

DNK – METODA IDENTIFIKACIJE

DNA – METHOD OF IDENTIFICATION

Elma Šeper – Nadžak, Ministarstvo unutrašnjih poslova Zeničko - Dobojskog kantona, BiH

SAŽETAK

Rješavanje najtežih, ali i najlakših krivičnih djela (kada to okolnosti slučaja zahtijevaju; svakako je upitna i podjela na najlakša i najteža), danas je prosto nezamislivo bez primjene DNK analize. Uvođenju DNK analiza u forenzičku praksu predstavlja, po nepodjeljenom mišljenju analitičara i forenzičara, najveće naučno otkriće 20. vijeka.

DNA (bos. de/z/oksidiribonukleinska kiselina; eng. Deoxyribonucleic Acid) analiza danas, van svake sumnje, ima nezamjenjivu ulogu u forenzičkim naukama. Počev od 1985. godine kada su dr. Alex Jeffreys i saradnici prvi put primijenili DNA analizu u rješavanju forenzičkih problema, do danas širom zemaljske kugle, tom metodom riješeni su brojni sudskomedicinski slučajevi, koji bi bez primjene ove metode, vjerovatno ostali nerazjašnjeni. DNK analiza danas ima nezamjenjivu ulogu u forenzičkoj nauci, ona je postala „novi oblik naučnog dokaza“. Sudovi širom svijeta sve više prihvataju rezultate koji se temelje na DNK analizi. Generalno posmatrano, nekoliko je glavnih primjena DNK analize u sudskoj medicini, među kojima je: istraživanje kriminalnih radnji, utvrđivanje identiteta osoba i dokazivanje očinstva (sve su ovo slučajevi koji spadaju u oblast kriminalistike).

Ključne riječi: identifikacija, krvna klasifikacija, DNA fingerpriting, DNA typing, nuklearna DNK, mitohondrijalna DNK, faze procesa DNK analize

Key words: Identification, Blood classification, DNA fingerpriting, DNA typing, Nuclear DNA, Mitochondrial DNA, Phases of DNA analysis

ABSTRACT

Solving the most difficult and the easiest crimes (when the circumstances of the case require so; division on the easiest and most difficult is certainly questionable), is simply unimaginable without the use of DNA analysis. The introduction of DNA analysis in forensic practice is, according to undivided opinion of the analysts and forensics, the greatest scientific discovery of the 20th century.

DNA (Bos de/z/oksidiribonukleinska acid; eng. Deoxyribonucleic acid) analysis today, beyond any doubt, has irreplaceable role in the forensic science. Starting from 1985. when Dr. Alex Jeffreys and associates first applied DNA analysis to solve forensic problems, until today around the globe, this method solved numerous forensic cases, which would without using this method, probably remained unsolved. DNA analysis now has an irreplaceable role in forensic science, it has become "a new form of scientific evidence." Courts around the world are increasingly adopting the results that are based on DNA analysis. Generally speaking, there are several main applications of DNA analysis in forensic medicine, including: researching criminal activity, determining a person's identity and paternity (all of these are cases that fall within the field of criminology).

UVOD

Poseban kvalitet DNK analize je mogućnost sigurnog dokaza i sigurnost konačne presude. Oduvijek je postojala mogućnost (namjerna i nenamjerna, slučajna ili ne, te ona koja je plod neznanja itd.) da bude nevino osuđenih. Ne postoji gore prokletstvo nego osuditi nevinog čovijeka. Nikakva kasnija kajanja ne mogu popraviti stvar, nikakva kasnija satisfakcija neće biti dovoljna. Nekada može biti i kasno, jer npr. smrtna kazna može biti izvršena. U tom smislu, uloga DNK analiza, predstavlja još jedan kvalitet više. Upravo je u Americi u toku „DNA innocence projekat“ pokrenut s ciljem oslobađanja pogrešno optuženih i osuđenih osoba, te je zahvaljujući (većinom) DNK analizama u proteklih dvije decenije oslobođeno stotinjak osoba, od kojih su neki bili osuđeni i na smrtnu kaznu (10)!

Bilo da je riječ o standardnom utvrđivanju očinstva ili o analizi spornih bioloških tragova prikupljenih na mjestu zločina, DNK analiza se javlja nezaobilaznom procedurom koja daje rezultate visoke upotrebne vrijednosti.

Bosna i Hercegovine i njene vitalne institucije, policija i sudstvo, donedavno su bile uskraćene za ovo moćno oružje u borbi protiv kriminala. INGREB¹⁰⁷ je uspješno uspostavio sistem za DNK analizu osnovnih, ali i najkomplikovanijih bioloških tragova koji podrazumjevaju analizu malih i degradiranih količina nasljednog materijala, kao i mješanih bioloških tragova (6).

TRASEOLOGIJA I IDENTIFIKACIJA U MEDICINSKOJ KRIMINALISTICI

Traseologija je učenje o tragovima. Kriminalistički pojam traga se polazno uzima kao materijalna promjena nastala u vezi sa krivičnim djelom. Trag je funkcionalno u kriminalistici nositelj signala, poruke. On je predmet izučavanja

raznih naučnih disciplina. One kao cjelina tvore traseologiju.

Osnovni uslovi koji se zahtjevaju za kriminalistički traga su: a) kriminalistička važnost (relevantnost), b) povezanost sa djelovanjem subjekta krivičnog djela i c) prikladnost za kriminalističku identifikaciju i drugu upotrebu.

Klasifikacija tragova je s obzirom na njihovu raznovrsnost moguća na temelju raznih osnova. Tako se, na primjer, na osnovne načine nastanka (dinamička podjela) tragovi dijele na: a) tragove djela (na mjestu izvršenja, na žrtvi, na počinitelju), b) tragove počinioca (na mjestu izvršenja, na sredstvima, na žrtvi), c) tragovi na počiniocu (tragovi počinjenog krivičnog djela, tragovi mjesta izvršenja, tragovi žrtve).

Funkcionalna podjela tragova razvrstava tragove u skupine tragova: a) koji ukazuju na postojanje krivičnog djela, b) tok njegovog odvijanja, c) osobu počinioca, d) uzroke, ciljeve i motiv djela i e) žrtvu. Ta se podjela može kombinovati i sa temeljnim, glavnim pitanjima kriminalistike u kojem slučaju se pojedini tragovi lako uklapaju u sadržaje istražnih verzija i modela, te povezuju s drugim dokazima. Ujedno, ta je klasifikacija značajna za krivično pravo i krivično procesno pravo. Naime, na toj osnovi (tragova kao dokaza) se raspravljaju činjenice krivičnog djela i krivične odgovornosti izvršioca. Tu posebnu važnost imaju situacijski tragovi. Situacijski ili okolnosni trag je svaki trag koji upućuje na tok odvijanja krivičnog djela ili nekog drugog zbivanja.

Materijalna klasifikacija tragova utemeljena je na njihovim svojstvima, posebice imajući na umu metode s kojima se pojedini trag ispituje. Tako se na toj osnovi tragovi dijele na: a) promjene oblika, b) promjene u prostoru, c) promjene stanja, d) promjene sastava, e) prijenos tvari, f) odvajanje tvari i dr. Ta je podjela polazište za dalju klasifikaciju tragova na osnovu naučne discipline koja istražuje pojedinu vrstu traga. Tu je posebna važnost hemije, fizike i biologije. Bitno metodologijsko značenje

¹⁰⁷ Institut za genetičko inženjerstvo i biotehnologiju

ima podjela na makro – mikro i submikro tragove. U tom je području naočito važna podjela mikrotragova u relacijske klase koje se stvaraju uzajamnim djelovanjem materijalnih sastojaka slijedećih objekata: izvršioc, mjesto izvršenja, žrtva, sredstvo. Tragovi se zatim dijele na vidljive, nevidljive, latentne, nanosne, unosne, otiske, utisnuća, tekuće, rasute, polutekuće, krute i druge tragove, brisotine, prskotine.

Kao uobičajna osnova istraživanja tragova uzima se kriminalistička traseologijska klasifikacija, koja tragove razvrstava u slijedeće vrste: daktiloskopski tragovi, tragovi nogu i vozila, tragovi oruđa, alata i drugih sredstava, tragovi oružja i na oružju, tragovi u požarima i eksplozijama, tragovi koji služe hemijsko – fizikalnoj identifikacijskoj analizi, tragovi otrova, tragovi koji služe medicinskim i biologijskim ispitivanjima (biološki tragovi), tragovi u vezi sa ispravama, tragovi rukopisa, ostali tragovi.

Najveću važnost imaju identifikacijski tragovi. U širem smislu to su tragovi koji omogućavaju određivanje pripadnosti klasi, vrsti. U užem smislu, strogo smislu riječi identifikacijski trag je takav trag koji omogućava individualnu identifikaciju. Trag zahtjeva prikladno ispitivanje. To je proces koji se odvija u više etapa:

- a) pronalazak traga,
- b) osiguranje (mjesta pronalaska) traga,
- c) razrješenje (ekspertno) i tumačenje (sudsko) značenja traga.

Trag je najčešće indicij. Trag koji je neutralni poredbeni uzorak je kontrolna činjenica. Pojedini stadiji obrade traga u postupku predmetom su: uviđaj, pretrage, vještačenja.

Medicinska kriminalistika razvila je zasebno područje (sudsko)medicinske traseologije. Praktično je nemoguće izvršiti krivično djelo, a ne ostaviti nikakav trag. Otkrivanje, osiguranje i obrada tragova zahtjeva stručan pristup.

Identifikacija je postupak kojim se, uz primjenu specijalnih metoda, nastoji utvrditi i potvrditi tačna istovjetnost

(identitet) jedne osobe. Ako se postupak primjenjuje u medicinskoj kriminalistici, cilj mu je utvrđivanje identiteta nepoznatog leša ili počinitelja zločina (u istrazi, osumnjičene osobe). Postupak ima i šire značenje, preko genetskih markera postiže se utvrđivanje očinstva i materinstva, porijekla i identiteta bioloških tragova, itd.

Identifikacija se može ostvariti i na više nivoa, pa se tako može utvrđivati istovjetnost: a) skupine, roda, b) klase i c) pojedinog predmeta. Identifikacija predmeta je individualna, tj. identifikacija u strogo, pravnom smislu riječi. Ona uključuje utvrđivanje činjenica i obilježja prema kojima se određena osoba ili predmet razlikuju od ostalih. Temelji identifikacije moraju biti logička pravila traženja identiteta. U logici odnos identiteta među pojmovima postoji ako oni imaju isti sadržaj i obim što se izražava sudom o identitetu.

Cilj kriminalističke identifikacije je relativni identitet, koji se određuje prema pravilima koja su ili naučna ili iskustvena, u zavisnosti o konkretnome predmetu. To je ujedno najznačajnije polje istraživanja nove naučne kriminalistike (identifikacija upotrebom DNK analize).

Za identifikaciju su bitna stanja stabilnosti i promijenljivosti, te odnos svojstvo – obilježje. Identifikacija se temelji na izolacijskoj apstrakciji. Polazi se od svojstva predmeta koja su ontologijski pojam. Ona postoje sama po sebi, neovisno o bilo kakvom spoznajnom procesu. Među tim svojstvima izdvajaju se ona na temelju kojih se ostvaruje identifikacija. Time ta izdvojena sredstva postaju identifikacijska obilježja.

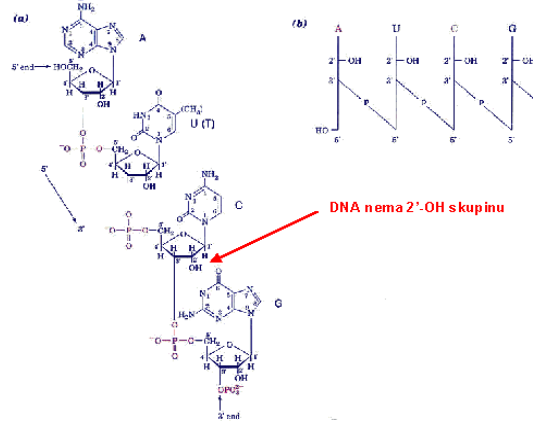
Identifikacijska obilježja su gnoseologijski pojam. Ona su izolirana upravo radi upotrebe u procesu identifikacije. Njihove karakteristike, o kojima zavisi identifikacijska vrijednost su individualnost, jednkrotnost, postojanost, neovisnost i brojnost. Sam proces identifikacije počiva na pojavi izomorfizma (ekvivalentnost predmeta koji ostavlja

odraz i predmeta na kojemu je ostavljen odraz, odnosno izotopnost odraza).

Identifikacijska obilježja su vrlo različita. Njihova podjela moguća je na temelju

Identifikacija se jako često ostvaruje kao djelatnost vještaka. To su identifikacijska vještačenja o čemu ćemo govoriti u nastavku.

Kemijska struktura nukleinskih kiselina



velikog broja kriterija. Za identifikaciju je bitna vrsta i količina identifikacijskih obilježja. Ključno mjesto među identifikacijskim metodama ima poredbena metoda, iako ona nije jedina identifikacijska metoda. Strukturu identifikacijskog procesa tvore:

- objekat identifikacije,
- sredstvo identifikacije i
- metoda identifikacije.

Objekti identifikacije mogu biti osobe i stvari. U osobnu identifikaciju ubrajaju se: prepoznavanje osoba, antropometrijski opis, lični opis, crtež papilarnih linija, tragovi usana, tragovi noktiju, odontologijska obilježja, rukopis, glas, miris, biološki tragovi.

Stvarna identifikacija uključuje predmete kojima je počinjeno krivično djelo, predmete nastale krivičnim djelom i predmete nosioce tragova krivičnog djela.

Najvažnija načela identifikacije su:

- isključivost cjeline identifikacijskih obilježja (u smislu da postoje samo kod dotičnog predmeta)
- prijeko potrebni stepen podudarnosti uzoraka i
- primjena odgovarajuće pouzdane metode.

MOLEKULARNA BIOLOGIJA

Osnovni elementi humane genetike, hromosoma, gena i DNK

DNK je molekula nasljeđa, tj. nositelj nasljedne informacije. To je nitasta molekula koja se sastoji od dvaju nasuprot položenih lanaca koji su spiralno savijeni jedan oko drugog i međusobno povezani vodikovim vezama. Nukleotidi se međusobno razlikuju prema bazama koje ih tvore.

Čovjek, ali i sva živa bića, građen je od ćelija (stanica), koje istovremeno predstavljaju najmanju strukturnu i funkcionalnu jedinicu našeg organizma. U sadašnjem trenutku egzistira pretpostavka da je ljudski organizam građen od približno 100 trilijona ćelija. Iako su ćelije specijalizovane za različite funkcije, po svojoj su strukturi, uglavnom, veoma slične i građene su od jezgra i citoplazme. Osnovna genetička informacija smještena je u jezgri, dok se u citoplazmi nalaze brojne ćelijske strukture koje održavaju ćeliju na životu. Jedna od tih struktura, važna za proizvodnju ćelijske energije, su mitohondriji. S forenzičkog stajališta mitohondriji su važni jer sadrže mitohondrijsku DNK (mtDNK) koja se nasljeđuje direktno putem majčinske linije.

Iako veličina prosječne ćelije odgovara otprilike 1/10 promjera dlake, pronalaženje bioloških tragova koji sadrže dovoljan broj ćelija sigurno može biti odlučujuće u rješavanju sudsko – medicinskih i kriminalističkih slučajeva. I pored toga što postoje određeni izuzeci, svaka od ćelija u našem organizmu sadrži potpuno identičnu gensku poruku, nasljeđenu od majke i oca. Uvažavajući činjenicu da svaka osoba nasljedi polovicu genetičkog materijala od majke, a polovicu od oca, DNK testiranjem je moguće utvrditi povezanost između ispitanih osoba. Druga veoma važna osobina DNK je da je stabilna i da se tokom vremena ne mijenja, pa se pravilno pohranjen uzorak može uporediti s nekim drugim uzorkom uzetim i nakon nekoliko godina. Sve navedeno, nesumnjivo potvrđuje veliku ulogu DNK analiza u kriminalistici i sudskoj medicini.

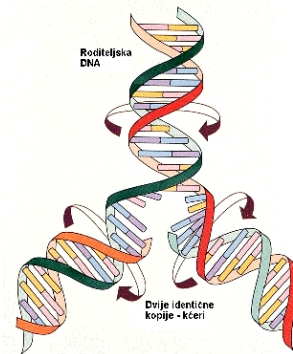
Jezgrina DNK predstavlja genetički materijal, koji nosi nasljednu poruku, zapisanu u genima, a čiju osnovnu strukturu čini DNK. Drugačije rečeno, geni su aktivni segmenti koji se nalaze na tačno određenim mjestima lanca DNK. Upravo zahvaljujući normalnom funkcionisanju gena, svaka jedinka ima određene parametre rasta i razvoja organizma (genetički je određeno da osoba ima dvije ruke i dvije noge), ali, isto tako, i neke druge parametre, kao što su visina, boja očiju itd. Očito je da je DNK centralna molekula života koja kontroliše rast i razvoj svakog živog bića. Ukupna jezgrina DNK je smještena u strukturama koje se zovu hromosomi. Od ukupno 46 hromosoma koji se nalaze u ćelijama svakog pojedinca, 23 je nasljeđeno od oca, a 23 od majke.

Preciznije rečeno, pri stvaranju nove jedinice, 23 hromosoma dolazi iz jajne ćelije, a 23 iz spermija. Hromosomi se u jezgru nalaze u parovima, pa se tako kod čovjeka nalazi ukupno 23 para hromosoma. Jedan od tih parova čine i spolni hromosomi (X, Y) koji su važni kod određivanja spola svake jedinice i međusobno se razlikuju. Preostala 22 para hromosoma su autosomi koji su homologni

u oba spola. Općenito vrijedi pravilo da dva X hromosoma (XX) određuju ženski, a kombinacija X i Y hromosoma (XY) muški spol. Veoma je važno istaći činjenicu da sve tjelesne ćelije (ćelije kože, koštane ćelije, bijele krvne ćelije itd.) sadrže po 46 hromosoma (23 para), dok spolne ćelije (spermiji i jajašce) sadrže upola manje, odnosno 23 hromosoma. Unutar hromosoma se na tačno određenim mjestima nalazi približno 30 000 do 40 000 gena koji određuju sva svojstva jednog organizma. Fizički položaj gena na hromosomu naziva se lokus. Dva autosoma koji čine par odgovaraju jedan drugom kako po strukturi tako i po funkciji.

Zbog toga se takva dva hromosoma, koja su slična po građi i nose identične gene, zovu homologni hromosomi. Treba istaći da se geni koji na homologim hromosomima zauzimaju isti položaj ili lokus i koji na različite načine određuju isto genetičko svojstvo nazivaju aleli. Aleli su, u suštini,

Umnažanje (replikacija) DNA



dva ista gena s razlikom u sekvenci. Još je potrebno objasniti dva pojma koja se vrlo često susreću u genetici, pa analogno tome i sudskoj medicini, a to su – homozigot i heterozigot.

Homozigot predstavlja genotip koji ima identične alele, odnosno iste gene na određenom lokusu na paru homolognih hromosoma. Nasuprot tome, heterozigot označava osobu ili genotip koji ima 2 različita alela na određenom lokusu na paru homolognih hromosoma.

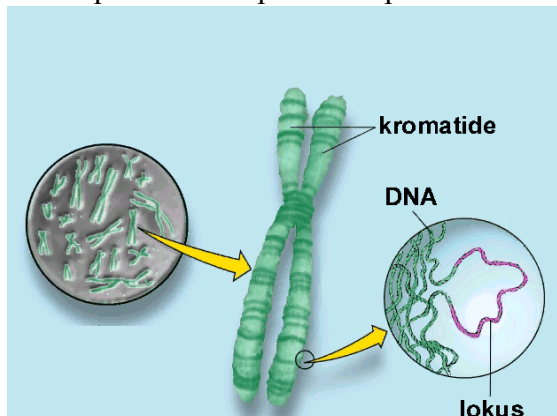
Molekula DNK građena je u obliku dvostruke zavojnice i smještena je u svih 46

hromosoma. Kad bi se ta ista DNK u potpunosti razmotala, dobila bi se nit duga oko 2 metra. DNK sačinjavaju baza nazvane nukleotidi, i svaka molekula sadrži oko 3×10^9 takvih baza. Svaki nukleotid sastavljen je od tri podbaze: šećerne baze, fosfatne grupe i nukleotidnih baza koje sadrže dušik, a zovu se: adenin (A), gvanin (G), citozin (C) i timin (T). Važno je istaći činjenicu da se u dvostrukom lancu adenin uvijek spaja s timinom (A-T), a citozin s gvaninom (C-G). uslovi isključuju sparivanje po nekoj drugoj šemi.

Upravo te veze održavaju dvostruke lance DNK zajedno. Upravo taj pojedinačni kontakt između navedenih baza naziva se par baza (pb). Izmijene navedenih baza ili razlika u broju ponavljanja parova baza koje imaju određen redosljed predstavlja osnovu utvrđivanja identiteta osobe.

U prirodi, DNK poprima oblik duplog helixa (zavojnice). Dva dijela su zavrnuti jedan preko drugog i spojena zajedno kao prečage na ljestvima. Svaka prečaga je sastavljena od dvije osnove koje imaju jak afinitet jedan prema drugoj, kolektivno ove snoge molekulu drže zajedno (privlače dva lanca jedan drugom).

Svaka prečaga koja spaja dvije baze zove se bazni par. Samo specifični parovi između



četiri baze će se povezati i držati zajedno. A se uvijek spaja sa T i G sa C. Ovo obavezno sparivanje zvano komplementarno bazno sparivanje je prisutno u svim vrstama klasifikacija DNK molekula.

U prirodi, komplementarno bazno sparivanje je odgovorno za sposobnost

reprodukcije DNK molekule i njeno prenošenje na slijedeće generacije. Kad je dupli helix čitav (netaknut), DNK ima dva lanca. Kad se dvije strane helixa razdvoje prirodno ili vještački, DNK ima samo jednu stazu. Upotrebom jedne polovice originalnog helixa, kreira se druga polovica, što rezultira sa dvije molekule identične originalu. Svaka originalna baza stvara komplementarnu zamjenu da komplementira bazni par. Ovaj proces može biti kreiran vještačkim putem i predstavlja osnov lančane reakcije polimeraze (PCR) koja će biti detaljnije razmatrana u daljem tekstu.

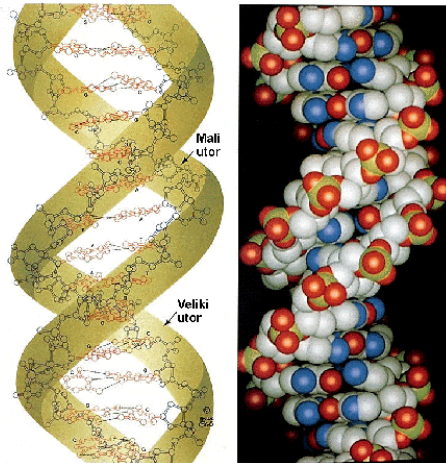
Kratki segmenti komplementarne DNK s jednim lancem takođe pokazuju specifičan afinitet jedni za druge invitro, ponovo definisano specifičnim baznim nizom. Pod odgovarajućim uslovima, komplementarni fragmenti DNK će se pronaći i držati zajedno. Tehnički, ovo je označeno kao hibridizacija. U laboratoriji, krucijalno je da hemijski uslovi za hibridizaciju budu tačno određeni. Ovi uslovi, koji su određeni naučnim eksperimentima se zovu uslovi nizanja. Ako je nizanje veliko, hibridizacija se neće pojaviti, a ako je suviše malo, neki fragmenti se mogu držati zajedno čak iako nisu savršeno komplementarni. Ako je od posebnog interesa neki niz na određenoj lokaciji, fragment sa jednom stazom mogu biti vještački sintetizovani da bi se naciljala ta lokacija. Ovi fragmenti poznatog niza se zovu DNK ispipavanje. Komplementarno bazno sparivanje je suština genetičkih varijacija kojeće biti kasnije opisane.

Da bismo kvalitetnije razumjeli koliki je napredak napravljen uvođenjem DNK klasifikacije u forenzička izučavanja prethodno ćemo nekoliko riječi reći o onome što je prethodilo.

Konvencionalna krvna klasifikacija

Krv je tjelesna tekućina koja kola kroz krvne žile i osnovni je prijenosni sistem hrane i kisika u organizmu. Sastoji se od ćelijskog dijela i plazme (11).

**Struktura
molekule
DNA**



Ukupna količina krvi u čovjeku iznosi približno dvanaesti dio njegove tjelesne težine, što iznosi oko 5,5 litara za čovjeka teškog oko 70 kg.

Labaratorijska ispitivanja tragova krvi se u kriminalističkoj praksi najčešće provode sa ciljem da se utvrdi da li postoji veza žrtve sa osumnjičenim i osumnjičenog sa mjestom događaja.

Sistem ABO krvnih antigena prvi put je otkriven 1900. godine i nazvan je krvne grupe. Sastoji se od antigena koji se obilježavaju slovima A, B, O od kojih su antigeni A i B dominantni nad antigenom O. To znači da će antigen A ili B „prekriti“ antigen O ako se snjime nađu u hromozomskom paru. Ova tri antigena nalaze se u ćelijama. U serumu krvi nalaze se njihova prirodna protutijela i to tako da se, kad se u ćelijama nalazi antigen A, u serumu krvi nalazi protutijelo za antigen B, i obrnuto, kad se u ćelijama nalazi antigen B, u serumu krvi se nalazi protutijelo za antigen A. Ako se u ćelijama nalaze antigeni A i B, u serumu krvi nema nikakvih protutijela, ali će se protutijela za antigen A i za antigen B nalaziti u serumu osoba u čijim se ćelijama nalazi (slab) antigen O. Kod krvnih grupa antigeni se nazivaju aglutinogeni, a njihova protutijela u serumu krvi aglutinini. Svojsvo je aglutinina (protutijela) da kad se s odgovarajućim aglutinogenom (antigenom) dođe u bliski dodir, izazivaju neku vrstu grušanja, tzv. koagulaciju. Prema tome koji se aglutinogen nalazi u ćelijama, svi se ljudi mogu podijeliti na 4 krvne grupe, prema nazivu aglutinogena: na osobe

krvne grupe A, krvne grupe B, krvne grupe AB i na krvne grupe O (1).

Svako lice posjeduje jedan aleomorfni gen nasljeđen od oca ili jedan drugi nasljeđen od majke. Tako djeca rođena od oca BO i majke AB mogu biti:

- ili genotip BB, koji odgovara fenotipu B,
- ili genotip BO, koji odgovara fenotipu B, jer B dominira nad O;
- ili genotip AB, koji odgovara fenotipu AB;
- ili genotip AO, koji odgovara fenotipu A.

Lako se može shvatiti da jedno dijete ne posjeduje gene A i B ako oni ne postoje kod roditelja, a s druge strane oni mogu postojati kod roditelja, a da ne postoje kod djece. Isto tako, ako je jedan od roditelja OO djeca ne mogu biti sa grupom AB, a ako jedan od roditelja ima grupu AB, nijedno od njihove djece ne može biti iz grupe O. Osobe koje na hromosomskom paru imaju oba gena A ili oba gena B nazivaju se homozigoti (homojos = jednak, zigota = ćelija koja nastaje spajanjem muške i ženske spolne ćelije, tj. spermija i jajne stanice). Nasuprot tome, osobe koje na hromosomskom paru imaju uz gen A ili gen B i gen O nazivaju se heterozigoti (heteros = različit). Raspored gena na hromosomskom paru naziva se genotip, a određivanjem nečije pripadnosti krvnoj grupi A ili B ne otkriva se i genotip.

Ubrzo nakon otkrića ABO krvnih grupa otkrivena su u ćelijama još dva antigena, koji su nazvani M i N. S obzirom na prisutnost ovih antigena ljudi se dijele na tri krvne grupe; M, N i MN, s time, što su pripadnici grupe M i grupe N homozigoti, a pripadnici grupe MN heterozigoti.

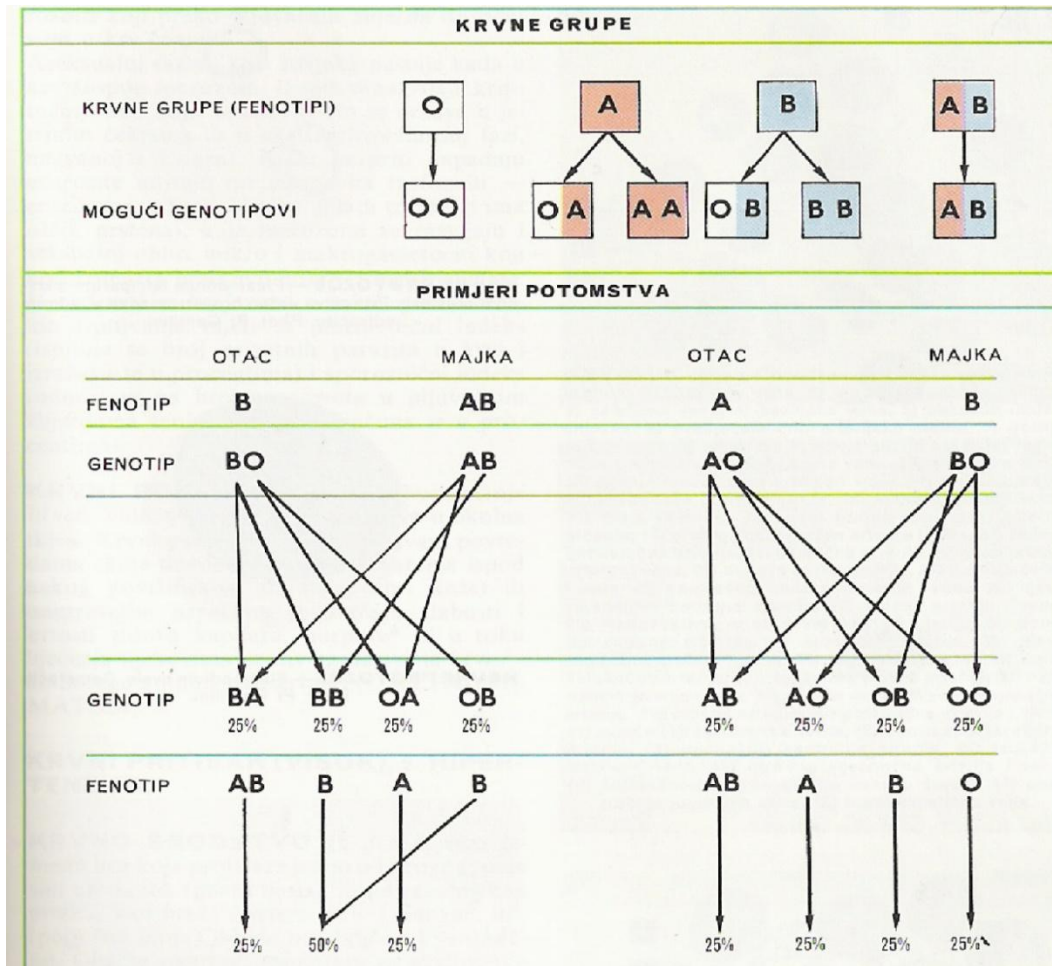
Rh faktor otkrili su 1939. godine u New Yorku Landsteiner i Wiener. Antigen je nazvan RH, prema majmunu Rhesus macacus, u čijim se ćelijama nalazi identičan antigen kao u čovječijim. Analiza je pokazala da oko 80% bijelih stanovnika New Yorka ima taj faktor, a 15% ga nema, pa je otada u upotrebi podjela na osobe Rh + i osobe Rh – , tj. na osobe koje taj antigen imaju i one koje ga nemaju. U godinama nakon drugog svjetskog rata otkriveno je da

nije riječ o jednom faktoru, tj. o jednom antigenu, već da postoji 6 standardnih antigena od kojih se 3 nalaze u jednom hromozomu. U Evropi se ovi antigeni označavaju velikim i malim slovima:

Ovo je iznešeno da bi se jednostavno pokazalo odakle su počela genetička istraživanja i da bi se jasnije ukazalo na značaj i mogućnosti savremenih metoda kao što je DNK.

C,c,D,d,E,e. Ovih 6 antigena uobičajnog su naziva podskupine Rh faktora (15).

KRATKA ISTORIJA DNK



Otkrićem Rh faktora pronađen je u stvari samo jedan od navedenih 6 antitijela i to onaj koji se označava sa D. Prema tome, ako se za neku osobu navodi da je Rh+, to znači da između šest antigena ima jedan ili dva D.

Vidljivo je da je širok diapazon osoba koje se mogu pojaviti kao eventualni izvori nekog traga, pa je stoga i neprimjenjiv u identifikaciji. On se može jednostavno primjenjivati za isključivanje ili uključivanje neke osobe kao mogućeg učesnika u nekom događaju, a vrlo rijetko i za tvrdnju da je isti učestvovao u tom događaju.

U drugoj polovici XIX vijeka Gregor Mendel, otac moderne genetike, je svojim pokusima i interpretacijom njihovih rezultata postulirao korpuskularnu teoriju nasljeđivanja: biološko ili organsko nasljeđivanje ostvaruje se putem odijeljenih, diskretnih materijalnih čestica, koje predstavljaju fizički most među generacijama živih bića. Ove čestice osiguravaju da potomci liče na roditelje po svim bitnim osobinama, dok su u isti mah i različiti. Putem tih čestica ostvaruje se ono što nazivamo nasljednošću, a to je, zapravo, pojava da se najvažnije osobine živih bića ponavljaju kroz njihova pokoljenja. Mendel

je prvi opisao pravilnosti u transgeneracijskon ponavljanju vidljivih svojstava (3).

Nekoliko godina nakon što su Mendelova otkrića otrgnuta zaboravu (1900), danski genetičar Johannsen daje nasljednim česticama – nosiocima nasljednosti naziv *geni* (3).

Godine 1944., Oswald Aver je definisao ulogu celularne komponente kao DNK (Dezoxiribonukleinska kiselina). 1953. godine Džejms Vatson i Fransis Krik su rasvijetlili strukturu molekule DNK kao dupli helix (zavojnica). Godine 1980. David Botstein i njegove kolege su prvi eksploatisali male varijacije pronađene između ljudi na genetskom nivou. Određena vrsta varijacije koju su oni koristili je nazvana RFLP (Restriksijski fragmentni dužinski polimorsim). 1984. godine dok je tragao za indikatorima bolesti u DNK, Alec Jeffreys je otkrio jedinstvenu primjenu RFLP tehnologije kao metode u personalnoj identifikaciji. Njegov metod, koji je on nazvao „DNK otisak“ (finger print) se modificirao i prilagodio za generalnu upotrebu u laboratorijama u SAD danas. Naučnici se generalno slažu da je za ovaj proces mnogo bolji i opisaniji naziv „DNK klasifikacija“ ili „DNK profiliranje“. 1986. godine Polimerazna lančana reakcija (PCR) je izumljena od strane Kary Mullisa, koji je dobio Nobelovu nagradu za hemiju upravo zbog tog njegovog otkrića. PCR više nego bilo koji drugi naučni napredak, osim možda objašnjenja strukture DNK, je promijenio lice molekularne biologije. RFLP i PCR tehnologije zajedno formiraju temelje forenzičke DNK klasifikacije.

Treba se naglasiti da DNK analiza, uopće, ima mnogo veću upotrebu i dužu istoriju nego sama identifikacija uzoraka iz kriminalnih scena. Kao što je i pomenuto, inicijalna primjena je bila prisutna u potrazi za genima koji upućuju na bolest. Usljed tih napora, velikim dijelom, vrlo brzo su se katalogizirale sve informacije koje su sadržane u ljudskom genetičkom kodu. To je već dovelo do identifikacije gena koji su uključeni u bolesti kao što su muskulaturna

distrofija i različiti genetički prouzrokovani tumori. Jedna specifična primjena je prisutna u posmatranju transplanata koštane srži kod pacijenta koji boluju od leukemije. U ovoj primjeni, klasifikacija je mnogo brža i bez grešaka nego druge metode klasifikacije krvi. Kada krv pacijenta pokazuje uzorak davaoca, transplatacija je uspješna. Pored toga, da bi se unaprijedile i poboljšale dijagnoze, terapija za neke od tih bolesti, aktuelno premještanje gena je već u razmatranju.

Prva legalna područja upotrebe analize DNK su bile imigracije i utvrđivanje očinstva. Spajane su porodice i u SAD i vani samo kad bi DNK testovi dokazali identitet djeteta ili potomka. Slučajevi očinstva, koji su se tradicionalno provodili analizom krvi sada imaju opciju da se mogu rješavati i preciznijim DNK testovima. Poznavanje kako DNK povezuje porodicu – srodnike, može dati veoma dragocijene zaključke o identitetu osoba koje su eshumirane iz masovnih grobnica. Posmrtni ostaci, se mogu identifikovati klasifikacijom potencijalnih roditelja i/ili potomaka i određivanjem vjerovatnoće bliske genetske veze između njih.

Zbog svoje relativne stabilnosti u poređenju sa drugim biološkim naukama, DNK je postala veoma važan segment u studijama antropologije i drevne istorije. Na Univerzitetu Minesota istraživači su provodili istraživanje na papiru 1100 godina starog mumificiranog Chirbaya indijanca i pronašli su egzaktnu vezu sa DNK bakterije uzročnika tuberkuloze, što znači da je isti umro od tuberkuloze.

Prva forenzička upotreba DNK analize je bila u Engleskoj 1986. godine. U malom engleskom selu dvije dvije djevojke su silovane i zadavljene na gotovo istom mjestu 1983. i 1986. godine. Lokalni mladić je priznao jedno ubistvo, ali je uporno poricao drugo.

U jesen 1984. godine Alec Jeffreys razvio je prvu metodu za analizu DNK koja se mogla primjeniti u forenzici. Analiza DNK pokazala je da taj mladić nije počinio niti jedno ubistvo. Tom prilikom analizirano je

gotovo 3000 mještana iz okolice, ali niti jedan profil nije odgovarao. 1987. godine otkriveno je počinitelj oba ubistva (4).

DNK FINGERPRINTING

Polu stoljeća nakon revolucionarnog otkrića molekularne strukture DNK, kao osnovnog nosioca nasljedne informacije molekula DNK je promovirana u najčešće spominjanu i korištenu organsku supstancu u širokom dijapazonu naučnih disciplina. Jedan od tih modela je forenzičko DNK testiranje, poznato još kao *DNA fingerprinting*.

DNA typing u forenzične svrhe bazira se na osnovnim fundamentalnim principima i koristi skoro iste tehnike koje se rutinski koriste u medicinskoj dijagnostici, kao i u različitim populaciono genetičkim istraživanjima. Ove molekularne metode se baziraju na analizi osnovnog svojstva živih bića – molekularnom biodiverzitetu. Kao rezultat zajedničkih osnovnih postulata danas su standardne molekularne i populacione genetičke tehnike, uz neznatne modifikacije, pronašle svoju primjenu u dobijanju i prezentaciji konačnih rezultata u oblasti forenzičkih znanosti. Osnovna karakteristika ovih metoda je da se na osnovu malih količina DNK prisutnih u posmatranom biološkom tragu može, sa visokim stepenom sigurnosti, utvrditi genetički identitet osobe koja je taj trag ostavila za sobom.

DNK profiliranje doživjelo je svoju naučnu promociju u radovima engleskog genetičara Aleca Jeffreysa. On je opisao postojanje DNK sekvenci, jasno lociranih u humanom genomu, koje se ponavljaju u sukcesivnom nizu. Također, potvrdio je da broj tih repetitivnih jedinica može individualno varirati u posmatranom populacionom uzorku. Usavršavanjem metoda ispitivanja dužinskih varijacija ovih repetitivnih DNK sekvenci Jeffers je kreirao mogućnost sprovođenja humanog DNK identifikacijskog testiranja.

To je ujedno predstavljalo i početak primjene širokog spektra molekularnih markera u oblasti forenzičkog DNK profiliranja. Repetitivne sekvence, koje čine 20 – 40 % genoma svakog sisara, pokazale su se kao visoko informativne u tom smislu. Vremenom su prvo korišteni tzv. VNTR lokusi (*Variable Numbers of Tandem Repeats*) potisnuti primjenom lako dostupnih i kraćim repetitivnim STR (*Short Tandem Repeats*) sekvencama.

Pored strukturne razlike ovih markera (tipični VNTR region sastoji se od 500 do 1000 baznih parova u okviru kojih se ponavljaju tandemske repetitivne jedinice u dužini od 16 – 35 parova, dok se STR lokusi baziraju na prisustvu sekvenci dužine 2 – 5 baznih parova koje se ponavljaju određen broj puta) i pored toga što dijapazon variranja VNTR markera je znatno veći, jednostavnost i brzina samog procesa, kao i mogućnost simultanog manipuliranja sa većim brojem markera, raštrkanih po cijelom humanom genomu, promovirale su STR lokuse u danas najčešće korištene identifikacione molekularne markere. Simultana opservacija većeg broja markera smanjila je teorijsku vjerovatnoću postojanja dvije individue sa identičnim ustanovljenim DNK profilom (sa izuzetkom jednojajčanih blizanaca), npr. 15 STR lokusa, zastupljenih u *PowerPlex* kitu za kavkazoidno stanovništvo, iznosi $1/1,83 \times 10^{17}$. To znači da bi ljudska populacija morala brojati 18.300.000.000.000.000. individua da bi zadovoljila matematički model u kojem bi takva podudarnost bila vjerovatna.

Pored VNTRs i STR nuklearnih markera bitno je spomenuti i hipervarijabilne regione mitohondrijalne DNK, kao i Y vezane STR i bialelne markere. Modeli nasljeđivanja ovog genetičkog materijala po isključivoj materijalnoj, tj. paternalnoj liniji čine ih izuzetno pogodnim prilikom identifikacije individua na osnovu bliskih srodnika u slučajevima odsustva jedne od navedenih linija. Posebna primjena Y vezanih markera trebala bi biti ključna u

slučajevima silovanja, s obzirom da se tako izbjegava mješanje profila uzorka žrtve i napadača, koje su se dobijale prilikom analize autosomalnih hromozoma, a koje su otežavale krajnu interpretaciju rezultata. Bitno je napomenuti da su se ovi markeri promovirali i kao moćni pokazatelji u različitim populaciono – genetičkim i evolucionim studijama koje nisu zaobišle i naše prostore, a zanimljivo je i to da su neki od njih, konkretno STR markeri, pokazali izuzetno podobni za eventualnu forenzičku upotrebu i u malim, relativno izolovanim populacijama.

U velikom broju zemalja formirane su baze podataka, koje obuhvataju sakupljene STR profile policiji zanimljivih individua. S obzirom na stepen globalizacije samog procesa, tj. na potencijalno stvaranje globalne mreže takvih baza podataka, sve novonastale baze su u biti, manje – više, uniformisane. U USA FBI je utemeljio *Combined DNA Indexing System* (CODIS), koji je opće prihvaćen u cijelome Svijetu, sa 13 STR lokusa. U Evropi je to *European Network of Forensic Scientist Institutes* (ENFSI) koji se bazira na 7 lokusa. Interpol zahtjeva minimalno 6 lokusa kao standard za unos podataka u njihovu bazu, dok je u Južnoj Americi predložen *GITARD (Grupo Iberoamericano de Trabajo en Analisis de DNA)* standard koji obuhvata 6 lokusa. S obzirom na tempo razvoja ove oblasti svi ovi sistemi su zamišljeni kao izuzetno fleksibilni i lako se prilagođavaju situacijama nastalim otkrivanjem novih markera i njihovim inkorporiranjem u kreirane baze.

TIPOVI DNK

U dosadašnjim DNK analizama korištena su dva tipa DNK, i to mitohondrijalna (mtDNK) i nuklearna DNK.

Nuklearna DNK

Ljudska ćelija, kao što je rečeno, sadrži 23 para hromozoma. Svaka osoba ima dvije kopije istog hromozoma, je DNK dolazi od oca, a druga od majke. Različite oblike istog gena ili indikatora nazivamo alele. Najjednostavnije različitosti alela posmatrao je Mendel, 1866, otac moderne genetike. On je primjetio da grah može biti zelen ili žut, duguljast ili okruglast i da se ovi tragovi mogu pratiti kroz mnoge generacije. Zeleno i žuto su allele istog gena, a okruglasto i draguljasto su allele nekog drugog gena.

Kao primjer za različite allele istog gena kod ljudskih bića mogu nam poslužiti krvne grupe. Ako su allele na određenoj lokaciji (lokusu) isti na oba hromozomska para, situacija se zove homozigot. Ako s druge strane postoji mala razlika na specifičnom lokusu, tako da su na svakom hromozomu prisutne različite allele, situacija se zove heterozigot.

Jedan par 23 hromozoma sadrži informacije koje određuje pol. Ovi su hromozomi označeni prije prije slovima nego brojevima, odnosno x i y. Muški pol ima jedan x i jedan y hromozom (xy), a ženski ima dva x hromozoma (xx). Ženski jajnici sadrže samo x hromozome, dok muška sperma može sadržavati x i y hromozome. Prema tome, pol je određen komponentom s očeve strane. Informacije sadržane u polnim hromozomima toliko su različite koliko to i vizualno izgleda drugačije. Pol se može odrediti testiranjem DNK i ponekad je veoma koristan izvor informacija u forenzičkoj istrazi (4).

GENETIČKI MARKERI NUKLEARNE DNK

Varijabilni broj tandemskih ponavljanja (VNTR¹⁰⁸)

VNTR su područja DNK koja uključuju hiljadu do nekoliko hiljada baznih parova.

¹⁰⁸ Variable Numbers of Tandem Repeats

Ovo nisu geni, jer ne proizvode bilo kakav produkt, što znači da nisu ni odgovorni za bilo kakvu primjetnu genetsku osobinu. Tipičan VNTR je stvoren od velikog broja jedinica koje se tandemski ponavljaju. Veličina svake jedinice u različitim VNTR koji se upotrebljavaju za forenzičke analize varira od 8 do 80 baznih parova (obično 15 – 35). Iako je veličina jedinice skoro konstantna za dato VNTR mjesto, broj ponavljanja je visoko varijabilna veličina, tako da ponekad postoje stotine ili čak više različitih dužina. Upravo ova velika varijabilnost dužine je ono što čini VNTR tako korisnim za forenzičke analize.

Tehnike za određivanje dužine određenog VNTR su u svojoj suštini jednostavne. Prvo se DNK ekstrahuje iz materijala i potom analizira. Tada se izlaže dejstvu enzima koji presjeca DNK na svakoj tački gdje se pojavljuje određeni niz. Tako naprimjer, enzim *Hae III* pronalazi niz GGCC (CCGG u suprotnom smjeru) i presjeca obje strane između G i C. Na ovaj način DNK se presjeca na milione dijelova čije su veličine određene odstojanjem između GGCC nizova. Stvoreni fragmenti migriraju u zavisnosti od njihove veličine u električnom polju, a proces se naziva elektroforeza. Odvojeni fragmenti se potom hemijski tretiraju kako bi se DNK razdvojio u pojedinačne lance.

Denaturisani fragmenti se nanose direktnim kontaktom na najlonsku membranu na koju se i nalijepe. Membrana se tada isisava sondom, odnosno kratak komad DNK koji je komplementaran određenom fragmentu duž miliona na membrani. Zbog specifičnih pravila baznog sparivanja DNK (A sa T i G sa C), sonda se pronalazi i prikači odgovarajućem fragmentu, onom gdje je komplementarne baze odgovaraju onima u sondi. Oni koji se ne vezuju sa fragmentom DNK se ispiru. Sondama se dodaje oznaka koja služi da signalizira njeno prisustvo. Ovo je otkriveno fotografskim filmom koji je smješten u kontaktu sa najlonskom membranom. Originalno, oznake su bile radioaktivni atomi što izlažu film na položaju koji odgovaraju poziciji sonde na

membrani. Međutim, sada se mnogo češće koristi luminescentno otkrivanje. Membrana je prekrivena sa matreijalom koji se mijenja u svjetlo pomoću enzima pričvršćenog na sondu. To svjetlo se hvata pomoću filma kroz period od nekoliko sati (4).

Preciznost mjerenja veličine fragmenata je takva da VNTR-i koji se razlikuju u jednoj ili dvije ponavljane jedinice se obično ne mogu razlikovati. Iz tog razloga, slične veličine fragmenata se grupiraju u odjeljenja (binove). Na ovaj način, ukupan broj VNTR se reducira od stotine na dvadeset do trideset VNTR područja. Glavni razlog što je VNTR bio koristan i još je uvijek za neke svrhe, je njihova jačina i postojanje velikog broja područja po jednom mjestu. Od prednosti VNTR-a su slijedeća:

Tehnike su dobro utvrđene i široko su u upotrebi,

Uvijek je testove prihvatio pravni sistem, veliki broj područja olakšava analizu „miješanih uzoraka“.

Od ograničenja možemo istaći:

Osjetljivost tehnike, upošteno se zahtjeva 50NG ili više DNK materijala da bi se ostvarili jasni rezultati,

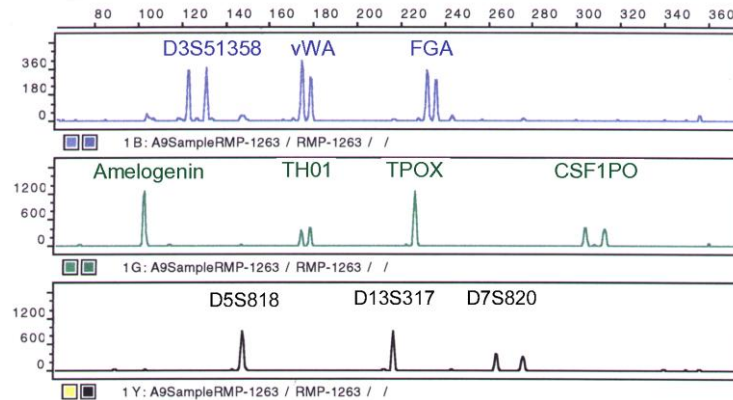
Proces je vremenski dugačak. Potrebno je nekoliko dana (ili sedmica ako se koriste radioaktivne probe) da se proces kompletira,

Broj validnih lokusa je ograničen,

Veliki fragmenti nisu pogodni za upotrebu sa degradiranim DNK uzorcima koji se ponekad pojave u forenzičkom radu,

Neophodnost biniranja predstavlja komplikaciju a ponekad i poteškoću u prezentaciji,

Zbog malog broja validnih lokusa, VNTR-i su ograničene vrijednosti u razlikovanje (4).



Kratka tandemska ponavljanja (STR)¹⁰⁹

STR su slični VNTR i opći principi korištenje su im potpuno isti. Razlikuju se od VNTR-a zbog toga što imaju manje jedinice ponavljanja, od dvije do sedam baza i manja je ukupna veličina STR, obično manje od 500 baza. Manja veličina znači da se može koristiti i za početni materijal veoma malih količina, manjih od jednog ng DNK. Također, dozvoljava analizu degradirane DNK, DNK koja se rastavljena na kratke dijelove. Takva degradirana DNK često se ne može analizirati analizom VNTR-a.

Upotreba PCR dopušta upotrebu veoma male količine DNK koja bi se mogla naći na poštanskoj markici, cigaretama ili šoljici od kafe, za amplifikaciju, kako bi se proizvele dovoljne količine fragmenata DNK za analizu. Amplificirani produkti se razvijaju elektroforezom kao što je opisano za VNTR fragment. Za razliku od VNTR-a, kod STR amplificira se samo željna regija. Manja veličina fragmenta STR i upotreba više diskriminirajućeg sistema separacije dozvoljava identifikiranje svih područja na lokusu. Prema tome, eliminira se zahtjev za binovima. Postoje, međutim, varijacije koje povećavaju diskriminatornu snagu sistema ali mogu proizvesti probleme prilikom rješavanja (4). U forenzičkim istraživanjima razdvojeni STR fragmenti se generalno otkrivaju upotrebom dvije metode:

- Jedna DNK metoda koristi sklonost srebra da se vezuje sa DNK. Cijeli gel se oboji srebrom, ali zbog velike količine DNK

amplificiranih fragmenata oni se jasno razlikuju od više razblažene pozadine.

Drugi, preovlađujući metod zahtjeva da neki od komponenti (početnice ili nukleotide) koji se koristi tokom amplifikacije sadržava fluorescentne oznake koje su ubačene u STR fragmente sakupljene tokom amplifikacije.

Slijedeća, fragmentska separacija je instrument koji se koristi za otkrivanje pozicije i separiranja odvojenih fluorescentnih produkata. Tokom elektroforeze u laboratorijama se koristi vremenska detekcija.

STR lokusi koji se izabiru za forenzičku upotrebu obično imaju 7 do 30 različitih alela. Uglavnom je moguće analizirati uzorak DNK u mnogim STR lokusima. Razvijeni su sistemi tako da dozvoljavaju amplifikacije 3 – 16 lokusa odjednom. Mnoge forenzičke laboratorije danas imaju instrumente koji razlikuju različite fluorescentne boje koje se koriste za označavanje određenih lokusa (4).

Poredeći STR sa VNTR može se reći da STR i nema nedostataka a od prednosti možemo istaći:

Proces se može koristiti i sa degradiranim uzorcima, kao i sa kratkim fragmentima DNK,

PCR proces dozvoljava analizu ekstremno malih količina DNK,

Potencijalni broj lokusa je veoma veliki što je naročito značajni za identifikaciju lica kada su uključene braća, sestre i drugi rođaci kao što je slučaj u identifikaciji žrtava masovnih grobnica.

Proces je brz.

Čitav proces se može automatizirati.

¹⁰⁹ Short Tandem Repeats

MITOHONDRIJALNA DNK I Y – HROMOSOM

Mitohondrijalna DNK se koristi kao efikasna tehnika za forenzičku identifikaciju gdje je postojeći uzorak nedovoljan ili neodgovarajući za nuklearnu analizu. Mitohondrije se posmatraju kao „snaga ćelije“ i one su vitalne za korištenje oksigena koji generira energiju potrebnu za život ćelije.

Nalaze se izvan nukleusa u citoplazmi ćelije. Mitohondrija sadrži svoju vlastitu DNK na nekoliko načina. Prvo, manja je nego nuklearna DNK. Drugo, mitohondrijalna DNK se isključivo nasljeđuje od majke, dok se nuklearna DNK nasljeđuje podjednako od oba roditelja. Ovo materijalno nasljeđe postoji usljed činjenice da sve mitohondrije dolaze iz jajne ćelije. Pošto mitohondrijalna DNK potomaka dolazi direktno iz majčine strane djetetu, tako služi kao oznaka identiteta za majčine srodnike.

Mitohondrijalna DNK ima slijedeće prednosti:

- Uzorci koji nisu pogodni za nuklearnu DNK zbog svoje veličine mogu se analizirati upotrebom mitohondrijalne DNK.
- Mala molekula mitohondrijalne DNK se ne degradira tako brzo kao nuklearna DNK.
- Zato što se prenošenje mitohondrijalne DNK vrši od majke svojoj djeci, ovo je veom koristan način u traganju za porodičnom lozom.
- Zato što se većina mitohondrija pronađu samo jednom u bazi podataka, diskriminaciona snaga je veća nego jedan jedinstveni nuklearni lokus.
- Također, možemo iznijeti i slijedeće nedostatke mitohondrijalne DNK:
- Pošto su svi nasljednici kroz žensku liniju identični, ovo se ne može koristiti za razdvajanje srodnika sa majčine strane.
- Pošto postoji veoma slaba, a ako ne i nikakva mogućnost pojave osobine u potomstvu koja se ne nalazi u roditelja (rekombinacija) diskriminaciona snaga

sistema je ograničena veličinom baze podataka.

Prisustvo više od jednog mitohondrijalnog tipa u jednoj ćeliji može komplikovati analizu.

Diskriminaciona snaga je ograničena veličinom baze podataka.

Y – hromosom je u stvari hromozom koji se nalazi u jednoj kopiji po ćeliji i postoji samo kod muških srodnika. Pokazuje očinsko naslijeđe koje se prenosi od oca svakom sinu. Kao i mitohondrijalna DNK i nuklearna Y DNK je veoma bitna za rekonstrukciju familijarnih veza. U tom slučaju, postojeći materijal od muške osobe se može upoređivati sa njegovim bratom, ocem, djedom od oca ili rođacima od oca u svrhu identificiranja. Njihova efikasnost u ovakvim studijama se proširuje i na pitanja geografskog porijekla. Nuklearna DNK ima transmisiju muškarac muškarcu, te može oslikavati porijekla y hromosoma (4).

Također ističemo neke prednosti i nedostatke y hromosoma:

Pošto se u y hromosom prenosi na sve muške srodnike, veoma je koristan u traganju za rodbinskim vezama između muških pripadnika.

Zbog specifičnog nasljeđivanja i odsustva rekombinacije može se koristiti i u određivanju veza između osoba sa određenim geografskim porijeklom.

Od nedostataka ističemo da nemogućnost rekombinacije među lokusima ograničava diskriminacionu snagu sistema veličinom baze podataka.

OSNOVNE FAZE PROCESA DNK ANALIZE

Da bismo kvalitetno razumjeli šta se u stvari dešava od momenta kada se neki trag biološkog porijekla pronađe pa do momenta kada saznamo kome on pripada, moraćemo prorađiti procedure DNK analize.

a. Prikupljanje uzoraka

Sakupljanje „DNK dokaza“ sa mjesta zločina ili prilikom rutinskog utvrđivanja spornog očitstva, mora biti po precizno standardiziranim procedurama sa jasno definisanim odrednicama koje se obligatno i dosljedno poštivaju. To je jedini način kojim se može osigurati kvalitetna detekcija validnih DNK profila u sudskim procesima. Razvoj modernih metoda omogućio je analiziranje količinski deficijentne i visoko degradirane DNK u biološkim tragovima, ali je sa druge strane obavezao na izuzetne mjere opreza prilikom kontakta i manipulisanja tim tragovima (zbog moguće kontaminacije). Prikupljanje, sortiranje i transport ovakvih bioloških tragova su početne, ali i najčešće i ključne faze uspješnog sprovođenja DNK ekspertize.

b. Laboratorijsko markiranje uzoraka

Sam postupak prilikom procesiranja uzoraka i sprovođenja DNK analize varira u zavisnosti o velikom broju parametara, ali osnovni postulati ove metode ostaju isti u skoro svim svjetskim laboratorijama, bez obzira na njihovu namjenu, metodološki pristup ili čak tehnološke performanse samoga procesa. Metode markiranja variraju od laboratorija do laboratorija. Biološki tragovi se po prijemu u laboratorij vizuelno analiziraju, klasificiraju na sporne i nesporne, a zatim im se dodijeli laboratorijski kod koji se sastoji od karaktera koji opisuju da li se radi o spornom, tj. nespornom biološkom tragu i ako ih ima više u aktuelnom slučaju označavaju se rednim brojem. Također, može im se dodijeliti i broj slučaja u tekućoj godini, kao i neke druge oznake. U institucijama koje mjesečno procesiraju veliki broj uzoraka, u cilju optimalnog praćenja ulaznih i izlaznih podataka koristi se standardno kodiranje uzoraka dodjeljivanjem bar koda za svaki pojedinačno. Kao neophodan instrument uspostavi se informaciona mreža – LIM sistem, koji obezbjeđuje automatsko

pretraživanje računarske baze podataka i potpunu automatizaciju procesa markiranja u svakoj fazi procesa. U laboratorijama sa manjim prosječnim brojem uzoraka i ograničenim budžetom, ovaj proces se odvija manuelno kroz radne faze, s tim što se u završnoj fazi podaci također računarski arhiviraju.

c. Ekstrakcija ukupne genomske DNK

Slijedeći korak je ekstrakcija ukupne genomske DNK. U najvećem broju slučajeva moguće je korištenje standardne organske procedure, koja se optimizira u zavisnosti o prirodi biološkog traga i vrlo je efikasna. Osnovno optimiziranje organske ekstrakcije ukupne genomske DNK bazira se na prilagođavanju količina digestivnog pufera kao i proteinaze K u koraku digestije, a samim tim i zapremina fenola i hlorofom/fenol/alkohol solucije u narednim fazama. Također, optimizacija je poželjna i u procesu precipitacije i eventualnog koncentriranja uzorka. U slučaju kada se radi o biološkom tragu, koji po svojoj prirodi sadrži jako male količine DNK ili je prisutna DNK izuzetno fragmentirana neophodno je prilagoditi procedure precipitacije. Najčešće se koristi tzv. *centrikoniranje* uzoraka koje podrazumjevaju upotrebu membranskih sistema na kojima se DNK koncentriše i na kraju se iz tih eluira u tubice. U tim slučajevima najčešće se primjenjuje i metoda vakumskog koncentrisanja uzorka koja podrazumjeva odstranjivanje viška tečnosti iz uzorka pod uticajem kombinovanog dejstva vakumske i centrifugalne sile. U ovom procesu neophodnim se javlja optimalizacija više procedura ekstrakcije, kao standardnih laboratorijskih, tako i komercijalnih, jer su se neke od njih pokazale pogodnijim za određeni tip uzorka. Postojanje više optimiziranih procedura omogućava izbor najbrže i najjednostavnije, ali i najjeftinije, u datom slučaju. Proces ekstrakcije se odvija pretežno u luminarima, prethodno prebrisanim razblaženom 20%

komercijalnom varkinom i izloženom UV zračenju u odgovarajućem trajanju. Pipetori, pipetni nastavci kao i sva aparatura koja se koristi u ovom procesu, također se prethodno pripreme i dekontamiraju od potencijalne strane DNK. Pored opisanih priprema prostora i instrumentarija, u cilju izbjegavanja kontamiranja uzoraka, u toku procesa neophodno je da DNK analitičar koristi zaštitna sredstva koja imaju dvojaku ulogu: sprječavanje kontaminacije uzoraka i zaštita samoga analitičara od potencijalno agresivnih hemikalija. Standardizacija ove faze je ključna za dobijanje krajnjih rezultata.

d. Kvantifikacija

Nezaobilazna procedura koja ulazi u sastav cjelokupnog procesa u svim eminentnim laboratorijama je kvantifikacija DNK. Ovaj uzorak se koristi kod spornih tragova, posebno onih za koje se pretpostavlja da sadrže relativno male količine degradirane DNK. U aktuelnim okolnostima najraširenija je komercijalna metoda Quantiblot koja se bazira na hibritizaciji izolirane humane DNK sekvence u dostavljenoj probi sa humanim sekvencama prisutnim u biološkom tragu, tj. uzorku. Ako izostane pozitivna detekcija tokom ovog procesa u najvećem broju slučajeva radi se o odsustvu humanog nasljednog materijala u uzorku. Ipak, dokazano je da ponekad uzorci koji su negativno reagirali u ovom tipu kvantifikacije uspješno budu profilirani. Ta činjenica sugerira upotrebu koraka kvantifikacije u cilju optimizacije naredne faze amplifikacije, a ne odlučivanja o nastavku ili terminaciji samoga procesa. U posljednje vrijeme Real time PCR metoda se pokazala mnogo pouzdanijom jer kao krajnji rezultat ne javlja se samo dokaz o kvantitativnom prisustvu, tj. odsustvo humane DNK, već se dobijaju i podaci o stvarnom stanju molekule i o prisustvu potencijalnih inhibitora procesa amplifikacije i detekcije. U skoroj budućnosti ova metoda bi mogla u

potpunosti da zamijeni do sada poznate konvencionalne metode. Međutim, ovaj proces neće ići tako brzo s obzirom na visoku cijenu pojedinih dijelova opreme koja je neophodna.

e. Amplifikacija (umnožavanje) ciljanih DNK markera

Proces amplifikacije omogućava umnožavanje ciljanih regiona DNK molekule. Prvi puta je opisan u radovima Mullisa iz 1987. godine, a značajno modificirana uvođenjem TAQ polimeraze u sami proces. Optimizacija ovog procesa se prvenstveno bazira na zapreminu uzorka koji se koristi u PCR reakciji i na količini enzima TAQ polimeraze, ali i na optimizaciji broja ciklusa u samoj reakciji. Tako se za uzorke koji su u procesu kvantifikacije slabo detektovani, tj. koji su prikazali prisustvo malih količina degradirane DNK predstavlja reakcija sa većom količinom uzorka i TAQ-a i koristi se duži protokol. Ako se pretpostavi jako prisustvo PCR inhibitora, onda se uzorak dekoncentrira i koriste se kraće PCR protokoli. S obzirom na prirodu STR markera oni se često koriste prilikom profiliranja i utvrđivanja genetičkog identiteta kako individua tako i bioloških tragova. Odabir kita za ovaj proces u laboratoriji, rukovodi se činjenicom da potencijalno zastupljeni lokusi u korištenom multipleksu omogućavaju korespondenciju i razmjenu rezultata sa skoro svim postojećim svjetskim bazama podataka.

Zato je za amplifikaciju i detekciju ciljanih STR sistema pogodno je korištenje multipleks sistema, koji podržavaju simultantnu amplifikaciju većeg broja lokusa. Ovako inkorporirani kompleksi prajmera omogućavaju analizu ponekad i 16 lokusa nakon pojedinačne amplifikacijske reakcije. Prije postavljanja PCR reakcije steriliše se prostor koji se koristi sa 10% rastvorom komercijalne varkine, te se izloži dejstvu UV zraka u trajanju od 20 – 30 minuta. Nakon

ustrojenja „DNA – free“ uvjeta pristupa se postavlja PCR reakcije, koja se optimizira u skladu sa prirodnom uzoraka i rezultatima kvantifikacije. Tako pripremljeni uzorci postavljaju se u PCR *thermocycler* instrument u kojem se programira odgovarajući protokol reakcije.

f. Detekcija rezultata amplifikacije

Nakon amplifikacije slijedi faza detekcije koja se odvija na nekoj od analitičkih mašina, te se upotrebom različitih softvera, u određenim fazama procesa, generiraju konačni genetički profili. Detekcija, kao finalna faza procesa utvrđivanja genetičkog identiteta osobe ili biološkog traga je automatizovana procedura, koja je najviše podložna promijenama i učestalim inovacijama.

g. Statistička analiza rezultata

Tipovi statističke analize rezultata profiliranja, koji se obično predstavljaju tabelarno, variraju u zavisnosti o slučaju. Ipak, statističke procedure su jasno opisane za sve potencijalne mogućnosti, bilo da se radi o standardnom utvrđivanju očinstva ili identifikaciji parcijalnog profila ili čak o statističkoj analizi mješanih bioloških tragova. Krajnji rezultati se prezentiraju u završnom izvještaju koji se u biti sastoji od uvodnog dijela sa osvrtom na kratku istoriju uzorka, segmenta u kojem se navode korištene metode, te paragrafa u kojem se tabelarno prikazuje analizirani profil i rezultati statističke analize i na kraju zaključka koje donosi stručno lice na osnovu predočenih činjenica. Konačna formulacija dobivenih rezultata i kreiranje jasne i nekomplicirane forme izlaznog dokumenta, baziranog na egzatnim činjenicama, znatno olakšava prezentaciju rezultata DNK analize kako na sudu tako i u sklopu kompleksnog forenzičnog izvještaja.

h. Obrazovanje DNK profila

Vrijednost je DNK analize što omogućuje „praktično“ dokazivanje osobe kojoj pripada određen biološki trag. To znači da je, primjerice, između tri osobe krvne grupe A moguće odrediti kojoj osobi pripada krvna mrlja u kojoj je također otkriven antigen A. Dosadašnjim metodama ovo nije bilo moguće razlučiti, već se dopuštala mogućnost da krvna mrlja može pripadati svakoj od te tri osobe.

Puna vrijednost DNK metode vidi se i u identifikaciji ostalih bioloških tragova (sline, dlake, sperme) i uzoraka tkiva (komadići kože, mišića, kosti, zuba ...). Analizom ovih uzoraka moguće je također „praktično“ dokazati identitet osobe kojoj pripadaju, što klasičnim metodama nije bilo moguće. Tako je dosadašnjim metodama bilo moguće samo odrediti krvnu grupu iz spermija, ali ne i odrediti osobu od koje spermiji potiču. Za kosu (dlake) također je bilo moguće odrediti morfološke osobine dlake, kao i krvnu grupu, ali opet na osnovu toga nije bilo moguće sa sigurnošću odrediti osobu kojoj pripada ili sa sigurnošću pojedinu osobu isključiti. Slično je i sa analizom tragova krvi (15).

U većini kriminalističkih slučajeva ispituje se da li je DNK izolirana iz biološkog traga na mjestu zločina identična DNK osumnjičene osobe. Dva uzorka DNK potiču od iste osobe samo ako se poklapaju u svim analiziranim lokusima.

Imamo slučajeva kada nije dostupna nesporna DNK osobe čiji se identitet želi utvrditi, provodi se analiza DNK njenih roditelja ili djece, kao što su slučajevi identifikacije žrtava rata iz masovnih grobnica.

Ova metoda se koristi kod utvrđivanja očinstva, kao i kod kaznenih djela, utvrđivanjem počinitelja ili žrtve, te kod identifikacije žrtava masovnih katastrofa, kao i ostatka poginulih vojnika i civila u ratnim sukobima (11).

OBRADENI SLUČAJEVI PUTEM DNK ANALIZE

Primjer 1: Monstruozno silovanje i ubistvo H.Ć. iz Visokog 2005. godine

U malom selu Gornja Vratnica, općina Visoko, 12. februara 2005. godine odjeknula je stravična vijest. Tog poslijepodneva pronađeno je beživotno tijelo pobožne bošnjakinje H.Ć. (1949.) od strane njene sestre G.S. Odmah je obaviještena policija PU Visoko, mjesto događaja obezbijeđeno, te je formirana uviđajna ekipa inspektora i krim. tehničara MUP-a ZE – DO kantona i tužioca Kantonalnog tužilaštva Zenica. Uviđaj je započeo u večernjim satima (20,30 sati). Tijelo je pronađeno u dnevnoj sobi na sredini, nago, djelimično prekriveno jorganom i dekama, nageta na desnom boku, polusavijenih nogu, lijeva ruka prebačena prema naprijed u visini lica, desna ruka polusavijena, šake skupljene u pest, a po čitavom tijelu i glavi vidljivi su krvavi i plavi podljevi koji najvjerojatnije potiču od udaraca tupim predmetom. Po cijeloj sobi nalazili su se tragovi krvi. Na podu pored leša pronađeno je rublje i odjeća na kojima su bili vidljivi elementi nasilja time što je ista isparana i bez dugmadi, sa tragovima crvenkaste tečnosti koja svojim izgledom asocira na krv. Na plafonu dnevne sobe, vitrini i televizoru, također su bile vidljive prskotine krvi.

Po nalogu Kantonalnog tužilaštva Zenica, tijelo je preveženo u prosekturu Gradskog groblja Visoko radi vršenja detaljnog pregleda i obdukcije leša, te utvrđivanja uzroka smrti.

15.02.2005. godine izvršen je vanjski pregled i obdukcija od strane obducenta leša H.Ć. kojom prilikom je utvrđeno da je smrt nasilna, te da je nastala usljed ugušenja. Ugušenje je posljedica obostranog serijskog prijeloma rebra sa pomakom. Pored navedenog, na tijelu H.Ć. je konstatovano više mehaničkih povreda u vidu oguljotina, kao i preloma, gdje je osim navedenog serijskog prijeloma rebra

konstatovan i prijelom lijeve jagodične kosti, kosti gornje vilice, te prijelom nosne kosti. Isto tako, pregledom vanjskog polnog otvora konstatovane su povrede u vidu defloracije, raskida i krvnih podliva, a krvni podlivi su konstatovani i oko vanjskog ušća maternice. Također, obducent je konstatovao da je leš star 5 dana, tj. da je H.Ć. ubijena 11.02.2005. godine (ta činjenica je istragu odvela u krivi smijer). Istražitelji su operativnim radom na terenu došli do mogućeg počinioca, međutim, osumnjičeni Š.M. star 24 godine na dan 11.02.2005. godine ima čvrst alibi. Daljnjim radom došlo se do saznanja da je H.Ć. zadnji put viđena živa 05.02.2005. godine od strane službenika elektrodistribucije, a da je dana 08.02.2005. godine isti službenik dijelio račune za struju, te je došavši do H.Ć. zatekao ulazna vrata otvorena 15 cm, a pošto se H.Ć. na poziv nije javljala isti je ubacio račun i otišao. Na osnovu toga istržitelji izvode zaključak da H.Ć. u vrijeme podjele računa nije bila živa, te je 19.02.2005. godine ponovo priveden osumnjičeni Š.M., lišen je slobode i isti je priznao izvršenje krivičnog djela ubistva i silovanja:

„Š.M. je dana 06.02.2005. godine oko 04,00 sati nakon što je napustio kuću H.Š., gdje je boravio kao učesnik oproštajne večeri povodom odlaska na osluženje vojnog roka njegovog sina H.A., krećući se putem koji prolazi pored kuće H.Ć. ušao u dvorište, a zatim na ulazna vrata u hodnik kuće H.Ć., gdje je istu odmah po ulasku fizički napao zadavši joj više udaraca zatvorenom pesnicom u predjelu glave i tijela, prisiljavajući je fizičkom snagom, na način što ju je ugurao u prostoriju dnevnog boravka gdje je ista i spavala, te joj ponovo zadaje više udaraca u predjelu tijela i glave. H.Ć. zbog zadobijenih povreda najvjerojatnije pada u komu što Š.M. koristi i sa iste upotrebom fizičke snage trga garderobu učinivši je nagom, potom svlači hlače i donji veš do ispod koljena, a potom seksualno zadovoljava na taj način što prodirući svojim polnim organom u

vaginu H.Ć. ostvaruje spolni odnos i snošaj, kojom prilikom istu defloriše. Nakon takve radnje, u najvjerovatnije komatiziranom stanju, potpuno nagu, Š.M. je ostavlja na mjestu gdje je i zatečena 12.02.2005. godine.

U cilju uspoređivanja spornih tragova pronađenih na licu mjesta i određivanja DNK profila od Š.M. je uzet uzorak krvi, a kod ubijene ispod noktiju pronađeni su tragovi počinioca. DNK analiza potvrdila je činjenicu da je Š.M. star 24. godine na svirep način ubio i obećastio H.Ć. staru 56 godina.

Primjer 2. Samoubistvo

Dana 12.06.2004. godine u jutarnjim satima dežurni PU Zenica obavješten je od strane I.F. da je pronašao beživotno tijelo Lj.M. u njegovom stanu. Odmah je formirana uviđajna ekipa od strane inspektora i krim. tehničara MUP-a ZE – Do kantona i Kantonalnog tužioca.

Tijelo Lj.M. zatečeno je na sredini kuhinje, glavom okrenutom prema prozoru. Leš je zatečen u ležećem položaju, na ležima, dok je na lijevoj strani grudnog koša, u prijedjelu srca zariven nož sa crnom drškom koja je dužine 10 cm i širine 3 cm. Nož je cijelom dužinom siječiva zariven u tijelo, tako da je oštrica noža okrenuta prema desnoj strani tijela. Stvari i pokućstvo u stanu su u urednom stanju. Ulazna vrata su zatečena sa otključanom bravom i ključevima sa unutrašnje strane, a pregledom istih nisu uočena mehanička oštećenja.

Obdukcijom je utvrđeno da je smrt Lj.M. nasilna i neposredno nastupila usljed unutrašnjeg iskrvarenja u obje grudne šupljine, koje je posljedica naglog i obimnog izlivanja krvi kroz prijesjek zadnjeg – završnog dijela grudne aorte. Ozljeda je nanešena zaživotno, sa naznakom da je najvjerovatnije samoubilačkog karaktera.

U cilju rasvjetljavanja ovog događaja naloženo je biološko vještačenje tragova krvi na dršci noža i nastradaloga.

Rezultatom analize DNK profila spornog traga i DNK profila nespornog uzroka utvrđeno je da je Lj.M. donor ovog spornog biološkog traga i DNK analizom nije utvrđeno prisustvo bioloških tragova koji bi poticali od neke druge osobe osim Lj.M. Iz svega je konstatovano da je Lj.M. izvršio samoubistvo.

ZAKLJUČAK

Konvencionalne metode odigrale su nesumnjivo veliku ulogu u otkrivanju i razrješavanju različitih krivičnih dijela. Ipak, pojavom DNK analize, stekli su se uslovi za apsolutno pouzdane rezultate.

Bilo da je riječ o standardnom utvrđivanju očitstva ili o analizi spornih bioloških tragova prikupljenih na mjestu zločina, DNK analiza se javlja nezaobilaznom procedurom koja daje rezultate visoke upotrebne vrijednosti.

Značaj biološkog vještačenja je nesumnjiv. Naime, uvođenje vještačenja bioloških tragova putem DNK otiska u našoj sudskoj praksi otvara nove mogućnosti u vještačenju bioloških tragova, pozitivno utiče na skraćenje trajanja i na smanjenje troškova krivičnog postupka, ima izuzetan značaj u rasvjetljavanju pojedinih krivičnih dijela, uz istovremenu primjenu i u dokazivanju biološkog porijekla dijeteta.

Upotreba ove metode je pouzdana u identifikaciji osoba, osim kod homozigotnih blizanaca. Stoga je treba primjenjivati u postupcima dokazivanja očitstva i materinstva i u drugim postupcima.

Međutim, da bi se dobili kvalitetni – upotrebljivi rezultati poslije obavljenog biološkog vještačenja moramo se potruditi svi mi koji postupamo u toku krivičnog postupka – kao predstavnici policije, da što prije prevaziđemo probleme, kao što su:

- neophodna je kvalitetna edukacija svih službenih lica koja postupaju prilikom uviđaja na licu mjesta (javnih tužilaca, odgovarajućih policijskih službi) u cilju sagledavanja značaja biološkog

- materijala pronađenog prilikom uviđaja i njihove upotrebljivosti za vještačenje;
- nužno je spriječavanje kontaminacije⁴⁾ uzoraka bioloških tragova pronađenih⁵⁾ na licu mjesta do koje se može doći neopreznim radom službenih lica na licu mjesta prilikom uviđaja;
 - potrebno je obratiti pažnju na problem neadekvatne obrade, pa potom čuvanja pronađenih bioloških tragova;
 - ovo vještačenje treba obaviti u što ranijoj fazi krivičnog postupka – u pretkrivičnom ili prethodnom postupku, što suštinski pozitivno utiče na smanjenje troškova krivičnog postupka.

Na normativnom planu trebalo bi u najskorije vrijeme regulisati slijedeće:

- a) Uvesti tipsku proceduru u mjeri u kojoj je to moguće u postupcima uzimanja različitog biološkog materijala
- b) Formirati bazu podataka
- c) Donijeti propise o zaštiti generičke privatnosti

Iz svega navedenog zaključujemo:

- 1) Metoda DNK otiska, pokazalo se u praksi, ima potpunu dokaznu snagu i predstavlja validan materijalni dokaz jer se vještačenje vrši na osnovu biološkog materijala, koji se ni protekom vremena ne mijenja.
- 2) Ova metoda našla je primjenu u praksi, kao i u krivičnim postupcima, zbog najrazličitijih i brojnih vrsta krivičnih djela, tako i u paternitetskim postupcima gdje je u potpunosti dokazala svoju superiornost nalaza u odnosu na ranije korištenje metode krvno – grupnih analiza i antropometrijske analize. Osim toga, evidentan je značaj u primjeni ove metode u identifikaciji nestalih, smrtno stradalih lica pronađenih u masovnim grobnicama, na drugim mjestima kao i drugim postupcima.
- 3) U ovom momentu naša zemlja ima kvalitetne laboratorije koje u svom radu koriste savremenu opremu i prilikom analize bioloških materijala

vještačenje vrše u pogledu genskih lokusa u skladu sa sistemom CODIS.

Određeni problemi mogu da utiču u praksi na validnost ovog dokaza, kao što je problem interpretacije dobijenih rezultata i kvalifikacije osobe koja te rezultate iznosi pred sudom. Uz svo uživanje stručnosti ljekara različite specijalnosti koji mogu da rade u DNK laboratorijama, jedino su stručne osobe za pravilno interpretiranje ovih rezultata pred sudom molekularni biolozi i genetičari, te da zbog toga ovu vrstu vještačenja treba povjeriti ustanovama koje imaju odgovarajući profil stručnjaka sposoban da obavi traženo vještačenje i potom pravilno interpretiraju dobijene rezultate.

LITERATURA

- [1] Basarić M. Vejzagić N., *Kriminalistika II*, Sarajevo 1998.
- [2] Berberberović Ljubomir: *Bioantropologija*, Sarajevo 1999.
- [3] Berberović Ljubomir: *Teorijske osnove molekularno – genetičkih metoda identifikacije – „DNA Fingerprinting“*, Kriminalističke teme 3-4: 17 – 30, Sarajevo 2004.
- [4] Lauc Gordan: *Primjena analize DNK u sudskoj medicini. Utvrđivanje identiteta*, Medicinski fakultet u Osijeku, 2004.
- [5] Mahmutović Dževad: *Savremene metode identifikacije u masovnim grobnicama*, Diplomski rad, FKN u Sarajevu, 2002.
- [6] Marjanović Damir: *DNK profil – temeljni identifikacijski dokument*, Kriminalističke teme 1-2: 129 – 144, Sarajevo 2004.
- [7] Marjanović D., Bakal N., Milosavljević M.: *Optimizacije osnovnih parametara procesa DNK analize kao standardne metode u sklopu policijskih istraga i sudskih procesa*, Kriminalističke teme 1 (2): 31 – 38, Sarajevo, 2003.
- [8] Milosavljević Branko: *Socijalna patologija*, Sarajevo, 1986.

- [9] Milosavljević Mladen: *Osnovi forenzičke biologije*, Sarajevo 2000.
- [10] Milosavljević M. i Marjenović D.: *Uporedna varijabilnost konvencionalnih metoda i DNA analize u rješavanju najtežih krivičnih djela*, Kriminističke teme 1 (1): 245 – 255, Sarajevo, 2003.
- [11] Modly D. I Korajlić N.: *Kriministički rječnik*, Tešanj, 2002.
- [12] Prohić Halil: *Sudska Medicina*, Glas medicinara, Sarajevo, 1989.
- [13] Ramljak Alija: *Pravna medicina*, Pravni fakultet Banja Luka, 1986.
- [14] Ramljak Alija: *Medicinska kriminalistika*, FKN Sarajevo, 1999.
- [15] Zečević D. i Škavić J.: *Osnove sudske medicine za pravnike*, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 1996.