

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА**  
**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ**

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА  
У КРАГУЈЕВЦУ

ПРИМЉЕНО: 13. 05. 2021			
Орг.јед.	Број	Прав.	Вређност
05	5429		

**1. Одлука Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу о формирању  
Комисије за оцену завршене докторске дисертације**

На седници Већа за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу, одржаној 14.04.2021. године, одлуком број IV-03-279/24, формирана је Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације под називом **"Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција"** кандидаткиње др Катарине Витошевић, у следећем саставу:

1. **Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник
2. **Проф. др Ђорђе Алемпијевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Судска медицина, члан
3. **Доц. др Маја Саздановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан

Комисија је прегледала и проучила докторску дисертацију кандидаткиње др Катарине Витошевић и подноси Наставно-научном већу следећи:

## ИЗВЕШТАЈ

### 2.1. Значај и допринос докторске дисертације са становишта актуелног стања у одређеној научној области

Докторска дисертација кандидаткиње др Катарине Витошевић под називом "Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција", урађена је под менторством проф. др Данијеле Тодоровић, ванредног професора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика. Наведена докторска дисертација представља оригинално истраживање у коме је извршено испитивање квалитета молекула ДНК (чистоћа, принос, интегритет) изоловане из здравих ткива изузетих током судскомедицинских обдукција и фиксираних у формалину од 6h до 2 месеца, као и из здравих ткива укалупљених у парафинске блокове и архивираних до 30 година.

Прегледом доступне литературе нису пронађене студије у којима је испитиван утицај врсте формалина и дужине фиксирања здравих ткива на квалитет ДНК. Бројне студије показују да је могуће изоловати геномску ДНК и урадити генетичка испитивања на узорцима туморских ткива која су архивирана у виду парафинских блокова. Само у малом броју студија истраживања су урађена на здравим, нетуморским ткивима, добијеним у току обдукције, затим фиксираним у формалину и укалупљеним у парафинске блокове, али се резултати тих истраживања односе на кратак временски период (5-10 година) и на само одређена ткива. Такође, не постоји сагласност научника ни око избора адекватне методе за изоловање ДНК из ткива фиксираних у формалину и укалупљених у парафинске блокове, што у великој мери утиче на квалитет изоловане ДНК. Ово истраживање је показало да је дужина фиксирања здравих ткива и дужина архивирања парафинских блокова здравих ткива изузетих након судскомедицинских обдукција не утиче на хистоморфолошке карактеристике ткива, али утиче на интегритет ДНК изоловане из ових ткива. Студија је такође показала да ДНК изолована екстракцијом помоћу фенола, хлороформа и изоамил алкохола из ткива срца и мозга која су фиксирана у 10% пуферизованом

формалину има најбољи интегритет, па су ова ткива погодана за молекуларно биолошке анализе и након 30 година архивирања.

## **2.2. Оцена да је урађена докторска дисертација резултат оригиналног научног рада кандидата у одговарајућој научној области**

Прегледом доступне литературе прикупљене детаљним и систематским истраживањем биомедицинских база података "PubMed", "Medline" и "CoBSON", уз коришћење одговарајућих кључних речи "medico-legal autopsy", "formalin fixed paraffin-embedded tissues", "DNA isolation", "DNA purity", "DNA yield", "DNA fragmentation" и "PCR" нису пронађене студије сличног дизајна и методолошког приступа. Сходно наведеном, Комисија констатује да докторска дисертација кандидаткиње др Катарине Витошевић под називом "Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција" представља резултат оригиналног научног рада.

## **2.3. Преглед остварених резултата рада кандидата у одређеној научној области**

### **А. Лични подаци**

Др Катарина Витошевић је рођена 09.03.1983. године у Чачку. Основну школу "Свети Сава" је похађала у Баточини, а средње образовање Прву крагујевачку гимназију у Крагујевцу. 2002. године уписала је Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу који је завршила 2009. године са просечном оценом 9,35. Докторске академске студије уписала је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу школске 2010/2011. године, изборно подручје Хумана репродукција и развој. Од јуна 2013. године до јануара 2014. године волонтирала је у Служби за судску медицину и токсикологију КЦ Крагујевац. Од јануара 2014. године је запослена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, као сарадник у настави на Катедри за Анатомију и судску медицину. Од јуна 2020. године је у звању асистента на Катедри за Судску медицину. Звање специјалисте судске медицине је стекла на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу 2019. године. Учествовала је

на јуниор пројекту: „Утицај формалина и парафинског блока на степен фрагментације молекула ДНК у ткивима јетре, срца и мозга изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција“ финансираног од стране Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

## **Б. Списак објављених радова (прописани минимални услов за одбрану докторске дисертације)**

Кандидаткиња др Катарина Витошевић је аутор више научних радова у домаћим и међународним часописима и први аутор у радовима објављеним у часописима индексираним на SCI листи чији су резултати саставни део докторске дисертације (радови под редним бројем 1 и 2), чиме је испунила услов за одбрану докторске дисертације:

1. **Vitošević K**, Todorović M, Slović Ž, Varljen T, Matić S, Todorović D. DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded healthy tissue after 30 years of storage can be used for forensic studies. *Forensic Sci Med Pathol.* 2021;17(1):47-57. **M22**
2. **Vitošević K**, Todorović M, Varljen T, Slović Ž, Matić S, Todorović D. Effect of formalin fixation on PCR amplification of DNA isolated from healthy autopsy tissues. *Acta Histochem.* 2018;120(8):780-788. **M23**
3. **Vitošević K**, Todorović D, Slović Ž, Živković Zarić R, Todorović M. Forensic genetics and genotyping. *Ser J Exp Clin Res.* 2018;20(2):75-86. **M51**

### **2.4. Оцена о испуњености обима и квалитета у односу на пријављену тему**

Сprovedено истраживање је усклађено са пријављеном темом докторске дисертације. Наслов докторске дисертације и урађено истраживање се у потпуности поклапају. Циљеви истраживања и примењена методологија поклапају се са одобреним у пријављеној тези. Докторка дисертација Катарине Витошевић садржи следећа поглавља: Увод, Циљеви, Материјал и методе, Резултати, Дискусија, Закључци, Скраћенице и Литература. Написана је на 117 страна и има 16 слика, 17 графикона и 15 табела. Поглавље Литература садржи 138 цитираних библиографских јединица из иностраних и домаћих стручних публикација.

У уводном делу кандидаткиња је на свеобухватан, јасан и прецизан начин и цитирајући релевантну литературу изложила актуелана сазнања о структури и функцији молекула ДНК, о кодирајућим и некодирајућим секвенцама, као и о генетичким маркерима који су од значаја за форензичку генетику. Такође, дат је преглед најчешће коришћених метода за изоловање и анализу молекула ДНК, као и значај анализе ДНК у судској медицини. Након тога, описан је значај фиксирања ткива и калушљања у парафинске блокове, као и основни кораци у овим процесима који би могли да утичу на квалитет молекула ДНК изоловане из ових ткива.

Циљеви истраживања су јасно изложени и дефинисани у складу са одобреним приликом пријаве тезе. Кандидаткиња је у свом раду испитивала утицај формалина и парафинског блока на квалитет молекула ДНК у хуманим здравим ткивима која су изузета током судскмедицинских обдукција, са посебним освртом на врсту формалина у коме су ткива фиксирани, врсту ткива из којих је ДНК изолована и методу која је коришћена за изоловање молекула ДНК.

Материјал и методологија рада су детаљно и прецизно формулисани и подударају се са одобреним приликом пријаве тезе. Одобрење за истраживање на материјалу хуманог порекла је добијено од стране Етичког одбора Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (бр. 01-4970), Етичког одбора Клиничког центра Крагујевац (бр. 01-2798), Апелационог јавног тужилаштва у Крагујевцу (А.бр. 79/13) и Вишег суда у Крагујевцу (VIII СУ-41-170/13).

Истраживање је обухватило 1040 исечка здравих хуманих ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега фиксираних у 4% непуферизованом или у 10% пуферизованом формалину, сврстаних у 13 експерименталних група на основу дужине фиксирања у формалину, као и 543 исечка ткива срца, јетре и мозга која су укалушљена у парафинске блокове, сврстаних у 7 експерименталних група на основу дужине архивирања парафинских блокова ткива. Сви ткивни препарати су након Н&Е бојења проучавани хистоморфолошки. ДНК је изолована помоћу фенол-хлороформ-изоамил алкохола (PCI) и комерцијалног комплета (PureLink Genomic DNA Mini Kit). Чистоћа и принос ДНК су одређени спектрофотометријски. Интегритет изоловане ДНК је одређен PCR амплификацијом GPD1 (150bp), АСТВ (262bp) и RPL4 (407bp) гена. Умножени ДНК фрагменти су затим електрофоретски анализирани на 2% агарозном гелу.

Резултати истраживања су систематично приказани и добро документовани табелама (укупно 13), графиконима (укупно 17) и сликама (укупно 10). Приказ резултата је прегледан и разумљив. Показано је да на хистоморфолошке карактеристике ткива не утиче ни фиксирање ткива у формалину ни калупљење у парафински блок. Међутим, дужина фиксирања здравих хуманих ткива у формалину и дужина архивирања парафинских блокова ткива утичу на квалитет изоловане ДНК из ових ткива. Такође је показано да врста ткива, врста формалина у коме су ткива фиксирана и метода коришћена за изоловање ДНК утичу на квалитет изоловане ДНК.

Закључено је да је до 72h фиксирања ткива у формалину могуће амплификовати фрагменте дужине до 407 bp, а до 14 дана фрагменте до 262 bp, као и да је до 6 година архивирања парафинских блокова ткива могуће амплификовати фрагменте дужине до до 407 bp, до 26 година архивирања фрагменте до 262 bp, а након 30 година архивирања фрагменте дужине до 150 bp. Такође је закључено да за фиксирање ткива треба корисити 10% пуферизовани формалин, да је ДНК најбоље очувана у ткивима срца и мозга и да за изоловање ДНК треба користити РСI методу.

У поглављу "Дискусија" детаљно су анализирани и објашњени резултати добијеног истраживања у поређењу са доступним литературним подацима из исте области. Резултати су дискутовани у контексту сличних, али и различитих података из доступне литературе. Добијени резултати су врло детаљно дискутовани, прегледно и разумљиво.

Литература је адекватна по обиму, садржају и релевантности. Цитирано је 138 библиографских јединица из домаћих и страних научних публикација.

На основу предходно изнетих чињеница, Комисија сматра да завршена докторска дисертација кандидаткиње др Катарине Витошевић под називом ""Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција" по обиму и квалитету израде у потпуности одговара пријављеној теми дисертације.

## 2.5. Научни резултати докторске дисертације

Најзначајни резултати истраживања садржани су у следећим закључцима:

1. Фиксирање здравих ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега у формалину утиче на квалитет молекула ДНК изоловане из ових ткива, али не и на хистоморфолошке карактеристике:

- Фиксирање ткива у 4% непуферизованом или 10% пуферизованом формалину не утиче значајно на хистоморфолошке карактеристике ткива.
- Метода која се користи за изоловање ДНК из ткива фиксираних у формалину значајно утиче на квалитет изоловане ДНК: екстракција помоћу фенола, хлороформа и изоамил алкохола омогућује добијање ДНК бољег квалитета него што је ДНК добијена коришћењем комерцијалног комплета (*PureLink Genomic DNA Mini Kit*).
- Узорци ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину имају бољу чистоћу, принос и интегритет него ДНК из ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину.
- Не постоји значајна разлика у чистоћи и интегритету ДНК изоловане из различитих ткива (срце, јетра, мозак, плућа и бубрези) фиксираних у формалину; међутим, принос ДНК је различит у различитим фиксираним ткивима. Највећи принос ДНК је добијен у узорцима из фиксираних ткива јетре, а најмањи из срца и мозга. У узорцима ДНК који су фиксирани до 72h могуће је амплификовати фрагменте дужине до 407 bp, до 14 дана фрагменте дужине 262 bp, а до 28 дана фрагменте дужине до 150 bp.
- Дужина фиксирања ткива у формалину не утиче на чистоћу изоловане ДНК. Међутим дужина фиксирања ткива у формалину утиче на принос изоловане ДНК (што се ткиво дуже фиксира мањи је принос изоловане ДНК) и на интегритет изоловане ДНК (што се ткиво дуже фиксира у формалину већи је степен фрагментације изоловане ДНК).

2. Калупљење здравих ткива срца, јетре и мозга у парафинске блокове утиче на квалитет молекула ДНК изоловане из ових ткива, али не и на хистоморфолошке карактеристике:

- Дужина архивирања парафинских блокова у која су укалупљена здрава ткива није имала утицаја на хистоморфологију ових ткива.

- Метода која се користи за изоловање ДНК из укалупљених ткива значајно утиче на квалитет изоловане ДНК: екстракција помоћу фенола, хлороформа и изоамил алкохола омогућује добијање ДНК бољег квалитета него што је ДНК добијена коришћењем комерцијалног комплета (*PureLink Genomic DNA Mini Kit*).
- Не постоји значајна разлика у чистоћи узорака ДНК изоловане из различитих ткива (срца, јетре и мозга) која су укалупљена у парафинске блокове. Различита укалупљена ткива се разликују у приносу и интегритету изоловане ДНК. Највећи принос ДНК је добијен из укалупљеног ткива јетре, а из ткива срца и мозга је изолована ДНК очуванијег интегритета.
- Дужина архивирања парафинских блокова ткива до 30 година утиче на квалитет изоловане ДНК. Вредности чистоће и приноса ДНК изоловане помоћу PCI методе су веће ако је ДНК изолована из старијих парафинских блокова, за разлику од вредности за ДНК изоловану помоћу комерцијалног комплета које не зависе од старости парафинских блокова ткива. Степен фрагментације ДНК изоловане из ткива која су укалупљена у парафинске блокове је већи што је дужи период архивирања парафинских блокова ткива: RPL4 ген је амплификован до 6 година, АСТВ ген до 26 година, а GPD1 ген до 30 година архивирања парафинских блокова ткива.

## 2.6. Применљивост и корисност резултата у теорији и пракси

Добијени резултати истраживања дају оригиналан и битан допринос у сагледавању утицаја формалина и парафинског блока на квалитет молекула ДНК у здравим хуманим ткивима која су изузета приликом извођења судскомедицинских обдукција. С обзиром да широм света постоје бројне архиве ткива фиксираног у формалину и укалупљеног у парафинске блокове, значај анализе молекула ДНК изоловане из ових ткива је све већи како за проспективне и ретроспективне биомедицинске студије, тако и у судскомедицинској пракси. Информације о томе колико је дуго интегритет молекула ДНК очуван у здравим ткивима фиксираним у формалину и укалупљеним у парафинским блоковима и у ком ткиву је степен фрагментације ДНК најмањи, као и информације о избору најадекватније методе за изоловање ДНК, доприносе постављању стандарда за прављење архиве, у којој би се парафински узорци



чували на најадекватнији начин, онолико година, колико је ДНК очувана и корисна за спровођење одговарајућих генетичких анализа. На тај начин сачувана ДНК може послужити за идентификацију особа које су у тренутку смрти биле неидентификоване или погрешно идентификоване, као и за друге генетичке анализе које би имале значаја у судским споровима и након смрти одређене особе (идентификација особе која је пре смрти извршила злочин, утврђивање очинства или родбинских веза након смрти особе и др.), а без ексхумације лешева.

## **2.7. Начин презентирања резултата научној јавности**

Резултати ове студије публиковани су као оригинално истраживање у часописима индексираним на SCI листи.

- 1. Vitošević K, Todorović M, Slović Ž, Varljen T, Matić S, Todorović D.** DNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded healthy tissue after 30 years of storage can be used for forensic studies. *Forensic Sci Med Pathol.* 2021 Mar;17(1):47-57. doi: 10.1007/s12024-020-00327-z. **M22**
- 2. Vitošević K, Todorović M, Varljen T, Slović Ž, Matić S, Todorović D.** Effect of formalin fixation on PCR amplification of DNA isolated from healthy autopsy tissues. *Acta Histochem.* 2018 Nov;120(8):780-788. doi: 10.1016/j.acthis.2018.09.005. **M23**

## ЗАКЉУЧАК

Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације кандидаткиње др Катарине Витошевић под називом "Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција" сматра да је истраживање у оквиру тезе базирано на актуелним сазнањима и валидној методологији и да је прецизно и адекватно постављено и спроведено.

Комисија сматра да докторска дисертација кандидаткиње др Катарине Витошевић, урађена под менторством проф. др Данијеле Тодоровић, ванредног професора, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, представља оригинални научни допринос у испитивању утицаја формалина и парафинског блока на квалитет молекула ДНК у здравим хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција.

Комисија са задовољством предлаже Наставно-научном већу Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу да докторска дисертација под називом **"Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција"** кандидаткиње др Катарине Витошевић буде позитивно оцењена и одобрена за јавни одбрану.

## ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

**Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Генетика*, председник



---

**Проф. др Ђорђе Алемпијевић**, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Судска медицина*, члан



---

**Доц. др Маја Саздановић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Хистологија и ембриологија*, члан



---

У Крагујевцу, 2021. године