

Quo vadis, súdna genetika?

Quo Vadis, Forensic Genetics?

Ján Miertuš
Vanda Rísová
Miroslava Vráblová

Abstract: Forensic genetics together with many other scientific fields connected to molecular biology and its development is currently experiencing epochal change through the introduction of high-power technologies. With reference to the literature the authors summarize the newest knowledge in the field of judicial genetics as well as some fairly interesting examples of development expected in the near future. In this context, it seems necessary to underline the importance of bio-molecular technologies as well as the importance of modelling and software processing of statistical data in the simulation of both downwards – genotype or upwards – phenotype. DNA analysis method represents a very useful instrument appropriate for identification of individuals from the forensic point of view. This is a rapidly evolving field of forensic biology. Forensic experts, however, consider genetic identification to be a complex and time-limited technological process.

Key Words: DNA Analysis Method; Downwards – Genotype; Upwards – Phenotype; Forensic Biology; Forensic Genetics; Identification of Individuals.

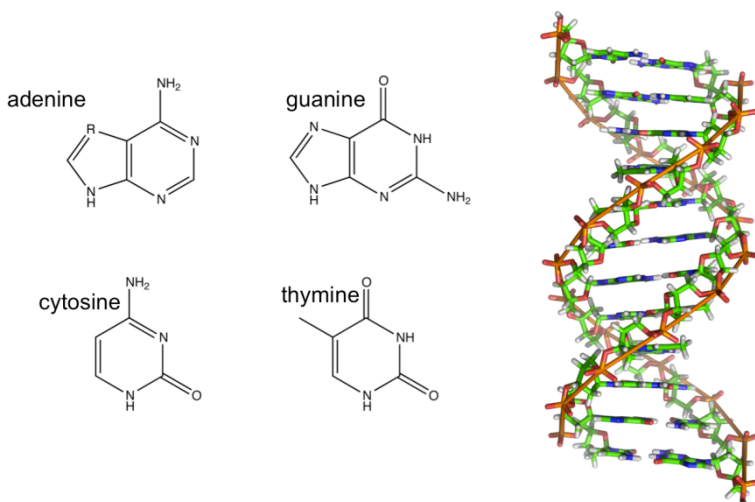
Abstrakt: Forenzná genetika spolu s mnohými ďalšími vednými odvetvami, ktorých sa dotýka molekulárna biológia a jej rozvoj, zažíva v súčasnosti epochálnu zmenu vďaka zavádzaniu vysokovýkonných technológií. Autori s odkazom na literatúru uvádzajú prehľad najnovších poznatkov v oblasti súdnej genetiky, ako aj niekoľko mimoriadne zaujímavých príkladov vývoja v blízkej budúcnosti. V tejto súvislosti sa javí potrebné podčiarknuť význam biomolekulárnych technológií vo vývoji, ako aj modelovania a softvérového spracovania štatistických dát pri simulácii či už downwards – genotypu, alebo upwards – fenotypu. Z kriminalistického hľadiska predstavuje metóda analýzy DNA mimoriadne vhodný nástroj na identifikáciu osôb. Ide o veľmi rýchlo sa rozvíjajúcu oblasť kriminalistickej biológie. Odborníci kriminalisticko-expertízneho skúmania však považujú genetickú identifikáciu za zložitý a časovo limitovaný technologický postup.

Kľúčové slová: Metóda analýzy DNA; downwards – genotyp; upwards – fenotyp; kriminalistická biológia; súdna genetika; identifikácia osôb.

Úvod

Genetická analýza patrí k biometrickým metódam na identifikáciu osoby. Najvyšší stupeň identifikácie osoby – individuálnu identifikáciu – je možné dosiahnuť práve prostredníctvom biologického skúmania metódou analýzy deoxyribonukleovej kyseliny (DNA). Odobratie vzoriek na vykonanie DNA analýzy sa vykonáva z dôvodu identifikácie osôb na účely trestného konania, pátrania po nezvestných osobách či identifikácie osôb neznámej totožnosti. V kriminalistickom expertíznom skúmaní sa táto genetická identifikácia považuje za zložitý, časovo limitovaný technologický postup. Vzhľadom na náročnosť skúmanej problematiky, ktorá sa nachádza na rozmedzí viacerých vedných disciplín, považujeme za potrebné priblížiť a vysvetliť základné pojmy z genetiky súvisiace s genetickou expertízou.

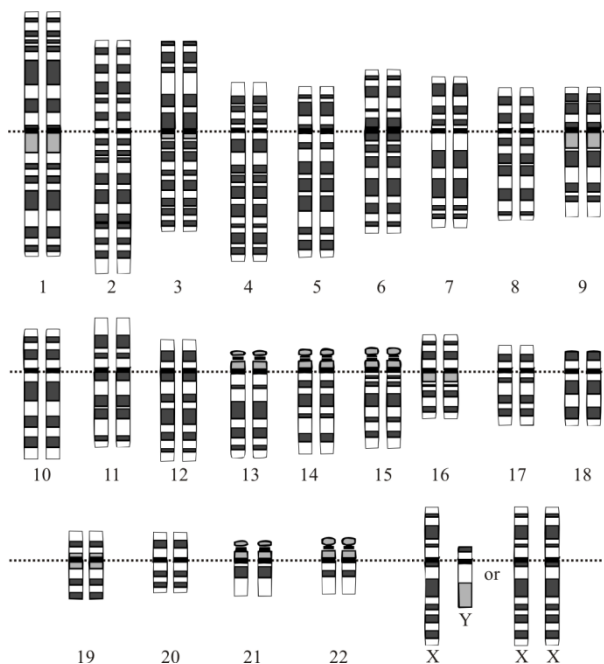
Obrázok 1 Trojrozmerná štruktúra DNA so zvýraznením štyroch základných stavebných jednotiek – nukleotidov



Prameň: *2D Molecules That Form Our 3D World* [online]. 2012-06-06 [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://skepchick.org/2012/06/2d-molecules-that-form-our-3d-world/>.

Nositelkou dedičnej informácie je de(z)oxyribonukleová kyselina (DNA – Obrázok 1) obsiahnutá v jadre a v mitochondriách buniek (Obrázok 3). Skladá sa zo základných stavebných jednotiek – báz, respektíve nukleotidov. Tie sú pospájané do reťazca tvoriaceho dvojité špirálovú štruktúru. Táto predstavuje v ľudskej bunke približne 3 miliardy párov nukleotidov, ktoré sú rozdelené a uložené v chromozónoch (23 chromozómov pochádza od jedného rodiča, 23 od druhého; 2 x 22 je tzv. autozómov, dva sú pohlavné XX – u žien, či XY – u mužov). V minulosti (70. a 80. roky minulého storočia) bola analýza chromozómových máp (Obrázok 2) pri rozličných stupňoch rozlíšenia ťažiskovou metódou v ľudskej genetike. Postupne, najmä s nástupom PCR (pozri nižšie), sa do popredia dostávali stále intenzívnejšie technológie molekulárnej biológie, ktoré pracujú priamo s DNA.

Obrázok 2 Ľudská chromozómová mapa – úplný diploidný normálny karyogram/karyotyp



Prameň: NHGRI. *Trisomy* [upravený obrázok] [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/Pdf/trisomy.pdf>.

V reťazci DNA sú obsiahnuté informácie o štruktúre proteínov, základných stavebných jednotiek bunky. Iba približne 1,5 – 3 % z celkovej dĺžky DNA kodifikuje proteíny. Jeden proteín je kodifikovaný jedným génom (v súčasnosti je známych približne 20 000 génov pre každý haploidný genóm). Každý gén sa skladá z exónov (kódujúcich častí) a intrónov (ktoré majú komplementárnu funkciu). Reťazec DNA je pre každého jedinca jedinečný. Z 3 miliárd párov báz sa odlišujeme jeden od druhého približne každým 500. – 1 000. nukleotidovým párom, čo sa prirodzene odráža aj na fenotype (napr. na výzore či iných objektivizovateľných charakteristikách).

Je preto prirodzené, že pre identifikáciu v súdnom lekárstve sa s postupným zdokonaľovaním technológií molekulárnej biológie postupne prešlo od identifikácie pomocou odtlačkov prstov, štruktúry zuboradia, anorganického zloženia adnexov (vlasov, nechťov a pod.) či iných častí tela, analýzy krvných stôp (napr. určením krvných skupín) k individuálnej identifikácii metódami analýzy DNA. Táto dnes predstavuje nevyhnutnú súčasť dokazovania v prípadoch určenia rodičovstva (napr. otcovstva v prípade platenia výživného, materstva v prípade opustených detí), či, a to najmä, v oblasti trestnoprávnej.

Forenzné laboratórium

Veľké množstvo vzoriek, ktoré musia byť typizované vo forenznom laboratóriu, vyžaduje solídnu organizáciu celého procesu, zahrňujúceho zber dôkazného materiálu, purifikáciu DNA (príp. iných biologických molekúl), amplifikáciu DNA, zviditeľnenie a interpretáciu výsledkov. V súčasnosti sa každá z týchto fáz vykonáva nezávisle od nasledujúcej, časovo a/alebo priestorovo oddelene a každý jeden proces môže trvať mnoho hodín.¹

Odber DNA

Schopnosť úspešnej analýzy DNA často závisí od miery jej zachovania pri odbere a následnom uchovaní. Keďže sa extrémne malé vzorky DNA môžu použiť ako dôkazy, mimoriadne veľký pozor treba dávať na ich kontamináciu pri ich hľadaní (identifikovaní), zbieraní a ďalšej manipulácii (napr. balení a pod.). Osobitná pozornosť sa musí venovať takzvanému „chain of custody“ (reťazec strážcov), ktorý sa vzťahuje na chronologickú

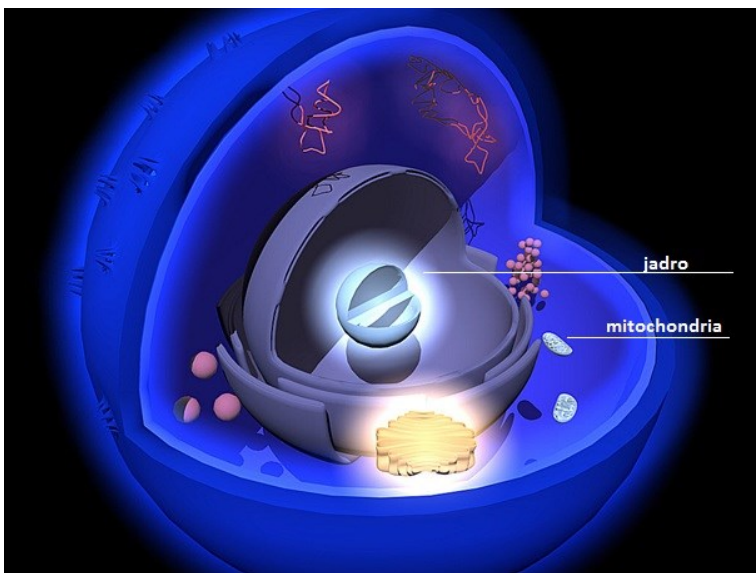
¹ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

dokumentáciu zaznamenávajúcu získanie, starostlivosť a ochranu, kontrolu, presuny a rozmiestnenie dôkazov. Hlavným cieľom reťazca je zabezpečenie, že priložený a predkladaný dôkaz naozaj súvisí s daným čínom, a zároveň vylúčenie kontaminácie či zmeny fyzického stavu dôkazu.

Purifikácia DNA

Pod izoláciou DNA sa rozumie jej extrakcia z rozličných zdrojov. Metodológia závisí od východiskovej vzorky, jej veku a veľkosti. Navzdory veľkej mnohotvárnosti používaných metód jestvujú medzi nimi niektoré podobnosti. Vo všeobecnosti ide o oddelenie DNA prítomnej v bunke (bunkovom jadre – Obrázok 3) od ostatných komponentov.

Obrázok 3 Schematické znázornenie štruktúry bunky s poukázaním na organely obsahujúce DNA



Prameň: *Anatomium 3D* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.anatomium.com/3d-anatomy-guarantee.html>.

Forenzné extrakčné metódy musia byť adaptované v zmysle schopnosti efektívnej purifikácie DNA z rozličných zdrojov a veľkostí vzorky. V prípade, že ide o vzorku, ktorá obsahuje minimálne množstvo DNA (napr. jediný vlas či jediná spermia), metóda bude prirodzene odlišná od prípadu, v ktorom je východiskom na izoláciu DNA niekoľko miligramov

tkaniva alebo mililitrov krvi. Najstaršia metóda je založená na zmesi organických rozpúšťadiel a doteraz sa používa aj v mnohých forenzných laboratóriách. Ide o veľmi efektívnu metódu, ktorá sa používa v prípade dostatočného množstva biologického materiálu. Jedna z modifikácií tejto metódy využíva na zrážanie DNA vysokú koncentráciu soli (NaCl). Iná z často používaných metód sa opiera o Chelex® – živicu na výmenu iónov, ktorá viaže polyvalentné ióny kovov a je mimoriadne praktická pri odstraňovaní inhibítorov z DNA. Je možné použiť ju pri akomkoľvek druhu vzorky – celá krv, krvné stopy, stopy ejakulátu, výteroch z ústnej dutiny, vlasoch. Podobne môžu DNA vychytávať paramagnetické partikuly. Vzorky sú najprv rozpustené a neskôr upravené proteínázou K. Lyzáty sú potom dané do styku s partikulami, tie sa neskôr omyjú a DNA sa vylúhuje pri teplote 65 °C. Magnetické častice sa oddelia na magnetický podklad. Najmodernejšie metódy čistenia DNA predpokladajú stĺpce rozličných druhov, ktoré sú plnené výmenníkmi iónov, silicovými živcami či maticami. Iónové výmenníky sú zvyčajne nabité kladne, čím je umožnená väzba negatívne nabitej nukleovej kyseliny; aj matrice zo živice bývajú nositeľkami náboja, aby zadržovali DNA. Pri týchto aplikáciách sa očakáva, že DNA z lyzátoov sa udrží naviazaná v stĺpci. V nasledujúcej fáze sa DNA získa omytím vodou či sol'nými roztokmi s neutrálnym pH, ktoré narúšajú väzby kyseliny so živicom. Používanie stĺpcov zvyšuje výťažok zo vzoriek, skraca čas procesu (v porovnaní s tradičnou extrakciou založenou na roztokoch), zvyšuje množstvo získanej DNA a zlepšuje kvalitu očistenej DNA.²

Väčšina automatických extraktorov sa sústredila na získavanie DNA zo štandardných referenčných vzoriek, iné sú prispôsobené na aplikácie v špecifickjších prípadoch, ako napríklad izolácia z kostí, vlasov, zubov, ohorkov z cigariet či spermíí. Robotizované platformy sa môžu líšiť kapacitou, použitím reaktantov a/alebo inými metódami.

Automatizácia

Aj pri zapojení tých najrýchlejších overených techník by každé laboratórium bolo pod veľkým tlakom, ak by vyprodukovalo výsledky za menej ako 5 hodín. Navyše, zníženie času potrebného na vykonanie analýzy by malo viesť k zredukovaniu nákladov. Dopyt po výsledkoch, ktoré sú lacné, rýchle, presné a opakovateľné priniesol rozvoj automatizácie. Roboti-

² GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

ka a modifikovaná chémia sprístupňujúca rozvoj automatických procesov, vďaka ktorým sa zvyšuje kapacita, pokračujú v zlepšovaní automatizovanej výkonnosti. Automatizácia zaručuje kontrolu kvality a manažment dát pri nižších nákladoch. Odstránením ľudskej zložky z procesu redukuje/minimalizuje možnosť chyby spôsobenej ľudským faktorom. Chyby sa odstraňujú predovšetkým minimalizovaním pravdepodobnosti „prepnutia“ vzorky a kontaminácie z preťaženia. Vývoj nových softvérov umožňuje stopovanie narábania so vzorkami počas celého procesu. Nižšie objemy reakčných zmesí sa premietajú do menšieho množstva spotrebných chemikálií a menšieho odpadu/nižších strát. V ostatných rokoch sa vyvinuli mnohé nové počítačové aplikácie, ktoré pomáhajú vo forenzných laboratóriách pri narábaní s veľkým prívalom vzoriek a príslušných informácií. Jednou z nich sú riešenia riadenia laboratórnych informácií, ktoré podporujú automatizáciu pracovných postupov prepojením laboratórnej techniky, možnosť presných pracovných postupov a automatických skúšok dát, čo sa týka kontaminácie. Takéto softvéry podporujú celý pracovný postup a sledujú forenzné vzorky od ich zberu (odobratia) až po interpretáciu dát. Taktiež dovoľujú vyhodnotiť komplikované miešané vzorky v súlade s odporúčaniami Medzinárodnej spoločnosti pre forenznú genetiku (International Society of Forensic Genetics – ISFG), prostredníctvom tzv. metódy pravdepodobnosti a „náhodný muž nevylúčený“. Ako sme už spomínali, väčšina automatizácie sa sústredila na extrakciu DNA zo štandardných referenčných vzoriek a len niektoré rozšírili možnosť byť použité aj pri skúmaných vzorkách. Zjavne najdôležitejšou snahou pri automatizácii ostáva však momentálne príprava práve skúmaných vzoriek. Na opačnom konci procesu stojí zjavne interpretácia výsledkov. V poslednom období sa dosiahla miniaturizácia najmä vďaka tzv. mikrofuidným technológiám (alebo tzv. „lab-on-a-chip“ technológii).³

Identifikácia

Pri testovaní identity sú porovnávané dve alebo viac vzoriek, pričom cieľom je potvrdiť či vylúčiť ich podobnosť a/alebo rozdielnosť. V prípade, že dve vzorky obsahujú na úrovni testovaných markerov vysoký počet zhodných znakov, testované osoby môžu súvisieť s činom, ak všetky zdieľané alely prináležia k vzorke pochádzajúcej z toho istého individua. Štandardne, vzorka nájdená na mieste činu je porovnávaná so vzorkou podozrivého. Prv, než forenzný expert smie prísť k záveru, že test DNA

³ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

má dostatočnú výpovednú hodnotu na identifikáciu vzorky ako dôkazu, musí dokázať, že testované charakteristiky sú mimoriadne variabilné medzi rôznymi populáciami, a to výpočtom frekvencie daného profilu v príslušnej celkovej populácii. Zváženie týchto entít môže byť vykonané za použitia prístupu berúceho do úvahy frekvenciu, pričom prostriedkom je pravdepodobnosť alebo počet pravdepodobností, aby sa dosiahlo výsledných odd pomerov, ktoré hovoria v prospech súvislosti, alebo Bayesových počtov, ktoré hovoria proti nej. Z toho vyplýva, že pravdepodobnosť náhodnej zhody zodpovedá možnosti, že náhodný profil DNA je zhodný s profilom celkovej populácie. Tento je potom recipročný k frekvencii profilu v danej populácii. Frekvencia (častosť výskytu) profilu DNA je odhadom pri určovaní frekvencie genotypu pre každý locus a násobkom jednotlivých frekvencií. Naopak, počet pravdepodobností zahrňuje porovnanie pravdepodobností za dvoch alternatívnych predpokladov. Tieto navzájom sa vylučujúce hypotézy predstavujú pozíciu obžaloby – konkrétne, že DNA z miesta činu má pôvod v podozrivom – a pozíciu obhajoby – že práve tá DNA sa iba náhodou zhoduje s obhajovaným, pričom pochádza od neznámej osoby prináležiackej k všeobecnej populácii. Preto je počet pravdepodobností pomerom dvoch pravdepodobností týkajúcich sa jedného dôkazu z dvoch odlišných (opačných) uhlov pohľadu. Je výhodnejšie použiť počet pravdepodobností primárne za predpokladu, že zdrojom daného profilu DNA je podozrivý a postaviť túto hypotézu proti alternatívnej, podľa ktorej bolo „donorom“ DNA netestované a nesúvisiace individuum z celkovej populácie. V každom prípade by sa tieto dišputy mali odohrávať v právnom prostredí.⁴

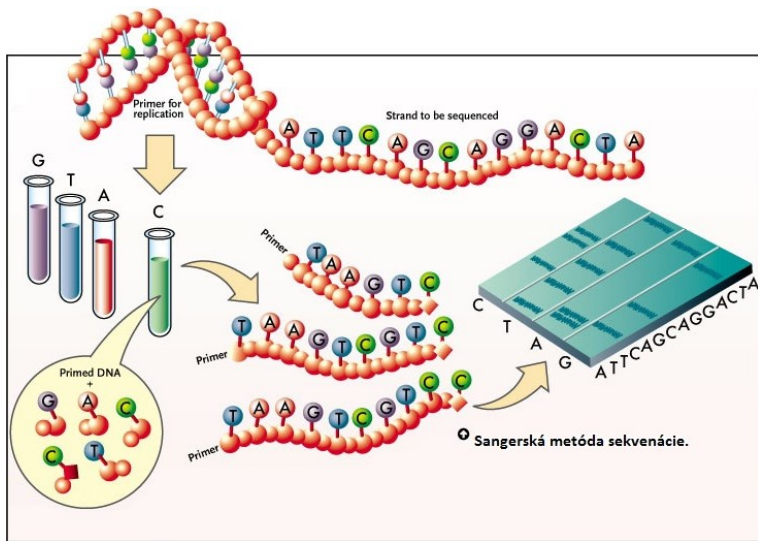
Markery

STRs

Rozoznávajúce profilov deoxyribonukleovej kyseliny (DNA – Obrázok 1) prostredníctvom typizácie tzv. krátkych tandemových opakovaní (short tandem repeats – STRs) predstavuje v súčasnej dobe štandardnú metódu forenzej analýzy. Fragmentačná analýza DNA je teda dodnes hojne využívaná, pričom priama sekvenácia (čítanie presného poradia báz – Obrázok 4) je aplikovaná iba v prípadoch, pri ktorých je k dispozícii obmedzené množstvo DNA.

⁴ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

Obrázok 4 V ére pred automatizovanými robotmi bol base-calling vykonávaný manuálne na elektroforéznom želé



Prameň: WINNICK, E. DNA Sequencing Industry Sets Its Sights on the Future. In: *The Scientist* [online]. 2004-09-27 [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/15939/title/DNA-Sequencing-Industry-Sets-its-Sights-on-the-Future/>.

*STR analýza: krátke tandemové opakovania (short tandem repeats – STRs) je metódou najčastejšie používanou pri tzv. DNA fingerprintingu (odbere „odtlačkov prstov“). Tento spôsob analýzy má svoj základ v PCR (viď nižšie), keďže využíva krátke sekvenčné opakovania 2 až 4 párov nukleotidov. Prostredníctvom STR je teda analyzovaný počet opakovaní na určitom mieste DNA vlákna.*⁵

mtDNA

Za takýchto okolností sekvenácia hypervariabilných úsekov mitochondriálnej DNA (mtDNA, Obrázok 2) napomáha identifikácii osôb po maternálnej línii (prípady, kedy neexistuje priamy príbuzný, ale len súrodeni) a vzťahy medzi rôznymi vzorkami nukleárných kyselín.

⁵ *DNA Fingerprinting Methods* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.fingerprinting.com/dna-fingerprinting-methods.php>.

V molekulárnej biológii polymerázová reťazová reakcia (polymerase chain reaction – PCR) je *in vitro* technikou používanou na exponenciálnu replikáciu krátkych úsekov DNA. Týmto sa dosiahne dostatočný počet molekúl, ktoré je možné zviditeľniť pri použití vhodnej techniky aj voľným okom. Prehľad PCR techniky: 1. Denaturácia: na úvod sú vlákna DNA denaturované pri vysokej teplote (94 °C), pri ktorej sú prerušené väzby medzi komplementárnymi nukleotidmi. 2. Annealing: v druhom kroku sa roztok ochladzuje za prítomnosti dvoch oligonukleotidových primerov (umelo syntetizovaných krátkych špecifických komplementárných sekvencií, zvyčajne počítajúcich 18 – 25 báz), z ktorých jeden, tzv. „forward“, sa viaže na vlákno v smere 5' – 3', „reverse“ zase na druhé v opačnom smere. Toto prebieha pri tzv. „melting“ teplotách v rozmedzí 50 – 72 °C. 3. Extenzia: tretí krok je charakterizovaný zapojením sa enzýmu polymerázy, ktorý za prítomnosti nukleotidov (A, C, T, G) kopíruje podľa originálu vlákna DNA novú kópiu v každom cykle. Po ňom je roztok ochladený, čo napomáha 4. Renaturalizácii vlákien pôvodnej a nových reťazcov DNA. Celý proces, ktorý trvá približne 5 minút, je možné vďaka automatizácii a podľa potreby opakovať zvyčajne 25 – 35 krát. Po tridsiatich cykloch, napríklad, je v roztoku prítomných 1 073 741 823 nových molekúl cieľovej DNA.⁶

Jedným z najfantastickejších príkladov forenzej analýzy mtDNA bola nepochybne identifikácia pozostatkov ruskej kráľovskej rodiny popravenej v roku 1918. „Klasická“ Sangerská metóda sekvenácie (Obrázok 4) je však mimoriadne prácna a ekonomicky náročná, zvlášť berúc do úvahy veľkosť (16 kb) a množstvo vzoriek mtDNA čo i len v jednej bunke.

Sekvenácia celého ľudského genómu (whole genome sequencing – WGS)

Vysokokapacitné SGS technológie tento proces nesmierne zjednodušujú. V jednej zo súčasných štúdií bola použitá sekvenácia druhej generácie do veľkej „hlbky“ (priemerne 16 700-krát bol prečítaný ten istý genóm) pri identifikácii heteroplazmatického (líšiaceho sa v rámci mitochondrií tej istej bunky) umiestnenia nukleotidov na úrovni normálnej mtDNA, ako aj somatických variácií v rakovinových bunkách (Obrázok 5). Táto analýza preukázala, okrem iného, rozdiely medzi mtDNA pochádzajúcej z rôznych orgánov toho istého individua. Takýto nález môže mať význam pri forenzej analýze, keďže referenčná vzorka môže mať pôvod v inom tkani-

⁶ PCR at a Glance. In: *Sciencercay* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://sciencercay.com/biology/pcr-at-a-glance/>.

ve ako vzorka evidenčná. V každom prípade bolo argumentované, že pomer chýb pri tomto konkrétnom spôsobe analýzy bol príliš vysoký na to, aby spĺňal kritériá a prísne štandardy vyžadované pri forenzných prípadoch. Kritika vyplývala z porovnania identifikovaných mutácií a fylogény mtDNA zostavenej v *PhyloTree* projekte. Z daného porovnania vyplynulo, že SGS analýza nedokázala zachytiť priemerne päť mutácií na každú bunkovú radu. Pomer chybných načítaní nukleotidových báz je teda vyšší pri SGS v porovnaní so Sangerskou analýzou, aj keď v jednej z najaktuálnejších štúdií bol zvýšením „hlĺbky“ analýzy (počtu prečítaní každého jednotlivého úseku DNA) dokázaný pri sekvenácii mtDNA stodeviatich indivíduí nepatrný rozdiel iba na piatich pozíciách. Všetky nerovnaké výsledky boli následkom problémov vyvolania báz (*base calling*) softvéru Sanger. Takisto je možné uskutočniť dodatočné filtrovanie kvality dát pochádzajúcich z SGS.⁷

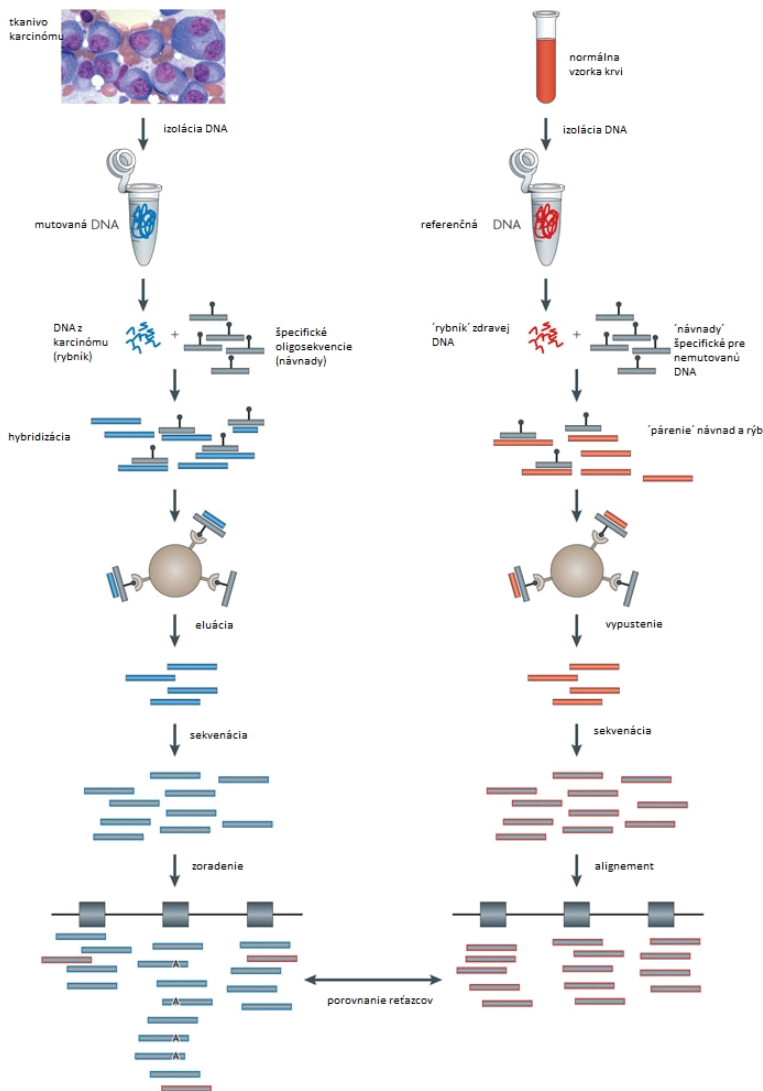
Hoci štandardná typizácia STR poskytuje dostatočnú diskriminačnú „silu“ (schopnosť) pri väčšine aplikácií, použitím *large-scale* (širokopásmovej – t.j. neobmedzenej iba na určité úseky) sekvenácie je možné dosiahnuť mnohé zlepšenia forenzných analýz.

Napríklad, za pomoci priamej sekvenácie je možná identifikácia *jednónukleotidových polymorfizmov* (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs; podobne, ako v prípade mutácie, sa jedná o náhradu jednej bázy, na rozdiel od ktorej frekvencia v populácii presahuje 1 %) v rámci či v blízkosti STRs, čím je možné zvýšiť potenciál analýz medzi príbuznými. Mimoriadne zaujímavou sa javí byť možnosť náhrady STRs za informatívnejšie markery, objavené práve pri veľkoplošnej sekvenácii. Snáď najväčším problémom, s ktorým sa bude musieť moderná forenzná genetika vysporiadať, je práve „zastaranosť“ databáz, ktoré sú založené na STR profiloch. Z mnohých prípadov sa forenzné vzorky pre opätovnú (presnejšiu) analýzu nezachovali. Nanešťastie, dnešná SGS technológia nie je kvôli príliš nízkej rozlišovacej schopnosti STRs veľmi vhodná, preto bude nutné vynaložiť nesmierne úsilie pri nahrádzaní STR genotypizácie sekvenáciou druhej generácie, či už pri update databázach, ako aj pri zbieraní redundantných informácií o genotypoch v nadchádzajúcej prechodnej fáze.⁸

⁷ MEYERSON, M., S. GABRIEL a G. GETZ. Advances in Understanding Cancer Genomes through Second-Generation Sequencing. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2010, vol. 11, no. 10, s. 685-696 [cit. 2014-02-03]. ISSN 1471-0064. Dostupné na: <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n10/full/nrg2841.html>.

⁸ Ibidem.

Obrázok 5 Záchyt, sekvenácia a porovnanie DNA pochádzajúcej z mutovaného (karcinóm) a zdravého tkaniva (krv)



Prameň: MEYERSON, M., S. GABRIEL a G. GETZ. Advances in Understanding Cancer Genomes through Second-Generation Sequencing. *Nature Reviews Genetics* [online].

2010, vol. 11, no. 10, s. 685-696 [cit. 2014-02-03]. ISSN 1471-0064. Dostupné na: <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n10/full/nrg2841.html>.

Výhody, ktoré poskytuje SGS, pokiaľ ide o analýzu degradovaných vzoriek prítomných vo veľmi malých množstvách, zjednodušenie laboratórnych procedúr, väčšie množstvo získaných dát, ako aj presnejšie určenie variabilných oblastí sú argumentmi, ktoré jednoznačne hovoria v prospech SGS pri forenzných analýzach.

Chromozómy Y

V ďalšej z aktuálnych štúdií boli prostredníctvom SGS analyzované mužské chromozómy Y, medzi ktorými bol rozdiel 13 generácií. Pre každú generáciu bola objavená približne jedna mutácia, takže je možné extrapolovať a predpokladať, že každý jednotlivý chromozóm Y je odlišiteľný prostredníctvom sekvenácie.⁹

Tento výsledok je prísľubom pre forenznú aplikáciu, keďže Y-STRs používané na identifikáciu páchatel'ov mužov v rámci vzoriek obsahujúcich stopy viacerých individuí, i napriek súčasnému rýchlemu rozvoju a pokroku v rozlišovaní súborov znakov, majú relatívne nízku rozlišovaciu schopnosť medzi blízkymi príbuznými. V ostatných rokoch asociačné štúdie celého genómu (Genome-Wide Association Studies – GWAS) priniesli možnosti rozoznania SNPs, pomocou ktorých je pravdepodobná predpoveď etnickej príslušnosti, ako aj výzorových znakov. Forenzný význam takýchto predpovedí poskytuje ohromujúci potenciál identifikácie páchatel'a (narážajúci na legislatívne problémy) bez potreby referenčnej vzorky. Mnohé z fenotypových (fenotyp = genotyp + prostredie) znakov, vrátane farby očí, vlasov a odtieňa pokožky, je už dnes možné predpovedať s 80 – 90 % presnosťou. Predvídanie napr. telesnej hmotnosti a výšky je predbežne menej presné. Aj v rámci práve uvedeného použitia je možné prostredníctvom sekvenácie genómu *in toto* zvýšiť špecifitu analýz (predovšetkým) vďaka informáciám (dátam) týkajúcim sa markerov, ktoré nie sú obsiahnuté na genotypizujúcich čipoch.¹⁰

⁹ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

¹⁰ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223; a ODLEROVÁ, J. Využitie Y-STR polymorfizmov vo forenzní praxi. In: *Pokroky v kriminalistike 2005*. 1. vyd. Bratislava: Akadémia Policajného zboru v Bratislave, 2005, s. 123-134. ISBN 80-8054-359-3.

Novovyvíjané systémy schopné čítania dlhých (tzv. „šírka“) úsekov DNA z jedinej bunky (sekvenácia tretej generácie – Third Generation Sequencing – TGS) budú mimoriadne užitočné pre forenznú genetiku. Typizácia dlhých fragmentov umožní priamo určiť haploskupiny mitochondriálnej DNA za prítomnosti mnohých variantov v rámci jednej analýzy. TGS uľahčí takisto identifikáciu viacerých jednotlivcov (donorov) v zmiešaných vzorkách.¹¹

Ďalšou z atraktívnych možností pri narábaní s kontaminovanými vzorkami je ich obohatenie o ľudský alebo mtDNA materiál, využívajúc tzv. záchyt (*target capture*) cieľovej vzorky, podobne ako DNA. *H. Neanderthal* bol obohatený v kontaminovaných vzorkách za použitia „vychytávania za pomoci extenzie primerov“, či záchytu za pomoci „arrays“ (mikročipov).¹²

Inzerčno-delečné polymorfizmy (indels)

Indels sú polymorfizmy týkajúce sa dĺžky reťazca, ktoré sú vytvorené vložením alebo vyňatím segmentov DNA v rozsahu jedného až niekoľkých stoviek nukleotidov. Podobne, ako v prípade STRs, ovplyvňujú *indels* veľkosť fragmentov a je možné ich typizovať prostredníctvom kapilárnej elektroforézy. Takisto ako SNPs, sú bialecké a majú presne definovanú variabilitu krátkych intervalov pre alelu. Kombináciou niektorých z požadovaných vlastností STRs a SNPs *indels* môžu v určitých prípadoch premosťovať medzeru medzi už štandardizovanými stratégiami. Samozrejme, sú hojne rozložené pozdĺž celého genómu a majú aj štatisticky významnú frekvenciu rozdielných aliel medzi populáciami. Navyše môžu byť analyzované prostredníctvom amplifikácie krátkych úsekov (krátkych amplikónov), čím dovoľujú vysokokapacitné mnohopočetné širokospektrálne analýzy, ako aj zvýšenie možnosti úspešnej amplifikácie veľmi degradovaných vzoriek DNA. Jeden z posledných multiplexov zahŕňa 38 bialeckých *indels* markerov, čím predstavuje dôležitú a účinnú alternatívu pre SNPs a STRs.¹³

¹¹ BERGLUND, E. C., A. KIILAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

¹² BERGLUND, E. C., A. KIILAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

¹³ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

Haploblok

Ďalšou z tried forenzných markerov uvedených do praxe iba v nedávnej minulosti je tzv. blok haplotypu. Pod pojmom haplotyp sa rozumie kombinácia alieli na viacerých miestach (locus, -i), ktoré sú prenášané generácie spolu na tom istom chromozóme. Ľudský genóm je tak organizovaný vo viacerých „blokovaných“ segmentoch, oddelených rekombinačnými bodmi (recombinant hotspots = miesta, na ktorých prichádza k rekombinácii (premiešaniu) s vyššou pravdepodobnosťou). Tieto *loci* predstavujú približne 60 % všetkých rekombinácií v ľudskom genóme, pričom zaberajú približne len 6 % z celkovej dĺžky. Tým pádom je genetická variabilita medzi rôznymi (aj príbuznými) indivíduami dôsledkom haplotypov (markerových setov) skôr ako jednotlivých variantov. Set markerov označuje blokovánú oblasť (haploblok) a každý z haploblokov môže obsahovať mnohé z možných haplotypov, v závislosti od kombinácie alieli na každom SNP. Haplotypy pozorované na úrovni populácie majú väčší diskriminačný potenciál (DP) v porovnaní s jednotlivými SNPs obsiahnutými v bloku. Teoreticky je každý jeden haploblok v DP ekvivalentný STR markeru. Pozorovaný haplotyp bude teda analógom alieli na jednotlivých STR loci. Podľa Novelli et al. (autorov jednej z predlôh), hoci táto trieda markerov nie je vhodná na testovanie identity vďaka množstvu jednotlivých markerov na testovanie, nízka heterozygotita i vysoký koeficient kríženia (t.j. nízka heterogenita populácie) je mimoriadne vhodnou pomôckou pri odhade etnickej príslušnosti neznámych vzoriek a pri analýze príbuzenstva.¹⁴

Mikrobiálne vzorky

V porovnaní s ľudskými vzorkami, pri ktorých je zvyčajne postačujúci obmedzený súbor predurčených markerov DNA, vzorky mikrobiálnych nukleárných kyselín sú ďalšou z výziev forenznej genetiky, keďže markery sú väčšinou neznáme a špecifické pre jednotlivé prípady. Toto podozretie forenzných analýz sa donedávna opieralo o Sangerskú sekvenáciu. Tak to bolo napríklad aj v prípade určenia pôvodu baktérií, ktoré boli použité v neslávne známom prípade útoku antraxom (baktériou slezinnej sneti) na USA v roku 2001. Pri riešení daného prípadu boli z tisícov kolónií manuálne vybrané pre načítanie sekvencie celého genómu (Whole

¹⁴ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

Genome Sequencing – WGS) tie, ktoré sa morfológicky mierne odlišovali.¹⁵

Na základe identifikovaných polymorfizmov boli navrhnuté štyri testy, ktoré boli použité pri *screeningu* viac než tisíce vzoriek izolovaných z rôznych laboratórií.

V roku 2001 predstavoval každý genóm antraxu cenu približne 140 tisíc USD. Na porovnanie, pri nedávnej analýze štyroch kmeňov *Bacillus anthracis* pomocou systému SOLiD bola cena reagentov nižšia ako 1 000 USD za jeden genóm. Pridržiavajúc sa manuálu prístroja Illumina HiSeq 2000, približne 300-násobné pokrytie 384 rozličných *B. anthracis* kmeňov je možné uskutočniť v priebehu jediného experimentu za cenu reagentov nižšiu ako 50 USD v prepočítaní na jeden genóm.¹⁶

Sekvenácia jedinej molekuly DNA

Niekedy sa označuje aj ako sekvenácia tretej generácie. Nepredpokladá amplifikáciu predchádzajúcu samotnej sekvenácii vzorovej molekuly. Tieto technológie vyžadujú zdokonalenie kvantitatívnej presnosti eliminujúcej riziká vzniknuté skreslením počas prípravy knižníc na sekvenáciu. Táto generácia dovoľuje aj priame určenie sekvencií RNA, zisťovanie chemicky modifikovaných báz (napr. metylovaných), ako aj „čítanie“ dlhších reťazcov. Posledné z menovaných je užitočné najmä pri projektoch sekvenácie *de novo*, ako aj pri experimentálnom určovaní fázy (určenie prítomnosti aliel na tom istom chromozóme), namiesto dnes používaného štatistického priradovania fázy.¹⁷

V systéme od Helicos Biosciences (Cambridge, MA, USA)¹⁸ Heliscope Single Molecule Sequencer poly(dT) oligonukleotidové primery sú pripnuté v prietokovej komore a k nim sú pripnuté templáty s poly(dA)koncami. V každom cykle je pridaný a polymerázou inkorporovaný jeden reverzibilne fluorescentne označený nukleoid, potom sa sklíčko zobrazí a omyje, pričom farebná etiketa je odstránená. Táto technológia

¹⁵ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

¹⁶ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

¹⁷ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

¹⁸ *Helicos BioSciences* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.helicosbio.com/>.

vygeneruje približne 35 Gb pre každú sekvenciu pri priemernej dĺžke 35 nukleotidov.¹⁹

Pacific Biosciences (Menlo Park, CA, USA)²⁰ vyvinula systém, ktorý nazvala sekvenácie jedinej molekuly v reálnom čase (SMRT – Single Molecule Real Time), za použitia polymerázy DNA upevnenej na sklenom povrchu nukleotidov označených fluorochrómami, ktoré sa odštiepujú zároveň s inkorporáciou samotných nukleotidov. Sekvenačná reakcia sa tak odohráva v tzv. nulovom móde vlnovo-riadenom nanoštruktúrovanom teste. Inkorporácia svetelne označených nukleotidov sa monitoruje v reálnom čase, čo dovoľuje veľmi krátke časy jednotlivých testovacích kôl. Pomocou tejto technológie sa získali sekvenčné dĺžky viac ako 1 000 báz. Vysoký pomer chýb a nízky výkon, aktuálne obmedzený na 0.1 Gb, sú jej nevýhodou. Tento systém sa úspešne použil pri rýchlej analýze druhov *Vibrio cholera* pri prvom haitskom prepuknutí epidémie.²¹

Mnohé nové technológie pre sekvenácie jednej molekuly sú vo vývoji. Nanopore Sequencing Technologies (Oxford Nanopore, Oxford, UK),²² NABsys (Providence, RI, USA)²³ sú založené na priamej detekcii prirodzených elektrochemických rozdielov medzi nukleotidmi a nevyžadujú označovanie fluorescentmi. Starlight System (Life Technologies) disponuje technológiou v reálnom čase s použitím quantum-dot-labeled polymerázy a osobitne označených fosforeskujúcich nukleotidov. Dnes ešte nie je celkom jednoznačné, ktorý z principiálne rozličných systémov, čo sa týka reakcie i detekcie, vyvíjaných v rámci tretej generácie sekvenácie jadrových kyselín, dosiahne kapacitu a presnosť požadovanú každodennými aplikáciami „real life“.²⁴

¹⁹ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

²⁰ *Pacific Biosciences* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.pacificbiosciences.com/>.

²¹ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

²² *Oxford Nanopore Technologies* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <https://www.nanoporetech.com/>.

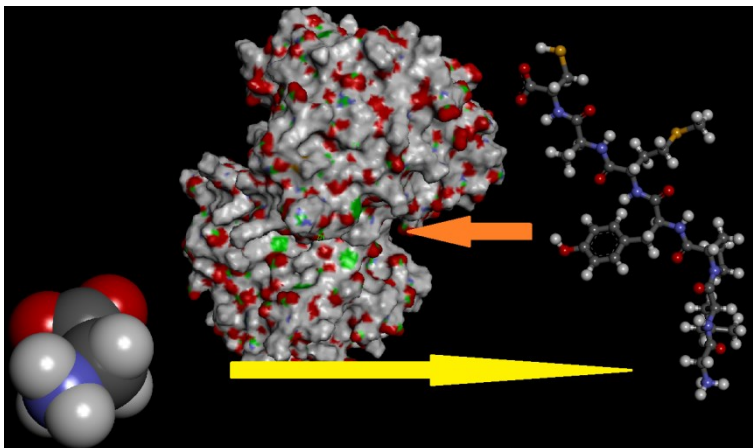
²³ *Nabsys* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.nabsys.com/>.

²⁴ BERGLUND, E. C., A. KIIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

Iné biomakromolekuly v rámci identifikácie

„Liezol mi v noci do spálne zlodej cez otvorené strešné okno, keď tu zrazu mu kvapol hlien z nosa na rímso, a tak sa prezradil.“ V prípadoch, keď nie je k dispozícii genetický materiál, forenzné laboratórium musí pracovať so stopami obsahujúcimi iné makromolekuly použiteľné na identifikáciu páchatel'a. Jednými z nich sú proteíny, ktorých terciárna (priestorová) štruktúra závisí o.i. od poradia aminokyselín v reťazci. Tá je odhaliteľná pomocou mnohých technológií: magnetická rezonancia, hmotnostná spektrometria, X-rays či modernejšie prístroje, ktoré sú schopné rozlišovať tzv. „arrangement“ proteínov. Za pomoci softvérového modelovania je možné postupne z informácií o 3D rozložení jednotlivých podjednotiek zistiť primárnu štruktúru bielkovín. Tá je menej jedinečná ako zloženie triplet DNA (pripomíname, že niektoré z dvadsiatich aminokyselín môžu byť kodifikované viacerými kombináciami trojíc nukleotidov), ale za predpokladu, že analyzujeme dostatočný počet aminokyselín, tieto môžu mať vypovednú hodnotu o identite.²⁵

Obrázok 6 3D modely najjednoduchšej z aminokyselín Glycínu (A), reťazca aminokyselín (tzv. sekundárnej štruktúry proteínu – B), ako aj terciárnej štruktúry enzýmu (C)



Prameň: S vďakou Mgr. Jakubovi Kollárovi z Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave.

²⁵ STRAUS, J. et al. *Kriminalistická technika*. 2. rozšíř. vyd. Plzeň: Aleš Čeněk, 2007. 430 s. ISBN 978-80-7380-052-9.

Forenzná analýza anorganických stôp nie je predmetom tohto príspevku.

Využitie analýzy DNA pre identifikačné účely

Analýza DNA predstavuje veľmi účinný nástroj pri identifikácii osôb. Kriminalistická genetická expertíza dnes patrí medzi pomerne často využívané identifikačné metódy. Využívanie tejto metódy pri vyšetrovaní trestnej činnosti sa rozšírilo vďaka neustálemu technickému pokroku, unifikácii molekulárnych genetických identifikačných metód a ich pomerne vysokej presnosti. Identifikačné skúmanie ľudskej deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) vedie za optimálnych podmienok až k individuálnej identifikácii človeka. Pre účely skúmania DNA a následnej identifikácie človeka môžu byť využité rôzne biologické stopy, napr. krv, ejakulát, kosti, vlasy a pod. Z trestnoprávneho hľadiska je nutné zdôrazniť, že informácie získané metódami forenznnej genetiky môžu byť podkladom pre rozhodnutie pri odhaľovaní a vyšetrovaní trestnej činnosti len vtedy, ak boli zaistené a zabezpečené orgánom činným v trestnom konaní len zákonom stanoveným spôsobom. Najčastejším spôsobom zaistenia stôp je obhliadka, či už obhliadka miesta činu, veci alebo prehliadka tela osoby. Stopy za účelom genetického skúmania je možné zaistiť aj na veciach, ktoré boli zaistené zaist'ovacím úkonom. Samotné zaistenie biologických stôp z týchto predmetov je vykonávané príslušnými technikmi kriminalisticko-expertízneho ústavu. Následne po zaistení stôp, krokom číslo dva je zaistenie porovnávacích materiálov za účelom zistenia totožnosti osoby. Za zisťovanie totožnosti osoby sa považuje každé objasňovanie smerujúce k identifikácii osôb, ktoré sa zdržiavali na mieste činu, teda aj určovanie, komu patria odtlačky prstov nájdené na mieste činu. Do úvahy prichádza okrem odobratia daktyloskopických odtlačkov aj odber krvi či biologického materiálu za účelom genetického skúmania. Dôkazy prostredníctvom metód forenznnej genetiky sú získavané formou odborného vyjadrenia alebo znaleckého posudku.²⁶

S rozvojom metód, ktoré umožnili zápis a porovnávanie výsledkov analýz DNA v alfanumerickej podobe (DNA profil), sa objavila myšlienka vytvorenia databáz DNA v záujme uľahčenia práce polície pri vyšetrovaní trestnej činnosti. Rada Európy prijala Odporúčanie č. R (92) Výboru ministrov členským štátom o využívaní analýzy deoxyribonukleovej kyseliny

²⁶ KOŽINA, J. Právní aspekty využití analýzy DNA pro identifikační účely. *Kriminalistika*. 2011, roč. 44, č. 1, s. 27-38. ISSN 1210-9150.

ny (DNA) v rámci systému trestnej justície, na základe ktorého je možné využívať analýzu DNA pre vyšetrovanie trestných činov bez ohľadu na ich závažnosť. Súčasne je potrebné uviesť, že v čl. 8 požaduje likvidáciu vzoriek DNA a z nej odvodených informácií, akonáhle nebudú ďalej potrebné pre účely, na ktoré boli použité. Zároveň však predpokladá, že výsledky analýzy DNA a z nej odvodené informácie môžu byť uchované, ak bol dotknutý jednotlivец odsúdený za závažné trestné činy ohrozujúce život, zdravie alebo bezpečnosť osôb. Pre takéto prípady musia vnútroštátne právne predpisy stanoviť presnú dobu uchovávaní. V Slovenskej republike zákon č. 417/2002 Z.z. o používaní analýzy deoxyribonukleovej kyseliny na identifikáciu osôb upravuje v § 8 likvidáciu údajov z databázy po uplynutí 100 rokov od narodenia dotknutej osoby.²⁷

Etické problémy

Je zrejmé, že zo samotnej podstaty kriminalistických evidencií vyplýva požiadavka dlhodobého uchovávaní informácií v nich obsiahnutých, ktorá sa dostáva do konfliktu s ochranou ľudských práv, najmä práva na súkromie. Najdôležitejším hľadiskom, ktoré sa týka ľudského práva na súkromie, je zadržanie vzoriek DNA alebo jej profilov na dobu neurčitú. V súčasnosti Národné databázy DNA obsahujú približne 5 miliónov osobných profilov a/alebo vzoriek DNA. Hoci užitočnosť uchovávaní samotných vzoriek DNA, okrem profilov, je diskutabilná aj v prípade odsúdených páchatel'ov, osobný názor autorov jednej z predlôh je, že v prípade, že sa jedná o STR profily, sú nesmierne potrebné pre prípad spochybnenia/dodatočného dokazovania či pri aktualizácii prostredníctvom nových molekulárnych techník, ktoré ešte môžu byť vyvinuté v budúcnosti.²⁸ Autori veria, že majú riešenie pre etické problémy, ktoré nastolilo zavedenie a vývoj NDNAD. Osobitne je potrebné, aby sa NDNAD (Národné databázy vzoriek DNA) riadili právnymi predpismi, ktoré rešpektujú dohovory o ľudských právach.²⁹

²⁷ KRAJNÍK, V. et al. *Kriminalistika*. 1. vyd. Bratislava: Akadémia Policajného zboru v Bratislave, 2005. 356 s. ISBN 80-8054-356-9.

²⁸ GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.

²⁹ ŠIMOVIČEK, I. et al. *Kriminalistika*. 1. vyd. Plzeň: Aleš Čeněk, 2011. 405 s. ISBN 978-80-7380-343-8; a SABO, M. a T. HAJDÚKOVÁ. Identifikácia počtu páchatel'ov analýzou DNA. *Kriminalistika*. 2012, roč. 45, č. 2, s. 142-147. ISSN 1210-9150.

Záver

Vývoj analýz DNA pre forenzné účely prekonal v pomerne krátkej dobe rapídne zmeny v spôsobe vykonávania a vyhodnocovania analýz. V historickom kontexte išlo o metódy označované skratkami RFLP, PCR či v súčasnosti STR. V článku rozpracované najmodernejšie technológie tzv. second generation sequencing predpokladajú dešifrovanie celého genómu jedinca, preto sú omnoho komplexnejšie a úplné, v porovnaní so staršími metódami. Predmetná metóda predstavuje revolučný krok v analýze DNA. Prínos nášho príspevku vidíme najmä v zhrnutí jednotlivých metód, ktoré sú v súčasnosti k dispozícii v súdnej genetike, ako aj v načrtnutí možných smerov, ktorými sa bude uberať súdna genetika v budúcnosti.

Uvedomujeme si, že analýza DNA predstavuje mimoriadne účinný nástroj pri identifikácii osôb. Využívanie kriminalistickej genetickej expertízy pri vyšetrovaní trestnej činnosti sa rozšírilo vďaka neustálemu technickému pokroku, unifikácii molekulárnych genetických identifikačných metód a ich pomerne vysokej presnosti. Nakoľko identifikačné skúmanie ľudskej deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) vedie za optimálnych podmienok až k individuálnej identifikácii človeka, považujeme neustále napredovanie v poznatkoch analýz DNA za nevyhnutné.

Pod'akovanie: Autori by sa radi pod'akovali Emilianovi a Ann-Christine, autorom predlôh, za dovoľenie prekladu i adaptácie, ako aj pani Mgr. Jane Odlerovej, vedúcej Oddelenia biológie a genetickej analýzy, Odbor prírodovedného skúmania a kriminalistických analýz, Kriminalistický a expertízny ústav PZ SR, za konštruktívne a kritické pripomienky k príspevku. Takisto ďakujeme pani PhDr. Eve Rísovej za trpezlivosť pri jazykovej úprave.

Zoznam bibliografických odkazov

2D Molecules That Form Our 3D World [online]. 2012-06-06 [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://skepchick.org/2012/06/2d-molecules-that-form-our-3d-world/>.

Anatomium 3D [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.anatomium.com/3d-anatomy-guarantee.html>.

BERGLUND, E. C., A. KIALAINEN a A.-Ch. SYVÄNEN. Next-Generation Sequencing Technologies and Applications for Human Genetic History and Forensics. *Investigative Genetics*. 2011, vol. 2, no. 23. ISSN 2041-2223.

- DNA Fingerprinting Methods [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.fingerprinting.com/dna-fingerprinting-methods.php>.
- GIARDINA, E., A. SPINELLA a G. NOVELLI. Past, Present and Future of Forensic DNA Typing. *Nanomedicine*. 2011, vol. 6, no. 2, s. 257-270. ISSN 1748-6963.
- Helicos BioSciences [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.helicosbio.com/>.
- KOŽINA, J. Právni aspekty využítí analýzy DNA pro identifikační účely. *Kriminalistika*. 2011, roč. 44, č. 1, s. 27-38. ISSN 1210-9150.
- KRAJNÍK, V. et al. *Kriminalistika*. 1. vyd. Bratislava: Akadémia Policajného zboru v Bratislave, 2005. 356 s. ISBN 80-8054-356-9.
- MEYERSON, M., S. GABRIEL a G. GETZ. Advances in Understanding Cancer Genomes through Second-Generation Sequencing. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2010, vol. 11, no. 10, s. 685-696 [cit. 2014-02-03]. ISSN 1471-0064. Dostupné na: <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n10/full/nrg2841.html>.
- Nabsys [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.nabsys.com/>.
- NHGRI. Trisomy [upravený obrázok] [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.genome.gov/Pages/Hyperion/DIR/VIP/Glossary/Illustration/Pdf/trisomy.pdf>.
- ODLEROVÁ, J. Využitie Y-STR polymorfizmov vo forenzej praxi. In: *Pokroky v kriminalistike 2005*. 1. vyd. Bratislava: Akadémia Policajného zboru v Bratislave, 2005, s. 123-134. ISBN 80-8054-359-3.
- Oxford Nanopore Technologies [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.nanoporetech.com/>.
- Pacific Biosciences [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.pacificbiosciences.com/>.
- PCR at a Glance. In: *Sciencelay* [online]. [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://sciencelay.com/biology/pcr-at-a-glance/>.
- SABO, M. a T. HAJDÚKOVÁ. Identifikácia počtu páchatel'ov analýzou DNA. *Kriminalistika*. 2012, roč. 45, č. 2, s. 142-147. ISSN 1210-9150.
- ŠIMOVICEK, I. et al. *Kriminalistika*. 1. vyd. Plzeň: Aleš Čeněk, 2011. 405 s. ISBN 978-80-7380-343-8.

STRAUS, J. et al. *Kriminalistická technika*. 2. rozšíř. vyd. Plzeň: Aleš Čeněk, 2007. 430 s. ISBN 978-80-7380-052-9.

WINNICK, E. DNA Sequencing Industry Sets Its Sights on the Future. In: *The Scientist* [online]. 2004-09-27 [cit. 2014-02-03]. Dostupné na: <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/15939/title/DNA-Sequencing-Industry-Sets-its-Sights-on-the-Future/>.

MUDr. Ján Miertuš, MSc.

Lekár – genetik
Slovenská republika
jan.miertus@gmail.com

MUDr. Vanda Rísová, PhD.

Lekárska fakulta
Univerzita Komenského v Bratislave
Sasinkova 4
811 01 Bratislava
Slovenská republika
vandariso@gmail.com

Doc. JUDr. Miroslava Vráblová, PhD.

Právnická fakulta
Trnavská univerzita v Trnave
Kollárova 10
917 01 Trnava
Slovenská republika
miroslava.vrablova@truni.sk