



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Катарина М. Витошевић

**УТИЦАЈ ФОРМАЛИНА И ПАРАФИНСКОГ БЛОКА НА
ФРАГМЕНТАЦИЈУ МОЛЕКУЛА ДНК У ХУМАНИМ
ТКИВИМА ИЗУЗЕТИХ ПРИЛИКОМ ИЗВОЂЕЊА
СУДСКОМЕДИЦИНСКИХ ОБДУКЦИЈА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2021.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Katarina M. Vitošević

**UTICAJ FORMALINA I PARAFINSKOG BLOKA NA
FRAGMENTACIJU MOLEKULA DNK U HUMANIM
TKIVIMA IZUZETIH PRILIKOM IZVOĐENJA
SUDSKOMEDICINSKIH OBDUKCIJA**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2021.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Katarina M. Vitošević

**THE INFLUENCE OF FORMALIN FIXATION
AND PARAFFIN EMBEDDING ON DNA
FRAGMENTATION IN HUMAN TISSUES
EXCLUDED DURING MEDICO-LEGAL
AUTOPSIES**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2021.

| |
|---|
| I Аутор |
| Име и презиме: Катарина Витошевић |
| Датум и место рођења: 9.03.1983. године, у Чачку |
| Садашње запошљење: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу |
| II Докторска дисертација |
| Наслов: Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција |
| Број страница: 117 |
| Број слика: 16 слика, 17 графикона, 15 табела |
| Број библиографских података: 138 |
| Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу |
| Научна област (УДК): Судска медицина, форензичка генетика |
| Ментор: Проф. др Данијела Тодоровић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу |
| III Оцена и одбрана |
| Датум пријаве тезе: 03.05.2018. године |
| Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-774/8, 10.10.2018. године |
| Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: |
| 1. Проф. др Оливера Милошевић-Ђорђевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник |
| 2. Проф. др Слободанка Митровић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Патолошка анатомија, члан |
| 3. Проф. др Оливер Стојковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хумана генетика, члан |
| Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: |
| Датум одбране дисертације: |

| |
|--|
| I Autor |
| Ime i prezime: Katarina Vitošević |
| Datum i mesto rođena: 9.03.1983. godine u Čačku |
| Sadašnje zapošljenje: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu |
| II Doktorska disertacija |
| Naslov: Uticaj formalina i parafinskog bloka na fragmentaciju molekula DNK u humanim tkivima izuzetih prilikom izvođenja sudskomedicinskih obdukcija |
| Broj stranica: 117 |
| Broj slika: 16 slika, 17 grafikona, 15 tabela |
| Broj bibliografskih podataka: 138 |
| Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu |
| Naučna oblast (UDK): Sudska medicina, forenzička genetika |
| Mentor: Prof. dr Danijela Todorović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu |
| III Ocena i odbrana |
| Datum prijave teze: 03.05.2018. godine |
| Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske /umetničke disertacije: IV-03-774/8, 10.10.2018.godine |
| Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata: |
| 1. Prof. dr Olivera Milošević-Đorđević, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, predsednik |
| 2. Prof. dr Slobodanka Mitrović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, za užu naučnu oblast Patološka anatomija, član |
| 3. Prof. dr Oliver Stojković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Humana genetika, član |
| Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije: |
| Datum odbrane disertacije: |

| |
|---|
| I Autor |
| Name and surname: Katarina Vitošević |
| Date and place of birth: 9.03.1983. Čačak |
| Current employment: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| II Doctoral Dissertation |
| Title: The influence of formalin fixation and paraffin embedding on DNA fragmentation in human tissues excluded during medico-legal autopsies |
| No. of pages: 117 |
| No. of images: 16 pictures, 17 figures, 15 tables |
| No. of bibliographic data: 138 |
| Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| Scientific area (UDK): Forensic medicine, forensic genetics |
| Mentor: Prof. dr Danijela Todorović, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac |
| III Grade and Dissertation Defense |
| Topic Application Date: 03.05.2018. |
| Decision number and date of acceptance of the doctoral/artistic dissertation topic: IV-03-774/8, 10.10.2018. |
| Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate: |
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Olivera Milošević-Đorđević, Full professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, president 2. Prof. dr Slobodanka Mitrović, Associate professor of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrower scientific field of Pathological anatomy, member 3. Prof. dr Oliver Stojković, Associate professor of Faculty of Medicine, University of Belgrade for the narrower scientific field of Human genetics, member |
| Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation: |
| Date of Dissertation Defense: |

САЖЕТАК

Циљ ове студије је био да се испита ефекат формалина и парафинског блока на квалитет ДНК изоловане из различитих здравих ткива изузетих током судскомедицинских обдукција. Коришћена су здрава ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега која су фиксирана у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину од 6h до 2 месеца, као и парафински блокови здравих ткива срца, јетре и мозга архивирани од 1988-2017. године. Морфолошке одлике ткива су проучаване након Н&Е бојења препарата. ДНК је изолована помоћу фенол-хлороформ-изоамил алкохола (PCI) и комерцијаног кита. Чистоћа и принос ДНК су одређени спектрофотометријски. Интегритет изоловане ДНК је одређен PCR амплификацијом GPD1 (150bp), АСТВ (262bp) и RPL4 (407bp) гена. На хистоморфолошке карактеристике ткива не утичу ни фиксирање ткива у формалину ни калушљење у парафински блок. Екстракција ДНК из узорака ткива PCI методом омогућује добијање ДНК бољег квалитета од ДНК добијене коришћењем кита. Бољи квалитет ДНК је у узорцима ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину. Не постоји разлика у чистоћи и интегритету ДНК између различитих фиксираних ткива, већ само у приносу: највећи принос ДНК је добијен у узорцима из ткива јетре, а најмањи из срца и мозга. Дужина фиксирања утиче на принос и интегритет ДНК: до 72h фиксирања је могуће амплификовати фрагменте дужине до 407bp, а до 14 дана фрагменте до 262bp. Највећи принос ДНК је добијен из укалушљеног ткива јетре, а из ткива срца и мозга је излована ДНК очуванијег интегритета. Дужина архивирања парафинских блокова ткива утиче на квалитет ДНК: RPL4 је амплификован до 6 година, АСТВ до 26 година и GPD1 до 30 година архивирања парафинских блокова ткива. ДНК изолована PCI методом из ткива срца и мозга која су фиксирана у 10% пуферизованом формалину има најбољи квалитет, па су ова ткива погодана за молекуларно биолошке анализе и након 30 година архивирања.

КЉУЧНЕ РЕЧИ: судскомедицинска обдукција, ткиво фиксирано у формалину и укалушљено у парафински блок, изоловање ДНК, чистоћа ДНК, принос ДНК, фрагментација ДНК, PCR

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the effect of formalin and paraffin block on the quality of DNA isolated from various healthy tissues excluded during medico-legal autopsies. Healthy heart, liver, brain, lung and kidney tissues fixed in 10% buffered or 4% unbuffered formalin from 6h to 2 months were used, as well as paraffin blocks of healthy heart, liver and brain tissues archived from 1988-2017. Morphology of tissues was studied using H&E staining. DNA was isolated using phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) and commercial kit. The purity and yield of DNA were determined spectrophotometrically. The integrity of the isolated DNA was determined by PCR amplification of GPD1 (150bp), ACTB (262bp) and RPL4 (407bp) genes. The histomorphological characteristics of the tissue are not affected by tissue fixation in formalin or embedding into a paraffin block. Extraction of DNA from tissue samples by PCI method enables obtaining better quality of DNA than DNA obtained using commercial kit. Better DNA quality is obtained from samples isolated from tissues fixed in 10% buffered formalin. There is no difference in the purity and integrity of DNA between different tissues, but only in yield: the highest DNA yield was obtained in samples from fixed liver tissues, and the lowest from the heart and brain. The duration of fixation affects on yield and integrity of DNA: fragments up to 407bp in length can be amplified up to 72h of fixation, and fragments up to 262bp in length up to 14 days of fixation. The highest yield of DNA was obtained from embedded liver tissue and DNA of more preserved integrity was extracted from heart and brain tissue. The duration of archiving of paraffin tissue blocks affects the quality of DNA: RPL4 is amplified up to 6 years, ACTB up to 26 years and GPD1 up to 30 years of archiving paraffin tissue blocks. DNA isolated by PCI method from heart and brain tissues fixed in 10% buffered formalin has the best quality, so these tissues are suitable for molecular biological analysis even after 30 years of archiving.

KEY WORDS: medico-legal autopsy, formalin fixed paraffin-embedded tissues, DNA isolation, DNA purity, DNA yield, DNA fragmentation, PCR

САДРЖАЈ

| | |
|---|----|
| 1. УВОД..... | 1 |
| 1.1. Хумани геном..... | 3 |
| 1.2. Структура и функција молекула ДНК..... | 4 |
| 1.2.1. Секвенце у молекулу ДНК..... | 5 |
| 1.2.1.1. Кодирајуће секвенце..... | 5 |
| 1.2.1.2. Некодирајуће секвенце..... | 6 |
| 1.3. Генетички маркери од значаја за форензичку генетику..... | 7 |
| 1.4. Методе за изоловање и анализу молекула ДНК..... | 9 |
| 1.4.1. Методе за изоловање и квантификацију молекула ДНК..... | 10 |
| 1.4.2. Методе за анализу молекула ДНК изолованих из биолошких узорак..... | 12 |
| 1.5. Значај анализе молекула ДНК у судској медицини..... | 14 |
| 1.6. Фиксирање ткива..... | 15 |
| 1.6.1. Врсте фиксатива..... | 15 |
| 1.6.2. Хемијске и физичке особине формалдехида..... | 16 |
| 1.6.3. Фиксирање ткива формалдехидом..... | 17 |
| 1.6.4. Реакција између формалдехида и молекула ДНК..... | 18 |
| 1.7. Парафински блокови ткива..... | 19 |
| 1.7.1. Карактеристике ткива и молекула ДНК укалупљених у парафински блок..... | 20 |
| 1.7.2. Чување и складиштење парафинских блокова ткива..... | 21 |
| 1.7.3. Значај и примена парафинских блокова ткива..... | 21 |
| 2. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ..... | 23 |
| 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ..... | 25 |
| 3.1. Хемикалије..... | 26 |
| 3.2. Врста студије и популација која се истражује..... | 27 |
| 3.3. Узорковање и експерименталне групе..... | 27 |
| 3.4. Калупљење ткива у парафинске блокове..... | 29 |
| 3.5. Прављење микроскопских препарата и хистоморфолошки опис ткива..... | 29 |
| 3.6. Припрема ткива за изоловање молекула ДНК..... | 30 |
| 3.6.1. Припрема ткива фиксираних у формалину..... | 30 |
| 3.6.2. Депарафинизација парафинских блокова ткива..... | 30 |
| 3.7. Изоловање молекула ДНК..... | 31 |
| 3.7.1. Изоловање молекула ДНК методом органске екстракције (РСИ метода)..... | 31 |
| 3.7.2. Изоловање молекула ДНК коришћењем комерцијалног комплета (кит)..... | 32 |
| 3.8. Спектрофотометријско одређивање чистоће и приноса изоловане ДНК..... | 32 |
| 3.9. Ланчана реакција полимеразе (Polymerase chain reaction-PCR)..... | 33 |

| | |
|--|----|
| 3.10.Електрофореза ДНК на агарозном гелу..... | 35 |
| 3.11.Статистичка обрада података..... | 36 |
| 4. РЕЗУЛТАТИ..... | 37 |
| 4.1. Хистоморфолошке карактеристике ткива..... | 38 |
| 4.1.1.Хистоморфолошке карактеристике ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину..... | 38 |
| 4.1.2.Хистоморфолошке карактеристике ткива укалупљених у парафинске блокове..... | 40 |
| 4.2. Квалитет ДНК изоловане из ткива фиксираних формалину..... | 41 |
| 4.2.1.Чистоћа и принос ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину..... | 41 |
| 4.2.1.1. Утицај методе за изоловање ДНК из фиксираних ткива на чистоћу и принос изоловане ДНК..... | 41 |
| 4.2.1.2. Утицај врсте формалина на чистоћу и принос изоловане ДНК... | 42 |
| 4.2.1.3. Утицај врсте ткива фиксираних у формалину на чистоћу и принос изоловане ДНК..... | 45 |
| 4.2.1.4. Утицај дужине фиксирања ткива у формалину на чистоћу и принос изоловане ДНК..... | 47 |
| 4.2.1.5. Утицај свих испитиваних фактора на чистоћу и принос ДНК изоловане из различитих ткива фиксираних у формалину..... | 51 |
| 4.2.2.Интегритет ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину..... | 53 |
| 4.2.2.1. Утицај методе за изоловање ДНК из фиксираних ткива на интегритет молекула ДНК..... | 54 |
| 4.2.2.2. Утицај врсте формалина на интегритет молекула ДНК..... | 55 |
| 4.2.2.3. Утицај врсте фиксираних ткива на интегритет молекула..... | 56 |
| 4.2.2.4. Утицај дужине фиксирања ткива на интегритет молекула ДНК..... | 57 |
| 4.3. Квалитет ДНК изоловане из ткива укалупљених у парафинске блокове..... | 62 |
| 4.3.1.Чистоћа и принос ДНК изоловане из ткива укалупљених у парафинске блокове..... | 62 |
| 4.3.1.1. Утицај методе за изоловање ДНК из укалупљених ткива на чистоћу и принос изоловане ДНК..... | 62 |
| 4.3.1.2. Утицај врсте ткива укалупљених у парафинске блокове на чистоћу и принос изоловане ДНК..... | 63 |
| 4.3.1.3. Утицај дужине чувања ткива укалупљених у парафинске блокове на чистоћу и принос изоловане ДНК..... | 66 |
| 4.3.2.Интегритет ДНК изоловане из ткива укалупљених у парафинске блокове..... | 69 |
| 4.3.2.1. Утицај методе за изоловање ДНК из укалупљених ткива на интегритет ДНК..... | 69 |
| 4.3.2.2. Утицај врсте укалупљеног ткива на интегритет молекула ДНК.. | 71 |
| 4.3.2.3. Утицај дужине архивирања укалупљеног ткива на интегритет молекула ДНК..... | 72 |
| 4.4. Поређење квалитета ДНК изоловане из ткива која су фиксирани у формалину и ткива која су укалупљена у парафинске блокове..... | 76 |
| 5. ДИСКУСИЈА..... | 79 |

| | |
|--------------------|----|
| 6. ЗАКЉУЧЦИ..... | 91 |
| 7. СКРАЋЕНИЦЕ..... | 94 |
| 8. ЛИТЕРАТУРА..... | 97 |

1. УВОД

Дезоксирибонуклеинску киселину, ДНК је први пут изоловао швајцарски научник Мишер (*Friedrich Miescher*) 1869. године. Мишер је изучавао бихемијску структуру леукоцита анализирањем гноја са хируршких завоја које је добијао из оближње болнице. Своја истраживања је спроводио у кухињи средњовековног замка у Немачком граду Тубингену користећи веома примитивну опрему. Током овог истраживања открио је нову мистериозну супстанцу коју је назвао "нуклеин". Закључио је да то није ни протеин ни липид и да садржи атоме угљеника, водоника, азота, кисеоника и велике количине фосфора. Пошто је открио да нуклеин тј. молекул ДНК постоји и у једру других ћелија, Мишер је претпоставио да је молекул ДНК одговоран за преношење наследних особина (*Dahm, 2008*). Међутим, прошло је скоро 70 година пре него што је до истог закључка дошао Ејвери (*Oswald Avery*) радећи експерименте на бактеријама. Херши (*Alfred Hershey*) и Чејз (*Marta Chase*) су 1952. године потврдили да је молекул ДНК носилац генетичких информација (*Dahm, 2005*). Када су 1953. године Вотсон (*James Watson*) и Крик (*Francis Crick*) описали секундарну структуру ДНК која испуњава све особине супстанце која је носилац наследне особине, настала је нова наука – молекуларна биологија, која је направила пробој у свим биомедицинским наукама. Данас се анализа молекула ДНК користи не само у научно-истраживачке сврхе, већ има примену у превенцији, дијагностици и терапији многих болести. Анализа молекула ДНК се најчешће користи за дијагнозу наследних болести, истраживање малигних процеса, откривање заразних болести, у пренаталној дијагностици и у судској медицини (*Sedlacek and Duspivova, 1992; Norbury and Norbury, 2006*). Развојем персоналне медицине ДНК анализе се употребљавају у циљу генетичког профилисања, што укључује откривање предиктивних биомаркера (*Hamamoto et al, 2019*). Предиктивни биомаркери служе да се идентификују пацијенти са ризиком за одређену болест или тешку варијанту те болести и самим тим омогућавају превенцију тих болести, како би се побољшао квалитет живота (*Hamamoto et al, 2019*). Анализа молекула ДНК у судској медицини има важну, често одлучујућу улогу у идентификацији жртава и извршилаца различитих кривичних дела (убиства, силовања, саобраћајне несреће, провале, крађе и др.) (*Gunn, 2019*). Поред тога, анализа молекула ДНК представља суверену методу у идентификацији жртава масовних несрећа и несталих особа (*Issan et al, 2019*).

1.1. ХУМАНИ ГЕНОМ

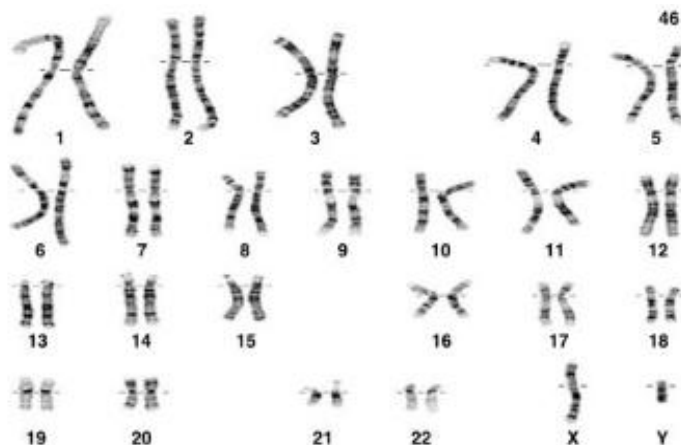
Хумани геном се састоји од једарне ДНК организоване у виду хромозома који су смештени у ћелијском једру и циркуларне, митохондријалне ДНК присутне у матриксу митохондрија (*Michaelis et al, 2008*). Хумане телесне ћелије имају једру у коме се налази 46 хромозома, тј. 23 пара хромозома. Један сет хромозома наслеђујемо од мајке, а други од оца (*Goodwin et al, 2007; Michaelis et al, 2008*). За разлику од једарне ДНК која представља комбинацију наследног материјала родитеља, митохондријална ДНК се наслеђује искључиво од мајке. У телесним ћелијама човека се налази и до неколико стотина митохондрија, а њихов број зависи од енергетских потреба ћелије (*Michaelis et al, 2008*).

Хромозоми једарног хуманог генома су дугачке кончасте творевине изграђене од ланаца ДНК, протеина и мале количине РНК (рибонуклеинска киселина). Да би се постигла високоорганизована структура хромозома, ДНК молекул је удружен са хистонским и нехистонским протеинима који помажу паковање и организацију молекула ДНК (*Goodwin et al, 2007; Albert et al, 2015*). Комплекс хистонских и нехистонских протеина са молекулом ДНК чини хроматин (**Слика 1**) (*Albert et al, 2015*). Хроматин под микроскопом изгледа као низ перли, где је низ ланац молекула ДНК, а перле су нуклеозоми (*Smolle and Workman, 2013; Albert et al, 2015*). Нуклеозоме чини октамерно језгро хистонских протеина око кога су 1,7 пута обмотани ланци молекула ДНК (*Smolle and Workman, 2013; Albert et al, 2015*). Паковање ДНК са хистонским и нехистонским протеинима води формирању метафазних хромозома у којима је ДНК густо сабијена, што омогућава њено паковање у једру. Метафазни хромозоми се састоје од две идентичне сестринске хроматиде, које су повезане центромером. Положај центромере одређује и изглед хромозома. На крајевима хромозома се налазе теломере које обезбеђују линеаран облик хромозома.



Слика 1. Организација хроматина (*Albert et al, 2015*).

Хумани једарни геном чине 24 различита хромозома: 22 су аутозомни хромозоми, а два хромозома су полни, X и Y. У свим телесним ћелијама човека се налази 23 пара хромозома, 22 пара аутозомних, и један пар полних: XX се налазе у ћелијама жене, а XY у ћелијама мушкарца. Полне ћелије садрже duplo мање хромозома, дакле по једну хромозомску гарнитуру (23 хромозома). Спајањем мушке и женске полне ћелије настаје гамет који има 46 хромозома. Скуп хромозома у једној ћелији представља кариотип (*Goodwin et al, 2007*).



Слика 2. Мушки кариотип (Goodwing et al, 2007).

Хумани митохондријални геном чини само један кратки кружни хромозом који се налази у митохондријама. На митохондријалној ДНК, која садржи 16.569 bp налази се укупно 37 гена, који се настављају један на други. Од тога, 13 гена кодира полипептиде, а остали носе информацију за синтезу рРНК (рибозомална РНК) и тРНК (транспортна РНК). Митохондријални хромозом се састоји највећим делом од кодирајућих секвенци; само кратак сегмент величине 1100 bp, назван D петља, је некодирајући регион. С обзиром да се митохондрије наслеђују од мајке, сродне особе по мајчиној линији имају исти молекул митохондријалне ДНК, што је од значаја у форензици.

1.2. СТРУКТУРА И ФУНКЦИЈА МОЛЕКУЛА ДНК

Молекул ДНК је полимер изграђен од четири врсте нуклеотида. Сваки нуклеотид чини шећер дезоксирибоза, остатак фосфорне киселине и једна од четири азотне базе (пуринске, А-аденин и Г-гуанин и пиримидинске, С-цитозин и Т-тимин) (Lee et al, 1994). Фосфатна група је везана за С5 атом дезоксирибозе естарском везом, а азотна база за С1 атом дезоксирибозе Н-гликозидном везом, градећи нуклеотид. У оквиру једног ланца нуклеотида су повезани фосфодиестарским везама које се формирају између С3 атома дезоксирибозе и фосфорне групе. Секундарну структуру молекула ДНК чине два полинуклеотидна ланца ДНК организована у виду двоструког хеликса (дволанчане завојнице). Ланци су антипаралелни и повезани водоничним везама које се формирају између наспрамних пуринских и пиримидинских база (Albert et al, 2015). Базе А и Т су повезани двоструком водоничном везом, а базе Г и С троструком водоничном везом, тако да је потребно више енергије за раскидање водоничних веза у регионима ДНК са више GC парова (Lee et al, 1994).

Наследна информација је записана у редоследу нуклеотида у молекулу ДНК, односно у примарној структури ДНК. Одређивање примарне структуре ДНК хуманог генома или секвенцирање урађено је крајем прошлог и почетком 21. века (од 1990-2003.) у оквиру Пројекта Хумани геном (engl. *Human Genome Project, HGP*), а основни циљ овог пројекта је био идентификација и мапирање гена (одређивање њиховог положаја на хромозомима) (Brown, 2002; Goodwing et al, 2007). Показано је да се дуж

молекула ДНК налазе гени - делови ДНК који носе информацију за синтезу функционалних продуката. Гени се налазе на свим молекулима ДНК у ћелији, односно улазе у састав свих хромозома, а сваки хромозом садржи регионе сиромашне или богате генима. Највећи број гена се налази на највећем аутозомном хромозому број 1, а најмањи на полном Y хромозому (http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html).

На молекулу ДНК се налази комплетна наследна информација неопходна за структурну и функционалну организацију ћелија и организма у целини, као и за размножавање (*Goodwin et al, 2007*). Ова информација се преноси са родитеља на потомке захваљујући веома прецизним процесима самодупликације–репликације ДНК, која претходи свакој ћелијској деоби. У процесу репликације долази до удвајања молекула ДНК, које се одвија на семиконзервативан начин, односно стари ланац служи као матрица за синтезу новог ланца, при чему се на крају добијају два идентична молекула ДНК. Приликом ћелијске деобе свака ћерка ћелија добија по један ланац ДНК, што значи да имају исти генетички материјал као и мајка ћелија. На тај начин генетичка информација остаје очувана у оквиру једне врсте. На основу наследне информације на молекулу ДНК, у ћелији се у процесима транскрипције и транслације, синтетишу сви неопходни протеини који су неопходни за одржавање животних процеса. Улога синтетисаних протеина у организму је разноврсна (*Allison, 2007*). Они учествују у грађи цитоскелета, служе као хормони који преносе сигнал са једне ћелије на другу ћелију, омогућавају комуникацију међу ћелијама, служе за сигнализацију у оквиру ћелије, затим за транспорт, као ензими каталишу мноштво хемијских реакција у организму, чине део имуног система и утичу на активност гена (*Allison, 2007*).

1.2.1. Секвенце у молекулу ДНК

Једарна ДНК се састоји од 3,2 милијарди нуклеотида по хаплоидном сету хромозома (*Albert et al, 2015*). Једарни геном се може поделити у две различите категорије на основу структуре и функције секвенци молекула ДНК (*Goodwin et al, 2007*). Око 40% генома улази у састав гена и секвенци које су сродне генима, при чему само 2% генома заузимају секвенце које кодирају полипептиде. Највећи део генома, око 60%, припада екстрагенској ДНК. Екстрагенску ДНК чине секвенце које раздвајају суседне гене (*Todorović and Todorović, 2019*). Из овога се види да највећи део хуманог генома чине некодирајуће секвенце, док информативни делови чине тек 2% молекула ДНК.

1.2.1.1. Кодирајуће секвенце

Делови ДНК који носе информацију за синтезу полипептида зову се гени. Људски геном садржи око 20 000-25 000 гена (*Goodwin et al, 2007*). Гени се састоје од егзона и интрона. Егзони су кодирајући делови гена који носе информацију за синтезу. Између егзона се налазе интрони, некодирајући делови гена, који не носе информацију за синтезу продукта. Иако се у процесу транскрипције и они преписују заједно са егзонима, исецају се и "избацују" из примарног транскрипта. Људски гени имају у

просеку око 9 егзона по гену (Brown, 2002). Просечно егзон је дужине око 50-200 bp (Lodish et al, 2000). Интрони су генерално дужи од егзона и више од 90% ДНК у оквиру гена припада интронима (Lander, 2011). Интрони учествују у регулацији експресије гена везивањем регулаторних протеина и комбиновањем егзона у различите полипептидне ланце (Meisenberg and Simmons, 2011). У састав гена, поред егзона и интрона, улазе и промоторски региони и граничне секвенце, који се налазе на 5' крају, испред гена. Ове секвенце се не транскрибују, а за њих се везују регулаторни протеини који започињу процес транскрипције и који регулишу експресију гена.

Већина гена који кодирају протеине су присутни у само једној копији у хаплоидном геному. То су мономорфни гени који кодирају протеине који обављају виталне функције у ћелији и организму па су названи гени чуваркуће (engl. "housekeeping" genes). Било каква мутација у оквиру ових гена има фаталне последице, управо због важних функција коју производи тих гена имају. Поред тога постоје и дупли гени са две идентичне или готово идентичне копије блиско повезане на истом хромозому. Често један од дуплих гена мутира, чиме губи способност транскрипције и тако настају псеудогени (Meisenberg and Simmons, 2011). Постоје и гени који су присутни у много копија, као што су гени који кодирају синтезу рибозомалне РНК, транспортне РНК и хистона (Lodish et al, 2000). Фамилије гена се састоје од два или више сличних, али не идентичних гена који су у већини случајева близу једни другима на хромозому (Meisenberg and Simmons, 2011).

Током еволуције су се дешавале мутације у појединим генима, што је довело до настанка генских алела, различитих облика једног гена и полиморфности молекула ДНК. Генски алели се незнатно разликују у нуклеотидном саставу, а последица тога је престанак синтезе или синтеза другачијег полипептидног ланца, што се може детектовати на нивоу фенотипа. Све ово обезбеђује индивидуалну уникатност на нивоу молекула ДНК и представљају фокус форензичке генетике.

1.2.1.2. Некодирајуће секвенце

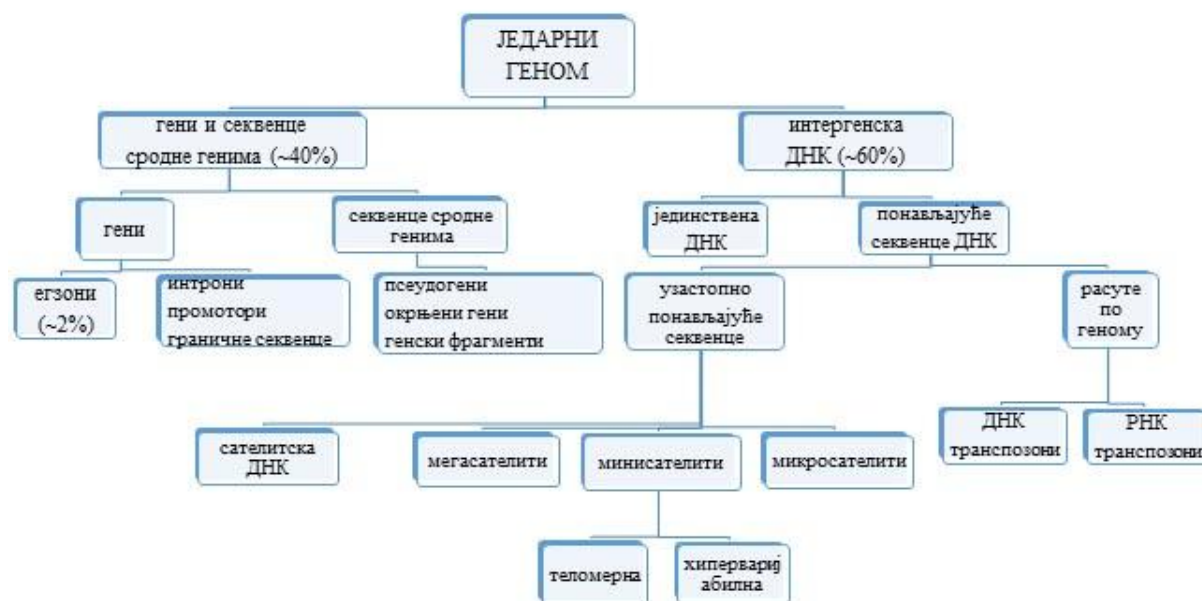
Већи део генома, око 60%, чини екстрагенска ДНК која не носи информацију за синтезу функционалних продуката. Екстрагенску ДНК чине јединствене и понављајуће секвенце. Понављајуће секвенце се састоје од кратких, узастопно понављајућих секвенци или могу бити расуте по једарном геному (транспозоми) (Todorović and Todorović, 2019).

Узастопно понављајуће секвенце имају основне јединице понављања које су смештене једна поред друге у низу (Brown, 2002). Дужина узастопно понављајућих секвенци ДНК је веома различита између људи, вероватно због *crossing-over*-а током мејозе. Разлике у дужини ових секвенци су основа ДНК профилисања, односно идентификације (Lodish et al, 2000). У зависности од дужине основне јединице понављања, узастопно понављајуће секвенце делимо на: сателитску ДНК, мегасателитску ДНК, минисателитску ДНК (engl. *Variable Number of Tandem Repeats, VNTR*) и микросателитску ДНК (engl. *Short Tandem Repeats, STR*). Због велике дужине сателитска ДНК и мегасателити нису погодни за индивидуално профилисање. Минисателити, се састоје од узастопних поновака дужине 6 bp до 100 bp, које се понављају, чинећи низове величине од 100 bp до 200 kb (Ziętkiewicz et al, 2012; Hu et al, 2014). Број поновака у оквиру низа је различит код различитих индивидуа, што их

чини веома интересантним секвенцама у форнзичкој генетици. Ове полиморфне секвенце је открио 1985. године Алек Џефри (*Alec Jeffery*) и означио их као VNTR секвенце и развио технику ДНК отиска (*engl. DNA fingerprinting*) која представља почетак примене анализе молекула ДНК у форензици. Последњих година много су интересантнији микросателити или STR секвенце које се састоје од кратких, узастопних поновака који у низу дужине до 150 bp садрже мотиве величине од 1 bp до 6 bp (*Foroughmand et al, 2014*). Број поновака у микросателитима је веома варијабилан, што их чини веома интересантним генетичким маркерима у форензици.

Понављајуће секвенце расуте по геному могу да мењају свој положај у геному па се називају и мобилни елементи генома. Претпоставља се да је њихова улогу у обликовању генома током еволуције (*Kazazian and Moran, 2017*).

Некодирајући део митохондријалне ДНК је познат као D петља. Овај регион митохондријалне ДНК има два хиперваријабилна региона: HV1 и HV2 (*Decorte and Cassiman, 1993; Bianchi and Lio, 2007*), који показују висок степен варијабилности између несродних особа по мајчиној линији, што омогућава примену анализе ових регија у форензици (*Parsons and Coble, 2001*).



Слика 3. Хумани једарни геном (*Todorović and Todorović, 2019*).

1.3. ГЕНЕТИЧКИ МАРКЕРИ ОД ЗНАЧАЈА ЗА ФОРЕНЗИЧКУ ГЕНЕТИКУ

Форензичка генетика је интердисциплинарна наука чији је задатак идентификација и утврђивање родбинских веза коришћењем метода за анализу молекула ДНК. Генотипизација је постала основ у карактеризацији форензичких биолошких узорака (*Budowle et al, 2009*). Фокус форензичке генетике представљају

полиморфни региони (генски локуси) на молекулу ДНК који обезбеђују индивидуалну уникатност. Пошто се ови полиморфни региони налазе у различитим деловима генома (кодирајућим и некодирајућим), њихово присуство се може детектовати на основу фенотипа (спољашњег изгледа једне особе), на основу синтезе протеина који је кодиран тим полиморфним геном (детектује се употребом серолошких или ензимских техника) или искључиво анализом молекула ДНК, када се налазе у некодирајућим секвенцама (детектује се употребом молекуларно-биолошких метода). Због значаја који ови полиморфни генски локуси имају у идентификацији, названи су и генетички маркери.

Конвенционални или класични генетички маркери који се испољавају на нивоу фенотипа или синтезе одређеног полипептида имају малу дискриминативну моћ, због чега су веома непоуздани, па је неопходно анализирати већи број ових маркера истовремено, како би се обезбедила већа поузданост (*Todorović and Todorović, 2019*).

Молекуларно-генетички маркери се налазе у некодирајућем делу генома и могу се открити употребом метода молекуларне биологије за анализу ДНК. У форензичкој генетици се користе различити маркери који су подељени у две велике групе: оне који детектују мулти-алелске полиморфизме (VNTR и STR маркери) или биалелске полиморфизме (*engl. Single Nucleotide Polymorphisms, SNP*) (*Bianchi and Lio, 2007; Ziętkiewicz et al, 2012*). Код мултиалелског полиморфизма генски локуси имају велики број различитих алелиних стања. Различити алели се разликују по броју узастопних поновака. Основни мотив понављања VNTR маркера је дужине 6-100 bp, при чему се број понављања разликује од особе до особе (*Ziętkiewicz et al, 2012; Hu et al, 2014*). Ови VNTR маркери су добри за идентификацију зато што имају велики број алелних форми (100 и више) (*Ziętkiewicz et al, 2012*). Главно ограничење употребе VNTR маркера, је то што је за ову анализу неопходна добро очувана ДНК. Почетком 1990-их прешло се са маркера који имају дугачак понављајући сегмент на маркере са кратким понављајућим сегментом, као што су STR маркери, чија је дужина основног мотива понављања дужине 1-6 bp (*Foroughmand et al, 2014*). Први комерцијални китови који су могли да користе више STR маркера у једној реакцији су постали доступни почетком 2000-те године (*Hu et al, 2014*). Данас су у форензичким лабораторијама VNTR маркери замењени са STR маркерима.

Форензичке лабораторије користе STR маркере као стандард за ДНК идентификацију (*Babol-Pokora and Berent, 2008*). Рутински се за идентификацију користи истовремено 15-16 различитих STR маркера, као и амелогенин ген за идентификацију пола (*Yang et al, 2014; Kowalazyk et al, 2018*). Мала дужина ампликона STR маркера (90-500 bp) их чини прикладним за анализу деградоване ДНК (*Sanchez et al, 2006; Butler, 2007; Bianchi and Lio, 2007; Budowle and Daal, 2008; Budowle et al, 2009; Foroughmand et al, 2014; Kowalazyk et al, 2018*). Последњих година постоји тенденција да се повећа број појединачних локуса који се амплификују да би се избегла случајна поклапања. Зато је данас у многим случајевима стандард проширен на 24 STR маркера (*Kowalazyk et al, 2018*). STR маркери су тренутно најинформативнији генетички маркери за идентификацију (*Budowle and Daal, 2009; Ziętkiewicz et al, 2012; Foroughmand et al, 2014; Pontes et al, 2015*). Поред STR маркера који се налазе на аутозомним хромозомима постоје и STR маркери који се налазе на полним хромозомима (Y-STR и X-STR) који су од значаја за идентификацију пола. Идентификација пола се углавном заснива на амелогенин гену због разлике у дужини амликона код мушкараца и жена (*Kowalazyk et al, 2018*). Међутим, постоји могућност мутације амелогенин гена, због чега је од велике користи употреба Y-STR и X-STR маркера (*Kowalazyk et al, 2018*). Поред тога, Y-STR маркери се користе у случајевима

сексуалног насиља код помешаних узорака, односно када постоји више мушких нападача и у случајевима где је велика количина ДНК која потиче од жене помешана са незнатном количином ДНК која потиче од мушкарца (*Barra et al, 2015*).

Међутим, ДНК која је доста оштећена садржи веома кратке ДНК фрагменте. Такав је случај са ДНК изолованом из различитих биолошких трагова, али и из ткива које је фиксирано у формалину и укалупљено у парафинске блокове, доводећи до тога да је конвенционална STR типизација неуспешна (*Babol-Pokora and Bernet, 2008*). Успех амплификације деградоване ДНК је побољшан употребом мини-STR маркера (*Butler, 2007*). Дужина ампликона мини-STR маркера је између 71-250 bp. Постоје и маркери који су још краћи од мини-STR маркера, а то су SNP маркери чији су ампликони дужине 50-60 bp (*Budowle and Daal, 2009; Ziętkiewicz et al, 2012; Pontes et al, 2015*). SNP маркери су мале генетичке варијације које се дешавају у хуманој ДНК на сваких 100 до 300 bp дуж 3,2 милијарди базних парова у хуманом геному. Ови SNP маркери спадају у биалелски полиморфизам тј. постоје у два алтернативна алелска стања која се разликују у једном нуклеотиду због супституције, инсерције или делеције нуклеотида (*Bruijns et al, 2018*). SNP маркери се појављују у некодирајућим, али и у кодирајућим деловима ДНК (нпр. који су одговорни за синтезу ензима респираторног ланца), како у нуклеарној тако и у митохондријалној ДНК (*Babol-Pokora and Bernet, 2008; Kowalazyk et al, 2018*). Проблем са SNP маркерима је што су мање информативни у односу на STR маркере (*Budowle and Daal, 2008; Pontes et al, 2015*), па је поребан панел од 50-100 SNP маркера за генотипизацију (*Sanchez et al, 2006; Budowle and Daal, 2008; Ziętkiewicz et al, 2012; Pontes et al, 2015*). SNP маркери се користе и као допуна стандардним STR маркерима за генотипизацију (*Ziętkiewicz et al, 2012; Pontes et al, 2015*).

За разлику од клиничких генетичких истраживања у којима резултат ДНК анализе сам по себи носи информацију, форензичка генетика се заснива на компаративној анализи, где се ДНК профил из једног биолошког извора пореди са ДНК профилем из другог биолошког извора (*Vitošević et al, 2018a*). Идентификација се врши упоређивањем ДНК профила добијеног из узорка (биолошког трага) који се испитује са ДНК профилем особе чији је идентитет познат (референтни узорак). Међутим, када је починилац кривичног дела непознат, када га нема у бази осумњичених или окривљених, референтни узорак недостаје, па ДНК профил добијен са места злочина не може да се са њим упореди. У том случају може се применити "ДНК фенотипизација" где се употребом одређених SNP маркера може предвидети боја коже, очију и косе, облик лица и географско порекло починитеља кривичног дела (*Curtis et al, 2019; McCord et al, 2019*).

1.4. МЕТОДЕ ЗА ИЗОЛОВАЊЕ И АНАЛИЗУ МОЛЕКУЛА ДНК

Биолошки узорци који се најчешће користе као извор ДНК у форензичкој генетици су крв, пљувачка, семена течност, урин, нокти, длаке, кожа, зуби, кости и различита друга ткива и телесне течности (*Ziętkiewicz et al, 2012; Magalhães et al, 2015*). Међутим, ови узорци поред молекула ДНК садрже и мноштво других супстанци и молекула (*Budowle et al, 2000*), због чега је неопходно применити одговарајуће методе како би се добили што чистији узорци ДНК за даљу анализу.

1.4.1. Методе за изоловање и квантификацију молекула ДНК

Геномска ДНК се може изоловати из биолошког материјала у коме постоје ћелије са једром. Изоловање ДНК из биолошких узорака подразумева ослобађање молекула ДНК од осталих ћелијских компоненти, тј. разбијање ћелије и ћелијског једра да би се ослободио генетички материјал. Тај процес се назива дигестија ћелија и постиже се додавањем лизирајућег пуфера који садржи детергенте (који уклањају липиде мембране), ензим протеиназу К (који врши дигестију свих протеина, укључујући ензиме, протеине мембране, хистоне и нехистоне), као и соли NaCl које стабилизују молекуле ДНК.

Да би ДНК могла да се даље употреби за анализу, неопходно је уклонити компоненте које могу да деградују ДНК, али и да утичу на успешност метода које се користе за анализу изоловане ДНК (инхибитори PCR). То су, пре свега, компоненте телесних течности (уреа, меланин, хемоглобин), али и хемијски реагенси који се користе у лабораторији (формалин, органска и фенолна једињења, гликоген, полисахариди и други). Зато је после лизирања ћелија неопходно урадити екстракцију ДНК. За екстракцију молекула ДНК из биолошких узорака за даље форензичке анализе користи се неколико техника: органска екстракција, екстракција хелирајућим смолама, FTA папирићи, екстракција чврстом фазом и екстракција исољавањем. Која ће метода бити употребљена за изоловање молекула ДНК зависи од биолошког узорка који се анализира, претпостављене количине молекула ДНК у том узорку, потребне брзине добијање резултата, као и од обучености тима и цене анализе (Butler, 2009).

Органска екстракција је дуги низ година била најчешће коришћена метода за изоловање ДНК. То је течно-течна екстракција молекула ДНК која се изводи сукцесивним додавањем неколико хемикалија. Након дигестије ћелија лизирајућим пуфером, додаје се смеша органских растварача фенола и хлороформа, која служи да се растворе липиди и протеини, док се молекули ДНК у овој смеси не растварају (Butler, 2009). ДНК остаје у воденој фази, док ће остали молекули прећи у органску фазу ове органско-водене мешавине. Након сепарације водене и органске фазе може се издвојити само водена фаза у којој су молекули ДНК. Мана ове методе је што захтева време, што се користе токсичне хемикалије и захтева пренос узорака између више епрувета што повећава ризик да дође до грешке или контаминације узорака (Nasiri et al, 2005). Последње две деценије развијене су нове методе за изоловање ДНК које користе хемикалије које су далеко мање токсичне од фенола (Butler, 2009).

Алтернативни и јефтин поступак за екстракцију молекула ДНК користи суспензију хелирајућих смола (*Celex*) које се могу додати директно у узорак. У већини протокола у биолошки узорак се додаје 5% суспензија *Celex*-а који се кува неколико минута да би ћелије пукле и ослободиле ДНК. Кување на 100°C доводи до денатурације молекула ДНК, до пуцања ћелијске мембране и уништавања ћелијских протеина (Butler, 2009). Честице *Celex*-а за себе везују мале молекуле из раствора које се након центрифугирања исталоже, а у раствору остају молекули ДНК. Екстракција молекула ДНК хелирајућим смолама представља брзу методу са малом могућности контаминације и губитка узорака (Coombs et al, 1999). Међутим, овако припремљени раствор ДНК може садржати нечистоће које могу реметити накнадну PCR реакцију.

FTA папирићи (*engl. Flinder Technology Associates papers, FTA papers*) су првобитно коришћени за складиштење молекула ДНК. Ови папирићи су натопљени са више хемикалија, за лизирање ћелија, фиксирање инхибитора ензимских реакција и

хемикалије које спречавају раст бактерија и гљивица. Након лизирања ћелија ослобођена ДНК остаје заробљена унутар папирића и тако може да се чува годинама на собној температури (Butler, 2009).

Изоловање нуклеинских киселина помоћу чврсте фазе је принцип на коме се заснива већина комерцијалних комплета. За разлику од течностно-течне екстракције где, долази до некомплетне сепарације фаза, у овој методи се чврстом фазом адсорбују нуклеинске киселине и цео процес зависи од рН пуфера и концентрације хаотропних соли пуфера који се користе за испирање (Tan and Yip, 2009). Ове хаотропне соли денатуришу протеине у течностној средини, док је молекула ДНК термодинамски стабилан (Butler, 2009). Чврста фаза су заправо спин колонице са силика-гел мембраном. Изоловање нуклеинских киселина чврстом фазом се заснива на адсорпцији нуклеинских киселина помоћу силицијум диоксида, а силицијум диоксид који се користи у многим комерцијалним спин колонама потиче из ћелијских зидова дијатомеја (Naccache et al, 2013). Кисели пуфери, који имају ниске рН вредности, са високом концентрацијом хаотропних соли омогућавају адсорпцију ДНК на силика-гел мембрани, док се остале нечистоће испирају. Употребом алкалних пуфера (виша рН вредност) са ниском концентрацијом соли ДНК се испира са силика-гел мембране и може да се употреби за даље анализе (Tan and Yip, 2009).

Други начин екстракције ДНК помоћу чврсте фазе је екстракција употребом магнетних честица. Ова метода се заснива на томе да се молекула ДНК везује за магнетне куглице у киселом раствору, док у раствору остају нечистоће. Након тога се додају раствори за испирање како би се молекули ДНК скинули са магнетних честица и прешли у раствор (Butler, 2009).

Екстракција ДНК изољовањем подразумева примену сланих раствора. Првобитно се ћелијски лизат третира протеиназом К преко ноћи, а затим додаје слани раствор (Nasiri et al, 2005). Ова метода подразумева коришћење раствора засићеног NaCl-ом да би се преципитирали протеини, а затим алкохола како би се преципитирали молекули ДНК (Miler et al, 1988; Rivero et al, 2006).

Будући да успешност амплификације молекула ДНК између осталог, зависи и од количине ДНК у изолату, пожељно је пре извођења генетичких анализа одредити количину ДНК у узорку. Знање о расположивој количини ДНК користи се за одлучивање о стратегији амплификације и употреби оптималне количине ДНК, да би могло да се сачува више изворног узорка одакле је ДНК изолована. Превише ДНК доводи до преоптерећених електрофореграма који отежавају тумачење резултата, а преамало ДНК доводи до губитка алела и неуспеха амплификације. Традиционална квантификација молекула ДНК подразумева спектрофотометријско мерење апсорбације светлости таласне дужине од 260 nm, пошто молекули ДНК апсорбују светлост управо ове таласне дужине. Поред тога, могу се употребљавати и агарозни гелови за мерење приноса на којима се фрагменти молекула ДНК раздвајају по величини електрофорезом. Међутим, проблем обе методе је што нису специфичне само за материјал хуманог порекла, па се не може знати да ли је ДНК изолована из одређеног узорка људског порекла или потиче од неке друге врсте (Madea, 2014). Међу савременијим методама за квантификацију молекула ДНК убрајају се хибридизација ДНК са *Alu* секвенцом или са пробом која је комплементарна секвенци D17Z1 (*slot blot* техника). Обе секвенце су специфичне за примате. На основу количине везане пробе може се тачно одредити количина молекула ДНК која је присутна у узорку (Lee et al, 2014). Најпрецизније и најелегантније методе за квантификацију молекула ДНК су *End point PCR* и *Real Time PCR*. *End point PCR* се производи анализирају по завршетку PCR,

док *Real Time PCR* количина ДНК се континуирано прати након сваког циклуса PCR (Butler, 2009). *Real Time PCR* је метода која комбинује PCR ампликацију и флуорометрију. Ова метода користи пробе обележене флуоресцентним бојама. Током PCR, проба са бојом се везује за новосинтетисани молекула ДНК, што резултира повећањем флуоресценције, а ниво флуоресценције се читава након сваког циклуса (Lee et al, 2014).

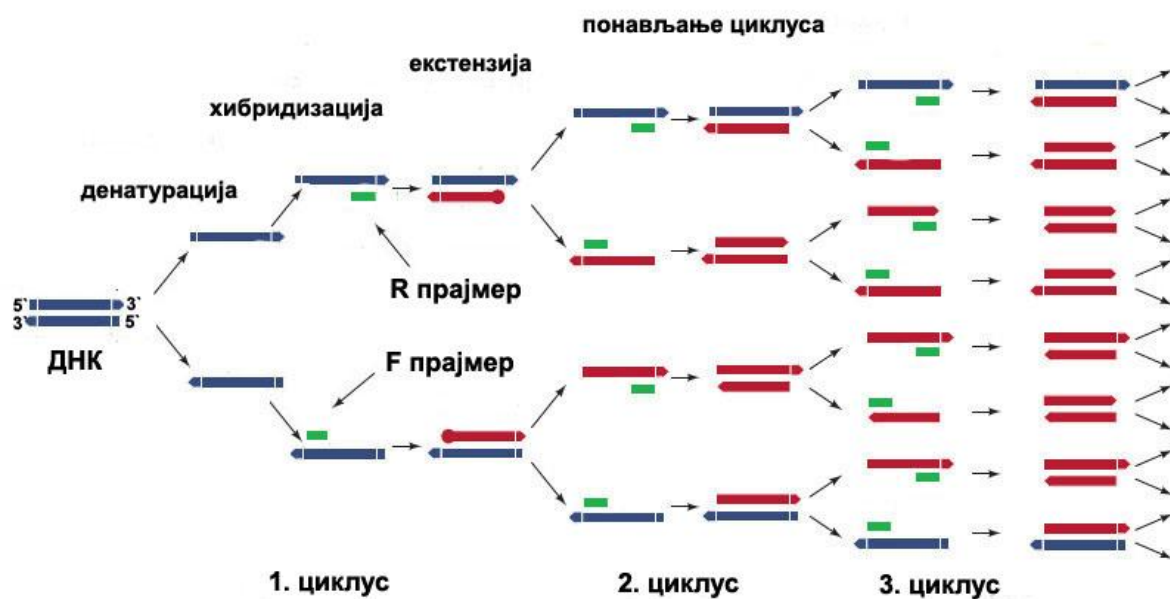
1.4.2. Методе за анализу молекула ДНК изолованих из биолошких узорака

Након изоловања и одређивања концентрације ДНК из биолошких узорака, примењују се методе за њену анализу. Која метода ће бити употребљена, зависи од квалитета и количине добијене ДНК.

RFLP (*engl. Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*) анализа је прва техника која је била примењена за ДНК профилисање (Dai and Long, 2015), којом су се издвајали и идентификовали VNTR маркери (Lee et al, 1994). Ова метода подразумева сечење молекула ДНК на мање фрагменте коришћењем ензима рестрикционе ендонуклеазе (Dai and Long, 2015). Након сечења молекула ДНК рестрикционим ензимима врши се сепарација рестрикционих фрагмената молекула ДНК електрофорезом на агарозном гелу. Агарозни гел који је потопљен у пуфер поставља се у поље једносмерне струје при чему ће краћи рестрикциони ДНК фрагменти путовати брже ка аноди и прећи даљи пут кроз гел (Lee et al, 1994). Након тога се врши денатурација молекула ДНК потапањем гела у базни раствор, да би се добила једноланчана ДНК која треба да хибридује са познатом ДНК пробом (Jarcho, 2001). ДНК проба је кратки једноланчани фрагмент ДНК чија је нуклеотидна секвенца позната и комплементарна ДНК фрагменту који желимо да идентификујемо. Једноланчани фрагмент молекула ДНК се пре хибридизације преноси на чврсту подлогу тј. најлонску мембрану капиларним силама. Пошто су ДНК пробе које се користе за хибридизацију радиоактивно обележене, визуелизација ДНК фрагмената (VNTR маркера) на најлон мембрани се постиже прислањањем мембране уз ренгенски филм (Jarcho, 2001). Након тога се уочава ДНК профил радиографијом. На основу положаја траке на филму, који одговара положају фрагмената ДНК на најлонској мембрани и гелу, можемо да проценимо дужину фрагмента, односно VNTR секвенце у испитиваном узорку. Недостаци ове анализе молекула ДНК је што је потребно много времена за извођење анализе, као и велика количина високомолекуларне ДНК, што често представља проблем са биолошким узорцима (Lee et al, 1994).

Након открића методе ланчане реакције полимеразе (*engl. Polymerase Chain Reaction, PCR*) 1983. године од стране Малинса (Kary Mullins) PCR је постала једна од најмоћнијих техника која се примењује у молекуларној биологији (Gunn, 2019). Основни принцип PCR је селективна амплификација, односно умножавање једне жељене секвенце молекула ДНК милион до милијарду пута и представља имитацију репликације молекула ДНК која се одвија у ћелијама. Основне одлике PCR су брзина, прецизне и цикличне промене температуре које су неопходне за одвијање процеса амплификације. Свака PCR реакција садржи 30-40 циклуса. Један циклус PCR чине 3 фазе (Слика 4): фаза денатурације ДНК матрице, хибридизација прајмера и елонгација или екстензија (Gunn, 2019). Током фазе денатурације на 95-97°C раскидају се водоничне везе између комплементарних ланаца молекула ДНК, да би се добила

једноланчана ДНК. У фази хибридизације, која се одиграва на нижој температури (50-60°C), за једноланчане молекуле ДНК се узима прајмер (почетница), кратки фрагмент ДНК који је комплементаран почетку фрагмента на испитиваној ДНК који желимо да ампликујемо. Сваки прајмер се узима за циљну секвенцу у ланцу молекула ДНК коју проналази у низу нуклеотида и они служе као граничници секвенце ДНК која се умножава. У фази елонгације се синтетише комплементарни ланац захваљујући ензиму *Taq* полимерази, користећи слободне нуклеотиде из реакционе смеше. У сваком следећем циклусу сви молекули ДНК служе као матрица за даљу синтезу, због чега са повећањем броја циклуса број циљних секвенци молекула ДНК расте експоненцијално (Gunn, 2019).



Слика 4. Фазе PCR реакције (Todorović and Todorović, 2019).

Уколико се у реакциону смешу дода два или више прајмера, у току једне PCR је могуће истовремено амплификовати два или више фрагмената ДНК. Оваква PCR амплификација је позната као дуплекс (*duplex*) или мултиплекс (*multiplex*) PCR. У току мултиплекс PCR важно је да нуклеотидни састав прајмера који се користе буде сличан како би услови PCR били адекватни за умножавање свих жељених сегмената ДНК.

Губитак одређене количине ДНК се дешава како током екстракције ДНК тако и током квантификације, што је велики проблем у форензици када се ради о малим почетним количинама ДНК (Cavanaugh and Bathrick, 2018). Овај проблем је превазиђен употребом тзв. директног PCR-а. За **директан PCR** није потребно претходно изоловање ДНК из биолошког узорка, као ни пречишћавање и квантификација молекула ДНК (Cavanaugh and Bathrick, 2018). Директан PCR је интеграција процеса изоловања и амплификације и омогућава добијање генетичких профила појединаца из биолошких трагова са јако деградованом ДНК (Kowalczyk et al, 2018).

После умножавања фрагмената ДНК изоловане из биолошког материјала потребно је раздвојити добијене амликоне. То се постиже електрофоретским

раздвајањем фрагмента различите дужине у електричном пољу на основу њихове дужине и брзине кретања кроз гел. Дужи фрагменти се крећу спорије и у јединици времена пређу краће растојање на гелу у односу на краће фрагменте. С обзиром да се различити алели једног STR локуса разликују у броју поновака основног мотива, тј. у дужини низа, након амплификације тог фрагмента ДНК и раздвајања ампликона на агарозном гелу, добија се прецизна генотипизација тог локуса.

ДНК секвенцирање је одређивање линеарног редоследа четири типа нуклеотида у молекулу ДНК (Lee et al, 1994). Још 1977. године Сангер (Frederick Sanger) је изумео секвенаторе прве генерације и 1980. године добио Нобелову награду (Bruijns et al, 2018). Од 2005-2007. године су произведени секвенатори друге генерације, а након тога и секвенатори треће генерације, који се другачије називају масивно паралелно секвенцирање или секвенатори нове генерације (engl. Next Generation Sequencing, NGS) како би се раздвојила нова технологија од претходних метода секвенцирања (Bruijns et al, 2018). Секвенатори нове генерацију могу да обрађују милион до милијарду ДНК секвенци паралелно (Naccache et al, 2013; Hamamoto et al, 2019). Употребом NGS у форензици смањила се вероватноћа лажно позитивних подударана у ДНК профилисању и постало је лакше разликовати различите ДНК профиле у сложеној смеси. Употребом PCR у комбинацији са капиларном електрофорезом број STR маркера који ће се анализирати је ограничен, док са NGS технологијом не постоје ограничења (Bruijns et al, 2018).

1.5. ЗНАЧАЈ АНАЛИЗЕ МОЛЕКУЛА ДНК У СУДСКОЈ МЕДИЦИНИ

Анализа хумане геномске ДНК има широку примену у форензичкој генетици, с обзиром да су молекули ДНК јединствени и непоновљиви у хуманој популацији. Делови ланца ДНК који су универзални сегменти, идентични су код свих јединки у оквиру исте врсте, док су варијабилни сегменти различити код различитих јединки. Управо се ова друга врста сегмената користи за ДНК типизацију приликом идентификације људи (Butler, 2005). Геномска ДНК се може изоловати из различитих узорака укључујући ћелије периферне крви, ћелије бриса оралне слузнице, култивисане ћелије, аспират костне сржи, амниоците, свеже или смрзнуто ткиво, као и ткиво укалупљено у парафинске блокове (Mullegama et al, 2019). Најбољи резултати се постижу анализом живих ткива, али и материјал са обдукције може бити употребљив све док, због одмаклих трулежних промена, не дође до потпуног уништења једарног материјала.

Судскомедицинске обдукције се обављају у свим случајевима насилне смрти, нејасне природне смрти, као и у случајевима када је потребна идентификација неидентификованих лешева. Један од задатака судскомедицинске обдукције је утврђивање узрока смрти. Када се након судскомедицинске обдукције не установи узрок смрти, врше се додатна испитивања, као што су хисто-патолошко претраживање ткива, токсиколошке анализе и микробиолошке анализе. Анализа молекула ДНК је данас суверена метода која се користи у судској медицини приликом вештачења биолошких узорака и трагова и често једина метода у разрешавању многобројних, на други начин нерешивих кривичних дела. Примена форензичке ДНК анализе постала је суверена метода у утврђивању идентитета особе, разјашњењу случајева криминалних радњи, утврђивању очинства, идентификацији жртава катастрофа и других.

Идентификацију је могуће извршити било на основу упоређивања ДНК профила неидентификоване особе са ДНК профилем сродника, или се упоређују ДНК профили који постоје у одговарајућој архиви узорака.

1.6. ФИКСИРАЊЕ ТКИВА

Фиксирање ткива је процедура која омогућава очување хистолошке структуре ткива и морфологије ћелија и ћелијских елемената у стању што приближнијем живим ткивима (*Thavarajah et al, 2012*). Фиксирање омогућава да очврсну све компоненте ткива како би оно издржало даљу обраду. Такође, фиксирањем ткива се спречава његова аутолиза и труљење (*Howat and Wilson, 2014*). Раствори који се користе током фиксирања се зову фиксирајући раствори или фиксативи. Хемијске методе фиксирања захтевају знатно краће време за фиксирање, што зависи од времена пенетрације фиксатива и величине ткива (*Tsai, 2006*). Поред хемијске методе фиксирања постоји и физичка метода фиксирања (*Grizzle, 2009*). Физичким методама се ткива фиксирају тако што се излажу екстремним условима, као што је веома висока или ниска температура. Мумије су очуване, јер је тело изложено екстремно сувом окружењу од веома високих до веома ниских температура (*Tsai, 2006; Grizzle, 2009*).

1.6.1. Врсте фиксатива

Све фиксативе који се користе за фиксирање ткива можемо сврстати у четири основне групе (*Thavarajah et al, 2012; Kocjan et al, 2016*):

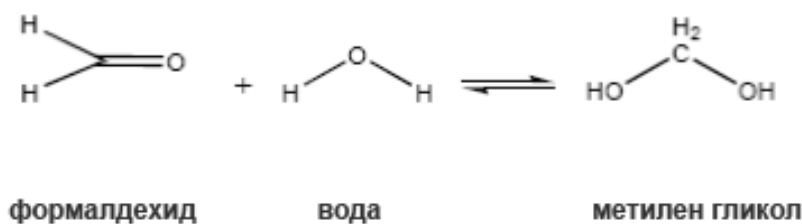
1. алдехиди (формалдехид, глутардехид),
2. оксиданси (осмијум-тетраоксид, калијум перманганат),
3. фиксативи на бази алкохола (етил алкохол, метил алкохол, сирћетна киселина),
4. фиксативи са металима (жива-хлорид, пикринска киселина).

Алдехиди и оксиданси делују тако што стварају унакрсне везе са макромолекулима и на тај начин фиксирају ткиво (*Thavarajah et al, 2012*). Фиксативи на бази алкохола не стварају унакрсне везе са биомолекулима, већ денатуришу протеине уклањањем воде из слободних карбоксилних, хидроксилних, аминок, амидо и имино група протеина, што доводи до коагулације протеина, али и скупљања (набирања) ткива (*Howat and Wilson, 2014*), због чега нису погодни за проучавање морфологије фиксираних ткива (*Srinivasan et al, 2002*). Фиксативи са металима делују тако што формирају нерастворљиве металне преципитате (*Thavarajah et al, 2012*). Фиксативи који користе живу се везују за сулфидне и аминок групе и преципитирају протеине; ови фиксативи се ретко користе у пракси (*Howat and Wilson, 2014*). Пошто формалдехид утиче на квалитет нуклеинских киселина (*Howat and Wilson, 2014*), а други фиксативи нису идеални за фиксирање свих ткивних компоненти, примењују се мешавине фиксатива како би се надокнадили недостаци појединачних фиксатива (*Srinivasan et al, 2002*). Међутим, избор фиксатива зависи пре свега од врсте ткива које се фиксира и од тога које ће се даље анализе спороводити (*Thavarajah et al, 2012*).

1.6.2. Хемијске и физичке особине формалдехида

Формалдехид је открио још 1859. године Батлеров (*Aleksandr Butlerov*) (*Fox et al, 1985; Skage and Schander, 2007*), а 1868. године Хофман (*August Wilhelm Van Hoffman*) је развио методу синтезе формалдехида из метанола. Да би формалдехид почео да се индустријски производи требало је да има медицинску примену. У то време у медицини се користило само неколико антисептика, који су били изузетно токсични и нагризали су ткиво, па се претпоставило да формалдехид може да се користи као антисептик или за лечење и спречавање инфекције рана. Са том намером је 1892. године млади лекар Блум (*Ferdinand Blum*) почео са испитивањем антисептичког дејства формалдехида (*Fox et al, 1985; Donczo and Guttman, 2018*). Блум је користио 4% раствор формалдехида који је добио разблажењем индустријског, 40% раствора формалдехида. Резултати његовог тестирања су показали да формалдехид ефикасно, али споро убија бактерије. Такође је закључио да су ткива потопљена у формалину изузетно припремљена за хистолошку анализу, посебно након бојења (*Fox et al, 1985*), због чега је 4% формалин почео да се примењује за фиксирање ткива (*Groelz et al, 2013*).

Формалдехид је најједноставнији алдехид који садржи само један угљеников атом (*Tsai, 2006; Hoffman et al, 2015*). Формалдехид је гас (*Kiernan, 2000*), који се брзо раствара у води, са којом хемијски реагује и формира метилен гликол (метилен хидрат) (**Слика 5**) (*Fox et al, 1985; Kiernan, 2000; Thavarajah et al, 2012*). У тој форми је формалдехид присутан у воденом раствору (*Kiernan, 2000*). Молекули метилен гликола реагују једни са другима правећи полимере (*Kiernan, 2000; Thavarajah et al, 2012*). У воденом раствору је формалин у највећем проценту у облику кратких полимера дужине 2 до 8 мономерних јединица-метилен гликола, који се називају полиоксиметилен гликол, а мањим делом у облику мономера (*Kiernan, 2000; Tsai, 2006*). Произвођачи додају метанол у раствор формалина, који успорава његову полимеризацију (*Fox et al, 1985; Kiernan, 2000; Tsai, 2006*).



Слика 5. Реакције формалдехида у води (*Fox et al, 1985*).

Данас је у употреби 10% пуферизовани формалин који садржи 3,7% формалдехид, 1% метанол (*Kiernan, 2000; Thavarajah et al, 2012*) и фосфатне пуфере (NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4) (*Lehmann and Kreipe, 2001*). Формалдехид има природну тенденцију да оксидује производећи мрављу киселину. Овај процес оксидације се дешава под утицајем атмосферског кисеоника, а незнатна количина мравље киселине може бити присутна и у комерцијалном формалдехиду (индустријски произведеном), вероватно као резултат складиштења или производње. Мравља киселина настаје под

утицајем ниског рН раствора, тако да се додавањем фосфатних пуфера и подизањем рН раствора решава овај проблем (Fox et al, 1985).

1.6.3. Фиксирање ткива формалдехидом

Фиксирање ткива је физичко-хемијски процес. Прожимање ткива формалином или пенетрација је физички процес којим раствор формалина "улази" у ткиво док не дође до најдубљих слојева ћелије (Thavarajah et al, 2012). Формалин доводи до хемијске модификације биомолекула, формирајући хемијске везе између протеина, нуклеинских киселина, гликопротеина и полисахарида (Fox et al, 1985; Groelz et al, 2013). Док се прожимање ткива формалином прилично брзо дешава, само фиксирање ткива је спор процес (Bussolati et al, 2011).

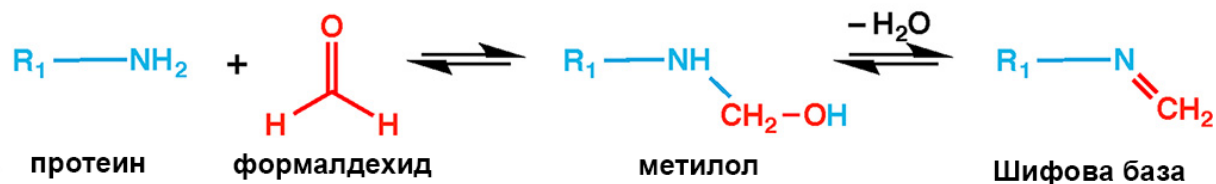
Различити фактори утичу на прожимање ткива формалином (Fox et al, 1985; Srinivasan et al, 2002; Tsai, 2006; Thavarajah et al, 2012; Todorović et al, 2019): температура, рН вредност раствора, запремина и концентрација раствора, дужина фиксирања, притисак и површина ткива. Присуство капилара и мишићних влакана у ткиву повећава стопу прожимања ткива.

Фиксирање ткива зависи од коефицијента дифузије фиксатива и стопе којом реагује са ткивним компонентама. Што је већи коефицијент дифузије, фиксирање ткива је боље. Раствор 4% формалдехида има коефицијент дифузије од 0,78. Из праксе је познато да је за фиксирање ткива дебљине 1 mm потребан 1h. Прожимање ткива је у почетку брже и износи око 1 mm/1h, а затим се тај процес одвија значајно спорије, 1cm ткива за око 24h (Stanta, 2011; Comănescu et al, 2012). После тога, прожимање ткива фиксативом је још спорије (Stanta, 2011). Већ фиксирано ткиво делује као баријера за улазак, односно прожимање ткива формалдехидом (Thavarajah et al, 2012). У свакодневном раду ткиво се фиксира најчешће између 24h и 48h (Srinivasan et al, 2002; Hewitt et al, 2008).

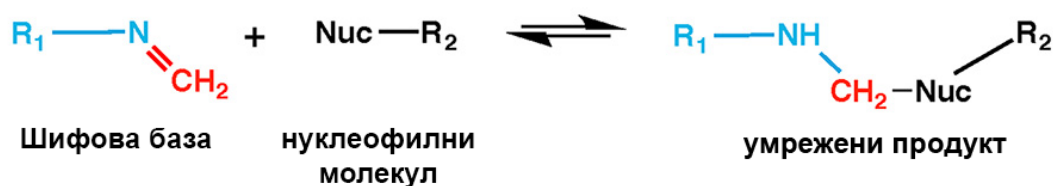
Као што је већ поменуто, у контакту са водом формалдехид се хидрогенизује у форму метилен гликола. Када се ткиво потопи у формалин оно се најпре прожима метилен гликолом и мањом количином формалдехида (Fox et al, 1985; Thavarajah et al, 2012). Ковалентно хемијско фиксирање зависи од фракције формалдехида који формира везе са ткивним компонентама и издвајања формалдехида из метилен гликола (Fox et al, 1985; Thavarajah et al, 2012): што више формалдехида "изађе" из метилен гликола, фиксирање ткива је боље. Низак рН, висока концентрација и повећана температура фаворизују дисоцијацију метилен гликола и издвајање формалдехида (Fox et al, 1985). Формалдехид, као реактивна електрофилна врста, лако реагује са различитим функционалним групама биолошких макромолекула при чему долази до умрежавања. Студије показују да је најчешћа врста умрежавања коју формира формалдехид са протеинима и то између атома азота на крају бочног ланца лизина и атома азота пептидне везе (Thavarajah et al, 2012). У овој реакцији се формира метилол, интермедијер који може да изгуби воду дајући Шифову базу (имин). У другом кораку Шифова база реагује са другим нуклеофилима, који потичу из другог протеина, или из истог протеина као и први нуклеофил, или другог ендогеног малог молекула, при чему се ствара умрежени производ (Слика 6). Иницијално стварање унакрсних веза се завршава за 24h до 48h након прожимања ткива формалином. Све

реакције у овом двостепеном процесу су реверзибилне, што је кључна карактеристика умрежавања формалдехида (*Thavarajah et al, 2012; Dietrich et al, 2013*).

1. корак



2. корак



Слика 6. Хемијске реакције у току умрежавања формалдехида и макромолекула (*Hoffman et al, 2015*).

Да би се створио велики број стабилних ковалентних веза потребно је и до 30 дана и тај процес је иреверзибилан. Све ово мења физичко-хемијско стање ткива као што су редукција и оксидација, мембрански потенцијал ткива и површински напон и чиме се мења и реактивност хелијских компоненти. Међутим, још увек није познато колико је времена најмање потребно да се обе овако сложене интеракције одиграју. Супстанце као што су масти, угљени хидрати и нуклеинске киселине су заробљене у нерастворљивом матриксу унакрсно повезаних протеина првих 24h, али се не мењају хемијски осим ако се фиксирање не продужи на неколико недеља (*Kiernan, 2000*). Ако је концентрација формалдехида превише ниска или је време инкубације сувише кратко неће се створити довољно унакрсних веза (*Hoffman et al, 2015*), па ни ткиво неће бити добро фиксирано.

1.6.4. Реакција између формалдехида и молекула ДНК

Формалдехид реагује са молекулом ДНК на сличан начин као и са другим макромолекулима у хелији (*Thavarajah et al, 2012; Hoffman et al, 2015*). Формалдехид реагује са amino и imino групама азотних база у молекулу ДНК, додаје хидроксиметил (метилол) групу-CH₂OH, при чему настају метилол деривати базе. Између две amino групе азотних база се формира метиленски мост (*Douglas and Rogers, 1998; Srinivasan et al, 2002*). Хидролизом долази до раскидања N-гликозидне везе, одвајања пурина и пиримидина од молекула ДНК и стварања апурињских и апириимидинских места (AP места) у молекулу ДНК. Реакција хидролизе доводи до раскидања фосфодиестарских

веза између дезоксирибонуклеотида и фрагментације молекула ДНК (*Douglas and Rogers, 1998; Srinivasan et al, 2002; Tsai, 2006*).

Формалдехид може да доведе и до умрежавања протеина са молекулом ДНК. С обзиром да је лизин најреактивнији у нативном протеину, највећи принос умреженог производа добијен је са лизином и деоксигуанозиним (*Lu et al, 2010*). У једру ћелије се налази велика количина бочних ланаца лизина у протеинима који се везују за ДНК, док се дуж молекула ДНК налазе аминок и имино групе. Ове две особине могу да допринесу релативно већем приносу протеин-ДНК умрежавања у поређењу са протеин-протеин унакрсним везама (*Lu et al, 2010*).

Дужина фиксирања нема ефекта на хистолошке карактеристике ткива, али утиче негативно на квалитет молекула ДНК у ткивима. Просечна величина молекула ДНК изолованог из ткива које је фиксирано у пуферизованом формалину опада са повећањем дужине фиксирања ткива (*Srinivasan et al, 2002*). На степен деградације молекула ДНК, који су изоловани из ткива која су фиксирана у формалину, утиче и концентрација формалина, рН, концентрација соли, врста ткива које се фиксира и температура (*Dietrich et al, 2013; Todorović et al, 2019*). Фиксирање ткива на нижој температури смањује активност ћелијских ензима (укључујући ензиме који доводе до деградације ДНК и протеина), што доводи до мање деградације молекула ДНК (*Bussolati et al, 2011; Todorović et al, 2019*).

1.7. ПАРАФИНСКИ БЛОКОВИ ТКИВА

Калупљење ткива у парафинске блокове први је увео Клебс (*Edwin Klebs*) 1869. године. Процес калупљења ткива је поступак у коме се правилно оријентисано ткиво потпуно затвара у чврсту подлогу, тј. медијум као што је парафин, да би се омогућило сечење ткива на танке резове (слајсове) (*Sadeghipour and Babaheidarian, 2019*). Медијум у који се ткиво калупи треба да омогући еластичност, одупирање изобличењу пресека приликом сечења и истовремено да олакша сечење ткива. Иако су у употреби различите супстанце за калупљење ткива (целоидин, естарски восак, синтетичке смоле, желатин), парафински восак је најпопуларнији медијум који се користи у хистопатолошким лабораторијама. Чврсти парафински восак је смеша дуголанчаних угљоводоника добијених из нафте. Комерцијално доступан парафински восак је беле боје или је безбојан, обично без мириса, са тачкама топљења у распону од 40°C до 70°C (*Sadeghipour and Babaheidarian, 2019*). За рад са меканим ткивима се користи парафин чија је тачка топљења 45°C и ниже, а за рад са чврстим ткивима се користи парафин чија је тачка топљења 60°C и више (*Hewitt et al, 2008; Kocjan et al, 2016*). Најчешће је у употреби парафин чија је тачка топљења између 56°C и 57°C (*Sadeghipour and Babaheidarian, 2019*).

Адитиви су различите супстанце које се додају у парафински восак како би се променила његова пластичност, конзистенција и тачка топљења. Најчешће употребљавани адитиви су пластични полимери, гума, цересин, диметил сулфоксид, пчелињи восак и восак од боровнице (*engl. bayberry wax*). Пластични полимери се додају у парафински восак да би повећали његову еластичност и постојаност. Гума такође повећава еластичност. Цересин је восак пречишћен од озецерита. Додатак од 0,3-0,5% церезина служи да повећа чврстину воска и смањи његову кристалну структуру. Диметил сулфоксид омогућава брзу инфилтрацију ткива парафином.

Пчелињи восак је жута супстанца са тачком топљења од 64°C и најчешће се додаје 10-20% пчелињег воска у парафински восак како би му се смањила кристална структура. Восак од боровнице не само да смањује кристализацију, већ и снижава тачку топљења парафинског воска (*Sadeghipour and Babaheidarian, 2019*). За биомолекуларна истраживања треба избегавати парафин са високом тачком топљења и парафин који као адитив садржи пчелињи восак, зато што ови парафини ометају регенерацију биомолекула, као што су нуклеинске киселине (*Hewitt et al, 2008; Klopffleisch et al, 2011; Sadeghipour and Babaheidarian, 2019*). Коришћење парафина са високом тачком топљења доводи до неадекватне депарафинизације и смањеног приноса нуклеинских киселина (*Hewitt et al, 2008; Klopffleisch et al, 2011*).

Процес обраде ткива и калупљење у парафински блок обухвата неколико корака: дехидратацију ткива која се врши премештањем ткива из водене у алкохолну средину (најчешће етанол), затим следи замена органским растварачем (ксиленом) и на крају замена ксилена парафином (*Hewitt et al, 2008; Stanta, 2011*). На овај процес у великој мери утичу температура, време, присуство вакуума и квалитет реагенса (*Hewitt et al, 2008; Stanta, 2011*). Трајање читавог процеса може варирати од мање од 4h до преко 12h. Од суштинског је значаја да ткиво буде потпуно дехидрирано током обраде, јер преостала вода неће бити замењена парафином, што доводи до деградације и хидролизе нуклеинских киселина. Некомплетна дехидратација је у великој мери последица лошег фиксирања ткива (*Hewitt et al, 2008*).

Следећи корак обраде ткива представља "умештање" ткива тј. постављање ткива које је већ прожето парафином у калуп. Током овог процеса додају се нове количине парафина како би се створио парафински блок који облаже спољашњост овог калупа. Процес умештања омогућава сецирање ткива на врло танке резове ткива дебљине 4-20 μm коришћењем микротоме (*Hewitt et al, 2008*). Парафин који се користи за импрегнацију и прављење блокова варира и зависи од индивидуалних потреба сваке лабораторије (*Hewitt et al, 2008; Klopffleisch et al, 2011*). Новије студије су показале да повећана температура током калупљења ткива у парафин доводе до смањеног приноса и мање чистоће нуклеинских киселина (*Lou et al, 2014*).

1.7.1. Карактеристике ткива и молекула ДНК укалупљених у парафински блок

Парафински блокови ткива се праве после адекватног фиксирања и обраде ткива изузетих током операције, биопсије или обдукције. За молекуларна истраживања је подједнако важно коришћење и нормалног и патолошки измењеног ткива. Међутим, деградација нуклеинских киселина је интензивнија у ткивима изузетим током обдукције него у ткивима изузетим током операције или биопсије. Дужина ДНК фрагмента изолованих из парафинских блокова ткива изузетих током биопсије или операције је око 300-400 bp, а много су краћи фрагменти ДНК изоловане из парафинских блокова ткива изузетих током обдукције (*Bonin et al, 2003*). Нуклеинске киселине изоловане из ткива укалупљених у парафинске блокове и архивираних преко 20 година су знатно више оштећене него нуклеинске киселине из укалупљених ткива које је било краће архивирано (*Bonin et al, 2003*). На степен фрагментације нуклеинских киселина утиче и величина укалупљеног ткива. Из укалупљених исечака ткива који су већи од 1 cm, амплификација фрагмената ДНК је значајно успешнија. Мањи исечци ткива имају

повећану апсорпцију фиксатива, што доводи до деградације нуклеинских киселина и хемијских модификација у целом исечку ткива (*Gouvegia et al, 2016*).

У литератури постоји мали број података о утицају парафинског калуупљења ткива на интегритет и квалитет нуклеинских киселина (*Klopfleisch et al, 2011*). Поједини научници су открили да количина нуклеинских киселина које су изоловане из старијих парафинских блокова ткива опада од 5% до 50% за сваку деценију архивирања узорака. Још увек је нејасно да ли на смањење количине изолованих нуклеинских киселина највише утиче старост парафинских блокова, врста укалуупљених ткива, квалитет првобитне обраде ткива или промене у реагенсима и процесима фиксирања ткива (*Hewitt et al, 2008*).

1.7.2. Чување и складиштење парафинских блокова ткива

Ткива укалуупљена у парафинске блокове остају стабилна дужи временски период, али је неопходно њихово адекватно складиштење под одређеним условима. Неопходна је контрола влажности ваздуха и температуре просторије у којој се парафински блокови ткива чувају (*Hewitt et al, 2008*). Складиштење парафинских блокова ткива у топлој и влажној средини може да убрза процес оксидације формалина и последично оштећење нуклеинских киселина у ткивима која су укалуупљена у парафинске блокове (*Kocjan et al, 2016*). Оштећење или уништење парафинских блокова се такође може десити и под утицајем инсеката или глодара (*Hewitt et al, 2008*).

1.7.3. Значај и примена парафинских блокова ткива

Широм света постоје бројне архиве ткива фиксираног у формалину и укалуупљеног у парафинске блокове (*Groelz et al, 2013*). Укалуупљена ткива представљају вредан извор биолошког материјала за проспективне и ретроспективне биомедицинске и биофармацеутске студије. Парафински блокови ткива се користе за генетичка испитивања наследних болести, затим за испитивање канцера-везе између онкогених мутација и туморогенезе и утврђивања метастаза примарног тумора (*Greer et al, 1991a*). Предност парафинских блокова је једноставно и релативно безбедно руковање, јефтино складиштење, широка доступност и погодност за примену имунохистохемијских и других анализа (*Ludyga et al, 2012; Dietrich et al, 2013; Kokkat et al, 2013*). Последњих година је све веће интересовање за анализу молекула ДНК изоловане из ткива укалуупљених у парафински блок. Парафински блокови ткива су релативно стабилни током неколико деценија (*Ludyga et al, 2012*). Због тога је важно обезбедити оптималну процедуру калуупљења и адекватно складиштење парафинских блокова ткива, како би њихова искористљивост за различите анализе била што већа (*Srinivasan et al, 2002*).

Изоловање нуклеинских киселина из архивираног биолошког материјала као што су парафински блокови ткива за PCR анализе се све чешће примењује и у клиничкој пракси (*Bonin and Stanta, 2013*), а представља и значајан извор ДНК за

примену у форензици (*Babol-Pokora and Berent, 2008; Lv et al, 2020*). Међутим, проблем који се може јавити током анализе је квалитет ДНК узорка, због деградације, контаминације и присуства PCR инхибитора. Због тога је изузетно важно испитати квалитет, квантитет и степен деградације молекула ДНК изолованог из ткива које је фиксирано у формалину и укалупљено у парафинске блокове.

Стандардна процедура приликом судскомедицинских обдукција је изузимање узорака различитих ткива, која се фиксирају у раствору формалина, праве се парафински блокови и врше хистоморфолошка испитивања. У случају форензичке истраге, узорци ткива у парафинским блоковима могу бити последњи и једини доступни извор за анализу генетичких профила и могу допринети у идентификацији и разјашњењу нерешених судских случајева. У литератури је показано да је могуће изоловати геномску ДНК и урадити генетичка испитивања на узорцима туморских ткива која су чувана ускладиштена у виду парафинских блокова и неколико деценија (*Nechifor-Boilă et al, 2015; Potluri et al, 2015*). С обзиром да је туморско ткиво посебно по својим карактеристикама и да се у многим параметрима разликује од здравог ткива, важно је изоловати молекул ДНК из здравог ткива, изузетог у току судскомедицинске обдукције, које је током вишегодишњег периода чувано у парафинским блоковима. Само у малом броју студија истраживања су урађена на здравим, нетуморским ткивима, добијеним у току обдукције, али се резултати тих истраживања односе на кратак временски период (5-10 година) и за само одређена ткива (*Gall et al, 1993; Budimlija et al, 2009; Duval et al, 2010; Funabashi et al, 2012*). Такође, не постоји сагласност научника ни око избора адекватне методе за депарафинизацију и изоловање ДНК из парафинских узорака (*Alvarez-Aldana et al, 2015; Janecka et al, 2015*), што у великој мери утиче и на концентрацију и квалитет изоловане ДНК (*Sengüven et al, 2014*). 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, допринеле би 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. ЦИЉЕВИ СТУДИЈЕ

Због изузетног значаја које исечци ткива, као носиоци молекула ДНК могу имати као материјално доказно средство у судским процесима, циљеви овог исраживања су следећи:

1. Испитати утицај врсте формалина и дужине фиксирања здравих ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега изутетих током судскомедицинских обдукција и фиксираних у формалину на хистоморфолошке промене, чистоћу, принос и интегритет молекула ДНК;
2. Испитати утицај парафинског блока и дужине архивирања укалупљених здравих ткива срца, јетре и мозга на хистоморфолошке промене, чистоћу, принос и интегритет молекула ДНК;
3. Упоредити квалитет (чистоћу, принос и интегритет) молекула ДНК изолованих коришћењем две различите методе за изоловање ДНК (екстракција фенолом-хлороформом-изоамил алкохолем и помоћу комерцијалног комплета) из узорака ткива фиксираних у формалину и исечака ткива из парафинског блока.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ХЕМИКАЛИЈЕ

Хемикалије које су коришћене у експериментима:

- 10% пуферизовани формалин (37%-40% формалдехид (CH₂O), 60%-63% H₂O и фосфатни пуфери (NaH₂PO₄ и Na₂HPO₄)) (*Superlab, Belgrade, Serbia*),
- 4% непуферизовани формалин (35%-38% формалдехид (CH₂O), 7-15% метанол (CH₃OH) и H₂O)) (*ZORKA PharmaHEMIJA, Šabac, Serbia*),
- етанол (C₂H₅OH) 100%, 86% и 70% (*Biognost, Zagreb, Croatia*),
- етанол (C₂H₅OH) 96% (*ZORKA PharmaHEMIJA, Šabac, Serbia*),
- ксилол (C₈H₁₀) (*ZORKA PharmaHEMIJA, Šabac, Serbia*),
- парафин (*Path Hille&Co Ltd, Essex, UK*),
- кристални хематоксилин (*Superlab, Belgrade, Serbia*),
- еозин (*Biognost, Zagreb, Croatia*),
- Канада балзам (*Canada balsam, Centrohem, Serbia*),
- раствор фенол-хлороформ-изоамил алкохола (однос 25:24:1) (*Fisher Scientific by Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium*),
- SDS (содијум-додецил-сулфат, C₁₂H₂₅NaSO₄) (*Fisher Scientific by Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium*),
- NaCl (*ZORKA PharmaHEMIJA, Šabac, Serbia*),
- EDTA(етилен-диаминотетрасирћетна киселина, C₁₀H₁₆N₂O₈),
- протеиназа К (*Thermo Scientific by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania*),
- хлороформ (CHCl₃) (*Carlo Erba reagents S.A.S., Val de Reuil, France*),
- изоамилалкохол (C₅H₁₂O) (*SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA*),
- комерцијални комплет за изоловање ДНК (*PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*),
- *One Taq 2x Master Mix-a* са стандардном пуфером (*New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA*),
- граничници (*engl. primers*) (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts*),
- агароза (C₁₂H₁₈O₉) (*Lonza, Rockland, ME, USA*),
- етидијум-бромид (C₂₁H₂₀BrN₃) (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*).

Пуфери и раствори који су коришћени у експериментима:

- TNS дигестиони пуфер:
 - TE пуфер
 - 10% SDS
 - 3 M NaCl
- TE пуфер (*Lonza, Rockland, ME, USA*):
 - 10 Mm TRIS pH 8
 - 1 mM EDTA
- TBE пуфер:
 - Tris base
 - Acidi Borici
 - 0,5 M EDTA

- пуфер за пуњење (*engl. Loading Dye*) (*Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA*),
- Mayer-ов раствор хематоксилина:
 - кристални хематоксин
 - H₂O
 - NaJO₃ или KJO₃
 - KAl(SO₄)₂
 - C₂H₃Cl₃O₂
 - лимунска киселина (C₆H₈O₇)
- алкохолни еозин (1% основни раствор):
 - 96% етанол
 - H₂O
 - еозин.

3.2. ВРСТА СТУДИЈЕ И ПОПУЛАЦИЈА КОЈА СЕ ИСТРАЖУЈЕ

Студија је дизајнирана као експериментална студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*.

За истраживање су коришћени исечци здравог хуманог ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега који су изузети са лешева у току судскомедицинских обдукција које су обављане у периоду од 12h до 24h након констатовања смрти у Служби за судску медицину и токсикологију УКЦ Крагујевац. Пре извођења обдукције лешеви су били на температури од +4°C до +8°C. Исечци ткива су изузимани са лешева здравих особа старости између 20 и 50 година који су умрли насилном смрћу (убиство, самоубиство, задес). Све обдукције су урађене по наредби Основних и Виших судова, а на захтев Основних и Виших јавних тужилаштава са подручја Апелационог суда и Апелационог јавног тужилаштва у Крагујевцу, Република Србија. 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).

3.3. УЗОРКОВАЊЕ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ГРУПЕ

За испитивање утицаја фиксирања ткива у формалину на квалитет молекула ДНК коришћени су исечци здравог ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега који су изузети у току судскомедицинских обдукција. Изузети делови ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега били су величине по 2,5x1,5x2,5 cm. Део ткива је потопљен у 4% непуферизовани формалин, а други део изузетих ткива у 10% пуферизовани формалин. Узорци ткива су инкубирани на собној температури у формалину у херметички

затвореним пластичним теглама са пластичним затварачем, прописно обележеним одговарајућим лешним бројем и датумом изузимања. Дужина инкубације ткива у формалину је била 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца. Након истека одговарајућег инкубационог периода изузимани су делови ткива масе $0,091 \pm 0,009$ g за даљу анализу. Сви узорци су подељени по експерименталним групама које се међусобно разликују по врсти формалина, по врсти ткива (срце, јетра, мозак, плућа и бубрези) и дужини фиксирања у формалину.

Узорци су груписани у 13 експерименталних група, при чему свака група садржи узорке пет различитих ткива. Свака експериментална група има 80 узорака ткива укупно.

група N1-изузета ткива одмах након обдукције без фиксирања у формалину (контролни узорци);

група N2- ткива која су фиксирана у формалину 6h;

група N3- ткива која су фиксирана у формалину 24h;

група N4- ткива која су фиксирана у формалину 48h;

група N5- ткива која су фиксирана у формалину 72h;

група N6- ткива која су фиксирана у формалину 96h;

група N7- ткива која су фиксирана у формалину 5 дана;

група N8- ткива која су фиксирана у формалину 6 дана;

група N9- ткива која су фиксирана у формалину 7 дана;

група N10- ткива која су фиксирана у формалину 10 дана;

група N11- ткива која су фиксирана у формалину 14 дана;

група N12- ткива која су фиксирана у формалину 28 дана;

група N13- ткива која су фиксирана у формалину 2 месеца.

За испитивање утицаја фиксирања и калуљнења ткива у парафински блок анализирана су здрава ткива срца, јетре и мозга која су изузета током судскомедицинских обдукција, фиксирана у 4% непуферизованом формалину и укалуљена у парафински блок. Парафински блокови се чувају одвојено по лешним бројевима и годинама у архиви Службе за судску медицину и токсикологију УКЦ Крагујевац у тамној просторији, средњег степена влажности, на собној температури. Анализирани су парафински блокови ткива стари до 30 година.

Узорци су груписани у експерименталне групе на основу старости парафинских блокова, при чему свака група садржи узорке три различита ткива, шест узорака по години осим прве групе у којој је 7 узорака.

- група N1-парафинских блокови ткива стари до 1 год.;
- група N2-парафинских блокови ткива стари до 6 год.;
- група N3-парафинских блокови ткива стари до 11 год.;
- група N4-парафинских блокови ткива стари до 16 год.;
- група N5-парафинских блокови ткива стари до 21 год.;
- група N6-парафинских блокови ткива стари до 26 год.;
- група N7-парафинских блокови ткива стари до 30 год.

3.4. КАЛУПЉЕЊЕ ТКИВА У ПАРАФИНСКЕ БЛОКОВЕ

Процес фиксирања ткивног материјала и прављење парафинских блокова у Служби за судску медицину и токсикологију УКЦ Крагујевац изводио се према протоколу РТ.35.11. Процес фиксирања је почињао потапањем ткивних исечака у 4% непуферизовани формалин. Дужина фиксирања је зависила од врсте ткива и трајала је од 6h до 72h, понекад и дуже. Након формалинског фиксирања материјал је обрађен у аутотехнику (ткивни процесор *LEICA TP 220, Germany*) по следећем програму: 90 min у 86% алкохолу, 3 пута по 90 min у 96% алкохолу, 4 пута по 90 min у 100% алкохолу, 2 пута по 90 min у ксилолу и 90 min у парафину. Након обраде у аутотехнику ткивни материјал је разливен у посебне парафинске калупе.

Ткива укалупљена у парафинске блокове и обележена лешним бројем и годином архивирана су у картонским кутијама на мрачном месту, средњег степена влажности, на собној температури. На описани начин су направљени парафински блокови ткива који су архивирани до 30 година.

На исти начин су направљени и парафински блокови ткива која су коришћења за испитивање утицаја врсте фиксатива и дужине фиксирања (до 2 месеца) на хистоморфолошке промене.

3.5. ПРАВЉЕЊЕ МИКРОСКОПСКИХ ПРЕПАРАТА И ХИСТОМОРФОЛОШКИ ОПИС ТКИВА

У Служби за судску медицину и токсикологију УКЦ Крагујевац примењује се патохистолошка метода бојења ткива са хематоксилином и еозином, према протоколу РТ.35.01. Парафински блокови ткива су након хлађења сечена на ротационом микротому (*LEICA RM 2135, Germany*) на резове дебљине од 4 до 8 μm , монтирана на предметним стаклима у воденом купатилу на температури од +44°C, која су сушена у

термостату на температури од +56°C, 1h. Депарафинизација ткивних резова је извођена инкубацијом у ксилолу 2 пута по 5 min, затим у апсолутном алкохолу 5 min, у 96% алкохолу 5 min, у 70% алкохолу 5 min и на крају у дестилованој води 5 min. Депарафинизовани резови ткива су бојени *Mayer*-овим раствором хематоксилина 2-5 min и испрани у млакој текућој води 5-10 min. Након тога су обојени алкохолним еозином 1-2 min и инкубирани у 80% алкохолу 1-2 min, у 90% алкохолу 2-3 min, у 96% алкохолу 2 пута по 5 min, у апсолутном алкохолу 5-10 min, у раствору који садржи исту количину апсолутног алкохола и ксилола 2-3 min, у ксилолу 2 пута по 5 min и на крају су монтирани Канада балзамом. Микроскопски препарати су анализирани на микроскопу (*Olympus, BX51, Olympus Corporation, Japan*), фотографисани апаратом (*Canon, Power Shot G6, PC 1089*) и описани хистоморфолошки.

3.6. ПРИПРЕМА ТКИВА ЗА ИЗОЛОВАЊЕ МОЛЕКУЛА ДНК

3.6.1. Припрема ткива фиксираних у формалину

Из узорака ткива која су инкубирана у 4% непuffersованом као и у 10% пуuffersованом формалину прво је исечена мања коцкица ткива из средине промера 3x3x3 mm. Након тога ткиво је измацериано скалпелом и инкубирано у апсолутном етанолу на собној температури 10 min. После пажљивог одливања апсолутног етанола ткива су инкубирана у 70% етанолу 10 min на собној температури. Пажљивим одливањем 70% етанола узорак је био спреман за изоловање молекула ДНК.

3.6.2. Депарафинизација парафинских блокова ткива

Парафински блокови ткива који су коришћени у овом истраживању изизумани су из архиве ткива Службе за судску медицину и токсикологију УКИЦ Крагујевац поштујући унапред задате критеријуме. Изабрани су блокови без маханичких оштећења, без трагови буђи, чији су микроскопски препарати након хистоморфолошких претраживања показали да су у питању здрава ткива. Ткива са некрозом, аутолизом и канцером су искључена из студије.

Депарафинизација је процес који служи да се из ткива одстрани парафин који је један од инхибитора PCR. Парафински блокови ткива су сечени на микротому на танке резове дебљине 10 µm, при чему су прва 2-3 листића сваког узорка одбачена, да не би дошло до унакрсне контаминације између узорака. Ткивни резови (2-3 листића ткива) су прво инкубирани у раствору ксилола 3 пута по 30 min, на собној температури, где је после сваке инкубације узорак центрифугиран по 1 min на 14 000 rpm на собној температури и пажљиво издвојен супернатант. Након тога је ткиво рехидрирано у опадајућим концентрацијама етанола: у 100% етанолу 5 min, након центрифугирања од

1 min на 14 000 rpm на талог је додат 70% етанол 5 min, а након центрифугирања 1 min на 14 000 rpm додата је дестиловна вода у којој је талог (ткиво) инкубирано 5 min на собној температури. Узорци су још једном центрифугирани 1 min на 14 000 rpm на собној температури. Овако припремљени узорци били су спремни за изоловање ДНК.

3.7. ИЗОЛОВАЊЕ МОЛЕКУЛА ДНК

За изоловање молекула ДНК коришћене су две различите методе: метода органске екстракције која се заснива на екстракцији фенол-хлороформ-изоамил алкохолом (*engl. Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol, PCI*) и метода која подразумева коришћење комерцијалног комплета за изоловање ДНК (*PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen*) (у даљем тексту кит).

Геномска ДНК је изолована из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега фиксираних у 4% непуферизованом формалину, као и у 10% пуферизованом формалину. За свако ткиво су коришћена 4 узорка, па је укупан број узорака из којих је изолована ДНК био 1040 (4 узорка x 5 различитих врста ткива x 2 врсте формалина x 13 временских тачака x 2 методе за изоловање молекула ДНК = 1040 узорака).

Геномска ДНК је изолована из 543 исечка ткива која су укалупљена у парафинске блокове и архивирана од 1998 до 2017. године. Од тога, 181 узорак је ткиво срца, 181 ткиво јетре, а 181 узорак је ткиво мозга. Молекули ДНК су изоловани из ових ткива уз помоћ две методе за изоловање па је укупан број узорака ДНК био 1086.

3.7.1. Изоловање молекула ДНК методом органске екстракције (*PCI* метода)

Органска екстракција је метода за изоловање нуклеинских киселина којом се добија висок принос и добра чистоћа изолата, због чега се сматра златним стандардом (*Budowle et al, 2000*). Припремљени узорци су инкубирани у присуству 300 μ L TNS дигестионог пуфера и 50 μ L протеиназе К на 56°C преко ноћи. NaCl из пуфера омогућава бубрење и прскање ћелије и ћелијске мембране, што за последицу има ослобађање хроматина. Алкални детергент, SDS разграђује липидне компоненте ћелијске мембране, док ензим протеиназа К разграђује протеине који улазе у састав хроматина. Након тога је додато по 350 μ L смеше фенол-хлороформ-изоамил алкохола у односу 25:24:1 и центрифугирано 5 min, на 4 000 rpm, на +4°C. У фенолу као органском растварачу задржавају се деградовани протеини и липиди. Изоамил алкохол спречава пенушање раствора у епрувети због присуства детергента. Хлороформ омогућава формирање две фазе: доњу фенолску и горњу, у којој је водени раствор са нуклеинским киселинама. Горња фаза је пренета у нову епрувету и додато је по 350 μ L смеше хлороформ-изоамил алкохола у односу 24:1 како би се уклонили остаци фенола. Након центрифугирања 5 min, на 4 000 rpm, на +4°C, формирале су се поново две фазе,

горња водена фаза са раствором ДНК и доња у којој су хлорофом, заостали фенол и друге нечистоће. Горња фаза је затим пребачена у нову епрувету. Изолована ДНК је преципитирана раствором NaCl-а и апсолутног леденог етанола (-20°C), преко ноћи на +4°C, након тога раствор је центрифугиран 30 min, на 15 000 rpm, на +4°C. Супернатант је декантован, а на талог је додато 70% етанола (-20°C) и центрифугирано 15 min, на 15 000 rpm, на +4°C. Одливиен је супернатант, а талог је добро осушен. Исталожена и осушена ДНК је растворена у ТЕ пуферу и узорак је чуван на -20°C до употребе.

3.7.2. Изоловање молекула ДНК коришћењем комерцијалног комплета (кит)

Изоловање молекула ДНК коришћењем комерцијалног комплета (*PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen*) је урађено према процедури произвођача. У епрувете са претходно припремљеним узорцима је додато по 200 µL мешавине дигестионог пуфера који садржи 180 µL *Pure Link Genomic* дигестионог пуфера и 20 µL протеиназе К. Узорци су инкубирани преко ноћи на 56°C. Након инкубације узорци су центрифугирани на 13 200 rpm, 3 min, на собној температури. Супернатант је пребачен у нове епрувете и у сваку је додато по 20 µL РНКазе А (рибонуклеаза А). Након инкубирања од 2 min на собној температури, у сваку епрувету је додато по 200 µL *Pure Link Genomic* лизирајућег/везујућег пуфера и 200 µL 96-100% етанола, а затим је садржај пребачен на колонице са силика-гел мембраном и центрифугирано на 10000xg, 1 min, на собној температури. Колоне на чијим се мембранама налазила ДНК су потом пребачене у нове епрувете. У сваку је додато по 500 µL испирајућег пуфера 1 са етанолом. Колоне са силика-гел мембраном имају способност селективне адсорпције нуклеинских киселина: у киселој средини (pH<7,5) коју обезбеђују испирајући пуфери 1 и 2, и до 95% ДНК је адсорбовано на овој мембрани, а центрифугирањем се све друге непожељне компоненте лизата испирају у доњу епрувету и декантују. Након тога су колоне пребачене у другу епрувету и додат је елуциони пуфер на колону са силика-гел мембраном на којој је адсорбована ДНК. Елуциони пуфер обезбеђује алкалну средину (pH>7,5) у којој се ДНК ефикасно испира са силика-гел мембране у доњу епрувету. Након центрифугирања, колоне су бачене, а епрувете са раствором ДНК остављене на -20°C до употребе.

3.8. СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈСКО ОДРЕЂИВАЊЕ ЧИСТОЋЕ И ПРИНОСА ИЗОЛОВАНЕ ДНК

Чистоћа и принос изоловане ДНК су одређене спектрофотометријски помоћу апарата *UV-1800 Shimadzu UV spectrophotometer, Japan*. По 2 µL раствора изоловане ДНК је растворено у 998 µL ТЕ пуфера. Спектрофотометар је калибрисан са 1 ml ТЕ пуфера. За одређивање чистоће узорка изоловане ДНК, одређен је однос A260/A280, који представља однос апсорбанци нуклеинских киселина (A260) и протеина (A280).

Такође је одређена апсорбанца од A230 која указује на то да ли постоји замућење, као индикатор могуће контаминације. Однос апсорбанци A260/A230 указује на контаминацију солима, угљеним хидратима, липидима и растварачима као што је фенол (*Lucena-Agullar et al, 2016*). Ако је однос апсорбанци A260/A280 између 1,5-2,0, а A260/A230 између 1,7-2,2 сматра се да је ДНК чиста (*Stanta, 2011; Rabelo-Goncalves et al, 2014; Potluri et al, 2015; Lucena-Agullar et al, 2016*). Концентрација ДНК у узорку је одређена мерењем апсорбанце на 260 nm (A260). Апсорбанца од једне оптичке јединице (OD) даје 50 µg/mL дволанчане ДНК. Укупан принос ДНК у 50 µL изолата одређен је множењем израчунате концентрације ДНК (µg/µL) и запремине раствора ДНК (50 µL).

3.9. ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА ПОЛИМЕРАЗЕ (*Polymerase chain reaction*–PCR)

За процену интегритета, тј. за одређивање степена фрагментације молекула ДНК коришћена је ланчана реакција полимеразе (PCR), која се заснива на амплификацији тачно одређеног сегмента ДНК у PCR апарату (*Techne Genius, Eppendorf*). Коришћени су прајмери за 3 различита гена различите дужине. У зависности од тога да ли је молекул ДНК у испитиваном узорку фрагментисан на дуже или краће фрагменте и у којој мери, одабрани гени различите дужине биће у већој или мањој мери амплификовани у том узорку. Метода PCR се заснива на механизму репликације молекула ДНК у ћелији. Који ће део геномске ДНК бити амплификован овом методом зависи од граничника (*engl. primers*) који се везују за комплементарне почетне делове сегмента геномске ДНК које желимо да амплификујемо. Граничници су олигонуклеотидне секвенце дужине 18-25 нуклеотида који се хемијски синтетишу и комерцијално продају. За умножавање једног фрагмента ДНК потребна су два граничника: F (*engl. forward*) који је комплементаран 5' крају молекула ДНК и R (*engl. reverse*) који је комплементаран 3' крају молекула ДНК. Према томе, да би амплификовали одређени део молекула ДНК, потребно је да знамо његову секвенцу, како би дизајнирали одговарајуће граничнике. У овом истраживању коришћени су граничници (**Табела 1**) за 3 различита гена, различите дужине: GPD1 (*glycerol-3-phosphate dehydrogenase*) величине 150 bp, АСТВ (*β actin*), 262 bp и RPL4 (*ribosomal protein L4*), 407 bp. Наведени гени су "housekeeping" гени, тј. гени се експримирају у свим ћелијама и њихови продукти су неопходни за метаболизам ћелије. GPD1 ген кодира протеин који има кључну улогу у метаболизму угљених хидрата и липида тако што катализује реверзибилну конверзију ДНАР (дихидроксиацетон фосфат) и редукује NADH (никотинамид аденин динуклеотид) у глицерол-3-фосфат и NAD⁺. АСТВ ген кодира један од шест различитих актинских протеина који је главна компонента контрактилног апарата ћелије. RPL4 ген кодира рибозомални протеин који улази у састав 60S субјединице рибозома. Пошто се описани гени увек експримирају (у свим ћелијама код свих људи) и нису полиморфни, укључени су у ову студију.

Табела 1. ДНК секвенце прајмера који су коришћени за амплификацију *GPD1*, *ACTB* и *RPL4* гена.

| Ген | Базни пар (bp) | F граничник 5'-3' | R граничник 3'-5' |
|-------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| GPD1 | 150 | CAGATGCCCCAGGTGAGTGAA | ACTGCCTCACTCCTTACTCCT |
| ACTB | 262 | TGCTAAAGACCGTGGGGAAC | TGTGACCCCTTTCTCCCTCA |
| RPL4 | 407 | TGGAACAGGAGGGGAAGACA | ATCACAGCAAGGGACACCAG |

Граничници су селектовани уз помоћ *online* алата *Primer BLAST*, при чему се водило рачуна о нуклеотидном саставу и температури хибридизације граничника, како би били погодни за одвијање мултиплекс PCR, тј. истовремене амплификације два (*duplex* PCR) или три фрагмента (*triplex* PCR) у једном узорку. Финална запремина PCR смеше (**Табела 2**) која је износила 25 μ l, садржала је 0,5 μ l 10 μ M F граничника и 0,5 μ l 10 μ M R граничника. За успешно извођење PCR неопходно је и присуство ензима *Taq* полимеразе која по принципу комплементарности уграђује нуклеотиде и синтетише нови ланац наспрам једноланчане матрице. Активација термостабилног ензима *Taq* полимеразе се одвија у првом кораку PCR на 95°C када се денатурацијом протеина који се налазе у активном месту *Taq* полимеразе, чиме се активно место ензима ослобађа и он постаје активан. Ензим *Taq* полимеразе, као и нуклеотиди-градивни елементи молекула ДНК, улазе у састав комерцијално дизајнираног *One Taq 2x Master Mix*-а са стандардним пуфером, чија је запремна у финалној PCR реакционој смеши била 12,5 μ l. Запремина узорка ДНК у PCR реакционој смеши била је 1 μ l (100-200 ng ДНК у 25 μ l реакционе смеше) (**Табела 2**).

Табела 2. Компоненте које улазе у састав PCR реакционе смеше чија је финална запремина по узорку 25 μ l.

| Компоненте PCR реакционе смеше | Количина (μ l) |
|--------------------------------|---------------------|
| <i>One Taq 2x Master Mix</i> | 12,5 |
| F граничник | 0,5 |
| R граничник | 0,5 |
| изолована геномска ДНК | ~1 |
| дејонизована H ₂ O | до 25 |

Једна PCR реакција, након иницијалне денатурације на 94°C, 10 min, има три фазе. У првој фази која се одвија на 94°C, 30 s долази до денатурације молекула ДНК, при чему се раскидају водоничне везе између два ланца молекула ДНК и формирају се

две једноланчане структуре. У другој фази која се одвија на 60°C, 1 min, за ове једноланчане ДНК молекуле се везују граничници. У трећој фази, која се одвија на 68°C, 1 min за граничнике се везује *Taq* полимераза која додаје нуклеотиде на основу комплементарности са једноланчаном матрицом и синтетише ДНК. Након ове фазе реакције број копија испитиваног фрагмента ДНК је удвостручен. Ове три фазе PCR чине један циклус који се понавља 30 пута. У сваком наредном циклусу број умножавања тачно одређеног фрагмента ДНК (ампликона) се повећава и износи 2^n , где је n број циклуса. После ових 30 циклуса следи финална елонгација која се одвија на 68°C, 5 min у којој се парцијално елонгацијом продукти продужују и комплетира се њихова синтеза. Након финалне елонгације температура се снижава на +4°C чиме се спречава даље одвијање реакције. Након тога узорци су спремни за даљу анализу.

За сваки узорак ДНК PCR је урађен у дупликату. У сваки PCR су укључене и позитивне и негативне контроле. Негативне контроле садрже све састојке PCR реакционе смеше изузев изоловане ДНК, док су позитивне контроле са изолованом ДНК из ткива изузетог одмах након обдукције пре фиксирања у формалину. Умножени ДНК фрагменти (ампликони) су затим анализирани на 2% агарозном гелу.

3.10. ЕЛЕКТРОФЕРЕЗА ДНК НА АГАРОЗНОМ ГЕЛУ

Електрофореза ДНК на агарозном гелу је метода којом се раздвајају фрагменти ДНК различите дужине, на основу наелектрисања и брзине кретања кроз агарозни гел. Молекули ДНК су наелектрисани негативно због присуства фосфорне групе, па се у електричном пољу крећу ка позитивној електроди-аноде. Брзина кретања зависи од дужине фрагмента: краћи фрагменти се крећу брже, а дужи спорије, због чега се на гелу јасно раздвајају фрагменти различитих дужина. Моћ раздвајања зависи и од концентрације гела: гелови са нижим процентом агарозе користе се за раздвајање фрагмента веће дужине, а гелови са већим процентом агарозе се користе за раздвајање краћих фрагмента ДНК. У овом истраживању је коришћен 2% агарозни гел за раздвајање фрагмента ДНК дужина 150 bp, 262 bp и 407 bp. Агарозни гел је направљен тако што је 4 g агарозе растворено у 200 ml TBE пуфера загревањем до кључања у микроталасној пећници. Охлађеном раствору на 65°C је додато 10 μ L етидијум-бромида (EtBr) (финалне концентрације 0,5 μ g/ml) који интеркалира у ДНК молекул. Гел је изливен у хоризонталну плочу тако да буде дебљине око 3-5 mm. Након тога је гел остављен 30 min да полимеризује и очврсне. У отворе на гелу је нането око 5 μ L узорака амплификованих фрагмента ДНК и 1 μ L пуфера за пуњење (*engl. Loading Dye*).

Електрофореза је извођена у TBE пуферу на 150 V првих 5 min, а следећих 55min на 100 V. Као стандард коришћена је комерцијална смеша фрагмента ДНК различите дужине (*100 bp DNA Ladder*). Након завршене електрофорезе гел је пренет на трансилуминатор где је под UV светлом извршена визуелизација развојених фрагмента ДНК и фотографисање гела.

3.11. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Дескриптивна статистика је генерисана за све варијабле у студији. Пре статистичке обраде података, испитана је правилност расподеле добијених вредности континуалних варијабли помоћу *Kolmogorov-Smirnov* или *Shapiro-Wilk* теста. Резултати који се односе на чистоћу и принос молекула ДНК су представљени као средња вредност \pm стандардна девијација (S.V. \pm S.D.) и приказани су табеларно и графички. Значајност разлика по групама је евидентирана *Post Hoc* тестирањем (*Bonferroni* тестом, *Dunnet* тестом или *Tukey* тестом) у оквиру анализа ANOVA (једносмерна анализа варијансе) или непараметријским *Friedman* и *Kruskal Wallis* тестом у случају неправилне дистрибуције података. Некатегоријске варијабле изражене су као апсолутне и релативне вредности (број/процент/фреквенција). За анализу смера и јачине повезаности две варијабле коришћен је *Pearsonov* или *Spirmanov* коефицијент. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група је $p < 0,05$, док је статистички веома значајна разлика за $p < 0,01$. Све статистичке анализе података су урађене помоћу комерцијалног статистичког програма SPSS 20 за *Windows* (*engl. Statistical Package for the Social Sciences*).

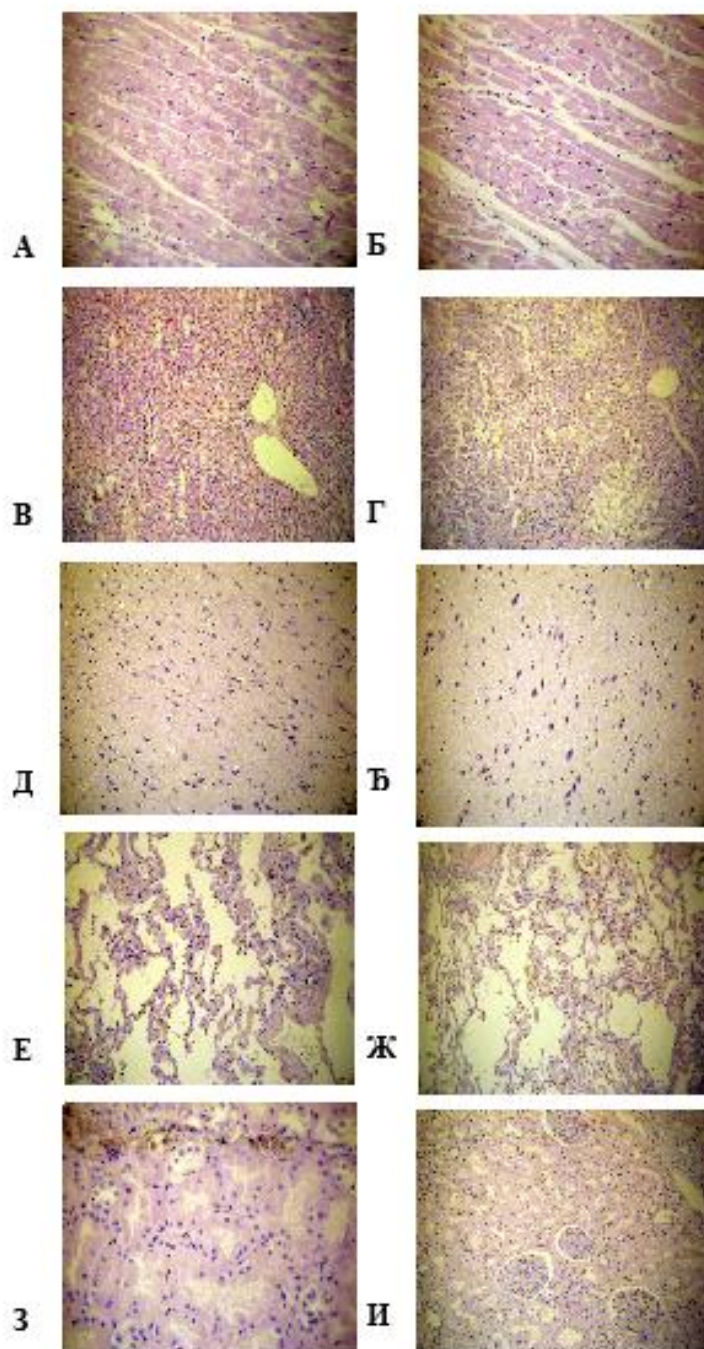
4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. ХИСТОМОРФОЛОШКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ТКИВА

4.1.1. Хистоморфолошке карактеристике ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину

Хистолошки препарати ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега која су фиксирана у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину, обојени су хемотоксилин/еозин техником и анализирани под светлосним микроскопом (**Слика 7**). На препаратима нису уочене значајне хистоморфолошке разлике између ткива која су фиксирана у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину. Ткива која су фиксирана у 10% пуферизованом формалину су била незнатно боље обојена, што није од дијагностичког значаја.

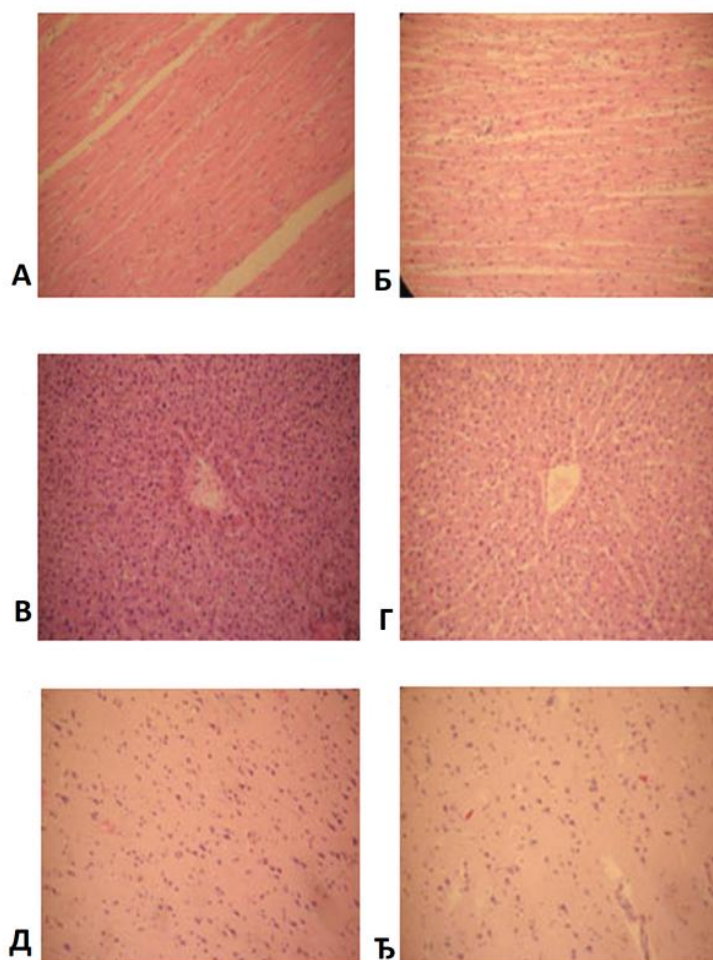
Мишићна влакна срца су у регуларном распореду, уједначене дебљине, централно локализованих једара, дисперзно расутог хроматина, местимично видљивих једараца. Ткиво јетре је очуване грађе ламина хепатоцита. Ћелије јетре су округле, очуване грађе, светле цитоплазме испуњене гликогеном, централно локализованих једара са јасно уочљивим једарцима. Сиву масу мозга чине неурони пирамидног и овалног облика, светле цитоплазме, централно постављених једара, са местимично упадљивим једарцима, а белу масу чине бројне глијалне ћелије са једрима овалног облика. Ткиво плућа је очуване грађе ваздушних путева и алвеола. Интраалвеоларне преграде су уједначене дебљине обложене једнослојним плочастим епителом. Интерстицијум је регуларне грађе и ширине са густом мрежом капиларних крвних судова. Ткиво бубрега је очуване грађе гломерула и интеркапсуларног простора. Проксимални и дистални сабирни каналићи су уједначене величине и регуларне морфологије тубуларног епитела. Интерстицијум је очуван, лако дилатираних крвних судова.



Слика 7. Хистолошки препарати ткива срца (А, Б), јетре (В, Г), мозга (Д, Б), плућа (Е, Ж) и бубрега (З, И) фиксираних у 4% непuffersованом формалину (А, В, Д, Е, З) и 10% пуuffersованом формалину (Б, Г, Б, Ж, И) и обојени хематоксилин/еозин техником.

4.1.2. Хистоморфолошке карактеристике ткива укалупљених у парафинске блокове

Хистоморфолошки су анализирани ткивни препарати срца, јетре и мозга који су фиксирана у 4% непуферизованом формалину и након тога укалупљени у парафин и архивирани од 0 до 30 година. Хистолошки препарати ткива су обојени хематоксилин/еозином одмах након калупљења и исти ткивни препарати су обојени хематоксилин/еозином након месец дана до 30 година архивирања парафинских блокова. Хистоморфолошке разлике између ткивних препарата израђених одмах након калупљења и ткивних препарата која су архивирани до 30 година уназад нису уочене. Сва ткива имају уобичајену структуру цитоплазме и једра и нормалну ткивну архитектуру (Слика 8).



Слика 8. Хистолошки препарати ткива срца (А, Б), јетре (B, Г) и мозга (Д, Ђ) обојених хематоксилин/еозином одмах након калупљења (А, B, Д) и препарати истих ткива обојених хематоксилин/еозином након 30 (Б), 29 (Г) и 28 (Ђ) година архивирања парафинских блокова.

4.2. КВАЛИТЕТ ДНК ИЗОЛОВАНЕ ИЗ ТКИВА ФИКСИРАНИХ У ФОРМАЛИНУ

4.2.1. Чистоћа и принос ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину

Чистоћа узорака ДНК изоловане из различитих ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину, коришћењем две различите методе за изоловање ДНК, односи се на присуство протеина, соли, угљених хидрата, липида и растварача који су заостали у узорцима током процеса изоловања ДНК и одређена је спектрофотометријски. Чистоћа узорака је одређена односом апсорбанци A260/A280 (вредности ниже од 1,5 указују на присуство велике концентрације протеина у изолату) и односом апсорбанци A260/A230 (вредности ниже од 1,7 указују на присуство соли, липида и растварача).

Укупан принос ДНК у изолатима представља количину (μg) ДНК у 50 μL ТЕ пуфера и израчунат је за сваки узорак изоловане ДНК.

4.2.1.1. Утицај методе за изоловање ДНК из фиксираних ткива на чистоћу и принос изоловане ДНК

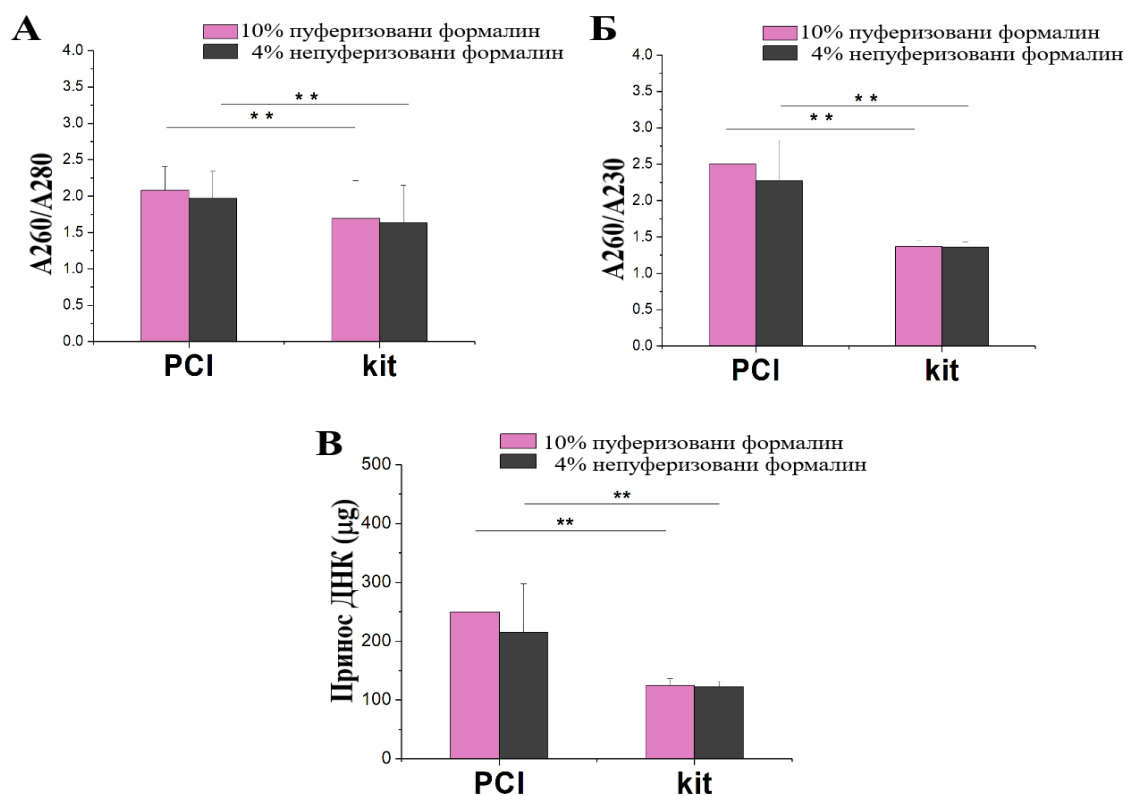
Чистоћа и принос молекула ДНК су одређени у узорцима у којима је ДНК изолована из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуфеизованом формалину помоћу две методе: екстракцијом помоћу фелол-хлороформ-изоамил алкохола (РСИ метода) или коришћењем комерцијалног комплета (кит). Добијени резултати приказани су у Табели 3.

Табела 3. Чистоћа и принос ДНК изоловане из формалином фиксираних ткива помоћу РСИ методе или употребом кита. Резултати су представљени као средња вредност (*S.V.*) \pm стандардна девијација (*S.D.*).

| Метода | Врста формалина | A260/A280 | A260/A230 | Принос (μg) | |
|--------|-------------------|-----------------|-----------------|--------------------------|----------------|
| | | | | S.V. \pm S.D. | опсег |
| РСИ | 10% пуферизовани | 2,08 \pm 0,33 | 2,5 \pm 1,00 | 249,65 \pm 100,50 | 121,25-612,95 |
| | 4% непуферизовани | 1,97 \pm 0,37 | 2,27 \pm 0,71 | 214,95 \pm 82,27 | 103,75- 527,50 |
| | <i>p</i> | <0,01** | <0,01** | <0,01** | |
| Кит | 10% пуферизовани | 1,69 \pm 0,52 | 1,37 \pm 0,08 | 124,30 \pm 12,54 | 93,75-201,25 |
| | 4% непуферизовани | 1,63 \pm 0,52 | 1,36 \pm 0,07 | 122,51 \pm 9,42 | 93,75-142,50 |
| | <i>p</i> | <0,01** | <0,01** | <0,01** | |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

Узорци ДНК добијени PCI методом садрже статистички значајно мање протеина (виши однос апсорбанци A260/A280) ($p < 0,01$) и других нечистоћа (виши однос апсорбанци A260/A230) ($p < 0,01$) у односу на ДНК изоловану помоћу кита (Графикон 1А, 1Б). Такође, и принос ДНК изоловане помоћу PCI методе је статистички значајно већи од приноса ДНК у узорцима добијеним изоловањем помоћу кита ($p < 0,01$) (Графикон 1В). Иако су све вредности односа A260/A280 и односа A260/A230 у опсегу који указује на добру чистоћу узорака (Табела 3), најбољи чистоћа и принос ДНК узорака добијени су у узорцима ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину коришћењем PCI методе (Табела 3).



Графикон 1. Утицај методе за изоловање ДНК на чистоћу (А, Б) и принос (В) ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину. Резултати су представљени као средња вредност ($S.V.$) \pm стандардна девијација ($S.D.$).

**статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.2.1.2. Утицај врсте формалина на чистоћу и принос изоловане ДНК

Чистоћа и принос ДНК одређени су у узорцима ДНК изолованим из ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину. Средње вредности ових параметара приказане су у Табели 4.

Табела 4. Чистоћа и принос ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| Врста формалина | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|-------------------|-----------|-----------|--------------|--------------|
| | | | S.V.±S.D. | опсег |
| 10% пуферизовани | 1,89±0,41 | 1,94±0,39 | 186,97±35,59 | 93,75-612,95 |
| 4% непуферизовани | 1,80±0,43 | 1,81±0,30 | 168,72±37,37 | 93,75-201,25 |
| <i>p</i> | <0,05* | >0,05 | <0,05* | |

* статистички значајна разлика $p < 0,05$

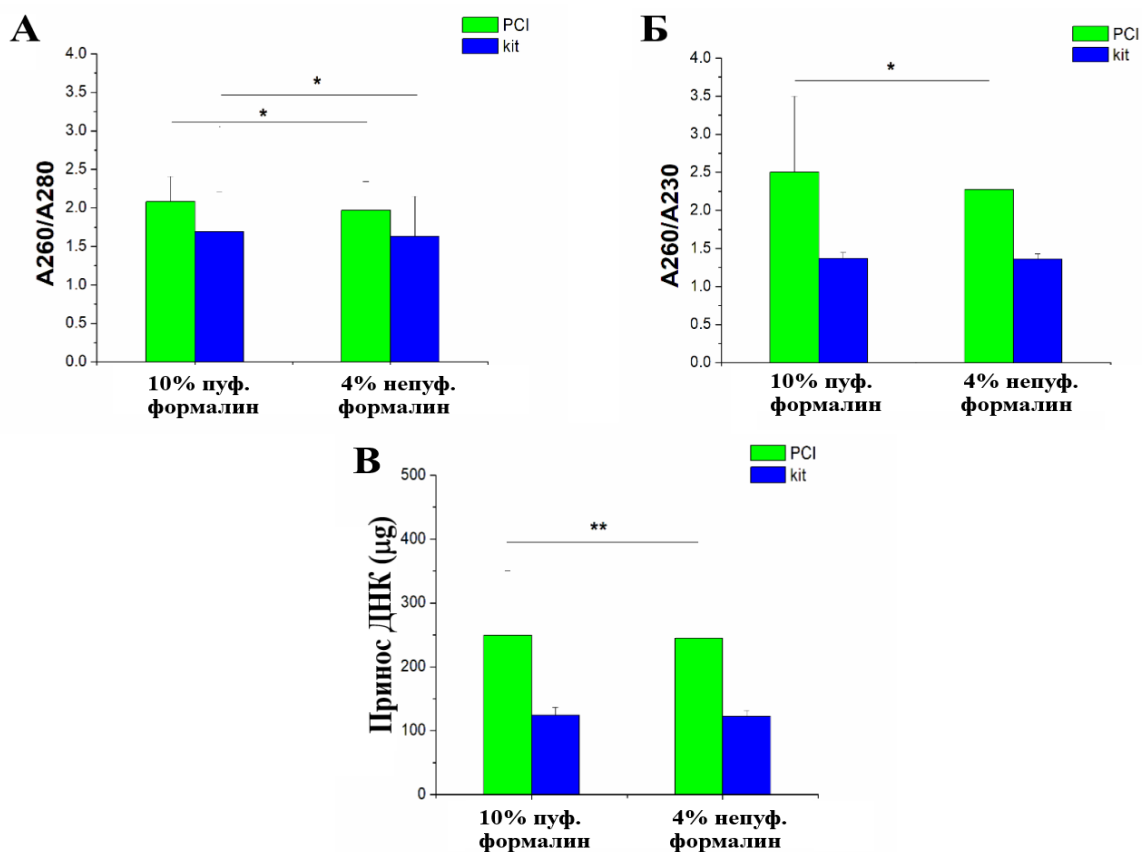
Резултати показују да на чистоћу ДНК утиче врста формалина у коме су ткива фиксирана пре изоловања ДНК. Све вредности односа A260/A280 као и односа A260/A230 крећу се у опсегу вредности које указују на ниску концентрацију протеина, соли, липида и растварача у изолатима заосталих након изоловања ДНК. Поређењем чистоће узорка ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину, без обзира којом је методом изолована ДНК, вредности односа A260/A280 су више у изолатима из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину у односу на она која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину (Табела 4) и ова разлика у чистоћи је статистички значајна ($p < 0,05$). Вредности односа A260/A230 су више у изолатима из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину у односу на она која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину. Међутим, ова разлика није статистички значајна ($p > 0,05$). Принос молекула ДНК је статистички значајно већи у узорцима ДНК у којима је она изолована из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину ($p < 0,05$) (Табела 4).

Пошто је показано да врста формалина у коме је ткиво фиксирано пре изоловања ДНК утиче на чистоћу и принос, упоредили смо утицај формалина у узорцима у којима је ДНК изолована помоћу РСI методе у односу на узорке у којима је ДНК изолована помоћу кита (Графикон 2).

Узорци ДНК изоловане из ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину имају више протеина (нижи однос A260/A280) у односу на узорке ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину и ова разлика је статистички значајна како за узорке ДНК изоловане помоћу РСI методе ($p < 0,05$), тако и за ДНК изоловану помоћу кита ($p < 0,05$) (Графикон 2А). Све вредности односа апсорбанци A260/A280 за све испитиване узорке крећу се у опсегу који, према подацима из литературе, дефинише добру чистоћу узорка ДНК.

Однос апсорбанци A260/A230, који указује на присуство соли, липида и растварача у узорцима ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуфеизованом формалину показује статистичку значајност у свим узорцима ДНК изоловане РСI методом ($p < 0,05$). Узорци ДНК изоловане из ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину имају нижи степен чистоће (ниже вредности односа

A260/A230) него узорци ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину (**Графикон 2Б**). За све испитиване узорке ДНК изоловане PCI методом вредности односа апсорбанци крећу се у опсегу који указује на добру чистоћу узорака. У узорцима ДНК изоловане помоћу кита разлика у чистоћи, тј у односу A260/A230 није статистички значајна ($p>0,05$) у односу на врсту формалина у коме је ткиво фиксирано (**Графикон 2Б**). Међутим, ниске вредности односа апсорбанци A260/A230 (ниже од 1,4) у свим испитиваним узорцима у којима је ДНК изолована помоћу кита указују на присуство велике концентрације соли, липида и растварача у овим узорцима.



Графикон 2. Утицај врсте формалина за фиксирање ткива на чистоћу (А, Б) и принос (В) ДНК изоловане помоћу PCI методе или кита. Резултати су представљени као средња вредност ($S.V.$) \pm стандардна девијација ($S.D.$).

* статистички значајна разлика $p<0,05$

** статистички веома значајна разлика $p<0,01$

Упоређујући принос ДНК која је изолована PCI методом из ткива фиксираних у 10% пуферизованом и из ткива фиксираних у 4% непуферизованом утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика ($p<0,01$). Већи принос ДНК је добијен у узорцима ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину. У узорцима ДНК изоловане из ткива помоћу кита не постоји статистички значајна разлика у приносу ДНК између изолата из ткива фиксираних у 10% пуферизованом у односу на принос из изолата ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину ($p>0,05$) (**Графикон 2В**).

4.2.1.3. Утицај врсте ткива фиксираних у формалину на чистоћу и принос изоловане ДНК

Чистоћа и принос ДНК изоловане помоћу РСИ методе или кита из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега која су фиксирана у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину су одређени спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на 260 nm, 280 nm и 230 nm. Средње вредности добијених параметара и стандардне девијације приказане су у **Табели 5**.

Табела 5. Чистоћа и принос ДНК изоловане помоћу РСИ методе или кита из пет различитих ткива (срца, јетре, мозга, плућа и бубрега) фиксираних у формалину. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| Метода | Врста ткива | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|--------|-------------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| | | | | S.V.±S.D. | опсег |
| РСИ | срце | 2,16±0,39 | 1,87±0,29 | 170,24±32,64 | 103,75-250,00 |
| | јетра | 1,97±0,24 | 3,12±0,71 | 346,84±116,06 | 137,50-612,95 |
| | мозак | 2,00±0,34 | 1,99±0,39 | 180,35±38,82 | 115,00-255,00 |
| | плућа | 1,99±0,36 | 2,54±1,30 | 225,19±55,51 | 125,00-347,50 |
| | бубрег | 1,97±0,39 | 2,40±0,64 | 235,11±67,92 | 121,25-372,50 |
| | <i>p</i> | >0,05 | <0,01** | <0,01** | |
| Кит | срце | 1,70±0,57 | 1,35±0,06 | 121,09±9,62 | 93,75-136,25 |
| | јетра | 1,59±0,48 | 1,37±0,08 | 124,75±15,47 | 93,75-201,25 |
| | мозак | 1,74±0,58 | 1,35±0,07 | 121,50±9,70 | 98,75-140,00 |
| | плућа | 1,63±0,46 | 1,38±0,08 | 125,63±9,41 | 102,50-146,25 |
| | бубрег | 1,66±0,49 | 1,36±0,06 | 123,86±9,44 | 95,00-141,25 |
| | <i>p</i> | >0,05 | >0,05 | >0,05 | |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

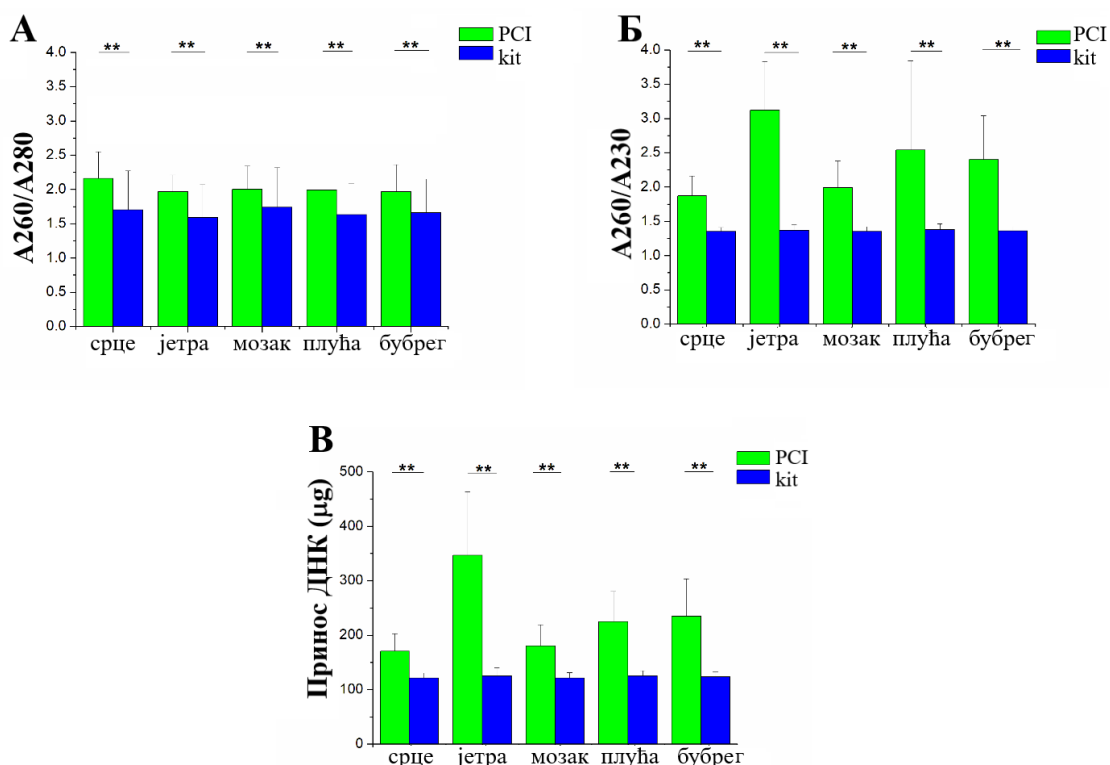
Вредности односа апсорбанци A260/A280 и A260/A230 свих узорака ДНК која је изолована из различитих ткива екстракцијом помоћу РСИ методе указују на задовољавајућу чистоћу узорака ДНК (**Табела 5**). Ниже вредности односа апсорбанци A260/A280 и A260/A230 добијене су у узорцима ДНК изоловане помоћу кита указују на већу концентрацију протеина, соли, липида и растварача у узорцима.

Вредности односа апсорбанци A260/A280 у узорцима ДНК изолованих РСИ методом из пет различитих ткива су сличне ($p > 0,05$). Такође, не запажа се статистички значајна разлика у вредностима односа апсорбанци A260/A280 у узорцима ДНК изолованих употребом кита из пет различитих ткива ($p > 0,05$).

У погледу чистоће узорака ДНК изоловане PCI методом у односу на присуство соли и растварача (однос A260/A230), постоји статистички веома значајна разлика између пет различитих ткива ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем утврђена је разлика у односу A260/A230 између ткива: јетре и свих осталих ткива, затим срца и плућа, мозга и плућа, па срца и бубрега, као и мозга и бубрега ($p < 0,01$). Највећи однос A260/A230 утврђен је у узорцима ДНК која је изолована PCI методом из ткива јетре.

Сви узорци ДНК изоловане помоћу кита, однос A260/A230 имају приближно исту чистоћу у свим испитиваним ткивима, па статистички значајна разлика између ткива није забележена ($p > 0,05$).

Принос ДНК зависи од врсте ткива из ког је она изолована. Разлике у приносу између различитих ткива су статистички веома значајне у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе ($p < 0,01$), али не и у узорцима ДНК изоловане помоћу кита ($p > 0,05$). *Post hoc* тестирањем утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика између приноса ДНК изоловане из ткива срца и јетре, јетре и мозга, мозга и плућа, срца и плућа, срца и бубрега, јетре и плућа, јетре и бубрега, као и мозга и бубрега ($p < 0,01$). Најбољи принос је добијен из ткива јетре ($346,84 \pm 116,06 \mu\text{g}$ ДНК), а најмањи из срца ($170,24 \pm 32,064 \mu\text{g}$ ДНК) и мозга ($180,35 \pm 38,82 \mu\text{g}$ ДНК) када је ДНК изолована помоћу PCI методе. У узорцима ДНК изоловане помоћу кита принос ДНК је уједначен између различитих ткива и средње вредности приноса се крећу од $121,09 \pm 9,62 \mu\text{g}$ ДНК у ткиву срца, до $125,63 \pm 9,41 \mu\text{g}$ ДНК у ткиву плућа (Табела 5).



Графикон 3. Утицај врсте ткива (срце, јетра, мозак, плућа и бубрег) на чистоћу (А, Б) и принос (В) ДНК изоловане помоћу PCI методе или кита из фиксираних ткива. Резултати су представљени као средња вредност ($S.V.$) \pm стандардна девијација ($S.D.$).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

Разлике у вредностима испитиваних параметара у односу на методу изоловања ДНК из пет различитих ткива приказане су на **Графикону 3**. Упоредивањем вредности односа A260/A280 у узорцима ДНК изоловане помоћу РСI методе и помоћу кита, између пет различитих ткива указује на постојање статистички веома значајне разлике ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем показано је да је разлика у односу A260/A280 између ДНК изоловане из истих ткива, али различитом методом, статистички веома значајна за сва испитивана ткива ($p < 0,01$), при чему су узорци ДНК изоловане помоћу РСI методе чистији од узорака ДНК изоловане помоћу кита (**Графикон 3А**).

Да би утврдили да ли постоји разлика у односу A260/A230 ДНК у зависности од примењене методе за изоловање ДНК из анализираних ткива, за свако ткиво понаособ поредили смо узорке ДНК изоловане РСI методом са узорцима ДНК добијеним помоћу кита. Резултати су показали да постоји статистички веома значајна разлика у зависности од примењене методе за изоловање ДНК ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика између чистоће ДНК изоловане из истих ткива применом различитих метода за изоловање ($p < 0,01$), при чему су узорци ДНК изоловане помоћу РСI методе чистији од узорака ДНК изоловане помоћу кита (**Графикон 3Б**).

Упоредивањем приноса ДНК изоловане помоћу РСI методе у односу на кит из пет различитих врста ткива која су фиксирана у формалину утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика у зависности од примењене методе за изоловање ДНК ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика између приноса ДНК изоловане из исте врсте ткива, али различитим методама изоловања ($p < 0,01$) (**Графикон 3В**). Већи принос ДНК добијен је у узорцима ДНК изоловане помоћу РСI методе него у узорцима ДНК изоловане помоћу кита.

4.2.1.4. Утицај дужине фиксирања ткива у формалину на чистоћу и принос изоловане ДНК

Чистоћа и принос молекула ДНК одређени су у узорцима ДНК изоловане из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега које је фиксирано у формалину 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца (**Табеле 6 и 7**). Контролни узорци представљају ДНК изоловану из ткива одмах након обдукције, без предходног фиксирања у формалину.

Чистоћа узорака ДНК добијене из фиксираних ткива не разликује се значајно од чистоће ДНК у контролним узорцима.

Вредности односа апсорбанци A260/A280 узорака ДНК су задовољавајуће чистоће, без обзира на методу изоловања ДНК. Вредности односа апсорбанци A260/A230 зависе од употребљене методе за изоловање ДНК. Наиме, узорци добијени екстракцијом помоћу РСI методе имају нижу концентрацију соли, липида и растварача (више вредности односа A260/A230) у односу на узорке ДНК добијене изоловањем помоћу кита. Вредности односа A260/A280 и A260/A230 у узорцима ДНК изоловане помоћу РСI методе из ткива које је фиксирано у формалину су веће у односу на

вредности чистоће ДНК изоловане помоћу кита за скоро све временске тачке. Анализом података је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима односа A260/A280 и A260/A230 између суседних временских тачака до 28 дана фиксирања ткива у формалину независно од примењене методе за изоловање ДНК ($p > 0,05$).

Принос ДНК изоловане помоћу РСI методе из ткива која су фиксирана у формалину одређени временски период је мањи у односу на принос из контролних узорка (Табеле 6 и 7). Међутим, у узорцима ДНК у којима је она изолована помоћу кита не постоји разлика у приносу ДНК у узорцима ткива која су фиксирана у формалину у односу на контролне узорке (Табела 7). Користећи кит за изоловање ДНК из контролних, нефиксираних и ткива фиксираних одређени временски период добија се скоро упола мањи принос ДНК за скоро све временске тачке у односу на принос ДНК у изолатима из фиксираних и контролних ткива из којих је ДНК изолована помоћу РСI методе (Табеле 6 и 7).

Табела 6. Чистоћа и принос ДНК изоловане помоћу РСI методе из пет различитих ткива (срца, јетре, мозга, плућа и бубрега) фиксираних у формалину 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца и контролних узорка. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| Дужина фиксирања | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|------------------|-----------|-----------|-----------------------|---------------|
| | | | S.V.±S.D. | опсег |
| контрола | 2,18±0,11 | 2,25±1,50 | 353,00 ±223,71 | 197,50-738,75 |
| 6h | 2,18±0,32 | 2,53±0,81 | 252,06±90,34 | 133,75-527,50 |
| 24h | 1,95±0,25 | 2,36±0,67 | 228,08±73,72 | 136,25-435,00 |
| 48h | 2,08±0,40 | 2,12±0,70 | 220,71±114,35 | 121,25-612,96 |
| 72h | 2,20±0,38 | 2,40±0,78 | 232,00±103,43 | 123,75-486,25 |
| 96h | 2,11±0,52 | 2,40±0,58 | 234,63±68,57 | 142,50-416,25 |
| 5 дана | 1,98±0,23 | 2,39±0,64 | 244,25±67,35 | 153,75-400,00 |
| 6 дана | 2,10±0,44 | 2,22±0,77 | 224,50±105,24 | 121,25-487,50 |
| 7 дана | 2,18±0,20 | 2,53±0,62 | 267,25±101,18 | 158,75-502,50 |
| 10 дана | 1,90±0,13 | 2,50±0,71 | 267,57±115,01 | 150,00-572,50 |
| 14 дана | 1,99±0,22 | 2,45±0,65 | 241,31±82,65** | 133,75-421,25 |
| 28 дана | 1,65±0,13 | 2,82±1,88 | 179,81±71,09** | 103,75-356,25 |
| 2 месеца | 1,90±0,53 | 1,53±0,38 | 141,25±21,12 | 122,50-197,50 |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

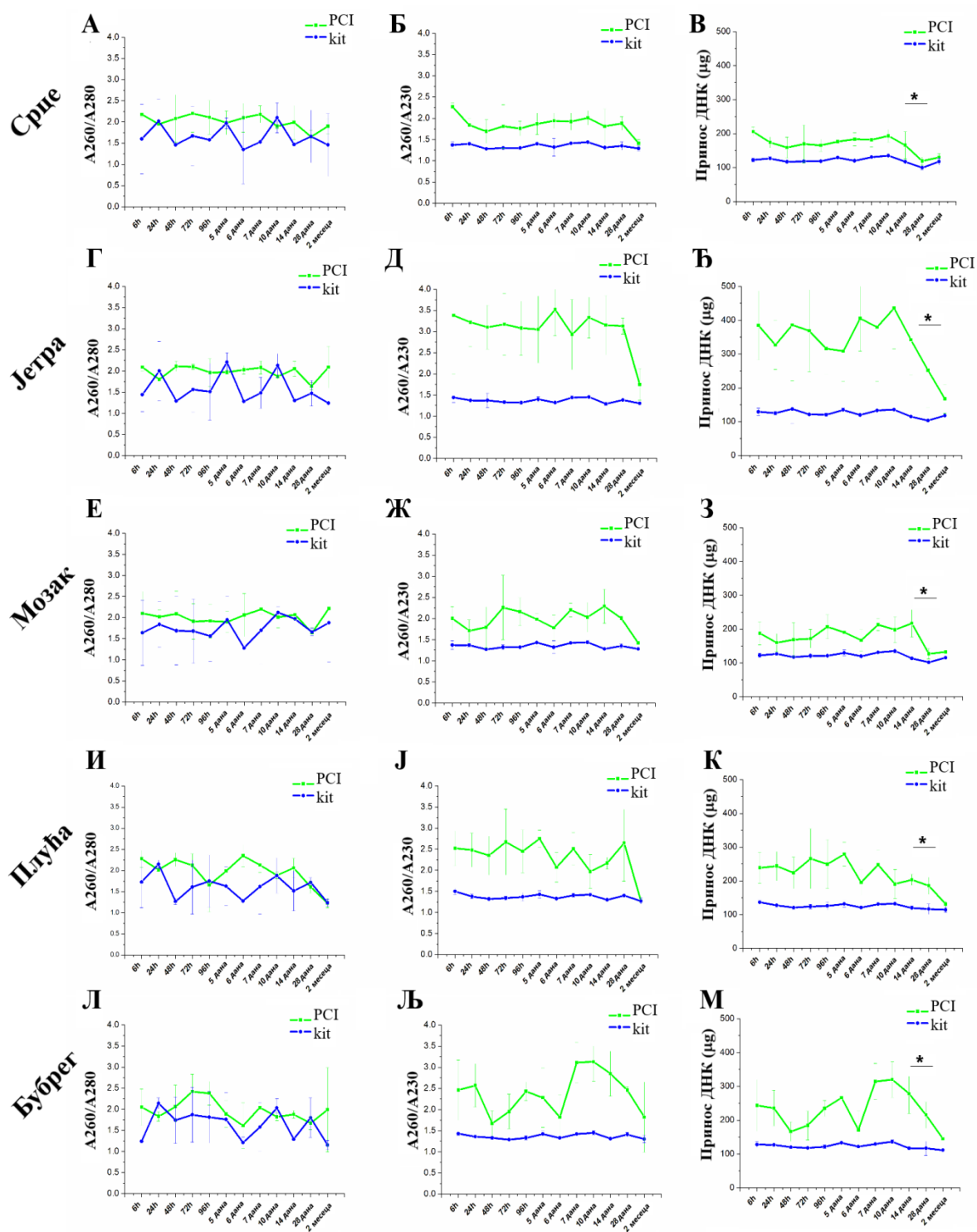
У узорцима ДНК изолованим из ткива која су фиксирана до 14 дана не постоји разлика у приносу ДНК, без обзира која је метода коришћена за њено изоловање. Међутим након 14 дана и 28 дана фиксирања ткива у формалину постоји статистички значајан пад у приносу ДНК у зависности од дужине фиксирања ($p < 0,01$), како у изолатима добијеним РСI методом (Табела 6), тако и у изолатима добијеним помоћу кита (Табела 7).

Табела 7. Чистоћа и принос ДНК изоловане помоћу кита из пет различитих ткива (срца, јетре, мозга, плућа и бубрега) фиксираних у формалину 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца и контролних узорака. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| Дужина фиксирања | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|------------------|-----------|-----------|-----------------------|---------------|
| | | | S.V.±S.D. | опсег |
| контрола | 2,04±0,62 | 1,40±0,21 | 128,75±21,84 | 116,25-167,50 |
| 6h | 1,6±0,59 | 1,42±0,10 | 127,63±8,85 | 117,50-146,25 |
| 24h | 2,02±0,43 | 1,37±0,03 | 126,63±4,00 | 120,00-132,50 |
| 48h | 1,46±0,45 | 1,31±0,09 | 122,50±18,00 | 113,75-201,25 |
| 72h | 1,67±0,60 | 1,32±0,04 | 120,44±4,70 | 113,75-133,75 |
| 96h | 1,58±0,54 | 1,33±0,06 | 121,50±6,05 | 113,75-142,50 |
| 5 дана | 1,97±0,48 | 1,43±0,07 | 131,76±6,59 | 122,50-145,00 |
| 6 дана | 1,35±0,37 | 1,32±0,02 | 120,56±1,69 | 117,50-125,00 |
| 7 дана | 1,53±0,52 | 1,42±0,03 | 131,13±3,16 | 126,35-137,50 |
| 10 дана | 2,10±0,31 | 1,44±0,03 | 134,88±3,67 | 127,50-141,25 |
| 14 дана | 1,47±0,45 | 1,30±0,03 | 116,38±3,90** | 111,25-127,50 |
| 28 дана | 1,66±0,36 | 1,37±0,03 | 107,63±13,46** | 93,75-136,25 |
| 2 месеца | 1,46±0,51 | 1,30±0,05 | 115,38±5,56 | 108,75-126,25 |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

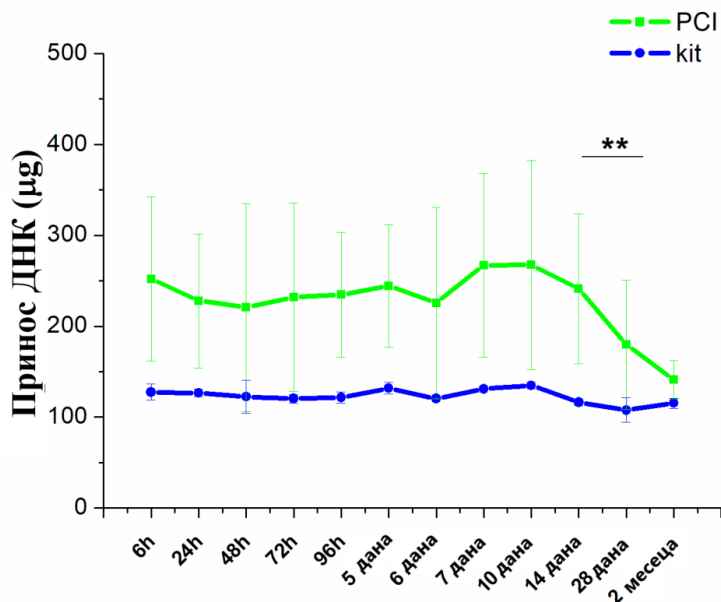
Када анализирамо различите врсте ткива појединачно кроз различиту дужину фиксирања у формалину статистичком обрадом података је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у вредностима односа A260/A280 и A260/A230 између суседних временских тачака независно од примењене методе за изоловање ДНК ($p > 0,05$). Чистоћа узорака варира, али те разлике нису статистички значајне и не показују правилност у испољавању (Графикон 4А, 4Б, 4Г, 4Д, 4Е, 4Ж, 4И, 4Ј, 4Л, 4Љ). Статистичком анализом података о приносу ДНК добијене из различитих ткива која су фиксирана у формалину од 6h до 2 месеца, утврђено је да за сва ткива постоји статистички значајан пад у приносу након 14 дана фиксирања у формалину без обзира на методу која је коришћена за изоловање ДНК ($p < 0,05$) (Графикон 4В, 4Ђ, 4З, 4К, 4М).



Графикон 4. Утицај дужине фиксирања ткива у формалину на чистоћу (однос A_{260}/A_{280} : А, Г, Е, И, Л, и однос A_{260}/A_{230} : Б, Д, Ж, Ј, Љ) и принос (В, Б, З, К, М) ДНК изоловане из ткива срца (А, Б, В), јетре (Г, Д, Б), мозга (Е, Ж, З), плућа (И, Ј, К) и бубрега (Л, Љ, М). Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

* статистички значајна разлика $p < 0,05$

Анализом збирног приноса ДНК (за сва ткива заједно), утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика у приносу између 14 дана и 28 дана фиксирања ткива у формалину, без обзира на методу која је коришћена за изоловање ДНК ($p < 0,01$) (**Графикон 5**). Утврђивањем корелације преко коефицијента r_0 Спирманове корелације ранга између дужине фиксирања ткива и приноса ДНК утврђена је негативна корелација мале јачине од $-0,151$ када је ДНК изолована помоћу PCI методе и $-0,199$ када изолована помоћу кита.



Графикон 5. Средње вредности приноса ДНК изоловане помоћу PCI методе и кита из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега која су фиксирана у формалину 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца. Резултати су представљени као средња вредност ($S.V.$) \pm стандардна девијација ($S.D.$).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.2.1.5. Утицај свих испитиваних фактора на чистоћу и принос ДНК изоловане из различитих ткива фиксираних у формалину

У **Табели 8** и **9** представљене су средње вредности чистоће и приноса ДНК у испитиваним узорцима у односу на врсту формалина и врсту ткива, као и на примењену методу за изоловање ДНК.

Статистичком обрадом података који се односе на вредности односа апсорбанци A_{260}/A_{280} за сва испитивана појединачна ткива која су фиксирана у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину потврђено је да постоји статистички веома значајна разлика у чистоћи узорака ДНК изоловане PCI методом ($p < 0,01$), али не и за чистоћу узорака ДНК изоловане помоћу кита ($p > 0,05$). *Post hoc* тестирањем је утврђено да постоји статистички веома значајна разлика у чистоћи ДНК изоловане PCI методом из ткива плућа које је фиксирано у 10% пуферизованом формалину у односу на чистоћу ДНК из ткива плућа које је фиксирано у 4% непуферизованом формалину ($p < 0,01$) (**Табела 8**): виша вредност односа A_{260}/A_{280} у

узорцима ДНК из ткива плућа фиксираних у 10% формалину указује на мању концентрацију протеина у односу на узорке ДНК изоловане из ткива плућа фиксираних у 4% непуферизованом формалину.

Анализом чистоће ДНК израчунавањем односа апсорбанци А260/А230 показано је да ДНК која је изолована РСІ методом из различитих ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину показује различит степен чистоће узорака, а те разлике међу ткивима су статистички веома значајне ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем је утврђено да постоји статистички веома значајна разлика између чистоће узорака ДНК изоловане из ткива срца које је фиксирано у 10% пуферизованом формалину и ткива срца које је фиксирано у 4% непуферизованом формалину ($p < 0,01$) (Табела 8). Разлика у чистоћи узорака ДНК изоловане помоћу кита из различитих ткива (Табела 9) није статистички значајна ($p > 0,05$).

Табела 8. Чистоћа и принос ДНК изоловане коришћењем РСІ методе из ткива које је фиксирано у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| Врста формалина | Врста ткиво | A260/A280 | A260/A230 | Принос ДНК (μg) | |
|----------------------------------|-------------|---------------------|---------------------|------------------------|----------------|
| | | | | S.V. ± S.D. | опсег |
| 10 % пуферизовани формалин | срце | 2,14±0,43 | 2,02±0,27 ** | 184,52±32,40** | 121,28-250,01 |
| | јетра | 2,03±0,14 | 3,29±0,47 | 397,70±101,73** | 170,03-612,89 |
| | мозак | 2,02±0,36 | 2,04±0,33 | 188,92±38,39 | 121,32-255,04 |
| | плућа | 2,17±0,26 ** | 2,72±1,8 | 228,51±54,23 | 150,04-347,53 |
| | бубрег | 2,05±0,37 | 2,45±0,67 | 248,50±69,81 | 127,49-372,51 |
| 4% непуферизовани формалин | срце | 2,18±0,35 | 1,73±0,24 | 157,11±27,37 | 103,77-215,00 |
| | јетра | 1,93±0,29 | 2,96±0,86 | 300,21±110,32 | 137,48-527,50 |
| | мозак | 1,98±0,32 | 1,94±0,44 | 172,42±38,33 | 115, 04-235,01 |
| | плућа | 1,84±0,37 | 2,37±0,54 | 222,14±57,72 | 125, 04-340,01 |
| | бубрег | 1,90±0,42 | 2,35±0,63 | 222,88±65,23 | 121,49-338,81 |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

Анализирајући принос ДНК која је изолована РСІ методом из различитих ткива која су фиксирани у оба формалина такође је уочена статистички веома значајна разлика у приносу између ткива ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем је утврђено да постоји разлика у приносу ДНК између ткива срца које је фиксирано у 10% пуферизованом и ткива срца које је фиксирано у 4% непуферизованом формалину ($p < 0,01$), као и између ткива јетре које је фиксирано у 10% пуферизованом и ткива јетре које је фиксирано у 4% непуферизованом формалину ($p < 0,01$) (Табела 8). Разлика у приносу ДНК изоловане из ткива која су фиксирани у оба формалина помоћу кита није статистички значајна ($p > 0,05$) (Табела 9).

На основу добијених резултата показано је да на чистоћу и принос молекула ДНК утиче пре свега метода којом је ДНК изолована из ткива, али и врсте ткива. У мањој мери на чистоћу и принос утиче врста формалина и дужина фиксирања ткива у формалину. Бољи резултати су добијени када је ткиво фиксирано у 10% пуферизованом формалину, него у 4% непуферизованом формалину. Са продуженим временом фиксирања у формалину смањује се принос изоловане ДНК, посебно након 14 дана фиксирања у формалину.

Табела 9. Чистоћа и принос ДНК изоловане коришћењем кита из ткива које је фиксирано у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

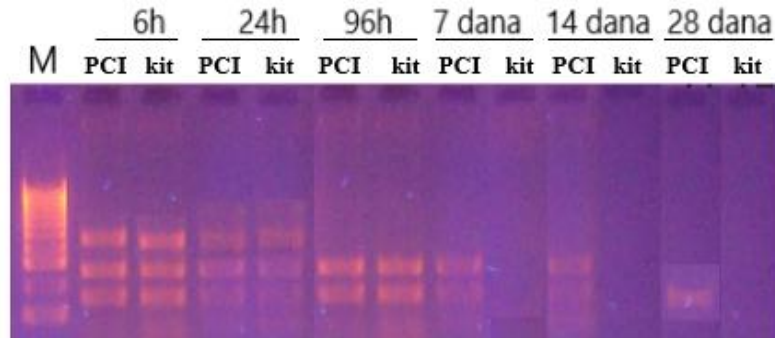
| Врста формалина | Врста ткива | A260/280 | A260/230 | Принос ДНК (µg) | |
|----------------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------------|---------------|
| | | | | S.V.± S.D. | опсег |
| 10 % пуферизовани формалин | срце | 1,79±0,64 | 1,35±0,06 | 121,01±10,10 | 93,75-136,30 |
| | јетра | 1,63±0,48 | 1,39±0,09 | 127,60±19,50 | 101,29-201,25 |
| | мозак | 1,62±0,47 | 1,35±0,08 | 121,32±10,03 | 98,82-140,04 |
| | плућа | 1,66±0,49 | 1,39±0,08 | 127,01±9,66 | 103,79-146,13 |
| | бубрег | 1,79±0,50 | 1,37±0,07 | 124,42±10,13 | 95,06-141,33 |
| 4% непуферизовани формалин | срце | 1,61±0,49 | 1,35±0,06 | 120,91±9,42 | 95,01-135,02 |
| | јетра | 1,55±0,48 | 1,36±0,07 | 122,12±10,28 | 93,84-142,45 |
| | мозак | 1,84±0,66 | 1,35±0,07 | 121,71±9,6 3 | 100,04-137,46 |
| | плућа | 1,61±0,44 | 1,36±0,07 | 124,29±9,12 | 102,52-142,48 |
| | бубрег | 1,54±0,47 | 1,36±0,06 | 123,41±9,03 | 103,78-140,03 |

4.2.2. Интегритет ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом и 4% непуферизованом формалину

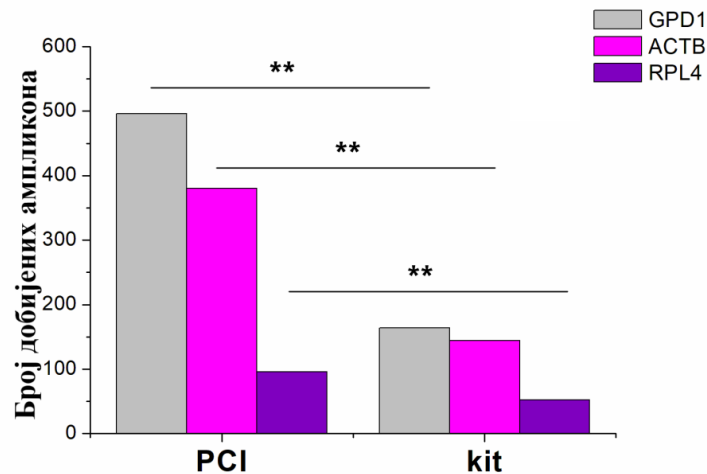
Фиксирањем ткива долази до деградације молекула ДНК, јер формалин доводи до фрагментације молекула ДНК. Избор формалина у ком се ткиво фиксира утиче на степен фрагментације молекула ДНК. Да би се утврдио интегритет, тј. степен фрагментације молекула ДНК изоловане из фиксираних ткива амплификовани су фрагменти гена GPD1, АСТВ и RPL4 помоћу PCR реакције, а успешност амплификације је провераван електрофорезом на 2% агарозном гелу. Присуство траке (ампликона) одређене дужине указује на специфичну амплификацију одговарајућег фрагмента ДНК.

4.2.2.1. Утицај методе за изоловање ДНК из фиксираних ткива на интегритет молекула ДНК

Интегритет ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или у 4% непуферизованом формалину зависи од методе која се користи за изоловање ДНК (Слика 9).



Слика 9. Провера успешности PCR амплификације *GPD1* и *ACTB* и *RPL4* gena у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе или кита из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину 6h, 24h, 96h, 7 дана, 14 дана и 28 дана. Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 µg/ml). М – ДНК маркер (100 bp).



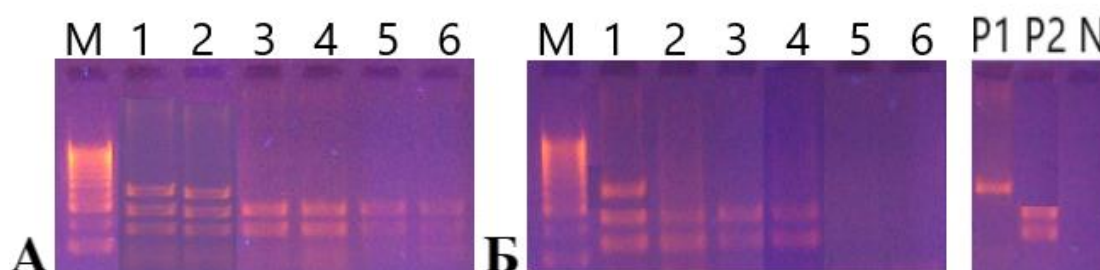
Графикон 6. Успешност PCR амплификације фрагмената ДНК изолованих из фиксираних ткива коришћењем PCI методе или кита. Дужина умножених фрагмената ДНК је 150 bp (*GPD1* ген), 262 bp (*ACTB* ген) и 407 bp (*RPL4* ген).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

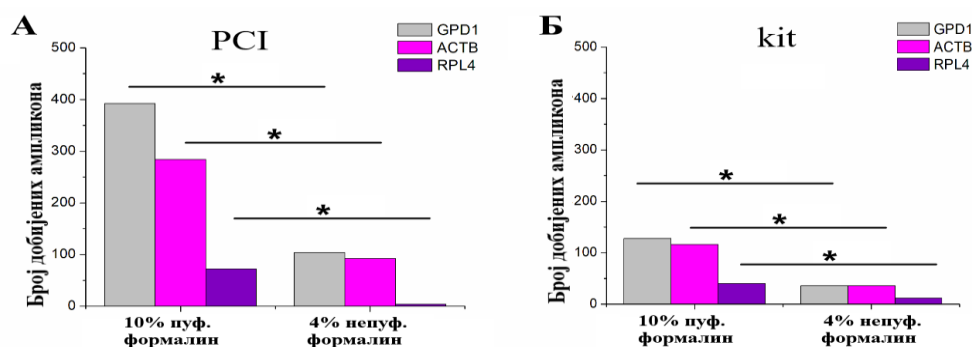
Већа успешност PCR амплификације жељених фрагмената ДНК различите дужине добијена је у узорцима ДНК изоловане из фиксираних ткива помоћу PCI методе у односу на ДНК изоловане из фиксираних ткива помоћу кита (Графикон 6). Ова разлика је статистички веома значајна ($p < 0,01$), што потврђује да на интегритет ДНК у великој мери утиче метода која се користи за њено изоловање.

4.2.2.2. Утицај врсте формалина на интегритет молекула ДНК

У свим узорцима ДНК изоловане из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега која су фиксирана у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину дошло је до амплификације бар неког од жељених фрагмената ДНК (Слика 10). Успешност PCR амплификације сва три жељена фрагмента је већа у узорцима ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом него у узорцима ДНК изоловане из ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину (Графикон 7). То указује на бољу очуваност интегритета молекула ДНК у ткивима фиксираних у 10% пуферизованом формалину. Највећа успешност амплификације добијена је за најкраћи фрагмент дужине 150 bp (GPD1 ген), а затим за краћи фрагмент дужине 262 bp (ACTB ген). У најмањем броју узорака ДНК амплификован је најдужи фрагмент од 407 bp (RPL4 ген) (Графикон 7). Ова разлика у успешности амплификације у односу на врсту формалина која је коришћена за фиксирање ткива је статистички значајна ($p < 0,05$)



Слика 10. Провера успешности PCR амплификације GPD1 и ACTB и RPL4 gena у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе (1, 3, 5) или кита (2, 4, 6) из ткива фиксираних у 10% пуферизованом (А) или 4% непуферизованом формалину (Б), 6h (1, 2), 96h (3, 4) и 14 дана (4, 5). Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$). М – ДНК маркер (100 bp). P1 - позитивни контрола за RPL4 ген; P2 - позитивна контрола за GPD1 и ACTB гене; N - негативна контрола.



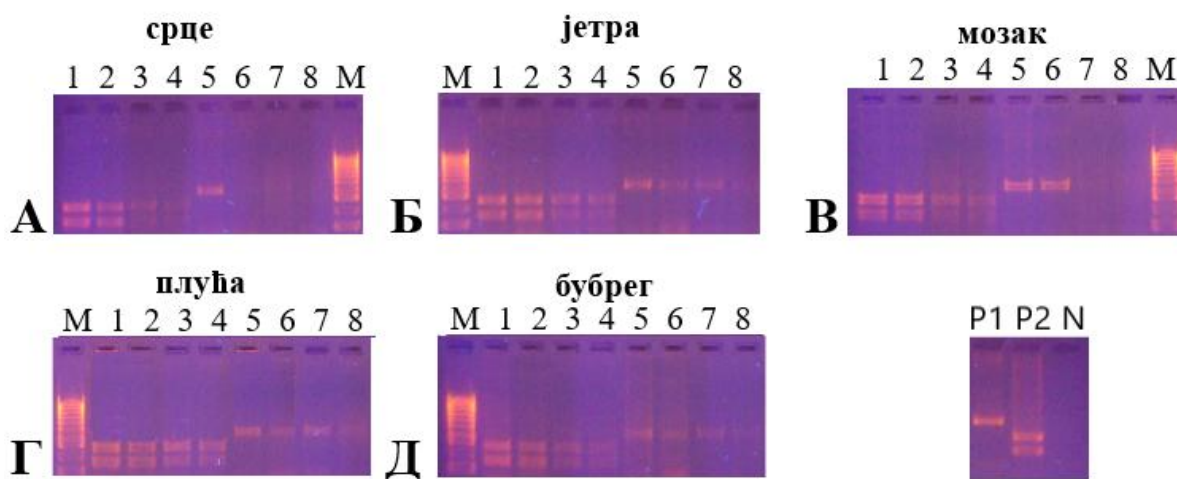
Графикон 7. Успешност PCR амплификације фрагмената ДНК изоловане помоћу PCI методе (А) или помоћу кита (Б) из ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину. Дужина умножених фрагмената ДНК је 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген).

* статистички значајна разлика $p < 0,05$

4.2.2.3. Утицај врсте фиксираних ткива на интергритет молекула ДНК

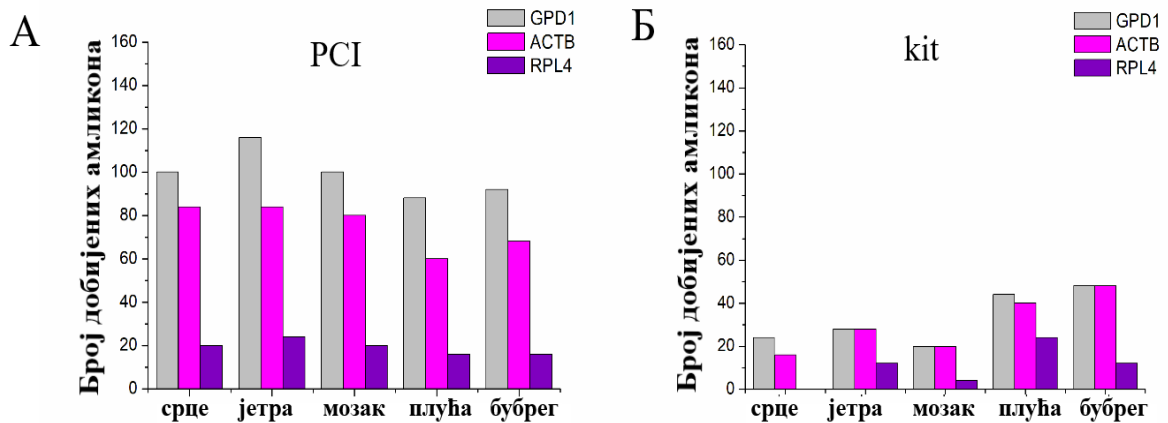
У свим узорцима ДНК изоловане из фиксираних ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега амплификовани су жељени фрагменти ДНК дужине 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген) (Слика 11).

Провером успешности PCR амплификације фрагмената ДНК електрофорезом на 2% агарозном гелу обојеном EtBr показано је присуство жељених ампликона у свим узорцима ткива (Слика 11). Интезитет трака (ампликона) на агарозном гелу је сличан за све узорке ДНК изоловане из пет различитих врста ткива. У свим узорцима у којима је ДНК изолована помоћу PCI методе интезитет трака је јачи у односу на интензитет трака из узорка ДНК изоловане помоћу кита.



Слика 11. Провера успешности PCR амплификације у узорцима ДНК изоловане из ткива срца (А), јетре (Б), мозга (В), плућа (Г) и бубрега (Д) фиксираних у 10% пуферизованом (узорци 1, 3, 5, 7) или 4% непуферизованом (узорци 2, 4, 6, 8) формалину из којих је ДНК изолована PCI методом (узорци 1, 2, 5, 6) или помоћу кита (узорци 3, 4, 7, 8). Узорци 1-4: дуплекс PCR: амплификовани GPD1 и ACTB гени; узорци 5-8: амплификован RPL4 ген. Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$). М – ДНК маркер (100 bp); P1 - позитивни контрола за RPL4 ген; P2 - позитивна контрола за GPD1 и ACTB гене; N - негативна контрола.

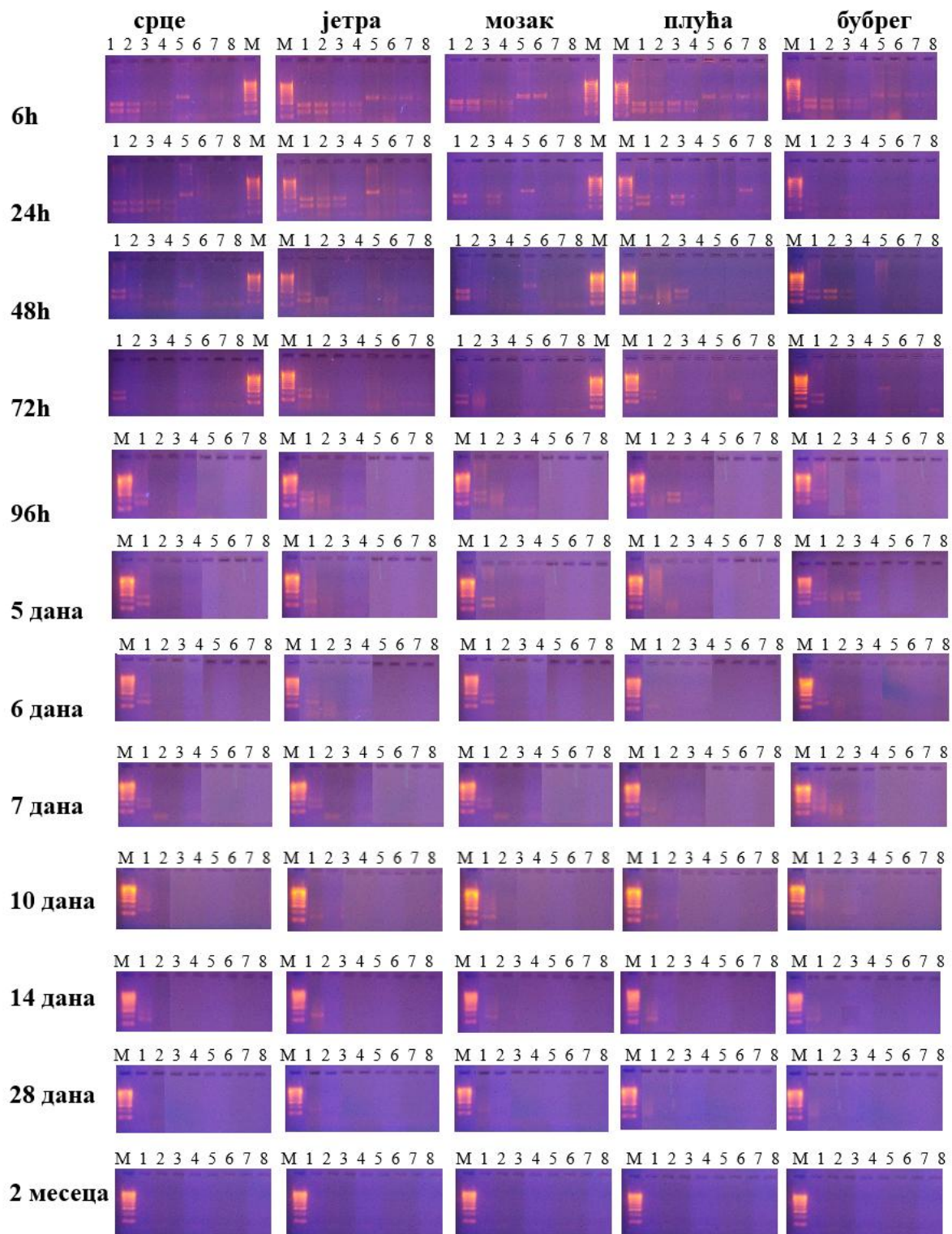
Краћи фрагменти (ACTB и GPD1 ген) су амплификовани у највећем броју узорка ДНК без обзира да ли је она изолована из ткива PCI методом (Графикон 8А) или помоћу кита (Графикон 8Б). Најдужи фрагмент ДНК (RPL4 ген) је амплификован у најмањем броју узорка ДНК изоловане из свих пет врста ткива. Статистичком обрадом података је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у успеху PCR амплификације одређеног фрагмената ДНК у зависности од фиксираних ткива из којих је ДНК изолована ($p > 0,05$).



Графикон 8. Успешност PCR амплификације фрагмената ДНК изолованих из фиксираних ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега коришћењем PCI методе (А) или кита (Б). Дужина умножених фрагмената ДНК је 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген).

4.2.2.4. Утицај дужине фиксирања ткива на интегритет молекула ДНК

Испитиван је ефекат дужине фиксирања ткива у формалину на интегритет молекула ДНК. Узорци ДНК су добијени изоловањем ДНК из одговарајућих ткива PCI методом или помоћу кита након 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца фиксирања у формалину. У свим узорцима ДНК урађена је PCR амплификација жељених фрагмената дужине 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген). Провером успешности PCR амплификације фрагмената у 2% агарозном гелу обојеном EtBr, уочено је присуство жељених ампликона. Интензитет трака (ампликона) у агарозном гелу је временски завистан (**Слика 12**): у узорцима ДНК изоловане из ткива која су дуже фиксирана у формалину интензитет трака је све слабији, а траке потпуно нестају у узорцима ДНК из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину после 2 месеца, односно у узорцима ДНК из ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину после 10 дана. Успешност амплификације је много већа у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе у односу на кит. Ово се односи на амплификацију сва три жељена гена, за све временске тачке, у свим узорцима ткива без обзира да ли су фиксирана у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину (**Слика 12**).



Слика 12. Провера успешности PCR амплификације *GPD1*, *ACTB* (узорци 1-4, дуплекс PCR) и *RPL4* (узорци 5-8) gena у узорцима ДНК изоловане PCI методом (узорци 1, 2, 5, 6) или помоћу кита (узорци 3, 4, 7, 8) из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега фиксираних у 10% пуферизованом (узорци 1, 3, 5, 7) или 4% непуфеизованом (узорци 2, 4, 6, 8) формалину. Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$). M – ДНК маркер (100 bp).

Резултати показују да не постоји разлика у успешности амплификације сва три жељена гена у зависности од врсте фиксираног ткива из кога је изолована ДНК. Међутим статистички значајна разлика у успешности амплификације сва три жељена гена добијена је у зависности од дужине трајања фиксирања ткива и врсте фиксатива (Табела 10).

Табела 10. Број амплификованих фрагмената ДНК у узорцима изолованим из различитих ткива фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину од 6h до 2 месеца.

| | | 6h | 24h | 48h | 72h | 96h | 5 дана | 6 дана | 7 дана | 10 дана | 14 дана | 28 дана | 2 месеца |
|-----------------------------------|------|-------|-------|-------|------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|----------|
| 10% пуферизовани формалин | | | | | | | | | | | | | |
| Срце | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 8/16 | 8/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 12/16 | 4/16 | 12/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 4/16 | 4/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 12/16 | 16/16 | 12/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 4/16 | 8/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 |
| Јетра | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 16/16 | 12/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 16/16 | 16/16 | 12/16 | 8/16 | 4/16 | 4/16 | 8/16 | 4/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 16/16 | 16/16 | 12/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 0/16 |
| Мозак | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 12/16 | 8/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 12/16 | 16/16 | 12/16 | 8/16 | 4/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 4/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 12/16 | 16/16 | 12/16 | 8/16 | 4/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 0/16 |
| Плућа | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 16/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 8/16 | 12/16 | 0/16 | 4/16 | 4/16 | 0/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 8/16 | 12/16 | 0/16 | 12/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 8/16 | 0/16 |
| Бубрег | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 16/16 | 0/16 | 0/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 8/16 | 12/16 | 16/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 16/16 | 16/16 | 16/16 | 8/16 | 12/16 | 16/16 | 8/16 | 4/16 | 0/16 | 8/16 | 4/16 | 0/16 |
| 4% непуферизовани формалин | | | | | | | | | | | | | |
| Срце | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 8/16 | 16/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 8/16 | 16/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| Јетра | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 16/16 | 8/16 | 4/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 16/16 | 8/16 | 4/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| Мозак | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 8/16 | 0/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| Плућа | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 16/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 16/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 16/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| Бубрег | | | | | | | | | | | | | |
| | RPL4 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | ACTB | 16/16 | 0/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |
| | GPD1 | 16/16 | 0/16 | 8/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 4/16 | 4/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 | 0/16 |

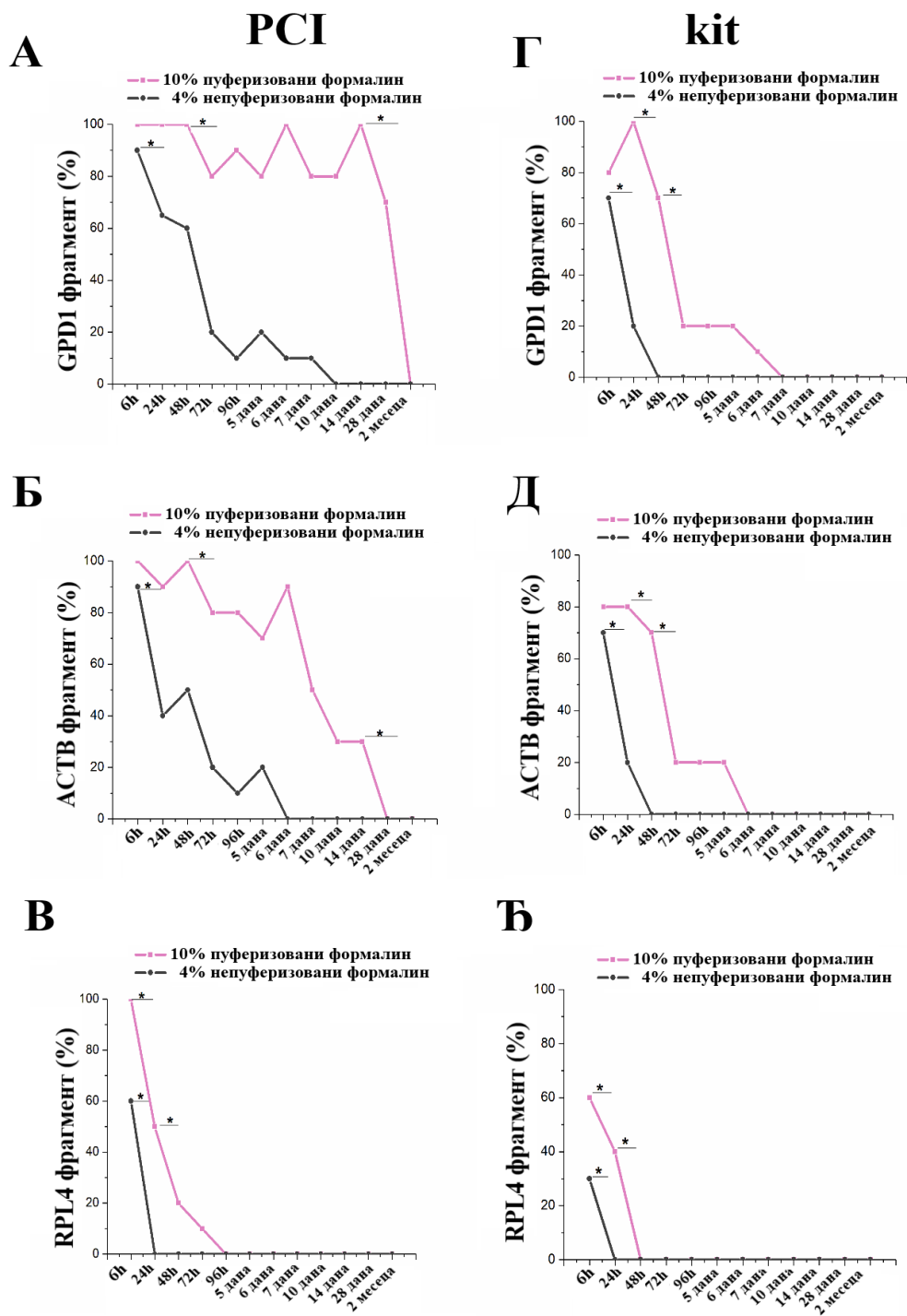
RPL4 

ACTB 

GPD1 

Најкраћи фрагмент ДНК дужине 150 bp (GPD1 ген) је амплификован у узорцима ДНК изоловане из ткива јетре, мозга, плућа и бубрега које је фиксирано у 10% пуферизованом формалину до 28 дана, а из ткива срца до 14 дана фиксирања. Када су ткива фиксирана у 4% непуферизованом формалину, ампликони дужине 150 bp детектовани су у узорцима ДНК изолованим из бубрега који је фиксиран у формалину до 7 дана, док су у узорцима ДНК из срца ампликони дужине 150 bp детектовани само у узорцима фиксираним до 48h (**Табела 10**). Фрагмент дужине 262 bp (АСТВ ген) је амплификован у узорцима ДНК изоловане из ткива срца, мозга и плућа фиксираних у 10% пуферизованом формалину до 14 дана фиксирања, у узорцима ткива јетре до 10 дана и ткива бубрега до 6 дана фиксирања. У узорцима ткива која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину АСТВ ген је амплификован до 5 дана фиксирања, док је у узорцима из мозга амплификован само ако је фиксирање трајало до 6h (**Табела 10**). Најмања успешност амплификације је добијена за најдужи RPL4 ген (407 bp) који је амплификован у узорцима ДНК изоловане из ткива бубрега фиксираних у 10% пуферизованом формалину до 72h, срца и мозга до 48h, а јетре и плућа само до 24h (**Табела 10**). У узорцима ткива јетре, мозга, плућа и бубрега RPL4 ген је амплификован у узорцима ткива фиксираних до 6h у 4% непуферизованом формалину, док у узорцима из ткива срца RPL4 ген није уопште амплификован.

Успешност PCR амплификације најкраћег GPD1 гена (150 bp) у узорцима ДНК изоловане из ткива које је фиксирано у 10% пуферизованом формалину је временски зависна и креће се од 70% до 100% у првих 28 дана када је ДНК добијена помоћу PCI методе, док помоћу кита је мања и креће се од 10% до 100% у првих 6 дана (**Графикон 9А, 9Г**). Након два месеца фиксирања ткива у 10% пуферизованом формалину на изолованој ДНК се не може амплификовати ни један од жељених гена, па ни GPD1, користећи обе методе за изоловање ДНК. Успешност PCR амплификације АСТВ гена дужине 262 bp је од 30% до 100% до 14 дана фиксирања користећи PCI методу за изоловање ДНК, док користећи кит се креће од 20% до 80% до 5 дана фиксирања ткива у 10% пуферизованом формалину (**Графикон 9Б, 9Д**). Успех PCR амплификације најдужег RPL4 гена (407 bp) је била од 10% до 100% за прва 72h користећи PCI методу за изоловање ДНК, док користећи кит је била од 40% до 60%, али само прва 24h за ткива која су фиксирана у 10% пуферизованом формалину (**Графикон 9В, 9Ђ**). Успешност PCR амплификације GPD1 гена на ДНК изолованој из ткива која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину различит временски период се креће од 10% до 90% све до 7 дана фиксирања ткива када је коришћена PCI метода за изоловање ДНК, а употребом кита од 20% до 70% у прва 24h (**Графикон 9А, 9Г**). Користећи PCI методу за изоловање ДНК успех PCR амплификације АСТВ гена се кретао од 10% до 90% у првих 5 дана, а употребом кита од 20% до 70% у прва 24h фиксирања ткива у 4% непуферизованом формалину (**Графикон 9Б, 9Д**). RPL4 ген је амплификован до 60% користећи PCI методу за изоловање ДНК и до 30% користећи кит и то само у првих 6h фиксирања ткива у 4% непуферизованом формалину (**Графикон 9В, 9Ђ**). Статистички значајан пад у интегритету молекула ДНК показан је између узорка ДНК изоловане из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину и то између 24h и 48h ($p < 0,05$), између 48h и 72h ($p < 0,05$), као и између 28 дана и 2 месеца ($p < 0,05$). У ткивима која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину статистички значајна разлика у интегритету ДНК се уочава већ између 6h и 24h ($p < 0,05$).



Графикон 9. Успешност PCR амплификације жељених фрагмената: GPD1 (А, Г), ACTB (Б, Д) и RPL4 (В, Ђ) гена у узорцима ДНК изолованих коришћењем PCI методе (А, Б, В) и кита (Г, Д, Ђ) из ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега фиксираних у 10% пуферизованом или 4% непуферизованом формалину 6h, 24h, 48h, 72h, 96h, 5 дана, 6 дана, 7 дана, 10 дана, 14 дана, 28 дана и 2 месеца.

* статистички значајна разлика $p < 0,05$

4.3. КВАЛИТЕТ ДНК ИЗОЛОВАНЕ ИЗ ТКИВА УКАЛУПЉЕНИХ У ПАРАФИНСКЕ БЛОКОВЕ

4.3.1. Чистоћа и принос ДНК изоловане из ткива укалупљених у парафинске блокове

Чистоћа и принос ДНК одређени су у изолатима из ткива срца, јетре и мозга која су након судскомедицинске обдукције фиксирана у 4% непуферизованом формалину, укалупљена у парафинске блокове и архивирана у архиви Службе за судску медицину и токсикологију УКЦ Крагујевац. Циљ је да одредимо у којој мери чистоћа и принос ДНК зависе од методе која се користи за изоловање ДНК, врсте ткива из ког је ДНК изолована, као и од дужине архивирања ткива укалупљених у парафинске блокове.

4.3.1.1. Утицај методе за изоловање ДНК из укалупљених ткива на чистоћу и принос изоловане ДНК

У Табели 11 су приказане средње вредности чистоће и приноса ДНК изоловане из укалупљених ткива коришћењем две методе: екстракцијом помоћу РСИ или употребом кита.

Табела 11. Чистоћа и принос ДНК изоловане помоћу РСИ методе или употребом кита из ткива укалупљених у парафинске блокове. Резултати су представљени као средња вредност (*S.V.*) ± стандардна девијација (*S.D.*).

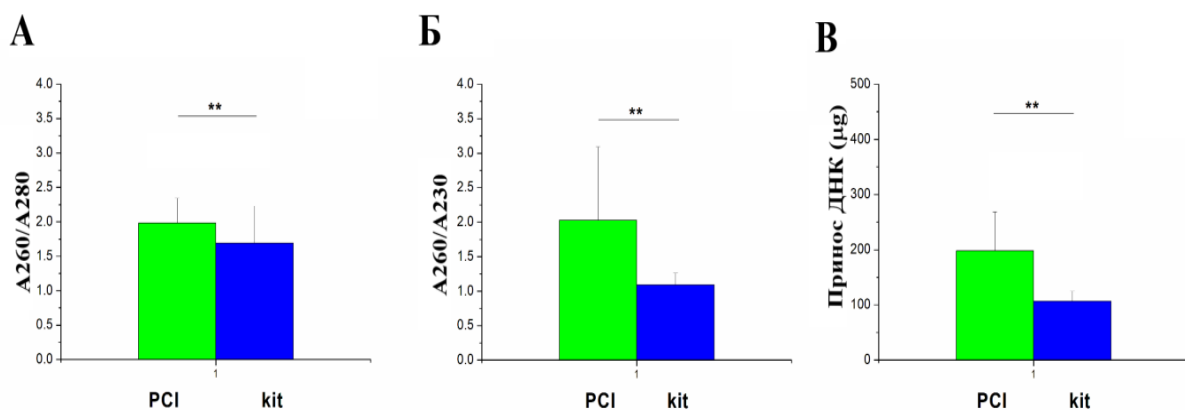
| Метода | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|----------|-----------|-----------|----------------|--------------|
| | | | S.V.±S.D. | опсег |
| РСИ | 1,98±0,36 | 2,03±1,06 | 197,94 ± 70,62 | 71,30-636,30 |
| Кит | 1,69±0,54 | 1,09±0,17 | 106,81 ± 17,81 | 57,50-137,50 |
| <i>p</i> | <0,01** | <0,01** | <0,01** | |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

Резултати показују да и чистоћа и принос ДНК зависе од употребљене методе за изоловање ДНК. Однос апсорбанци A260/A280 је у опсегу 1,69-1,98 и указује да је у

узорцима ДНК присутна мала количина протеина. Бољи однос, односно чистији узорци су добијени када је ДНК изолована екстракцијом помоћу РСИ него помоћу кита и ова разлика је статистички веома значајна ($p < 0,01$) (**Графикон 10А**). Однос апсорбанци А260/А230, који указује на присуство соли, липида и растварача у изолатима, износи 2,03 и у границама је оптималних вредности (1,7-2,2) за узорке у којима је ДНК изолована РСИ методом. Међутим, за узорке у којима је ДНК изолована помоћу кита вредности односа А260/А230 су значајно ниже од оптималних вредности, што указује на присуство велике концентрације соли, липида и растварача у овим изолатима. Вредности односа апсорбанци А260/А230 су више у узорцима ДНК изолованих РСИ методом у односу на узорке ДНК добијених помоћу кита и ова разлика је статистички веома значајна ($p < 0,01$) (**Графикон 10Б**).

Принос ДНК је већи у узорцима у којима је ДНК изолована РСИ методом у односу на узорке у којима је ДНК изолована помоћу кита и ова разлика у приносу између две методе за изоловање ДНК је статистички веома значајна ($p < 0,01$) (**Графикон 10В**).



Графикон 10. Утицај методе за изоловање ДНК на чистоћу (А, Б) и принос (В) ДНК у узорцима добијеним из ткива укалупљених у парафинске блокове. Резултати су представљени као средња вредност ($S.V.$) \pm стандардна девијација ($S.D.$).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.3.1.2. Утицај врсте ткива укалупљених у парафинске блокове на чистоћу и принос изоловане ДНК

Пошто је добијена статистички значајна разлика у чистоћи и приносу ДНК између узорака у којима је она изолована РСИ методом и узорака у којима је ДНК изолована помоћу кита, пратили смо чистоћу и принос ДНК у изолатима из појединачних укалупљених ткива (срца, јетре и мозга) у односу на методу којом је ДНК изолована из тих ткива.

Табела 12. Чистоћа и принос ДНК изоловане из различитих укалупљених ткива (срце, јетра, мозак) коришћењем две методе за изоловање ДНК: екстракцијом помоћу РСИ методе и кита. Резултати су представљени као средња вредност (*S.V.*) ± стандардна девијација (*S.D.*).

| Метода | Врста ткива | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|----------|-------------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| | | | | S.V.±S.D. | опсег |
| РСИ | срце | 1,96±0,38 | 1,80±1,05 | 166,36±53,37 | 88,80-386,3 |
| | јетра | 2,05±0,33 | 2,67±1,33 | 272,96±118,30 | 107,50-636,31 |
| | мозак | 1,92±0,38 | 1,63±0,82 | 154,50±40,19 | 71,34-293,81 |
| <i>p</i> | | >0,05 | <0,01** | <0,01** | |
| Кит | срце | 1,66±0,54 | 1,10±0,17 | 108,35±17,37 | 58,82-130,01 |
| | јетра | 1,7±0,54 | 1,09±0,16 | 106,12±17,63 | 57,49-137,50 |
| | мозак | 1,7±0,53 | 1,08±0,18 | 105,96±18,42 | 57,48-132,50 |
| <i>p</i> | | >0,05 | >0,05 | >0,05 | |

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

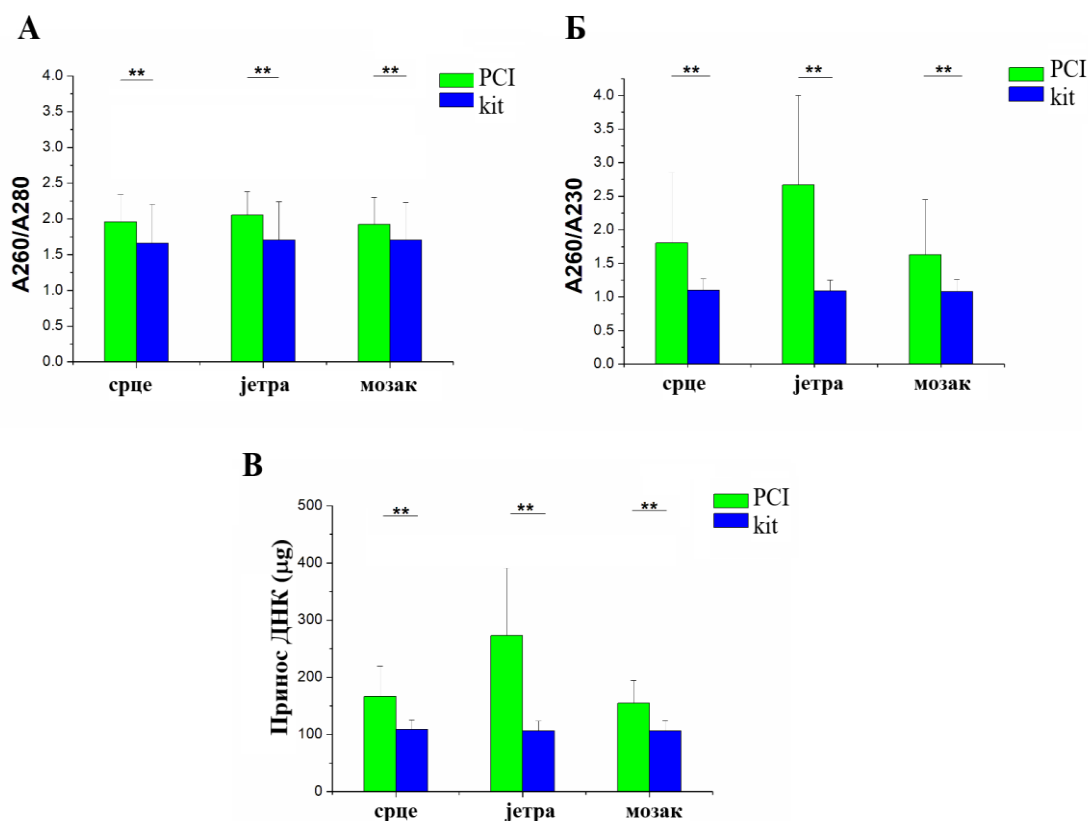
Вредности односа апсорбанци A260/A280 као и односа апсорбанци A260/A230 свих узорак ДНК која је изолована из различитих ткива екстракцијом помоћу РСИ методе крећу се у оптималном опсегу и указују на задовољавајућу чистоћу узорак ДНК (Табела 12). Ниже вредности односа апсорбанци A260/A280 и A260/A230 добијене су у узорцима ДНК изоловане помоћу кита. Вредности односа апсорбанци A260/A230 у узорцима ДНК изоловане помоћу кита су ниже од оптималних вредности, што указује на велику концентрацију соли, липида и растварача у овим узорцима.

Статистичком обрадом података је утврђено да нема статистички значајне разлике у односу A260/A280 између узорак ДНК изоловане из различитих укалупљених ткива (срца, јетре или мозга) помоћу РСИ методе ($p > 0,05$). Не постоји ни статистички значајна разлика у односу A260/A280 између различитих ткива (срца, јетре или мозга) када је ДНК изолована помоћу кита ($p > 0,05$) (Табела 12). Међутим, када упоредимо вредности односа A260/A280 у узорцима ДНК изоловане помоћу РСИ методе са вредностима у узорцима у којима је ДНК изолована помоћу кита, за три различита ткива је утврђено да постоји статистички веома значајна разлика ($p < 0,01$) (Графикон 11А). *Post hoc* тестирањем је утврђена разлика у односу апсорбанци A260/A280 ДНК изоловане из истих ткива различитим методама, при чему су узорци ДНК изоловани помоћу РСИ методе чистији од узорак ДНК изоловане помоћу кита (Графикон 11А).

Вредности односа A260/A230 за узорке ДНК изоловане помоћу РСИ методе из различитих ткива је различита. Постоји статистички веома значајна разлика између појединих ткива (срца, јетре и мозга) у чистоћи узорак ДНК изоловане РСИ методом ($p < 0,01$). Узорци ДНК који су изоловани из јетре су најчистији (највећа вредност односа A260/A230 је 2,05±0,33), а статистички веома значајна разлика у чистоћи постоји између узорак из ткива срца и јетре, као и јетре и мозга ($p < 0,01$) (Табела 12). У узорцима ДНК изоловане из укалупљених ткива срца, јетре и мозга помоћу кита не постоји статистички значајна разлика у чистоћи (тј. односу A260/A230) између

појединих ткива ($p > 0,05$) (Табела 12). Поређењем вредности односа A260/A230 у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе у односу на кит из три различита ткива утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика у чистоћи узорака у односу на примењену методу ($p < 0,01$) (Графикон 11Б). *Post hoc* тестирањем је утврђена разлика у чистоћи ДНК изоловане из истих ткива различитим методама ($p < 0,01$), при чему су узорци ДНК изоловани помоћу PCI методе чистији од узорака ДНК изоловане помоћу кита (Графикон 11Б).

Разлика у приносу ДНК изоловане PCI методом из ткива срца, јетре и мозга је статистички веома значајна између појединих ткива ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем је утврђена разлика у приносу између узорака ДНК изоловане из ткива срца и јетре, као и јетре и мозга ($p < 0,01$) (Табела 12). Највећи принос је добијен из ткива јетре ($272,96 \pm 118,3 \mu\text{g}$ ДНК), а најмањи из ткива мозга ($154,5 \pm 40,19 \mu\text{g}$ ДНК). За узорке ДНК изоловане помоћу кита из укалупљених ткива срца, јетра и мозга не постоји статистички значајна разлика у приносу ДНК између различитих ткива ($p > 0,05$) (Табела 12). Када упоредимо принос ДНК изоловане помоћу PCI методе у односу на кит из три различита укалупљена ткива видимо да постоји статистички веома значајна разлика између ткива у зависности од примењене методе за изоловање ДНК ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем је утврђена разлика у приносу ДНК изоловане из истих ткива различитим методама за изоловање ДНК ($p < 0,01$), при чему је принос ДНК већи у узорцима изолованих помоћу PCI методе од приноса ДНК узорака изолованих помоћу кита (Графикон 11В).



Графикон 11. Утицај врсте ткива (срце, јетра и мозак) на чистоћу (А, Б) и принос (В) ДНК изоловане помоћу PCI методе или кита. Резултати су представљени као средња вредност ($S.V.$) \pm стандардна девијација ($S.D.$).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.3.1.3. Утицај дужине чувања ткива укалупљених у парафинске блокове на чистоћу и принос изоловане ДНК

Чистоћа и принос ДНК изоловане РСИ методом или помоћу кита из ткива која су укалупљена у парафинске блокове и архивирана до 30 година приказани су у **Табели 13**. Контролни узорци представљају ДНК изоловану из ткива одмах након обдукције, без фиксирања у формалину и калупљења у парафинске блокове.

Вредности односа апсорбанци А260/А280 и А260/А230 се не разликују у контролним и узорцима ДНК из укалупљених ткива (**Табела 13**).

Табела 13. Чистоћа и принос ДНК изоловане помоћу РСИ методе или кита из ткива које је фиксирано у формалину и укалупљено у парафинске блокове и архивирано до 30 година. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| Старост парафинских блокова | Метода | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| | | | | S.V.±S.D. | опсег |
| Контрола | РСИ | 2,26±0,04 | 2,21±0,88 | 420,83±282,75 | 197,52-738,75 |
| До 1 год. | | 2,20±0,33 | 1,92±0,71 | 209,35±90,88 | 120,00-423,75 |
| 2-6 год. | | 1,92±0,46 | 1,64±0,85 | 171,51±106,89 | 71,25-636,25 |
| 7-11 год. | | 1,89±0,56 | 2,27±2,08 | 213,31±100,03 | 105,00-561,25 |
| 12-16 год. | | 1,98±0,25 | 2,02±0,81 | 213,31±100,03 | 105,00-561,25 |
| 17-21 год. | | 1,97±0,19 | 1,80±0,69 | 187,32±82,26 | 100,00-487,50 |
| 22-26 год. | | 2,08±0,10 | 2,30±0,56 | 249,86±69,16 | 165,00-448,75 |
| 27-30 год. | | 2,06±0,10 | 2,35±0,72 | 256,16±91,91 | 165,00-576,25 |
| Контрола | | Кит | 2,06±0,73 | 1,34±0,28 | 133,75±29,24 |
| До 1 год. | 1,75±0,68 | | 1,16±0,02 | 116,73±2,67 | 113,75-125,00 |
| 2-6 год. | 1,78±0,54 | | 1,00±0,22 | 98,43±23,17 | 57,50-132,50 |
| 7-11 год. | 1,89±0,42 | | 1,15±0,06 | 112,80±6,24 | 101,25-130,00 |
| 12-16 год. | 1,84±0,51 | | 1,14±0,11 | 110,54±12,86 | 57,50-137,50 |
| 17-21 год. | 1,74±0,60 | | 1,15±0,10 | 113,65±10,67 | 97,51-130,00 |
| 22-26 год. | 1,75±0,47 | | 1,01±0,24 | 94,81±20,44 | 62,49-113,75 |
| 27-30 год. | 1,77±0,62 | | 1,15±0,07 | 112,02±17,92 | 57,51-130,00 |

Резултати показују да су вредности односа A260/A280 у опсегу од 1,74-2,26 што указује на добру чистоћу узорака ДНК изолованих како из контролних тако и из укалупљених ткива, без обзира на дужину архивирања парафинских блокова ткива. Мало више вредности односа A260/A280 су добијене у узорцима ДНК изолованих РСI методом у односу на узорке у којима је ДНК изолована помоћу кита, али све добијене вредности указују на малу количину протеина у изолатима (**Табела 13**).

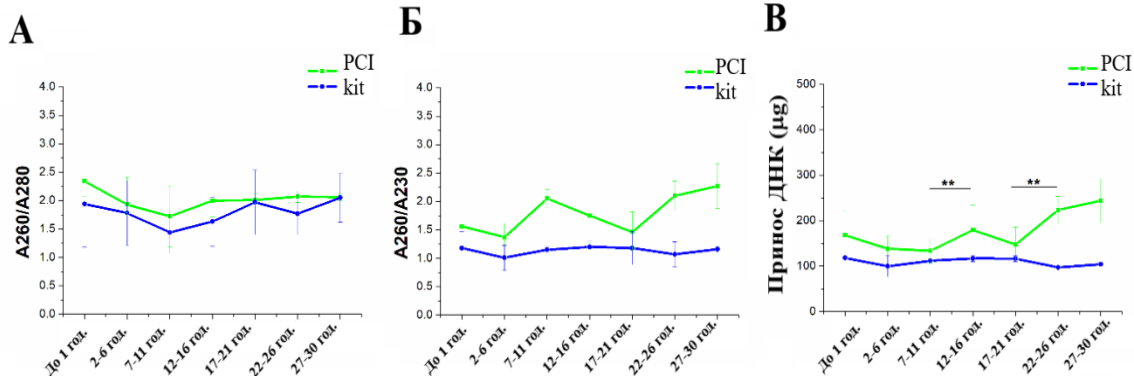
Однос апсорбанци A260/A230, који указује на присуство соли, липида и растварача у узорцима ДНК изоловане РСI методом из укалупљених ткива старих до 30 година креће се у опсегу 1,64-2,35, што указује на малу концентрацију ових материја у изолатима. Међутим, у узорцима ДНК изолованих из истих ткива помоћу кита, концентрација соли, липида и растварача је већа, на шта указује значајно нижи однос апсорбанци A260/A230 који је у опсегу 1,00-1,34 (**Табела 13**).

Принос ДНК у изолатима из контролних ткива је значајно већи од приноса у узорцима добијеним из укалупљених ткива, без обзира на дужину архивирања парафинских блокова ткива и без обзира на методу која је коришћена за изоловање ДНК. Међутим, ако упоредимо принос ДНК који је добијен из ткива укалупљених у парафинске блокове до 30 година из којих је ДНК изолована РСI методом са приносом из истих ткива, али када је ДНК изолована помоћу кита, принос ДНК је двоструко већи у узорцима у којима је ДНК изолована РСI методом (**Табела 13**).

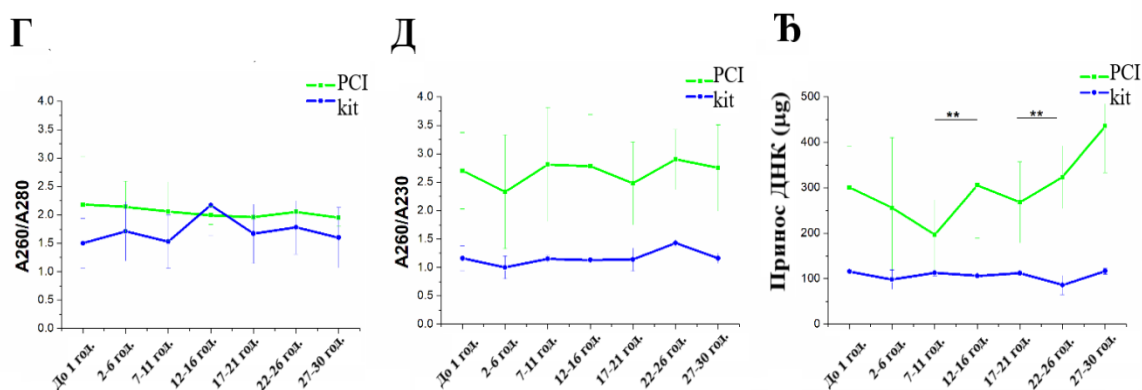
Анализом чистоће појединачних узорака ДНК изоловане из ткива срца (**Графикон 12А, 12Б**), јетре (**Графикон 12Г, 12Д**) и мозга (**Графикон 12Е, 12Ж**) укалупљених у парафинске блокове и архивираних до 30 година, показано је да се вредности односа апсорбанци A260/A280 као и A260/A230 крећу у опсегу који указује на задовољавајућу концентрацију протеина, као и концентрацију соли, липида и растварача у узорцима свих анализираних ткива, и да не постоји статистички значајна разлика у вредностима односа апсорбанци између суседних временских тачака независно од примењене методе за изоловање ДНК ($p > 0,05$).

Статистичком обрадом података о приносу ДНК изоловане РСI методом из укалупљених ткива срца, јетре и мозга, архивираних до 30 година, утврђено је да постоји статистички значајно повећање у приносу ДНК са продужењем времена архивирања узорака, почев од 7 година (**Графикон 12В, 12Ђ, 12З**). *Post hoc* тестирањем је утврђено да постоји статистички веома значајна разлика у приносу ДНК изоловане из укалупљених ткива срца и јетре старих 7-11 година и 12-16 година ($p < 0,01$), као и 17-21 и 22-26 година ($p < 0,01$), док у ткиву мозга статистички веома значајна разлика у приносу је детектована између ткива старости 17-21 и 22-26 година ($p < 0,01$).

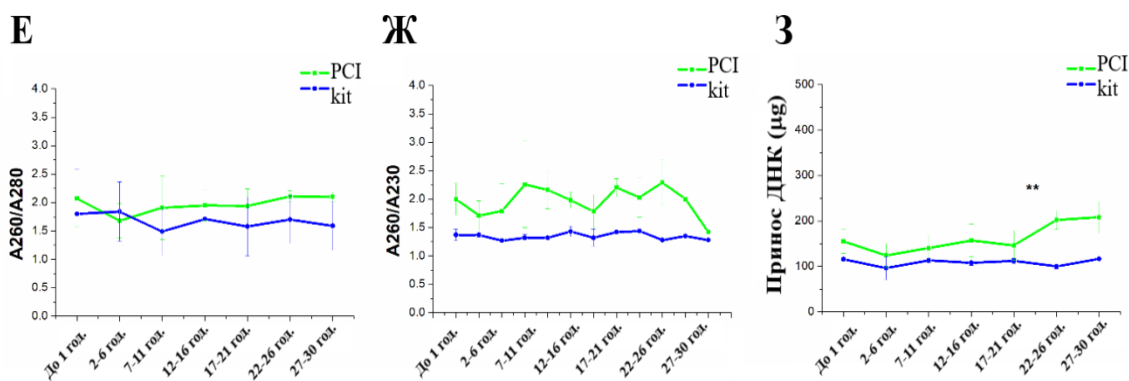
Срце



Јетра



Мозак



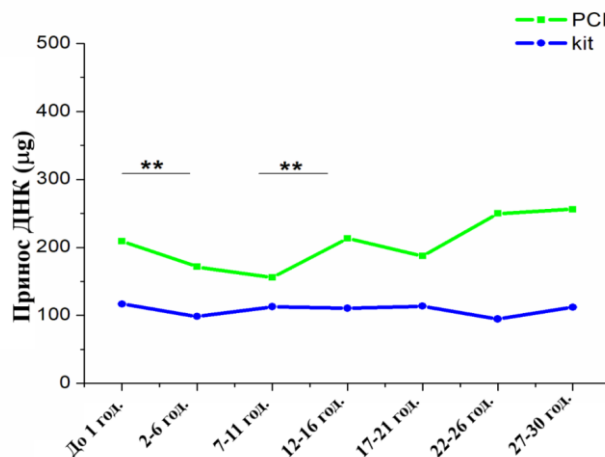
Графикон 12. Утицај дужине архивирања ткива у парафину на чистоћу (однос A260/A280: А, Г, Е и однос A260/A230: Б, Д, Ж) и принос (В, Ђ, З) ДНК изоловане из ткива срца (А, Б, В), јетре (Г, Д, Ђ) и мозга (Е, Ж, З). Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

**статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

Анализом вредности приноса ДНК изоловане помоћу PCI методе за сва ткива заједно утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика у приносу ДНК у зависности од дужине архивирања парафинских блокова ткива ($p < 0,01$). Поређењем различитих временских интервала појединачно, користећи *Post hoc* тестирање утврђена је разлика у приносу између следећих временских интервала: између парафинских

блокова старости до 1 године и старости 2-6 година ($p < 0,01$), као и између парафинских блокова старости 7-11 година и 12-16 година ($p < 0,01$) (**Графикон 13**).

Поређењем различитих временских интервала појединачно, *Post hoc* тестирањем је показано да у узорцима ДНК изолованих помоћу кита из укалупљених ткива старих до 30 година не долази до статистички значајних промена у приносу ДНК током 30 година архивирања укалупљених ткива ($p > 0,05$) (**Графикон 13**).



Графикон 13. Средње вредности приноса ДНК изоловане помоћу PCI методе и кита из ткива срца, јетре и мозга укалупљених у парафинске блокове и архивираних до 30 година. Резултати су представљени као средња вредност (*S.V.*) ± стандардна девијација (*S.D.*).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

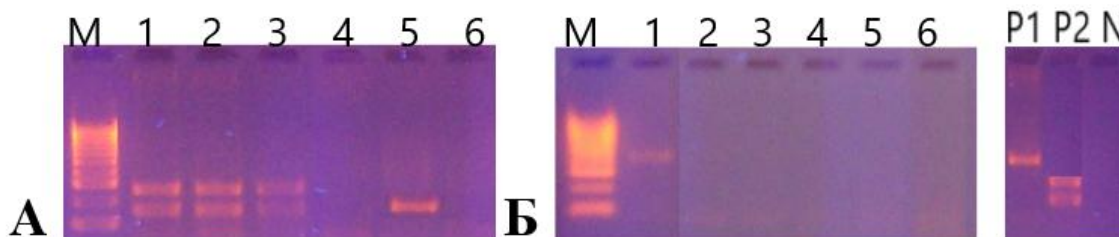
4.3.2. Интегритет ДНК изоловане из ткива укалупљених у парафинске блокове

Интегритет молекула ДНК одређен је у узорцима изолованим из ткива срца, јетре и мозга која су након судскомедицинске обдукције фиксирана, укалупљена у парафински блок и архивирани до 30 година. Степен фрагментације ДНК провераван је амплификацијом три жељена фрагмента различите дужине (150 bp, 262 bp и 407 bp) и провером успешности амплификације електрофорезом у 2% агарозном гелу обојеном EtBr.

4.3.2.1. Утицај методе за изоловање ДНК из укалупљених ткива на интегритет ДНК

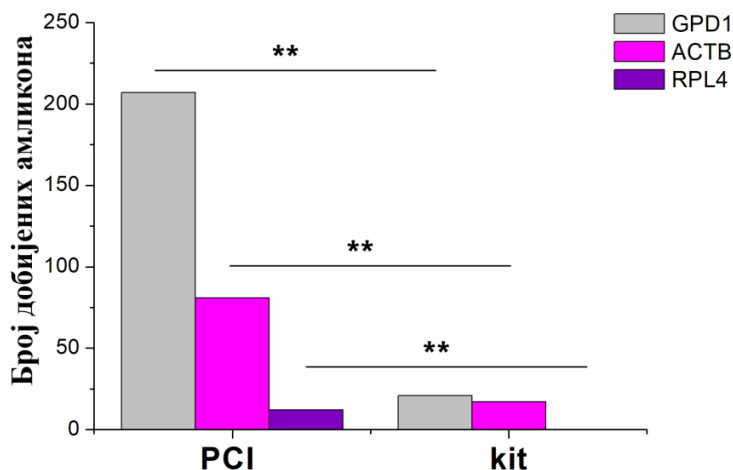
Интегритет изоловане ДНК из ткива које је укалупљено у парафинске блокове до 30 година уназад зависи од методе која се користи за изоловање ДНК.

Провером успешности PCR амплификације фрагмената ДНК електрофорезом на 2% агарозном гелу показано је да је интензитет трака (ампликона) значајно јачи у узорцима ДНК изолованих из ткива коришћењем PCI методе у односу на узорке добијене изоловањем помоћу кита (Слика 13).



Слика 13. Провера успешности PCR амплификације *GPD1* и *ACTB* (A) и *RPL4* (B) gena у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе (узорци 1, 3 и 5) или кита (узорци 2, 4 и 6) из укалупљених ткива архивираних годину дана (узорци 1 и 2), 6 година (узорци 3 и 4) и 12 година (узорци 5 и 6). Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 µg/ml). M – ДНК маркер (100 bp). P1 - позитивни контрола за *RPL4* ген; P2 - позитивна контрола за *GPD1* и *ACTB* гене; N - негативна контрола.

Постоји статистички веома значајна разлика у успешности амплификације одређеног жељеног фрагмента у зависности да ли је ДНК изолована PCI методом или помоћу кита ($p < 0,01$). Већи успех амплификације за сва три анализирана gena је добијен за узорке ДНК која је изолована помоћу PCI методе у односу на кит (Графикон 14). Највећа успешност амплификације добијена је за најкраћи *GPD1* ген, а најмања успешност је добијена за најдужи *RPL4* ген, употребом обе методе за изоловање ДНК.



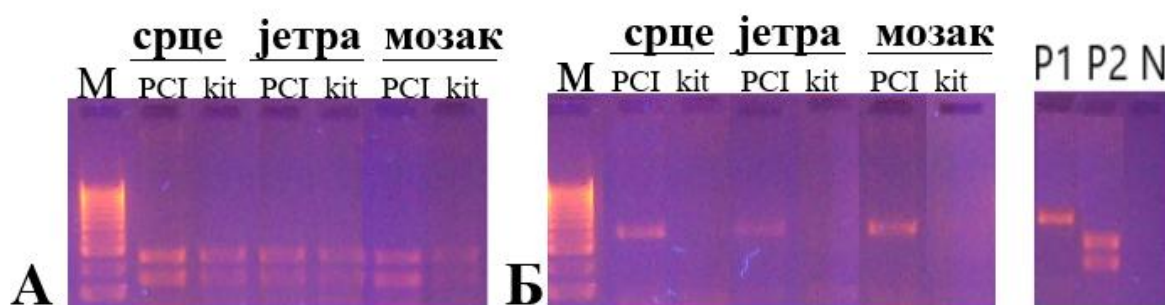
Графикон 14. Успешност PCR амплификације фрагмената ДНК изолованих из укалупљених ткива коришћењем PCI методе или кита. Дужина умножених фрагмената ДНК је 150 bp (*GPD1* ген), 262 bp (*ACTB* ген) и 407 bp (*RPL4* ген).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.3.2.2. Утицај врсте укалупљеног ткива на интегритет молекула ДНК

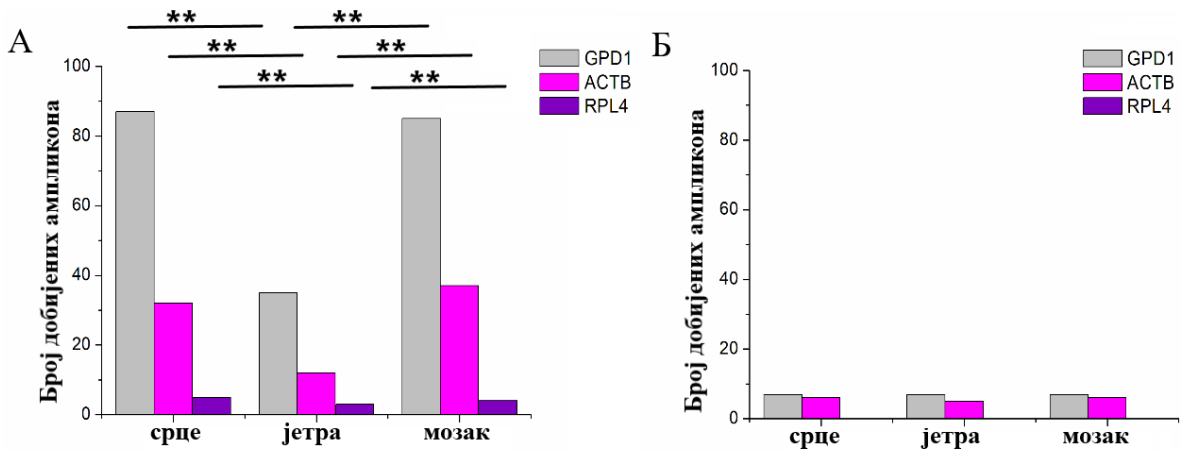
Молекула ДНК је изолован, коришћењем PCI методе или кита, из укалупљених ткива срца, јетре и мозга, архивираних до 30 година.

Провером успешности PCR амплификације фрагмената ДНК електрофорезом на 2% агарозном гелу који је обојен EtBr показано је присуство жељених ампликона у свим узорцима ткива (Слика 14). Интензитет трака за одговарајући фрагмент (амликон) на агарозном гелу је сличан за све узорке ДНК изоловане из три различита ткива. У свим узорцима у којима је ДНК изолована помоћу PCI методе интензитет трака је јачи у односу на интензитет трака из узорака ДНК изоловане помоћу кита (Слика 14).



Слика 14. Провера успешности PCR амплификације *GPD1* и *ACTB* гена (дуплекс PCR) (A) и *RPL4* гена (B) у узорцима ДНК изоловане из укалупљених ткива срца, јетре и мозга, из којих је ДНК изолована PCI методом или помоћу кита. Резултати амплификације анализирају се на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$). M – ДНК маркер (100 bp); P1 - позитивна контрола за *RPL4* ген; P2 - позитивна контрола за *GPD1* и *ACTB* гене; N - негативна контрола.

Анализирајући разлике у успеху PCR амплификације жељених фрагмената у узорцима ДНК изоловане PCI методом из различитих укалупљених ткива (Графикон 15A) утврђено је да постоји статистички веома значајна разлика између ткива ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем је утврђено да је успешност амплификације статистички значајно већа у узорцима ДНК изоловане из укалупљених ткива срца и мозга у односу на ткиво јетре ($p < 0,01$), док статистички значајна разлика у успешности амплификације не постоји између ткива срца и мозга ($p > 0,05$). Значи, очуванији интегритет има ДНК која је изолована из ткива срца и мозга у односу на ДНК изоловану из ткива јетре. У највећем броју узорака амплификован је најкраћи фрагмент дужине 150 bp, а у најмањем броју најдужи фрагмент од 407 bp, што указује да је интегритет молекула ДНК различит у различитим ткивима укалупљених у парафинске блокове. У узорцима ДНК изоловане из укалупљених ткива помоћу кита не постоји статистички значајна разлика ($p > 0,05$) у погледу интегритета молекула ДНК између различитих ткива (Графикон 15B).



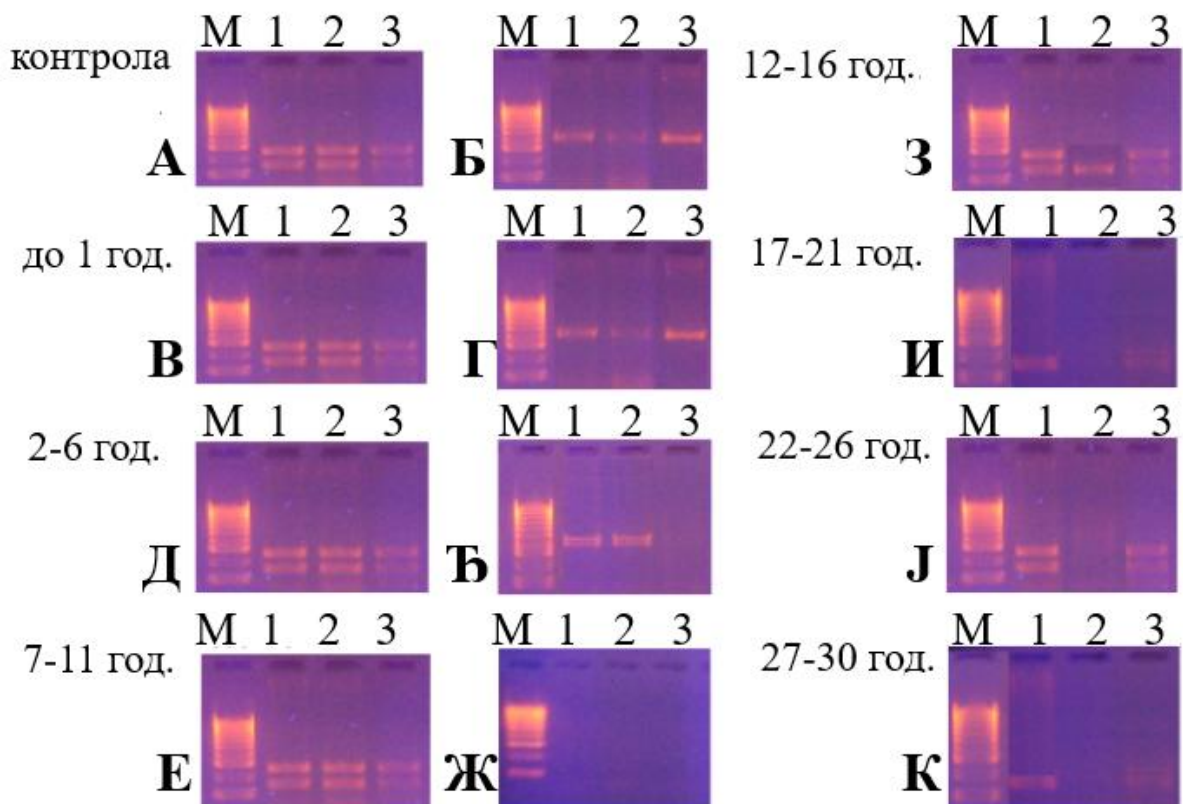
Графикон 15. Успешност PCR амплификације фрагмената ДНК изолованих из укалупљених ткива срца, јетре и мозга коришћењем PCI методе (А) или кита (Б). Дужина умножених фрагмената ДНК је 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.3.2.3. Утицај дужине архивирања укалупљеног ткива на интегритет молекула ДНК

Анализиран је интегритет молекула ДНК изоловане из ткива срца, јетре и мозга која су укалупљена у парафинске блокове и архивирани до 30 година (Слика 15). PCR су амплификовани жељени фрагменти ДНК дужине 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген) и анализирани на 2% агарозном гелу.

Интензитет добијених трака (ампликона) у агарозном гелу је временски завистан: у узорцима ДНК изолованих из укалупљених ткива која су дуже архивирана интензитет трака је слабији, а ампликони GPD1 гена се добијају чак и у узорцима ДНК изолованим из ткива која су била архивирана и 30 година (Слика 15). Успешност амплификације је много већа у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе у односу на кит. Ово се односи на амплификацију сва три жељена гена, за све временске тачке, у свим узорцима ткива.



Слика 15. Провера успешности PCR амплификације *GPD1*, *ACTB* (узорци А, В, Д, Е, З, И, Ј, К -duplex PCR) и *RPL4* (узорци Б, Г, Ђ, Ж) гена у узорцима ДНК изоловане PCI методом из укалупљених ткива срца (1), јетре (2) и мозга (3). Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 µg/ml). М – ДНК маркер (100 bp).

Резултати показују да постоји разлика у успешности амплификације сва три жељена гена у зависности од врсте укалупљеног ткива из кога је изолована ДНК, као и у зависности од дужине архивирања парафинских блокова ткива (**Табела 14**). Најкраћи фрагмент ДНК, *GPD1* ген се може амплификовати из узорка ДНК која је изолована из ткива срца и мозга архивираних до 30 година, а из ткива јетре архивираних до 16 година старости (**Табела 14**). Дужи фрагмент ДНК, *ACTB* ген је амплификован из узорка ДНК која је изолована из ткива срца и мозга која су укалупљена у парафинске блокове и архивирани до 26 година, а из укалупљеног ткива јетре архивираних до 11 година. Најдужи фрагмент ДНК, *RPL4* ген је амплификован из узорка ДНК која је изолована из свих анализираних укалупљених ткива која су архивирани само до 1 године. После тог периода амплификација *RPL4* гена је била могућа у узорцима ДНК која је изолована из укалупљеног ткива срца и јетре, али не и из ткива мозга. После 7 година архивирања парафинских блокова ткива није више било могуће амплификовати *RPL4* ген ни из једног узорка ДНК која је изолована из ових укалупљених ткива (**Табела 14**).

Табела 14. Број амплификованих фрагмената ДНК у узорцима изолованим из различитих укалупљених ткива архивираних до 30 година.

| | | До 1 год. | 2-6 год. | 7-11 год. | 12-16 год. | 17-21 год. | 22-26 год. | 27-30 год. |
|-------|------|-----------|----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| Срце | | | | | | | | |
| | RPL4 | 8/14 | 2/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/48 |
| | ACTB | 14/14 | 22/60 | 14/60 | 6/60 | 0/60 | 8/60 | 0/48 |
| | GPD1 | 14/14 | 46/60 | 36/60 | 28/60 | 14/60 | 24/60 | 10/48 |
| Јетра | | | | | | | | |
| | RPL4 | 4/14 | 2/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/48 |
| | ACTB | 10/14 | 6/60 | 8/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/48 |
| | GPD1 | 10/14 | 30/60 | 22/60 | 8/60 | 0/60 | 0/60 | 0/48 |
| Мозак | | | | | | | | |
| | RPL4 | 8/14 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 | 0/60 |
| | ACTB | 14/14 | 36/60 | 18/60 | 2/60 | 0/60 | 4/60 | 0/48 |
| | GPD1 | 14/14 | 44/60 | 36/60 | 32/60 | 6/60 | 20/60 | 14/48 |

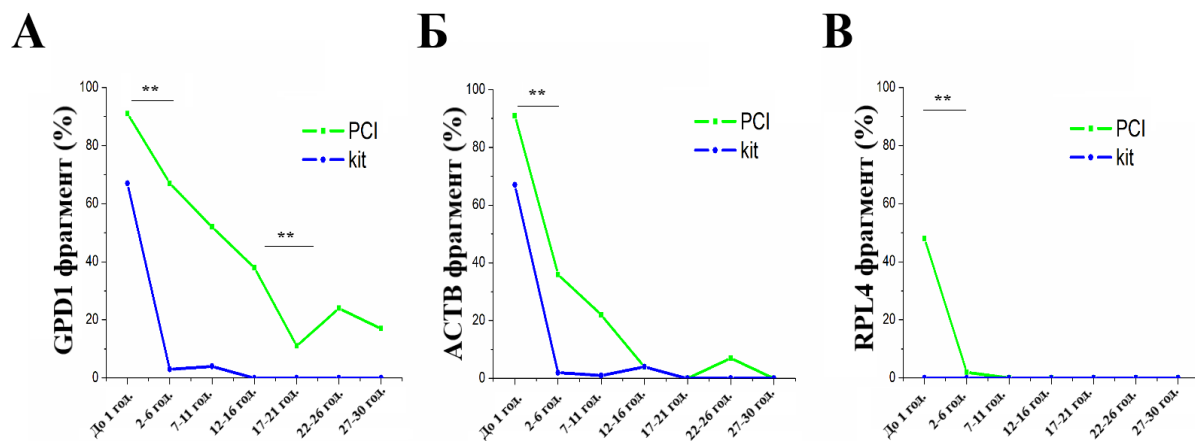
| | |
|------|---|
| RPL4 |  |
| ACTB |  |
| GPD1 |  |

Успешност PCR амплификације сва три жељена гена је временски зависна (**Графикон 16**): са порастом дужине трајања архивирања укалупљених ткива опада број ампликона одређеног фрагмента, односно интегритет молекула ДНК изоловане помоћу PCI методе из ових ткива је све лошији. Најкраћи фрагмент, GPD1 ген (**Графикон 16А**), је амплификован у узорцима ДНК изоловане из срца и мозга архивираних до 30 година. Успешност амплификације ових гена је од 20% до 100% у узорцима из ткива срца, односно од 30% до 100% у узорцима ДНК из ткива мозга. Међутим, GPD1 ген је амплификован у узорцима ДНК из ткива јетре које је архивирано до 16 година и то у 13% узорака. Дужи фрагмент, ACTB ген (**Графикон 16Б**), амплификован је у 13%-100% узорака ДНК из ткива срца архивираних од једне до 26 година, као и 7%-100% узорака ДНК изоловане из ткива мозга архивираних од једне до 26 година. Укалупљено ткиво јетре има најлошији интегритет ДНК: ACTB фрагмент је амплификован у 13%-71% узорака ДНК изоловане из јетре архивираних само до 11 година. Најдужи, RPL4 ген (**Графикон 16В**), је амплификован у свим узорцима ДНК изоловане из укалупљеног ткива срца, јетре и мозга која су архивирани до годину дана, а у 3% узорака архивираних до 6 година. Након тог временског периода RPL4 ген више није могао бити амплификован у овим узорцима. И у овом случају је показано да је ДНК из јетре највише деградована, јер је RPL4 ген амплификован само у 29% узорака ДНК изоловане из овог ткива након годину дана архивирања. У узорцима ДНК изоловане из укалупљеног ткива мозга које је било архивирано дуже од годину дана није дошло до амплификације RPL4 гена.

У узорцима ДНК изоловане из укалупљених ткива помоћу кита успешност амплификације жељених фрагмената је лошија него у узорцима ДНК изоловане помоћу PCI методе (**Графикон 16**). Краћи фрагменти, GPD1 и ACTB гени (**Графикон 16А,**

16Б), амплификовани су у 71% узорака ДНК изоловане из укалупљених ткива срца и мозга која су архивирана до годину дана, односно у само 3% узорака ових ткива архивираних до 11 година. Након тог периода архивирања укалупљених ткива у узорцима ДНК изоловане из њих ни један од ових гена више није могао бити амплификован. Користећи кит за изоловање ДНК из узорака укалупљених ткива срца, јетре и мозга и PCR у овим узорцима није амплификован RPL4 гена ни у једном ДНК узорку (**Графикон 16В**).

Резултати показују да постоји статистички веома значајна разлика између дужине архивирања парафинских блокова са ткивима и интегритета ДНК изоловане помоћу PCI методе ($p < 0,01$). *Post hoc* тестирањем је утврђено да након годину дана складиштења укалупљених ткива, интегритет ДНК опада у свим анализираним ткивима и тај пад у интегритету ДНК је статистички веома значајан ($p < 0,01$). Интегритет ДНК је очуван у укалупљеним ткивима архивираним наредних 15 година, након чега поново постоји статистички веома значајан пад у интегритету молекула ДНК ($p < 0,01$). Резултати добијени у узорцима ДНК изоловане из укалупљених ткива помоћу кита показују да такође постоји статистички веома значајна разлика између дужине архивирања укалупљених ткива и интегритета молекула ДНК ($p < 0,01$). Статистички значајан пад у интегритету молекула ДНК детектован је у узорцима ДНК изоловане помоћу кита из укалупљених ткива након годину дана архивирања, као и након 6 година архивирања. Дакле, што је дужи период архивирања укалупљених ткива, већи је степен фрагментације ДНК изоловане из њих, а на интегритет молекула ДНК изоловане из ових узорака утиче и метода која се користи за њено изоловање (**Графикон 16**).



Графикон 16. Успешност PCR амплификације жељених фрагмената: GPD1 (А), ACTB (Б) и RPL4 (В) у узорцима ДНК изолованих коришћењем PCI методе или кита из укалупљених ткива срца, јетре и мозга архивираних до 30 година.

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

4.4. ПОРЕЂЕЊЕ КВАЛИТЕТА ДНК ИЗОЛОВАНЕ ИЗ ТКИВА КОЈА СУ ФИКСИРАНА У ФОРМАЛИНУ И ТКИВА КОЈА СУ УКЛУПЉЕНА У ПАРАФИНСКЕ БЛОКОВЕ

У Табели 15 приказан је упоредни преглед чистоће и приноса ДНК изоловане помоћу РСI методе или кита из ткива срца, јетре и мозга одмах након обдукције (контроле), ткива која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину и ткива која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину, а затим укалупљена у парафинске блокове.

Табела 15. Чистоћа и принос ДНК изоловане РСI методом или помоћу кита из контролних ткива која нису фиксирана у формалину, из ткива која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину и ткива која су укалупљена у парафинске блокове. Резултати су представљени као средња вредност (S.V.) ± стандардна девијација (S.D.).

| | Метода | Врста ткива | A260/A280 | A260/A230 | Принос (µg) | |
|--|--------|-------------|-----------|-----------|---------------|---------------|
| | | | | | S.V.±S.D. | опсег |
| Контрола | РСI | срце | 2,25±0,28 | 2,07±0,23 | 197,50±83,26 | 114,24-280,76 |
| | | јетра | 2,30±0,37 | 1,75±0,28 | 738,75±228,54 | 510,21-967,29 |
| | | мозак | 2,21±0,34 | 2,27±0,25 | 326,25±120,7 | 205,88-446,62 |
| Ткиво фиксирано у 4% непуферизованом формалину | | срце | 2,18±0,35 | 1,73±0,24 | 155,13±27,37 | 103,75-215,00 |
| | | јетра | 1,93±0,29 | 1,97±0,87 | 300,17±110,27 | 137,50-527,50 |
| | | мозак | 1,98±0,32 | 1,95±0,44 | 172,45±38,28 | 115,00-235,00 |
| Ткиво укалупљено у парафински блок | | срце | 1,96±0,38 | 1,80±1,05 | 166,36±53,37 | 88,75-386,25 |
| | | јетра | 2,05±0,33 | 2,07±1,33 | 272,96±118,30 | 107,50-636,25 |
| | | мозак | 1,92±0,38 | 1,63±0,82 | 154,50±40,19 | 71,25-293,75 |
| Контрола | Кит | срце | 3,38±1,08 | 1,29±0,29 | 117,50±36,70 | 80,80-154,20 |
| | | јетра | 2,22±0,58 | 1,76±0,38 | 167,50±56,80 | 110,70-224,30 |
| | | мозак | 3,57±1,21 | 1,28±0,27 | 116,25±26,70 | 89,55-142,95 |
| Ткиво фиксирано у 4% непуферизованом формалину | | срце | 1,61±0,49 | 1,35±0,06 | 120,95±9,38 | 95,00-135,00 |
| | | јетра | 1,55±0,07 | 1,36±0,07 | 122,17±10,32 | 93,75-142,50 |
| | | мозак | 1,85±0,66 | 1,35±0,07 | 121,74±9,62 | 100,00-137,50 |
| Ткиво укалупљено у парафински блок | | срце | 1,66±0,54 | 1,10±0,17 | 108,35±17,37 | 58,75-130,00 |
| | | јетра | 1,70±0,54 | 1,09±0,16 | 106,11±17,63 | 57,52-137,50 |
| | | мозак | 1,70±0,53 | 1,08±0,18 | 105,96±18,41 | 57,50-132,50 |

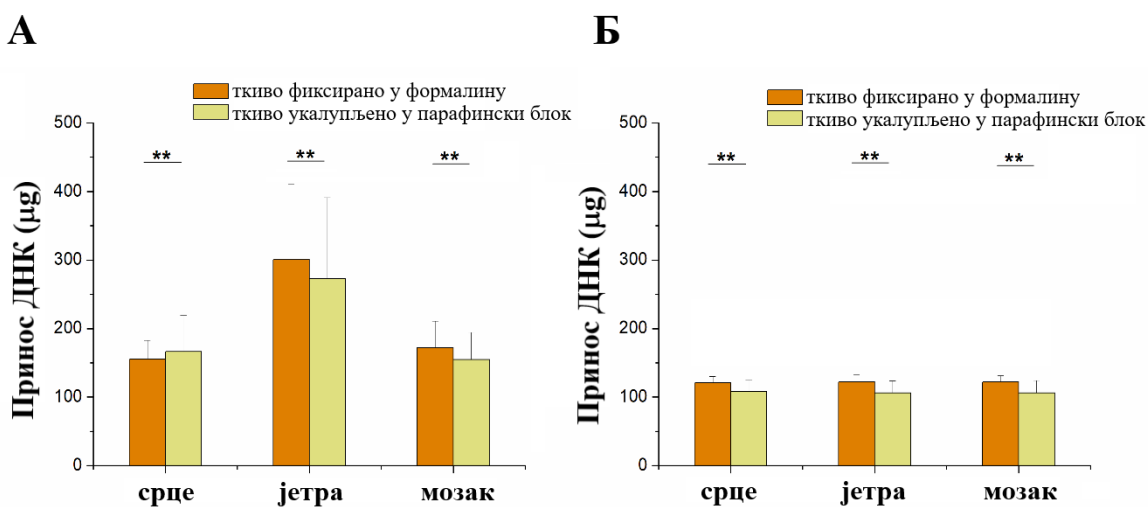
Резултати показују да нема статистички значајне разлике у вредностима односа апсорбанци A260/A280 и A260/A230 у узорцима ДНК изоловане помоћу РСI методе из контролних ткива, из ткива која су фиксирана у 4% непуферизованом формалину и

тквива које су након фиксирања у 4% непуферизованом формалину укалупљена у парафинске блокове. Чистоћа (однос A260/A280) узорака ДНК изоловане из истих ткива, али коришћењем кита је задовољавајућа и креће се у оптималном опсегу вредности. Међутим, однос A260/A230 је нижи у свим узорцима ДНК изоловане помоћу кита, што указује на присуство соли, липида и растварача у изолатима. Можемо да закључимо да на чистоћу узорака не утиче ни процес фиксирања ткива ни парафински блок, већ метода која је коришћена за изоловање ДНК.

Принос ДНК је највећи у узорцима ткива из којих је ДНК изолована одмах након обдукције (**Табела 15**). Највећи принос ДНК је из контролног ткива јетре. Принос ДНК је већи у узорцима ткива фиксираних у 4% непуферизованом формалину у односу на узорке ткива која су након фиксирања укалупљена у парафински блок. Ово се односи како на узорке ДНК изоловане помоћу РСI методе, тако и на оне изоловане помоћу кита.

Ако упоредимо сва ткива из којих је ДНК изолована помоћу РСI методе, принос је већи у ткивима која су само фиксирани у 4% непуферизованом формалину него у ткивима која су након фиксирања укалупљена у парафински блок. Ова разлика у приносу је статистички веома значајна ($p < 0,01$) (**Графикон 17А**).

Анализом ткива из којих је ДНК изолована помоћу кита показано је да је статистички значајно бољи принос ДНК изоловане из ткива која су фиксирани у 4% непуферизованом формалину него из укалупљених ткива ($p < 0,01$) (**Графикон 17Б**).

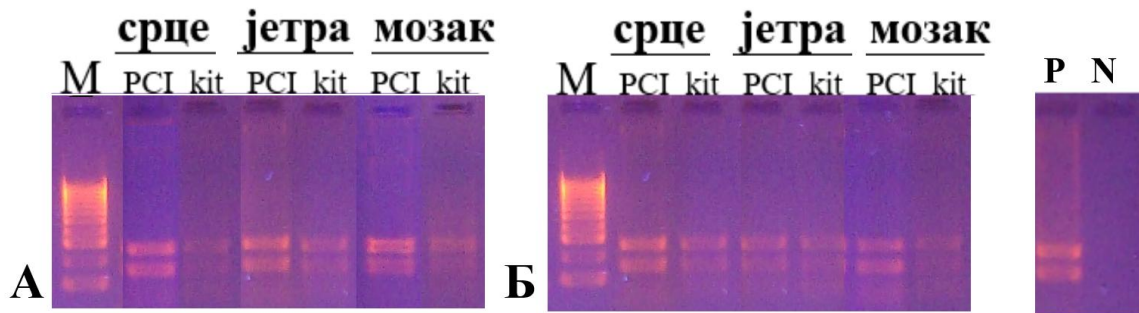


Графикон 17. Средње вредности чистоће и приноса ДНК изоловане помоћу РСI методе (А) и кита (Б) из ткива која су фиксирани у 4% непуферизованом формалину и ткива која су укалупљена у парафинске блокове. Резултати су представљени као средња вредност (*S.V.*) ± стандардна девијација (*S.D.*).

** статистички веома значајна разлика $p < 0,01$

Интензитет трака за одговарајући фрагмент (амликон) на агарозном гелу је сличан за узорке ДНК изоловане из ткива која су фиксирани у формалину и ткива која су након фиксирања укалупљена у парафинске блокове (**Слика 16**). У узорцима у којима је ДНК изолована из ткива која су фиксирани у формалину као и у узорцима

ДНК која је изолована из ткива која су укалупљена у парафинске блокове, интензитет трака је јачи ако је ДНК изолована помоћу PCI методе у односу на кит (Слика 16).



Слика 16. Провера успешности PCR амплификације *GPD1* и *ACTB* гена (дуплекс PCR) у узорцима ДНК изоловане из ткива срца, јетре и мозга фиксираних у формалину (А) и узорцима ДНК изоловане из ткива срца, јетре и мозга укалупљених у парафинске блокове (Б), из којих је ДНК изолована PCI методом или помоћу кита. Резултати амплификације анализирани су на 2% агарозном гелу обојеном EtBr (0,5 $\mu\text{g/ml}$). М – ДНК маркер (100 bp); P - позитивни контрола за *GPD1* и *ACTB* гена; N - негативна контрола.

5. ДИСКУСИЈА

Фиксирана и у парафину укалупљена људска ткива, која се деценијама рутински прикупљају на одељењима судске медицине и патологије широм света, представљају један од најдоступнијих материјала за молекуларну анализу и основа су савремене клиничке патолошке праксе (*Turashvili et al, 2012*). Око 25-30 милиона узорака људских ткива се годишње у Европи изузме, фиксира у формалину и калупи у парафинске блокове. Ови узорци укалупљених ткива представљају највеће доступне архиве људског материјала (*Stanta, 2011*). Ткиво које је фиксирано у формалину и укалупљено у парафинске блокове се користи пре свега у хистопатолошкој дијагностици. Међутим, у ретроспективним студијама и форензичким анализама укалупљена и архивирана ткива су често једини и последњи доступни материјал за даља молекуларна испитивања (*Reid et al, 2017*). Молекуларне анализе ткива изузетих током обдукција су све чешће, посебно у случајевима изненадне необјашњиве смрти, а њихов циљ је идентификовање генских мутација које могу бити одговорне за смрт. Такође, у случајевима насилне смрти, када починиоци, али и друге околности случаја нису откривени, молекуларна обдукција може дати одговоре на многа питања. Молекуларна обдукција подразумева извођење молекуларних тестова у форензичком окружењу како би се утврдио биолошки и генетички допринос болести и смрти (*Decorte and Cassiman, 1993*). Међутим, процес калупљења ткива подразумева примену различитих поступака и агенаса који доводе до оштећења молекула ДНК. То резултира екстракцијом јако фрагментисане ДНК променљивих приноса и чистоће, што накнадно смањује способност извођења молекуларних анализа. У литератури постоје подаци о истраживањима у којима су испитивана могућа побољшања различитих аспеката поступака екстракције и амплификације ДНК из фиксираних и укалупљених ткива како би она била употребљива за молекуларно биолошке анализе (*Shi et al, 2002; Santos et al, 2009*). Тип ткива, процес фиксирања, пост-фиксирајући процеси, поступак изоловања ДНК и амплификација жељених фрагмента су основни кораци у процесу калупљења ткива и молекуларне анализе где треба тражити и могућности за оптимизацију и добијање веће количине ДНК очуваног интегритета.

У Служби за судску медицину и токсикологију УКЦ у Крагујевцу, током рутинске судскомедицинске обдукције, изузимају се ткива мозга, срца и јетре, која се затим фиксирају у формалину, уграђују у парафинске блокове и чувају у архиви дуги низ година. Поред ових ткива, у неким случајевима, архивирају се и ткива плућа, бубрега и слезине. Циљ нашег рада је био да одредимо која су ткива најпогоднија за фиксирање у формалину и калупљење у парафински блок како би послужила као извор очуване ДНК за молекуларну анализу. Такође, оптимизација услова у процесу припреме калупа са ткивима, као и изоловање ДНК и амплификација жељених фрагмента, омогућиће нам стандардизацију протокола при формирању архиве ткива. У литератури не постоји довољан број података о оптималним условима фиксирања и калупљења здравих, људских ткива. Највећи број података се односи на туморска ткива која су изузета током биопсија. Такође, не постоје подаци о оптималној дужини фиксирања здравих ткива, као ни о дужини архивирања укалупљених ткива како би се из њих изоловала ДНК очуваног интегритета, погодна за молекуларну анализу.

Фиксирање је кључни корак у обради ткива изузетог током обдукције или биопсија (*Thavarajah et al, 2012*). Фиксирање у формалину обезбеђује очување ћелијске архитектуре, како би ткиво могло да уђе у даљу обраду (*Thavarajah et al, 2012*). Стварањем унакрсних веза између протеина, углавном између основних аминокиселина и аминокиселине лизин, омогућава стабилну морфологију ткива и чување дуги низ година (*Klopfleisch et al, 2011*). Фиксирана ткива се калупе у парафинске блокове и хистоморфолошки анализирају и архивирају. У овој студији су ткива срца, јетре, мозга плућа и бубрега фиксирана у пуферизованом и непуферизованом формалину и након бојења хематоксилином и еозином анализирана је морфологија ових ткива. Морфологија ткива је посматрана у односу на нуклеарне, цитоплазматске и детаље ћелијске мембране. Ткива са конгестијом, хеморагијом, аутолизом, некрозом, као и туморска ткива су искључена из ове студије. Након посматрања ткивних препарата под микроскопом уочено је да оба испитивана фиксатива након фиксирања ткива до 2 месеца не доводе до морфолошких промена у ткивима и дају компарабилне резултате у погледу хистоморфологије. Подаци из литературе потврђују наше резултате. *Bass* и сарадници су показали да фиксирање ткива у формалину до годину дана не доводи до морфолошких промена ткива (*Bass et al, 2014*). Међутим, пролонгирано фиксирање ткива у формалину од 6 до 42 године доводи до стварања фиксационих артефаката у ткиву мозга, укључујући грануларне промене неутрофила (*Bass et al, 2014*). Да би видели ефекте калупљења ткива у парафински блок на хистоморфолошке карактеристике, посматрали смо препарате ткива која су након фиксирања у формалину укалупљена у парафин. Упоредили смо препарате ткива који су направљени одмах након калупљења ткива са препаратима које смо направили после одговарајућег времена архивирања (до 30 година) ових блокова. Резултати су показали да сам процес калупљења ткива, као и старост парафинских блокова не утиче на хистоморфолошке карактеристике ткива срца, јетре и мозга, па се ова укалупљена ткива могу проучавати хистоморфолошки и после 3 деценије архивирања. Подаци из литературе показују да ткива укалупљена у парафинске блокове и архивирана до 48 година не показују разлику у хистоморфологији (*Bass et al, 2014*).

Када говоримо о квалитету ДНК изоловане из одговарајућих ткива, мислимо пре свега на чистоћу узорка, принос, односно концентрацију изоловане ДНК и на њен интегритет, тј. степен фрагментације. Чистоћа узорка ДНК односи се на присуство протеина, угљених хидрата, масти, растварача, соли итд. у узорцима у којима је растворена ДНК. Присуство ових молекула и једињења смањује квалитет и количину изоловане ДНК и често онемогућују даље анализе као што је PCR (*Gouvegia et al, 2014; Potluri et al, 2015*). На квалитет изоловане ДНК утичу бројни фактори као што су старост узорка, метода која се користи за изоловање ДНК, количина ткива које се процесуира (*Seiler et al, 2016*), врста фиксатива, дужина фиксирања и температура (*Sengüven et al, 2014; Gouvegia et al, 2016*). Чистоћа и принос изоловане ДНК се одређују спектрофотометријски. Спектрофотометрија, као један од начина за одређивање чистоће и концентрације ДНК у узорцима, представља фотоелектрично мерење зрачења које нека супстанца апсорбује на одређеној таласној дужини. Количина апсорбоване светлости одређене таласне дужине одговара концентрацији испитиване супстанце. Нуклеинске киселине апсорбују максимално UV светлост чија је таласна дужина 260 nm, протеини апсорбују на 280 nm, а соли на 230 nm. Добро пречишћена ДНК има однос A260/280 између 1,5-2,0, а однос A260/A230 између 1,7-2,2, када се сматра да је ДНК чиста и погодна за даље анализе. Методе анализе изоловане ДНК захтевају и оптималну концентрацију ДНК, па је принос који добијемо изоловањем из одређеног узорка веома важан. Принос ДНК зависи од врсте биолошког

материјала из ког је она изолована, али и од примењене методе за изоловање ДНК. У литератури постоје различити подаци о приносу и концентрацији изоловане ДНК из фиксираних и укалупљених ткива, али се највећи број тих података односи на туморско ткиво. Из укалупљеног, здравог ткива јетре изузетог током обдукције *Ferruelo* и сарадници су изоловали ДНК чији је принос од 47 ng/μl до 130 ng/μl, у зависности од дужине архивирања парафинских блокова, а однос A260/A280 је био у опсегу од 1,69-1,96 (*Ferruelo et al, 2011*). Из здравог аутопсијског укалупљеног ткива јетре *Funabashi* и сарадници су добили ДНК у опсегу од 7,6-1045,6 ng/μl, из слезине од 10,5-1009,5 ng/μl, а из мозга од 6,3-335,2 ng/μl, у зависности од примењене методе за изоловање ДНК, као и дужине архивирања парафинских блокова (*Funabashi et al, 2012*). Интегритет молекула ДНК, односно степен фрагментације изоловане ДНК се процењује применом методе ланчане реакције полимеразе, PCR. Амплификацијом фрагмената познате дужине у узорцима ДНК изоловане из одговарајућих ткива, процењујемо степен фрагментације ДНК у тим узорцима: ако су амплификовани дужи фрагменти, ДНК је бољег интегритета, односно ако се амплификују само кратки делови ДНК то указује на висок степен фрагментације овог молекула у испитиваним узорцима. У форензичким лабораторијама се најчешће користе STR и SNP генетички маркери као стандард за ДНК идентификацију, а за извођење ове методе потребни су фрагменти ДНК дужине од 150 bp до 450 bp (*Babol-Pokora and Berent, 2008*). Кратки узастопни поновци, STR садрже основне јединице дужине 1 bp до 6 bp у низу чија је укупна дужина до 150 bp. С друге стране, SNP ампликони су краћи (краћи од 150 bp) од осталих маркера, што омогућава амплификацију оштећене ДНК. *Babol-Pokora* и сарадници су користили пет SNP маркера дужина 123 bp, 99 bp, 93 bp, 85 bp и 71 bp и закључили да су SNP маркери идеални за форензичку анализу деградираних узорака (*Babol-Pokora and Berent, 2008*). С обзиром на ове податке из литературе, у нашој студији су за процену интегритета ДНК амплификована три гена различите дужине: GPD1 ген дужине 150 bp, АСТВ ген дужине 262 bp и RPL4 ген дужине 407 bp.

У литератури постоји само неколико података о квалитету молекула ДНК изолованих из здравих ткива фиксираних у формалину (*Hamazaki et al, 1993; Miething et al, 2006*). Постоји много више студија о интегритету ДНК изоловане из здравих, смрзнутих ткива (*Legnard et al, 2002; Santos et al, 2008*) или из туморских ткива (*Bussolati et al, 2011; Ludyga et al, 2012; Nam et al, 2014*) фиксираних у формалину и уграђених у парафин. Не постоје студије које су анализирале интегритет ДНК изоловане из туморских или здравих ткива само фиксираних у формалину, без калупљења у парафин. Фиксирање у формалину доводи до деградације молекула ДНК, што за последицу има изоловање ДНК лошег квалитета. Познато је да реагенси који се користе за парафинско уграђивање ткива могу утицати на квалитет молекула ДНК (*Funabashi et al, 2012*). Такође, оштећења на молекулу ДНК могу настати и применом агресивних реагенаса за депарафинизацију (*Budimlija et al, 2009*). Да би утврдили у којој мери квалитет ДНК зависи од процеса фиксирања у формалину, а у којој мери од процеса калупљења ткива у парафин, упоредили смо квалитет ДНК изоловане из здравих, фиксираних ткива и ДНК изоловане из ткива која су након фиксирања у формалину укалупљена у парафински блок.

У лабораторијама је раније коришћен 4% непуферизовани формалин за фиксирање ткива, тако да су сва ткива која су пре више деценија укалупљена у парафинске блокове фиксирана само у непуферизованом формалину (*Vitošević et al, 2018b*). Непуферизовани формалин брзо деградира и има ограничени рок трајања. Последњих година у употреби је 10% пуферизовани формалин (*Srinivasan et al, 2002; Hewitt et al, 2008*). Пуфер успорава, али не спречава деградацију формалина, а за

пуферизовање се користи неколико различитих пуфера: фосфатни пуфер, калцијум карбонат, магнезијум карбонат, цитрат, *Tris* и други (Hewitt et al, 2008). У нашој лабораторији се раније користио непуферизовани формалин, а последњих година се користи формалин који је пуферизован фосфатним пуфером. Због тога су нека ткива укалупљена у парафинске блокове пре калупљења фиксирана у непуферизованом, а нека у пуферизованом формалину. Да би показали само ефекте пуферизованог и непуферизованог формалина на квалитет ДНК, ткива која су изузета током судскомедицинских обдукција смо фиксирани у једном или другом формалину, инкубирани одређени период и пратили квалитет изоловане ДНК. Наши резултати показују да је чистоћа ДНК, изоловане из ткива фиксираних како у пуферизованом, тако и у непуферизованом формалину, у границама оптималних вредности. Нешто више вредности су добијене у узорцима ДНК изоловане из ткива фиксираних у пуферизованом него у непуферизованом формалину. Принос ДНК добијене из ткива фиксираних у пуферизованом формалину је већи од приноса и узорцима добијеним из ткива фиксираних у непуферизованом формалину, што је у складу са подацима из литературе (Bass et al, 2014). Међутим, највећа разлика је у интегритету изоловане ДНК у односу на врсту формалина у коме су ткива фиксирана. У свим узорцима ДНК изоловане из ткива која су фиксирана у формалину амплификована су сва три жељена фрагмента различите дужине. Међутим, већа успешност амплификације фрагмента је у узорцима ДНК изоловане из ткива фиксираних у пуферизованом него у непуферизованом формалину. То указује на чињеницу да је интегритет молекула ДНК боље очуван, односно ДНК је мање фрагментисана, када су ткива фиксирана у пуферизованом него у непуферизованом формалину. Познато је да током фиксирања ткива непуферизовани формалин оксидише и претвара се у мрављу киселину. У киселој средини долази до деградације нуклеинских киселина, јер се β -глокозидне везе пуринских база хидролизују на $\text{pH}=4$ (Hamazaki et al, 1993; Srinivasan et al, 2002; Bonin et al, 2003; Zsikla et al, 2004). Због тога неки истраживачи тврде да из ткива која су изузета током обдукције и фиксирана у непуферизованом формалину не могу да се ампликују ДНК фрагменти дужи од 90 bp (Bonin et al, 2003). Miething и сарадници су детектовали фрагменте дужине 150 bp у узорцима ДНК изоловане из ткива фиксираних у пуферизованом формалину (Miething et al, 2006), док су Hamazaki и сарадници амплификовали фрагменте дужине 128 bp у узорцима ДНК из ткива фиксираних у непуферизованом формалину (Hamazaki et al, 1993). У литератури не постоје други подаци који пореде интегритет ДНК изоловане из здравих ткива фиксираних у пуферизованом или непуферизованом формалину. Постоји много више студија о интегритету ДНК изоловане из туморских ткива фиксираних у формалину и уграђених у парафинске блокове. Coura и сарадници су изоловали ДНК из парафинских блокова туморских ткива која су пре калупљења фиксирана у пуферизованом и непуферизованом формалину. Фрагменте дужине од 121 bp до 227 bp амплификовали су у узорцима ДНК из ткива фиксираних у пуферизованом формалину, док су у узорцима из ткива фиксираних у непуферизованом формалину добили само деградовану ДНК (Coura et al, 2005). Inoue и сарадници су амплификовали фрагменте дужине до 345 bp у узорцима ДНК изоловане из туморског ткива укалупљеног у парафински блок, а претходно фиксираног у непуферизованом формалину. Међутим, јасно су показали да степен фрагментације ДНК зависи како од врсте формалина, тако и од дужине фиксирања туморског ткива у формалину (Inoue et al, 1996). На основу изнетих резултата и њиховим поређењем са подацима из литературе можемо да закључимо да се из здравих ткива фиксираних у пуферизованом формалину добија ДНК боље чистоће, већег приноса и очуванијег интегритета, него ДНК из ткива фиксираних у непуферизованом формалину.

Геномска ДНК може бити изолована из различитих биолошких узорака различитим методама изоловања. Избор методе зависи од врсте и количине биолошког материјала, врсте хемикалија, обучености тима, цене итд., а циљ је добити висок принос што квалитетније ДНК. У форензичким лабораторијама се користе како стандардне (органска екстракција, исољавање), тако и комерцијалне (изоловање помоћу комерцијалних комплета) методе за изоловање ДНК. Међутим, ни једна метода за изоловање ДНК не испуњава све неопходне стандарде. Описани су различити протоколи за изоловање ДНК бољег квалитета из ткива која је фиксирано у формалину и укалупљено у парафински блок (*Legnard et al, 2002; Cao et al, 2003; Ferrer et al, 2007; Babol-Pokora and Berent, 2008; Okello et al, 2010; Ludyga et al, 2012; Rabelo-Goncalves et al, 2014*). И у овом случају се подаци најчешће односе на квалитет ДНК изоловане из туморских ткива која су укалупљена у парафинске блокове и архивирана. Не постоје подаци који упоређују различите методе за изоловање ДНК из ткива која су само фиксирана у формалину. У нашем истраживању је за изоловање ДНК из ткива фиксираних у формалину коришћена органска екстракција помоћу фенола, хлороформа и изоамил алкохола (РСИ метода), као и изоловање помоћу комерцијалног комплета (кит) (*PureLink Genomic DNA Mini Kit*). У литератури постоје контрадикторни подаци о томе која је од ове две методе боља за изоловање ДНК из архивираних ткива: по неким истраживачима то је екстракција помоћу фенола, хлороформа и изоамил алкохола (*Rabelo-Goncalves et al, 2014*), док други сматрају да бољи квалитет ДНК обезбеђује изоловање помоћу комерцијалних комплета (*Wang et al, 2013*). Изоловање ДНК помоћу комерцијалног комплета је брже и једноставније, али је принос мањи у односу на екстракцију фенол-хлороформом-изоамил алкохолем (*Skage and Schander, 2007*). Наши резултати показују да је РСИ методом добијена ДНК значајно бољег квалитета него што је ДНК добијена из фиксираних ткива помоћу кита. Иако се вредности односа А260/А280, који дефинишу чистоћу узорака, крећу у опсегу оптималних вредности, већа чистоћа узорака је добијена када је ДНК изолована из фиксираних ткива РСИ методом него помоћу кита. Сви анализирани узорци ДНК који су добијени изоловањем из фиксираних ткива помоћу кита садрже много веће количине соли, органских молекула и растварача (низак однос А260/А230) у односу на узорке добијене РСИ екстракцијом. Такође, принос ДНК је значајно већи у узорцима ДНК изоловане РСИ методом него помоћу кита, што се може објаснити губитком ДНК у току испирања силико-гел мембрана на којима је адсорбована ДНК прилоком употребе кита (*Ludyga et al, 2012*). Интегритет ДНК изоловане из ткива фиксираних у формалину такође зависи од примењене методе за изоловање. Иако су у свим узорцима ДНК амплификована сва три фрагмента различите дужине, већа успешност амплификације је постигнута у узорцима ДНК изоловане РСИ методом. То значи да се током процеса изоловања ДНК РСИ методом она мање фрагментира, због чега се на крају добија ДНК очуванијег интегритета која се може даље користити у молекуларно биолошким анализама. Из наведеног можемо закључити да на квалитет ДНК у значајној мери утиче метода којом је она изолована из фиксираних ткива и то много више него што утиче врста формалина која је коришћена за фиксирање ткива.

На квалитет изоловане ДНК у великој мери утиче и врста фиксираног ткива из ког је она изолована. Постоје различита мишљења о томе који су органи погодни за фиксирање и изоловање ДНК која ће се користити за даље молекуларно биолошке анализе. Квалитет ДНК изоловане из различитих органа, фиксираних у формалину, често варира услед промена у ћелијском саставу ових ткива. Треба избегавати ткива која имају нехомологни ћелијски састав (панкреас, дебело црево, плућа), јер су концентрација и чистоћа ДНК изоловане из њих лоши (*Turashvili et al, 2012*). Поред

тога, плућно ткиво није погодно за молекуларну анализу због присуства слузи. Узорци ткива изоловани из органа који имају велику ћелијску густину (мозак, срце, јетра, слезина) коришћени су за молекуларне анализе, јер се показало да је PCR амплификација фрагмената ДНК у овим узорцима успешнија (*Funabashi et al, 2012*). С друге стране, ДНК изолована из органа грудне дупље (срца и плућа) показује бољи квалитет од ДНК изоловане из ткива пореклом из трбушне дупље (панкреас, јетра, бубрег, дебело црево, желудац), због ензима панкреаса, убрзаног раста бактерија и брже аутолизе ткива (*Niland et al, 2012*). Бубрежно ткиво не треба узимати особама старијим од 50 година, јер је вероватно започета аутолиза ћелија (*Funabashi et al, 2012*). У нашем истраживању одлучили смо да користимо пет различитих органа из различитих дупљи: срце, јетру, мозак, плућа и бубреге. Ови органи су приступачни за узимање узорака приликом обдукције и погодни за наше истраживање. У свим узорцима ДНК изоловане из фиксираних ткива срца, јетре, мозга плућа и бубрега присутна је оптимална концентрација протеина, али и повећана концентрација угљених хидрата, масти, соли и растварача, које не ометају даље анализе. Принос ДНК изоловане из ткива јетре непосредно након обдукције био је највећи, што се може објаснити великом густином ћелија у овом ткиву, као и присуством полиплоидних ћелија које су у јетри заступљене са 30-40% (*Farrugia et al, 2010*). Најмањи принос ДНК је добијен из фиксираних ткива срца и мозга. *Ferrugia* и сарадници су су добили значајно већи принос ДНК из узорака изолованих из ткива јетре у односу на узорке из ткива срца (*Farrugia et al, 2010*). И други истраживачи који су испитивали разлике у приносу ДНК изоловане из различитих ткива су дошли до закључка да се из различитих ткива добија различит принос молекула ДНК (*Legnard et al, 2002*). Из лимфног чвора, бубрега и слезине добијен је два до четири пута већи принос ДНК у односу на принос ДНК из коже, мозга и танког црева (*Legnard et al, 2002*). Када упоредимо интегритет молекула ДНК изоловане из пет различитих фиксираних ткива, можемо да видимо да не постоји статистички значајна разлика у степену фрагментације изоловане ДНК када се упореде ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега међусобно. У свим узорцима ДНК изоловане из фиксираних ткива срца, јетре, мозга, плућа и бубрега амплификовани су жељени фрагменти ДНК дужине 150 bp (GPD1 ген), 262 bp (ACTB ген) и 407 bp (RPL4 ген). Краћи фрагменти дужине 150 bp и 262 bp су амплификовани у свим узорцима ДНК, док је најдужи фрагмент ДНК дужине 407 bp амплификован у најмањем броју узорака ДНК изоловане из свих пет различитих ткива. *Miething* и сарадници су упоредили интегритет ДНК изоловане из здравих ткива срца, скелетних мишића, јетре, бубрега и мозга која су фиксирана у различитим фиксативима и дошли до закључка да су ткива скелетних мишића и бубрега која су фиксирана у пуферизованом формалину најбољег интегритета и најприкладнија за даља молекуларна истраживања (*Miething et al, 2006*). Они су успели да детектују фрагмент ДНК дужине 150 bp у узорцима ДНК изоловане из ткива срца, скелетних мишића, јетре, бубрега и мозга фиксираних у пуферизованом формалину (*Miething et al, 2006*), што је у складу са резултатима које смо добили у нашем истраживању. Највеће осцилације у интегритету ДНК добијене су за ткиво мозга, што се може приписати неједнакој пенетрацији фиксатива у ово ткиво (*Miething et al, 2006*). *Funabashi* и сарадници сматрају да ткиво плућа није погодно за анализе молекула ДНК због присуства мукуса у овом органу (*Funabashi et al, 2012*). *Hamazaki* и сарадници су пратили интегритет ДНК изоловане из ткива јетре изузетог током обдукције које је било фиксирано у непуферизованом формалину дужи временски период (*Hamazaki et al, 1993*) и успели су да амплификују фрагмент ДНК дужине 128 bp (*Hamazaki et al, 1993*). Сличне резултате су добили *Legnard* и сарадници који су поредили ДНК изоловану из различитих ткива која су фиксирана у непуферизованом формалину и

затим укалупљена у парафинске блокове (*Legnard et al, 2002*). Они су дошли до закључка да успех амплификација ДНК више зависи од протокола за екстракцију ДНК и фиксирања формалином него од врсте ткива из којег се изолује ДНК (*Legnard et al, 2002*), што потврђују и наши резултати. И у овом случају је показано да на квалитет ДНК у великој мери утиче метода која је коришћена за изоловање ДНК: значајно већи принос и чистоћа су потврђени у узорцима у којима је ДНК изолована РС1 методом у односу на узорке у којима је за изоловање ДНК коришћен кит.

На квалитет ДНК изоловане из фиксираних ткива у великој мери утиче дужина фиксирања ткива у формалину (*Greer et al, 1991a; Quach et al, 2004; Ferrer et al, 2007*). Због тога смо у нашем истраживању фиксирани ткива срца, јетре, мозга, бубрега и плућа у пуферизованом или непуферизованом формалину до 2 месеца и одрађивали квалитет (чистоћу, принос и интегритет) ДНК изоловане из тих ткива. Резултати су показали да је чистоћа узорака слична у свим узорцима ДНК, без обзира на дужину трајања фиксирања. *Nam* и сарадници су такође дошли до закључка да продужено фиксирање ткива у формалину не утиче на чистоћу изоловане ДНК (*Nam et al, 2014*). Међутим, продужено фиксирање у формалину доводи до смањења приноса ДНК, нарочито након 14 дана фиксирања. Установљена је корелација мале јачине између дужине фиксирања ткива и приноса изоловане ДНК за обе методе коришћене за изоловање ДНК, што доводи до закључка да што се ткиво дуже фиксира у формалину принос изоловане ДНК је мањи. Подаци из литературе показују да се висок принос ДНК добија из ткива фиксираних у непуферизованом формалину до 7 дана. Након 16 дана фиксирања принос ДНК опада за 50%, а после 32 дана фиксирања ткива вредности приноса ДНК су врло мале (*Legnard et al, 2002*). И интегритет ДНК зависи од дужине фиксирања ткива у пуферизованом или непуферизованом формалину. Најкраћи фрагмент (*GPD1* ген) је амплификован у узорцима ДНК изоловане из ткива која су фиксирана у пуферизованом формалину до 28 дана (изузев ткива срца, у којима је амплификација могућа у узорцима који су фиксирани до 14 дана), *ACTB* ген из ткива која су фиксирана до 14 дана, док је *RPL4* ген амплификован из ДНК изоловане из ткива бубрега која су фиксирана до 72h. Међутим, у узорцима ДНК добијеним из ткива која су фиксирана у непуферизованом формалину *GPD1* ген је амплификован у узорцима ДНК изоловане из ткива која су фиксирани до 7 дана, *ACTB* ген до 5 дана, а *RPL4* ген само до 6h фиксирања. Са продужењем времена фиксирања ткива у формалину успешност PCR амплификације опада: дужи фрагменти ДНК не могу да се амплификују што указује на то да је ДНК у тим узорцима деградована на кратке фрагменте (*Greer et al, 1991a; Greer et al, 1991b; Quach et al, 2004; Nam et al, 2014*). То значи да фиксирање ткива у формалину доводи до временски зависне деградације молекула ДНК. Према неким истраживачима фиксирање у трајању од 36h доводи до деградације молекула ДНК и немогућности амплификације фрагмената већ након 72h (*Gino et al, 2004; Hewitt et al, 2008*). У литератури постоје бројни подаци о степену деградације молекула ДНК која је изолована из здравог (*Greer et al, 1991a; Greer et al, 1991b; Legnard et al, 2002; Santos et al, 2008*), као и из туморског ткива (*Nam et al, 2014*) које је фиксирано у формалину различит временски период, а затим укалупљено у парафинске блокове. Резултати су различити, јер концентрација формалина који се користи за фиксирање ткива, рН формалинског раствора, као и дужина фиксирања значајно варирају у различитим студијама. Што је краће време ткиво фиксирано у формалину, боља је очуваност изоловане ДНК (*Ferrer et al, 2007*).

Здрава, хумана ткива укалупљена у парафинске блокове могу бити значајан извор ДНК за молекуларну анализу. До сада су научници изоловали ДНК из здравих укалупљених ткива која су била архивирана само до 5 година (*Funabachi et al, 2012*).

Сви подаци у литератури који се односе на квалитет ДНК изоловане из укалупљених ткива односе се на туморска ткива (*Greer et al, 1994; Coombs et al, 1999; Ludyga et al, 2012; Nam et al, 2014*). Због тога је циљ наших истраживања био и да изолујемо ДНК из укрупљених ткива која су архивирана до 30 година, да одредимо којом методом за изоловање добијамо ДНК најбољег квалитета и које је ткиво најпогодније за архивирање, како би направили архиву ткива која су погодна за молекуларне анализе ДНК.

Оптимизација метода за екстракцију високо квалитетне ДНК је веома важна. У литератури постоје контрадикторни подаци о томе којом се методом добија најквалитетнија ДНК: нека истраживања показују да је бољи квалитет ДНК добијен коришћењем PCI методе за изоловање ДНК (*Rivero et al, 2006; Okello et al, 2010*), док други указују на предност екстракције помоћу комерцијалних комплета (*Cao et al, 2003; Ferrer et al, 2007; Kocjan et al, 2015*). Приликом изоловања ДНК из укалупљених ткива најпре се врши депарафинизација ксиленом, након чега следи ензимска дигестија ткива са протеиназом К и на крају екстракција ДНК помоћу фенол-хлороформ-изоамил алкохола или комерцијалног комплета (*Ferguson et al, 2012*). Концентрација протеиназе К, време дигестије и температура инкубације су битни фактори који утичу на квалитет изоловане ДНК (*Rivero et al, 2006; Bonin and Stanta, 2013; Gouvegia et al, 2016*). Због великог броја корака у процесу изоловања ДНК PCI методом, да би се добила ДНК високог квалитета, потребна је добра обученост експериментатора. У нашем истраживању изоловање ДНК помоћу фенол-хлороформ-изоамил алкохола је била супериорнија метода у односу на изоловање помоћу комерцијалног комплета (*PureLink Genomic DNA Mini Kit*). Вредност односа A260/A280 узорка ДНК изолованих из ткива која су укалупљена у парафинске блокове коришћењем обе методе за изоловање су задовољавајуће, мада је показано да узорци добијени PCI методом садрже мање протеина од узорка ДНК добијених помоћу комерцијалног комплета. И *Funabashi* и сарадници су изоловали чистију ДНК са већим вредностима односа A260/A280 користећи PCI методе у односу на комерцијални комплет (*Funabashi et al, 2012*) из укалупљених здравих ткива. Међутим, вредности односа A260/A230 су знатно ниже у узорцима у којима је ДНК изолована помоћу комерцијалног комплета, што указује на већу концентрацију соли, угљених хидрата, липида и растварача у узорцима. И подаци из литературе показују да су вредности односа A260/A230 испод просечних, опште прихваћених вредности за чистоћу ДНК (*Reid et al, 2017*), али нема доказа да су соли, растварачи и други молекули значајно утицали на амплификацију фрагмената ДНК (*Cao et al, 2003*). Значајно већи принос ДНК добијен је применом PCI методе екстракције у поређењу са комерцијалним комплетом. То се може објаснити чињеницом да се током изоловања ДНК комерцијалним комплетом, одређена количина ДНК губи током проласка кроз колоне силика гела (*Sam et al, 2012*), које такође може зачепити велика количина ДНК (*Rabelo-Gonçalves et al, 2014*). Метода која се користи за изоловање ДНК из укалупљених здравих ткива значајно утиче и на успех амплификације фрагмената ДНК. Неколико претходних студија упоређивало је протоколе за екстракцију ДНК из укалупљених туморских ткива (*Cao et al, 2003; Okello et al, 2010; Ludyga et al, 2012; Rabelo-Gonçalves et al, 2014*), при чему су резултати били различити. У нашем истраживању у узорцима ДНК изолованим PCI методом добијени су дужи PCR ампликони него у узорцима ДНК добијеним помоћу комерцијалног комплета, вероватно због веће осетљивости и бољег приноса добијене ДНК. Користећи PCI методу за изоловање ДНК, успех амплификације GPD1 гена и АСТВ гена је био до 91%, у поређењу са комерцијалним комплетом, где је био до 67%.

Да би показали из ког здравог укалупљеног ткива се добија најквалитетнија ДНК, користили смо парафинске блокове три различита ткива: срца, јетре и мозга. Ова укалупљена здрава ткива се изузимају током судскомедицинске обдукције и архивирају у Служби за судску медицину и токсикологију УКЦ Крагујевац. Резултати су показали да између узорак ДНК изолованих из различитих ткива која су укалупљена у парафинске блокове не постоји разлика у погледу вредности односа A260/A280 без обзира на методу која је коришћена за изоловање. Вредности односа A260/A280 се крећу у опсегу од 1,92 до 2,05 што указује на малу количину протеина у узорцима. Вредности односа A260/A230 су задовољавајуће; ниже вредности су и у овом случају добијене у узорцима у којима је ДНК изолована помоћу комерцијалног комплета. У приносу ДНК изоловане из три различита ткива постоји разлика у односу на ткиво из ког је ДНК изолована. Највећи принос ДНК добијен је у узорцима из ткива јетре, а најмањи из ткива мозга из којих је она изолована помоћу PCI методе. То је у складу са чињеницом да је јетра орган са великом ћелијском густином. Иако је величина исечка ткива важна за количину ДНК која се добија, претходне студије су показале да је ћелијска густина ткива, односно број интактних ћелија ткива која су укалупљена у парафинске блокове прецизнији предиктор приноса ДНК него количина ткива у ткивном исечку одакле се изолује ДНК (*Ferguson et al, 2012*). Принос ДНК је већи што је већа ћелијска густина ткива (*Thyagarajan et al, 2005*). Принос ДНК изоловане помоћу комерцијалног комплета се не разликује међу анализираним ткивима. Резултати показују да је интегритет ДНК различит у различитим укалупљеним ткивима. Иако је из узорак ткива јетре изолована ДНК које има набољу чистоћу и принос, ова ДНК је и највише фрагментисана у односу на ДНК изоловану из срца или мозга. Познато је да је ткиво јетре подложно брзој аутолизи зато што садржи велики број високо катаболичких ензима (*Rich et al, 2005*), док мишићно ткиво много спорије поропада (*Rich et al, 2005*). У ткивима која су боље васкуларизована (јетра и плућа) брже долази до хетеролизе. *Funabashi* и сарадници су амплификовали АСТВ ген, дужине 136 bp у узорцима ДНК која је изолована из нетуморског ткива јетре, слезине и мозга која су укалупљена у парафинске блокове и архивирана до 5 година (*Funabashi et al, 2012*). Сви остали подаци из литературе се односе на интегритет ДНК изоловане из укалупљених ткива тумора (*Gall et al, 1993; Greer et al, 1994; Gillio-Tos et al, 2007*).

Квалитет ДНК зависи и од дужине архивирања ткива укалупљених у парафинске блокове. Вредности односа апсорбанци које указују на чистоћу узорак су у границама оптималних, осим за узорке у којима је ДНК изолована помоћу кита: у овим узорцима вредности односа A260/A230 су ниже од оптималних, што указује на присуство соли, масти, угљених хидрата и растварача. Принос ДНК која је изолована из здравих ткива укалупљених у парафинске блокове и архивираних до 30 година је задовољавајући и оптималан за даље молекуларно биолошке анализе. Међутим, принос ДНК у овим узорцима је дупло мањи него у узорцима у којима је ДНК изолована из ткива одмах након изузимања, дакле, без фиксирања и калупљења. То указује на чињеницу да процеси фиксирања и калупљења неминовно доводе до смањења приноса ДНК у узорцима, без обзира на дужину архивирања. Принос ДНК је различит у односу на дужину архивирања укалупљених ткива, а подаци из литературе, који се односе на туморска ткива, су шаролики (*Ludyga et al, 2012; Niland et al, 2012*). Закључак је да старост парафинских блокова ткива нема значајнијег утицаја на принос и чистоћу изоловане ДНК (*Kokkat et al, 2013; Neichifor-Boila et al, 2015*). Успех амплификације ДНК фрагмената изолованих из ткива која су укалупљена у парафинске блокове и архивирани дужи временски период је различит. Резултати неких студија у којима су

коришћена укалупљена туморска ткива су показали да успех PCR амплификације значајно зависи од старости парафинских блокова ткива (*Lin et al, 2009*), док су друга истраживања показала да повећање успеха амплификације не зависи од њихове старости (*Carturan et al, 2008; Gouvegia et al, 2016*). Успешност амплификације ДНК изоловане из аутопсијског ткива које је укључено у парафинске блокове се не смањује линеарно са старошћу парафинских блокова (*Okello et al, 2010*). *Nam* и сарадници су амплификовали фрагменте ДНК у узорцима у којима је она изолована из туморског ткива које је укалупљено у парафинске блокове и архивирано од 3 до 8 година, као и мање од 1 године (*Nam et al, 2014*). Њихови резултати су показали да није било значајне разлике у дужини фрагмената ДНК и успеху PCR амплификације између парафинских блокова ткива различите старости (*Nam et al, 2014*). Са друге стране, ДНК фрагменти изоловани из парафинских блокова са туморским ткивом или из ткива са грануломатозном упалом која су архивирана 3 до 6 година су значајно краћи у односу на ДНК фрагменте који су изоловани из парафинских блокова истих ткива архивираних краћи временски период, од 1 до 2 године (*Goelz et al, 1985; Johansen et al, 2004; Funabashi et al, 2012*). У нашем истраживању је показано да фрагментација ДНК зависи од старости парафинских блокова ткива. Амплификација најкраћег фрагмента дужине 150 bp (GPD1 ген) је била могућа у узорцима ДНК која је изолована из ткива јетре које је укалупљено у парафинске блокове и складиштено до 16 година, док је интегритет ДНК изоловане из ткива срца и мозга очуван до 30 година старости парафинских блокова. Дужи фрагмент од 262 bp (ACTB ген) је амплификован у узорцима ДНК изолованим из парафинских блокова ткива јетре старости до 11 година, а из парафинских блокова ткива срца и мозга до 26 година старости. Најдужи фрагмент од 407 bp (RPL4 ген) може да се амплификује у узорцима ДНК изоловане из било ког ткива само до 6 година старости парафинских блокова ткива. Ови резултати показују да степен фрагментације изоловане ДНК зависи од старости парафинских блокова ткива. *Funabashi* и сарадници су такође користили нетуморско, аутопсијско ткиво које је укалупљено у парафинске блокове и архивирано од 1 до 5 година и успели су да амплификују β -actin ген дужине 136 bp (*Funabashi et al, 2012*). У литератури постоје бројни подаци о степену фрагментације ДНК која је изолована из парафинских блокова са туморским ткивом које је архивирано дуги низ година (*Greer et al, 1994; Coombs et al, 1999; Ludysga et al, 2012*), али нема података о интегритету ДНК изоловане из укалупљених ткива која су архивирана дуже од 5 година. *Gall* и сарадници су амплификовали ДНК фрагменте дужине 317 bp изоловане из парафинских блокова са туморским ткивом старости 38 година (*Gall et al, 1993*), док су *Wang* и сарадници амплификовали ДНК фрагменте дужине 242 bp из парафинских блокова такође са туморским ткивом старости 40 година (*Wang et al, 1994*). Међутим, основни проблем у форензичким истраживањима када се користи туморско ткиво су сталне модификације молекула ДНК и нестабилност STR маркера (*Budimlija et al, 2009*).

Ако упоредимо квалитет ДНК изоловане из свежих ткива одмах након обдукције са ДНК изоловане из фиксираних ткива и ткива укалупљених у парафинске блокове, можемо да закључимо да и процес фиксирања и калупљења утичу на квалитет изоловане ДНК. Поред тога, значајан утицај има и метода која се користи за изоловање ДНК. Резултати нашег истраживања показују да је ДНК добијена РС1 методом значајно квалитетнија од ДНК која је изолована помоћу комерцијалног комплета. Иако су вредности односа апсорбанци који указују на чистоћу узорка ДНК у оптималном опсегу у скоро свим узорцима, принос ДНК се значајно мења. У свим испитиваним ткивима, фиксираним или укалупљеним у парафински блок, принос ДНК је значајно нижи него у контролним узорцима ткива (из којих је ДНК изолована одмах након

обдукције). Највећи пад у приносу ДНК забележен је након фиксирања у формалину, посебно са продуженим временом фиксирања, а додатно и након калупљења ткива у парафински блок. Из наших резултата се може закључити да дужина фиксирања ткива у формалину има већи утацај на принос ДНК него дужина архивирања ткива у парафинским блоковима. Принос ДНК у узорцима изолованим из ткива јетре је већи од приноса ДНК из срца и мозга, без обзира да ли је реч о свежим ткивима, фиксираним ткивима или ткивима укалупљеним у парафинске блокове.

Процес фиксирања ткива у формалину и калупљења у парафинске блокове утиче и на интегритет молекула ДНК. Наши резултати показују да је најмање фрагментисана ДНК изолована РС1 методом из ткива фиксираних у 10% пуферизованом формалину, а да калупљење ткива у парафинске блокове додатно доводи до фрагментације ДНК. Због стварања унакрсних веза између протеина и ДНК и раскидања фосфодиестарских веза у нуклеинским киселинама, формалин доводи до фрагментације молекула ДНК (*Duval et al, 2010; Okello et al, 2010*). Продужено фиксирање ткива у формалину значајно убрзава фрагментацију ДНК. Ткиво мозга је најпогодније за фиксирање у формалину, јер је интегритет ДНК најдуже очуван. Калупљење ткива у парафин и услови складиштења парафинских блокова такође могу да утичу на квалитет изоловане ДНК (*Okello et al, 2010; Bonin and Stanta, 2013; Simbolo et al, 2013*). У процесу калупљења ткива у парафинске блокове ако се заостала вода не замени парафином може довести до даље деградације молекула ДНК (*Bonin and Stanta, 2013*). Неодговарајући услови складиштења парафинских блокова ткива (влага, температура, буђ) могу временом довести до даље деградације ДНК (*Bonin and Stanta, 2013*). У литератури нема прецизних података о томе да ли и у којој мери дужина архивирања укалупљених здравих ткива утиче на интегритет ДНК. Наши резултати показују да се интегритет ДНК изоловане из здравих, укалупљених ткива изузетих током судскомедицинских обдукција смањује са временом архивирања. Формалдехид одржава морфологију ткива, али доводи до фрагментације ДНК на фрагменте мање од 200 bp (*Okello et al, 2010; Turashvili et al, 2012*). Формалдехид се временом разграђује у мрављу киселину, што резултира хидролизом молекула ДНК у ткивима (*Sato et al, 2001*) и хемијском модификацијом нуклеинских киселина (*Farrugia et al, 2010*). Ткиво мозга и срца укалупљено у парафинске блокове и после 30 година архивирања се могу користити за анализу кратких фрагмента ДНК (дужине до 150 bp).

Упркос изазовима које представљају здрава ткива укалупљена у парафинске блокове, она остају вредан извор ДНК у ретроспективним молекуларним форензичким истраживањима.

6. ЗАКЉУЧЦИ

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.

На основу овако сумираних резултата изведени су општи закључци. За фиксирање здравих ткива изузетих након судскомедицинских обдукција најбоље је користити 10% пуферизовани формалин, а дужина фиксирања може бити од 72h (када је могуће амплификовати фрагменте дужине и до 400 bp) до 14 дана (када је могуће амплификовати фрагменте дужине до 260 bp). За изоловање ДНК треба користити PCI методу. Иако је из фиксираног ткива јетре добијен најбољи принос, интегритет ДНК је најбоље очуван у фиксираном ткиву срца и мозга. Приликом прављења парафинских калупа ткива за архиву, треба користити пре свега ткива срца и мозга. Када су фиксирана на одговарајући начин, чистоћа, принос и интегритет молекула ДНК у овим укалупљеним ткивима су погодни за молекуларно биолошке анализе и након 30 година архивирања.

7. СКРАЋЕНИЦЕ

A - аденин

ACTB - *engl.* β actin, *превод:* β актин

bp - *engl.* base pair, *превод:* базни пар

C - цитозин

ДНАР - *engl.* dihydroxyacetone phosphate, *превод:* дихидроксиацетон фосфат

ДНК - дезоксирибонуклеинска киселина

EDTA - *engl.* Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid, *превод:* етилен-диамин-тетрасирћетна киселина

EtBr - етидијум-броми

FTA - *engl.* Flinder Technology Associates

G - гуанин

GPD1 - *engl.* Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1, *превод:* глицерол-3-фосфат-дехидрогеназа 1

H&E – *engl.* Hematoxylin and Eosin staining, *превод:* бојење хематоксилином и еозином

HGP – *engl.* Human Genome Project, *превод:* Пројекат хуманог генома

HV1 - хиперваријабилни регион 1

HV2 - хиперваријабилни регион 2

NADH - *engl.* Nicotine Adenine Dinucleoti, *превод:* Никотинамид аденин динуклеотид

NGS - *engl.* Next Generation Sequencing, *превод:* Секвенатори нове генерације

OD - *engl.* Optical Density, *превод:* оптичка јединица

PCI - *engl.* Phenol-Chloroform-Isoamyl alcohol, *превод:* фенол-хлороформ-изоамил алкохол

PCR - *engl.* Polymerase Chain Reaction, *превод:* ланчана реакција полимеразе

РНК - рибонуклеинска киселина

РНКазе А - рибонуклеаза А

рРНК - рибозомална РНК

RFLP - *engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism, *превод:* полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената

RPL4 - *engl.* Ribosomal Protein L4, *превод:* рибозомални протеин Л4

S.D. - стандардна девијација

SDS - содијум-додецил-сулфат

SNP - *engl.* Single Nucleotide Polymorphisms, *превод:* тачкасти полиморфизам

SPSS - *engl.* Statistical Package for the Social Sciences

STR - *engl.* Short Tandem Repeats, *превод:* кратки узастопни поновци

S.V. - средња вредност

T - тимин

TBE – TRIS-borate-EDTA пуфер

TE – TRIS-EDTA пуфер

TNS – TE-NaCl-SD пуфер

tPHK - транспортна РНК

UV - *engl.* Ultraviolet Light, *превод:* ултраљубичаста светлост

VNTR - *engl.* Variable Number of Tandem Repeats, *превод:* узастопни поновци променљивог броја

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Albert B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Wakter P. *Molecular Biology of the Cell*. 6th ed. New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group; 2015.
2. Allison LA. *Fundamental molecular biology*. Blackwell publishing; 2007.
3. Alvarez-Aldana A, Martínez JW, Sepúlveda-Arias JC. Comparison of five protocols to extract DNA from paraffin-embedded tissues for the detection of human papillomavirus. *Pathol Res Pract*. 2015;211(2):150-5. doi: 10.1016/j.prp.2014.10.011.
4. Babol-Pokora K, Berent J. SNP-minisequencing as an excellent tool for analysing degraded DNA recovered from archival tissues. *Acta Biochim Pol*. 2008;55(4):815-9.
5. Barra GB, Santa Rita TH, Chianca CF, Velasco LF, de Sousa CF, Nery LF, Costa SS. Fetal male lineage determination by analysis of Y-chromosome STR haplotype in maternal plasma. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;15:105-10. doi: 10.1016/j.fsigen.2014.11.006.
6. Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med*. 2014;138(11):1520-30. doi: 10.5858/arpa.2013-0691-RA.
7. Bianchi L, Liò P. Forensic DNA and bioinformatics. *Brief Bioinform*. 2007;8(2):117-28. doi: 10.1093/bib/bbm006.
8. Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G. PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol*. 2003;56(3):184-6. doi: 10.1136/mp.56.3.184.
9. Bonin S, Stanta G. Nucleic acid extraction methods from fixed and paraffin-embedded tissues in cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2013;13(3):271-82. doi: 10.1586/erm.13.14.
10. Brown TA. *Genomes*. 2nd edition. Oxford, United Kingdom: Wiley-Liss; 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21134/>.
11. Bruijns B, Tiggelaar R, Gardeniers H. Massively parallel sequencing techniques for forensics: A review. *Electrophoresis*. 2018;39(21):2642-2654. doi:10.1002/elps.201800082.
12. Budimlija Z, Lu C, Axler-DiPerte G, Seifarth J, Popiolek D, Fogt F, Prinz M. Malignant tumors and forensics--dilemmas and proposals. *Croat Med J*. 2009 Jun;50(3):218-27. doi: 10.3325/cmj.2009.50.218.
13. Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A. Validity of low copy number typing and applications to forensic science. *Croat Med J*. 2009;50(3):207-17. doi: 10.3325/cmj.2009.50.207.
14. Budowle B, Smith J, Moretti T, Di Zinno J. *Dna typing protocols: Molecular Biology and Forensic Analysis*. 1st ed. Eaton Publishing Company; 2000.
15. Budowle B, van Daal A. Extracting evidence from forensic DNA analyses: future molecular biology directions. *Biotechniques*. 2009;46(5):339-40, 342-50. doi: 10.2144/000113136.
16. Budowle B, van Daal A. Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*. 2008;44(5):603-8, 610. doi: 10.2144/000112806.
17. Bussolati G, Annaratone L, Medico E, D'Armento G, Sapino A. Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity. *PLoS One*. 2011;6(6):e21043. doi: 10.1371/journal.pone.0021043.
18. Butler JM. *Forensic DNA typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2nd ed. Elsevier Academic Press, USA; 2005.
19. Butler JM. *Fundamentals of forensic DNA typing*. Elsevier Academic press, USA; 2009.
20. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*. 2007;43(4):ii-v. doi: 10.2144/000112582.

21. Cao W, Hashibe M, Rao JY, Morgenstern H, Zhang ZF. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(5):397-404. doi: 10.1016/s0361-090x(03)00103-x.
22. Carturan E, Tester DJ, Brost BC, Basso C, Thiene G, Ackerman MJ. Postmortem genetic testing for conventional autopsy-negative sudden unexplained death: an evaluation of different DNA extraction protocols and the feasibility of mutational analysis from archival paraffin-embedded heart tissue. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(3):391-7. doi: 10.1309/VLA7TT9EQ05FFVN4.
23. Cavanaugh SE, Bathrick AS. Direct PCR amplification of forensic touch and other challenging DNA samples: A review. *Forensic Sci Int Genet.* 2018;32:40-49. doi: 10.1016/j.fsigen.2017.10.005.
24. Comănescu M, Arsene D, Ardeleanu C, Bussolati G. The mandate for a proper preservation in histopathological tissues. *Rom J MorpholEmbryol.* 2012;53(2):233-42.
25. Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(16):e12. doi: 10.1093/nar/27.16.e12.
26. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol.* 2005;58(8):894-5. doi: 10.1136/jcp.2004.021352.
27. Curtis C, Hereward J, Mangelsdorf M, Hussey K, Devereux J. Protecting trust in medical genetics in the new era of forensics. *Genet Med.* 2019;21(7):1483-1485. doi: 10.1038/s41436-018-0396-7.
28. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet.* 2008;122(6):565-81. doi: 10.1007/s00439-007-0433-0.
29. Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol.* 2005;278(2):274-88. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.11.028.
30. Dai S, Long Y. Genotyping analysis using an RFLP assay. *Methods Mol Biol.* 2015;1245:91-9. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6_7.
31. Decorte R, Cassiman JJ. Forensic medicine and the polymerase chain reaction technique. *J Med Genet.* 1993;30(8):625-633. doi:10.1136/jmg.30.8.625.
32. Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, Kristiansen G. Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One.* 2013;8(10):e77771. doi: 10.1371/journal.pone.0077771.
33. Donczo B, Guttman A. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: The Holy Grail for molecular diagnostics. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;155:125-134. doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.065.
34. Douglas MP, Rogers SO. DNA damage caused by common cytological fixatives. *Mutat Res.* 1998;401(1-2):77-88. doi: 10.1016/s0027-5107(97)00314-x.
35. Duval K, Aubin RA, Elliott J, Gorn-Hondermann I, Birnboim HC, Jonker D, Fourney RM, Frégeau CJ. Optimized manual and automated recovery of amplifiable DNA from tissues preserved in buffered formalin and alcohol-based fixative. *Forensic Sci Int Genet.* 2010;4(2):80-8. doi: 10.1016/j.fsigen.2009.06.003.
36. Farrugia A, Keyser C, Ludes B. Efficiency evaluation of a DNA extraction and purification protocol on archival formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Sci Int.* 2010;194(1-3):e25-e28. doi:10.1016/j.forsciint.2009.09.004.
37. Ferguson AE, Cohn RJ, Ashton LJ. Use of formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue as a DNA source in molecular epidemiological studies of pediatric CNS tumors. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21(2):105-13. doi: 10.1097/PDM.0b013e3182340a78.

38. Ferrer I, Armstrong J, Capellari S, Parchi P, Arzberger T, Bell J, Budka H, Ströbel T, Giaccone G, Rossi G, Bogdanovic N, Fakai P, Schmitt A, Riederers P, Al-Sarraj S, Ravid R, Kretschmar H. Effects of formalin fixation, paraffin embedding, and time of storage on DNA preservation in brain tissue: a BrainNet Europe study. *Brain Pathol.* 2007;17(3):297-303. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00073.x.
39. Ferruelo A, El-Assar M, Lorente JA, Nin N, Peñuelas O, Fernández-Segoviano P, Gonzalez C, Esteban A. Transcriptional profiling and genotyping of degraded nucleic acids from autopsy tissue samples after prolonged formalin fixation times. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011;4(2):156-61.
40. Foroughmand AM, Jari M, Kazeminezhad SR, Abdollahi A, Ahmadi L, Heidari M. Genetic analysis of two STR loci (VWA and TPOX) in the Iranian province of Khuzestan. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(8):583-7.
41. Fox CH, Johnson FB, Whiting J, Roller PP. Formaldehyde fixation. *J HistochemCytochem.* 1985;33(8):845-53. doi: 10.1177/33.8.3894502.
42. Funabashi KS, Barcelos D, Visoná I, e Silva MS, e Sousa ML, de Franco MF, Iwamura ES. DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathol Res Pract.* 2012;208(10):584-91. doi: 10.1016/j.prp.2012.07.001.
43. Gall K, Pavelić J, Jadro-Santel D, Poljak M, Pavelić K. DNA amplification by polymerase chain reaction from brain tissues embedded in paraffin. *Int J Exp Pathol.* 1993;74(4):333-7.
44. Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, Garcia-Bragado F, Dikshit R, Boffetta P, Merletti F. Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 365 samples. *Pathology.* 2007;39(3):345-8. doi: 10.1080/00313020701329757.
45. Gino S, Varacalli S, Robino C, Torre C. STR typing of fixed human tissue: formalin vs. alcohol-based method. *International Congress Series.* 2004;1261:611-612. [https://doi.org/10.1016/S0531-5131\(03\)01660/1](https://doi.org/10.1016/S0531-5131(03)01660/1).
46. Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *BiochemBiophys Res Commun.* 1985;130(1):118-26. doi: 10.1016/0006-291x(85)90390-0.
47. Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *An introduction to Forensic Genetics.* Wiley; 2007.
48. Gouveia GR, Ferreira SC, Siqueira SAC, Pereira J. Nucleic Acids Extraction from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. In: Larramendy ML, Soloneski S, editor. *Nucleic Acids-From Basic Aspects to Laboratory Tools.* IntechOpen: 2016;27-36.
49. Gouveia GR, Ferreira SC, Ferreira JE, Siqueira SA, Pereira J. Comparison of two methods of RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *Biomed Res Int.* 2014;2014:151724. doi: 10.1155/2014/151724.
50. Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1991b;1(1):46-50. doi: 10.1101/gr.1.1.46.
51. Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *Am J Clin Pathol.* 1991a;95(2):117-24. doi: 10.1093/ajcp/95.2.117.
52. Greer CE, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Appl.* 1994;3(6):S113-22. doi: 10.1101/gr.3.6.s113.
53. Grizzle WE. Special symposium: fixation and tissue processing models. *Biotech Histochem.* 2009;84(5):185-93. doi: 10.3109/10520290903039052.
54. Groelz D, Sobin L, Branton P, Compton C, Wyrich R, Rainen L. Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: a comparison of histology and RNA quality. *Exp Mol Pathol.* 2013;94(1):188-94. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.07.002.
55. Gunn A. *Essential forensic biology.* 3rd ed. John Wiley and Sons; 2019.

56. Hamamoto R, Komatsu M, Takasawa K, Asada K, Kaneko S. Epigenetics Analysis and Integrated Analysis of Multiomics Data, Including Epigenetic Data, Using Artificial Intelligence in the Era of Precision Medicine. *Biomolecules*. 2019;10(1):62. doi: 10.3390/biom10010062.
57. Hamazaki S, Koshiba M, Habuchi T, Takahashi R, Sugiyama T. The effect of formalin fixation on restriction endonuclease digestion of DNA and PCR amplification. *Pathol Res Pract*. 1993;189(5):553-7. doi: 10.1016/S0344-0338(11)80365-1.
58. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, Goralski TJ, Langmore JP, Raja RG, Williams PM, Palma JF, Warrington JA. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(12):1929-35. doi: 10.1043/1543-2165-132.12.1929.
59. Hoffman EA, Frey BL, Smith LM, Auble DT. Formaldehyde crosslinking: a tool for the study of chromatin complexes. *J Biol Chem*. 2015;290(44):26404-11. doi: 10.1074/jbc.R115.651679.
60. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014;70(1):12-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2014.01.022.
61. http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html.
62. Hu N, Cong B, Li S, Ma C, Fu L, Zhang X. Current developments in forensic interpretation of mixed DNA samples (Review). *Biomed Rep*. 2014;2(3):309-316. doi: 10.3892/br.2014.232.
63. Inoue T, Nabeshima K, Kataoka H, Koono M. Feasibility of archival non-buffered formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification: an analysis of resected gastric carcinoma. *Pathol Int*. 1996;46(12):997-1004. doi: 10.1111/j.1440-1827.1996.tb03580.x.
64. Issan Y, Avlas O, Daniel O. Investigation of Different Ways in Which the CODIS 7.0 May be Used in Mass Disaster Identification. *J Forensic Sci*. 2019;64(3):852-856. doi: 10.1111/1556-4029.13915.
65. Janecka A, Adamczyk A, Gasińska A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Anal Biochem*. 2015;476:8-10. doi: 10.1016/j.ab.2015.01.019.
66. Jarcho J. Restriction fragment length polymorphism analysis. *Curr Protoc Hum Genet*. 2001;Chapter 2:Unit 2.7. doi: 10.1002/0471142905.hg0207s01.
67. Johansen IS, Thomsen VØ, Forsgren A, Hansen BF, Lundgren B. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. *J Mol Diagn*. 2004;6(3):231-6. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60515-6.
68. Kazazian HH Jr, Moran JV. Mobile DNA in Health and Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(4):361-370. doi: 10.1056/NEJMra1510092.
69. Kiernan JA. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*. 2000;8(1):8-13. doi:10.1017/S1551929500057060.
70. Klopffleisch R, Weiss AT, Gruber AD. Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *HistolHistopathol*. 2011;26(6):797-810. doi: 10.14670/HH-26.797.
71. Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol Alp PannonicaAdriat*. 2015;24(3):47-53. doi: 10.15570/actaapa.2015.12.
72. Kocjan BJ, Hošnjak L, Poljak M. Detection of alpha human papillomaviruses in archival formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue specimens. *J Clin Virol*. 2016;76 Suppl 1:S88-S97. doi: 10.1016/j.jcv.2015.10.007.

73. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW. Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreserv Biobank*. 2013;11(2):101-6. doi: 10.1089/bio.2012.0052.
74. Kowalczyk M, Zawadzka E, Szewczuk D, Gryzińska M, Jakubczak A. Molecular markers used in forensic genetics. *Med Sci Law*. 2018;58(4):201-209. doi: 10.1177/0025802418803852.
75. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 2011;470(7333):187-97. doi: 10.1038/nature09792.
76. Lee HC, Ladd C, Bourke MT, Pagliaro E, Tirnady F. DNA typing in forensic science. I. Theory and background. *Am J Forensic Med Pathol*. 1994;15(4):269-82. doi: 10.1097/00000433-199412000-00001.
77. Lee SB, McCord B, Buel E. Advances in forensic DNA quantification: a review. *Electrophoresis*. 2014;35(21-22):3044-52. doi: 10.1002/elps.201400187.
78. Legrand B, Mazancourt Pd, Durigon M, Khalifat V, Crainic K. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Sci Int*. 2002;125(2-3):205-11. doi: 10.1016/s0379-0738(01)00641-7.
79. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. *Methods*. 2001;25(4):409-18. doi: 10.1006/meth.2001.1263.
80. Lin J, Kennedy SH, Svarovsky T, Rogers J, Kemnitz JW, Xu A, Zondervan KT. High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples deparaffinized using mineral oil. *Anal Biochem*. 2009;395(2):265-7. doi: 10.1016/j.ab.2009.08.016.
81. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
82. Lou JJ, Mirsadraei L, Sanchez DE, Wilson RW, Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Singer EJ, Mareninov S, Yong WH. A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. *Clin Biochem*. 2014;47(4-5):267-73. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.011.
83. Lu K, Ye W, Zhou L, Collins LB, Chen X, Gold A, Ball LM, Swenberg JA. Structural characterization of formaldehyde-induced cross-links between amino acids and deoxynucleosides and their oligomers. *J Am Chem Soc*. 2010;132(10):3388-99. doi: 10.1021/ja908282f.
84. Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016;14(4):264-70. doi: 10.1089/bio.2015.0064.
85. Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, Aubele M. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch*. 2012;460(2):131-40. doi: 10.1007/s00428-011-1184-9.
86. Lv Y, Li S, Li Z, Tao R, Shao Y, Chen Y. Quantitative analysis of noncoding RNA from paired fresh and formalin-fixed paraffin-embedded brain tissues. *Int J Legal Med*. 2020;134(3):873-84. doi: 10.1007/s00414-019-02210-1.
87. Madea B. *Handbook of Forensic Medicine*. 1st ed. John Wiley and sons; 2014.
88. Magalhães T, Dinis-Oliveira RJ, Silva B, Corte-Real F, Nuno Vieira D. Biological Evidence Management for DNA Analysis in Cases of Sexual Assault. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:365674. doi: 10.1155/2015/365674.

89. McCord BR, Gauthier Q, Cho S, Roig MN, Gibson-Daw GC, Young B, Taglia F, Zapico SC, Mariot RF, Lee SB, Duncan G. Forensic DNA Analysis. *Anal Chem.* 2019;91(1):673-688. doi: 10.1021/acs.analchem.8b05318.
90. Meisenberg G, Simmons WH. *Principles of Medical Biochemistry E-Book.* Elsevier Health Sciences; 2011.
91. Michaelis RC, Flanders RG, Wulff P. *A Litigator's Guide to DNA: From the Laboratory to the Courtroom.* 1st ed. Academic Press; 2008.
92. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J. Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *J HistochemCytochem.* 2006;54(3):371-4. doi: 10.1369/jhc.5B6726.2005.
93. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215.
94. Mullegama SV, Alberti MO, Au C, Li Y, Toy T, Tomasian V, Xian RR. Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:359-383. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_30.
95. Naccache SN, Greninger AL, Lee D, Coffey LL, Phan T, Rein-Weston A, Aronsohn A, Hackett J Jr, Delwart EL, Chiu CY. The perils of pathogen discovery: origin of a novel parvovirus-like hybrid genome traced to nucleic acid extraction spin columns. *J Virol.* 2013;87(22):11966-77. doi: 10.1128/JVI.02323-13.
96. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN, Lee HS. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation. *Korean J Pathol.* 2014;48(1):36-42. doi: 10.4132/KoreanJPathol.2014.48.1.36.
97. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005;19(6):229-32. doi: 10.1002/jcla.20083.
98. Nechifor-Boilă AC, Loghin A, Vacariu V, Halatîu VB, Borda A. The storage period of the formalin-fixed paraffin-embedded tumor blocks does not influence the concentration and purity of the isolated DNA in a series of 83 renal and thyroid carcinomas. *Rom J MorpholEmbryol.* 2015;56(2 Suppl):759-63.
99. Niland EE, McGuire A, Cox MH, Sandusky GE. High quality DNA obtained with an automated DNA extraction method with 70+ year old formalin-fixed celloidin-embedded (FFCE) blocks from the indiana medical history museum. *Am J Transl Res.* 2012;4(2):198-205.
100. Norbury G, Norbury CJ. DNA analysis: what and when to request? *Arch Dis Child.* 2006;91(4):357-60. doi: 10.1136/adc.2005.089219.
101. Okello JB, Zurek J, Devault AM, Kuch M, Okwi AL, Sewankambo NK, Bimenya GS, Poinar D, Poinar HN. Comparison of methods in the recovery of nucleic acids from archival formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues. *Anal Biochem.* 2010;400(1):110-7. doi: 10.1016/j.ab.2010.01.014.
102. Parsons TJ, Coble MD. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croat Med J.* 2001;42(3):304-9.
103. Pontes ML, Fondevila M, Laréu MV, Medeiros R. SNP Markers as Additional Information to Resolve Complex Kinship Cases. *Transfus Med Hemother.* 2015;42(6):385-8. doi: 10.1159/000440832.
104. Potluri K, Mahas A, Kent MN, Naik S, Markey M. Genomic DNA extraction methods using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Anal Biochem.* 2015;486:17-23. doi: 10.1016/j.ab.2015.06.029.
105. Quach N, Goodman MF, Shibata D. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin Pathol.* 2004;4(1):1. doi: 10.1186/1472-6890-4-1.

106. Rabelo-Gonçalves E, Roesler B, Guardia AC, Milan A, Hara N, Escanhoela C, Almeida J, Boin I, Zeitune JM. Evaluation of five DNA extraction methods for detection of *H. pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2014;210(3):142-6. doi: 10.1016/j.prp.2013.11.003.
107. Reid KM, Maistry S, Ramesar R, Heathfield LJ. A review of the optimisation of the use of formalin fixed paraffin embedded tissue for molecular analysis in a forensic post-mortem setting. *Forensic Sci Int*. 2017;280:181-187. doi: 10.1016/j.forsciint.2017.09.020.
108. Rich J, Dean DE, Powers RH. *Forensic Medicine of the Lower Extremity*. Humana Press; 2005.
109. Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SO, Nunes FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 2006;202(7):523-9. doi: 10.1016/j.prp.2006.02.007.
110. Sadeghipour A, Babaheidarian P. Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:253-268. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5_22.
111. Sam SS, Lebel KA, Bissailon CL, Tafe LJ, Tsongalis GJ, Lefferts JA. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 2012;208(12):705-7. doi: 10.1016/j.prp.2012.08.008.
112. Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N. A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis*. 2006;27(9):1713-24. doi: 10.1002/elps.200500671.
113. Santos MC, Saito CP, Line SR. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathol Res Pract*. 2008;204(9):633-6. doi: 10.1016/j.prp.2008.04.005.
114. Santos S, Sá D, Bastos E, Guedes-Pinto H, Gut I, Gärtner F, Chaves R. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Res Vet Sci*. 2009;86(3):421-6. doi: 10.1016/j.rvsc.2008.08.007.
115. Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, Kameya T, Natori M, Mukai K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol*. 2001;10(4):265-71. doi: 10.1097/00019606-200112000-00009.
116. Sedláček Z, Duspivová R. Use of DNA analysis in medicine. *Cas Lek Cesk*. 1992;131(12):357-63.
117. Seiler C, Sharpe A, Barrett JC, Harrington EA, Jones EV, Marshall GB. Nucleic acid extraction from formalin-fixed paraffin-embedded cancer cell line samples: a trade off between quantity and quality? *BMC Clin Pathol*. 2016;16:17. doi: 10.1186/s12907-016-0039-3.
118. Sengüven B, Baris E, Oygur T, Berktas M. Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Int J Med Sci*. 2014;11(5):494-9. doi: 10.7150/ijms.8842.
119. Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D, Lim H, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J HistochemCytochem*. 2002;50(8):1005-11. doi: 10.1177/002215540205000802.
120. Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G, Lawlor RT, Scarpa A. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS One*. 2013;8(6):e62692. doi: 10.1371/journal.pone.0062692.
121. Skage M, Schander C. DNA from formalin-fixed tissue: extraction or repair? That is the question. *Marine Biology Research*. 2007; 3(5): 289:295. doi:10.1080/17451000701473942.

122. Smolle M, Workman JL. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(1):84-97. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.08.008.
123. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*. 2002;161(6):1961-71. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64472-0.
124. Stanta G. *Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany; 2011. doi:10.1007/978-3-642-17890-0_1.
125. Tan SC, Yip BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol*. 2009;2009:574398. doi: 10.1155/2009/574398.
126. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK, Ranganathan K. Chemical and physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(3):400-5. doi: 10.4103/0973-029X.102496.
127. Thyagarajan B, Anderson KE, Kong F, Selk FR, Lynch CF, Gross MD. New approaches for genotyping paraffin wax embedded breast tissue from patients with cancer: the Iowa women's health study. *J Clin Pathol*. 2005;58(9):955-61. doi: 10.1136/jcp.2004.023374.
128. Todorović D, Vitošević K, Todorović M, Slović Ž. Formalin Fixation of Human Healthy Autopsied Tissues: The Influence of Type of Tissue, Temperature and Incubation Time on the Quality of Isolated DNA. *Ser J Exp Clin Res*. 2019. doi: 10.2478/sjecr-2019-0020.
129. Todorović M, Todorović D. *Biološki tragovi i analiza molekula DNK*. Fakultet medicinskih nauka, Kragujevac; 2019.
130. Tsai C. *Comparing DNA Damage Caused by Formaldehyde, Glutaraldehyde, Carnoy's and Methacarn in Cancer Tissue Fixations*. Electronic Thesis or Dissertation. Bowling Green State University, 2006. <https://etd.ohiolink.edu/>.
131. Turashvili G, Yang W, McKinney S, Kalloger S, Gale N, Ng Y, Chow K, Bell L, Lorette J, Carrier M, Luk M, Aparicio S, Huntsman D, Yip S. Nucleic acid quantity and quality from paraffin blocks: defining optimal fixation, processing and DNA/RNA extraction techniques. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):33-43. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.09.013.
132. 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*. 2018b;120(8):780-788. doi: 10.1016/j.acthis.2018.09.005.
133. Vitošević K, Todorović D, Slović Ž, Živković Zarić R, Todorović M. Forensic genetics and genotyping. *Ser J Exp Clin Res*. 2018a;20(2):75-86. doi:10.1515/SJECR-2016-0074.
134. Wang JH, Gouda-Vossos A, Dzamko N, Halliday G, Huang Y. DNA extraction from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded human brain tissue. *Neurosci Bull*. 2013;29(5):649-54. doi: 10.1007/s12264-013-1379-y.
135. Wang W, Kumar P, Schwarz M, Malone G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40-year-old paraffin-embedded tumor-tissues - comparison of 4 different DNA extraction and purification methods. *Int J Oncol*. 1994;5(3):453-7. doi: 10.3892/ijo.5.3.453.
136. Yang Y, Xie B, Yan J. Application of next-generation sequencing technology in forensic science. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014;12(5):190-7. doi: 10.1016/j.gpb.2014.09.001.
137. Ziętkiewicz E, Witt M, Daca P, Zebracka-Gala J, Goniewicz M, Jarząb B, Witt M. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. *J Appl Genet*. 2012;53(1):41-60. doi: 10.1007/s13353-011-0068-7.
138. Zsikla V, Baumann M, Cathomas G. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J Clin Pathol*. 2004;57(6):654-6. doi: 10.1136/jcp.2003.013961.

БИОГРАФИЈА

Др Катарина Витошевић је рођена 9.03.1983. 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 запошљена 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.

БИБЛИОГРАФИЈА

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.
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.
3. **Vitošević K**, Todorović D, Slović Ž, Živković Zarić R, Todorović M. Forensic genetics and genotyping. *Ser J Exp Clin Res.* 2018 Feb;20(2):75-86. doi:10.1515/SJECR-2016-0074.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Катарина М. Витошевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција

која је одбрањена на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 18.3.2021. године,



потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Катарина М. Витошевић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Утицај формалина и парафинског блока на фрагментацију молекула ДНК у хуманим ткивима изузетих приликом извођења судскомедицинских обдукција

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

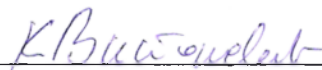
не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 18.3.2021. године,



потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>