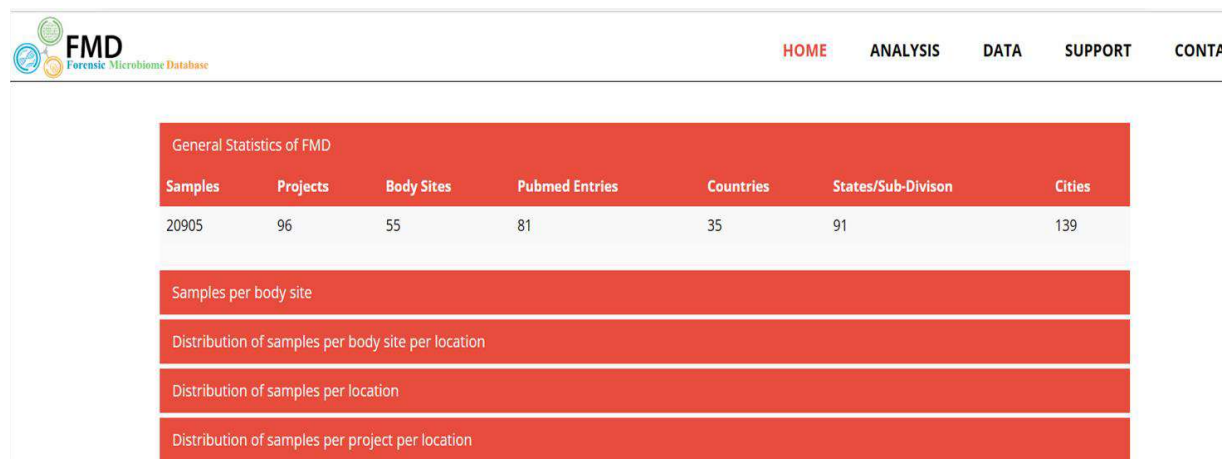
7.2.6.2 Sekvenciranje kompletnog genoma

Sekvenciranje kompletnog genoma metodom sačmarice (*shotgun*) podrazumijeva fragmentaciju molekula DNK izolovanih iz mikrobiote u male fragmente, koji se zatim sekvenciraju i uspoređuju s referentnim genomima, a u cilju utvrđivanja prisutnosti fragmenata istog sastava u originalnom uzorku. U poređenju s prethodnom metodom sekvenciranja 16S rRNK, u ovom slučaju analizira se cjelokupni genetički materijal ispitivanog uzorka, zbog čega se ova metoda ističe kvalitetom, raznovrsnošću, ali i količinom dobijene informacije. U novije vrijeme, za primjenu ove metode znatno su se smanjili i troškovi, tako da bi u budućnosti sekvenciranje čitavog genoma moglo naći širu primjenu u forenzičkoj mikrobiologiji.

7.2.7 Bioinformatička analiza mikrobiotskih podataka

Mikrobiota, odnosno njen sastav, prikazuje se uz pomoć bioinformatičkih alata i programa koji obrađuju sirove podatke dobijene sekvenciranjem. Neke od danas najšire korištenih platformi za analizu sekvenci gena 16S rRNK su platforme QIIME 2 (engl. *Quantitative Insights Into Microbial Ecology*), Bioconductor, USEARCH i MOTHUR. Upotrebom softvera QIIME sastav mikrobiote se može prikazati i putem alfa i beta analize raznolikosti. Alfa raznolikost prikazuje koje su sve vrste prisutne u datom uzorku, dok beta raznolikost predstavlja komparaciju mikrobne zajednice između svih analiziranih uzoraka, a na osnovu sastava taksona. Iako je DNK sekvenciranje velikog broja mikroorganizama prestalo biti limitirajući faktor u istraživanjima, potrebno je uspostaviti odgovarajući evaluacijski okvir za tumačenje dobijenih podataka. Štaviše, istraživači su pokušali prevazići i ova ograničenja stvaranjem nove mikrobiomne baze podataka FMD (engl.

*Forensic Microbiome Database*³¹) s pridruženom web-stranicom koja prikuplja i uspoređuje javno dostupne skupove podataka mikrobioma (slika 7.17). Baza podataka je za sada popunjena s oko 20.000 NGS 16S rRNA uzoraka mikrobioma porijeklom s više lokacija na tijelu.



The screenshot shows the FMD website interface. At the top, there is a navigation bar with links: HOME, ANALYSIS, DATA, SUPPORT, and CONTACT. Below the navigation bar, there is a section titled 'General Statistics of FMD' which contains a table with the following data:

Samples	Projects	Body Sites	Pubmed Entries	Countries	States/Sub-Division	Cities
20905	96	55	81	35	91	139

Below the table, there are four more sections, each with a red header and a corresponding chart (not visible in the screenshot):

- Samples per body site
- Distribution of samples per body site per location
- Distribution of samples per location
- Distribution of samples per project per location

Slika 7.17. Sučelje baze *Forensic Microbiome Database*

Osim sekvenci, baza prikuplja i metapodatke povezane s uzorcima uključujući geolokaciju, zdravstveni status i druge varijable. Povezana s web-stranicom, omogućava korisnicima da usporede mikrobiome s različitih geografskih lokacija i dijelova tijela, kao i da učitaju podatke kojim se može predvidjeti geolokacija uzorka. Čini se razumnim sugerisati da bi upravo trenutne metode statističkog zaključivanja mogle pružiti potrebne okvire za proširivanje mikrobiomnih baza podataka i razvoj novih bioinformatičkih alata koji bi se mogli primijeniti za profiliranje mikrobioma u forenzici.

³¹ <http://fmd.jcvi.org/stat.php>

Literatura

- Aeri, R., Arora, J., Kapoor, P., Sharma, A.D. (2020). An Introduction to Microbial Forensics. In S.G. Sharma, N.R. Sharma, M. Sharma (Eds.), *Microbial Diversity, Interventions and Scope*, (pp. 377-397). Singapur: Springer.
- Ahannach, S., Spacova, I., Decorte, R., Jehaes, E., Lebeer, S. (2021). At the Interface of Life and Death: Post-mortem and Other Applications of Vaginal, Skin, and Salivary Microbiome Analysis in Forensics. *Frontiers in microbiology*, 12, 694447.
- Bishop, A.H. (2019). The signatures of microorganisms and of human and environmental biomes can now be used to provide evidence in legal cases. *FEMS microbiology letters*, 366(3).
- Breeze, R.G., Budowle B., Schutzer S.E. (2005). *Microbial Forensics* (1st Edition). San Diego, Kalifornija, USA: Academic Press.
- Budowle, B., Schutzer, S.E., Morse, S.A. (2020). *Microbial Forensics* (3rd Edition). San Diego, Kalifornija, USA: Academic Press.
- Carter, D.O., Tomberlin, J.K., Benbow, M.E., Metcalf, J.L. (2017). *Forensic Microbiology*. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Carus, W.S. (2002). *Bioterrorism and Biocrimes: The Illicit Use of Biological Agents Since 1900*. Fredonia Books. Nizozemska: The Minerva Group, Inc.
- Cho, H.W., Eom, Y.B. (2021). Forensic analysis of human microbiome in skin and body fluids based on geographic location. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695191.
- Clarke, T., Brinkac, L., Greco, C., Alleyne, A.T., Carrasco, P., Inotroza, C., Tau, T., Wisitrasameewong, W., Torralba, M.G., Nelson, K., Singh, H. (2022). Sampling from four geographically divergent young female populations demonstrates forensic geolocation potential in microbiomes. *Scientific Reports*, 12(1), 1-10.
- Cvetnić, Ž., Duvnjak, S., Zdelar-Tuk, M., Reil, I., Habrun, B., Benić, M., Beck, R., Kompes, G., Štepanić, M., Špičić, S. (2015). Primjena različitih molekularnih metoda u tipizaciji vrsta roda *Brucella* (II. dio). *Veterinarska stanica br.* 46(4), 273-279.
- Decker, R.S., Kerns, T.L. (2020). The FBI's Amerithrax Task Force and the advent of microbial forensics. In B. Budowle, S.E. Schutzer, S.A. Morse (Eds.), *Microbial Forensics* (3rd Edition), (pp 11-23). San Diego, Kalifornija, USA: Academic Press.
- Gouello, A., Donyach-Remy, C., Siatka, C., Lavigne, J.P. (2022). Analysis of microbial communities: An emerging tool in forensic sciences. *Diagnostics*, 12(1), 1.
- Gunn, A. (2009). *Essential Forensic Biology* (2nd Edition). Chichester, UK: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd.
- Hanssen, E.N., Liland, K.H., Gill, P., Snipen, L. (2018). Optimizing body fluid recognition from microbial taxonomic profiles. *Forensic Science International: Genetics*, 37, 13-20.
- Jerković-Mujkić, A. (2014). *Biologija bakterija*. Sarajevo, Bosna i Hercegovina: Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu.
- Kapoor, N., Sulke, P., Badiye, A. (2021). Molecular Techniques in Microbial Forensics. In Dash, H.R., Shrivastava, P., Lorente, J.A. (Eds.) *Handbook of DNA Profiling*. Singapur: Springer.

- Kaufmann, A.F., Keim, P.S. (2011). The Kameido Anthrax Incident: A Microbial Forensics Case Study. In B. Budowle, S.E. Schutzer, S.A. Morse (Eds.), *Microbial Forensics* (2nd Edition), (pp. 5-13). San Diego, Kalifornija, USA: Academic Press, Elsevier Inc.
- Keim, P., Smith, K.L., Keys, C., Takahashi, H., Kurata, T., Kaufmann, A. (2001). Molecular investigation of the Aum Shinrikyo anthrax release in Kameido, Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(12), 4566-4567.
- Keim, P.S., Budowle, B., Ravel, J. (2011). Microbial forensic investigation of the anthrax-letter attacks. In B. Budowle, S.E. Schutzer, S.A. Morse (Eds.), *Microbial Forensics* (2nd Edition), (pp. 15-25). San Diego, Kalifornija, USA: Academic Press, Elsevier Inc.
- Koch, L., Lopes, A.A., Maiguy, A., Guillier, S., Guillier, L., Tournier, J.N., Biot, F. (2020). Natural outbreaks and bioterrorism: How to deal with the two sides of the same coin? *Journal of Global Health*, 10(2).
- Kulišić, D. (2012). O općim obilježjima mogućih pogibelji i istraga možebitnih akata terorizma počinjenih smrtonosno opasnim mikrobiološkim agensima. *Zbornik radova Međunarodna konferencija „Rat protiv terorizma nakon 10 godina“* (Zagreb, Hrvatska: Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske), 103-147.
- Kumari, P., Prakash, P., Yadav, S., Saran, V. (2022). Microbiome analysis: an emerging forensic investigative tool. *Forensic Science International*, 111462.
- Leake, S. (2014). Human identification through analysis of the salivary microbiome: proof of principle (Doctoral dissertation). Laussane, Švicarska: Faculté de droit et des sciences criminelles, Université de Lausanne.
- López, C.D., Vidaki, A., Kayser, M. (2022). Integrating the human microbiome in the forensic toolkit: Current bottlenecks and future solutions. *Forensic Science International: Genetics*, 56, 102627.
- Madigan, M. T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P. (2012). *Brock Biology of microorganisms* (13th Edition). San Francisco, USA: Pearson Benjamin-Cummings.
- Madle-Samardžija, N.D., Turkulov, V.S., Vukadinov, J.S., Čanak, G.J., Doder, R.Ž., Sević, S.Đ. (2002). Anthrax-past, present and future. *Medicinski pregled*, 55(3-4), 114-119.
- Marjanovic, D., Primorac, D., Dogan, S. (Eds.) (2018). *Forensic Genetics: Theory and Application*. Sarajevo, Bosna i Hercegovina: International Burch University.
- Metzker, M.L., Mindell D.P., Liu X., Ptak R.G., Gibbs R.A., Hillis D.M. (2002). Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(22), 14292-14297.
- Mikulić, M., Humski, A., Njari, B., Stojević, D., Jurinović, L., Špičić, S., Duvnjak, S., Cvetnić, Ž. (2017). Metode izdvajanja i dokazivanja bakterija roda *Campylobacter* – metode genotipizacije. *Veterinarska stanica*, 48(5).
- Milić, D. (2010). Bioterrorizam i upotreba biološkog oružja. *Revizija za bezbednost*, 2, 103-116.
- Nothorn, K. (2016). How research into the human microbiome can be used to solve crimes. *Southern California Interdisciplinary Law Journal*, 25, 721.
- Oliveira, M., Amorim, A. (2018). Microbial forensics: new breakthroughs and future prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24), 10377-10391.
- Oliveira, M., Mason-Buck, G., Ballard, D., Branicki, W., Amorim, A. (2020). Biowarfare, bioterrorism and biocrime: A historical overview on microbial harmful applications. *Forensic Science International*, 314, 110366.

- Planinić, A. (2014). Mutacije povezane s rezistencijom virusa ljudske imunodeficijencije tipa 1 na antiretrovirusne lijekove (Doktorska disertacija). Zagreb, Hrvatska: Sveučilište u Zagrebu.
- Ristanović, E. (2016). Medicinski i bezbednosni izazovi 21. veka – bioterorizam. *ABC časopis urgentne medicine*, 16(1).
- Sijen, T., Harbison, S. (2021). On the identification of body fluids and tissues: A crucial link in the investigation and solution of crime. *Genes*, 12(11), 1728.
- Singh, H., Clarke, T., Brinkac, L., Greco, C., Nelson, K.E. (2021). Forensic microbiome database: A tool for forensic geolocation meta-analysis using publicly available 16S rRNA microbiome sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 12, 644861.
- Takahashi, H., Keim, P., Kaufmann, A.F., Keys, C., Smith, K.L., Taniguchi, K., Inouye, S., Kurata, T. (2004). *Bacillus anthracis* bioterrorism incident, Kameido, Tokyo, 1993. *Emerging infectious diseases*, 10(1), 117.
- Tozzo, P., D'Angiolella, G., Brun, P., Castagliuolo, I., Gino, S., Caenazzo, L. (2020). Skin microbiome analysis for forensic human identification: what do we know so far? *Microorganisms*, 8(6), 873.
- Velhner, M., Kozoderović, G., Jelesić, Z. (2007). Molekularna karakterizacija *salmonella enterica* serotip *enteritidis*: priznat e metode i njihova primena u određivanju klonalnog diverziteta. *Savremena poljoprivreda*, 56(1), 112-121.
- 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.
- Zhang, J., Liu, W., Simayijiang, H., Hu, P., Yan, J. (2022). Application of microbiome in forensics. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, In Press, Journal Pre-Proof.

IZVORI SLIKA

Slike i ilustracije u knjizi su originalna djela autora poglavlja ili su dozvoljene za korištenje i širu upotrebu (nisu licencirane). Za slike navedene u nastavku, autori knjige su dobili odobrenje za korištenje od autora slika uz navođenje reference ili su licencirane CC-BY licencom koja dozvoljava upotrebu slika uz navođenje izvora (web adrese).

Poglavljje 1

Slika 1.16. Šematski prikaz građe mitohondrija (lijevo) i slika pod elektronskim mikroskopom i uvećanjem $\times 236\ 000$ (desno) [Preuzeto sa: OpenStax Anatomy and Physiology. (2018). *The Cellular Level of Organization – The Cytoplasm and Cellular Organelles*. <https://cnx.org/contents/FPtK1zmmh@8.25:fEI3C8Ot@10/Preface> (CC-BY)]

Slika 1.17. Endoplazmatski retikulum [Preuzeto sa: OpenStax Anatomy and Physiology. (2018). *The Cellular Level of Organization – The Cytoplasm and Cellular Organelles*. <https://cnx.org/contents/FPtK1zmmh@8.25:fEI3C8Ot@10/Preface> (CC-BY)]

Slika 1.18. Goldžijev aparat [Preuzeto sa: OpenStax Anatomy and Physiology. (2018). *The Cellular Level of Organization – The Cytoplasm and Cellular Organelles*. <https://cnx.org/contents/FPtK1zmmh@8.25:fEI3C8Ot@10/Preface> (CC-BY)]

Poglavljje 2

Slika 2.18. Sirchie Mini Bluemaxx III Forensic Light Kit [Preuzeto sa: SIRCHIE. *Product (BM300 is SIRCHIE's standard BLUEMAXX™) description*. <https://www.sirchie.com/standard-bluemaxx-forensic-light-source.html>]

Slika 2.22. RSID-Semen set za testiranje prisustva sperme [Preuzeto sa: GALANTOS GENETICS. *Product (RSID™-SEMEN) description*. <https://www.galantos.eu/products/rsid-kits/semen-lab-field/>]

Slika 2.23. Izgled spermatozoida pod mikroskopom (uvećanje 100x) – autor slike Petkov et al. (2006) [Preuzeto iz: Petkov, N., Alegre, E., Biehl, M., Sánchez, L. (2006). LVQ acrosome integrity assessment of boar sperm cells. *Conference Proceedings Computational Modeling of Objects Represented in Images* (Coimbra, Portugal, 20-21 October 2006)]

Slika 2.25. Mikroskopska analiza razmaza vaginalnog sekreta tretiranog sa Sperm Hy-Liter™ reagensom – autor slike Christoffersen (2011) [Preuzeto iz: Christoffersen, S. (2011). Immunohistochemical staining of human sperm cells in smears from sexual assault cases. *International Journal of Legal Medicine*, 125(6), 887-90.]

Slika 2.32. Komora za cijanoakrilatno zaparivanje [Preuzeto sa: SIRCHIE. *Product (Cyanoacrylate Fuming Chamber 220V AC) description*. <https://www.sirchie.com/cyanoacrylate-fuming-chamber-220v-ac.html>]

Slika 2.39. Šematski prikaz građe zuba [Preuzeto sa: OpenStax Anatomy and Physiology. (2018). *The Digestive System – Anatomy of a tooth*. <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology> (CC-BY), modificirano]

Poglavlje 4

Slika 4.5. Morfološko-fizičke karakteristike pomoću kojih se razlikuju ženska od muške karlične kosti – autor slike White et al. (2021) [Preuzeto iz: White, D.T., Black, M.T., Folkens, P.A. (2012). *Human osteology* (3rd Edition). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.]

Slika 4.9. Metoda procjene starosti po Lovejoy i sar. – autor slike Lovejoy et al. (1985) [Preuzeto iz: Lovejoy, C.O., Meindl, R.S., Pryzbeck, T.R., Mensforth, R.P. (1985). Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: a new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology*, 68(1), 15–28.]

Slika 4.10. Morfološke promjene na četvrtom rebru – autori slike İşcan i Loth (2000) [Preuzeto iz: İşcan, M., Loth, S.R. (2000). Morphological Age Estimation. In J.A. Siegel (Ed.), *Encyclopedia of Forensic Sciences*, (pp 242-252). Cambridge, Massachusetts, USA: Elsevier Academic Press.]

Slika 4.12. Srastanje šava na obelionu – autor slike Byers (2004) [Preuzeto iz: Byers, N.S. (2004). *Introduction to Forensic Anthropology: A Textbook* (2nd Edition). Boston, USA: Allyn & Bacon.]

Slika 4.15. A - antemortalna trauma dijafize desnog femura, koja se manifestuje loše zaraslim kalusom praćen blagim zaraslim osteomijelitisom, B - masivna perimortalna trauma, posjekotina, na lijevoj parietalnoj i okcipitalnoj kosti, C - perimortalne traume na desnoj temporalnoj i lijevoj parietalnoj kosti – autor slike A i B Mario Novak (Institut za antropologiju, Zagreb, Hrvatska), slika C (C1 i C2) preuzeta sa: Future Learn. *Forensic Archaeology and Anthropology – Types of Perimortem Trauma*. [https://www.futurelearn.com/info/courses/forensic-archaeology-and-anthropology/0/steps/67891\(CC-BY\)](https://www.futurelearn.com/info/courses/forensic-archaeology-and-anthropology/0/steps/67891(CC-BY))

Slika 4.21. Anomalije nesrastanja kosti – autor slike Byers (2004) [Preuzeto iz: Byers, N.S. (2004).

Introduction to Forensic Anthropology: A Textbook (2nd Edition). Boston, USA: Allyn & Bacon.]

Slika 4.22. Velika trepanacija desne temporalne, desne sfenoidne (klinaste) i desne parietalne kosti, koja je prethodila hirurškom odstranjenju dijela mozga – autor slike Byers (2004) [Preuzeto iz: Byers, N.S. (2004). *Introduction to Forensic Anthropology: A Textbook* (2nd Edition). Boston, USA: Allyn & Bacon.]

Poglavlje 5

Slika 5.1. Struktura kore vrste *Quercus rotundifolia* – autor slike Sousa et al. (2021) [Preuzeto iz: Sousa, V., Ferreira, J.P.A., Miranda, I., Quilhó, T., Pereira, H. (2021). *Quercus rotundifolia* Bark as a Source of Polar Extracts: Structural and Chemical Characterization. *Forests*, 12(9), 1160.]

Slika 5.2. A - fragment kore prikupljen obdukcijom sa unutrašnje površine lijeve podlaktice žrtve u istraživanom slučaju, B - uvećani prikaz fragmenta – autor slike Caccianiga et al. (2020) [Preuzeto iz: Caccianiga, M., Compostella, C., Caccia, G., Cattaneo, C. (2021). Contribution of plant anatomy to forensic investigation: Tree bark morphology. *Forensic Science International*, 318, 110598.]

Slika 5.3. Usporedba između poprečnog presjeka vanjske kore vrste *Robinia pseudoacacia* sakupljene na mjestu zločina i fragmenata pronađenih na tijelu – autor slike Caccianiga et al. (2020) [Preuzeto iz: Caccianiga, M., Compostella, C., Caccia, G., Cattaneo, C. (2021). Contribution of plant anatomy to forensic investigation: Tree bark morphology. *Forensic Science International*, 318, 110598.]

Slika 5.4. A - fragment kosti koji pripada prednjem dijelu žrtvine lobanje, B - komadići drveta povezani s prijelomom žrtvine lobanje – autor slike Caccianiga et al. (2020) [Preuzeto iz: Caccianiga, M., Caccia, G., Mazzei, D., Salsarola, D., Poppa, P., Gaudio, D., Cappella, A., Franceschetti, L., Tambuzzi, S., Maggioni, L., Cattaneo, C. (2021). Common and much less common scenarios in which botany is crucial for forensic pathologist and anthropologists: a series of eight case studies.

International Journal of Legal Medicine, 135(3), 1067–1077.]

Slika 5.5. A - fotografija ulice u kojoj je pronađeno tijelo žrtve, B - maleni fragment bobice i stabljike pronađen u kosi mlade žene, C - fizičko podudaranje između slomljenih krajeva stabljike s biljke na ogradi i slomljena stabljika iz kanala – autor slike Aquila et al. (2014) [Preuzeto iz: Aquila, I., Ausania, F., Di Nunzio, C., Serra, A., Boca, S., Capelli, A., Magni, P., Ricci, P. (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: case report and review of literature. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 820–824.]

Slika 5.6. A - staza B i mjesto zločina, B - staza A i ispitivanje tla – autor slike Aquila et al. (2014) [Preuzeto iz: Aquila, I., Ausania, F., Di Nunzio, C., Serra, A., Boca, S., Capelli, A., Magni, P., Ricci, P. (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: case report and review of literature. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 820–824.]

Slika 5.7. A - biljne vrste pronađene na stazi A, B - *Xanthium orientalis* na odjeći žrtve – autor slike Aquila et al. (2014) [Preuzeto iz: Aquila, I.,

Ausania, F., Di Nunzio, C., Serra, A., Boca, S., Capelli, A., Magni, P., Ricci, P. (2014). The role of forensic botany in crime scene investigation: case report and review of literature. *Journal of Forensic Sciences*, 59(3), 820–824.]

Slika 5.12. Tipovi apertura na polenovom zrnu – autor slike Hesse et al. (2009) [Preuzeto iz: Hesse, M., Halbritter, H., Zetter, R., Weber, M., Buchner, R., Frosch-Radivo, A., Ulrich, S. (2009). *Pollen Terminology: An illustrated handbook*. Beč, Austrija: Springer.]

Poglavlje 7

Slika 7.5. Kolonije bakterije *B. anthracis* iz prikupljenog uzorka na krvnom agaru – autor slike Takahashi et al. (2004) [Preuzeto iz: Takahashi, H., Keim, P., Kaufmann, A. F., Keys, C., Smith, K. L., Taniguchi, K., Inouye, S., Kurata, T. (2004). *Bacillus anthracis Bioterrorism Incident*, Kameido, Tokyo, 1993. *Emerging Infectious Diseases*, 10(1), 117-120.]

INDEKS POJMOVA

A

- ABACard®HemaTrace® test, 92
 ABO sistem krvnih grupa, 24, 79, 90, 92, 93, 94, 95, 97, 108
 adenin, 36, 57, 58, 170, 177
 adhezivne trake, 116
 aerobiologija, 302
 AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*, analiza polimorfizma dužine amplificiranih fragmenata, 153, 332, 339, 340, 341, 343, 415, 432
 aglutinacija, 95, 96, 97, 322
 aglutinin, 95, 97
 aglutinogen, 95
 akonitin, *Aconitum*, 312, 318
 akrocentrični hromosom, 66, 69
 aksonema, 46
 aktivni transport, 32
 alel divljeg tipa, *wild-type allele*, 17
 alelna komplementacija, 25
 alelna ljestvica, *allelic ladder*, 163, 164, 165, 166, 366, 375
 alelna isključivanje, 25
 alkaloidi, 312, 315, 317, 318, 330
 aloenzimi, alozimi, 152
 aloploidija, interspecijska hibridizacija, 328
 ALS, *Alternative Light Source*, alternativni izvor svjetlosti, 100
 Alu sekvence, 147
 Alu-probe, 147
 AluQuant analiza, 144, 147
 AM, *antemortem* status zuba, 264, 267
 amatoksini, 324
 amelogenin, 125, 161, 162, 201
 amilaza, 43, 462
 amonijak, 109, 401, 406
 amonijevi ioni, 109
 amorf, 55
 amplikoni, *amplicon*, 150, 166, 336, 369, 378
 Amylose Azure test, 107
 anafaza, 48, 62, 65, 66, 71, 73, 74
 anagena faza, 120
 anemofilne biljne vrste, 309
 animalna forenzika, 16, 359, 364, 365, 370, 371, 373, 374, 389, 390
antemortem mikrobiom, 459
antemortem utapanje, 299
antemortem, *antemortalne* traume, povrede, 230, 253, 260, 262
 antimorf, 55
 antraks, antraksni toksin, 372, 426, 427, 429, 436, 437, 438, 439, 440, 441
 antraksna sepsa, 435
 antropološka analiza, obrada, 229, 230, 259, 260, 261, 262, 275, 291, 292
 antroposkopija, 230, 231
 AP, *Acid Phosphatase*, kisela fosfataza, 101, 102
 aperture, 304
 apoptoza, 122
 apsorpcijsko-inhibicijska metoda, 95
 aspermija, 105
 atropin, *Atropa belladonna* L., 315, 316, 319
 aurikularne površine, metoda procjene starosti prema Lovejoy i saradnicima, 239, 240
 autogamne biljne vrste, 308
 autoliza, *autolysis*, 194, 401, 403
 autopoliploidija, 329
 autoradiograf, autorad, 157, 158
 autoreplikacija DNK, 61
 autosom, 22, 25, 69, 159, 177, 184, 185
 autosomno nasljeđivanje dominantnih svojstava, 25
 autosomno nasljeđivanje recesivnih svojstava, 26
 azotne heterociklične baze, 36, 57

B

Bacillus anthracis, 427, 429, 433, 434, 435, 437, 439
 bakterijski markeri, 461
 Barrovo tijelo, 63
 Bayesova vjerovatnoća majčinstva, 385
 bazična palinologija, 302
 bazna linija, prag fluorescencije, 147
 benzidin, benzidinski test, 91
 besmislene mutacije, *nonsense*, 56
 bilateralna polenova zrna, 303
 biljna vakuola, 29, 46, 48
 biološki profil individue, 229, 230, 231, 252, 258
 biološko oružje, 426, 435, 436
 bioluminiscencija, 90
 bioterorizam, 323, 426, 427, 430, 431, 435, 437, 440
 bisimetrična polenova zrna, 303
 bivalent, bivalenti, 72, 73
 Bluestar® Forensic reagens, set, 90, 91
 BLUESTAR® Identi-PSA® test, 104
botane, 286
 botulin neurotoksin, *Clostridium botulinum*, 427, 437
 Brentamine Fast Blue B test, 102
 brisotine, 83, 87, 88

C

caklina, *substantia adamantina*, 125, 254, 273
 Camerier, metoda za izračunavanje dentalne dobi, 270
Carabelli kvržica, 276
 Carl von Linné, sistem binarne nomenklature, 293
 CCD kamera, *Charged-Coupled Device*, 114, 166
 CDK, *Cyclin-Dependent Kinase*, ciklin-zavisna kinaza, 61
 ćelija, eukariotske i prokariotske ćelije, 28, 29
 ćelijski ciklus, 59, 61, 62
 ćelijski zid, 29, 47, 48, 138, 139, 298
 cement, 125, 272
 cementociti, 125
 centralna biološka dogma, 49
 centralna lamela, 48

centromera, centromerni regioni, 63, 65, 68, 69, 73
 centromerni indeks, 68
 centromerni, C-heterohromatin, 68
 centrosom, 46, 65
 CFU, *Colony-Forming Units*, koloniformne jedinice, 438, 452, 453
Chelex metoda, 141
 cijanid, 321, 322
 cijanoakrilatno zaparivanje, 117, 119
 cijanogeni glikozidi, 312, 320, 322
 ciklini, 61
 citokineza, 46, 65, 66, 73, 74
 citoplazma, 28, 29, 30, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 48, 52, 53, 65, 69, 122, 188, 302
 citoskelet, 28, 29, 30, 34, 45
 citosol, 28, 30, 31, 38, 43, 445
 citozin, 36, 53, 58, 151, 177, 191
 CNV, *Copy Number Variation*, varijacija broja kopija, 173
 CODIS, *Combined DNA Index System*, 162
 COI gen, citohrom c oksidaza podjedinica I, 365, 375
 Combur testne trake, 91
 cpDNK, hloroplastna DNK, genom, 28, 47, 328
 CPE, kombinovana vjerovatnoća isključenja, 216
 CPI, *Combined Paternity Index*, kombinovani indeks očinstva, 211, 219, 221
 CRFNE, *Combined Random Female Not Excluded*, kombinirana neisključenost slučajno odabrane ženke iz opće populacije, 385
 CRI, *Combined Relationship Index*, kombinovani indeks povezanosti, 223
 Ct vrijednost, 147, 149
 CTAB Soltis Lab protokol, 331
 CTAB, cetiltrimetilamonijev bromid, 331
 CTS, *Christmas Tree Stain* metoda, 105
cytb, citohrom b gen, 365, 375, 388

D

daktiloskopija, 111, 112
Datura stramonium L., 315, 316
 deaminacija, 58
 deformativne lezije na kostima, 255

degradacija DNK, degradirana DNK, 122, 126, 140, 141, 146, 147, 148, 157, 174, 185, 194, 195, 204, 457
 degradacija traga, degradacija biološkog materijala, 119, 130, 131, 137, 194, 293
 dekalifikacija, 126
 dekondezacija DNK, 37
 Demirijan, metoda procjene dentalne dobi, 270, 271
 denaturacija, 141, 151
 dentalna analiza, 262
 dentalna dob, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 278
 dentalna identifikacija, 263
 dentalne karakteristike, 264, 265, 267, 277, 279
 dentalni status, 267, 278
 dentalno profiliranje, 276, 279
 denticija, 268
 dentin, *substantia eburnea*, 125
 depurinacija, 58
 dermatoglifi, 111, 112
 despiralizacija, 53, 65
 detekcija količine DNK, kvantifikacija, 143, 144, 146
 detritus, 291
 dezoksiriboza, 36
 DFO, 1,8-diazafluren-9-on reagens, 114, 115
 DGGE, denaturirajuća gradijent gel-elektroforeza, 431
 difraktogram, 372
 difuzija, 31
 digoksin, *Digitalis*, 321
 dijada, dijade, 72, 73, 74
 dijakineza, 71, 73
 dijavauza, 407
 dijavomejski test, 299
 diploidni genotip, 177
 diploten, 71, 72
 direktna mutacija, 55
 diskriminantno-funkcijska analiza, diskriminantne funkcije, 232, 236, 237
 diterpeni, 312
 dlaka, 80, 110, 117, 119, 120, 121, 122, 123, 130, 137, 310, 359, 361, 362, 363, 364, 365, 376, 386, 388, 389
 DMAC, para-dimetilaminocinamaldehyd test, 109

DNK barkoding, barkodiranje, *shotgun* metagenomika, 327, 346, 347, 348, 349, 389, 455
 DNK čipovi, *DNA array*, 371
 DNK ligaza, 50, 340
 DNK profil, 108, 111, 136, 137, 161, 164, 165, 166, 167, 168, 170, 171, 174, 177, 194, 195, 197, 198, 200, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 220, 260, 280, 332, 364, 377, 382, 384, 385, 387, 388, 414, 457
 DNK profiliranje, 105, 123, 136, 154, 259, 344, 386, 457
 DNKaza1L2, 122, 123
 dokazni materijal, 110, 127, 131, 279, 280, 286, 298, 307, 309, 329, 331, 350, 357, 365, 410, 426, 455
 D-petlja, *D-loop*, *displacement loop*, 187, 365

E

EDTA, etilen-diaminotetrasirćetna kiselina, 126, 130, 139, 204
 efekat osnivača, *founder effect*, 182, 373
 egzocitoza, 33, 34, 42
 egzoni, 52
 ekhimoze, potkožna krvarenja, 295
 ekologija biljaka, 286, 295
 eksina, 302, 303, 304, 305
 ekskorijacije, ogrebotine, 295
 ekstranukleusne, plazmatske mutacije, 55
 ektoksina, 303, 304
 ektokranijalne suture, Meindl i Lovejoy metoda procjene starosti, 241
 elektroferogram, 136, 161, 162, 163, 166, 169, 191, 200, 203, 342
 ELISA test, *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*, 103, 364
 elongacija, produživanje lanca, *extension*, 151, 152, 170
 emergentni patogeni, 428
 enamelina, 125
 endoksina, 303
 endocitoza, 33, 34
 endomembranski ćelijski sistem, 38

endoplazmatski retikulum, 34, 40, 41, 42, 43, 44, 48
 endosimbioza, endosimbiotska hipoteza, 28
 entomotoksikologija, 408
env gen, *envelope*, 444
 enzimski imunotest i gasna hromatografija s masenom spektrometrijom, GC-MS, 312
 epinekrotični mikrobiom, 459
 epitelne ćelije, 80, 106, 107, 109, 110, 111, 122, 137
 eritrociti, 25, 34, 82, 93, 95, 96, 97, 322
 ESS, Evropski standardni set lokusa, 162
 etidijev bromid, 145
 euhromatin, 36, 62, 63

F

fagocitoza, 33
 faktor edema, 435
 FCM, protočna citometrija, 328, 431
 feces, 80, 99, 107, 110, 359, 361, 362, 396, 442, 463
 felem, pluto, 288
 feloderm, 288
 felogen, 288
 fenilpropanoidi, 312
 fenolftalein, fenolftaleinski test, 91
 fenoli, 204, 330
 fenologija, 306
 fenotip, 17, 19, 21, 24, 25, 49, 55, 112
 FISH, fluorescentna *in situ* hibridizacija, 431
 fitohemaglutinin, 322
fiton, fitologija, 286
 fizički razvijatelj, rastvarač, 114, 116
 flavonoidi, 312, 320
 fleksija zadnje ivice ramusa mandibule, metoda procjene spola prema Loth i Hennenberg, 275
 fluorescencija, 90, 145, 146, 147, 148, 149, 166, 167, 200, 342
 fluorescentne interkalarnе boje, 144
 FMD, *Forensic Microbiome Database*, 467
forensis, 16, 263
 forenzička
 antropologija, 16, 229, 237, 258, 260, 399
 biologija, 16, 107

botanika, 16, 286, 293, 336, 349, 399
 dijamologija, 298
 mikrobiologija, 16, 425, 426, 430, 441, 466
 odontologija, 16, 263, 273
 palinologija, 302, 305, 306, 309
 toksikologija, 310, 311
 forenzički dokaz, 78, 109, 286, 308
 fosfat, orto-fosfatna kiselina, 36
 fosforescencija, 90
 fotoluminiscencija, 90
 fragmoblast, 66
frameshift mutacije, 56, 57
 Frederick Sanger, Sanger metoda sekvenciranja, 190, 388
 frustule, silikatni ćelijski zidovi, 297
F_{ST}, fiksacijski indeks, 208
 fulvična kiselina, 204
 funkcionalna jezgra, *functional core*, 447

G

gag gen, *group-antigen*, 444
 gametske mutacije, 55
 gasna hromatografija s negativno hemijsko-ionizacijskom masenom spektrometrijom, 312
 gasna hromatografija s površinsko-ionizacijsko organskom masenom spektrometrijom, 312
 GC, gasna hromatografija, 311
 GD, *Gene Diversity*, diverzitet gena, 210
 gencijana ljubičasto, 118
 genetički analizator, 165, 166
 genetički utisak, *imprinting*, 25
 genom, 21, 22, 28, 37, 47, 55, 63, 147, 153, 154, 155, 159, 173, 187, 191
 genomske mutacije, 55
 genotip, 17, 24, 49, 156, 177, 201, 206, 210, 211, 216
 genotipizacija sekvenciranjem, *genotyping-by-sequencing*, 371
 genske mutacije, 55
 glikozaminoglikan, 125
 glikozidi, 312, 320, 322
 Goldžijev aparat, kompleks, 41, 42, 43, 48
 Gregor Johann Mendel, Mendelovi zakoni, 17, 18, 19, 344

guanin, 36, 52, 57, 151, 177

H

Hajflikov limit, 70

haploidni genotip, 177

haplotip, 177, 178, 180, 189, 190, 192, 209, 225, 378, 380

HCL, tankoslojna hromatografija, 311

Hemastix testne trake, 91

hemijska ionizacijska masena spektrometrija, 312

hemiluminiscencija, 90

hemizigotnost, 22, 27

hemoglobin, 80, 84, 90, 91, 92, 204

heparin, 204

heterogametski spol, 22

heterohromatin, 36, 62, 63

fakultativni, 63

interkalarni, 63

strukturni, 63

heterokolpatna, kolporatna polenova zrna, 304

heteroplazmija, 39, 191, 366

heterosom, 22, 25, 27

heterosomno nasljeđivanje, 27

heteroza, hibridna snaga, 25

heterozigotnost, heterozigot, 24, 25, 26, 27, 156, 157, 159, 161, 163, 200, 210, 214, 338, 340, 369, 384

hibridizacija, *annealing*, 151

hidrofilne biljne vrste, 309

hidroksiapatit, 125

hijazme, 72, 73

hioscamin, *Hyoscyamus niger* L., 315, 317

hipermorf, 55

hipervariabilni regioni mitogenoma

HVI, HVII, 187

hipomorf, 55

histonski proteini, histoni, 36, 37, 38, 53, 61, 63, 66, 67

HIV, *Human Immunodeficiency Virus*, virus

humane imunodeficijencije, HIV-1, HIV-2, 443, 445

hloroplasti, 28, 29, 44, 46, 47, 52

holandrični geni, 27

homogametski spol, 22, 63

homologni hromosomi, 22, 24, 68, 71, 72, 73, 155

homoplazmija, 39

homozigotnost, homozigot, 24, 25, 156, 157, 201, 208, 211, 213, 214, 219, 369, 384

horologija, 306

HPLC, tečna hromatografija visokih performansi, 311

HPLC-MS, tečna hromatografija visokih

performansi s masenom spektrometrijom, 311

HRM, *High Resolution Melting*, 390

hromatida, 65, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74

hromatin, 36, 37, 53, 62, 63, 65, 66, 67

hromatografija, 311

hromatosom, 66

hromonema, 67, 69, 70

hromoplasti, 46, 47

hromosomska garnitura, 21, 22, 23

hromosomske mutacije, 55

huminska kiselina, 204

HV, hipervariabilni regioni mtDNK

HV1, HV2, HV3, 190, 191

HWE, Hardy-Weinberg ekvilibrij, ravnoteža, 175, 208

I

ICG, *interval to cessation of growth*, interval prestanka rasta, 407

Identi-PSA Semen Detection Test, 104

idiogram, 23

ILS, *Internal Size Standard*, interni veličinski standard, 163, 165, 166, 167

imunotestovi, 311

inaperturatna polenova zrna, 304

individualizacija traga, 81, 92, 150, 152, 154, 155

inducirane mutacije, 55

inhibitori ciklin-zavisnih kinaza, 61

interfaza, 35, 46, 60, 61, 62, 64, 65

interfazni hromosom, 36

interfazno jedro, 36, 62, 63

interkineza, 73

interkuspidalna distanca, 273

intermedijarna, srednje repetitivna DNK, 63

intermedijarni filamenti, 34, 45

intermedijarnost, nekompletna dominantnost, 24

intina, 302
 introgresija, 383
 introni, 52, 159, 369
 IPC, *Internal PCR Control*, interna PCR kontrola, 148, 150, 204
 iRNK, informaciona RNK, 20, 44, 49, 52, 54, 62, 413, 416
 ispadanje alela, *allelic drop-out*, 174, 218
 ISSOL, INTERPOL standardni set lokusa, 162
 ISSR, *Inter Simple Sequence Repeats*, 332, 345, 346, 389
 ITS, *Internal Transcribed Spacer*, 328, 347, 414
 Ivan Vučetić, *Juan Vuchetic*, 112
 izobilateralna, biradijalna polenova zrna, 303
 izoenzimi, izozimi, 152
 izoforme proteina, 54
 izomorf, 55

J

Jaffeova metoda, 110
 jedarce, nukleolus, 34, 35, 51, 65, 66, 73
 jedarna lamina, 45
 jebro, nukleus, *karyon*, 28, 30, 34, 45, 48, 53, 74, 189
 jezgro mikrobioma, *microbiome core*, 447

K

kaliper, 231
 kapsularni polipeptid, 435
 kariogram, 23
 kariokineza, 60, 65, 66
 kariotip, 23, 69
 katagena faza, 120
 keratin, 120, 122
 keratinizacija, 120, 122
 keratinociti, 122
 KI, *Kinship Index*, indeks srodstva, 223, 373
 kleistogamne biljne vrste, 308
 kodominantnost, 25, 344
 kolagen, kolagena vlakna, 124, 125
 kolhicin, *Colchicum autumnale* L., 313
 kolorimetrijski testovi, 311
 kolpatna polenova zrna, 304

kolpus, brazde polenovog zrna, 304
 kompleksni miješani DNK profil, 200
 kompletno spolno vezane osobine, 27
 kondenzacija hromatina, 53, 62, 63, 65, 66, 67
 konin, *Conium maculatum* L., 314
 konjugacija, uparivanje homolognih hromosoma, 71, 72, 74
 kontaktna DNK, *touch DNA*, 202
 kontaminacija, 110, 127, 128, 130, 137, 138, 197, 199, 203, 329, 380, 388, 389, 440, 446, 465
 koštani matriks, 124
 kreatinin, 109
 kreatinin-pikrat, 110
 Kvaal Solheim metoda procjene dentalne dobi, 278

L

lanac dokazivanja, *chain of custody*, 127
 LAT, *Large Autosomal Target*, 148
 Lattesova metoda, 95, 97
 LCN DNA, *Low Copy Number DNA*, 202
 LD, *Linkage Disequilibrium*, neravnoteža vezanih gena, 208, 225, 350
 LDTD-MS, laser-diodno-termalno-desorpciona masena spektrometrija, 312
 LE, *Linkage Equilibrium*, ravnotežna povezanost, 209
 leptomata, 304
 leptoten, 71
 letalne mutacije, 55
 letalni faktor, 435
 leukomalahit zeleno, 91
 leukoplasti, 46, 47, 48
 LG, *Linkage Group*, vezane grupe, 225
 lignani, 312
 limnologija, 286, 287, 297
 lionizacija, inaktivacija X-hromosoma, 63
 lipaza, 43
 litičke lezije na kostima, 255
 lizosomi, 42, 43
 Locardov princip razmjene, 78, 109, 111, 357
 LR, omjer vjerovatnoća, 213, 214, 216, 217, 218, 222, 224, 225
 LT DNA, *Low Template DNA*, 202
 LTR, *Long Terminal Repeat*, 445

luminol, luminol test, 90, 202

M

magnetna separacija, 142, 143

magnetni prah, 119

Mandragora officinarum, 316

masena spektrometrija visokih performansi, 312

masovne grobnice, 259, 260, 261, 295, 308, 399, 400

matK gen, 347

MCI, indeks mandibularnih kaninusa, očnjaka, 273

mejoza, 74, 175, 183, 184, 209, 225, 303

melisopalinologija, 302

metacentrični hromosom, 68

metafaza, 61, 62, 65, 66, 73, 74

metafazni hromosom, 35, 37, 63, 66, 67, 68, 69, 70

metagenomika, 446, 455

MI, *Maternity Index*, indeks majčistva, 185, 219, 220, 221, 385

Midori Green boja, 145

mijaza, 396, 400

miješani DNK profil, 137, 197, 198

miješani trag, 179, 194, 198, 200, 215

mikoplazme, 450

mikrobiom, 446, 447, 448, 449, 450, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 467

mikrobiota, 446, 447, 448, 451, 452, 453, 454, 460, 466

mikrobni otisak, 457

mikrodifuzijski test, 311

mikrofilamenti, 45, 66

mikrosatelitna DNK, mikrosatelitni markeri, 154, 158, 293, 337, 344, 345, 384, 386, 415

mikrotragovi, 90, 95, 137

mikrotubuli, 45, 46, 65, 73

mikrovarijante, 168, 170, 171, 206

Miller, ekstrakcija DNK metodom isoljavanja, 141, 142

minimalni haplotip, 178

minisatelitni markeri, 154, 155, 158, 195

mitogeni, 60, 61

mitogenom, 187, 188, 192, 388

mitohondrija, mitohondrije, 28, 38, 39, 44, 52, 187, 188, 189, 191, 365

mitohondrijska Eva, 192

mitoza, 28, 29, 46, 60, 62, 65, 66, 71, 74

mjerjenje radioaktivnog ugljika ^{14}C , 273

MLSA, *MultiLocus Sequence Analysis*, analiza sekvenci više lokusa, 432, 433, 434, 440

MLST, molekularna tipizacija temeljena na sekvenciranju više lokusa, 432

MLVA, *Multiple Locus Variable-number of Tandem Repeat Analysis*, analiza broja uzastopnih ponavljanja na više lokusa, 434, 438

mokraćna kiselina, 109

monada, monade, 72, 74, 303

mPMI, minimalni postmortalni interval, 400, 417

MPS, *Multiple Parallel Sequencing*, 390

MRCA, *Most Recent Common Ancestor*, najvjerovatniji zajednički predak, 180, 192

mrtvačka hladnoća, *algor mortis*, 401

mrtvačka ukočenost, *rigor mortis*, 401

mrtvačko bljedilo, *pallor mortis*, 401

MS, masena spektrometrija, spektrofotometrija, 123, 311, 371

mtDNK, mitohondrijska DNK, 38, 39, 122, 123, 148, 153, 185, 187, 188, 190, 191, 222, 365, 366, 368, 373, 378, 380, 381, 414

muhe mrtvačkih sanduka, *coffin fly*, 396

multipli alelizam, aleli, 24

muscimol, 324

mutacije izazvane traspozicijama, 55

mutacije pogrešnog smisla, *missense*, 56

mutirani alel, 17

N

narkotici, 108, 318

nef gen, 445

negativna ekstrakcijska kontrola, 138, 199

negativna PCR kontrola, 138, 199

nehistonski proteini, 36, 37, 66, 67

neizbalansiranost pikova, 202

neksina, 303

neomorf, 55

nesestrinske hromatide, 68

Nesslerov reagens, 109

nested PCR, 203, 218
 NG-MAST, *Multi-Antigen Sequence Typing database*, 464
 NGS, *Next Generation Sequencing*, sekvenciranje
 nove generacije, 190, 191, 370, 391, 460, 467
 ninhidrin, 114, 116
nonstop, stop-loss mutacija, 57
 NORs, *Nucleolar Organizing Regions*, regioni
 organizatori nukleolusa, 35, 66, 69
 nukleosom, 53, 66, 67
 nukleosomno vlakno, 66, 67
 nul-aleli, *null-alleles*, 168, 174, 175, 199, 200, 330

O

obligatni aleli, 219, 221, 384
 OBTI test, 92
 odontoblasti, 125
 odontogram, 265
 OL, *off-ladder* pikovi, 168, 170, 171
 oligogenija, 21
 oligospermija, 105
 organska metoda ekstrakcije (izolacije) DNK, 126, 140, 141
 ortopantomogram, 270, 271
 osmoza, 32
 osteoblasti, 124
 osteociti, 124
 osteofiti, 241, 255, 256
 osteokalcin, 124
 osteoklasti, 124
 osteologija, 229, 257
 osteometrija, 230, 231
 osteometrijske ploče, 231
 otisci prstiju, 113, 115, 116, 117, 118
 latentni, 113, 117, 118
 vidljivi, 113
 overleji, 281

P

P/E, omjer polarne i ekvatorijalne osi polenovog
 zrna, 305
 pahiten, 71, 72
 paleopalinologija, 302

palinologija, 286, 287, 302
 palinomorfoze, palinomorfološki spektar, 302, 307
 parcijalni DNK profil, 137, 204, 205, 217, 218
 parcijalno, nekompletno spolno vezane osobine, 27
 parenhim, 288
 parenje u srodstvu, *inbreeding*, F_{IS} , 373, 383
 pasivni transport, 31
 patologija, 254
 patološke promjene, stanja, 254, 255
 PCR uređaj, *thermal cycler*, 151
 PCR, polimerazna lančana reakcija, 150, 151, 326, 432
 PCR-RFLP. vidi PCR, polimerazna lančana
 reakcija i RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*, analiza polimorfizma dužine
 restrikcijskih fragmenata
 PD, *Power of Discrimination*, snaga isključenja,
 210, 373
 PE, *Power of Exclusion*, snaga isključenja
 očinstva, 211
 PE, *Probability of Exclusion*, vjerovatnoća
 isključenja, 215, 366
 periderm, 288, 291
perimortem, perimortalne traume, 230, 252, 253
 peroksisomi, 44
 PFGE, *Pulse-Field Gel Electrophoresis*, gel-
 elektroforeza u pulsirajućem polju, 443
 Phadebas® Amylase Test, 107
 Phadebas® Forensic Press Test, 107
 Phadebas® Forensic Tube Test, 108
Phl, floem, 288, 289, 290
 Phosphatesmo KM test, 101, 102
 PI, *Paternity Index*, indeks očinstva, 185, 211, 219,
 221, 373
 PIC, *Polymorphism Informative Content*,
 informacioni sadržaj polimorfizma, 210, 344
 P_{ID}, *Probability of Identity*, vjerovatnoća identiteta,
 344, 345, 373, 383
 pinocitoza, 33
 pirimidin, 36, 47, 56
 pirimidinski dimeri, ciklobutanski pirimidinski
 fotodimeri, 58
 plastidi, 29, 46
 plastidna DNK, genom, 28, 153, 327

plazmamembrana, ćelijska membrana, 30, 31, 33,
38, 41, 42, 45, 46, 48, 139
plazmodezme, 48
plejotropija, 21, 112
pljuvačka, saliva, 80, 81, 89, 94, 99, 100, 102, 107,
108, 109, 110, 111, 280, 282, 365, 386, 445,
448, 450, 461, 462, 463
PM, *Match Probability*, vjerovatnoća poklapanja,
210
PM, *postmortem* status zuba, 264, 267
PMI, postmortalni interval, 392, 397, 400, 402,
403, 406, 407, 409, 410, 412, 413, 416, 456,
458, 459
pojačivači, *enhancers*, 53
pol gen, *polymerase*, 444
polenova zrna, 303, 304, 307
poliadeninski, poli(A) rep, 52
poli-D-glutaminska kiselina, 435
polifenija, 21
poligenija, 21
polijade, 303
polimorfnost, 158
poliploidija, 22
poliploidija, poliploidi, 328, 336, 344
poliribosomi, 44
poluletalne mutacije, 55
poratna polenova zrna, 304
porus, pore polenovog zrna, 304
postmortalna translokacija mikroorganizama, 459
postmortalni mikrobiom, 459
postmortem mikrobiom, 459
postmortem utapanje, 299
postmortem, postmortalne traume, 230, 252
potvrđne metode, testovi, 80, 81, 100
testiranje tragova krvi, 92
testiranje tragova sperme, 103, 104
povratne mutacije, 55
PPE, *Probability of Paternity Exclusion*,
vjerovatnoća isključenja očinstva, 211
prethodne, preliminarne metode, testovi, 80
testiranje tragova krvi, 89, 91
testiranje tragova sperme, 101
prigušivač, *quencher*, 148
prigušivač, *silencer*, 54
primarni ćelijski zid, 48

proantocijanidini, 312
profaza, 46, 62, 65, 71, 73, 74, 225
proliferativne lezije na kostima, 255
prometafaza, 65, 73
promjena okvira čitanja šifre, *reading frame*, 56
proplastidi, 46
protamini, 37
proteaza, 139
proteinaza K, 139
protektivni antigen, 435
prskotine, 83, 86, 87, 89
PSA Check Test, 103
PSA, *Prostate Specific Antigen*, prostata-specifični
antigen, 103, 104
pseudoautosomalni regioni, PAR1, PAR2, 183
pubične simfize, Suchey-Brooks metoda za
određivanje starosti, 234, 237, 238
purifikacija DNK, 138, 140
purin, 36, 47, 56, 58
putrefakcija, *putrefactio*, 401, 404
pXO1 plazmid, 435
pXO2 plazmid, 435

Q

Q, *probability of excluding paternity*, vjerovatnoća
isključenja očinstva, 211
qI, prag vjerovatnoće pripadnosti, 382
qPCR, kvantitativni PCR, 148, 432
Quantifiler Duo, 148
Quantifiler Trio, 148
Qubit fluorometar, 145

R

racemizacija aspartatne kiseline iz zubnog dentina,
273
radiosimetrična polenova zrna, 303
RAPD *fingerprint*, 337
RAPD, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*,
metoda slučajno umnožene polimorfne DNK,
332, 337, 338, 339, 345, 389, 414
Rapignost-Amylase test, 107
rbcL gen, 328, 347, 348

rCRS, *Revised Cambridge Reference Sequence*, Andersonova sekvenca, 190
 RealTime PCR, 144, 147, 150
 rekombinacija, krosing-over, *crossing-over*, 21, 72, 183, 225
 rekonstruktivne dentalne metode, 268
 rendgenogram, 265, 278
 rendgenska difrakcija, difrakcija rendgenskih zraka, 371, 372
 replikacija DNK, 34, 37, 49, 50, 55, 58, 61, 175, 191
reporter boja, 148
 RER, *Rough Endoplasmic Reticulum*, granulirani, hrapavi endoplazmatski retikulum, 40, 41
 restriktijski enzimi, 156, 157, 192, 333, 334, 336, 340, 341, 378, 380, 443
rev gen, 445
 RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*, analiza polimorfizma dužine restriktijskih fragmenata, 146, 150, 153, 156, 332, 333, 335, 336, 378, 414, 415, 432
 RFNE, *Random Female Not Excluded*, neisključenost slučajno odabrane ženke iz opće populacije, 385
Rhy, ritidoma, mrtva kora, 288, 289, 290
 RI, *Relationship Index*, indeks povezanosti, 223
 ribosomi, 29, 38, 40, 41, 44, 47, 49, 53, 54, 66, 69, 433
 RMNE, *Random Man Not Excluded*, 218
 RMP, *Random Match Probability*, vjerovatnoća slučajnog podudaranja, 211, 212, 213, 214
 RRE regioni, *Rev Response Elements*, 445
 rRNK, ribosomska RNK, 17, 20, 34, 35, 44, 52, 63, 66, 69, 365, 432, 433, 447, 452, 454, 455, 466
 RSID-Semen test, 104
 RSID™ Urine test, 110
 RuBisCo enzim, ribulozo-1,5-bifosfat karboksilazu-oksigenaza, 328
 Ruhemanova ljubičasta, 115

S

S, Svedbergove jedinice, sedimentacijski koeficijent, 44

sakatna polenova zrna, 303
 SALigAE® test, 107
 sarkoplazmatski retikulum, 41
 SAT, *Small Autosomal Target*, 148
 satelitna DNK, 63, 154
 SCAR marker, *Sequence-Characterized Amplified Region*, 338
 Schmeling i saradnici, metoda procjene dentalne dobi, 271
scoring sistem, 270
 SDS, natrijev dodecil sulfat, 139
 sediment, analiza sedimenta, 299, 300, 308
 seksina, 303
 seksualni napad, delikt, 98, 99, 104, 106, 109, 361, 416, 463
 sekundarni ćelijski zid, 48
 sekundarni metaboliti, 309, 310, 330
 sekvenciranje bakterijske 16S rRNK, 465
 SEM, skenirajući elektronski mikroskop, 297
 senecencija, ćelijsko starenje, 70
 SER, *Smooth Endoplasmic Reticulum*, agranulirani, glatki endoplazmatski retikulum, 40, 41
 serotip, 431, 442
 sestrinske hromatide, 68
 Sg, semenolegin, 104
Shiga toksin, *Shigella*, 441, 442, 443
shotgun sekvenciranje, 455, 466
 SIDA, AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, sindrom stečene imunodeficijencije, 430, 443
 SIDS, *Sudden Infant Death Syndrome*, sindrom iznenadne smrti dojenčadi, 464
 silika-gel, 326, 327
 silika-membrana, 142
 silikatne alge, dijatomeje, Bacillariophyta, 297, 298, 299
 simetrična polenova zrna, 303
 sinaptonemni kompleks, 72
 SiO₂, silicijev dioksid, 298
 Sirchie Mini Bluemaxx III Forensic Light Kit, 100
 sitaste ćelije, 288
 SIV, *Simian Immunodeficiency Virus*, 443
 skeletne anomalije, 256

skeletni ostaci, 80, 123, 124, 125, 126, 127, 229, 252, 254, 259, 261, 262
 skopolamin, “đavolji dah”, 315, 316
 škrob-jodni test, 107
 slot blot hibridizacija, metoda, 146, 147
 Šmorlovi defekti, 255, 256
 SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*, polimorfizam jednog nukleotida, 153, 178, 180, 190, 191, 293, 332, 349, 350, 365, 370, 371, 373, 415, 433
 solanin, 310, 312, 319
 solenoid, solenoidno hromatinsko vlakno, 67
 somatske mutacije, 55
 Sperm Hy-Liter™ test, 106
 sperma, sjemeni tečnost, 81, 89, 98, 99, 100, 110, 111, 129, 130, 462
 spermatozoidi, 177
 spirem, 65
 splajnosom, 52
splicing, 52
 spolni dimorfizam, 233, 234, 236, 368
 spolno kontrolisano nasljeđivanje, 27
 spolno ograničene osobine, 27
 spolno uvjetovane osobine, 27
 spolno vezano nasljeđivanje, 27
 spontane lezije, 58
 spontane mutacije, 55, 57
 sporoderma, 302
 sporopolenin, 302, 303, 307
 SPR, *Small Particle Reagent*, reagens sitnih čestica, 117
 SRY, spolno determinirajući Y region, 148
 SSR markeri, *Simple Sequence Repeats*, 329, 332, 344, 345
 Starch-Iodine Mini-Centrifuge Test, 107
sticky-side powders, 118
 stomatološki dokazi, *dental evidence*, 263
 STR, *Short Tandem Repeats*, kratke ponavljajuće sekvence, 136, 158, 159, 160, 161, 163, 170, 177, 195
 strihnin, *Strychnos-nux vomica* L., 312, 317, 318
 submetacentrični hromosom, 68
 subvitalne mutacije, 55
 superdominantnost, naddominantnost, 25
 SYBR Green boja, 145

T

tačkaste mutacije, 56
 tanatomikrobiom, 459
 tanini, 312
 Taq DNK polimeraza, 147, 148, 152
 TaqMan® tehnologija, TaqMan esej, 147, 148, 204
 TAR regioni, *Trans-response elements*, 445
 tat gen, 445
 TE pufer, Tris-EDTA, 140
 tečna hromatografija, 311
 tečna hromatografija s elektrosprejnom masenom spektrometrijom, 312
 tehnologija Affymetrix čipa, 349
 tehnologija razmjene aniona, 142, 143
 telocentrični hromosom, 69
 telofaza, 62, 65, 66, 73, 74
 telogena faza, 120
 telomeraza, 70
 telomere, telomerni regioni, 63, 70
 test pripadnosti, *assignment test*, 382
 test taloženja, 92
 tetrada, tetrade, 72, 73, 303
 tetraploidija, 22
 THC, tetrahidrokanabinol, 123, 311
Thermus aquaticus, 152
 THP, Tamm-Horsfall glikoprotein, 110
 tihe mutacije, *silent*, 56
 timin, 36, 51, 57, 177
 toksikološka analiza, 310, 311
 toksini iz gljiva, 324
 tonoplast, 48
 tragovi, 78, 79, 80, 89, 98, 99, 101, 104, 107, 108
 biološki, 79, 80
 direktni, 79
 fizički, 79
 grupni, 79
 hemijski, 79
 indirektni, 79
 individualni, 79
 nesporni, 80
 sporni, 80
 transkripcija, 60
 translacija, 49, 52, 53, 54, 57

transponder, čip, 363
 transpozoni, 21
 transverzije, 56
 tranzicije, 56
 traseologija, 78
 trepanacije, 258
 tretman cinkovim solima, 115
 tretman kadmijevim solima, 115
 TRF, *Time-Resolved Fluorescence Immunoassay*,
 metoda vremenski odgođene fluorescencije, 439
 trialelne varijante, 172, 173, 199
 triploidija, 22
trnH-psbA gen, 328, 347
 tRNK, transportna RNK, 17, 20, 38, 51, 52, 63
trnL-trnF gen, 328

U

ubikvitin, 54
 univalent, univalenti, 72, 73
 uracil, 36, 51, 58
 urea, 31, 109
 ureaza, 109
 urin, 81, 89, 93, 100, 102, 104, 109, 110, 123
 uslovno letalne mutacije, 55
 ušne markice, 359, 363

V

vanjedarno, ekstranuklearno nasljeđivanje, 28
 vezanost gena, *genetic linkage*, 225
vif gen, 444
 VMD, *Vacuum Metal Deposit*, vakuumsko
 taloženje metala, 118
 VNTR markeri, *Variable Number Tandem*
Repeats, lokusi s različitim brojem uzastopnih

ponavljanja, 150, 153, 154, 155, 156, 157, 158,
 195, 332, 333, 334, 434, 435, 438
vpr gen, 444
vpu gen, 444

X

X-vezano dominantno nasljeđivanje, 27
 X-vezano recesivno nasljeđivanje, 27

Y

YCC, *Y Chromosome Consortium*, Konzorcij Y-
 hromosoma, 180
 YHRD, *Y Chromosome Haplotype Reference*
Database, 178, 179, 225
 Y-hromosomski Adam, 180

Z

zajednički aleli, 186, 220, 221, 222
 zaostajući pikovi, *stutter*, 168, 169, 170, 173, 200,
 218
 zaparivanje jodnim parama, 118
 žigosanje, 362
 zigoten, 71
 znakovi smrti, *signa mortis*, 400
 zoofilne biljne vrste, 309
 zubi, 125, 126, 136, 231, 244, 261, 262, 264, 265,
 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 275, 277,
 278, 279, 280, 282, 361, 448

α

α-amilaza, 107, 108
 α-naftolflavon, 118

“Nedvojbeno je da je knjiga Forenzična biologija izuzetno korisna i zanimljiva udžbenička literatura za širok spektar dodiplomskih, diplomskih i poslijediplomskih studija na sveučilištima koji uključuju nastavne programe iz forenzičkih znanosti, kriminalistike i prirodnih znanosti. Ova knjiga može biti veoma korisno i poučno štivo za praktično sve studentske programe u koja su uključena elaborirana poglavlja opće i specijalne forenzičke biologije, ali i za početnike u ovoj oblasti istraživanja.

Također, može se očekivati da će knjiga pobuditi značajan interes i šire znanstveno–stručne javnosti i ostalih čitatelja. Istovremeno, ta knjiga će dopuniti postojeću prazninu u izdavaštvu iz područja forenzičke genetike u regiji. Iz navedenog, za zaključiti je da je knjiga vrijedan znanstveni i stručni doprinos području forenzičkih znanosti te da će biti od velike koristi i tijekom realizacije edukacijskih procesa iz područja forenzičke biologije, ali i drugih srodnih područja. Nadalje, uvjeren sam da će knjiga „Forenzička biologija“ biti iznimno korisno štivo svim zainteresiranim tijekom interpretacije nalaza forenzičko–bioloških sudskih vještačenja, praćenja i tumačenja policijskih procedura, tijekom rješavanja pravnih nedoumica, ali istodobno bit će i od pomoći svima iz srodnih – teorijskih i aplikativnih znanstveno stručnih područja.”

Prof.dr. Dragan Primorac

“...procjenjujem da je priloženi rukopis visokokvalitetan i obuhvatan prilog poznavanju forenzičke biologije, što ga kvalificira u sam vrh dosadašnje bibliografije u pripadajućoj oblasti.”

Prof.emeritus dr. Rifat Hadžiselimović

ISBN 978-9958-083-11-2



978-9958-083-11-2