

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

Katedra antropologie a genetiky člověka

**Využití analýzy DNA v rámci forenzního zkoumání savčího
trichologického materiálu**

Vypracovala : Mária Štubňová, 2008

Školitelka :Mgr. Halina Šimková

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedených zdrojů, a souhlasím s jejím eventuálním zveřejněním v tištěné nebo elektronické podobě.

V Praze dne 14. 8. 2008


.....
Mária Štubňová

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Halině Šimkové za vedení této bakalářské práce, za její ochotu a čas, který mi věnovala při odborných konzultacích v průběhu psaní bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu při studiu a za čas, který věnovali mé výchově.

Moje poděkování patří také všem, který mi v posledních letech byli oporou a pomáhali mi, když bylo potřeba.

Obsah

Obsah.....	4
Abstrakt.....	6
Zkratky.....	8
1. Úvod.....	9
2. Trichologický materiál	10
2.1 Makroskopická stavba vlasu.....	11
2.1.1 Kořen.....	11
2.1.2 Tělo vlasu.....	12
2.1.3 Konec vlasu.....	12
2.2 Mikroskopická struktura vlasu.....	12
2.2.1 Kutikula.....	12
2.2.2 Kůra (Cortex).....	13
2.2.3 Dřeň (Medulla).....	13
2.3 Charakteristické znaky vlasů.....	14
2.3.1 Barva vlasu.....	14
2.3.1.1 Přírozená barva vlasu	14
2.3.1.2 Umělé ošetřování.....	15
2.4 Typy trichologického materiálu.....	16
2.4.1 Typy trichologického materiálu podle oblasti na těle.....	16
2.4.1.1 Vlasy hlavy.....	16
2.4.1.2 Vlasy obličejce.....	16
2.4.1.3 Axilární ochlupení.....	17
2.4.1.4 Ochlupení ohanbí.....	17
2.4.1.5 Chlupy končetin.....	17
2.4.2 Typy trichologického materiálu podle rasového původu.....	17
2.4.2.1 Kaukazoidní typ	17
2.4.2.2 Mongoloidní typ vlasů.....	18
2.4.2.3 Negroidní typ vlasů.....	18
2.5 Změna morfologie vlasu vlivem různých podmínek.....	18
2.5.1 pH vs. morfologie	18
2.5.2 Vzduch, vlhko vs. morfologie.....	18
2.6 Růst vlasu.....	19
2.6.1 Anagenní fáze.....	19
2.6.2 Katagenní fáze.....	19
2.6.3 Telogenní fáze.....	19
2.7 Složení vlasu.....	20
3. Forenzní analýza trichologického materiálu.....	22
3.1 Morfologická analýza trichologického materiálu.....	22
3.2 Genetická analýza trichologického materiálu.....	23
3.2.1 Obsah DNA ve vlasech.....	23
3.2.1.1 Jaderná DNA.....	24
3.2.1.2 Mitochondriální DNA.....	24
3.2.1.2.1 Heteroplazmie.....	25
3.3 Extrakce DNA z trichologického materiálu.....	25
3.3.1 Cheletační metoda.....	26
3.3.2 Fenol - chloroformová metoda.....	26
3.3.3 Extrakce DNA z trichologického materiálu v telogenní fázi růstu.....	27

3.3.4 Extrakce vazbou DNA na silikát.....	27
3.4 Analýza jaderné DNA – STR-typing.....	27
3.4.1 PCR.....	28
3.4.2 Kapilární elektroforéza.....	29
3.4.3 Mini-STR analýza.....	30
3.5 Analýza mitochondriální DNA.....	31
4. Využití forenzní analýzy trichologického materiálu v praxi - kauzistika.....	33
4.1 Snowball.....	33
4.2 Napadení člověka psem	33
4.3 Analýza historických pozůstatků.....	34
5. Závěr.....	35
.....	35
Citace.....	36

Abstrakt

Trichologický materiál je jedním z častých důkazních materiálů v kriminalistice. Proto je důležité najít vhodné způsoby jeho analýzy - jak morfologické, tak i genetické. Obě tyto metody se prolínají. Morfologická analýza je důležitá k určení morfologických vlastností vlasů, a je prvním krokem k identifikaci podezřelých. Morfologická analýza je potřebná mimo jiné i pro výběr trichologického materiálu, který je vhodný na genetickou analýzu. Před samotnou analýzou DNA je potřebné DNA z vlasu extrahovat. Mezi nejčastější metody extrakce DNA patří fenol-chloroformová metoda, chelatační metoda a metoda pomocí magnetosilikátových partikulí.

Pro analýzu DNA můžeme použít různé metody podle typu vyextrahované DNA. STR-typing je metoda pro analýzu dobře zachovalé DNA, miniSTR typing je preferovaná pro degradovanou jadernou DNA a sekvence je použita pro analýzu mitochondriální DNA. Forenzní analýza DNA má široké využití. Není to jen analýza pro právní účely (vyšetřování trestné činnosti, identifikace obětí, určení paternity atd.), ale i mimoprávní účely jako jsou různé populační studie nebo analýza historických pozůstatků.

Klíčová slova: analýza DNA, forenzní analýza, morfologická struktura vlasu, PCR, STR-typing, trichologický materiál

Abstract

Trichological material is one of the common physical evidence sources in crime investigation. It is therefore important to find appropriate means of morphologic and genetic analysis of hair. There is slight overlap between these methods. Morphologic analysis is used to distinguish various morphological features of hair, which can be helpful in identification of possible suspects. Morphologic analysis is needed, among other uses, for selection of trichological material eligible for genetic analysis. DNA must be extracted from the hair prior to being analyzed. Methods of DNA extraction include the phenol - chlorophorm method, chelation method and silica-based particle extraction method.

Different analysis methods are used for each form of DNA extracted. STR typing is the method of choice for well-conserved nuclear DNA, miniSTR typing is preferable for degraded nuclear DNA analysis, and PCR amplification is used for analysis of mitochondrial DNA. Forensic DNA analysis has a variety of uses ranging from forensic evidence (victim identification, paternity testing...) to scientific research, such as population studies or historical remains analysis.

Keywords: DNA analysis, forensic analysis, morphological structure of hair, PCR, STR typing, trichological material

Zkratky

DDT	dichlordifenyltrichlorethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
HCl	kyselina chlorovodíková
HV1, HV2	hypervariabilní oblast 1, 2
nDNA	jaderná deoxyribonukleová kyselina
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
pb	párů bází
PCR	polymerázová řetězová reakce
SNP	bodové polymorfismy
STR	krátké tandemové repetice
VNTR	variabilní počet repetitivních useku DNA

1. Úvod

Vlasy a chlupy jsou jedním z morfologických znaků, typických pro savce. Každý den přirozeně ztrácíme vlasy, a proto je trichologický materiál častým materiálem ve forenzním zkoumání (Linch *et al.*, 2001).

Analýza trichologického materiálu se rovněž dobře uplatňuje v rámci populačních studií, nebo medicínských vyšetření, neboť materiál může být získáván neinvazivními metodami.

Morfologická analýza trichologického materiálu je prvním krokem, po ní následuje analýza DNA. Obě jsou důležité a doplňují se. I když morfologická analýza neurčí přesnou identitu jedince, u maternálně příbuzných je jedinou možností, jak určit rozdílnost (Roberts and Calloway, 2007).

Při morfologické analýze zkoumáme morfologické znaky trichologického materiálu, jako je délka, přítomnost kořínku a v neposlední řadě vhodnost pro analýzu DNA. Analýza DNA z trichologického materiálu je obvykle založena na PCR metodách (Deedrick, 2000).

Genetická analýza trichologického materiálu má dnes široké využití, a to jak v populačních studiích, tak v kriminalistice nebo například v biomolekulární archeologii.

2. Trichologický materiál

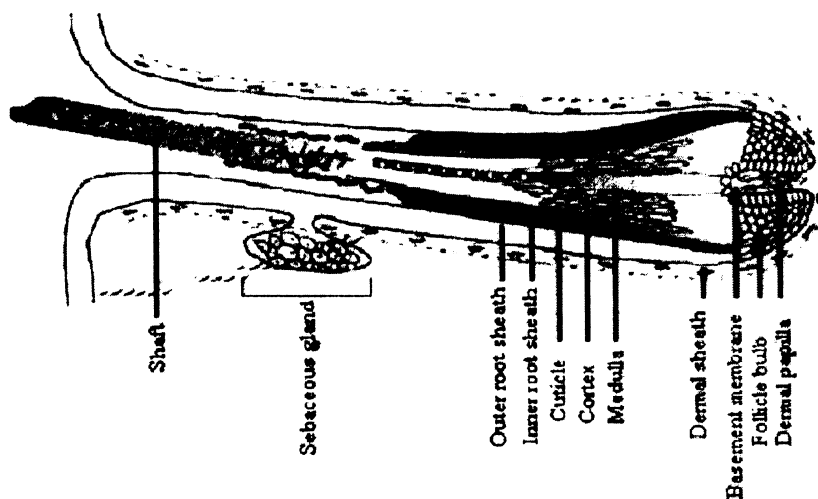
Trichologie je vědní obor, který se zabývá studiem kůže a jejích derivátů – vlasů a chlupů. Slovo trichologie pochází z řeckého slova trichos, které znamená vlas nebo chlup.

Mezi deriváty kůže, které už nespádají do oblasti zkoumání trichologie, řadíme např. peří ptáků nebo epidermální šupiny plazů (Roček, 2002).

S výjimkou dermální papily, která je mesodermálního původu, je vlas ektodermálního původu. Dermální papila je důležitá pro růst vlasu. Je tvořena pojivovou tkání a krevními cévami, které zajišťují výživu během růstu vlasů (Linch *et al.*, 2001). Kromě toho, obsahuje dermální papila receptory pro mužské hormony a androgeny. Androgeny regulují růst vlasu a mohou zmenšit velikost vlasového váčku a tím zjemnit vlasy u lidí, kteří mají pro to genetickou predispozici (Forslind *et al.*, 2004).

Struktura vlasů a chlupů je přibližně stejná. Pouhým okem na nich můžeme rozeznat tři oblasti: kořen, tělo a špičku. Na průřezu dále rozeznáváme tři hlavní oblasti: kutikulu, kůru (cortex) a dřeň (medulla) (Robertson, 1999; Hausman, 1925).

Mikroskopická i makroskopická struktura trichologického materiálu může být druh od druhu poměrně rozmanitá. Tyto rozdíly jsou známy již po staletí. První práce na toto téma byla zveřejněná už v roce 1663, kdy o těchto rozdílnostech ve stavbě a struktuře vlasů napsal ve svém pojednání Hook do Royal Society. (Houck and Budowle, 2002).



Morfologická struktura vlasů. Převzato z Popescu and Hartwig, (2007)

Hlavní rozdíly mezi zvířecím a lidským trichologickým materiálem jsou uvedeny v následující tabulce (Převzato z Robertson 1999).

Znak	Člověk	Zvíře
Barva	Relativně stejná po celé délce	Často výrazná změna barvy, pruhování
Distribuce pigmentu	Rovnoměrná, mírně zvýšená směrem ke kutikule	Centrální nebo zhuštěná při medulle
Cortex	Zabírá většinu vlasu, je širší než medulla	Užší než medulla
Medulla	Méně než 1/3 šířky vlasu, amorfni, většinou diskontinuální, je-li přítomná	Více než 1/3 šířky vlasu, kontinuální, její vzhled se mění se podél chlupů a má výraznou strukturu
Kutikula	Šupinovitě kladená podél celého vlasu od kořínku po špičku	Často vykazuje změny podél celého chlupu

Mezi nejdůležitější funkce trichologických útvarů patří teplotní izolace, ale význam mají též v sociální a sexuální komunikaci (Forslind *et al.*, 2004).

V následujících kapitolách se budu zaměřovat hlavně na trichologii lidského materiálu.

2.1 Makroskopická stavba vlasu

Na vlasu rozeznáváme tři oblasti: kořen, tělo a špičku vlasu.

2.1.1 Kořen

Součástí kořene je vlasová cibulka, která obklopuje dermální papilu. Kořen je rostoucí částí vlasu, buňky kořene nejsou ještě na rozdíl od zbytku vlasu keratinizované. Proto je vlas v této fázi růstu vhodným materiálem pro analýzu jak mtDNA, tak i nDNA.

Podle kořene vlasu můžeme zjistit, v jaké růstové fázi je námi zkoumaný vlas. Kořen z telogenního vlasu je asi o 1/3 kratší než z anagenního vlasu (více o telogenních a anagenních vlasech v kapitolách 2.6.1, 2.6.3). Většinou ale kořen na telogenních vlasech chybí (Linch *et al.*, 2001, Deedrick and Koch, 2004 a).

Další důležitou informací, kterou nám kořen vlasu poskytuje, je to, jestli byl násilně vytrhnut nebo přirozeně vypadl. Vytržené vlasy mají na sebe adheřované epitelální

buňky pokožky, které jsou důležitým materiálem na získání nDNA (Linch *et al.*, 2001; Deedrick 2000).

2.1.2 Tělo vlasu

Tělo může mít různou délku podle toho, jestli zkoumáme lidský nebo zvířecí trichologický materiál.

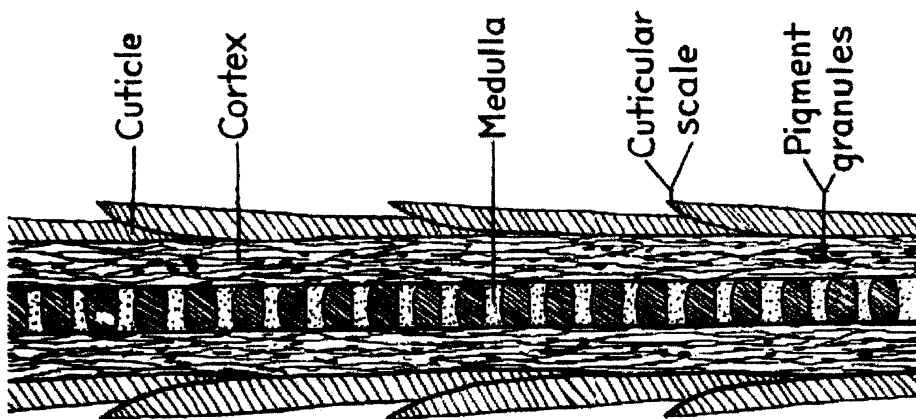
U člověka se liší délka podle toho, ze které části je námi zkoumán vlas či chlup (Deedrick, 2000).

2.1.3 Konec vlasu

Neporušený a špičatý konec vlasu nacházíme jenom u novorozence. Ve většině případů je konec vlasu roztřepený vlivem vnějších podmínek.

2.2 Mikroskopická struktura vlasu

Na průřezu rozdělujeme vlas do třech oblastí: kutikuly, kůry a dřeně. Kutikula se ještě někdy dělí na vnitřní a vnější vrstvu (Forslind *et al.*, 2004).

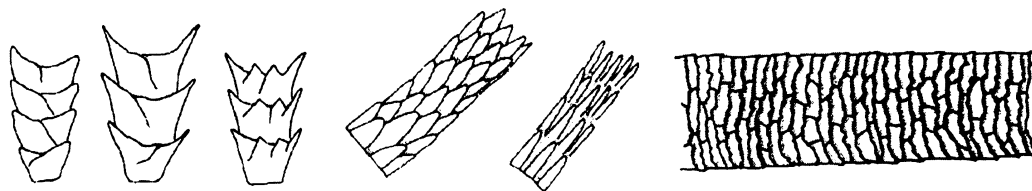


Mikroskopická stavba vlasu. Převzato z Hausman (1924).

2.2.1 Kutikula

Je vnější průsvitná vrstva, jakási pokožka vlasu. Je tvořena ze zrohovatělých buněk, které jsou taškovitě naskládány na sobě. Mohou být různého tvaru.

V dřívějších studiích se uváděly dva typy: korunovité a taškovité (Hausman, 1920). K dnešnímu dělení se přidává ještě jeden typ - lupenovitý. Korunovitý a lupenovitý tvar buňky je typický pro různé druhy savců, zatímco taškovitý tvar buněk nacházíme jenom u člověka (Deedrick and Koch, 2004).



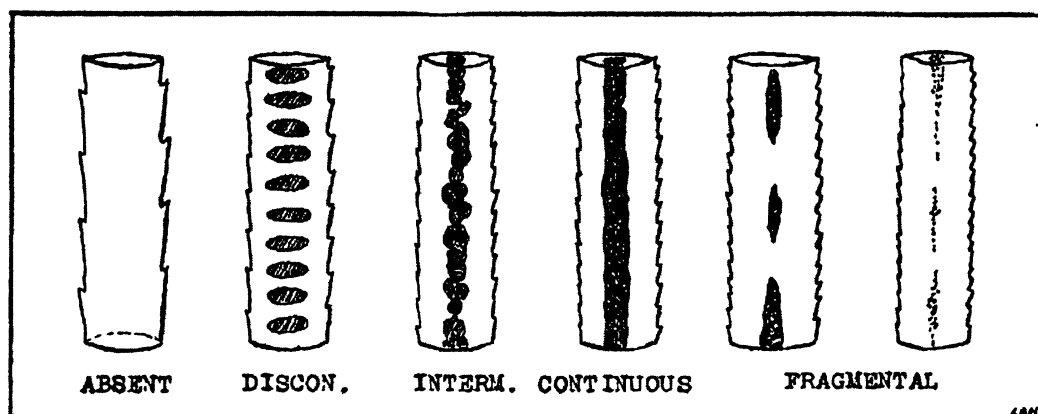
Typy šupin vyskytující se na trichologickém materiálu (převzato z Deedrick and Koch, 2004).

2.2.2 Kůra (Cortex)

Kůra, označovaná také jako cortex, je centrální částí vlasu. Pravděpodobně vzniká z matrixu buněk papily. Nad oblastí vlasové cibulky se v buňkách medully objevují vezikuly, které jsou od úrovně epidermis naplněné vzduchem. Pod světelným mikroskopem se jeví jako černá nebo neprůhledná struktura. Cortex je v lidských vlasech většinou amorfní. Naproti tomu u zvířat se dá dobře definovat (Houck and Budowle, 2002; Robertson, 1999; Hausman, 1925).

2.2.3 Dřeň (Medulla)

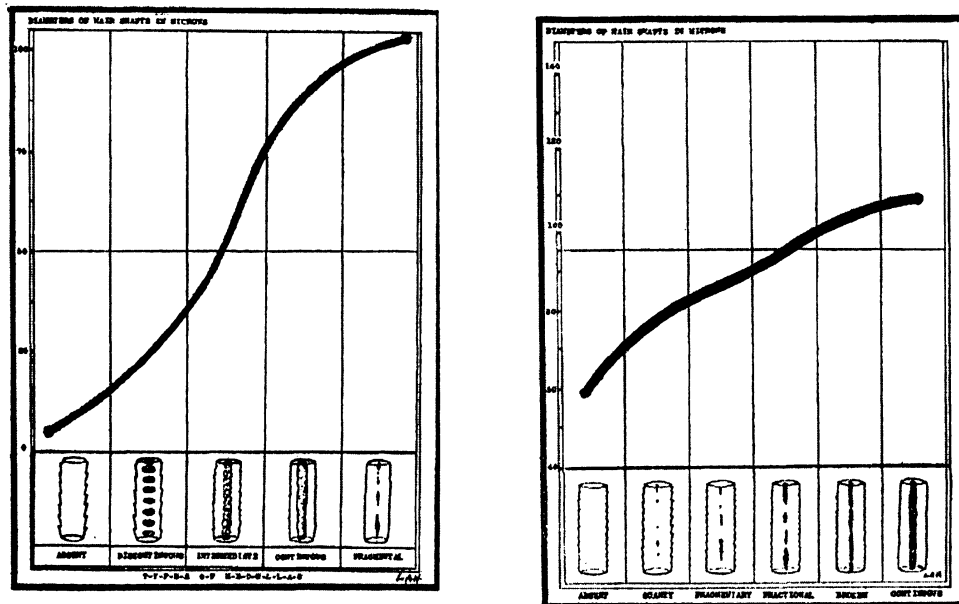
Nachází se v centrální části vlasů. Skládá se z podlouhlých buněk. V lidských vlasech může být medulla kontinuální, diskontinuální nebo úplně chybí (Hausman, 1925).



Typy medully při trichologickém materiálu. Převzato z Hausman (1930).

Hausman (1930) ukázal ve své studii, že tvar medully závisí od průměru chlupu. Pozorováno bylo 197 druhů savců včetně *Hominidea*. Při malém průměru medulla nebyla pozorována, při zvětšování průměru byla kontinuální a při větších průměrech se začala fragmentovat.

U lidských vlasů měl vývoj tvaru medully jiný průběh. Při malých průměrech nebyla medulla přítomná, při zvětšování průměru byla pozorována fragmentovaná medulla. Při větších průměrech byl pozorován postupný přechod ke kontinuálnímu tvaru medully.



Závislost mezi průměrem vlasu a tvaru medully savčího (vlevo) a lidského (vpravo) trichologického materiálu. Převzato z Hausman (1930).

2.3 Charakteristické znaky vlasů

Vlas můžeme charakterizovat podle různých znaků – jeho barvy, délky, síly atd. (Linch *et al.*, 2001).

2.3.1 Barva vlasu

Barvu vlasů můžeme dělit na přirozenou a umělou. Přirozená barva vlasů je výsledkem přítomnosti vlasového barviva – melaninu. Nepřirozenou barvu vlasů získáme pomocí syntetických nebo přírodních barev.

2.3.1.1 Přirozená barva vlasu

Barva vlasů je dána přítomností melanocytů. Jsou to buňky, které se nacházejí ve vlasovém váčku, s vysokými energetickými nároky.

Melanocyty se dělí poměrně pomalu, vzhledem k rychle dělícím se buňkám matrixu vlasu. Během maturace tvoří melanocyty stromovitá ramínka, která obsahují

mitochondrie a melanosomy (obsahují pigmentová grana - melanin). Ty se za pomoci kortikálních buněk přesouvají z vlasového váčku do těla vlasu.

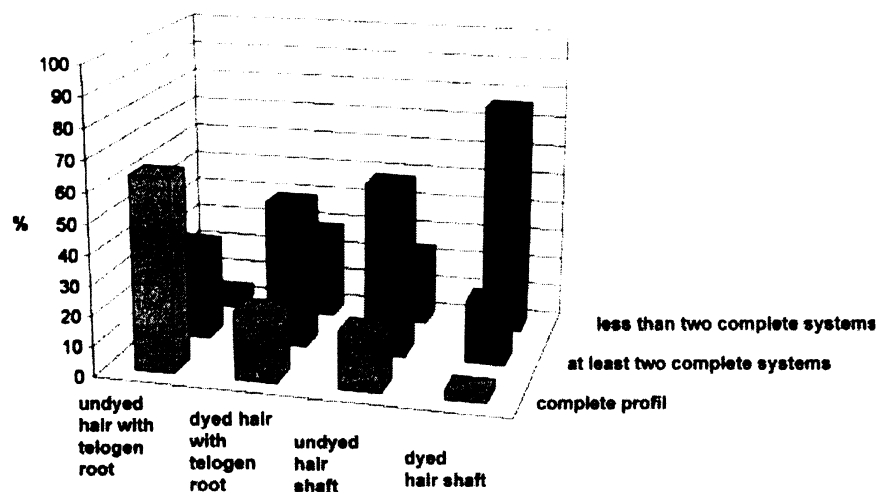
Melanosomy tvoří dva druhy melaninu – eumelanin a pheomelanin. Výsledná barva vlasu je určena jejich poměrem. Více pheomelaninu má za následek tmavé zbarvení vlasů, zatímco více eumelaninu variaci barev vlasů od blond po červenou.

V šedivějících vlasech klesá počet melanocytů i jejich aktivita (Linch *et al.*, 2001).

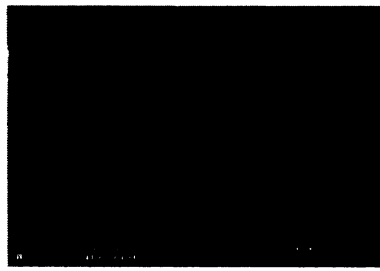
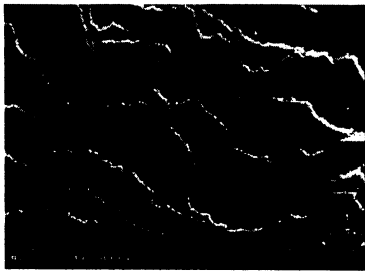
2.3.1.2 Umělé ošetřování

Kromě přirozené barvy vlasů se dnes setkáváme i s jinými barvami, které jsou vytvořené za pomoci barvení vlasů.

Základem většiny barev na barvení vlasů jsou látky jako např. para-phenylenediamine, 2,5-diaminotoluene, 2,4-diaminoanisole. Tyto látky způsobují oxidativní poškození DNA, a proto je analýza z takovýchto vlasů často neúspěšná. Jak můžeme vidět na následujícím grafu, získání kompletního profilu pomocí miniSTR-typingu bylo minimální. V případě, že měl vlas koříněk byla analýza výrazně úspěšnější (Müller *et al.*, 2007).



Úspěšnost miniSTR-typingu na nebarvených a barvených vlasech. Převzato z Müller *et al.*, (2007).



Rozdíl v morfologii kutikuly barvených (vpravo) a nebarvených vlasů (vlevo). Převzato z Müller *et al.*, (2007).

2.4 Typy trichologického materiálu

Rozdělit trichologický materiál můžeme na základe různých kritérií, např. podle barvy, délky, rasy nebo oblasti těla, ze které pochází.

2.4.1 Typy trichologického materiálu podle oblasti na těle

Podle umístění na těle rozlišujeme u člověka tyto oblasti (Houck and Budowle, 2002):

1. Vlasy hlavy
2. Vlasy obličeje (obočí, řasy, chloupky v uších nebo nose, brada, vousy)
3. Axilární ochlupení
4. Ochlupení ohanbí
5. Chlupy končetin

2.4.1.1 Vlasy hlavy

Vlasy hlavy pokrývají kůži neurokrania s výjimkou dolní části čelní kosti. Na šíji přecházejí v chloupky.

Medulla vlasů hlavy je diskontinuální a relativně se zužuje v porovnání s medullou z jiných oblastí těla. Mají relativně malý kořen a všechny variace tvaru jsou známé. Délka se většinou pohybuje v rozmezí od 100 do 1000 mm a na průřezu se jejich průměr pohybuje v rozmezí od 25 do 125 mikrometrů.

Můžeme na nich pozorovat umělé ošetření (např. barvení), blednutí způsobené sluncem nebo mechanické poškození způsobené vlivem vnějších podmínek (Deedrick and Koch, 2004 a; Deedrick, 2000; Robertson, 1999).

2.4.1.2 Vlasy obličeje

Mezi chlupy obličeje jsou řazeny vlasy knírku a vousu, obočí a řasy.

Knírek má větší kořínek než vlasy hlavy, více komplexnější medullu, tupější konec a jeho délka se pohybuje v rozmezí od 50 do 300 mm. Obočí a řasy mají průměrně kolem 10 mm, mají zakřivený tvar a velkou medullu (Fernando *et al.*, 2003; Deedrick, 2000; Robertson, 1999).

2.4.1.3 Axilární ochlupení

Axilární ochlupení patří mezi sekundární znak u obou pohlaví. Slouží mimo jiné k pohlčení potu nebo k zabránění nadměrnému tření v podpaží (Deedrick, 2000; Robertson, 1999; Deedrick, 2000; Hausman, 1925).

2.4.1.4 Ochlupení ohanbí

Ochlupení ohanbí je podobné axilárnímu ochlupení a je sekundárním znakem u obou pohlaví. Jeho výhodou je, že se nemění tak rychle jako vlasy hlavy, a proto je možné ho mikroskopicky zkoumat a porovnávat i po letech. Má vzhled podobný drátu, na pohled je vlákno silné, přičemž nacházíme různý průměr a diskontinuální medullu. Většinou je zakřivený, i když se vyskytuje i přímý nebo spirálovitý tvar (Deedrick and Koch, 2004 a; Deedrick, 2000; Robertson, 1999).

2.4.1.5 Chlupy končetin

Vlasy končetin jsou kratší obloukovité a často odřené. Pigment v nich je většinou granulovitý a medulla diskontinuální. Při mikroskopickém zkoumání nacházíme rozdíly mezi jedinci, ale tyto rozdíly nejsou dostatečným důkazem pro identifikaci (Linch *et al.*, 1998; Hausman, 1925).

2.4.2 Typy trichologického materiálu podle rasového původu

Podle rasového původu rozlišujeme vlasy kaukazoidní (Evropa), negroidní (Afrika) a mongoloidní (Asie) (Franbourg *et al.*, 2003).

Určování rasy na základě mikroskopické analýzy vlasu míšence není jednoduché, protože obsahují charakteristické znaky ras obou předků (Deedrick, 2000).

2.4.2.1 Kaukazoidní typ

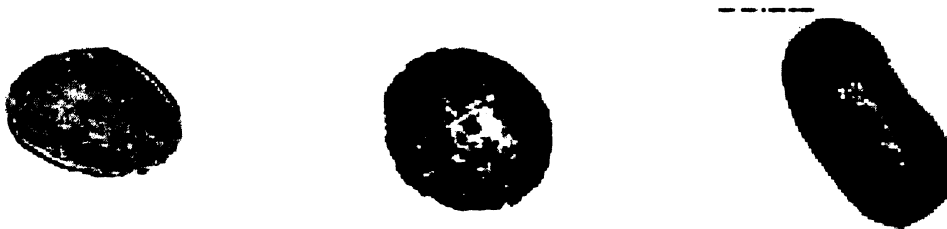
Vlasy kaukazoidního typu mohou být na pohled rovné nebo zvlněné, barevný rozsah je od blond po černé. Mají větší obsah vody jak negroidní typ vlasů. Na řezu je tělo vlasu kulaté až oválné a má rovnoměrně rozložený pigment (Franbourg *et al.*, 2003; Deedrick, 2000).

2.4.2.2 Mongoloidní typ vlasů

Mongoloidní typ vlasů je na řezu kruhový a má největší průměr v poměru k ostatním typem vlasů. Medulla je široká a kontinuální. Pigmentové granule jsou umístěné v cortexu a jsou seskupené (Franbourg *et al.*, 2003; Deedrick, 2000).

2.4.2.3 Negroidní typ vlasů

Negroidní vlasy jsou na pohled kudrnaté, vlnité a na průřezu mají elipsovité tvar. Nejsou tak silné v tahu jako předcházející dva typy vlasů. Jsou křehčí a proto se zlomí snáz než kaukazoidní typ vlasů. Pigmentové granule jsou větší než u obou předcházejících a jsou seskupené ve shlucích různých velikostí a tvaru (Franbourg *et al.*, 2003, Deedrick, 2000).



Porovnání kaukazoidního, mongoloidního a negroidního typu vlasů. Převzato z Petraco and Kubic, (2003).

2.5 Změna morfologie vlasu vlivem různých podmínek

2.5.1 pH vs. morfologie

Při stoupajících hodnotách pH vlas začíná degradovat. Při pH 11,4 začne vlas ztrácet svou cylindrickou strukturu už po 5 minutách, po pár dalších minutách se vlas rozpadává. V pH 4 vlas nevykazuje takovéto chování a zůstává nedotčený i po dobu 30 minut. Vysvětlením toho by mohlo být přeskupování iontů. Vyšší hodnoty pH mají za následek náchylnost vlasu k hydrataci. Při nižších hodnotách pH zůstávají ionty nabitě a adsorbují do vlasu (O'Connor *et al.*, 1995).

2.5.2 Vzduch, vlhko vs. morfologie

Vlas je náchylnější k poškození, když je mokrá, než když je suchý. Vlas má 3D strukturu z proteinu – keratinu a přidáním vody se může tato struktura oslabit, protože se přerušují vodíkové můstky mezi keratinem. V studii O'Connor *et al.*, (1995) byly vlasy experimentálně ponořeny do vody a pufry. Bylo pozorováno nabobtnání vlasu. Toto bobtnání je způsobené dvěma faktory, a to tím, že vnější vrstva nasaje větší objem vody

než celý vlas, nebo že překrývající se buňky kutikuly se oddělí, jakmile jsou hydratované. Jestliže by byl vymyšlen kondicionér nebo vlasový přípravek zabraňující hydrataci vlasů, sloužil by jako ochranný obal vlasu. Efektivita tohoto přípravku by závisela na makroskopické proporcionalitě vlasu (O'Connor, *et al.*, 1995).

2.6 Růst vlasu

Vlas má cyklický růst. Opakují se zde tři růstová stádia – anagenní, katagenní a telogenní. Na lidské kštici najdeme v průměru 100 000 – 150 000 vlasových váčků, které jsou v různém stádiu růstu. Za jeden den nám průměrně vypadne 50 – 100 vlasů (Linch *et al.*, 1998).

2.6.1 Anagenní fáze

První růstové stadium vlasu se nazývá anagenní (růstová) fáze neboli anagen. Vyznačuje se aktivním růstem vlasu, přičemž rychlé dělení buněk vyžaduje přísun velkého množství energie, kterou dodávají mitochondrie. V této fázi se nachází 80 % - 90 % vlasů a tato fáze trvá cca 2-8 let. Vlasy v tomto růstovém stadiu jsou dobrým materiálem pro získání mtDNA a nDNA.

Většina vytržených vlasů se nachází v tomto stadiu růstu (Roberts and Calloway, 2007). Důkazem vytržení je adheovaná folikulární tkáň z cibulky nebo epitelální buňky, které jsou dobrými zdroji pro analýzu nDNA (Graham, 2007; Linch *et al.*, 1998).

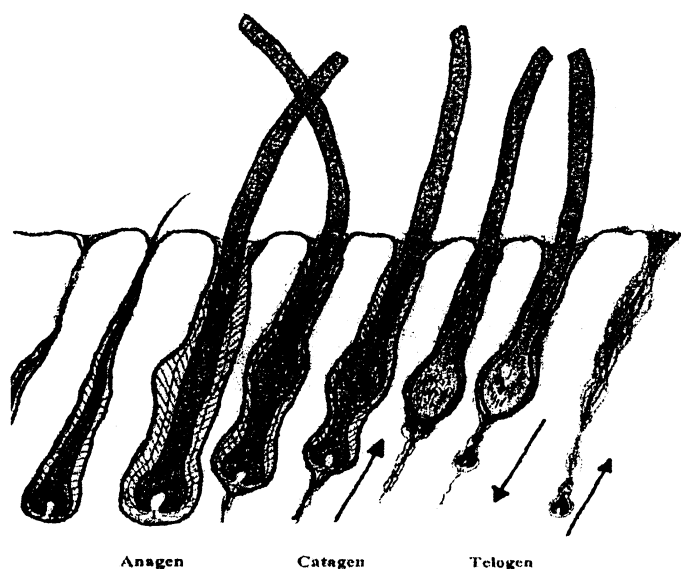
2.6.2 Katagenní fáze

Po fázi aktivního růstu nastává katagenní (degenerační) fáze neboli katagen, během které se omezuje mitotické dělení buněk a tím i produkce nové nDNA. MtDNA zůstává i nadále dobrým zdrojem DNA pro forenzní analýzu. Toto stadium trvá jen 2 – 4 týdny, proto vlasy v tomto stadiu nacházíme nejméně (Graham, 2007).

2.6.3 Telogenní fáze

Poslední růstovou fází je telogenní (klidová) fáze, neboli telogen. Tato fáze trvá 2 – 4 měsíce. Je charakteristická přirozeným vypadáváním vlasů. Proto jsou tyto vlasy nejčastějším důkazním materiálem (Linch *et al.*, 1998).

Telogenní vlas je charakteristický svou keratinizací a často mu chybí i kořínek. Kvůli této skutečnosti je z něho těžké získat nDNA, která je v těchto vlasech degradována. Proto jsou vhodnější pro analýzu mtDNA (Linch *et al.*, 2001).



Růst vlasů. Převzato z Linch *et al.*, (2001).

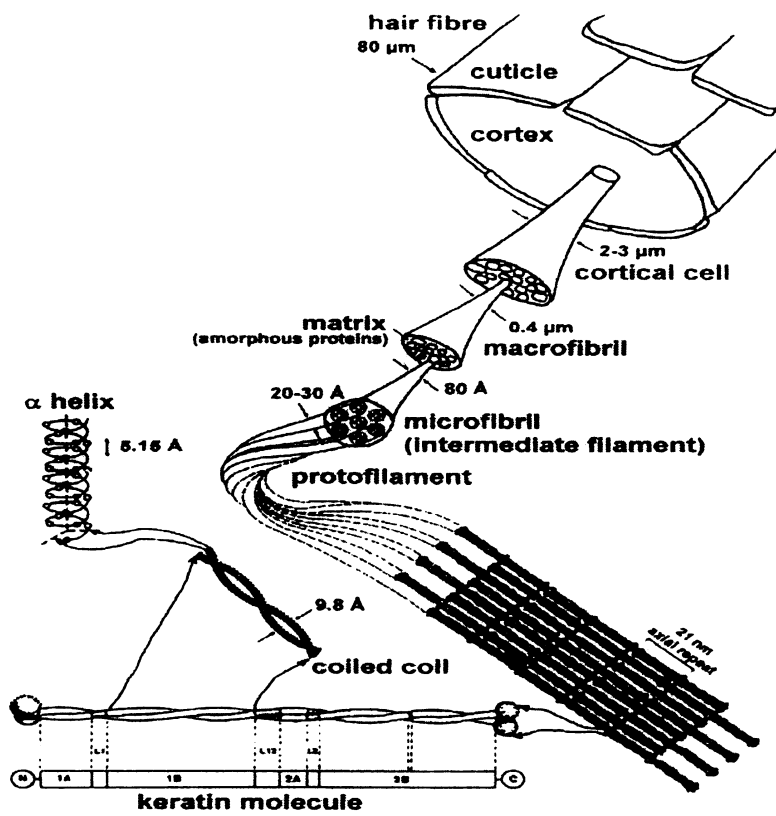
2.7 Složení vlasu

V kapitole 2.1 a 2.2 byla popsána morfologická a mikroskopická stavba vlasů.

Vlas se skládá z cca. 65 – 69 % proteinů, 15 – 35 % vody a 1 – 9 % lipidů.

Corex, hlavní část vlasu pozůstává z 90% z bílkoviny – keratinu. Konformace keratinových vláken je především helikální a jsou propojované kromě slabých vodíkových vazeb také kovalentními disulfidickými vazbami mezi cysteinovými zbytky. Změnou podílu cysteinu se může změnit také jejich tuhost.

Vodíkové vazby se rozruší lehko pomocí vlhkosti nebo vodou, ale po vysušení se tyto vazby opět obnoví. Naproti tomu rozrušit disulfidické vazby je obtížnější (Franbourg *et al.*, 2003; Robertson, 1999).



Struktura vlasu. Převzato z Franbourg *et al.*, 2003.

3. Forenzní analýza trichologického materiálu.

Termín „forenzní“ pochází z latinského slova forensis a znamená veřejný, soudní. Tedy forenzní analýza je analýza, která se zabývá zkoumáním nejrůznějšího materiálu pro soudní nebo právní účely. Trichologický materiál je jedním z častých materiálů nejen ve forenzních případech, ale také v medicíně atd. Výhodou je, že se při jeho odběru používají neinvazivní metody.

Ve forenzních laboratořích se provádí jako první mikroskopická analýza vlasu nebo chlupu, a pokud vlas splní určitá kritéria, následuje analýza DNA (nDNA nebo mtDNA).

Při mikroskopické analýze se vylučují vlasy, které nejsou vhodné ani pro mikroskopické porovnávání, ani pro analýzu DNA (Linch *et al.*, 2001; Deedrick, 2000).

Vzhledem k počtu obyvatel a zvířat na naší planetě se mohou jisté morfologické znaky v populaci opakovat. Tedy i vlasy od dvou různých jedinců mohou být na pohled shodné. Proto se jako následující krok analyzuje DNA z vlasového vzorku.

Při analýze mtDNA může nastat opačná situace. Analýza mtDNA neukáže dostatečné rozdíly při analýze maternálně příbuzných. Proto je tady důležitá mikroskopická analýza, která poukáže na morfologické rozdíly na zkoumaném materiálu (Linch *et al.*, 2001; Deedrick, 2000).

3.1 Morfologická analýza trichologického materiálu

Jak již bylo zmíněno, morfologická analýza je prvním krokem v analýze trichologického materiálu.

Ptáme se při ní na následující otázky :

1. Jedná se o vlas, chlup nebo vlákno?
2. Je vhodné pro morfologickou identifikaci (velikost vlasu, jeho úplnost, dostatek charakteristických rysů nebo poškození)?
3. Jedná-li se o vlas nebo chlup, je potřebné ho taxonomicky zařadit. U zvířecích chlupů se stanovuje druh, ze kterého chlup pochází, u člověka stanovujeme tělesnou oblast a rasu.
4. Jako poslední otázku si klademe, jestli je vlas vhodný k analýze DNA. Podle jeho morfologie se můžeme rozhodnout, zda zvolit analýzu mtDNA (např. telogenní vlas bez kořínku) nebo analýzu nDNA (Houck and Budowle, 2002; Deedrick, 2000).

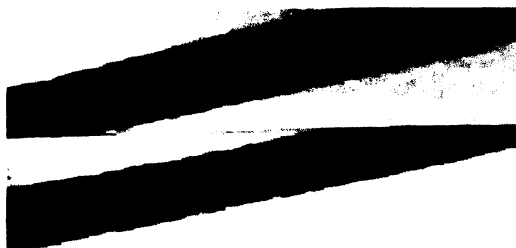
U zvířecího trichologického materiálu určíme druh na základě specifických morfologických znaků charakteristických pro různé taxony.

U lidského trichologického materiálu je důležité určit oblast těla, ze které vlas pochází a rasu.

Pro forenzní vyšetřování jsou nejdůležitější vlasy kštice a ochlupení ohanbí (Houck and Budowle 2002; Deedrick, 2000).

Při srovnávání (pomocí morfologické analýzy) neznámého vzorku vlasu nebo chlupu se známým vzorkem můžeme dospět k následujícím závěrům :

1. Vzorky jsou stejné, tedy se morfologicky shodují.
2. Vzorky jsou si podobné, i když s malými morfologickými odlišnostmi. Podezřelého nemůžeme ani usvědčit ani vyloučit z podezření.
3. Vzorky jsou morfologicky odlišné. Podezřelou osobu můžeme vyloučit (Houck and Budowle, 2002).



Shoda vlasů na základě mikroskopického porovnání. Převzato z Deedrick (2000).

3.2 Genetická analýza trichologického materiálu

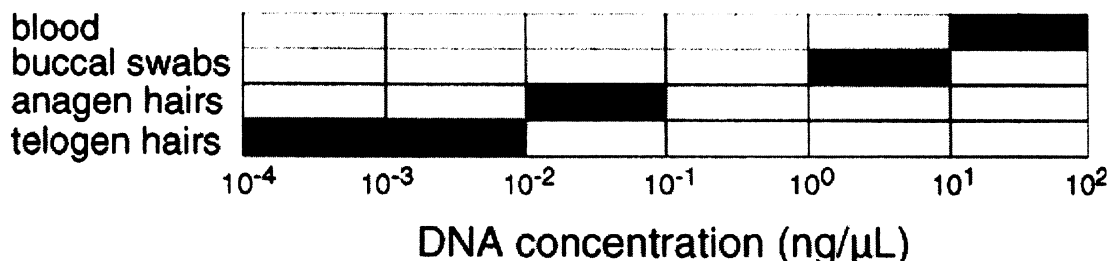
V morfologické analýze se určuje růstové stádium, v němž se vlas nachází a jeho morfologická stavba. Podle těchto skutečností můžeme zhodnotit, jestli je smysluplné dělat analýzu mtDNA nebo nDNA.

3.2.1 Obsah DNA ve vlasech

Obsah DNA v buňce je závislý na mnoha faktorech, zahrnujících jak stáří zkoumaného vlasu, jeho délku, sílu, ale také jestli je vlas barven nebo ne (Melton *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007).

Higuchi *et al.* (1988) kvantitativně porovnávali množství DNA ve vlasech čerstvě vytržených a vypadnutých. Tyto experimenty ukázaly, že v čerstvě vytržených vlasech je obsah DNA 200ng a ve vypadlých vlasech je jí jenom 10ng (Higuchi *et al.*, 1988).

Koncentrace nDNA v anagenních vlasech jen 1% v porovnání koncentrací nDNA ve steru z bukální sliznice. U telogenních vlasů je to jen 0,1% (McNevin et al., 2005 b).



Převzato z McNevin *et al.*, (2005 b).

Protože většina vlasů, které nacházíme na místě činu jsou vlasy v telogenní fázi růstu, detekujeme ve vlasu častěji obsah mtDNA, která je v buňce v tisícinásobných kopiích. Jedním z důležitých faktorů výtěžnosti DNA je také, jestli je vlas kompletně rozpuštěn (Müller *et al.*, 2007).

3.2.1.1 Jaderná DNA

Struktura DNA je označovaná jako double – helix, která je uspořádaná do celků vyšší úrovně zvaných chromozomy.

Jaderná DNA obsahuje cca 3000 Mb, v nichž je kódováno 30-35 000 genů. Jaderná DNA je rozdělena do 22 autozomů a 1 páru gonozomů. U zvířat je počet chromozomů různý, např. kočka domácí má 18 párů autozomů a 1 pár gonozomů (Alberts *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2002).

Pro analýzu nDNA jsou nejvhodnější tandemově repetitivní sekvence. Ve forenzní genetice se používají vysoce repetitivní sekvence jako minisatelity neboli VNTR a mikrosatelity neboli STR (Lynch T *et al.*, 2002).

Pro extrakci nDNA z vlasů jsou nejlepší anagenní vlasy s kořínkem. V telogenních vlasech je již obvykle nDNA degradována .

3.2.1.2 Mitochondriální DNA

MtDNA se nenachází přímo v jádře, ale v mitochondriích, které jsou součástí buňky. Jsou to semikonzervativní organely, které jsou „energetickou továrnou“ buňky. V buňce můžeme najít mitochondriální genom i v tisících kopiích. Narozdíl od nDNA je mtDNA prokaryotického typu a je tedy cyklická, přičemž u člověka má většinou konstantní délku 16 569 pb. Mitochondriální genom kóduje 37 genů, z toho 24 genů se podílí na tvorbě proteosyntetického aparátu mitochondrií (geny pro 16S a 23S rRNA a 22 genů

pro tRNA). Zbývajících 13 genů se podílí na vlastních polypeptidech, podílejících se na enzymatické výbavě mitochondrií (Holland and Parsons, 1999).

Na mtDNA můžeme rozoznat lehký řetězec, který obsahuje většinou pyrimidinové báze, a těžký řetězec s vyšším obsahem purinových bází. Kromě kódující oblasti nacházíme v mtDNA důležitou nekódující oblast zvanou „control region“ (CR). Tato oblast se také někdy nazývá D-loop.

CR obsahuje 2 hypervariabilní oblasti : HV1 od polohy 16024 do 16365 a HV2 od polohy 73 až 340 (Fernando *et al.* 2003; Holland and Parsons, 1999).

Mutace u mitochondriální DNA jsou častější než u jaderné DNA vzhledem k nepřítomnosti reparačních mechanismů (např. reparační mechanismus polymerázy) (Holland and Parsons, 1999).

3.2.1.2.1 Heteroplazmie

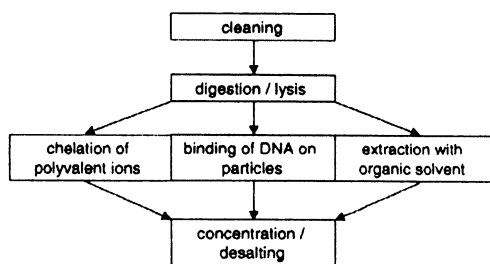
Heteroplazmie je existence více než jedné populace mtDNA v tkáni, resp. buňce. Výskyt heteroplazmie v populaci je 2-8 % (Hühne *et al.* 1999). V rámci forenzního zkoumání může přítomnost tohoto jevu přidat na váze důkazu, protože daná heteroplazmie je typická pro danou osobu (Holland and Parsons, 1999).

Byly však i studie ukazující dvě různé heteroplazmie v jediném těle vlasu nebo jiný typ heteroplazmie ve vlasu a jiný v krvi oběti. Proto je třeba k této skutečnosti přihlídnout (Holland and Parsons, 1999; Hühne *et al.* 1999;).

3.3 Extrakce DNA z trichologického materiálu

Je důležitá pro uvolnění DNA z buňky. Extrakce DNA se může lišit v některých krocích. Největší variabilita je při purifikaci roztoku. Extrakce DNA je prováděna podle těchto kroků:

1. čištění trichologického materiálu - pro případné zabránění kontaminace vzorku, používá se 70% roztok etanolu
2. jeho rozpuštění - je důležité pro uvolnění DNA
3. purifikace může mít různé postupy
4. zahušťování pro získání koncentrovanějšího roztoku



Čtyři kroky, které jsou používány při extrakci DNA. V kroku tři jsou možné různé varianty. Převzato z McNevin *et al.*,(2005a).

Nejrozšířenějšími metodami pro analýzu DNA jsou chelatace, fenol-chloroformová metoda a vazba na silikátové partikule.

Pro extrakci DNA jsou používány hlavně komerční kity jako např. Qiagen® (Qiagen, Germany), nebo Gene Clean® (Q Biogene, USA), které jsou založené na těchto metodách.

3.3.1 Cheletační metoda

Do ependorfy s vlasovým vzorkem byl přidán 5% roztok Chelex® 100 a proteinázy K. Po dobrém zvortexování je roztok inkubován několik hodin. Následně je roztok znovu zvortexován a ponořen do vodní lázně, pro inaktivaci enzymů. Po další centrifugaci se supernatant přeneso do jiné ependorfy a může být dále použit na PCR amplifikaci (Suenaga and Nakamura, 2005).

3.3.2 Fenol - chloroformová metoda

Do ependorfy s vlasovým vzorkem byl přidán extrakční pufr, roztok enzymu (DDT, proteinkináza K) a roztoku pro lýzu vlasů. Po následné inkubaci a centrifugaci byl opět přidán roztok enzymu. Po kratší inkubaci byl přidán fenol–chloroform–isoamylalkohol (25:24:1) a dobře promíchán. Po centrifugaci byla vrchní vrstva prepipetována a smíchána se sodium acetátem a ethachinmatem. Do ependorfy je přidán etanol a centrifugován.

Sraženina, která v ependorfce zůstala po odstranění supernatantu, byla promyta 70% etanolem a vysušena ve vakuu.

DNA byla rozpuštěna pomocí TE buffer (10mMTris–HCl buffer obsahuje 1mM EDTA, pH 8.0) a může být dále použita v PCR (Suenaga and Nakamura, 2005).

3.3.3 Extrakce DNA z trichologického materiálu v telogenní fázi růstu

Jak již bylo uvedeno, u trichologického materiálu se většina analýz provádí z mtDNA, protože vlasy, které nacházíme, jsou často bez kořínku v telogenní fázi růstu. Vlas je v této době již keratinizován a nDNA degradovaná.

Vlasy, které jsou v telogenní fázi růstu, mají nDNA na vnějšku vlasového těla (v kutikulárních buňkách nebo v epidermálních buňkách vmezeřených mezi kutikulární šupiny). McNevin *et al.*, (2005 b) vypracovali optimální protokol pro extrakci nDNA z telogenních vlasů:

1. Neumývejte nebo nečistěte vlas, pokud to není nezbytné! Jestli to uděláte, používejte jemné vodné nebo alkoholové oplachy.
2. Rozpouštějte tento materiál v jednoduchém pufru (e.g. 10 mM Tris– HCl, pH 8.0) s 10 mM EDTA a též i se solí (e.g 100 mM NaCl or KCl).
3. Inkubujte v 56 °C 2 hodiny v 0.3 mg/mL proteináze K s vápenatými ionty
4. Extrahujte s fenol:chloroform: isoamyl alkoholem (25:24:1, pH 8.0).
5. Extrahujte s chloroformem (na odstranění fenolu).
6. Zkoncentrujte a odsolte extrakt centrifugační ultrafiltrací (filtrační membrána musí mít hranici propustnosti, aby vyloučila molekuly, které jsou menší než požadovaný amplikon).
7. Amplifikujte extrahovanou DNA pomocí PCR (34 cyklů) (McNevin *et al.*, 2005a; McNevin *et al.*, 2005b).

3.3.4 Extrakce vazbou DNA na silikát

Tato extrakční metoda byla mnohokrát použita na extrakci DNA z starověkého materiálu nebo obecně na degradovanou DNA.

V ependorfce byl promíchán rozpouštěcí roztok a magnetosilikátové partikule. Supernatant byl odstraněn přiložením k magnetickému stojanu a byl přidán promývací pufr. Následně byl roztok zvortexován a byl opět vložen do magnetického stojanu. Tento promývací proces byl opakován.

Po přidání etanolu byla ependorfka zvortexována a bylo zopakováno promývání etanolem. Po přiblížení k magnetickému stojanu byl odstraněn supernatant do nové ependorfky a použit pro PCR (Takayanagi *et al.*, 2003).

3.4 Analýza jaderné DNA – STR-typing

STR (short tandem repeat) jsou krátké tandemové úseky nDNA, které se také označují jako mikrosatelitní DNA. Jejich délka se pohybuje většinou v rozmezí 2-6 párů bazí,

přičemž celková délka těchto opakování je přibližně 60-100 bp (McNevin *et al.*, 2005 b; McNevin *et al.*, 2005 a).

STR-typing je analýza nDNA založená na amplifikaci specifických lokusů na různých chromozomech nDNA a má vysokou diskriminační hodnotu při identifikaci. Například komerční kit *AmpFlSTR SGM Plus*, který analyzuje 10 STR lokusů a amelogenin, má diskriminační hodnotu 10^{-13} .

Při analýze jaderné DNA pomocí STR-typingu používáme sekvenčně specifický pár primerů, které naamplifikují fragment DNA obsahující danou repetici. Jeden z této dvojice primerů je vždy fluorescenčně označen. V praxi se většinou používají tři-, čtyř- nebo pěti nukleotidové lokusy (Benecke M., 1997).

Při multiplex PCR se amplifikuje víc než jen jeden STR lokus. Primery jsou při této amplifikaci označeny různými barvami a také je rozlišujeme pomocí délkových rozsahů. Multiplex PCR je základem různých komerčních kitů pro analýzu nDNA.

Takto barevně rozlišené primery jsou na výsledném výstupu pomocí CCD kamery rozlišené na různě barevné i vysoké píky.

STR typing má vysokou diskriminační hodnotu při identifikaci. STR typing můžeme rozdělit na autozomální STR-typing a Y STR typing, při mužských vzorcích (Corach *et al.*, 2001).

3.4.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR je metoda, při které se selektivně amplifikují specifické úseky DNA, podle námi zvolených primerů. Ze stopového množství DNA se dá tímto způsobem získat DNA řádově v nanogramech až mikrogramech.

Pro provedení PCR jsou potřebné tyto komponenty :

1. DNA templát – obsahuje oblast DNA, která má být amplifikována
2. 2 primery – jsou komplementární ke koncovým sekvencím vybraného lokusu
3. DNA polymeráza – nejčastěji používaná je Taq polymeráza ale i jiné, podmínkou je aby jejich teplotní optimum bylo kolem 70°C.
4. Deoxinukleotid trifosfáty (dNTP) - potřebné pro stavbu nové DNA podle templátové DNA.
5. Roztok pufru – poskytuje vhodné chemické prostředí pro optimální aktivitu a stabilitu DNA polymerázy
6. Divalentní ionty – obecně je používán Mg^{2+} .

PCR je cyklický proces a probíhá ve třech krocích, kterými jsou denaturace, anelace a extenze.

Denaturace je proces, ve kterém dochází k rozvolnění DNA, a to při teplotě kolem 95°C. V dalším kroku, který nazýváme anelací, dochází k nasednutí primerů ke komplementární sekvenci rozvolněného vlákna. V závislosti na délce a sekvenci primerů probíhá tento krok v teplotním rozmezí od 40-72°C. Poslední krok zahrnuje elongaci, kde se k 3'OH konci primeru připojují nukleotidy podle komplementární sekvence templátu. Tato fáze probíhá při 72°C, které tvoří teplotní optimum pro Taq DNA polymerázu. Množství DNA roste při PCR exponenciálně, to znamená, že po každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí (Zima *et al.*, 2004; Alberts *et al.*, 2002).

3.4.2 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je metoda analýzy malých molekul na základe náboje, hydrofobicity, stereospecifity atd. (Shihabi and Friedberg, 1997).

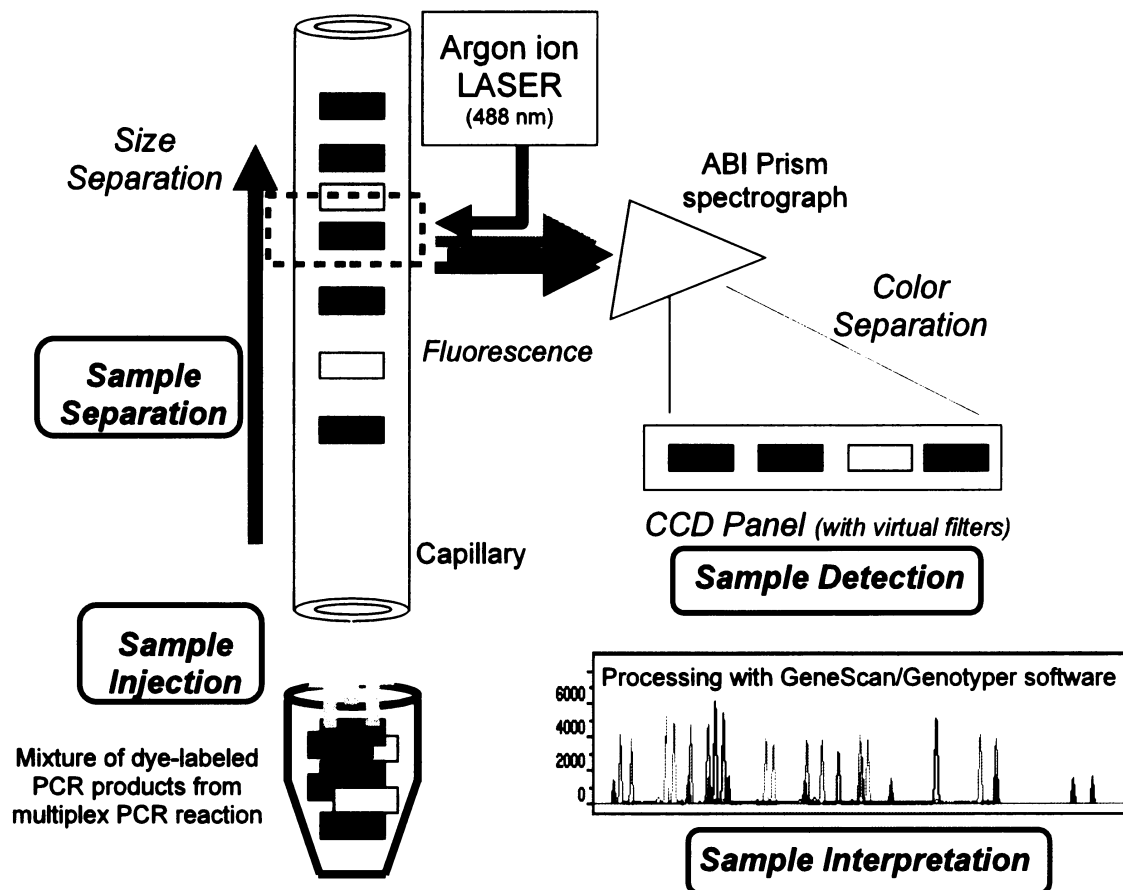
Kapilární elektroforéza se provádí v trubici o vnitřním průměru 50-100 mikrometrů. Úzká kapilára dovoluje použití vysokých elektrických polí a tím i kratší průběh kapilární elektroforézy a tím zabráňuje přehřátí, které vysoké napětí obecně způsobuje.

Vzorky pro kapilární elektroforézu jsou připravované naředěním malé části PCR produktu do vody nebo neionizovaného formamidu. Při analýze DNA je použita pozitivní voltáž, protože molekuly DNA jsou nabitě záporně (Butler *et al.* 2004).

Kapilární elektroforézu můžeme rozdělit do více kategorií jako např. kapilární gélová elektroforéza, kapilární zónová elektroforéza nebo micelární elektrokinetická kapilární elektroforéza. Nejjednodušší a nejčastěji používaná je kapilární zonální elektroforéza (Landers, 1994).

Výhodou kapilární elektroforézy je její automatizace (nabrání vzorku, separace a detekce), přičemž je možná rychlá separace vzorků. Má vysokou sensitivitu a rozlišení.

Pro analýzu metodou kapilární elektroforézy se nečastěji používají přístroje ABI Prism 3100 Genetic Analyzer.



ABI Prism 3100 Genetic Analyzer. Převzato z Butler *et al.* (2004).

Množství DNA, které je injektováno do kapiláry je nepřímo úměrné iontové síle roztoku. Po injektování vzorku do kapiláry následuje jeho separace na základě velikosti jednotlivých fragmentů. Na CCD kameře detekujeme barevné rozlišení vzorků.

Výsledný elektrogram je generován pomocí k tomu určenému softwaru (Butler *et al.*, 2004).

3.4.3 Mini-STR analýza

DNA může být degradována jak vlhkem, světlem, bakteriální kontaminací nebo kontaminací pomocí hub.

V degradovaných vzorcích DNA, je nDNA fragmentována na malé úseky, a proto STR-typing bude mít nízkou diskriminační hodnotu (Butler *et al.*, 2004).

Ku příkladu při amplifikaci STR se lokusy do 300 pb ve vysokém procentu případů nenaamplifikovali (např. primer D18S51 se nenaamplifikoval v 80 % případech).

Amplifikace lokusů, které měli délku kolem 230 pb, byla neúspěšná v 30 % případů.

Při délce lokusu mezi 106-209 pb byla neúspěšnost amplifikace jenom v 10 % případů. Pro analýzu degradované DNA byli vyvinuté mini - STR kity s průměrnou délkou amplifikovaných fragmentů 150 pb.

Proto byl navržen miniSTR-multiplex s lokusy TH01, D2S1338, D18S51, D16S539, FGA a amelogeninem. Při STR-typingu s miniSTR-multiplexem byla úspěšnost analýzy 80 % (Butler et al. 2003, Coble and Butler 2005).

Výhodou této analýzy je to, že její výsledné profily se dají srovnávat s profily vzniklými pomocí STR-typingu, proto je její použití výhodnější než analýza mtDNA (McNevin *et al.*, 2005 a; McNevin *et al.*, 2005 b).

3.5 Analýza mitochondriální DNA

Analýza mtDNA je používána tam, kde se předpokládá, že je nDNA degradovaná. Protože je mtDNA děděna maternálně, z matky na její děti, nemá význam ji provádět při maternálně příbuzných. Diskriminační hodnota je v těchto případech nulová.

U mtDNA se neanalyzují STR lokusy jako u nDNA, ale nekódující oblast mitochondriálního genomu zvaná také kontrolní region. Kontrolní region je rozdělen do dvou polymorfních úseků, označovaných jako HV1 a HV2.

Analýza mtDNA je založena na amplifikaci těchto úseků, přičemž SNP, které se nachází kolem HV1 a HV2 zvyšují pravděpodobnost shody.

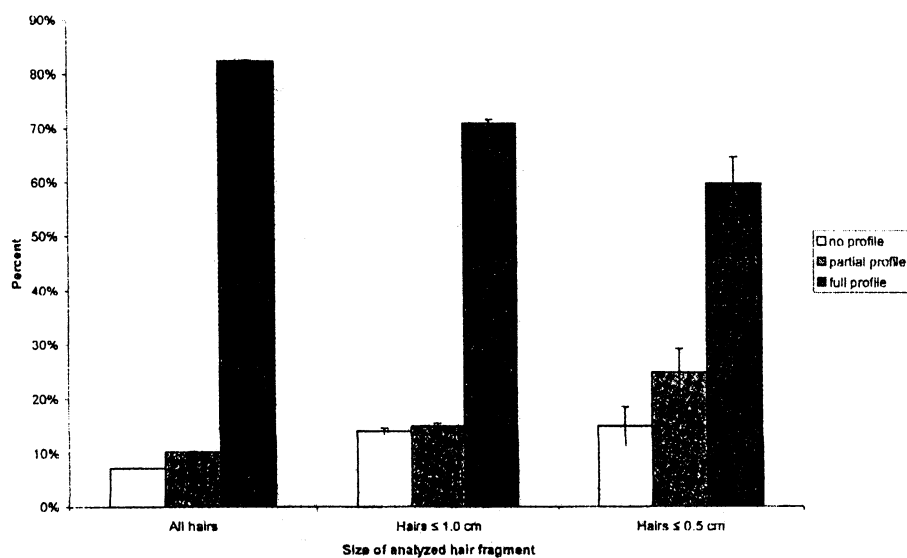
Primery, které se při analýze mtDNA používají, jsou strukturované jak pro těžké řetězce tak i pro lehké řetězce. Označení primerů pro těžký řetězec začíná písmenem H, zatímco označení pro lehký řetězec písmenem L (Holland and Parsons, 1999).

Pro amplifikaci primerů je následně použita PCR (Holland and Parsons, 1999).

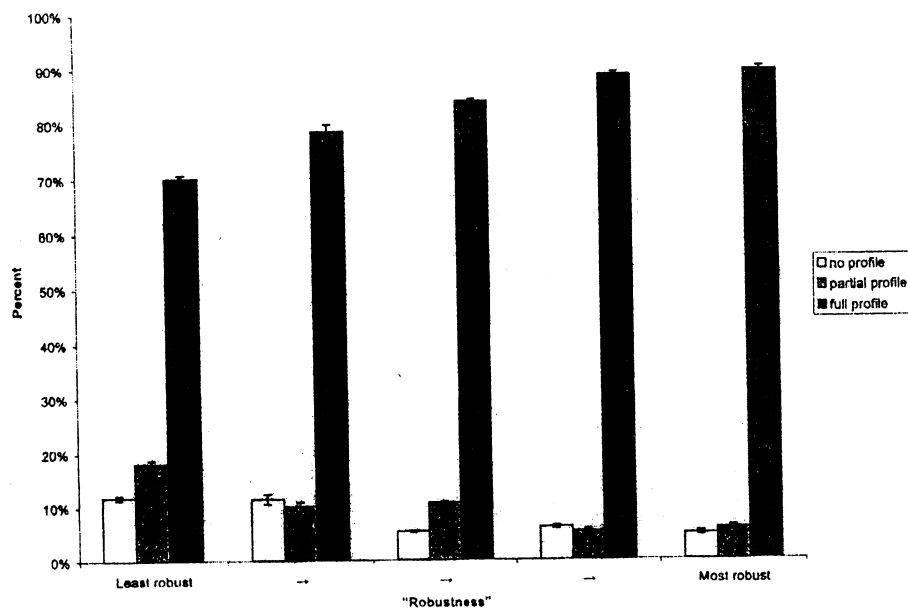
Při analýze mtDNA musíme brát v úvahu také jev zvaný heteroplazmie, který byl popsán v kapitole 3.2.1.2.1.

Úspěšnost analýzy mtDNA je vysoká. V průběhu 4 let bylo analyzováno 691 vlasových vzorků, přičemž jednoznačný plný profil byl dosažen v 82,5 %. Částečný profil se povedlo analyzovat při 10,3% vlasů a žádný profil u 7,2 % (Melton *et al.*, 2005).

Úspěšnost analýzy může záviset od různých faktorů jako je délka vlasu (Melton *et al.*, 2005):



Melton *et al.*, (2005) empiricky pozorovali také závislost úspěšnosti analýzy mtDNA na síle vlasu:



Ve všeobecnosti se tvrdí, že melanin je inhibítozem PCR ale v této studii tato skutečnost nebyla pozorována. Také prvotné vyloučení vlasů na základě morfologické struktury mělo vliv na úspěšnost analýzy DNA.

V jiné studii dosahuje úspěšnost analýzy mtDNA taktéž dobré výsledky - při vlasech 75 %, pubickém ochlupení 66 % a axilárním ochlupení 52 % (Pfeiffer *et al.*, 1999).

4. Využití forenzní analýzy trichologického materiálu v praxi - kauzistika

Forenzní genetika zahrnuje tři dílčí oblasti zkoumání:

1. Kriminální genetika
2. Identifikační genetika
3. Kognitivní genetika

Obecně je trichologický materiál dobrým zdrojem pro analýzu, i když má svá omezení, a to jak degradaci nDNA v keratinizovaných vlasech, tak výskyt heteroplazmie, který ale v některých případech může mít i pozitivní důsledky (Hühne *et al.*, 1999).

Vlas je jeden z nejtrvanlivějších biologických materiálů a tedy je možné s ním pracovat i po více než 100 letech. Odolá také různým vlivům počasí a častokrát i hoření, proto je dobrým materiálem pro identifikaci.

Díky dlouhodobému zachování trichologického materiálu je tento často používán i v archeologii nebo při zjišťování historických příbuzenských vztahů (Amory *et al.*, 2007; Jehaes *et al.*, 2001). Trichologický materiál, který je zkoumán, často pochází nejen od lidí ale také od zvířat nebo z rostlin. V následujících řádcích uvádím jen několik příkladů, ve kterých byla použita forenzní analýza trichologického materiálu.

4.1 Snowball

Jeden z nejznámějších a vůbec první z případů, kde byl v soudní síni usvědčen podezřelý z vraždy na základě forenzní analýzy trichologického materiálu zvířete.

Bývalý manžel, který zabil matku pěti dětí, kterou o pár měsíců později našli v mělkém hrobě, byl usvědčen na základě nálezů bílých chlupů na své kožené bundě, na které byla také krev zavražděné. Vyšetřovatel si vzpomněl, že s podezřelým bydlí v domě také bílá kočka, jménem Snowball.

V spolupráci s Menotti-Raymond, která pracovala na sekvenování kočičího genomu, se jim povedlo analyzovat tyto chlupy a usvědčit obviněného z vraždy, neboť chlupy náleželi s jistotou kočce obviněného (Menotti-Raymond *et al.*, 1997).

4.2 Napadení člověka psem

V březnu 2000, byl v Budapešti nalezen kluk, který byl později identifikován jako syn partnerky bezpečnostního strážce objektu. Nejprve si policie myslela, že se jedná o sexuální útok a následné usmrcení chlapce.

Pitva ale ukázala na pohryzení psem. Do úvahy připadali rottweiler a německý ovčák. Tyto druhy psů vlastnil i pracovník bezpečnostní služby. Po následném sběru vzorku ze psů a vlasů a těla oběti byla shoda mezi vzorky z oběti a německým ovčákem (Pádár *et al.*, 2002).

4.3 Analýza historických pozůstatků

Analýza DNA pomocí trichologického materiálu byla použita také při zkoumání ostatků domnělého syna Louise XVI, krále Francie, a jeho manželky Marie-Antoinetty, Louisi XVII. Vydával se za něho Carl Wilhelm Naundorff, který poskytl rodině nepřímé důkazy. Po zkoumání mtDNA z jeho vlasů a vlasů Marie-Antoinetty a dvou dalších dnes žijících maternálně příbuzných se zjistilo, že ve skutečnosti Naundorff nebyl Louis XVII (Jehaes *et al.*, 2001).

5.Závěr

Forenzní analýza DNA je dnes široce využívána. Mezi běžnější materiál, který se při ní využívá, patří trichologický materiál.

Před samotnou analýzou DNA zkoumáme vlas mikroskopicky pro vyloučení vzorků, které pro analýzu DNA nejsou vhodné. Také se provádí morfologické porovnávání vzorku vlasu, protože analýzou DNA se vlas zničí.

V předchozích kapitolách byly popsány jak možné postupy extrakce DNA z vlasu (cheletační metoda, fenol-chloroformová metoda a metoda vazbou na silikátové partikule), tak i následné analýzy DNA (STR-typing, miniSTR-typing a analýza mtDNA).

I když má analýza trichologického materiálu četné výhody, najdou se i nevýhody. Za jednu z největších bych označila nedostatek nDNA v telogenních vlasech.

Analýza mtDNA má také nevýhody, jako např. nulovou diskriminační hodnotu u maternálně příbuzných osob. Proto je jí nutné doplnit morfologickou analýzou.

I přes některé zápory je analýza DNA ve forenzním zkoumání trichologického materiálu velmi důležitá. I když již morfologie vlasů dokáže poukázat určité rozdíly ve vlasové struktuře, nemůže být použita pro jednoznačné vyloučení. Obě formy analýzy se tak doplňují a jsou nedílnou součástí forenzní analýzy trichologického materiálu.

Citace

Alberts B., Bray D., et al. (2002). *Molecular biology of the cell*, Garland Science.

Amory S., Keyser C., et al. (2007). "STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies." *Forensic Science International* 166(2-3): 218-229.

Benecke M. (1997). "DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey." *Naturwissenschaften* 84(5): 181-188.

Butler J.M., Shen Y., et al. (2003). "The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA." *Journal of Forensic Sciences* 48(5): 1054-1064.

Butler J.M., Buel E., et al. (2004). "Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis." *Electrophoresis* 25(10-11): 1397 - 1412.

Coble M.D. and Butler J.M. (2005). "Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA." *Journal of Forensic Sciences* 50(1): 43-53.

Corach D., Filgueira Risso L., et al. (2001). "Routine Y-STR typing in forensic casework." *Forensic Science International* 118(2-3): 131 - 135.

Deedrick D. W. (2000). "Hairs, Fibers, Crime, and Evidence." *Forensic Science Communications* 2(3).

Deedrick D. W. and Koch S.L. (2004 a). "Microscopy of Hair Part 1: A Practical Guide and Manual for Human Hairs." *Forensic Science Communications* 6(1).

Deedrick D. W. and Koch S.L. (2004 b). "Microscopy of Hair Part II: A Practical Guide and Manual for Animal Hairs." *Forensic Science Communications* 6(3).

Fernando P., Vidya T.N.C., et al. (2003). "Reliable Noninvasive Genotyping: Fantasy or Reality?" *Journal of Heredity* 94(2): 115-123

- Forslind B., Lindberg M., et al. (2004). *Skin, Hair, and Nails: Structure and Function*, Informa Health Care.
- Franbourg A., Hallegot P., et al. (2003). "Current research on ethnic hair." *Journal of the American Academy of Dermatology* 48(6): 115-119.
- Graham E.A.M. (2007). "DNA reviews: hair." *American Journal of Forensic Medicine & Pathology*(3): 133–137.
- Hausman A.H. (1920). "Structural Characteristics of the Hair of Mammals " The American Naturalist 54(635): 496-523.
- Hausman A.H. (1924). "Further Studies of the Relationships of the Structural Characters of Mammalian Hair." *The American Naturalist* 58(659): 544-557.
- Hausman A.H. (1925). "A Comparative Racial Study of the Structural Elements of Human Head-Hair." *The American Naturalist* 59(665): 529-538.
- Hausman, L. A. (1930). "Recent Studies of Hair Structure Relationships." *The Scientific Monthly* 30(3): 258-277.
- Higuchi R., von Beroldingen C.H., et al. (1988). "DNA typing from single hairs." *Nature* 332(6164): 543-546.
- Holland M.M. and Parsons T.J. (1999). "Mitochondrial DNA sequence Analysis - Validation and Use for Forensic Casework." *Forensic Science Review* 11(1): 22-50.
- Houck M.M. and Budowle B. (2002). "Correlation of Microscopic and Mitochondrial DNA Hair Comparisons." *Journal of Forensic Science* 47(5): 964-967.
- Hühne J., Pfeiffer H., et al. (1999). "Mitochondrial DNA in human hair shafts – existence of intra-individual differences?" *International Journal of Legal Medicine* 112(3): 172-175.

Jehaes E., Decorte R., et al. (2001). "Mitochondrial DNA analysis on remains of a putative son of Louis XVI, King of France and Marie-Antoinette." *European Journal of Human Genetics* 115(3): 135-141.

Landers J.P. (1994). *Handbook of Capillary Electrophoresis*, CRC Press.

Linch C.A., Smith S.L., et al. (1998). "Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison." *Journal of Forensic Sciences* 43(2): 305-314.

Linch C.A., Whiting D.A., et al. (2001). "Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist." *Journal of Forensic Sciences* 46(4): 844 - 853.

Lynch T., Rudin N., et al. (2002). *An Introduction to Forensic DNA Analysis*, CRC Press.

McNevin D., Wilson-Wilde L., et al. (2005 b). "Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair Part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles." *Forensic Science International* 153(2-3): 247 - 259.

McNevin D., Wilson-Wilde L., et al. (2005 a). "Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair Part 1. Review of current status and knowledge gaps." *Forensic Science International* 153 (2-3): 237 - 246.

Melton T., Dimick G., et al. (2005). "Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs " *Journal of forensic sciences* 50(1).

Menotti-Raymond M.A., David V.A., et al. (1997). "Pet cat hair implicates murder suspect." *Nature* 386(6627): 774.

Müller K., Klein R., et al. (2007). "Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA." *Electrophoresis* 28(16): 2835-2842.

O'Connor S.D., Komisarek K.L., et al. (1995). "Atomic force microscopy of human hair cuticles: a microscopic study of environmental effects on hair morphology." *Journal of Investigative Dermatology* 105(1): 96-99.

Pádár Z., Egyed B., et al. (2002). "Canine STR analyses in forensic practice - Observation of a possible mutation in a dog hair." *International Journal of Legal Medicine* 116(5): 286-288.

Petraco N. and Kubic T. (2003). *Color Atlas and Manual of Microscopy for Criminalists, Chemists, and Conservators*, CRC Press.

Pfeiffer H., Hühne J., et al. (1999). "Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons." *International Journal of Legal Medicine* 112(5): 287–290.

Popescu C. and Hartwig H. (2007). "Hair—the most sophisticated biological composite material." *Chemical Society Reviews* 36(8): 1282–1291.

Roberts K.A. and Calloway C. (2007). "Mitochondrial DNA Amplification Success Rate as a Function of Hair Morphology." *Journal of Forensic Sciences* 52(1): 40-47.

Robertson J. (1999). *Forensic Examination of Human Hair* Taylor & Francis Ltd.

Roček Z. (2002). *Historie obratlovců*, Academia.

Shihabi Z.K. and Friedberg M.A. (1997). "Analysis of small molecules for clinical diagnosis by capillary electrophoresis." *Electrophoresis* 18(10): 1724-1732.

Suenaga E. and Nakamura H. (2005). "Evaluation of three methods for effective extraction of DNA from human hair." *Journal of Chromatography B* 820(1): 137-141.

Takayanagi K., Asamura H., et al. (2003). "Investigation of DNA extraction from hair shafts." *International Congress Series* 1239: 759-764

Zima J., Macholán M., et al. (2004). Genetické metody v zoologii, Karolínium.