

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
ФАКУЛТЕТ: Prirodno-matematički fakultet



РЕПУБЛИКА СРПСКА  
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ  
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛЕТ  
Број: 19-2539/16  
Датум: 13.09.2016. год  
БАЊА ЛУКА

## ИЗВJEШТАЈ

о оцјени подобности теме и кандидата за израду докторске тезе

### ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

На основу Odluke Nastavno-naučnog vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci, broj: 19/3. 1922/16 od 06.07.2016. godine, imenovana je Komisija za ocjenu podobnosti teme za izradu doktorske disertacije pod nazivom „Biohemijsko-hematološki i molekularni parametri u dijagnostici reumatoidnog artritisa“ i kandidata mr. Biljane Klementa.

Komisija u sastavu:

1. Dr. Hilada Nefić, redovni profesor na Univerzitetu u Sarajevu – Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Genetika, Klinička biologija, predsjednik;
2. Dr. Biljana Davidović Plavšić, docent na Univerzitetu u Banjoj Luci – Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, član;
3. Dr. Stojko Vidović, redovni profesor na Univerzitetu u Banjoj Luci – Medicinski fakultet, uža naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija, član;
4. Dr. Radoslav Dekić, vanredni profesor na Univerzitetu u Banjoj Luci – Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Fiziologija životinja, član;
5. Dr. Smiljana Paraš, docent na Univerzitetu u Banjoj Luci – Prirodno-matematički fakultet, uža naučna oblast: Mikrobiologija, biologija ćelije, član.

Састав Комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, звање, назив у же научне области за коју је изабран у звање, назив универзитета и факултета у којем је члан комисије стално запослен.

### 1. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ, НАУЧНА И СТРУЧНА ДЈЕЛАТНОСТ КАНДИДАТА

#### BIOGRAFIJA

Biljana Klementa je rođena 18.10.1962. godine u Požegi, Republika Srbija, gdje je stekla osnovno i srednje obrazovanje. Visoku stručnu spremu je postigla na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Sarajevu kada je diplomirala na Odsjeku za biologiju (opšti smjer) 2006. godine. Postdiplomski studij smjer Mikrobiologija-specijalizacija upisala je 2008. godine na Veterinarskom fakultetu u Sarajevu, te je odbranila specijalistički rad pod naslovom "Mehanizmi rezistencije *Staphylococcus aureus* na antibiotike".

Akademski stepen magistra bioloških nauka (smjer - genetika) stekla je 2014. godine na Postdiplomskom studiju bioloških nauka Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu nakon odbranjenog magistarskog rada na temu "Primjena E-testa u detekciji MRSA (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*)".

Do 2009. godine radila je u mikrobiološkoj laboratoriji Opće bolnice Sarajevo, a od 2009. godine pa do danas je na poziciji odgovornog biohemičara u Službi za laboratorijsku dijagnostiku Doma zdravlja „Omer Maslić“ u Novom Sarajevu. Stečena znanja i iskustva u oblasti biohemije i molekularne biologije je dodatno usavršila u okviru rada na međunarodnim kongresima i konferencijama iz ovih oblasti. Kandidatkinja se aktivno služi engleskim jezikom, te uspješno primjenjuje stečena znanja iz oblasti bioinformatike i relevantnih operacija općih informacionih sistema.

Kao autor/koautor publicirala je tri originalna naučna rada, od toga dva u međunarodnim naučnim časopisima od kojih je jedan indeksiran u CC bazi.

#### **Objavljeni naučni radovi**

1. Doğan S., Doğan G., Ašić A., Bešić L., Klimenta B., Hukić M., Turan Y., Primorac D., Marjanović D. Prediction of the Y-Chromosome Haplogroups Within a Recently Settled Turkish Population in Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. *Collegium antropologicum*, 2016;40(1):1–7.
2. Ibahimagić A., Idrizović E., Divjan E., Klimenta B. Prevalence and antimicrobial resistance of beta-lactamase-producing Gram-negative isolates from outpatient clinical and environmental samples in the Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina. *Journal of Health Sciences*, 2016;6(2):1–6.
3. Klimenta B., Jerković-Mujkić A., Jažić S. Analiza kretanja rezistencije na antibiotike izolata *Staphylococcus aureus* iz hiruških rana. Peti simpozij o kontorli bolničkih infekcija Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Zbornik apstrakata i radova, 2007;49–55.

#### **Učešće na naučnim skupovima**

1. Sudjelovanje na 15. stručnom sastanku medicinskih biohemičara/biokemičara Bosne i Hercegovine koji je održan 03.06.2016. godine u Sarajevu. Organizator sastanka je Udruženja medicinskih biohemičara u Bosni i Hercegovini (UMBBiH).
2. Učešće na 21<sup>st</sup> IFCC - EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EuroMedLab JIB 2015 Exhibition) održanog od 21 do 25 juna 2015. godine u Parizu. Organizator kongresa: International Federation of Clinic Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), European Federation of Clinic Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM), SFBC i Syndicat des Biologistes.
3. Učešće na 23<sup>rd</sup> Meeting of Balkan Clinical Laboratory Federation (BCLF 2015 Sarajevo Meeting) koji je održan u Sarajevu (Bosna i Hercegovina) u periodu 7-9 oktobar 2015. godine. Organizator sastanka: International Federation of Clinic Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), European Federation of Clinic Chemistry (EFLM), Balcan Clinical Laboratory Federation (BCLF) i Association of Medical Biochemists in Bosnia and Herzegovina (AMBBH).
4. Prisustvo na 2. Nacionalnom Kongresu Udruženja medicinskih biohemičara/biokemičara u Bosni i Hercegovini koji je održan 05. oktobra 2015. godine. Organizator: Udruženja medicinskih biohemičara u Bosni i Hercegovini.
5. Sudjelovanje na 22<sup>nd</sup> International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC WorldLab Istanbul 2014), 22<sup>nd</sup> Balcan Clinical Laboratory Federation Meeting (BCLF 2014) i 26<sup>th</sup> National Congress of the Turkish Biochemical Society (TBS 2014) koji su održani u periodu 22-26 juni 2014. godine u Istanbulu. Organizatori: International Federation of Clinic Chemistry and Laboratory (IFCC), Balcan Clinical Laboratory Federation (BCLF) i Turkish Biochemical Society (TBS).
6. Sudjelovanje na 12. Stručnom sastanku medicinskih biohemičara/biokemičara Bosne i Hercegovine koji je održan 18. maja 2012. godine u Sarajevu u organizaciji Udruženja

- medicinskih biohemičara u Bosni i Hercegovini (UMBBiH).
7. Učesnik na 21<sup>st</sup> International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC – WorldLab EuroMedLab Berlin 2011), 19<sup>th</sup> IFCC – EFCC European Congress of Clinic Chemistry and Laboratory Medicine i 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society of Laboratory Medicine and Clinical Chemistry koji su održanani u Berlinu (Germany) u periodu 15-18 maj 2011. godine. Organizatori: International Federation of Clinic Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC), European Federation of Clinic Chemistry (EFCC) i DGKL.
  8. Sudjelovanje na 10. Stručnom sastanku medicinskih biohemičara/biokemičara Bosne i Hercegovine koji je održan 8. maja 2009. godine u Sarajevu u organizaciji Udruženja medicinskih biohemičara u Bosni i Hercegovini (UMBBiH).

#### **Članstvo**

- Član Udruženja medicinskih biohemičara Bosne i Hercegovine od 2009. godine.
  - Član Udruženja biohemičara i molekularnih biologa Bosne i Hercegovine od 2015. godine.
  - Član Udruženja biologa zaposlenih u zdravstvu Bosne i Hercegovine od 2016. godine.
- a) Навести неопходне биографске податке: школовање, успјех у току школовања, кретање у служби, резултати научно-истраживачког или стручног рада, јавна признања, друштвене активности и познавање страних језика;
- б) У прилогу биографије доставити списак објављених научних радова.

## **2. ЗНАЧАЈ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА**

#### **Značaj istraživanja**

Autoimunost se definiše kao imuni odgovor na sopstvene (autologe) antigene. Poremećaji koji su izazvani ovakvim odgovorom se nazivaju autoimune bolesti. Osnovni faktori u razvoju autoimunosti su naslijedeni geni podložnosti koji doprinose otkazivanju autotolerancije i faktori spoljašnje sredine, kao što je infekcija, koji mogu da aktiviraju autoreaktivne limfocite. Reumatoidni artritis (RA) je hronična i sistemska autoimuna bolest. Dijagnostički indikatori i markeri na osnovu kojih se procjenjuje težina bolesti kod pacijenata sa reumatoidnim artritism su prisustvo C reaktivnog proteina (CRP, engl. C reactive protein), stopa sedimentacije eritrocita (ESR, erythrocyte sedimentation rate) i reumatoidni faktor (RF, engl. rheumatoid factor). Nivo CRP je često povećan i povezan je sa težinom bolesti kod RA.

Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC, engl. major histocompatibility complex) je najpolimorfnnji genski sistem čovjeka. Iako geni i antigeni ovog sistema imaju važnu ulogu u imunopatogenezi autoimunih bolesti, HLA tipizacija se ne koristi rutinski u dijagnostici ovih bolesti. HLA tipizacija se izvodi na dva nivoa, antigenskom i genskom. Antigeni HLA određuju se serološkom metodom (testom mikrolimfocitotoksičnosti, MLCT) koja daje uvid u polimorfizam na nivou membranskih proteina dok se geni HLA određuju metodama molekularne biologije koje se temelje na PCR-u.

Većina autoimunih bolesti je vezana za pojedine haplotipove molekula HLA klase II. Međutim, relativni rizik od pojave određene autoimune bolesti razlikuje se iako se pojavljuje u bolesnika sa istim haplotipovima HLA što ukazuje na kompleksni mehanizam ekspresije bolesti. Molekularna tipizacija sistema HLA na nivou DNK otkriva da je predispozicija za pojavu određene autoimune bolesti posljedica kompleksne interakcije gena za podložnost i protektivnih gena unutar istog serološkog haplotipa HLA (Sertić et al., 2015). HLA tipizacija je od velike pomoći u postavljanju i potvrđivanju definitivne dijagnoze kod autoimunih bolesti.

HLA genotipizacija pacijenata i kontrolnih osoba će se vršiti metodom lančane reakcije polimeraze s

prajmerima specifičnim za određenu sekvencu DNK (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*, PCR-SSP). PCR-SSP tehnika je visokosenzitivna, specifična i može se izvoditi na starijim uzorcima što se ne može postići sa MLC te se uvodi kao rutinsko testiranje u HLA tipizaciji. Uloga genetičkih faktora u etiologiji reumatoidnog artritisa utvrđena je otkrićem povezanosti bolesti sa klasom II MHC kompleksa. Stastny (1978) je prvi utvrdio da je RA povezan sa HLA-DRw4 (serološka grupa) dok su kasnije studije potvratile povezanost sa HLA-DRB1\*04 genskom varijantom. Ova povezanost je uočena u mnogim populacijama dok je u drugim etničkim skupinama utvrđena veza između različitih varijanti HLA-DRB1 genskog lokusa i RA, koje mogu da se javljaju zajedno sa HLA-DRB1\*04 ili pojedinačno. S druge strane, opisane su genske varijante koje su negativno povezane sa razvojem RA, kao npr. HLA-DRB1\*07, HLA-DRB1\*08 i DRB1\*13, te se smatra da imaju protektivnu ulogu u sprečavanju nastanka reumatoidnog artritisa.

#### **Autoimune bolesti**

Autoimune bolesti su posljedica imunoreakcije protiv vlastitih antigena. Djelovanje antitijela ka sopstvenim (autologim) antigenima i aktivacije autoreaktivnih T limfocita dovode do oštećenja ćelija i tkiva vlastitog organizma (Janeway et al., 2005). Imuni sistem posredovan brojnim ćelijama i molekulama omogućava održavanje antigenske i genske homeostaze. Ovi mehanizmi su odgovorni za jedno od glavnih svojstava imunog sistema, sposobnost razlikovanja sopstvenih od stranih antigena. Autoimune bolesti se ubrajaju među najznačajnije u kliničkoj imunologiji. Do sada etiologija ovih oboljenja nije poznata. Procjenjuje se da najmanje 1 – 2% boluje od autoimunih bolesti (Abbas et Lichtman, 2006a). Saznanja o nastaku ovih oboljenja onemogućavaju činjenice da su ove bolesti najčešće heterogene i multifaktorske. Sopstveni antigeni koji su pokretači i ciljne molekule autoimunih reakcija često nisu poznati i ove bolesti se klinički ispoljavaju najčešće znatno kasnije od započinjanja autoimunih reakcija.

U razvoju rizika za nastanak autoimunosti utiču brojni faktori. Genetičku predispoziciju za nastanak tih bolesti čini nekoliko grupe gena. Tu spadaju geni MHC, odnosno HLA, geni antigenospecifičnog receptora limfocita T (TCR, engl. *T cell antigen receptor*) i limfocita B (BCR, engl. *B cell receptor*), geni za imunoglobuline, geni odgovorni za transport i predočivanje antigena, geni za komponente komplementa, spolno vezani geni i citokinski geni. Istraživanja bazirana na analizi genoma ukazuju da su ove bolesti povezane sa mnogobrojnim genskim lokusima (Sertić et al., 2015). Rezultati brojnih studija pokazali su da je kod većine autoimunih bolesti genetička predispozicija povezana sa genima koji kodiraju sintezu HLA antigena (Caillat-Zucman, 2008). Genska predispoziranost u interakciji sa faktorima spoljašnje sredine kao što su infekcije mogu da aktiviraju autoreaktivne mehanizme imunog sistema. Do sada nije jasno koji tip infekcije inducira ili inhibira autoimunu reakciju. Autoimunost može da bude rezultat produkcije antitijela protiv spostvenih antigena kao posljedica prekida autotolerancije.

Reumatoidna oboljenja, u najširem smislu, su bolesti lokomotornog sistema (kostiju, zglobova, mišića i okolnih struktura), degenerativne, inflamatorne (infekcijske ili autoimune) ili metaboličke prirode, a često zahvataju i druge organe i organske sisteme. Nastanak ovih oboljenja je nedovoljno razjašnjen, patogeneza je djelimično izučena, a klinički tok bolesti je najčešće hroničan i progresivan. Smatra se da 10 – 20% svjetskog stanovništva ima neko prolazno ili trajno reumatsko oboljenje (Dieppe et Paine, 1994; Bolumar et al., 1994). Od reumatoidnih bolesti, samo u SAD 1995. godine, boarlovalo je oko 40 miliona ljudi, a smatra se da će 2020. godine oko 60 miliona američkog stanovništva imati neku reumatoidnu bolest (American College of Rheumatology 1996). Prema važećoj podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), reumatoidne bolesti su podjeljene u grupe: degenerativne reumatoidne bolesti, vanzglobne reumatoidne bolesti, upalne reumatoidne bolesti, metaboličke reumatoidne bolesti, infekcijske reumatoidne bolesti, rijetke reumatoidne bolesti, reumatoidne bolesti sa reumatoidnim manifestacijama. Među upalnim reumatoidnim bolestima najčešći je reumatoidni artritis.

#### **Reumatoidni artritis**

Reumatoidni artritis je sistemska bolest vezivnog tkiva sa incidencijom od 0,5% na 1000 žena i 0,2% na 1000 muškaraca (2 – 3 puta je češći kod žena nego kod muškaraca) i prevalencijom kod bijelaca (SAD i Evropa) od 0,5 do 1% opšte populacije starije od 15 godina, a u pojedinim dijelovima SAD čak do 1,5%. (Popović et al. 2000). Taj odnos između muškaraca i žena se održava u svim

decenijama života (poslije 20. godine) sa nešto učestalijom pojavom bolesti kod žena poslije 50. godine života (Silman et al., 1993; Jones et al., 1996). U poređenju sa opštom populacijom, osobe koje imaju srodnike oboljele od RA su u većem riziku za nastanak ove bolesti (rizik po srodnike je veći za 2 do 17 puta od pojedinaca iz opšte populacije). Studije iz četiri američka centra, rađena tokom 1994. godine, provedene na 3501 bolesniku sa reumatoidnim artritisom, pokazuju da je i stepen mortaliteta ovih bolesnika najmanje dvostruko veći u odnosu na zdravu populaciju (Gabriel et al., 1995).

Zdrav organizam kontrolira i ograničava upalne procese, ali kod reumatoidnog artritisa, izvjesni poremećaji imunog sistema podržavaju ovaj proces i dovode do brojnih kliničkih i patoloških manifestacija. Poznato je da se imunopatološki proces u sinoviji odvija u pet faza (Harris, 1990): prezentacija i prepoznavanje nepoznatog antiga; proliferacija T i B ćelija, angiogeneza; proliferacija sinovijalnih ćelija, prezentacija citokina; formiranje panusa, aktiviranje hondrocyta i metaloproteinaza, početna destrukcija zgloba; destrukcija hrskavice.

Prema kriterijima *American Rheumatism Association* (danas *American College of Rheumatology*), nakon što se uspostavi dijagnoza reumatoidnog artritisa, dodatne pretrage mogu da ukažu na komplikacije ili neočekivane promjene. Analize krvne slike i diferencijalne krvne slike potvrđuju da je kod većine osoba prisutna blaga anemija, a u 1 – 2% slučajeva nalazi se neutropenijska. Reaktanti akutne faze, ubrzana sedimentacija i visok C reaktivni protein, upućuju na održavanje aktivnosti procesa kod oboljelih od reumatoidnog artritisa.

Uzrok nastanka reumatoidnog artritisa je još uvjek nedovoljno istražen iako je postignut znatan napredak u razmijevanju patogeneze ove bolesti. Pošto se javlja širom svijeta, pretpostavlja se da su "okidači" bolesti ubikvitarni mikroorganizmi. Oštećenja tkiva u toku ovih infekcija mogu dovesti do narušavanja mehanizma tolerancije. Reumatoidni artritis ima multifaktorsku etiologiju, najvjerojatnije sa oligogenom predispozicijom domaćina, koja je u interakciji sa okidačem iz vanjske sredine (Coenen et Gregersen, 2009). Genetska komponenta odgovorna je za 50 – 60% ukupne podložnosti RA, a među svim genetskim faktorima trećinu zauzima HLA kompleks. Većina autoimunih bolesti je vezana za pojedine haplotipove molekula HLA klase II.

Geni povezani s rizikom pojave RA povezuju se i s razvojem autoimunih bolesti kao što su Crohnova bolest, celjakija, primarna bilijarna ciroza, šećerna bolest tipa 1 i multipla skleroza (Čulić et al., 2016).

#### Biohemijsko-hematoški parametri

Do danas nije pronađen specifičan biohemski ili imunološki pokazatelj koji je specifičan za reumatoidni artritis. Relativnu specifičnost ima prisustvo reumatoidnih faktora u perifernoj krvi i sinovijalnoj tečnosti. Međutim, pouzdaniji pokazatelj da je u pitanju RA je C reaktivni protein koji se može otkriti u uzorcima krvi. Pojedini laboratorijski testovi služe jedino za praćenje aktivnosti i terapijskog efekta u reumatoidnom artritisu.

U dijagnosticiranju reumatoidnog artritisa se često koriste krvne pretrage, jer je krv tkivo do kojeg se najlakše i najsigurnije dolazi. Ove pretrage obuhvataju analize koje su usmjerene na ispitivanje vrste, broja, odnosa i izgleda ćelijskih elemenata krvi (krvna slika, hematoški parametri) i analize kojima se provjerava biohemski sastav krvi. Kompletna krvna slika (CBC, engl. *Complete Blood Count*) uključuje broj eritrocita (RBC, engl. *Red Cell Blood*), leukocita (WBC, engl. *White Cell Blood*) i trombocita (PLT, engl. *Platelet*), eritrocitne konstante [prosječni volumen eritrocita (MCV, engl. *Mean Cell Volume*), prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH, engl. *Mean Cell Hemoglobin*), prosječna koncentracija hemoglobina na litar eritrocita (MCHC, engl. *Mean Cell Hemoglobin Concentration*)], mjera varijabilnosti veličine eritrocita (RDW, engl. *Red Cell Distribution Width*), trombocitne konstante [prosječni volumen trombocita (MPV, engl. *Mean Platelet Volume*), raspodjela trombocita po volumenu (PDW, engl. *Platelet Distribution Width*)], diferencijalnu krvnu sliku [podvrste leukocita: neutrofili (NEU, engl. *neutrophil*), eozinofili (EOS, engl. *eosinophil*), bazofili (BASO, engl. *basophil*), monociti (MONO, engl. *monocyte*), limfociti (LYM, engl. *lymphocyte*)], hemoglobin (HGB, engl. *hemoglobin*) i hematokrit (HCT, engl. *hematocrit*).

Dijagnoza reumatoidnog artritisa se temelji i na određivanju brzine sedimentacije eritrocita (ESR, engl. *Erythrocyte Sedimentation Rate*). Značajan biohemski parametar predstavlja koncentracija C reaktivnog proteina (CRP, engl. *C reactive Protein*). Druge krvne pretrage obuhvataju prisustvo

reumatoidnog faktora (RF, engl. *Rheumatoid Factor*) i antitijela na citrulinirane peptide (Anti-CCP, engl. *anti-cyclic citrullinated peptide*).

Povećan broj leukocita može ukazivati na upalni proces koji je uzrokovani sa RA. Upalni procesi u organizmu mogu dovesti do pojave proteina u krvi koji sljepljuju eritrocite koji se nakon toga brže talože od normalnih krvnih ćelija. S obzirom da upalu mogu izazvati i druga stanja, sama ESR pretraga se ne koristi za dijagnozu RA. ESR i C reaktivni protein su nespecifični RA parametri upale. Oba testa se koriste za testiranje aktivnosti bolesti, ukoliko su visoki, ukazuju da je bolest vrlo aktivna (prepostavljujući da nisu prisutni drugi uzroci koji daju visoke rezultate, kao što je infekcija). Reumatoidni faktor je prvo antitijelo koje je otkriveno kod osoba sa RA (autoantitijela se javljaju kao odgovor na vlastiti organizam i karakteristika su autoimunih bolesti kao što je RA). Analizira se kompletna krvna slika. U 80% slučajeva se nalazi normokromna ili blago hipokromna, normocitna anemija. U krvi se može pronaći snižena količina hemoglobina. Česta je blaga poliklonska hipergamaglobulinemija. SE je ubrzana u 90% bolesnika s aktivnim RA. Komplement u serumu je uredan ili povišen.

#### Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC)

Molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) su membranski proteini na antigen-prezentirajućim ćelijama (engl. *antigen-presenting cells*, APC) čija je uloga da vežu antigenski peptid i prezentiraju na površini ćelije da bi ga prepoznao T limfocit. Različiti klonovi T ćelija svake jedinke mogu da prepoznaju odredene peptide samo ako su ti peptidi prezentovani u kompleksu sa MHC molekulama (Turnpenny et Ellard, 2011).

MHC lokus predstavlja skup gena koji se nalazi u genomu svih sisara. Kompleks gena i antiga tkivne podudarnosti MHC čovjeka naziva se još i ljudski leukocitni antigeni (engl. *human leukocyte antigen*, HLA) jer su specifičnim antitijelima otkriveni kao antigeni prisutni na leukocitima. Geni koji kodiraju ove molekule čine HLA lokus. HLA lokus je lociran na kratkom kraku hromozoma 6 i obuhvata oko 3,5 megabaza (Mb) DNK, dok se antigeni, odnosno produkti MHC-a nalaze na različitim ćelijama i u različitim količinama. Glavna uloga HLA je u prepoznavanju antiga u organizmu i regulisanju imunog odgovora na specifičan način. MHC je genski lokus čiji glavni produkti pripadaju imunom sistemu i služe za prezentaciju antiga.

Jedna od osnovnih osobina HLA sistema je izrazit polimorfizam alela, koji se ogleda u izuzetno visokom stepenu genske varijabilnosti njegovih produkata (antiga). Većina ovih gena je polimorfna, smješteni su blizu jedni drugih i obično se nasleđuju u bloku kao haplotip. Kod svih vrsta, MHC lokus sadrži dvije grupe veoma polimorfnih gena. Geni i antigeni MHC se dijele zbog funkcionalnih razlika u tri klase: I, II i III klasa MHC. Klase I i II su mnogo značajnije, a njihove funkcije su imunoregulacijske i komplementarne, dok klasa III gotovo nema s njima ništa zajedničko izuzev blizine smještaja gena u genomu.

HLA-A, B i C su najvažniji pripadnici MHC klase I gena, jer su njihovi produkti definisani kao klasični antigeni za transplantaciju. Molekule HLA-A, -B i -C su heterodimeri glikoproteini. Molekule MHC klase I prisutne su gotovo na svim ćelijama i odgovorne su za prezentiranje antiga koji potiču iz unutrašnjosti ćelije (endogeni antigeni) citotoksičnim T limfocitima (engl. *cytotoxic T lymphocytes*, CTL). Region MHC klase III gena sadrži više od 75 gena koji kodiraju proteine koji nisu povezani s ćelijskim imunitetom, ali mogu modulirati ili regulisati imuni odgovor na određen način. Oni uključuju tumor nekrozis faktor (engl. *tumor necrosis factor*, TNF), proteine toplotnog šoka (engl. *heat-shock proteins*, HSP) i proteine komplementa (C2, C4). Region MHC klase II gena veličine je između 1.000 - 1.200 kb s najmanje šest podregija, označenih sa DR, DQ, DP, DO, DN i DM. Strukturno su molekule klase II slične onima klase I, a izražene su kao heterodimeri na površini ćelija sa jednim teškim α-lancem i jednim β-lancem glikoproteina. MHC molekule klase II se ispoljavaju na površini profesionalnih antigen-prezentirajućih ćelija (APC) kao što su B limfociti, makrofagi, dendritske ćelije i aktivirani T limfociti. Njihova uloga je da prezentiraju egzogene antigene koji su ušli u ćelije endocitozom pomoćničkim T limfocitima za dalju prezentaciju B ćelijama i makrofagima (Allegretti et al., 1989; Abbas et Lichtman, 2006a; Abbas et Lichtman, 2006b; Abbas et al., 2015).

### Pregled istraživanja

Uzrok nastanka reumatoidnog artritisa je još uvek nepoznat. Važna uloga pripada imunim kompleksima koji nastaju u ozlijedenim ćelijama sinovije i upaljenim krvnim žilama. Plazma ćelije stvaraju antitijela (npr. RF) koja pridonose tim kompleksima. U ranoj fazi bolesti prema bolesnoj sinoviji migriraju makrofagi. Limfociti koji ulaze u sinoviju su pretežno CD4 $\beta$ T ćelije. Makrofagi i limfociti stvaraju upalne citokine i hemokine (npr. TNF, GM-CSF, razni interleukini, interferon  $\gamma$ ), a oslobođanje upalnih posrednika pridonosi kako zglobnim tako i opštim simptomima RA. Obložne ćelije sinovije izljučuju niz tvari, uključujući stromelin koji pridonosi razgradnji hrskavice, IL-1 i TNF- $\alpha$ , koji potiču upalu sinovije, osteoklastičnu resorpciju kosti i destrukciju hrskavice te prostaglandine koji pojačavaju upalu. Javlja se taloženje fibrina, fibroza i nekroza. Pomoću navedenih posrednika hiperplastično tkivo sinovije (*pannus*) nagriza hrskavicu, suphondralnu kost, zglobnu čahuru i ligamente. U sinovijskom izljevu obično prevladavaju neutrofilni leukociti. Laboratorijskim analizama se potvrđuje prisustvo anemije, povećanja broja bijelih krvnih zrnaca, smanjenje broja trombocita, ubrzana sedimentacija. Sedimentacija eritrocita ukazuje na postojanje upalnog procesa u organizmu. U skoro 80% slučajeva reumatoidnog artritisa u serumu se nalazi reumatoidni faktor. Postoji i porast IgM, IgG i IgA. Rendgenski nalaz zavisi od stadija bolesti. Visoke razine CRP-a su takođe indikator akutne upale. Antitijela na citrulinirane peptide (engl. *anti-cyclic citrullinated peptide, anti-CCP*) visoko su specifična i osjetljiva za RA i korisna su u diferencijalnoj dijagnozi ranog poliartritisa.

Rezultati istraživanja koja su vršili Peng et al. (2015) ukazuju da postoji korelacija između ESR i RF i reumatoidnog artritisa. Osim toga, uočili su i povezanost omjera trombocita i limfocita (PLR) sa RA. PLR i omjer neutrofila i limfocita (NLR), CRP i ESR su indikatori koji ukazuju na hroničnu upalu kod pacijenata sa RA. Međutim, u ovom istraživanju nije uočena asocijacija između omjera neutrofila i limfocita, CRP i RA. NLR i PLR su bili statistički značajno viši kod RA pacijenata u predenuju sa zdravom kontrolom. Takođe su uočene razlike između RA pacijenata i zdrave kontrole u pogledu broja leukocita, procента neutrofilnih granulocita, neutrofilnih granulocita, limfocita, trombocita, CRP, ESR i RF.

Sve je više podataka koji ukazuju da je NLR nezavini pokazatelj mortaliteta kod pacijenata sa akutnom srčanom manom (Arruda-Olson et al., 2009; Rudiger et al., 2006), a da ima ulogu u određivanju upalnih procesa kod srčanih i drugih poremećaja (Tamhane et al., 2008; Nunez et al., 2008; Walsh et al., 2005). Prethodna istraživanja su pokazala da su trombociti uključeni u aterogenezu tokom sekrecije proupatnih citokina (Kaplan et Jackson, 2011).

Frekvencije pojavljivanja genskih varijanti HLA-DRB1 lokusa kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa koje su opisane kao predisponirajuće, variraju među različitim etničkim skupinama. Utvrđeno je da alelna grupa HLA-DRB1\*04 predominira u populacijama RA pacijenata Sjeverne Europe (van Jaarsveld et al., 1998; Tuokko et al., 2001), a u populacijama Mediterana dominiraju alelne grupe HLA-DRB1\*01 i HLA-DRB1\*10 (Kinikli et al., 2003; Balsa et al., 2000; Fathi et al., 2008). Na području Engleske dominira alelna grupa HLA-DRB1\*04 dok su u populaciji Španije podjednako zastupljene alelne grupe HLA-DRB1\*04 i HLA-DRB1\*01 (Balsa et al., 2000). Studija iz Holandije pokazala je takođe učestalost alelne grupe HLA-DRB1\*04 u skupini RA pacijenata (van Jaarsveld et al., 1998). Slične rezultate za alelnu grupu HLA-DRB1\*04 pokazale su studije provedene u Mađarskoj (Varga et al., 2003) i u Slovačkoj (Stark et al., 2009). Analizom genskog lokusa HLA-DRB1 na području Francuske utvrđeno je da su kod skupine pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa zastupljene i alelna grupa HLA-DRB1\*04 i HLA-DRB1\*01. Analize HLA-DRB1 genskog lokusa rađene prema rasnom porijeklu u Maleziji (Malajce, Kineze i Indijce) kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i kontrolnih subjekata pokazale su da su alelne grupe HLA-DRB1\*04, HLA-DRB1\*09 i HLA-DRB1\*10, signifikatno učestalije kod oboljelih od RA (Kong et al., 2002). U populacijama sjeverno-američkih domorodaca RA je povezan sa alelnom grupom HLA-DRB1\*14.

Alelna grupa HLA-DRB1\*13 pronađena je kao signifikantno snižena kod RA pacijenata u poređenju sa kontrolnom skupinom u mnogim studijama (van Jaarsveld et al., 1998; Kinikli et al., 2003; Tuokko et al., 2001; Stark et al., 2009). U kontrolnoj skupini meksičkih Amerikanaca alelna grupa HLA-DRB1\*08 je statistički značajno učestalija i smatra se protektivnom alelnom grupom. Protektivni mehanizam kojim određene varijante HLA-DRB1 gena imaju ulogu u sprečavanju

nastanka RA nije razjašnjen. Prema jednoj hipotezi ove varijante gena mogu posredovati u uklanjanju autoreaktivnih T limfocita iz T limfocitnog repertoara.

#### **Radna hipoteza sa ciljem istraživanja**

Postoje razlike u hematološko-biohemijskim parametrima kao i u prisustvu različitih alelnih grupa i genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa koji pripadaju J.U.D.Z. Kantona Sarajevo i zdrave kontrolne skupine.

S obzirom na postavljenu hipotezu ciljevi rada su:

1. Odrediti razlike u biohemijsko-hematološkim parametrima između nesrodnih pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i zdrave kontrolne skupine.
2. Utvrditi da li postoji povezanost omjera neutrofila i limfocita (NLR) i omjera trombocita i limfocita (PLR) sa pojavom upale kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa.
3. Upoznati se sa HLA profilom pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa te sa profilom kontrolne zdrave skupine.
4. Utvrditi da li između nesrodnih pacijenata sa reumatoidnim artritisom i nesrodnih zdravih osoba postoji značajna razlika u frekvencijama alelnih grupa i genotipova unutar HLA-DRB1 genskog lokusa (klasa II MHC regiona).
5. Odrediti da li se u skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa može dokazati prisustvo rizičnih varijanti gena (alelnih grupa) i genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa tj. varijanti gena i genotipova koji nose statistički značajan rizik za razvoj bolesti.
6. Odrediti da li se u skupini zdravih osoba može dokazati prisustvo protektivnih varijanti gena i genotipova tj. varijanti gena i genotipova koji nose statistički značajan zaštitni efekat za sprečavanje razvoja bolesti.
7. Na kraju, dobivene rezultate uporediti sa rezultatima sličnih studija rađenih na drugim svjetskim populacijama.

#### **Materijal i metod rada**

##### **Ispitanici**

U istraživanje će biti uključeno 80 ispitanika sa dijagnozom reumatoidnog artritisa, oba spola, starosne dobi od 30 do 60 godina koji su pacijenti J.U.D.Z. Kantona Sarajevo. Kontrolna grupa će obuhvaćati 40 zdravih ispitanika koji nemaju dijagnozu reumatoidnog artritisa dok su po ostalim karakteristikama uskladjeni sa testnom grupom. Odabir ispitanika za uključivanje u istraživanje će se vršiti nakon detaljnog informisanja potencijalnih ispitanika o značaju i metodama istraživanja i njihovog pristanka.

##### **Metode**

Kod laboratorijske dijagnostike se koriste ciljani dijagnostički pristup, tj. izbor laboratorijskih pretraga kojima se pokušava potvrditi dijagnozu. Unutar testne i kontrolne skupine će se analizirati hematološke vrijednosti kompletne krvne slike, diferencijalne krvne slike, sedimentacije eritrocita, ka i vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP). Hematološki parametri biće određivani na automatiziranom analizatoru za hematologiju Beckman coulter DxH 800. Brzina sedimentacije eritrocita očitaće se u mm/1h. C-reaktivni protein će se kvantitativno određivati na aparatu Rochi/Hitachi cobas c311 systems.

Alelnе grupe HLA-DRB1 genskog lokusa će se određivati metodom molekularne biologije koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s prajmerima specifičnim za određenu sekvencu DNA (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*, PCR-SSP). Kod SSP-PCR metode, izolira se DNA iz uzorka osobe koju treba tipizirati, te se ista amplificira u više bazenčića, od kojih svaki sadrži specifične prajmere koji su komplementarni posebnim HLA alelima. Proizvod amplifikacije formira se samo ukoliko su DNA probe komplementarne sekvenci HLA molekule. Sadržaj bazenčića se zatim ukapava u agarozni gel i pušta elektroforeza, a proizvod amplifikacije se pojavljuje kao bend na gelu.

Biostatistička analiza ostvarenih rezultata izvršit će se korištenjem odgovarajućih populaciono-

genetičkih i statističkih metoda i upotrebom odabranih statističkih programske paketa. Za sve präocene biohemski-hematološke parametre uradić se deskriptivne metode. Za utvrđivanje statistički signifikantne razlike srednjih vrijednosti između upoređivanih grupa primijeniti će se T-test i hi-kvadrat test uz korištenje odgovarajućih programske paketa. Za izračunavanje frekvencija alela i genotipova, analizu heterozigotnosti, genskog diverziteta i polimorfizama, te za provjeru *Hardy-Weinbergovog* principa ravnoteže i asocijativne analize unutar HLA genskog lokusa koristiti će se statistički programski paket *PowerMarker*, verzija 3.25.

#### Faze u izradi doktorske disertacije

Ostvarivanje postavljenih ciljeva istraživanja postići će se realizacijom sljedećeg:

1. Prikupljanja uzoraka periferne krvi pacijenata J.U.D.Z. Kantona Sarajevo oboljelih od reumatoidnog artritisa i zdravih nesrodnih osoba za biohemski-hematološke i molekularne analize;
2. Pretrage kompletne i diferencijalne krvne slike na automatiziranom analizatoru.
3. Određivanja sedimentacije eritrocita (ESR).
4. Kvantitativnog određivanja vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP).
5. Presječnog istraživanja (*cross-sectional*) trenutnog stanja temeljeno na razlikama u hematološko-biohemiskim parametrima između ispitivanih skupina.
6. Utvrđivanje povezanosti omjera neutrofila i limfocita (NLR) i omjera trombocita i limfocita (PLR) sa pojmom upale kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa.
7. Izolacije genomske DNK iz priključenih uzoraka (metodom po Miller-u et al., 1988);
8. Provjere kvaliteta izolovane genomske DNK iz ćelija periferne krvi elektroforezom na 1% agaroznom gelu;
9. Izvođenja PCR-SSP metode uz pomoć komercijalnog testa (HLA-Ready Gene DR, InnoTrain, Njemačka);
10. Nakon završetka PCR reakcija, prisustvo i kvalitet amplificiranih genskih produkata provjeravaju se elektroforezom PCR produkata (amplikona) na 2% agaroznom gelu;
11. Određivanja prisustva i učestalosti alelnih grupa i genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa u skupini RA pacijenata i zdravih nesrodnih osoba;
12. Vršenja procjene odstupanja od *Hardy-Weinberg* ekilibrijuma (HWE), te analize heterozigotnosti, genskog diverziteta i informacije o udjelu polimorfizma (PIC) za HLA-DRB1 genski lokus;
13. Upoređivanja frekvencije alelnih grupa HLA-DRB1 genskog lokusa kod pacijenata oboljelih od RA i kontrolne skupine;
14. Korištenjem „*case-control*“ testa istražiti moguće asocijacije genskih varijanti (alelnih grupa) i prisustva/odsustva bolesti, te analizu genotipova i prisustva/odsustva bolesti na nivou HLA-DRB1 genskog lokusa;
15. Određivanja varijanti alela i genotipova koji bi mogli biti predisponirajući za nastanak RA;
16. Utvrđivanja povećane frekvencije alelnih grupa i genotipova koji imaju protektivni efekat za javljanje RA;
17. Rezultate istraživanja statistički obradivati uz pomoć odgovarajućih programske paketa kao što je *PowerMarker*, verzija 3.25;
18. Upoređivanja dobijenih rezultata sa rezultatima sličnih istraživanja na drugim svjetskim populacijama.

#### Biohemski i hematološke analize

Sve biohemski i hematološke analize će se vršiti u Službi za laboratorijsku dijagnostiku J.U.D.Z. Kantona Sarajevo. Uzimaju se uzorci periferne venske krvi u skladu sa standardima dobre laboratorijske prakse. Za opšte hematološke pretrage kompletne i diferencijalne krvne slike, izvaditi će se 3 ml krvi u vakutainer epruvetu koja sadrži antikoagulans etilendiaminetetraoctenu kiselinu (EDTA). Hematološki parametri biće određivani na automatiziranom analizatoru za hematologiju Beckman coulter DxH 800. Ova analiza je validirana i svakodnevno kontrolisana. Referentne vrijednosti za hematološke pretrage su određene prema spolu. Za hematološku pretragu određivanja sedimentacije eritrocita (uzeće se 1,8 ml krvi u vakutainer epruvete sa antikoagulansom natrijum citratom u koju je postavljena graduisana pipeta (150 mm). Brzina

sedimentacije očitaće se u mm/1h. Uzorci za biohemiju analizu C-reaktivnog proteina (CRP) će se uzimati u vakutainer epruvetu, centrifugirati 10 minuta na 3500 rpm i odvojiti serum. C-reaktivni protein će se kvantitativno određivati na aparatu Rochi/Hitachi cobas c311 systems. Ova metoda je u Službi za laboratorijsku dijagnostiku validirana i redovno kontrolisana. Referentna vrijednost C-reaktivnog proteina je 0 – 5 mg/l.

#### **HLA tipizacija**

Sve molekularno-genetičke analize će se raditi u Laboratoriji za genetiku Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu. Prilikom prikupljanja uzorka voditi će se računa o etičkim principima istraživanja. Uz informirani pristanak, uzorci periferne venske krvi se prikupljaju od pacijenata J.U.D.Z. Kantona Sarajevo oboljelih od reumatoидног artritisa i zdravih nesrodnih osoba u sterilne tubice sa EDTA antikoagulansom. Periferna krv će se pohranjivati na 4 °C i čuvati određeno vrijeme radi moguće ponovne izolacije DNK. Izolovana DNK će se pohranjivati i čuvati na -20 °C, radi mogućih retipizacija.

Izolaciji genomske DNK iz ćelija periferne krvi pristupiti će se odmah po njenom uzimanju. Time da će se osigurati dobar kvalitet i prinos izolovane DNK. Za ekstrakciju genomske DNK iz prikupljenih uzorka bit će primijenjen standardni protokol, baziran na metodi isolovanja uz neznatne modifikacije (Miller et al., 1988). Ova metoda se zasniva na suksesivnoj realizaciji četiri osnovne faze: liziranje lipoproteinskog i nukleohistonskog kompleksa primjenom digestivnih pufera, isolovanje 6 M NaCl-om, precipitacija apsolutnim etanolom i resolubilizacija u destilovanoj vodi. Za kvalitativno-kvantitativnu analizu izoliranih uzorka DNK koriće se horizontalna agarozna gel elektroforeza genomske DNK.

Za amplifikaciju HLA-DRB1 genskog lokusa koristiće se komercijalni test (HLA-Ready Gene DR Kit, Inno-Train, Njemačka) pri čemu se za pripremu PCR radne smjese i temperaturnih uslova genske amplifikacije slijede uputstva proizvoda. Kit sadrži komercijalni Ready PCR sa svim aditivima (dNTPs, PCR buffer, kreol red, glicerin) neophodnim za odvijanje reakcije. Procedura podrazumijeva izvođenje velikog broja PCR reakcija po uzorku sa specifičnim prajmerima – 24 reakcije za genotipiziranje niske rezolucije alela HLA-DRB1 lokusa. Rezultati su validni ako su amplificirane interne kontrole. Za pripremu PCR radne smjese za amplifikaciju HLA-DRB1 genskog lokusa korišten je obrazac: sterilna dejonizovana voda (168 µl), amplifikacijski pufer (ReadyPCR; 84 µl), *Taq*-Polymeraza (5U/µl; 2,2 µl). Za amplifikaciju HLA-DRB1 genskog lokusa koristi se PCR aparat Eppendorf Mastercycler gradient (Hamburg, Germany). PCR program je sljedeći: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 min na 96 °C, nakon čega slijedi 10 ciklusa od kojih svaki traje 15 sek na 96 °C i 60 sek na 65 °C, zatim 20 ciklusa u trajanju po 15 sek na 96 °C, 50 sek na 61 °C i 30 sek na 72 °C a zatim čuvanje na 4 °C. Evaluacija rezultata se vrši elektroforezom na 2% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom u TBE puferu. U električnom polju se amplikoni odvajaju prema njihovoj veličini i posmatraju pod UV svjetlom. Zatim slijedi čitanje reakcija iz HLA baterija manualno ili pomoću Score™ software v.4.0204 (Inno-train DIAGNOSTIK GMBH).

#### **Biostatistička analiza**

Za sve praćene biohemisko-hematološke parametre uradiće se deskriptivne metode: mjere centralne tendencije - srednje vrijednosti i srednji brojevi, te izračunavanje standardne greške aritmetičke sredine (SEM) i standardne devijacije (SD). Za utvrđivanje statistički signifikantnih razlika srednjih vrijednosti između upoređivanih grupa primjeniti će se T-test i hi-kvadrat test uz korištenje odgovarajućih programskih paketa. Vrijednosti razlika  $p < 0,05$  uzeti će se kao statistički signifikantne. Za izračunavanje frekvencija alela i genotipova, analizu heterozigotnosti, genskog diverziteta i polimorfizama, te za provjeru Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže i asocijativne analize unutar HLA genskog lokusa koristiti će se statistički programski paket PowerMarker, verzija 3.25.

Kompjuterski program OpenEpi v2.3.1 će se koristiti za procjenu statističke signifikantnosti razlika u frekvenciji alelnih varijanti, za izračunavanje omjera izgleda (OR), izračunavanja 95% intervala pouzdanosti (95% CI) za OR vrijednost. Statistička signifikantnost razlika u frekvenciji genskih varijanti između skupine RA pacijenata i kontrolne skupine se procjenjuje korištenjem „two-tail“ Fisher egzaktnog testa. Jačina asocijacije između prisustva određene genske varijante i javljanja

bolesti procjenjuje se računanjem OR (engl. *odds ratio*, omjer izgleda) vrijednosti. Za procjenu preciznosti dobivenih vrijednosti se izračunava 95% interval pouzdanosti (95% CI) za OR vrijednost.

Prilikom statističke obrade rezultata izvršit će se grupiranje i sređivanje, prikazivanje i interpretiranje dobivenih rezultata prema spolu i starosnoj dobi oboljelih od navedenih oboljenja. Svi prikupljeni i dobijeni rezultati će biti prikazani tabelarno i grafički.

### Naučni doprinos istraživanja

Laboratorijske pretrage su sastavni dio složenog procesa donošenja kliničkih odluka te imaju direktni uticaj na dijagnozu i liječenje neke bolesti. Za racionalno korištenje pretraga potrebno je rutinsko traženje skupine pretraga vezanih uz neku bolest ili patološko stanje. Serološka tipizacija je konvencionalna tehnika koja se koristi u HLA tipizaciji. Ograničenja ovog testa su da se on mora izvršiti u roku od 6 sati nakon uzimanja krvi, a najmanja količina krvi koja se mora uzeti iznosi 5 ml. Broj antiga koji se mogu odrediti serološki je malen u poređenju sa brojem gena koji se mogu utvrditi molekularnom tipizacijom. Međutim, u mnogim zemljama u razvoju, molekularna HLA tipizacija nije rutinski postupak u dijagnostici iako molekularne tehnike tipizacije daju bolje rezultate nego test mikrolimfocitotoksičnosti (MLCT, engl. *microlymphcytotoxicity test*). Većina testova molekularne tipizacije se zasniva na amplifikaciji specifičnoj za grupe pomoću PCR od kojih se PCR-SSP tehnika najčešće koristi za detekciju HLA-DRB1\*04 alela.

Rezultati ovog istraživanja će ukazati na biohemijsko-hematološke parametre i kvalitativno-kvantitativnu zastupljenost alelnih grupa i genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa u skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i kontrolne zdrave skupine Kantona Sarajevo. U skupini pacijenata sa reumatoidnim artritisom dokazat će prisustvo rizičnih, a u skupini zdravih osoba, protektivnih varijanti gena i genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa. Dokazat ćemo značaj PCR-SSP tehnike u HLA-DRB1\*04 tipizaciji kao skrining testa u dijagnozi reumatoidnog artritisa. Ovo će biti prvo istraživanje kojim će se dokazati povezanost HLA-DRB1\*04 alelne grupe sa dobro okarakterisanim reumatoidnim artritisom kod pacijenta koji pripadaju J.U.D.Z. Kantona Sarajevo.

Molekularna tipizacija bi mogla biti značajan dodatni dijagnostički parametar u slučajevima nejasne kliničke dijagnoze ili ako potvrda genetičke predispozicije, uz sve ostale dijagnostičke parametre, potvrđuje dijagnozu bolesti. Tipizacija HLA omogućuje i određivanje rizične populacije što može biti od praktične koristi u sprečavanju bolesti prije nego što dođe do razvoja težih oblika simptoma i komplikacija bolesti.

#### Citirana literatura

1. Abbas A.K., Lichtman A.H. (2006a): Osnovna imunologija. Funkcionalisanje i poremećaji imunskog sistema. Drugo, obnovljeno izdanje. Data status, Beograd.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H. (2006b): Basic Immunology: Functions of Disorders of the Immune System. Fifth Edition, Updated Edition. Elsevier Saunders, USA.
3. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2015): Cellular and Molecular Immunology. Eighth Edition, Updated Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
4. Allegretti N., Andreis I., Čulo F., Marušić M., Taradi M. (1989): Imunologija. Školska knjiga, Zagreb.
5. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the initial evaluation of the adult patient with acute musculoskeletal symptoms. *Arthritis Rheum* 1996; 39(1):1–8.
6. Arruda-Olson A.M., Reeder G.S., Bell M.R., Weston S.A., Roger V.L. Neutrophilia predicts death and heart failure after myocardial infarction: A community-based study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2009; 2:656–662.
7. Balsa A., Minaur N.J., Pascual-Salcedo D., McCabe C. Class II MHC antigens in early rheumatoid arthritis in Bath (UK) and Madrid (Spain). *Rheumatology* 2000; 39:844–849.
8. Bolumar F., Ruiz M.T., Hernandez I., Pascual E. Reliability of the diagnosis of rheumatic conditions at the primary health care level. *The Journal of Rheumatology* 1994; 21(12):2344–8.
9. Caillat-Zucman S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2008; 73:1–8.
10. Coenen M.J.H., Gregersen P.K. Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape. *Genes and Immunity* 2009; 10:101–111.
11. Čulić V., Pavelić J., Radman M. (ured.) (2016): Genetičko informiranje u praksi. Medicinska naklada, Zagreb.
12. Dieppe P., Paine T. Referral guidelines for general practitioners-which patients with limb joint arthritis should be sent to a rheumatologist? *Arthritis Rheum*. 1994; 1(37):1–4.
13. Turnpenny P., Ellard S. (2011): Emeryjeve osnove medicinske genetike. Medicinska naklada, Zagreb.
14. Fathi N.A., Ezz-Eldin A.M., Mosad E., Bakry R.M., Hamed H.B., Ahmed S., Mahmoud M., Rashed H.A.G., Abdullah F.. Diagnostic performance and predictive value of rheumatoid factor, anti-cyclic-citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB1 locus genes in rheumatoid arthritis. *Int Arch Med*. 2008; 1:20.
15. Gabriel S.E., Crowson C.S., O'Fallon W.M. Costs of osteoarthritis: estimates from a geographically defined population. *J. Rheumatol.* 1995; 22(43):23–25.
16. Harris E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implication for therapy. *N. Eng. J. Med.* 1990; 322:1277–89.
17. Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M. (2005): Immunobiology. The immune system in health and disease. Garland Science Publishing, USA.
18. Jones M.A., Silman A.J., Whiting S., Barrett E.M., Symmons D.P.M. Occurrence of rheumatoid arthritis in not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1996; 55:89–93.
19. Kaplan Z.S., Jackson S.P. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology, Am Soc Hematol Educ Program*. 2011; 46:51–61.
20. Kinikli G., Ateş A., Turgay M., Akay G., Kinikli S., Tokgöz G. HLA-DRB1 genes and disease severity in rheumatoid arthritis in Turkey. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 2003; 32(5):277–280.
21. Klinger M.H., Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res*. 2002; 22:913–922.
22. Kong K.F., Yeap S.S., Chow S.K., Phipps M.E. HLA-DRB1 Genes and Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Three Ethnic Groups from Malaysia. *Autoimmunity* 2002; 35(4):235–239.
23. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research* 1988; 16(3):1215.
24. Nanez J., Núñez E., Bodi V., Sanchis J., Miñana G., Mainar L., Santas E., Merlos P., Rumiz E., Darmofal H., Heatta A., Llácer A. Usefulness of the Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Predicting Long-Term Mortality in ST Segment Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol*. 2008; 101:747–752.
25. Peng Y-F., Cao L., Zeng Y-H., Zhang Z-X., Chen D., Zhang Q., Zhu Y-S. Platelet to lymphocyte ratio and neutrophil to lymphocyte ratio in patients with rheumatoid arthritis. *Open Med*. 2015;

10:249-253.

26. Popović M., Stefanović D., Mitrović D. i sar. (2000): Reumatične i srodne bolesti, dijagnoza i terapija. INFOhome, Beograd.
27. Rudiger A., Burckhardt O.A., Harpes P., Muller S.A., Follath F. The relative lymphocyte count on hospital admission is a risk factor for long-term mortality in patients with acute heart failure. *Am J Emerg Med.* 2006; 24:451–454.
28. Sertić J. i sur. (2015): Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Drugo, dopunjeno i obnovljeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
29. Silman A.J., MacGregor A.J., Thomson W., Holligan S., Carthy D., Farhan A., Ollier W.E. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br. J. Rheumatol.* 1993; 32:903–907.
30. Stark K., Rovensky J., Blažičkova S., Grosse-Wilde H., Ferencik S., Hengstenberg C., Straub R.H. Association of common polymorphisms in known susceptibility genes with rheumatoid arthritis in a Slovak population using osteoarthritis patients as controls. *Arthritis Res Ther.* 2009; 11(3):R70.
31. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298(16):869–871.
32. Tamhane U.U., Aneja S., Montgomery D., Rogers E.K., Eagle K.A., Gurm H.S. Association between admission neutrophil to lymphocyte ratio and outcomes in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2008; 102:653–657.
33. Tuokko J., Nejentsev S., Luukkainen R., Toivanen A., Ilonen J. HLA haplotype analysis in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 2001; 44(2):315-322.
34. Van Jaarsveld C.H.M., Otten H.G., Jacobs J.W.G., Kruize A.A., Brus H.L.M., Bijlsma J.W. J. Association of HLA-DR with susceptibility to and clinical expression of rheumatoid arthritis: re-evaluation by means of genomic tissue typing. *British Journal of Rheumatology* 1998; 37:311–416.
35. Varga E., Palkonyai E., Temesvari P., Toth F., Petri I.B. The role of HLA-DRB1\*04 alleles and their association with HLA-DQB genes in genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Hungarian patients. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2003; 50(1):33–4.
36. Walsh S.R., Cook E.J., Goulder F., Justin T.A., Keeling N.J. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2005; 91:181–184.

- a) Значај истраживања;
- б) Преглед истраживања;
- в) Радна хипотеза са циљем истраживања;
- г) Материјал и метод рада;
- д) Научни допринос истраживања.

### 3. ОЦЈЕНА И ПРИЈЕДЛОГ

Na osnovu prethodno navedenog, Komisija smatra da kandidatkinja mr. Biljana Klementa ispunjava sve Zakonom predviđene uslove za izradu prijavljene doktorske disertacije. S obzirom na stečeni akademski naziv magistra nauka i objavljene radove iz oblasti predložene teme (biohemija i molekularna biologija i mikrobiologija), Komisija smatra da kandidatkinja ima odgovarajuće naučne i stručne kvalifikacije da pristupi izradi navedene doktorske disertacije. Predložena istraživanja su aktuelna i naučno opravdana, a rezultati koji se očekuju će imati fundamentalni i primjenjeni značaj. Komisija je saglasna u ocjeni da je tema „Biohemijsko-hematološki i molekularni parametri u dijagnostici reumatoidnog artritisa“ podobna za izradu doktorske disertacije, kao i da je kandidatkinja mr. Biljana Klementa podobna za izradu predložene teme.

Zbog svega prethodno navedenog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom vijeću Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci da prihvati ovaj Izvještaj i odobri izradu navedene doktorske disertacije.

- a) Кратка оцјена о научним и стручним квалификацијама кандидата тј. о његовим способностима да приступи изради дисертације;
- b) Научна или практична оправданост предложених истраживања и резултати који се могу очекивати;
- c) Мишљење о предложеној методи истраживања;
- d) Уколико комисија сматра да кандидат не посједује одговарајуће научне и стручне квалификације, да неке претпоставке кандидата у вези пријављене дисертације нису тачне или је предложен метод рада неадекватан, исти треба детаљно образложити.
- e) Приједлог са образложеном оцјеном о подобности теме и кандидата (Обавезно написати оцјену да ли су тема и кандидат подобни или не)

U Banjoj Luci, 26.08.2016. godine

### ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

1.   
dr. **Hilada Nefić**, redovni profesor  
naučna oblast: Genetika, Klinička biologija,  
predsjednik
2.   
Dr. **Biljana Davidović Plavšić**, docent  
naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija,  
član
3.   
Dr. **Stojko Vidović**, redovni profesor  
naučna oblast: Biohemija i molekularna biologija,  
član
4.   
Dr. **Radoslav Dekić**, vanredni profesor  
naučna oblast: Fiziologija životinja, član
5.   
Dr. **Smiljana Paraš**, docent  
naučna oblast: Mikrobiologija, biologija ćelije, član

ИЗДВОЈЕНО МИШЉЕЊЕ: Члан комисије који не жели да потпише извјештај јер се не слаже са мишљењем већине чланова комисије, дужан је да унесе у извјештај образложење, односно разлоге због којих не жели да потпише извјештај.