

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
ФАКУЛТЕТ: Prirodno-matematički fakultet



РЕПУБЛИКА СРБИЈА
 УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
 ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛЕТ
 број: 19-214/20
 датум: 03.02.2020, град
 БАЊА ЛУКА

ИЗВЈЕШТАЈ
о оијени урађене докторске дисертације

I ПОДАЦИ О КОМИСИЈИ

Nastavno-naučno vijeće Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Banjoj Luci na 219. sjednici održanoj 20.11.2019. godine donijelo je Odluku broj: 19/3.3119/19 od 20.11.2019. godine, kojom je imenovalo Komisiju za ocjenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Biohemski-hematološki i molekularni parametri u dijagnostici reumatoidnog artritisa**“ doktoranta mr. **Biljane Klimenta** u sljedećem sastavu:

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

- 1) Навести датум и орган који је именовао комисију;
 2) Навести састав комисије са назнаком имена и презимена сваког члана, научно-наставног звања, назива уже научне области за коју је изабран у звање и назива универзитета/факултета/института на којем је члан комисије запослен.

II ПОДАЦИ О КАНДИДАТУ

- 1) Biljana (Milorad) Klimenta;
- 2) 18.10.1962. године, Požega, Republika Srbija;
- 3) Univerzitet u Sarajevu, Prirodno-matematički fakultet, Postdiplomski studij bioloških nauka, stekla akademski stepen magistra bioloških nauka (smjer - genetika);
- 4) Prirodno-matematički fakultet, teza: „Primjena E-testa u detekciji MRSA (meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*)“, naučna oblast: Genetika, 14.10.2014. godine;
- 5) Magistar bioloških nauka, smjer Genetika;
- 6) 2016. godina, Studijski program biologija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci

- 1) Име, име једног родитеља, презиме;
 2) Датум рођења, општина, држава;
 3) Назив универзитета и факултета и назив студијског програма академских студија II циклуса,

- односно послиједипломских магистарских студија и стечено стручно/научно звање;
- 4) Факултет, назив магистарске тезе, научна област и датум одбране магистарског рада;
 - 5) Научна област из које је стечено научно звање магистра наука/академско звање мастера;
 - 6) Година уписа на докторске студије и назив студијског програма.

III УВОДНИ ДИО ОЦЈЕНЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

- 1) Naslov doktorske disertacije: Biohemijsko-hematološki i molekularni parametri u dijagnostici reumatoidnog artritisa.
- 2) 23.02.2017. godine, Odluka Senata Univerziteta u Banjoj Luci, broj 02/04-3.189-52/17.
- 3) Doktorska disertacija je urađena u skladu sa Pravilnikom o sadržaju, izgledu i digitalnom repozitoriju doktorskih disertacija na Univerzitetu u Banjoj Luci. Obuhvata sljedeća poglavlja:
 1. Uvod, stranice 1 – 20;
 2. Cilj istraživanja, 21 – 22;
 3. Materijal i metode, 23 – 38;
 4. Rezultati i diskusija, 39 – 83;
 5. Zaključak, 84 – 85;
 6. Literatura, 86 – 93;
 7. Prilozi, 94 – 102;

Poglavlje „Uvod“ napisano je od 1. do 20. stranice i sadrži pet potpoglavlja: Autoimune bolesti (str. 1-3); Reumatske bolesti (str. 4-5); Reumatoidni artritis (RA) (str. 6-13); Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC) (str. 14-19) i HLA tipizacija (str. 20).

Poglavlje „Cilj istraživanja“ napisano je od 21. do 22. stranice i u njemu su definisani ciljevi i zadaci istraživanja.

Poglavlje „Materijal i metode“ napisano je od 23. do 38. stranice. U poglavlju su navedeni ispitanici i uzorci koji su korišteni u analizi a nakon toga su opisane metode rada. Objasnjeni su načini pripreme uzorka za biohemijsko-hematološku i molekularni analizu, dat je prikaz korištenih instrumenata, kao i principi njihovog rada. Opisan je način i princip određivanja svakog od ispitivanih parametara.

Poglavlje „Rezultati i diskusija“ napisano je od 39. do 83. stranice i u njemu su predstavljeni rezultati svih analiza. Ovo poglavje obuhvata osam potpoglavlja: Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe (str. 40-42); Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (str. 43-46); Uporedna analiza biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (str. 47-51); Rezultati analize alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa ispitanika kontrolne grupe (str. 52-56); Rezultati analize genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa kontrolne grupe (str. 57-58); Rezultati analize alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (str. 59-63). Rezultati analize genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (str. 64-66); i Komparativna analiza rezultata *HLA-DRB1* genskog lokusa, frekvencije alelnih grupa, genotipova i haplotipova kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (str. 67-83). Statistički obrađeni rezultati su praćeni odgovarajućom diskusijom u kojoj su se vlastiti rezultati poredili sa rezultatima drugih autora dobiveni sličnim istraživanjima.

Poglavlje „Zaključak“ napisano je od 84. do 85. stranice i prikazuje osnovne zaključke do kojih se došlo tokom istraživanja.

Poglavlje „Literatura“ napisano je od 86. do 93. stranice i obuhvata 91 izvod citirane literature.

Poglavlje „Prilozi“ napisano je od 94. do 102. stranice i sadrži popis slika, tabela i grafikona kao i tabelarne prikaze vrijednosti biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA).

- 4) Doktorska disertacija je napisana latiničnim pismom na 102 stranice numerisanog teksta A4 formata. Sadrži 30 tabela, 7 slika, 10 grafikona i 91 literaturni navod. Disertacija obuhvata sedam poglavlja: Uvod, Cilj istraživanja, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Prilozi.

- 1) Наслов докторске дисертације;
- 2) Вријеме и орган који је прихватио тему докторске дисертације
- 3) Садржај докторске дисертације са страничењем;
- 4) Истакни основне податке о докторској дисертацији: обим, број табела, слика, шема, графикона, број цитиране литературе и навести поглавља.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

1. Do danas nije pronađen specifičan biohemski ili imunološki pokazatelj koji je specifičan za reumatoidni artritis. U dijagnosticiranju reumatoidnog artritisa se često koriste krvne pretrage, jer je krv tkivo do kojeg se najlakše i najsigurnije dolazi. Pojedini laboratorijski testovi služe jedino za praćenje aktivnosti i terapijskog efekta u reumatoidnom artritisu. 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 dok su kasnije studije potvrdile povezanost sa *HLA-DRB1*04* genskom varijantom. S druge strane, opisane su genske varijante koje su negativno povezane sa razvojem RA.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je određivanje biohemsko-hematoloških parametara za RA i utvrđivanje varijanti alela i genotipova koji bi mogli biti predisponirajući za nastanak RA kao i onih koji bi mogli imati protektivni efekat za javljanje ove bolesti.

Cilj istraživanja je bio određivanje biohemsko-hematoloških parametara, frekvencije alelnih grupa i genotipova unutar *HLA-DRB1* genskog lokusa, prisustva rizičnih i protektivnih varijanti gena i genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa kod nesrodnih pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i zdrave kontrolne skupine.

U skladu sa postavljenim **ciljem istraživanja**, postavljena je i **hipoteza** prema kojoj postoje razlike u hematološko-biohemskim parametrima kao i u prisustvu različitih alelnih grupa i genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i zdrave kontrolne skupine.

Biohemsko-hematološki parametri

U dijagnosticiranju reumatoidnog artritisa se često koriste krvne pretrage. Ove pretrage obuhvataju analize koje su usmjerenе na ispitivanje ćelijskih elemenata krvi (krvna slika, hematološki parametri) i analize kojima se provjerava biohemski sastav krvi. Hematološki testovi su obuhvatili kompletну krvnu sliku (CBC) sa određivanjem broja eritrocita (RBC), leukocita (WBC) i trombocita (PLT), hemoglobina (HGB) i hematokrita (HCT). Osim toga, određivane su eritrocitne konstante: prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH), prosječna koncentracija hemoglobina na litar eritrocita (MCHC), mjera varijabilnosti veličine eritrocita (RDW) kao i jedna od trombocitnih konstanti, prosječni volumen trombocita (MPV). U okviru diferencijalne krvne slike (DBC) određivan je broj neutrofila (NE), eozinofila (EO), bazofila (BA), monocita (MO) i limfocita (LY). Također je određena brzina sedimentacije eritrocita (ESR) i koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) kao jedan od biohemskih parametara.

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 (prepostavljajući da nisu prisutni drugi uzroci koji daju visoke rezultate, kao što je infekcija). U krvi se može pronaći snižena količina hemoglobina. ESR je ubrzana u 90% bolesnika s aktivnim RA.

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 određene 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 na 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 na organizmu i regulisanju imunog odgovora. 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 nasljeđuju u bloku kao haplotip. Geni i antigeni MHC se dijele zbog funkcionalnih razlika u tri klase: I, II i III klase MHC. Klasa 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.

Region MHC klase II gena veličine je između 1.000 - 1.200 kb s najmanje šest podregija: 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 antiga koji su ušli u ćelije endocitozom pomoćičkim T limfocitima za dalju prezentaciju B ćelijama i makrofagima (Allegretti et al., 1989; Abbas et al., 2018; Abbas et al., 2015).

2. Autoimune bolesti su posljedica imunoreakcije protiv vlastitih antiga. 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 antiga.

Autoimune bolesti se ubrajaju među najznačajnije bolesti u kliničkoj imunologiji, međutim etiologija ovih oboljenja je još uvijek nepoznata. Procjenjuje se da najmanje 2 – 5% boluje od autoimunih bolesti (Abbas et al., 2018). U razvoju rizika za nastanak autoimunosti utiču brojni faktori. Genetičku predispoziciju za nastanak tih bolesti čini nekoliko grupa 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 antiga, 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) te da je kod većine autoimunih bolesti genetička predispozicija povezana sa genima koji kodiraju sintezu HLA antiga (Caillat-Zucman, 2008). Genska predisponiranost 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 sopstvenih antiga kao posljedica prekida autotolerancije.

Reumatoидna 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, boarlo 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 klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), reumatoidne bolesti su podjeljenje 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 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 hondrocita 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 neutropenija. Reaktanti akutne faze, ubrzana sedimentacija i visok C reaktivni protein, upućuju na održavanje aktivnosti procesa kod oboljelih od reumatoidnog artritisa.

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).

Važna uloga u nastanku reumatoidnog artritisa 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 β T ćelije. Makrofagi i limfociti stvaraju upalne citokine i hemokine (TNF, GM-CSF, razni interleukini, interferon γ), a oslobođanje upalnih posrednika pridonosi kako zglobnim tako i opštim simptomima RA. Obložne ćelije sinovije izlučuju niz tvari, uključujući stromelin koji pridonosi razgradnji hrskavice, IL-1 i TNF- α , 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, supondralnu kost, zglobnu čahu 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 (anti-CCP, engl. *anti-cyclic citrullinated peptide*) 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 ili 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 ili CRP i RA. NLR i PLR su bili statistički značajno viši kod RA pacijenata u pređenju sa zdravom kontrolom. Takođe su uočene razlike između RA pacijenata i zdrave kontrole u pogledu broja leukocita, procenta 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 proučalnih 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.

Od ukupno 91 literaturnog navoda upotrijebljenih za pisanje doktorske disertacije, ovdje su navedeni samo oni, koji su korišteni za prikaz dosadašnjih istraživanja:

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2015): Cellular and Molecular Immunology. Eighth Edition, Updated Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2018): Stanična i molekularna imunologija. Medicinska knjiga Zagreb.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovský J, Wolfe F, Hawker G (2010) 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* 62(9):2569–2581.
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. Refferal 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): Emeryeve 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., Bodí V., Sanchis J., Miñana G., Mainar L., Santas E., Merlos P., Rumiz E., Darmofal H., Heatta A., Llacer 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. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, Kavanaugh A, McInnes IB, Solomon DH, Strand V, Yamamoto K (2018) Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primer* 4:18001.

31. 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.
32. Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978; 298(16):869–871.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.

3. S obzirom na predmet istraživanja, može se reći da se doprinos ove disertacije ogleda u dokazivanju da prisustvo nekih genskih varijanti *HLA-DRB1* gena povećava rizik od razvoja RA dok druge varijante pružaju zaštitu protiv ove bolesti te je HLA tipizacija od velike pomoći u postavljanju i potvrđivanju definitivne dijagnoze kod autoimunih bolesti. C-reaktivni protein (CRP) i brzina sedimentacije eritrocita (ESR) su bili najsenzitivniji reaktanti akutne faze kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) te bi se mogli koristiti za procjenu aktivnosti bolesti i primjenu ranog tretmana RA.

Autoimunost se definiše kao imuni odgovor na sopstvene (autologe) antigene, a 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 je hronična i sistemska autoimuna bolest. Dijagnostički indikatori i markeri na osnovu kojih se procjenjuje težina bolesti kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom su prisustvo C reaktivnog proteina (CRP, engl. *C reactive protein*), stopa sedimentacije eritrocita (ESR, *erythrocyte sedimentation rate*), reumatoidni faktor (RF, engl. *rheumatoid factor*) i antitijela na citrulinirane peptide (Anti-CCP).

Iako geni i antigeni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC) 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, engl. *microlymphocytotoxicity test*) 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).

Primjenjene metode ispitanja su adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća u ovom polju u svjetskim nivoima.

Ispoštovan je plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske disertacije.

Dobijeni rezultati su pokazali da su ispitivani parametri dali dovoljno elemenata za pouzданo istraživanje mada bi za preglednije istraživanje bilo dobro analizirati još neke parametre kao što su reumatoidni faktor (RF) ili antitijela na citrulinirane peptide (Anti-CCP).

Statistička obrada podataka je adekvatna.

- 1) Објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
- 2) Дати кратак увид у примијењени метод истраживања при чemu је важно оцијенити следеће:

1. Да ли су примијењене методе истраживања адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
2. Да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
3. Да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;
4. Да ли је статистичка obrada података адекватна.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

- 1) Primjenom adekvatnih metoda, kandidatkinja je u skladu sa postavljenim ciljevima analizirala koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita (ESR). Vrijednosti ESR ($P < 0,0001$) i CRP ($P < 0,0001$) su bile statistički značajno povišene kod pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa (RA) u poređenju sa kontrolnom grupom, a utvrđena je i povezanost između vrijednosti ESR i CRP kod pacijenata sa RA ($P < 0,0001$).

Analizom *HLA-DRB1* genskog lokusa, utvrđeno je prisustvo svih 13 alelnih grupa ovog lokusa (*HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15 i *16*) među ispitnicima kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (Javna Ustanova Domovi Zdravlja Kantona Sarajevo, Bosne i Hercegovine). Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB1*04* ($P = 0.01774$, OR = 2.345,95% CI = 1.093-5.311) i *HLA-DRB1*03* ($P = 0.04165$, OR = 2.225,95% CI = 0.9639-5.482) bila je značajno povećana među pacijentima sa dijagnozom RA u poređenju sa kontrolnom grupom i stoga predstavlja faktor rizika za razvoj ove bolesti. Frekvencije genotipova *DRB1*04/DRB1*04* ($P = 0.03669$, OR = 6.361,95% CI = 0.49-410) i *DRB1*03/DRB1*04* ($P = 0.050$, OR = 5.149,95% CI = 0.5582-248.6) su bile takođe značajno povišene među RA pacijentima i predstavljaju rizične genotipove za nastanak RA. Osim toga, kod RA pacijenata je utvrđena jaka povezanost između *DRB1*04-DRB4* ($P = 0.0259$) i *DRB1*03-DRB3* ($P = 0.04426$) haplotipova i rizika od razvoja RA. Genske varijante *HLA-DRB1* gena koje predstavljaju rizik za razvoj reumatoidnog artritisa kodiraju sekvencu od pet konzerviranih aminokiselina (QRRAA/RRRAA/QKRAA) na položaju 70-74 u trećem hipervarijabilnom regionu (HVR3) *DRB1* lanca koja se označava kao *shared epitop* (SE).

Pored *HLA-DRB1* alela koji doprinose RA podložnosti, drugi *HLA-DRB1* aleli pružaju zaštitu protiv bolesti. Značajno povećana frekvencija *DRB1*01/DRB1*15* ($P = 0.007366$, OR = 0.143,95% CI = 0.003077-1.185) i *DRB1*07/DRB1*16* ($P = 0.04172$, OR = 0.1894,95% CI = 0.003924-1,747) genotipova u kontrolnoj grupi može se smatrati zaštitnim faktorom za RA, to jest sporečavaju razvoj bolesti. Ovi genotipovi nišu bili uočeni (*DRB1*01/DRB1*15*) kod pacijenata sa RA ili su bili značajno smanjeni (*DRB1*07/DRB1*16*). Zaštitne HLA molekule imaju, umjesto SE-motiva, različitu ali zajedničku sekvencu na istom položaju u beta lancu HLA-DR molekula, sastavljenu od amino kiselinskih ostataka DERRAA. Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB5* gena je bila značajno povišena u kontrolnoj grupi u poređenju sa RA pacijentima ($P = 0.03307$).

4. Očekivani naučni doprinos disertacije se ogleda u dobijenim informacijama o preciznosti i tačnosti sa kojom se mogu odrediti pojedine varijante *HLA-DRB1* genskog lokusa, a postignuti rezultati bi trebali doprinijeniti primjeni PCR-SSP metode u dijagnostici RA. Kako su nivoi CRP i ESR često povećani i povezan sa težinom bolesti kod RA, utvrđen je i značaj određivanja vrijednosti CRP i ESR u procjeni aktivnosti bolesti.

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 antigena 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). 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 ukazuju 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 dokazano je prisustvo rizičnih varijanti gena i genotipova, a u skupini zdravih osoba, protektivnih varijanti genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa. Rezultati istraživanja ukazuju na značaj PCR-SSP tehnike u *HLA-DRB1*04* tipizaciji kao skrining testa u dijagnozi reumatoidnog artritisa. 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. Ovo će biti prvo istraživanje kojim će se dokazati povezanost genski varijanti *HLA-DRB1*04* gena sa reumatoidnim artritisom kod pacijenta koji pripadaju Javnoj ustanovi Dom zdravlja Kantona Sarajevo.

- 1) Укратко истаћи разлог због којих су истраживања предузета и представити проблем, предмет, циљеве и хипотезе;
- 2) На основу прегледа литературе сажето приказати резултате претходних истраживања у вези проблема који је истраживан (водити рачуна да обухвата најновија и најзначајнија сазнања из те области код нас и у свијету);
- 3) Навести допринос тезе у рјешавању изучаваног предмета истраживања;
- 4) Навести очекиване научне и прагматичне доприносе дисертације.

V МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

- 1) U toku istraživanja korišteni su uzorci periferne krvi ukupno 83 ispitanika sa dijagnozom reumatoidnog artritisa (RA), starosne dobi od 34 do 77 godina koji su bili pacijenti Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo. Kontrolna grupa je obuhvatala ukupno 164 zdrava ispitanika koji nisu imali dijagnozu reumatoidnog artritisa dok su po ostalim karakteristikama uskladieni sa testnom grupom. Starosna dob kontrolne grupe se kretala od 21 do 68 godina. Odabir ispitanika za uključivanje u istraživanje je vršeno nakon detaljnog informisanja potencijalnih ispitanika o značaju i metodama istraživanja i njihovog pristanka. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo.
- 2) Primjenjene metode istraživanja obuhvatale su biohemijsko-hematološke analize, HLA tipizaciju i biostatističku obradu podataka. Analizirane su hematološke vrijednosti kompletne krvne slike (CBC), diferencijalne krvne slike (DBC), sedimentacije eritrocita (ESR) kao i vrijednosti C reaktivnog proteina (CRP). Alelne varijante *HLA-DRB1* genskog

lokusa su određene metodom molekularne biologije koja se temelji na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) s prajmerima specifičnim za određenu sekvencu DNK (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers*, PCR-SSP). Biostatistička analiza ostvarenih rezultata vršena je korištenjem odgovarajućih populaciono-genetičkih i statističkih metoda i upotrebom odabranih statističkih programskih paketa

Biohemijske i hematološke analize

Za sve biohemijske i hematološke analize uzorci periferne venske krvi su uzeti u skladu sa standardima dobre laboratorijske prakse. Za kompletну i diferencijalnu krvnu sliku, vadi se 3 ml krvi u vakutainer epruvetu koja sadrži antikoagulans etilendiaminotetraoctenu kiselinu (EDTA). Hematološki parametri su određeni na automatiziranom analizatoru za hematologiju Beckman coulter DxH 800. Ova analiza je validirana i svakodnevno kontrolisana. Referentne vrijednosti za hematološke parametre su određene prema spolu. Za određivanja sedimentacije eritrocita (ESR) uzeto je 1,8 ml krvi u vakutainer epruvete sa antikoagulansom natrijum citratom u koju je postavljena graduisana pipeta (150 mm). Brzina sedimentacije se očitava u mm/h. Uzorci za biohemijsku analizu C-reaktivnog proteina (CRP) uzeti su u vakutainer epruvetu, centrifugirani 10 minuta na 3500 rpm, a serum je odvojen. C-reaktivni protein je kvantitativno određivan na aparatu Rochi/Hitachi cobas c311 systems (Boehringer Mannheim, Germany). Ova metoda je u Službi za laboratorijsku dijagnostiku validirana i redovno kontrolisana. Referentna vrijednost C-reaktivnog proteina je 0 – 5 mg/l.

HLA tipizacija

Za ekstrakciju genomske DNK, iz prikupljenih uzoraka periferne krvi primijenjen je standardni protokol, baziran na metodi isolovanja uz neznatne modifikacije (Miller et al., 1988). Za kvalitativno-kvantitativnu analizu izoliranih uzoraka DNK korila se horizontalna agarozna gel elektroforeza genomske DNK. Amplifikaciju *HLA-DRB1* genskog lokusa vršena je pomoću komercijalnog testa (HLA-Ready Gene DR Kit, Inno-Train, Njemačka) pri čemu su se za pripremu PCR radne smjese i temperaturnih uslova genske amplifikacije slijedila uputstva proizvođača. Kit sadrži komercijalni Ready PCR sa svim aditivima (dNTPs, PCR pufer, krebol red, glicerin) neophodnim za odvijanje reakcije. Za pripremu PCR radne smjese za amplifikaciju *HLA-DRB1* genskog lokusa korišten je obrazac: sterilna deionizovana voda (168 µl), amplifikacijski pufer (ReadyPCR; 84 µl), *Taq*-Polymeraza (5U/µl; 2,2 µl) uz korištenje PCR aparata Eppendorf Mastercycler gradient (Hamburg, Germany). PCR program je bio sljedeći: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 min na 96 °C, nakon čega je slijedilo 10 ciklusa od kojih je svaki trajao 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 vršila elektroforezom na 2% agaroznom gelu obojenom etidijum bromidom u TBE puferu. U električnom polju se amplikoni odvajaju prema njihovoj veličini i posmatraju pod UV svjetлом. Zatim je slijedilo čitanje reakcija iz HLA baterija manualno (Inno-train DIAGNOSTIK GMBH).

Biostatistička analiza

Za sve praćene biohemijsko-hematološke parametre rađene su deskriptivne metode. Za utvrđivanje statistički signifikantnih razlika srednjih vrijednosti između upoređivanih grupa primijenjen je T-test. Vrijednosti razlika $p < 0,05$ uzete su kao statistički signifikantne. Za izračunavanje frekvencija alela i genotipova, analizu heterozigotnosti, genskog diverziteta i polimorfizama, te za provjeru Hardy-Weinbergovog principa ravnoteže unutar HLA genskog lokusa korišten je statistički programski paket PowerMarker, verzija 3.25. Kompjuterski program OpenEpi v2.3.1 je korišten 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 procjenjen korištenjem „two-tail“ Fisher egzaktnog testa. Jačina asocijacije između prisustva određene genske varijante i javljanja bolesti određena je računanjem OR (engl. *odds ratio*, omjer izgleda) vrijednosti. Za procjenu preciznosti dobivenih vrijednosti se izračunava 95% interval pouzdanosti (95% CI) za OR vrijednost.

Primjenjene metode isptraživanja su adekvatne, dovoljno tačne i savremene, imajući u vidu dostignuća u ovom polju u svjetskim nivoima.

Ispoštovan je plan istraživanja koji je dat prilikom prijave doktorske disertacije.

Dobijeni rezultati su pokazali da su ispitivani parametri dali dovoljno elemenata za pouzdano istraživanje mada bi za preglednije istraživanje bilo dobro analizirati još neke parametre kao što su reumatoidni faktor (RF) ili antitijela na citrulinirane peptide (Anti-CCP).

Statistička obrada podataka je adekvatna.

- 1) Објаснити материјал који је обрађиван, критеријуме који су узети у обзир за избор материјала;
- 2) Дати кратак увид у примијењени метод истраживања при чemu је важно оцијенити сљедеће:

1. Да ли су примијењене методе истраживања адекватне, довољно тачне и савремене, имајући у виду достигнућа на том пољу у свјетским нивоима;
2. Да ли је дошло до промјене у односу на план истраживања који је дат приликом пријаве докторске тезе, ако јесте зашто;
3. Да ли испитивани параметри дају довољно елемената или је требало испитивати још неке, за поуздано истраживање;
4. Да ли је статистичка обрада података адекватна.

VI РЕЗУЛТАТИ И НАУЧНИ ДОПРИНОС ИСТРАЖИВАЊА

- 1) Primjenom adekvatnih metoda, kandidatkinja je u skladu sa postavljenim ciljevima analizirala koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita (ESR). Vrijednosti ESR ($P < 0,0001$) i CRP ($P < 0,0001$) su bile statistički značajno povišene kod pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisra (RA) u poređenju sa kontrolnom grupom, a utvrđena je i povezanost između vrijednosti ESR i CRP kod pacijenata sa RA ($P < 0,0001$).

Analizom *HLA-DRB1* genskog lokusa, utvrđeno je prisustvo svih 13 alelnih grupa ovog lokusa (*HLA-DRB1*01, *03, *04, *07, *08, *09, *10, *11, *12, *13, *14, *15 i *16*) među ispitanicima kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) (Javna Ustanova Domovi Zdravljia Kantona Sarajevo, Bosne i Hercegovine). Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB1*04* ($P = 0.01774$, OR = 2.345,95% CI = 1.093-5.311) i *HLA-DRB1*03* ($P = 0.04165$, OR = 2.225,95% CI = 0.9639-5.482) bila je značajno povećana među pacijentima sa dijagnozom RA u poređenju sa kontrolnom grupom i stoga predstavlja faktor rizika za razvoj ove bolesti. Frekvencije genotipova *DRB1*04/DRB1*04* ($P = 0.03669$, OR = 6.361,95% CI = 0.49-410) i *DRB1*03/DRB1*04* ($P = 0.050$, OR = 5.149,95% CI = 0.5582-248.6) su bile takođe značajno povišene među RA pacijentima i predstavljaju rizične genotipove za nastanak RA. Osim toga, kod RA pacijenata je utvrđena jaka povezanost između *DRB1*04-DRB4* ($P = 0.0259$) i *DRB1*03-DRB3* ($P = 0.04426$) haplotipova i rizika od razvoja RA. Genske varijante *HLA-DRB1* gena koje predstavljaju rizik za razvoj reumatoidnog artritisra kodiraju sekvencu od pet konzerviranih aminokiselina (QRRAA/RRRAA/QKRAA) na položaju 70-74 u trećem hipervarijabilnom regionu (HVR3) DR β 1 lanca koja se označava kao *shared epitop* (SE).

Pored *HLA-DRB1* alela koji doprinose RA podložnosti, drugi *HLA-DRB1* aleli pružaju zaštitu protiv bolesti. Značajno povećana frekvencija *DRB1*01/DRB1*15* ($P = 0.007366$, OR = 0.143,95% CI = 0.003077-1.185) i *DRB1*07/DRB1*16* ($P = 0.04172$, OR = 0.1894,95% CI = 0.003924-1,747) genotipova u kontrolnoj grupi može se smatrati zaštitnim faktorom za RA, to jest spriječavaju razvoj bolesti. Ovi genotipovi nišu bili uočeni (*DRB1*01/DRB1*15*) kod pacijenata sa RA ili su bili značajno smanjeni (*DRB1*07/DRB1*16*). Zaštitne HLA molekule imaju, umjesto SE-motiva, različitu ali zajedničku sekvencu na istom položaju u beta lancu HLA-DR molekula, sastavljenu od amino kiselinskih ostataka DERRAA. Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB5* gena je bila značajno povišena u kontrolnoj grupi u poređenju sa RA pacijentima ($P = 0.03307$).

Biostatistička analiza je izvršena korištenjem odgovarajućih populaciono-genetičkih i statističkih metoda i upotrebom odabranih programskih paketa OpenEpi v2.3.1 i Power Marker, v3.25. Rezultati su predstavljeni tabelarno i grafički. Pored komparacije dobijenih rezultata, izvršeno je i poređenje sa sličnim istraživanjima.

Na osnovu dobijenih rezultata, može se reći da je za konačne zaključke, potrebno povećati broj uzoraka, kao i broj ispitivanih parametara kao što su reumatoidni faktor (RF) ili antitijela na citrulinirane peptide (Anti-CCP).

- 2) Dobijeni rezultati su jasno prikazani, pravilno, logično i jasno su tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora, pri čemu je autor doktorske disertacije ispoljio dovoljno kritičnosti.
- 3) Prilikom istraživanja došlo se do saznanja da su C-reaktivni protein (CRP) i brzina sedimentacije eritrocita (ESR) bili najsenzitivniji reaktanti akutne faze kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA), a da prisustvo nekih genskih varijanti *HLA-DRB1* gena povećava rizik od razvoja RA dok druge varijante pružaju zaštitu protiv bolesti. PCR-SSP tehnika je visokosenzitivna i specifična u HLA tipizaciji.

Disertacija predstavlja značajan teorijski doprinos na području istraživanja biohemije i molekularne biologije sa mogućnošću primjene HLA tipizacije u predviđanju razvoja RA i utvrđivanju i potvrđivanju definitivnih dijagnoza kod autoimunih bolesti kod nekih osoba. Biomarkeri upale, uključujući ESR i CRP, bi se mogli koristiti za procjenu aktivnosti bolesti i uvođenje ranog tretmana RA kako bi se spriječila pojava simptoma ove bolesti.

Rezultate istraživanja i naučni doprinos doktorske disertacije potvrđuje i rad objavljen u naučnom časopisu Rheumatology International koji je indeksiran u svjetski citatnim bazama (Web of Science – WoS; Science Citation Index – SCI; SCOPUS; Current Contents/ Life Sciences; Current Contents/Clinical Medicine; Medline):

- **Klimenta B**, Nefic H, Prodanović N, Jadrić R, Hukic F. The association of the biomarkers of inflammation and the *HLA-DRB1* gene locus with the risk of developing rheumatoid arthritis in females. *Rheumatol Int* 2019; 39(12):2147–2157. <https://doi.org/10.1007/s00296-019-04429-y>

Drugi naučni rad je prihvaćen za objavljivanje u časopisu Genetics & Applications koji je indeksiran u priznatim svjetskim citatnim bazama (EBSCO, DOAJ, CAB Abstract, Google Scholar, Global Health database, Crossref and Index Copernicus).

- **Klimenta B**, Nefic H, Prodanović N, Hukić F, Mešić A. Hematological parameters in patients with rheumatoid arthritis and gene variants *HLA-DRB2*04* and *HLA-DRB2*03* *Genetics & Applications (in press.)*

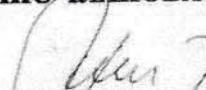
-
- 1) Укратко навести rezultate до којих је кандидат дошао;
 - 2) Оцијенити да ли су добијени rezultati jasno prikazani, pravilno, логично и јасно тумачени, упоређујући са rezultatima других аутора и да ли је кандидат при томе испољавао довољно критичности;
 - 3) Посебно је важно истаћи до којих нових сазнања се дошло у истраживању, који је њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

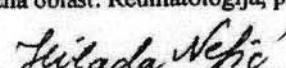
VII ЗАКЉУЧАК И ПРИЈЕДЛОГ

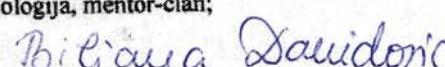
- 1) Doktorska disertacija mr. Biljane Klimenta je izrađena prema pravilima naučno-istraživačkog rada. Sveobuhvatnom analizom, utvrđeno je da ova doktorska disertacija predstavlja originalan naučni doprinos u oblasti primjenjene biohemije i molekulare biologije, što potvrđuju i objavljena dva originalna naučna rada u časopisima indeksiranim u svjetski citatnim bazama (Web of Science – WoS; Science Citation Index – SCI; SCOPUS; Current Contents/ Life Sciences; Current Contents/Clinical Medicine; Medline odnosno EBSCO, DOAJ, CAB Abstracts, Global Health database).
- 2) Na osnovu ukupne ocjene disertacije, Komisija daje pozitivnu ocjenu o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom **Biohemijsko-hematoški i molekularni parametri u dijagnostici reumatoidnog artritisa** mr. Biljane Klimenta i predlaže članovima Nastavno-naučnog vijeća Prirodno-matematičkog fakulteta i Senatu Univerziteta u Banjoj Luci da prihvati ovaj Izvještaj i omogući kandidatu javnu odbranu doktorske disertacije.
- 1) Навести најзначајније чињенице што тези даје научну вриједност, ако исте постоје дати позитивну вриједност самој тези;
- 2) На основу укупне оцјене дисертације комисија предлаže:
- да се докторска дисертација прихвati, а кандидату одобри одбрана,
 - да се докторска дисертација враћа кандидату на дораду (да се допуни или измијени) или
 - да се докторска дисертација одбија.

ПОТПИС ЧЛНОВА КОМИСИЈЕ

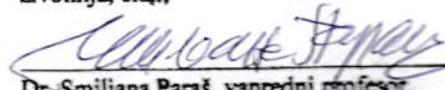
Датум: 29.01.2020. године

1. 
Dr. Nenad Prodanović, redovni profesor,
Medicinski fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci,
uža naučna oblast: Reumatologija, predsjednik;

2. 
Dr. Hilada Nefić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu,
uža naučna oblast: Genetika i Klinička
biologija, mentor-član;

3. 
Dr. Biljana Davidović-Plavšić, vanredni
profesor, Prirodno-matematički fakultet,
Univerzitet u Banjoj Luci, uža naučna oblast:
Biohemija i molekularna biologija, mentor-
član;

4. 
Dr. Radoslav Dekić, vanredni profesor,
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Banjoj Luci, uža naučna oblast: Fiziologija
životinja, član;

5. 
Dr. Smiljana Paraš, vanredni profesor,
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u
Banjoj Luci, uža naučna oblast:
Mikrobiologija, biologija ćelije, član.

ИЗДВОЕНО 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 разлог због којих не жели да потпише извјештај.