

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На X редовној седници Наставно-научног већа Биолошког факултета Универзитета у Београду, одржаној 08.09.2017. године, прихваћен је извештај ментора доц. др Душана Кецкаревића о урађеној докторској дисертацији Лане Остојић, дипломираног молекуларног биолога и физиолога, форензичара и истраживача у лабораторијама Канцеларије главног судско-медицинског вештака (енг. *Office of the Chief Medical Examiner*), града Њујорка, под насловом „**Квалитативна и квантитативна анализа хуманих биолошких трагова минималних граничних количина у форензичким анализама ДНК**”, и одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације у саставу: др Душан Кецкаревић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Милице Кецкаревић-Марковић, доцент Биолошког факултета Универзитета у Београду, др Миљана Кецмановић, доцент Биолошког факултета у Београду и др Драгана Згоњанин-Босић, научни сарадник Медицинског факултета у Новом Саду.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Већу подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији:

Докторска дисертација Лане Остојић под насловом „**Квалитативна и квантитативна анализа хуманих биолошких трагова минималних граничних количина у форензичким анализама ДНК**” урађена је у лабораторијама за науку и развој департмана за форензичку биологију Канцеларије главног судско-медицинског вештака (енг. *Office of the Chief Medical Examiner*), града Њујорка, уз финансијску подршку Националног института правосуђа (енг. *National Institute of Justice*), Сједињених Америчких Држава.

Докторска дисертација садржи 99 страна. Подељена је на уобичајена поглавља: **Увод** (14 страна); **Циљеви рада** (1 страна); **Материјал и методе** (19 страна); **Резултати** (36 страна); **Дискусија** (11 страна); **Закључци** (2 стране); **Литература** (13 страна), као и **Листу скраћеница** (3 стране). Дисертација садржи 15 слика (2 у поглављу Увод и 13 у поглављу Резултати) и 5 табела (5 у поглављу Резултати). У поглављу Литература је цитирано 211 библиографских јединица. Дисертација је написана на енглеском језику и садржи Сажетак, Захвалницу, Садржај као и Листу скраћеница. На крају дисертације су приложена следећа документа: Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације:

У **Уводу** кандидаткиња Лана Остојић даје јасан преглед података из научне литературе који се односе на проблематику докторске дисертације.

Кандидаткиња нас најпре упознаје са општим карактеристикама маркера који се користе у форензичким анализама ДНК, историјату њиховог открића и употребе, те наводи и остале области њихове примене. Описује како је са открићем нових маркера паралелно текао и развој мултиплекс комплета хемикалија који омогућавају симултану амплификацију више маркера са циљем добијања више информација, као и развој ДНК базе података која би омогућила размену информација на националном и интернационалном нивоу. У поглављу „Биолошки трагови са лица места“ (енг. „*Crime scene biological samples*“) наведене су врсте биолошког материјала које се често проналазе на местима злочина. При томе, посебно су апострофиране орожалне ћелије коже које су остављене на објекту са којим је извршен контакт, које се карактеришу минималним количинама ДНК материјала из којих постојеће методе анализе често не резултују у утврђивању комплетног ДНК профила. Поглавље „Контактни трагови“ (енг. „*Touched samples originating from skin*“) описује грађу коже те наводи разлоге зашто се мале количине ДНК најчешће проналазе у овим врстама биолошких узорака од чега је најзначајнији процес кератинизације уз лизирање ћелијских органела и једра. При томе се као извор значајних количина ДНК у овим узорцима наводи ванћелијска ДНК ослобођена руптуром бројних ћелија. У поглављу „ДНК анализе контактних трагова“ (енг. „*DNK testing of touched samples*“) описане су стратегије које донекле могу да успеше анализу ДНК материјала из ћелија коже које резултују често недовољно комплетним профилима, као и стохастичке ефекте и могућност контаминације које наведене стратегије повлаче са собом. Друге врсте проблема које се срећу у форензичком ДНК тестирању, као што су присуство инхибитора у узорку или деградованост ДНК, те утицај спољашњих фактора на очуваност ДНК молекула, детаљно су описани у поглављу „Проблеми у форензичким анализама ДНК“ (енг. „*Difficulties in forensic DNA profiling*“). Поглавља „Контрола квалитета и мере предострожности при интерпретацији резултата анализе контактних трагова“ (енг. „*Quality control and interpretation measures taken with touched sample*“) и „Стратегија анализе контактних трагова Канцеларије главног судско-медицинског вештака града Њујорка“ (енг. „*NYC OCME strategy to test touched samples*“) описују мере предострожности примењене у раду са „осетљивим“ контактним траговима те неке од начина превазилажења проблема који се јављају у анализи ових трагова као што су повећан број ПЦР циклуса, измењени услови електрофорезе и сл. На крају се подвлачи значај добијање ДНК профила из оваквих врста биолошких узорака. У последњем поглављу „Биолошке мешавине пореклом из контактних трагова“ (енг. „*Touched biological mixtures*“) наведено је да су најчешће узорци са места злочина мешавине ДНК пореклом од различитих особа, минималних, граничних количина често деградоване ДНК, те да су ове врсте биолошких узорака и најкомпликованије за интерпретацију и издвајање ДНК профила појединачних донора. У овом поглављу се, такође, наводе и неке од метода микроманипулације са којима би се могле одвојити појединачне ћелије, чиме би се потенцијално решио проблем биолошких мешавина и које би тако водила ка утврђивању ДНК профила појединачних донора и лакшој интерпретацији присутних мешавина ћелија пореклом од више различитих особа.

На основу представљених литературних података, постављени су следећи **Циљеви** истраживања ове докторске дисертације: 1) пронаћи начине изолације максималне могуће количине ДНК материјала из хуманих биолошких

трагова, 2) испитати употребу техника микроманипулације и раздвајања ћелија ради поједностављења интерпретације биолошких мешавина.

У оквиру поглавља **Материјал и методе** кандидаткиња је детаљно описала све фазе експерименталног рада. У почетном делу су наведени типови биолошких узорака (епителне ћелије букалне слузнице, сперматозоиди и ћелије коже испитане у траговима отисака прста) тестираних у овој студији, начини њихове припреме за методе микроманипулације, као и процедура прикупљања трагова отисака прста са циљем истраживања карактеристика узорака са минималним, граничним количинама ДНК. Даље се описује поступак остављања и потом **подизања** трагова отисака прста са различитих материјала након протока одређеног (различитог) временског периода како би се испитао њихов ефекат на деградацију молекула ДНК. У овом делу, наводе се и начини креирања мешавина биолошких трагова. Даље, у овом поглављу описани су принципи и процедуре за издвајање засебних ћелија методама микроманипулације и њихову анализу. Детаљно су описане врсте уређаја и материјала коришћених како би се испитали адекватни начини мануелне одвајања ћелија. У продужетку се наводе и лепљиве траке као алтернативни начин преноса биолошког материјала са већих физичких објеката чије димензије спречавају постављање под микроскоп са циљем директне визуализације ћелија. Како би се испитала ефикасност изолације ћелија, поред мануелног пута, описана је роботска изолација (*aureka*[®] манипулатор) и изолација ћелија коришћењем ласерске технологије (*P.A.L.M.*[®] микроскопијом). Даље је детаљно описан експериментални поступак анализе ДНК поређењем различитих протокола за изолацију ДНК, различитих комплета за умножавање ДНК и услова капиларне електрофорезе све у циљу оптимизације протокола за што успешнију анализу ДНК материјала изолованог из узорака са граничним количинама ДНК. У завршном делу овог поглавља описани су протоколи за интерпретацију резултата из узорака који садрже ДНК пореклом од једне особе или узорака прикупљених из биолошких мешавина, те начин статистичке обраде добијених података.

У поглављу **Резултати** добијени експериментални подаци су подељени у логично организоване целине, јасно представљени сликама и табелама уз примену одговарајуће статистичке обраде. Представљање резултата ове докторске дисертације започиње описом поступка препознавања ћелија у узорку употребом ћелијског бојења или само на основу морфологије. При томе су дати јасни разлози због којих се контактни трагови односно отисци прстију не излажу овим процедурама. Даље је детаљно описана процена различитих физичких објеката и медијума коришћених ради успостављања мануалних метода одвајања ћелија, те компатибилности медијума са даљим процесом анализе (комплетима хемикалија за ПЦР). Наводе се методе роботске и ласерске манипулације, и резултати процене адекватности наведених техника микроманипулације. Као метод избора, за подизање ћелија наводи се подизање са медијумом (микросфером) синтетисаним од арабичне смоле помешане са глицеролом ношеним врхом тунгстен игле, и то мануелно или роботским манипулатором, *aurekom*[®], као и ласерски пут помоћу *P.A.L.M.*[®] микроскопа. За прикупљање ћелија присутних у већем броју, као што је скупљање ћелија из отиска прста кандидат је опредељен за „*rubber cement*“ медијум или памуком, и то искључиво мануелним или роботским путем. При тестирању лепљивих трака,

трака „*SIRCHIE*“ се показала најадекватнијом за пренос ћелија са површина објеката који се не могу поставити под микроскоп у циљу директне визуализације ћелијске манипулације.

У следећем делу су дати резултати упоређења различитих процедура скидања брисева, изолације ДНК и умножавања ПЦР-ом, како би се пронашао протокол који који највише одговара анализи узорака са минималним граничним количинама ДНК у форензичким анализама. Као репрезентативна врста узорка са минималним граничним те варијабилним количинама ДНК коришћен је отисак прста. Поређење скидања брисева са водом или раствором детерџента није дало разлике. Даље су поређене три врсте изолације (две *in house* методе, метода у једној туби, и протокол високе сензитивности, те коришћење комерцијалног *Zygem* комплета) и три протокола умножавања ПЦР-ом (коришћењем *Identifiler*, 28-ИД28 или 31-ИД31 циклус, или *Identifiler+*, ИД+, комплета хемикалија). Анализом преко 700 отисака утврђен је протокол са највећом вероватноћом добијања ДНК профила употребљивих за форензичка поређења и унос у ДНК базу података (дефинисан као >70% комплетан профил) који се састојао од коришћења *Zygem* комплета и ИД31 протокола.

Анализом резултата квантификације изолата из отисака прста уочена је асоцијација изолата са већом концентрацијом од 2pg/μl и употребљивости ДНК профила. Тако су узорци са квантификацијом већом од 20pg/μl резултовали комплетним, а они изнад 10pg/μl са профилима подобним за унос у базу података (бар 70% комплетни), док се употребљивост профила смањује са даљим опадањем концентрације, да би концентрације испод 2pg/μl давале непоуздане резултате.

Детаљном анализом остављених отисака, добровољни даваоци су карактерисани као „сејачи“ ћелија са оценама 1-5. Поређењем ових оцена и резултата анализе ДНК профила трагова није уочена асоцијација. Даљим анализама отисака прста, констатују се, потом, и разлике између леве и десне руке у количини ћелија које се остављају додиром, односно износи резултат који указује да се мање комплетних профила очекује од трагова остављених више коришћеном руком.

У овој тези испитивана је и веза квалитета ДНК профила и времена које протекне од остављања отиска до његовог тестирања, односно опадање квалитета ДНК профила са временом. Као резултат наводи се да, иако је добијање употребљивих профила могуће и после 40 дана, количина оваквих профила значајно мања након протока времена (10, 20 и 40 дана) у односу на време одмах након остављања (1-3 дана). На тај начин сугерише се обрада предмета са лица места у што краћем временском интервалу након изузимања.

Конечно, у тези се утврђује и ефекат различитих врста материјала на које се наноси отисак прста на квалитет ДНК профила, где се метал у кованом новцу издваја као могућа препрека процесу ДНК анализе, а стакло истиче као најподобнија подлога за потоњу ДНК анализу, у односу на пластику и папир, редом.

Потенцијалне биолошке мешавине су анализирани на моделу мешавине отисака остављених на стакленој боци од стране три особе. Уместо прикупљања свих ћелија са стаклене боце и формирања једног узорка, формиран је већи број мањих узорака. У већини случајева добијених ДНК профила, радило се о мешавини две особе, или је резултат ДНК анализе указивао да узорак садржи ДНК материјал од само једне особе. Овакав резултат упућује на закључак да се на наведени начин потенцијално комплексне мешавине могу лакше

интерпретирати. Аналогно, овај принцип се успешно може применити и на мешавине ћелија истог типа (епителне ћелије слузнице или сперматозоиде), где би се формирање већег броја узорака и њиховом засебном анализом, потенцијално могли добити ДНК профили појединачних донора. Коришћењем техника микроманипулације је одређен најмањи број ћелија са једром потребних да би се добио ДНК профил употребљив за форензичка упоређења. Свега 10 епителијалних ћелија или сперматозоида је било потребно за добијање форензички употребљивог ДНК профила, при чему су резултати мануелне и роботске манипулације били конзистентнији, него ласерска манипулација кориштењем *P.A.L.M.*[®] микроскопа.

У оквиру поглавља **Дискусија** кандидаткиња је дала критички осврт на своје резултате користећи постојеће литературне податке из дате области. Први део се односи на карактеризацију методологије ДНК тестирања кроз евалуацију сваког корака, од скупљања трагова отисака прста, преко изолације молекула ДНК, до поређења различитих комплета хемикалија за умножавање ПЦР-ом. Теоријски се поткрепљују разлози коришћења поређених протокола и наводе се постојећи проблеми у форензичким анализама са узорцима који су остављени физичким контактом, као што је изузетна варијабилност у количини изоловане ДНК и комплетности анализом добијених ДНК профила. Методологија која је издвојена као најефикаснија у анализи отисака прста потврђена је и теоријским подацима који такође сугеришу минималну манипулацију узорка у поступку изолације молекула ДНК, умножавање ПЦР-ом коришћењем већег броја циклуса и тестирање узорка у триплекату како би се елиминисали стохастички ефекти и адекватно одредио изворни ДНК профил. Кандидаткиња при том констатује чак и присуство ДНК мешавина у понеким узорцима који су формиран на отisku прста једне особе, што се објашњава могућим секундарним трансфером ДНК. У односу на остале студије, ниво уочених мешавина је био прилично низак, свега ~6%, што се објашњава као резултат малих димензија тестираног узорка у виду отиска једног прста. Даље, претходне студије указивале су на разлике између индивидуа у степену орожавања коже као извор могућих разлике у квалитету ДНК профила, што овом студијом није потврђено. Наиме, микроскопском изуализацијом отисака прста различитих особа јесте потврђена разлика у количини присутних орожалих ћелија, али није уочена асоцијација са комплетношћу добијених ДНК профила. Опште је познато да ДНК материјал у биолошким траговима деградује током времена, што је овом студијом и потврђено, при чему је за период од 10 дана након остављања отиска прста уочен статистички значајан степен деградације и степен смањења добијања употребљивог ДНК профила, упркос констатацији да се ДНК профили употребљиви за форензичка поређења могу добити и након 40 дана. Анализом узорака леве и десне руке уочене су разлике у комплетности добијених ДНК профила што се тумачи „потрошњом“ ћелија потенцијалних за анализу чешћим коришћењем једне руке. Ова студија даље апострофира и зависност комплетности ДНК профила од врсте материјала на који је наношен отисак прста, при чему се стакло уочава као најподеснији материјал, а потом пластика или папир. Одсуство профила из узорака остављених отисака на кованом новцу је у складу са подацима из литературе који наводе ефекат понеких метала на инхибицију ПЦР амплификације. Анализа биолошких мешавина је вршена на моделу отисака прстију остављених од стране 3 особе на стакленој боци, где су ћелија сакупљањем као шест узорака са 6 једнако

подељених сегмената боце, уместо као један. Појединачним засебним анализама формираних узорака добијани су резултати који су били једноставнији за интерпретацију. Овакав приступ у анализи предмета са потенцијалним биолошким мешавинама водио је утврђивању чак по 2 различита ДНК профила са исте флаше добијена остављањем истих типова мешавина 3 особе. Као алтернативни начин решавања проблема биолошких мешавина који садржи ћелије са очуваним једром (епителијалне ћелије усне слузнице или сперматозоиде) користи се и директно одвајање ћелија под микроскопом и потоња ДНК анализа. Са циљем усавршавања поступка анализе, одређени су начини мануелне манипулације ћелија, и поређени са роботском и ласерком методом у циљу одређивања ефикасности одвајања ћелија, на који начин је одређен минимални броја ћелија потребних да би се добио форензички употребљив ДНК профил. Тако је 10 ћелија било потребно за успешну форензичку анализу ДНК профила, што је нижи број од претходно објављених студија. За разлику од ласерске изолације ћелија, мануелна и роботска је била мање подложна ефекту неизвесности убацивања ћелије у тубицу за ДНК изолацију, јер је, за разлику од ласерске, комплетна манипулација, од узимања ћелије са подлоге до преноса у тубу за тестирање могла бити визуелно испраћена, чиме су и резултати између појединачних узорака били конзистентнији.

Конечно, као метод преноса контактних трагова са површина које нису могле бити предмет посматрања под микроскопом због своје непокретности, тестиране су и лепљиве траке како би се одредила њихова компатибилност са ДНК тестирањем и са методама микроманипулације, и издвојен је одговарајући тип као најподеснији. Као и ова, и претходне студије истичу њихов значај и широку употребљивост у форензици као медијума за скупљања ћелија остављених контактом, као и начин смањења колекције инхибитора са подлога као што је нпр. тексас.

У поглављу **Закључци**, изведени су концизни закључци проистекли из резултата истраживања. Кандидаткиња је сумирала закључке на следећи начин: Биолошки узорци са минималним и граничним количинама ДНК показују велику непредвидивост у количинама изоловане ДНК као и комплетности ДНК профила. Кроз компаративну студију сваког корака у ДНК тестирању одређена је методологија тестирања која максимизира форензичку употребљивост узорка добијањем профила који могу да се користе у форензичким поређењима. Ефекат различитих материјала који носе отисак прста на комплетност добијених ДНК профила је тестиран како би се боље разуме приоритет предмета који се узимају у рад у форензичким лабораторијама за ДНК анализе. Најкомплетнији ДНК профили су добијени са стакла, потом пластике па папира, док метали новац вероватно због садржаја одговарајућих јона који инхибирају ДНК амплификацију није резултовао ДНК профилем. Како време које протекне од остављања отиска прста па до његовог тестирања има значајан ефекат на деградацију ДНК, сугерише се што бржа анализа форензичких узорака остављених контактом по стизању у лабораторију како би се добили што бољи резултати ДНК анализом. Биолошке мешавине су студирани на мешавини отисака прстију остављених од стране три особе на стакленој флаши. Формирање више узорака са истог предмета водило је резултатима који су углавном били или мешавине само две особе или су носиле ДНК једне индивидуе. Тиме је интерпретација комплексних биолошких мешавина, која зна

бити веома компликована, значајно поједностављена. Ефикасност издвајања ћелија са очуваним једром је испитивана поређењем мануелне, роботске изолације (*aureka*[®] манипулатор) и изолација ћелија кориштењем ласерске технологије (*P.A.L.M.*[®] микроскопијом). Као резултат ових анализа утврђен је праг од 10 епителијалних ћелија букалне слузнице или 10 сперматозоида, довољан за добијање ДНК профила употребљивог за форензичка поређења. При томе, иако су и мануална и ласерска манипулација брзе, ласерска не резултује катапултирањем ћелије увек ефикасно у екперименталну тубу што води и неконсистентним резултатима ДНК тестирања, за разлику од мануелног микроманипулатора. Користећи исти принцип формирања вишеструки узорака са ћелијама истог типа, аналогним узорцима са флаше држане од стране 3 особе, потенцијално се могу форензички решити и мешавине ћелија очуваних једара истог типа (епителијалних ћелија букалне слузнице или сперматозоида), где се формирањем већег броја узорака и њиховом засебном анализом, потенцијално могу утврдити ДНК профили појединачних донора, доприносилаца мешавини.

Завршно поглавље дисертације садржи листу коришћене **Литературе** која има 211 библиографске јединице, од којих је велики број најновијег датума. Референце су адекватно и на одговарајућим местима цитиране у тексту ове докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације:

Б1. Радови у часописима међународног значаја

1. **Ostojić L.**, Klempner S.A., Patel R.A., Mitchell A.A., Axler-DiPerte G.L., Wurmbach E., Qualitative and quantitative assessment of single fingerprints in forensic DNA analysis. *Electrophoresis*. 2014; 35 (3165-3172) **M21**
2. **Ostojić L.**, Wurmbach E., Analysis of fingerprint samples, testing various conditions, for forensic DNA identification. *Science and Justice*. 2017; 57(35-40) **M21**

Б2. Радови у часописима домаћег значаја

Б3. Конгресна саопштења на скуповима међународног значаја

1. **Ostojić L.** Assesment of fingerprints for forensic STR analysis, AAFS conference, Orlando, FL, USA, 2015
2. **Ostojic L.** Can direct PCR method improve DNA analysis of fingerprints, NEAFS conference, Hershey, PA, USA, 2014

Б4. Конгресна саопштења на скуповима домаћег значаја

Мишљење и предлог Комисије:

Увидом у докторску дисертацију Лане Остојић, Комисија са задовољством може истаћи да приказани резултати дају научни допринос у области форензичких анализа ДНК. Ова теза значајно доприноси бољем разумевању биолошких узорака са минималним количина ДНК, граничним у смислу употребљивости за форензичке анализе ДНК, који у већини случајева чине контактни трагова и упућује на начине њихове анализе. Теза апострофира технике ћелијске микроманипулације и методе формирања вишеструких ћелијских узорака из иницијалне биолошке мешавине као препоручени метод анализе оваквих трагова, на који начин чиме се отварају нове могућности за унапређење постојећих приступа у тестирањима форензички проблематичних биолошких узорака.

На основу горе изнетог, Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и предлаже Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду да прихвати овај извештај и одобри кандидату Лани Остојић јавну одбрану докторске дисертације под насловом „**Квалитативна и квантитативна анализа хуманих биолошких трагова минималних граничних количина у форензичким анализама ДНК**”.

У Београду, 07.11..2017. године.

КОМИСИЈА:

др Душан Кецкаревић, доцент
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Милица Кецкаревић-Марковић, доцент
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Миљана Кецмановић, доцент
Биолошког факултета Универзитета у Београду

др Драгана Згоњанин-Боснић, научни сарадник
Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду