



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS

mr Biljana Klimenta

**BIOHEMIJSKO-HEMATOLOŠKI I MOLEKULARNI
PARAMETRI U DIJAGNOSTICI REUMATOIDNOG
ARTRITISA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Banja Luka, 2020.



UNIVERZITET U BANJOJ LUCI
UNIVERSITY OF BANJA LUKA
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FACULTY OF NATURAL SCIENCES AND MATHEMATICS

Biljana Klimenta, MSc

**BIOCHEMICAL-HEMATOLOGICAL AND MOLECULAR
PARAMETERS IN DIAGNOSIS OF RHEUMATOID
ARTHRITIS**

DOCTORAL DISSERTATION

Banja Luka, 2020.

Mentori: dr. Hilada Nefić, doktor bioloških nauka, redovna profesorica, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu, uža naučna oblast: „Genetika“ i „Klinička biologija“.

dr. Biljana Davidović-Plavšić, vanredna profesorica, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, uža naučna oblast: „Biohemija“ i „Molekularna biologija“.

Naslov doktorske disertacije: Biohemijsko-hematološki i molekularni parametri u dijagnostici reumatoidnog artritisa

Rezime: Reumatoidni artritis (RA) je autoimuna bolest koja uzrokuje hroničnu upalu zglobova. RA karakterizira ireverzibilna oštećenja muskulo-skeletnih struktura i drugih organskih sistema što vodi do invalidnosti oboljelih. Više faktora uključujući genske varijante *HLA-DRB1* genskog lokusa utiču na podložnost za razvoj RA. Ovi faktori mogu pokrenuti imunopatofiziološke mehanizme kod rizične populacije. Povišeni upalni biomarkeri, brzina sedimentacije eritrocita (ESR) i C-reaktivni protein (CRP) ukazuju na održavanje procesa aktivnosti kod pacijenata sa RA. U ovoj studiji iz uzoraka periferne venske krvi urađena je uporedna analiza biohemijsko-hematoloških vrijednosti uključujući kompletnu krvnu sliku (CBC), diferencijalnu krvnu sliku (DBC), CRP i ESR između kontrolne grupe i pacijenata sa RA Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo. Zatim je utvrđena povezanost između alelnih grupa i genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa koji nose genetičku predisponiranost za razvoj bolesti.

Hematološki testovi, uključujući kompletnu krvnu sliku (CBC) i diferencijalnu krvnu sliku (DBC), su obavljani na automatiziranom hematološkom analizatoru. ESR je izražen u mm/h. C-reaktivni protein je izmjeren standardnim CRP testom. Za procjenu povezanosti između *HLA-DRB* genskog lokusa i rizika od RA kod pacijenata je rađena genotipizacija niske rezolucije (dvocifrena) *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* genskih lokusa PCR metodom prajmera specifičnih za sekvencu (PCR-SSP).

CRP i ESR su bili najsenzitivniji od reaktanata akutne faze kod pacijenata sa RA. Analizom rezultata utvrđena je povezanost među CRP i ESR vrijednostima kod pacijenata sa RA. Biomarkeri akutne-faze odgovora, CRP i ESR, trebaju biti korišteni za procjenu aktivnosti bolesti i dopušteni rani tretman RA. Prisustvo određenih *HLA-DRB1* genskih varijanti povećava rizik od razvoja RA dok druge varijante pružaju odbranu (zaštitu) protiv

bolesti. HLA tipizacija je odlična pomoć u utvrđivanju i potvrđivanju konačnih dijagnoza RA bolesti. Rezultati potvrđuju da je *HLA-DRB1* genski lokus visoko polimorfan i u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata sa RA. Genetička podložnost u populaciji sa RA je povezana sa alelnim grupama *HLA-DRB1*04* i **03*, *DRB1*04/DRB1*04* i *DRB1*03/DRB1*04* genotipova i *DRB1*04-DRB4* ili *DRB1*03-DRB3* haplotipova i stoga predstavlja faktor rizika za razvoj ove bolesti. Prema dobijenim rezultatima, *DRB1*01/DRB1*15* i *DRB1*07/DRB1*16* genotipovi i *HLA-DRB5* genski lokus predstavljaju odbrambeni (zaštitni) faktor za RA.

Ključne riječi: reumatoidni artritis (RA), kompletna krvna slika (CBC), diferencijalna krvna slika (DBC), C-reaktivni protein (CRP), brzina sedimentacije eritrocita (ESR), *HLA-DRB* geni, PCR-SSP.

Naučna oblast: Prirodne nauke

Naučno polje: Biološke nauke

Klasifikaciona oznaka: 1.06.06.; 3.01.02.

Tip odabrane licence Kreativne zajednice: Autorstvo - nekomercijalno - bez prerada

Mentori: dr. Hilada Nefić, Doctor of biological sciences, Professor, Faculty of Science, University of Sarajevo, narrow scientific field: “Genetics” and “Clinical Biology”.

dr. Biljana Davidović-Plavšić, Associate Professor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka, narrow scientific field: „Biochemistry“ and „Molecular biology“.

Title of the doctoral dissertation: Biochemical-hematological and molecular parameters in diagnosis of reumathoid arthritis

Summary: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease causing chronic inflammation of the joints. RA is characterized by irreversible damage to musculoskeletal structures and other organ systems which is leading to disability of the diseased. Multiple factors including gene variants of the *HLA-DRB1* gene locus influence susceptibility to RA development. These factors may trigger immune pathophysiological mechanisms in the population at-risk. Elevated inflammatory biomarkers, erythrocyte sedimentation rate (ESR), and C-reactive protein (CRP) indicate maintenance of the activity process in patients with RA. In this study, a comparative analysis of biochemical-hematological values including complete blood count (CBC), blood count (DBC), CRP and ESR between the control group and patients with RA, Public Institution of the Health Center of the Canton of Sarajevo, was made from samples of peripheral venous blood. Then, the association between allelic groups and genotypes of the *HLA-DRB1* gene locus carrying a genetic predisposition for disease development was determined.

Hematologic tests, including CBC and DBC, were performed on an automated hematology analyzer. ESR is expressed in mm/h. C-reactive protein was measured by a standard CRP assay. Low-resolution (double-digit) *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* and *HLA-DRB5* gene loci PCR by sequence-specific primers (PCR-SSP) genotyping was performed to evaluate the association between the *HLA-DRB* gene locus and the risk of RA in patients.

CRP and ESR were the most sensitive of acute-phase reactants in patients with RA. Analysis of the results revealed an association between CRP and ESR values in patients with RA. Acute-phase response biomarkers, CRP and ESR, should be used to evaluate disease activity and allow early RA treatment. The presence of certain *HLA-DRB1* gene variants

increases the risk of developing RA while other variants provide defense (protection) against disease. HLA typing is a great help in establishing and confirming definitive diagnoses of RA. The results confirm that the *HLA-DRB1* gene locus is highly polymorphic in both the control group and RA patients. Genetic susceptibility in the RA population is associated with members of the *HLA-DRB1*04* and *DRB1*03* allelic groups, *DRB1*04/DRB1*04* and *DRB1*03/DRB1*04* genotypes and *DRB1*04-DRB4* or *DRB1*03-DRB3* haplotypes and therefore represents a risk factor for the development of this disease. According to the obtained results the *DRB1*01/DRB1*15* and *DRB1*07/DRB1*16* genotypes and the *HLA-DRB5* gene locus represent a protective (protective) factor for RA.

Keywords: rheumatoid arthritis (RA), complete blood count (CBC), differential blood count (DBC), C-reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), *HLA-DRB* genes, PCR-SSP.

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Biological sciences

Classification Code: 1.06.06., 3.01.02.

Type the selected license Creative Communities: CC BY-NC-ND

Zahvalnica

Zahvaljujem se Javnoj ustanovi Dom zdravlja Kantona Sarajevo i Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Sarajevu na podršci u realizaciji istraživanja doktorske disertacije.

Najveću zahvalnost dugujem mentoru prof. dr. Hiladi Nefić na ogromnoj pomoći tokom istraživanja i realizacije doktorske disertacije i mentoru prof. dr. Biljani Davidović-Plavšić na sugestijama i smjernicama tokom izrade disertacije.

Dugujem veliku zahvalnost prof. dr. Nenadu Prodanoviću na dragocjenoj pomoći tokom rada i publikovanja rezultata istraživanja.

Željela bih da se zahvalim prim. dr. Draganu Stevanoviću i prof.dr.Radivoju Jadriću na podršci, smjernicama i literaturi u realizaciji disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na bezgraničnoj podršci, a najveću zahvalnost kćerci Ani na bezgraničnom razumjevanju i moralnoj podršci tokom izrade doktorske disertacije.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Autoimune bolesti.....	1
1.2. Reumatske bolesti.....	4
1.3. Reumatoidni artritis (RA).....	6
1.4. Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC).....	14
1.5. HLA tipizacija.....	20
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Ispitanici i uzorci.....	23
3.2. Biohemijsko-hematološke analize.....	24
3.2.1. Brzina sedimentacije eritrocita (ESR).....	26
3.2.2. C-reaktivni protein (CRP).....	26
3.3. HLA genotipizacija.....	28
3.3.1. Izolacija genomske DNK.....	29
3.3.2. Horizontalna agarozna gel – elektroforeza genomske DNK.....	31
3.3.3. Molekularna metoda PCR–SSP.....	32
3.3.4. Elektroforeza PCR produkata.....	35
3.4. Biostatističke metode.....	37
4. REZULTATI I DISKUSIJA	39
4.1. Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe....	40
4.2. Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA).....	43
4.3. Usporedna analiza biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA).....	47
4.4. Rezultati analize alelnih grupa HLA-DRB1 genskog lokusa ispitanika kontrolne grupe.....	52
4.5. Rezultati analize genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa kontrolne grupe.....	57
4.6. Rezultati analize alelnih grupa HLA-DRB1 genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA).....	59
4.7. Rezultati analize genotipova HLA-DRB1 genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA).....	64
4.8. Komparativna analiza rezultata HLA-DRB1 genskog lokusa, frekvencija alelnih grupa, genotipova i haplotipova kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA)...	67

5. ZAKLJUČAK	84
6. LITERATURA	86
7. PRILOZI	94
7.1. Pregled slika	94
7.2. Pregled tabela	95
7.3. Pregled grafikona.....	98
<i>Tabela 7.4 Tabela prikaz vrijednosti biohemijско-hematoloških parametara kontrolne grupe</i>	99
<i>Tabela 7.5 Tabela prikaz vrijednosti biohemijско-hematoloških parametara kod pacijenata sa RA</i>	101

UVOD

1.1. Autoimune bolesti

Autoimune bolesti se ubrajaju među najznačajnije bolesti u kliničkoj imunologiji, međutim, etiologija ovih oboljenja još uvijek je nepoznata. U razvijenim zemljama autoimune bolesti pogađaju 2–5% populacije (Abbas *et* Lichtman, 2018). Saznanja o nastanku ovih oboljenja onemogućavaju činjenice da su ove bolesti najčešće poligenske, multifaktorske i heterogene prirode, a sindromi bolesti se javljaju znatno kasnije od pokretanja efektorskih mehanizama autoimunosti.

Imuni sistem posredovan brojnim ćelijama i molekulama urođene i stečene imunosti omogućava održavanje antigenske i genske homeostaze. Jedna od glavnih funkcija imunog sistema je sposobnost kontrole imunog odgovora na vlastite antigenske determinante. Poremećaji imunološke homeostaze, centralne i periferne tolerancije, udruženi sa drugim patofiziološkim simptomima, pokreću autoreaktivne mehanizme koji mogu biti usmjereni na produkciju antitijela protiv sopstvenih promjenjenih ili nepromjenjenih strukturnih biomolekula vlastitih autoantigena. Genetičku predispoziciju za nastanak autoimunih bolesti čini nekoliko grupa gena. Tu spadaju geni MHC (engl. *major histocompatibility complex*) odnosno, HLA (engl. *human leukocyte antigen*), geni antigen-specifičnog 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 predočavanje antigena, geni za komponente komplementa, spolno vezani geni i citokinski geni.

Brojna klinička istraživanja ukazuju da u razvoju ekspresije autoreaktivnih limfocita, mogu biti uključene promjene molekulske strukture sekvenci DNK gena, koje su odrednice limfocitnih receptora tokom sazrijevanja i diferencijacije T limfocita u timusu. U razvoju patogeneze autoimunih oboljenja razaranje ćelija i organa koji nose ciljne molekule je najčešći mehanizam nastanka bolesti (Andreis *et al.*, 2010). Genske studije su razjasnile brojne poremećaje u imunoregulaciji, ali nisu otkriveni mehanizmi za blokiranje ključnog patogenetskog mehanizma u razvoju autoimunih oboljenja. Za sada nema saznanja kako organizam prepoznaje svoje i strane antigene (Abbas *et* Lichtman, 2006).

Ekspresija mutiranog gena može značajno uticati na promjene u strukturi proteina, koji mogu biti prepoznati kao antigeni i pokrenuti autoimuni odgovor (Raptopoulou *et al.*, 2007). Jedna od hipoteza je stvaranje neo-antigena (novih antigena) konjugacijom haptena (jona metala ili male molekule) s endogenim antigenom (Bolon, 2012).

Brojni faktori utiču u razvoju rizika za nastanak autoimunosti. Istraživanja bazirana na analizi genoma ukazuju da su ove bolesti determinirane mnogobrojnim genskim lokusima. Kod nekih autoimunih oboljenja geni odgovorni za razvoj bolesti se poklapaju što ukazuje na iste imunološke mehanizme koji su odgovorni za razvoj različitih simptoma i različitih autoimunih oboljenja (Feero *et al.*, 2011). Za svaki organ i tkivo u organizmu je otkrivena po jedna autoimuna bolest (Bolon, 2012). Genska predisponiranost u interakciji sa faktorima spoljašnje sredine kao što su infekcije mogu da aktiviraju autoreaktivne mehanizme imunog sistema. Precizni mehanizmi kojima vanjski faktori utiču na autoimunost nisu poznati (Vojdani, 2014). Infekcije mogu da pokrenu funkcionalne strukture urođene i stečene imunosti u inficiranom tkivu na strani antigen, a prezentacija novih signala regulacije, indukuje kostimulatore, proteinske makromolekule, na profesionalnim antigen prezentujućim ćelijama (APC engl. *antigen-presenting cells*) i aktiviraju polimorfonuklearne leukocite da sintetiziraju citokine, interleukin 1 (IL1), interleukin 6 (IL6) i tumor nekrosis faktor – α (TNF- α) koji mogu da izmjene normalnu fiziološku funkciju B i T limfocita specifične imunosti.

Diferencijacija limfocita T u efektorske T ćelije za vrijeme infekcije je ovisna o receptorima na T limfocitima koji se vezuju različitim afinitetom za kostimulatorne molekule proteina na antigen prezentujućim ćelijama. Za sada nije poznato koje su odrednice prezentacije određenog T limfocitnog receptora za protein B7 kojim se inhibira ili aktivira imuni odgovor. Jedina mogućnost je da mirujuće antigen prezentujuće ćelije ekspimiraju dovoljno B7 za angažovanje inhibitornog receptora, ali nedovoljno za aktivaciju T ćelija (Abbas *et Lichtman*, 2006). Infekcije mogu promijeniti regulaciju inhibicije T limfocitnih receptora prema vlastitom antigenu i aktivirati opstanak populacije autoreaktivnih T limfocita. Sličnost antigenskih peptida infektivnih mikroorganizama sa antigenom domaćina i oslobađanje antigena iz oštećenih tkiva može da aktivira autoreaktivne mehanizme autoimunosti.

Do sada nije jasno koji tip infekcije inducira ili inhibira autoimunu reakciju. Pokazano je kako pojačana metilacija određenih nukleotida DNK u limfocitima T može biti povezana s autoimunošću zato što se onemogućuje vezanje transkripcijskih faktora i sprječava se transkripcija gena (Bolon, 2012). Također, promjena u metilaciji DNK je

dodatni mehanizam kojim egzogeni faktori utiču na promjene u ekspresiji gena. Na primjer, okolišni zagađivači, dim cigareta i konzumacija alkohola povezani su s autoimunošću upravo zbog indukcije metilacije DNK (Vojdani, 2014). Detaljnijim proučavanjem DNK polimorfizama otkrivenih kod različitih bolesti, uočava se da se mnogi geni preklapaju, odnosno da zajednički mehanizmi dovode do razvoja različitih autoimunih bolesti (Lettre *et al.*, 2008). U patoimunološkim procesima autoimunih bolesti važnu ulogu imaju limfociti TCD4. Djelovanje antitijela ka sopstvenim (autologim) antigenima i aktivacije autoreaktivnih T-limfocita dovode do nastanka oštećenja ćelija i tkiva vlastitog organizma (Janeway *et al.*, 2005).

Rezultati brojnih studija pokazali su da je kod većine autoimunih bolesti genetička predispozicija povezana sa genima koji kodiraju sintezu HLA antigena (Caillat-Zucman, 2008). Važno je naglasiti da su kod većine bolesti mutirani geni MHC kompleksa imali najveći učinak (Bolton, 2012).

Porodična i populaciona istraživanja pokazala su da je mogućnost da jedinke koje su naslijedile određene HLA alele, obole od nekih autoimunih bolesti veća u poređenju sa osobama koje ih nemaju. Povećana incidencija se naziva "relativni rizik" udruženosti HLA i bolesti (Abbas *et Lichtman.*, 2006). Istraživanja povezana sa genomom GWAS (*A genome-wide association study*) su korisna zato što je broj pojedinaca čiji genom može biti istražen vrlo velik i što je veći broj uzoraka, to će više gena biti proučeno i možda povezano s različitim bolestima, ukoliko se nađu razlike između bolesnih i zdravih (Sawcer *et al.*, 2014).

1.2. Reumatske bolesti

Reumatske bolesti su bolesti muskuloskeletnog sistema, a često zahvataju druge organe i organske sisteme. I pored intenzivnog proučavanja, etiologija i patogeneza ovih oboljenja je nedovoljno razjašnjena. Nastanak reumatskih oboljenja je posljedica brojnih i različitih faktora među kojima su: genetski faktori, spol, godine života, infektivni agensi, endogeni i egzogeni faktori itd. Patofiziološki poremećaji kod oboljelih mogu imati akutni, subakutni, najčešće hronični klinički tok, a zajednički simptomi svim reumatskim bolestima su bol i oštećenje funkcije u zahvaćenim organskim sistemima.

Reumatska oboljenja karakterišu različite kliničke manifestacije. Za mnoge bolesti je karakteristično preklapanje uključenosti organskih sistema i simptoma što otežava prepoznavanje statusa bolesti i dijagnozu. Prema važećoj podjeli Svjetske zdravstvene organizacije (SZO), tj. desetoj reviziji međunarodne klasifikacije, reumatske bolesti se dijele na osnovu etiologije, kliničkog toka bolesti, imunoseroloških, biohemijskih, genetskih testova, radiološkog nalaza i terapijskog pristupa u pojedine grupe: degenerativne, vanzglobne, zapaljenske, infekcijske, metaboličke, rijetke reumatske bolesti i nereumatske bolesti sa reumatičnim manifestacijama (Popović *et al.*, 2000). Brojne studije su pokazale da su reumatske bolesti među vodećim hroničnim bolestima u svijetu kako u razvijenim tako i u nerazvijenim zemljama. Smatra se da 10-20% svjetskog stanovništva ima neko prolazno ili trajno reumatično oboljenje (Dieppe et Paine, 1994; Ruiz, 1995). Od reumatičnih bolesti, samo u SAD 1995. godine, bolovalo je oko 40 miliona ljudi, a smatra se da će 2020. godine oko 60 miliona američkog stanovništva imati neku reumatsku bolest (American College of Rheumatology, 1996). Studija iz četiri američka centra rađena tokom 1994. godine izvedena na 3501 bolesniku sa reumatoidnim artritismom, pokazuje da je i stepen mortaliteta ovih bolesnika najmanje dvostruko veći u odnosu na zdravu populaciju (Gabriel *et al.*, 1995).

Ireverzibilna oštećenja lokomotornog sistema i patofiziološki poremećaji organskih struktura onemogućavaju radne sposobnosti i životne aktivnosti oboljelih. Funkcionalna ograničenja bolesnika, zavisnost od tuđe njege, gubitak zaposlenja, visoki troškovi liječenja, udružene sa drugim aspektima življenja uvećavaju troškove zdravstvenih i socijalnoekonomskih sistema. Reumatske bolesti imaju veliki medicinski značaj jer svaki sedmi pacijent koji posjeti doktora dolazi zbog reumatskih tegoba, muskuloskeletnog bola ili poremećaja funkcije lokomotornog sistema (Popović *et al.*, 2000). Najčešće su vanzglobne reumatske bolesti, koje predstavljaju gotovo jednu trećinu uzroka koštano-

mišićnog bola i degenerativne reumatske bolesti od kojih boluje više od 50% osoba starijih od 60 godina (Emery, 1997).

Inflamatorne reumatske bolesti su bolesti hroničnog toka u čijoj osnovi su najčešće genetski faktori autoreaktivnog mehanizma imunoloških ćelija ili upale infekcijske prirode. Uticaj multigenских promjena u etiopatogenezi ovih oboljenja najviše je izražen kod oboljenja sistemskog vezivnog tkiva u koje se ubrajaju reumatoidni artritis (RA) i njegove varijante: juvenilni hronični artritis (JHA), Stilova bolest kod odraslih, sistemski eritemski lupus (SLE), primarni Sjogrenov sindrom, dermatopolimiozitis (DPM), sistemska skleroza (SS), kombinovana sistemska bolest vezivnog tkiva (KSBVT), nedovoljno definisane sistemske bolesti vezivnog tkiva (NSBVT) i heterogena grupa vaskulitisanih sindroma (Popović *et al.*, 2000).

Na osnovu dijagnostičkih procedura najvažnije karakteristike ovih bolesti su: bolest se češće javlja kod žena i u starijoj dobi, zahvaćenost više organa i organskih sistema, genetička predispozicija, prisustvo antitijela i pozitivni nalaz biomarkera upale, brzina sedimentacije eritrocita (ESR), C-reaktivnog proteina (CRP), promjene u krvnoj slici, progresija bolesti (egzacerbacija) u toku hronične upale, spontane remisije, preklapanje kliničkih simptoma i dr.

Do sada su klinička istraživanja pokazala da je oboljelim od reumatskih bolesti neophodan multidisciplinarni pristup što uključuje skupu dijagnostiku, troškove dugotrajnog liječenja i rehabilitaciju. Zbog povećanih troškova liječenja i rehabilitacije koji opterećuju zdravstvene i socijalno-ekonomske sisteme, razvijene su različite strategije u ranom otkrivanju reumatskih bolesti.

1.3. Reumatoidni artritis (RA)

Reumatoidni artritis (RA) je hronična sistemska bolest, koja uzrokuje oštećenja zglobova i drugih organskih sistema. Ime reumatoidni artritis prvi je dao Garrod 1858. godine (Jajić, 1982). Ova upalna reumatska bolest je jedna od najčešćih autoimunih bolesti koja u svijetu bilježi porast morbiditeta i mortaliteta. Broj oboljelih od reumatoidnog artritisa je prema procjeni oko 1% svjetske populacije (Kasper *et al.*, 2015). Incidenca 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 (Firestein, 2003). Taj odnos između muškaraca i žena održava se u svim decenijama života (poslije 20-te godine) sa nešto učestalijom pojavom bolesti kod žena poslije 50-te godine života (Silman *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 1996). Uzrok nastanka reumatoidnog artritisa još je nedovoljno istražen iako je postignut znatan napredak u razumjevanju patogeneze bolesti. Pošto se ova bolest javlja širom svijeta, pretpostavlja se da su okidači ove bolesti ubikvitarni mikroorganizmi. Ovo oboljenje ima multifaktorsku etiologiju, najvjerovatnije sa oligenskom predispozicijom domaćina koja je u interakciji sa okidačem iz "spoljašnje sredine" (Coenen *et Gregersen*, 2009).

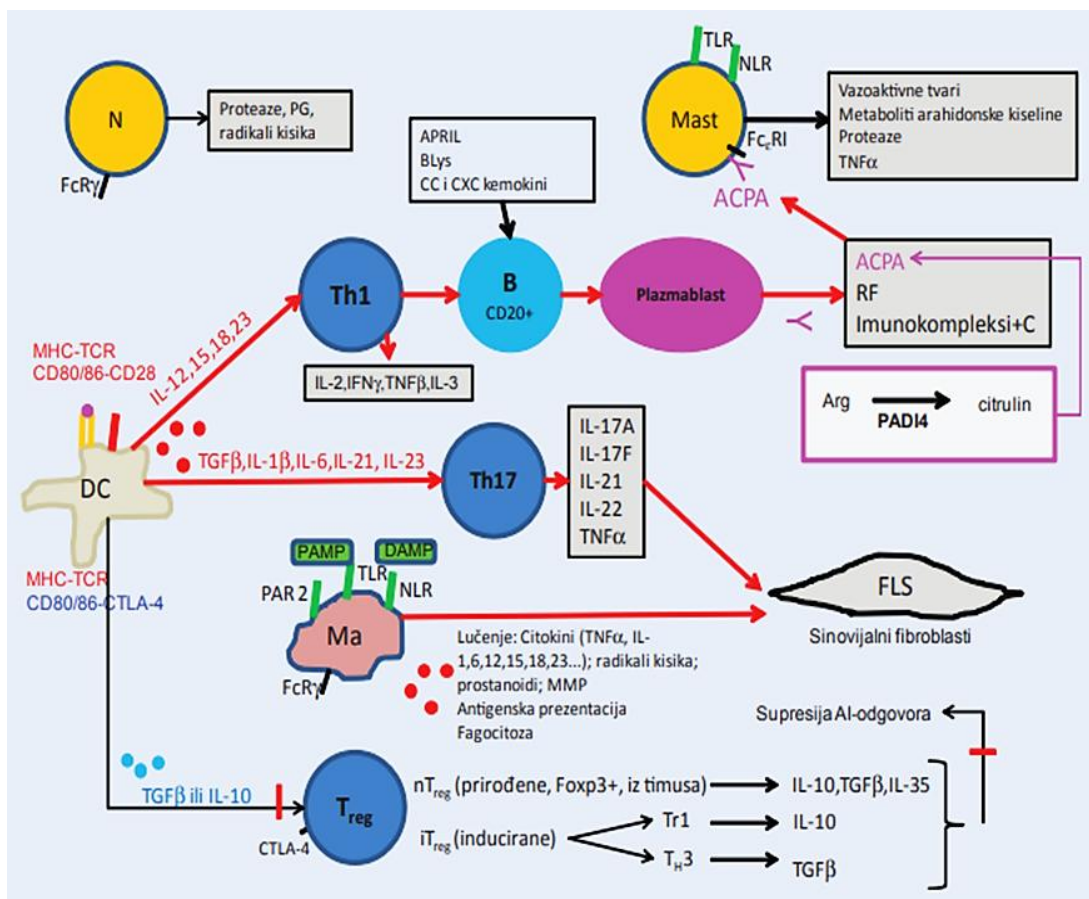
Zdrav organizam kontrolira i ograničava upalne procese, ali kod reumatoidnog artritisa izvjesni poremećaji imunog sistema podržavaju ovaj proces i dovode do brojnih kliničkih i patofizioloških manifestacija. Poznato je da se imunopatološki proces u sinoviji odvija u pet faza: prezentacija i prepoznavanje nepoznatog antigena, proliferacija T i B ćelija, angiogeneza, proliferacija sinovijalnih ćelija, prezentacija citokina, formiranje panusa, aktiviranje hondrocita i metaloproteinaza, početna destrukcija zgloba, destrukcija hrskavice (Harris, 1990). Kod zdravih osoba sinovijalna tečnost prenosi hranljive materije i kisik iz krvi do zglobnog hrskavičavog tkiva i olakšava pokrete koštanih struktura zgloba, a kod oboljelih od reumatoidnoga artritisa imuna disfunkcija aktivira nekontrolisanu proizvodnju upalnih ćelija i molekula koji potiču upalne procese sinovijalne (zglobne) ovojnice i zglobne čahure (Slika 1). U zahvaćenom području upalni proces se ponavlja i održava, pojačava se protok krvi i povećava količina sinovijske tekućine koja je zamućena zbog prisustva brojnih ćelija i enzima koji su uključeni u destrukciju ćelija sinovijalne ovojnice, hrskavice, vezivnog tkiva i zglobno koštane strukture.

Na osnovu dosadašnjih saznanja u procesu fagocitoze leukocita iz lizozoma se, zbog pojačane metabolitičke aktivnosti, oslobode brojni enzimi (katepsin D, proteaza, B

glukuronidaza i dr.) koji oštećuju osnovne komponente vezivnog tkiva, bazalnu membranu, funkcionalne strukture matriksa hrskavičavog tkiva, glukozamin, kolagen, konstituente hrskavice proteoglikan i druge gradivne strukture.

Dominantno obilježje reumatoidnog artritisa je stvaranje autoreaktivnih autoantitijela na vlastite proteine kolagen, imunoglobulin i bjelančevine toplinskog šoka (HSPs, engl., *heat shock proteins*). Postavljanje dijagnoze u ranoj fazi bolesti je otežano jer se sindromi bolesti javljaju kasnije, a simptomi bolesti mogu se preklapati u početnoj fazi sa nekim drugim bolestima. Danas se reumatoidni artritis, prema nekim autorima, sagledava kao "urgentno stanje u medicini" (Pincus, 1994). Tok bolesti zavisi od uspostavljanja blagovremene rane dijagnoze.

Provedena istraživanja kod srodnih pacijenata koji imaju prisutna autoantitijela su pokazala ne samo upalu sluznice, već i abnormalnosti signalnih i metabolomskih puteva u cirkulirajućim limfocitima CD4 T, klonske promjene u receptorima B ćelija periferne krvi, promjene plazmablasta u izotipu IgA, širenje epitopa protiv citruliranih peptida, a u plućima osoba pod rizikom za RA prisustvo neutrofilnih ćelija (Raza *et al.*, 2019). Autoreaktivni limfociti T su usmjereni na autoantigene, Fc-ulomak IgG, kolagen tipa II, proteoglikan agrekan, hrskavičave bjelančevine i bjelančevine toplinskog šoka koji luče citokine i aktiviraju limfocite B, monocite, makrofage, endotelne ćelije i fibroblaste (Andreis *et al.*, 2010).



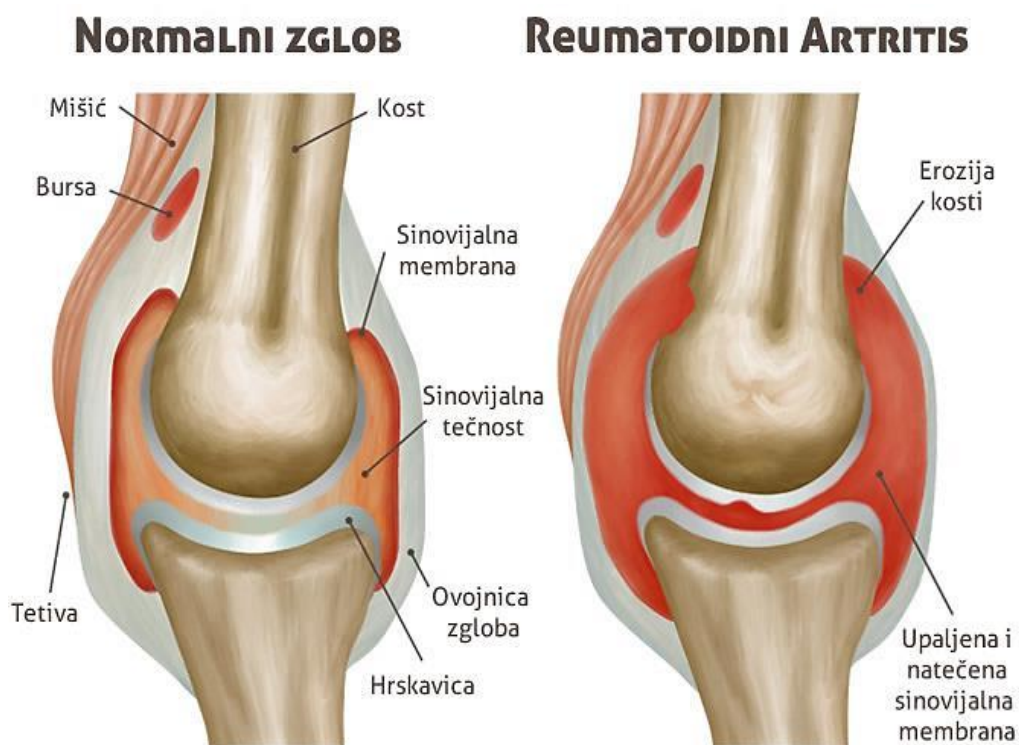
Slika 1. Šematski prikaz složene stanične interakcije u sinovijalnoj membrani u reumatoidnom artritisu. (N = neutrofil; Mat = mastociti; DC = dendritične ćelije; B = limfociti B; Th1 = Th1 pomoćnički limfociti T; Th17 = Th17 pomoćnički limfociti ; Ma = makrofazi; Treg = regulacijski limfociti T; FLS = sinoviociti slični fibroblastima; TLR = receptori slični Toll receptorima; NLR = receptori slični nukleotidnim receptorima; RF = reuma faktor; ACPA = autoprotutijela usmjerena na citrulinirane proteine/peptide; FcR = Fc receptor; APRIL = ligand induciran proliferacijom; TNF = faktor tumorske nekroze; TGF = transformirajući faktor rasta; PADI4 = peptidil-arginin deiminaza; PAMP = molekularni slijed vezan za patogen; DAMP = molekularni slijed vezan za oštećenje; PAR 2 = receptor aktiviran proteazama.

(Preuzeto sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-pathogenic-mechanisms-in-rheumatoid-arthritis-Ravli%C4%87-Gulan-Vrbani%C4%87/8c70b475d2aabfc654afa6a857a88b8a619bde1e>).

U serumu oboljelih od RA mogu se naći detektibilna autoantitijela protiv vlastitog tkiva, prije kliničkih simptoma, najčešće reumatoidni faktor (RF, engl. *rheumatoid factor*) – autoantitijelo (antiimunoglobulin) protiv imunoglobulina IgG. Kod 80% bolesnika reumatoidni faktor pripada imunoglobulinu IgG i IgM (Jajić, 1995). Reumatoidni faktor je čest kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom, te može biti pozitivan, a da pacijent nema reumatoidni artritis (Scott *et al.*, 2010). Kod seropozitivnih pacijenata RF može biti značajan dijagnostički parametar za razvoj reumatoidnog artritisa, ali i kod drugih bolesti može biti povišen RF. U dijagnostici reumatoidnog artritisa se koristi test za detekciju autoantitijela na ciklične citrulirane peptide (ACCPA, engl. *anti-cyclic citrullinated peptide antibodies*) koji ima visoku specifičnost (90%) i osjetljivost (96%) u dijagnostici RA (Wegner *et al.*, 2010). Anti-CCP je značajan za razlikovanje reumatoidnog artritisa od drugih upalnih artritisa, a posebnu važnost ima kod seronegativnih pacijenata. Antitijela usmjerena na ciklične citrulirane peptide se smataju prognostičkim biljekom RA, a dokazano je da mogu potaknuti osteoklastogenezu (Scott *et al.*, 2010). Gen PADI4 je odgovoran za posttranslacijsku zamjenu arginina u citrulin. Regulatorni limfociti T koji se nalaze u tkivima ljudi oboljelih od RA imaju smanjenu funkcionalnost. Na lošu ravnotežu između Th17 i regulatornih limfocita T može uticati i TNF- α koji blokira aktivnost regulatornih limfocita T (Furukawa *et al.*, 2015).

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

Uočeno je kako zajednički amino-kiselinski motiv (QKRAA, zajednički epitop) u HLA-DRB1 regiji, pridonosi osjetljivosti na razvoj RA. Ova saznanja sugeriraju kako selekcija limfocita T, prezentiranje antigena i promjena u afinitetu za (predočeni) peptid imaju ulogu u razvoju specifičnog autoreaktivnog imunskog odgovora. Druga moguća objašnjenja za povezanost RA i zajedničkog epitopa su molekularna mimikrija za zajednički epitop zbog mikrobnih proteina i pojačano starenje limfocita T zbog HLA molekula koje sadrže zajednički epitop (Koch, 2007).



Slika 2. Uporedni shematski prikaz normalnog zgloba i zgloba kod reumatoidnog artritisa

(Preuzeto sa: <https://www.narodnilijek.com/web/reumatoidni-artritis/>)

Reumatoidni artritis je karakteriziran oticanjem zgloba, mekoćom i razaranjem sinovijalnih zglobova (Slika 2) što vodi do teške invalidnosti i prerane smrtnosti. Dodatni znakovi i simptomi RA mogu uključiti produženu jutarnju ukočenost zgloba, artralgiju, crvenilo i zagrijanost zgloba, slabu groznicu, bol, umor, slabost, depresiju, gubitak apetita i manjak krvnih ćelija. Kod nekih pogođenih individua razvijaju se reumatoidni noduli. Reumatoidni artritis može također uzrokovati upalu drugih tkiva i organa (koža, oči, pluća, srce, bubrezi, pljuvačne žlijezde, nervno tkivo, koštanu srž i krvne žile).

Prema revidiranim kriterijima iz 2010, "definitivni RA" je karakteriziran prisustvom sinovitisa u barem jednom zglobu, odsustvom alternativnih dijagnoza koje bolje opisuju sinovitis i dostizanjem konačnog rezultata od šest ili više (od mogućih 10) iz individualnih rezultata u četiri domene: broj i mjesto zahvaćenih zglobova, serološku abnormalnost, pojačanu akutnu fazu odgovora i produženo trajanje simptoma (Aletaha *et al.*, 2010; Smolen *et al.*, 2018).

Revidirani kriteriji za klasifikaciju reumatoidnog artritisa objavili su Američko reumatološko društvo ARA (*American College of Rheumatology*) i Evropsko udruženje protiv reumatizma EULAR (*European League Against Rheumatism*). Ova klasifikacija za

RA će omogućiti ne samo ranu dijagnozu i liječenje već i istraživanje u ranijim fazama bolesti (Tabela 1).

Tabela 1. Klasifikacijski kriterij za reumatoidni artritis (RA)

Kriterij	Skor
Broj i veličina zglobova koji su natečeni. Liječnik broji koliko je velikih zglobova (ramena, laktovi, kukovi, koljena, gležnjevi) i koliko je malih zglobova (mali zglobovi u zglobovima, rukama i nogama) natečeno. Ovi kriteriji su klasificirani kao „zglobna zahvaćenost“.	Mogući skor je od 0 do 5.
Krvni testovi. Određuje se reumatoidni faktor (RF) i anticiklička citrulinirana peptidna antitijela (anti-CCP ili ACPA) u serumu. Oni su obično viši kod ljudi koji imaju reumatoidni artritis. Ovi kriteriji su klasificirani kao "serologija".	Mogući skor je od 0 do 3.
Dodatni testovi krvi. U krvi se određuje C-reaktivni protein (CRP) i brzina sedimentacije eritrocita (ESR). Ovi kriteriji su klasificirani kao "reaktanti akutne faze".	Mogući skor je 0 ili 1.
Koliko dugo traju simptomi. Liječnik primjećuje jesu li simptomi trajali manje od šest ili šest i više sedmica. Ovi kriteriji su klasificirani kao "trajanje simptoma".	Mogući skor je 0 ili 1.

Prisustvo autoantitijela, poput reumatoidnog faktora (RF) i anti-citruliniranih proteinskih antitijela (ACPA) kod pacijenata predviđa razvoj RA. Povišeni reaktanti akutne faze, brzina sedimentacije eritrocita (ESR) i C-reaktivni protein (CRP), ukazuju na održavanje procesa aktivnosti kod pacijenata sa RA. Precizna etiologija RA nije još utvrđena. Ne postoji znana specifična terapija za RA, ali liječenje može usporiti napredak bolesti ukazujući na značaj ranih dijagnoza i efektivnu-supresivnu terapiju bolesti ili minimiziranje pojave simptoma RA.

Danas se u kliničkoj praksi koristi biološka terapija (rekombinantni proteini) u tretmanu oboljelih od RA, među kojima su inhibitori na citokin TNF α prisutan u sinovijalnoj tekućini, inhibitori za IL-6 koji se nalazi u zglobu oboljelih, sintetiziraju ga makrofagi i sinovijalne ćelije, podstiče angiogenezu, aktivaciju osteoklasta i drugi biološki modulatori koji inhibitorno djeluju na medijatore upalnih procesa.

U poređenju sa općom populacijom, ljudi koji imaju RA-povezanu rodbinu su pod većim rizikom od razvoja ove bolesti (rizik kod rodbine je od 2 do 17 puta veći nego kod pojedinaca iz opće populacije). Također je opaženo da pacijenti sa ranijim nastupanjem bolesti imaju veću prevalencu RA među njihovim srođnicima nego oni kod kojih se razvije kasnije u životu. Studije iz četiri US centra pokazuju da je stopa smrtnosti ovih pacijenata bar dvaput veća nego u zdravoj populaciji (Gabriel *et al.*, 1995).

Simptomi RA su različiti za svaku osobu i mogu varirati u jačini. Patofiziološki poremećaji, kod oboljelih stalno podstiču upalne reakcije, posredovane mehanizmima specifične imunosti limfocita T i limfocita B. Stalna prisutnost nepoznatog antigena ili prirodnih antitijela koja su izmjenjena pa postaju antigeni, održavaju autoimune upalne procese. Za sada nije poznata priroda poremećaja koji pokreće imunološku autoreaktivnu komponentu ćelija. Većina ljudi ima epizode povećane aktivnosti buknuća bolesti koje su praćene periodima bez simptoma (remisija) kada se otok i bol smanje ili nestanu. Simptomi imaju tendenciju da se javljaju u ciklusima, stoga ljudi imaju periode buknuća (rekrudescencije) i remisije. Vremenom RA može dovesti do težih oštećenja zgloba, koja ograničavaju pokret i mogu uzrokovati značajan invaliditet. Dijagnoza RA je bazirana na nekoliko različitih testova. Testovi krvi se često koriste u dijagnostici RA. Reumatoidni faktor je prvo antitijelo koje je detektovano kod ljudi sa RA. U dijagnostici RA se također koristi određivanje brzine sedimentacije eritrocita i koncentracije CRP. Strukturne promjene mogu se vizualizirati konvencionalnom radiografijom.

U krvi može biti otkrivena smanjena količina hemoglobina. Povećan broj leukocita može ukazivati na upalni proces. Limfopenija, neutropenija i trombocitopenija su česta pojava kod oboljelih od reumatidnog artritisa. Upala može biti znak hronične bolesti, imunog poremećaja ili drugog zdravstvenog stanja poput RA. Upalni procesi u tijelu mogu dovesti do pojave proteina krvi koji agregiraju eritrocite, a zatim precipitiraju iz normalnih krvnih ćelija. ESR je ubrzan kod 90% pacijenata sa aktivnim RA. C-reaktivni protein je prisutan u tragovima u krvi, prisustvo viših koncentracija ovog proteina u plazmi znatno se povećava za vrijeme upalnog stanja. ESR i C-reaktivni protein su nespecifični RA indikatori upale. Oba testa su korištena za procjenu aktivnosti bolesti.

Uzrok RA je ipak nedovoljno istražen. Faktori koji mogu povećati rizik od RA uključuju: spol, dob, rasu, porodičnu prošlost, promjene u spolnim hromosomima (naročito kod žena), gojaznost (naročito kod žena sa 55 ili mlađih, koje su pretile ili gojazne čini se da je nešto veći rizik od razvoja RA), ozljedu zgloba, faktore načina života (poput dugotrajnog pušenja i vježbanja), izloženosti okolišu (izloženosti poput azbesta ili silicija mogu

povećati rizik od razvoja RA), zaposlenje (izlaganje nekim vrstama prašine ili vlakana, težak rad, teško dizanje, savijanje koljena, ponavljajući pokreti) i genetički faktori. Ovi faktori mogu potaknuti stanje kod ljudi koji su pod rizikom. Geni zapravo ne uzrokuju RA, oni mogu učiniti podložnijim faktorima okoliša, poput infekcija određenim virusima i bakterijama koje mogu potaknuti bolest. Oštećenje tkiva tokom ovih infekcija može voditi do poremećaja mehanizama tolerancije.

Genetička komponenta je odgovorna za 50-60% podložnosti RA dok je doprinos HLA u nasljeđivanju procijenjen na 11-37%. Većina autoimunih bolesti je povezana sa individualnim haplotipom HLA molekula klase II. Utvrđeno je da osobe oboljele od reumatoidnog artritisa imaju podudaran dio slijeda B lanca molekule HLA-DR, koji se nalaze u alelnim oblicima DR1 i DR4, a taj slijed imaju i neke bjelančevine toplinskog šoka mikroorganizama te glikoprotein gp 110 Epstein- Barrovog virusa (Andreis *et al.*, 2010).

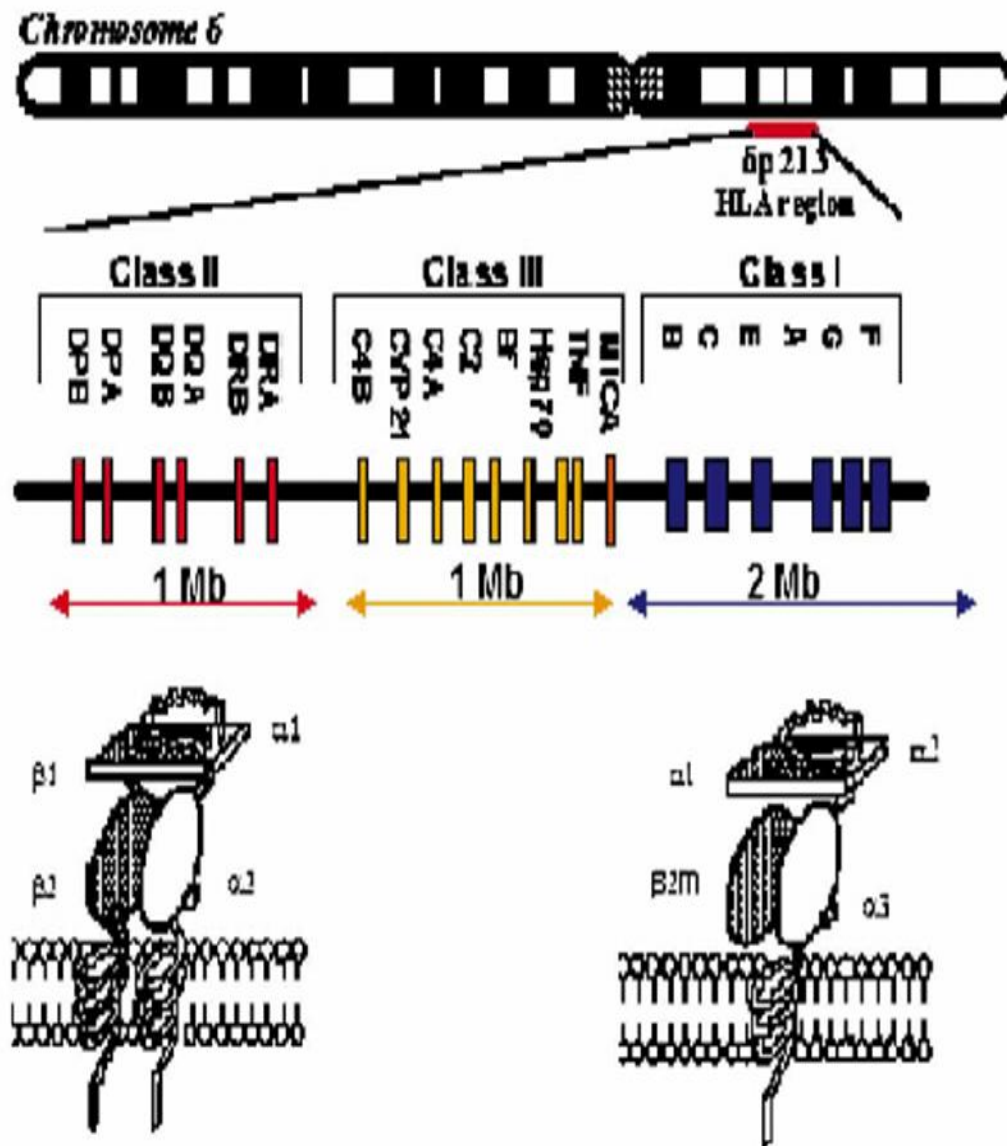
Stastny je najprije utvrdio da je RA povezan sa HLA-DRw4 (serološkom grupom), dok su sukcesivne studije potvrdile povezanost sa *HLA-DRB1*04* genskim varijantama. Ova povezanost je opažena u mnogim populacijama, međutim, u različitim etničkim grupama povezanost je utvrđena između drugih varijanti *HLA-DRB1* genskog lokusa i RA, koje se mogu pojaviti zajedno sa *HLA-DRB1*04* ili odvojeno (Stastny, 1978). Poseban podset HLA-DRB1 genskih varijanti (aleli *DRB1*01*, *DRB1*04* i *DRB1*10* grupa), koji se nazivaju zajednički aleli epitopa (SE), su najvažniji genetički pridonositelj za rizik od razvoja RA. HLA-DR4 i zajednički epitopi (SE) predstavljaju približno 15% RA faktora rizika. Osim poznatih SE alela, drugi *HLA* aleli, poput *HLA-DRB1*13* i *DRB1*15* varijanti su bili povezani sa podložnošću RA u nekim populacijama (Kurko *et al.*, 2013). Određeni polimorfizmi u drugim genima mogu također biti povezani sa podložnošću RA, uključujući *PTPN8*, *PTPN22*, *IL23R*, *TRAF1*, *CTLA4*, *IRF5*, *STAT4*, *CCR6*, *SLC22A4*, *MHC2TA*, *NFKBIL1* i *PADI4*.

1.4. Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC)

Genski sistem glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) predstavlja skup gena koji se nalazi u genomu svih sisara. Kompleks gena i antigena 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 regija je grupirana na kratkom kraku hromosoma 6 (6p21.3) i proteže se preko 3.5 mega baza (Mb) DNK, dok su antigeni, produkti MHC nađeni na različitim ćelijama i u različitim količinama. Ova regija sadrži oko 220 gena, mnogi od njih imaju imunoregulatorne funkcije. MHC lokus se proteže oko 4 centimorgana unutar crossovera pojavljuje se u oko 4% mejoza. Geni HLA lokusa kodiraju i nadziru proteine koji su sastavni dio ćelijske membrane na antigen-prezentirajućim ćelijama (engl. *antigen presenting cells*, APC). Različiti klonovi T-ćelija svake jedinke mogu da prepoznaju određene peptide samo ako su ti peptidi prezentovani u kompleksu sa MHC molekulama. Proteini produkovani regulacijom HLA gena pomažu imunom sistemu razlikovati molekule vlastitih proteina od proteina stranih infektivnih agenasa (poput virusa i bakterija).

MHC je najpolimorfiji genski sistem kod ljudi, što se ogleda u izuzetno visokom stepenu genetičke varijabilnosti njegovih produkata (antigena). Postoji trenutno 17.509 HLA i povezanih alela opisanih HLA nomenklaturom i uključenih u IPD-IMGT/HLA bazu podataka. Većina ovih gena su locirani jedni blizu drugih i obično se nasljeđuju u bloku kao haplotip. MHC geni su kodominantno eksprimirani kod svake individue – za date MHC gene, svaka individua izražava alele koji se nasljeđuju od oba roditelja. Klasa I i II su mnogo značajnije i njihove funkcije su imunoregulacijske i komplementarne, dok klasa III nema s njima ništa zajedničko izuzev blizine smještaja gena u genomu. HLA-A, B i C su najvažniji članovi klase I MHC gena, budući da su njihovi produkti definirani kao klasični transplantacijski antigeni. Molekule HLA-A, B i C su heterodimerni glikoproteini. MHC molekule klase I su prisutne na gotovo svim ćelijama i odgovorne su za prezentiranje antigena iz unutrašnjosti ćelije (endogeni antigeni) citotoksičnim T limfocitima (CTL).

Geni i antigeni MHC su podijeljeni zbog funkcionalnih razlika u tri klase (Slika 3).



Slika 3. Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC): (a) Hromosomsko mjesto i mapa gena koja prikazuje više gena unutar MHC regije na kratkom kraku hromosoma 6 (6p21.3).

(b) Slikovni prikaz molekularnih struktura HLA klase I i klase II koje prikazuju rascjep vezanja peptida formiran između domena $\alpha 1$ i $\alpha 2$ u slučaju klase I i domena $\alpha 1$ i $\beta 1$ u slučaju molekula klase II.

(Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/Human-major-histocompatibility-complex-MHC-a-Chromosomal-location-and-gene-map_fig1_6336320).

Molekule HLA-A, -B i -C se sastoje od MHC-kodiranog α ili teškog lanca od oko 44 kDa i nekodiranog MHC lakog lanca (β_2 -mikroglobulina) od 12 kDa molekularne težine. β_2 -mikroglobulin kodira nepolimorfni gen koji se nalazi na hromozomu 15, a potreban je za formiranje stabilnog kompleksa klase I. Teški lanac sačinjavaju tri dijela: izvanćelijski dio koji ima tri globularne domene α_1 , α_2 i α_3 , transmembranskog dijela i citoplazmatskog repa. Domeni α_1 i α_2 sadrže visoko varijabilne regione koji određuju specifičnost antigena klase I HLA i ova dva domena formiraju mjesto vezivanja peptida. Dok kod domena α_3 aminokiselinske sekvence su iste za sve molekule klase I neovisno od alela koji ih kodira. Većina ovih gena je polimorfna, smješteni su blizu jedni drugih i obično se nasljeđuju u bloku kao haplotip. Na jednom hromosomu, geni klase I su A, B, C, a geni klase II su DP, DQ i DR. Heterozigotna jedinka na svakoj svojoj ćeliji može imati 6 antigena klase I i 6 antigena klase II. Međutim, kod antigena klase II u genomu postoje dva ili tri gena za β lanac (a samo jedan za α) koji se prepisuju i u pojedinoj ćeliji, tako da na ćeliji može biti i više od 6 različitih antigena klase II (i do 20). Sve ćelije sa jedrom u tijelu ispoljavaju molekule HLA klase I (Abbas et Lichtman., 2006-2007), dok je ispoljavanje molekula HLA klase II ograničeno na B-ćelije, antigen-prezentirajuće i aktivirane mikrovaskularne endotelne ćelije.

Regija klase II MHC gena je veličine između 1.000 i 1.200 kb sa šest pod-regija, označenih sa HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DO, HLA-DN i HLA-DM. Set MHC alela prisutan na svakom hromosomu je MHC haplotip. HLA-DRB1 geni su dio porodice gena HLA kompleksa. Citogenetička lokacija *HLA-DRB1* gena je 6p21.32 i molekularna lokacija je 32.578.836 do 32.589.836 baznih parova na hromosomu 6 (*Homo sapiens*, GRCh38.p7). Istraživači su identificirali najmanje 2.479 različitih varijanti *HLA-DRB1* gena (IPD-IMGT/HLA izdanje 3.36.0, <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Strukturno su molekule klase II slične onima klase I, a izražene su kao heterodimeri na površini ćelija sa jednim teškim α -lancem (34 kDa) i jednim β -lancem (29 kDa) glikoproteina. Molekule klase II se sastoje dva nekovalentno vezana polipeptidna lanca, α i β -lanca. Oba lanca imaju dvije izvanćelijske imunoglobulinske domene, α_1 i α_2 za α -lanac i β_1 i β_2 za β -lanac, transmembranski i unutarstanični dio (Slika 4).

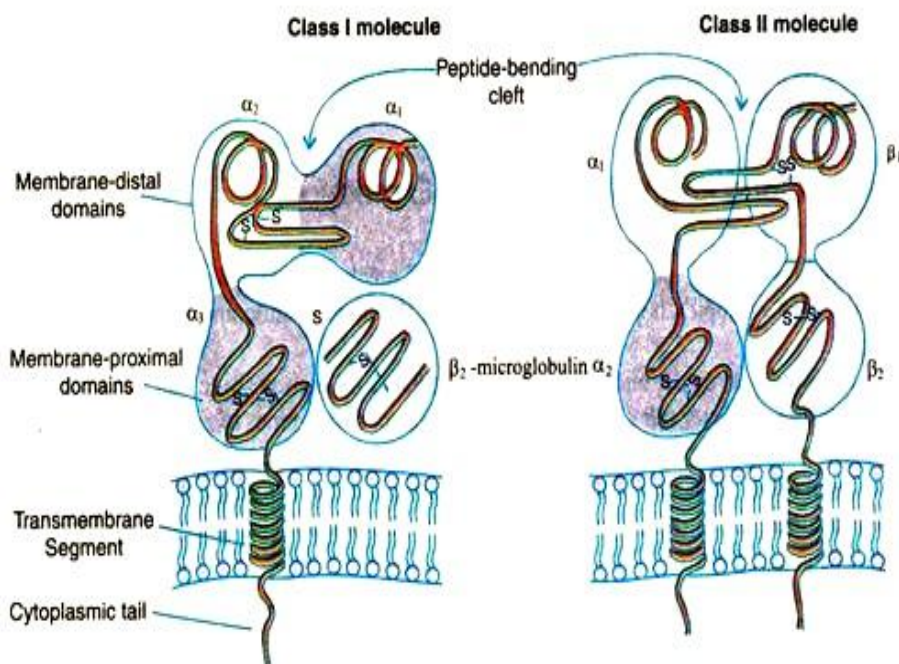


Fig. 22.20 : Structure of MHC molecules; A, Class I molecule; B-Class II molecule.

Slika 4. Uporedni prikaz strukturnih razlika između MHC molekula klase I i MHC molekula klase II.

(Preuzeto sa: <http://www.biologydiscussion.com/immunology/major-histocompatibility-complex-mhc-molecule-microbiology/66216>).

Žlijeb za vezanje peptida formira se od strane visoko polimorfnih $\alpha 1$ i $\beta 1$ domena. MHC molekule klase II se ispoljavaju na površini profesionalnih antigen-prezentirajućih ćelija kao što su B limfociti, makrofagi, dendritske ćelije i aktivirani T limfociti. Njihova uloga je da prezentuju egzogene antigene koji su ušli u ćelije endocitozom pomoćnim T limfocitima. Pomoćni T limfociti imaju nekoliko ključnih uloga, uključujući aktivaciju makrofaga i B limfocita.

HLA-DR molekula je sastavljena od α i β lanca glikoproteina kao heterodimera na površini ćelija. Lanac α je produkovan od *HLA-DRA* gena i lanac β je kodiran *DRB1*, *DRB3*, *DRB4* ili *DRB5*. Svaka individua ima jedan HLA DR α i jedan ili dva HLA-DR β gena. *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* pripadaju specifičnim DR haplotipovima. Većina alternativnih gena β -lanca povezanih sa *HLA-DRB1* su pseudogeni (*HLA-DRB2* i *HLA-DRB6* do *HLA-DRB9*) (Ozaki et al., 2014; Day et al., 2008). HLA-DR α je invarijantan a HLA-DR β (*HLA-DRB*) je polimorfan. Stoga, različitosti u HLA-DR β lancu objašnjavaju različite peptid-vezujuće motive HLA-DR molekula.

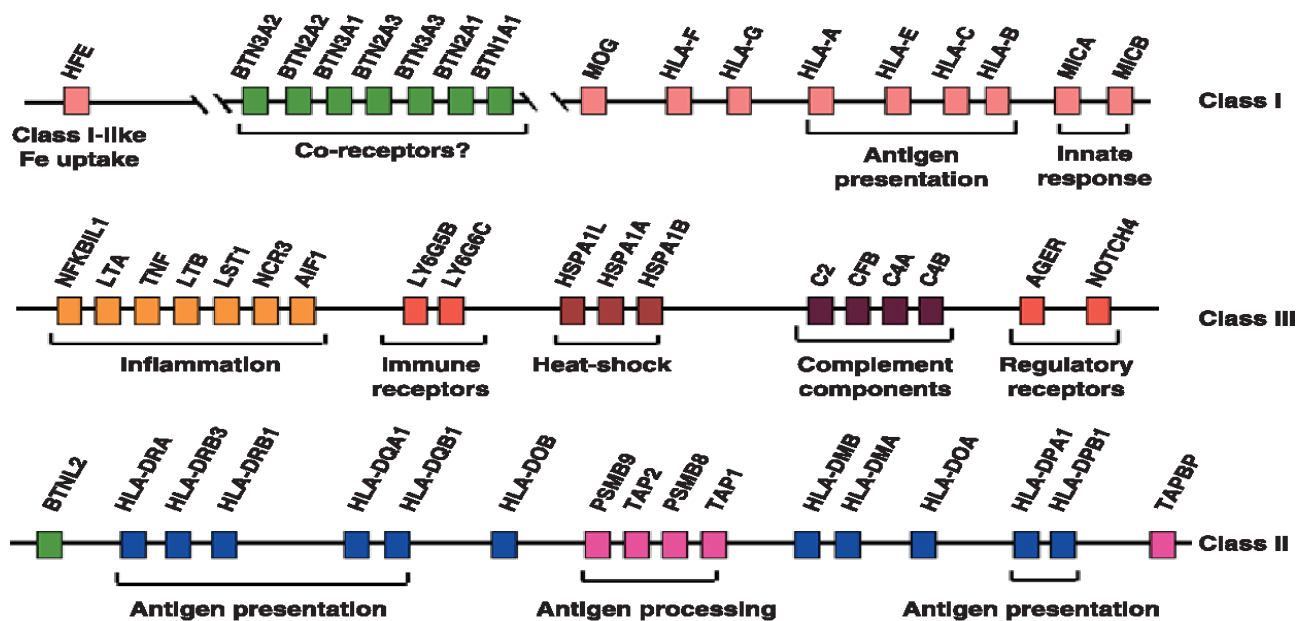


Figure 3. A reduced map of the MHC illustrating clustering of immune system genes. Two kinds of gene clustering are apparent. First, sequences

Slika 5. Reducirana mapa MHC koja ilustrira grupiranje gena imunološkog sistema. Prikazane su dvije vrste grupiranja gena. Prvo, sekvencijski povezani duplikati koji su omogućili diverzifikaciju duplikata, npr. HLA ili C4 komplementarni geni. Drugo, sekvencijski nepovezani geni s povezanom imunološkom funkcijom, npr. PSMB8/9-proteosomske komponente, TAP1/2-peptidni transporteri, TAPBP-peptidni šaperon i HLA-peptidni prikaz.

(Preuzeto sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/Human-MHC-architecture-and-evolution%3A-implications-Traherne/64864d64e49f31a585600d9485256a5e400efc46/figure/1>)

MHC molekule klase II prikazuju peptide CD4⁺T ćelijama, ovi tipovi T ćelija vrše različite funkcije u zaštiti protiv mikroorganizama (Abbas et Lichtman, 2015). Povezanost MHC genotipova u razvoju autoimunosti može biti jedan od faktora u patogenezi nekih oboljenja, a i drugi geni mogu kodirati različite peptide koji mogu uticati na ćelijski odgovor (Slika 5).

Antigenski receptori T specifičnih limfocita udruženi sa HLA molekulama učestvuju u regulaciji imunološkog odgovora na različite endogene i egzogene proteinske antigene. Unutarćelijske imunološke strukture s jedrom prepoznaju strani antigen u sklopu MHC I molekula i usmjeravaju prema citotoksičnim CD8T ćelijama.

HLA molekule su povezane sa više od 100 različitih oboljenja (Kulski *et* Inoko, 2005). Većina autoimunih bolesti je vezana za pojedine haplotipove molekula HLA klase II. Uloga genetičkih faktora u etiologiji RA ustanovljena je otkrićem povezanosti bolesti sa klasom II MHC kompleksa, preciznije sa genskom varijantom HLA-DRB1*04. 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 spriječavanju nastanka reumatoidnog artritisa.

Regija klase III MHC gena sadrži više od 75 gena koji kodiraju proteine koji nisu povezani sa ćelijskim imunitetom, ali mogu modulirati ili regulirati imuni odgovor. To uključuje faktor nekroze tumora (TNF), proteine toplinskog šoka (HSP) i proteine komplekta (C2, C4). Dio regiona klase III pored regiona klase I naziva se i inflamatorni region s obzirom na genski sadržaj.

1.5. HLA tipizacija

MHC kompleks je najpolimorfiji genski sistem kod čovjeka. Laboratorijsko određivanje HLA polimorfizma se naziva tipizacija tkiva. Mada geni i antigeni ovog sistema imaju važnu ulogu u imunopatogenezi autoimunih bolesti, HLA tipizacija se ne koristi rutinski u dijagnostici autoimunih bolesti. Izvodi se na dvije razine, antigenskoj i genskoj.

Antigeni HLA određuju se serološkom metodom (testom mikrocitotoksičnosti) koja daje uvid u polimorfizam na nivou membranskih proteina. Geni HLA određuju se metodama molekularne biologije koje se temelje na PCR-u. Molekularna tipizacija omogućuje odrediti i polimorfizam unutar gena - tipizacija visoke rezolucije (engl. *high resolution typing*). Veliki broj autoimunih bolesti je vezan za pojedine haplotipove molekula HLA. Relativni rizik od pojave određene autoimune bolesti razlikuje se iako se pojavljuje kod bolesnika sa istim haplotipovima HLA što upućuje na kompleksni mehanizam ekspresije bolesti.

Molekularna tipizacija sistema HLA na razini 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). Serološka i molekularna tipizacija može biti značajan dodatni dijagnostički parametar u slučajevima nejasne kliničke dijagnoze ili kao 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 sprječavanju bolesti prije nego što dođe do razvoja težih oblika simptoma i komplikacija bolesti. HLA tipizacija je od velike pomoći u postavljanju i potvrđivanju definitivne dijagnoze kod autoimunih bolesti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovni ciljevi istraživanja su odrediti vrijednosti biohemijско-hematoloških parametara, kompletne krvne slike (CBC), diferencijalne krvne slike (DBC), brzine sedimentacije eritrocita (ESR) i koncentracije C-reaktivnog proteina, i utvrditi HLA profil pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA), te zatim, dobijene rezultate uporediti sa rezultatima kontrolne zdrave skupine pacijenata Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo.

Utvrditi da li između nesrodnih bolesnika 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). Utvrditi da li se u skupini bolesnika može dokazati postojanje rizičnih varijanti gena (alelnih grupa) i genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa – odnosno varijanti gena i genotipova koji predstavljaju značajan rizik za razvoj bolesti. Utvrditi da li se u skupini zdravih osoba može dokazati postojanje protektivnih varijanti gena i genotipova – odnosno varijanti gena i genotipova koji imaju statistički značajan zaštitni efekat za sprečavanje razvoja bolesti. Na kraju, dobijene rezultate uporediti sa rezultatima sličnih studija rađenih na drugim svjetskim populacijama.

Ostvarivanje postavljenih ciljeva istraživanja postignuti su realizacijom sljedećih zadataka:

1. Prikupljanjem uzoraka periferne krvi pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i zdravih nesrodnih pacijenata Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo;
2. Analizom rezultata biohemijско-hematoloških parametara iz uzoraka periferne venske krvi;
3. Izolacijom genomske DNK iz uzoraka periferne krvi (metodom po Miller-u *et al.*, 1988);
4. Provjerom kvaliteta izolovane genomske DNK elektroforezom na 1% agaroznom gelu;
5. Izvođenjem PCR-SSP metode uz pomoć komercijalnog testa (*HLA-Ready Gene DR*, Inno-Train, Njemačka);
6. Nakon završetka PCR reakcija, prisustvo i kvalitet amplificiranih genskih produkata su provjeravani elektroforezom PCR produkata na 2% agaroznom gelu;

7. Utvrđivanjem prisustva različitih alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa;
8. Određivanjem prisustva najučestalijih genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa u skupini RA pacijenata i zdravih nesrodnih pacijenata Javne Ustanove Dom Zdravlja Kantona Sarajevo;
9. Procjenom odstupanja od *Hardy-Weinbergovog* ekvilibrijuma (HWE), te analizom heterozigotnosti, genskog diverziteta i informacije o udjelu polimorfizma (PIC) za *HLA-DRB1* genski lokus;
10. Upoređivanjem dobijenih rezultata u skupini pacijenata sa reumatoidnim artritismom sa skupinom zdravih nesrodnih pacijenata;
11. Istraživanjem moguće povezanosti varijanti gena i genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa MHC kompleksa sa nastankom ove autoimune bolesti;
12. Upoređivanjem frekvencije alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa u skupini pacijenata oboljelih od RA i kontrolne skupine. Primjenom „*case-control*“ testa uraditi analizu asocijacije genskih varijanti i prisustva/odsustva bolesti, te analizu genotipova i prisustva/odsustva bolesti na nivou *HLA-DRB1* genskog lokusa;
13. Utvrđivanjem povećane frekvencije alelnih grupa u kontrolnoj grupi koje imaju protektivni efekat u sprečavanju pojave reumatoidnog artritisa;
14. Određivanjem genotipova koji su predisponirajući za nastanak RA;
15. Rezultati istraživanja su statistički obrađeni uz pomoć odgovarajućih programskih paketa;
16. Upoređivanjem dobijenih rezultata sa rezultatima sličnih istraživanja na drugim svjetskim populacijama.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici i uzorci

Israđivanje je provedeno u Službi za laboratorijsku dijagnostiku, biohemijsko-hematološkog laboratorija Novo Sarajevo, Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo i Laboratorija za genetiku Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu.

Ova studija je rađena u periodu od aprila 2015-te do juna 2018-te godine. Hematološko-biohemijske analize su rađene iz uzoraka periferne venske krvi 82 ispitanika zdrave kontrolne grupe i 80 pacijenta kojima je dijagnosticiran reumatoidni artritis (RA).

Molekularno-genetičke analize *HLA-DRB1* genskog lokusa su provedene na uzorcima periferne venske krvi 82 ispitanika zdrave kontrolne grupe i 83 pacijenta kojima je dijagnosticiran RA.

Prilikom prikupljanja uzoraka, primjenjeni su etički principi istraživanja. Podaci vezani za godine i spol su dati od strane donora i svih sudionika uključenih u ovu studiju i koji su potpisali informirani pristanak.

Studija je odobrena od strane Centra za nastavnu i naučno-istraživačku djelatnost (NNID) i istraživačkog Etičkog komiteta Javne ustanove Dom zdravlja Kantona Sarajevo.

3.2. Biohemijsko-hematološke analize

Analiza biohemijsko-hematoloških parametara uzoraka periferne venske krvi je rađena kod 80 pacijenta sa dijagnosticiranim reumatoidnim artritisom i 82 zdrava ispitanika kontrolne grupe. Za hematološke analize kompletne krvne slike (CBC, engl. *Complete Blood Count*) i diferencijalne krvne slike (DBC, engl. *Differential Blood Count*), venepunkcijom je uzeto 3ml krvi u vakutainer epruvete koje sadrže antikoagulans etilendiaminotetraoctenu kiselinu (EDTA). Unutar testne i kontrolne grupe pacijenata su analizirani hematološki parametri CBC i DBC iz pune krvi. Kompletna krvna slika uključuje broj eritrocita (RBC, engl. *Red Blood Cell*), leukocita (WBC, engl. *White Blood Cell*) i trombocita (PLT, engl. *Platelets*).

Ispitanicima su određeni hemoglobin (HGB, engl. *Hemoglobin*), hematokrit (HCT, engl. *Hematocrit*), eritrocitne korpuskularne konstante, prosječni volumen eritrocita (MCV, engl. *Mean Cell Volume*), prosječna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH, engl. *Mean Cell Hemoglobin*), prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (MCHC, engl. *Mean Cell Hemoglobin Concentration*), mjera varijabilnosti veličine eritrocita (RDW, engl. *Red Cell Distribution Width*), RDV-SD (engl. *Red Cell Distribution Width Standard Deviation*) trombocitne konstante, prosječni volumen trombocita (MPV, engl. *Mean Platelet Volume*) i određeni pojedini tipovi leukocita, neutrofil (NEU, engl. *neutrophil*), eozinofili (EOS, engl. *eosinophil*), bazofili (BASO, engl. *basophil*) monociti (MONO, engl. *monocyte*) i limfociti (LYM, engl. *lymphocyte*). Omjeri neutrofila i limfocita (NLR) i omjeri trombocita i limfocita (PLR) su također određeni.

Uzorci venske krvi su uzeti u skladu sa standardima dobre laboratorijske prakse. Hematološki parametri su mjereni na automatiziranom hematološkom analizatoru BeckmanCoulter DxH 800. Ove analize su potvrđene i kontrolirane svaki dan.

Mjerenje hematoloških parametara kompletne krvne slike rađena je Culterovom metodom. Pumpa za aspiraciju aspirira 165 μ l krvi, krvne ćelije su suspendovane u DXH provodljivoj tekućini (otapalu) i prolaze kroz otvor u kupelji s trostrukim otvorima za leukocite i eritrocite. U WBC kupelji približno 6,0 ml otapala DXH i približno 28 μ l uzorka kombinira se s 1,08 ml lize ćelija DXH za konačno razrjeđenje u omjeru od 1: 251. U kupelji sa eritrocitima, približno 10 ml DXH otapala i približno 1,6 μ l uzorka se razrjeđuje u omjeru 1:6250. Nakon mješanja i inkubacije uzorka i reagensa, na 6 inča vakuma, suspenzija krvnih ćelija provodi se pomoću električne energije u otvor gdje sistem vrši mjerenje broja i volumena ćelija.

Svi impulsi dobijeni sa detekcije obrađenih uzoraka-volumen, provodljivost, raspršivanje svjetlosti, modulom višestrukog pretvornika (MTM) prikupljaju se i šalju na karticu održavanja signala analizatora gdje se vrši konverzija signala iz analognog u digitalni. Proces osigurava sljedeća digitalna mjerenja koja obrađuje Upravitelj sistema: vrijeme, volumen (vršna amplituda impulsa), brzina brojanja, vrijeme čekanja, širina impulsa, korekciju podudaranja, izbor, generiranje histograma od 256 kanala za leukocite, eritrocite i trombocite te njihove obrasce analize izbora, korekcija interferencija. Stepenn raspršenosti svjetlosti sa ćelija se određuje pomoću električnog sistema koji pretvara svjetlosne u električne impulse.

Diferencijalna krvna slika (DKS) Culterovom metodom određuje se primjenom VCS tehnologija. Diferencijacija leukocita na analizatoru se vrši upotrebom tri mjerenja: Analiza volumena ćelija – leukocita upotrebom niskofrekventne struje. Analiza provodljivosti ćelijske stjenke i detekcija razlika u svojstvima komponenti, karakterizira nuklearne, granularne sastavnice i hemijski sastav unutrašnjosti ćelije primjenom struje visoke frekvencije mjerenjem promjena u provodljivosti. Mjerenje raspršenosti svjetlosti s Modulom višestrukog pretvornika koji koristi struju kako bi čestice prošle kroz zonu otkrivanja jedna po jedna i diodu lasera za osvjetljavanje čestica. Osvjetljene čestice istovremeno raspršuju i apsorbuju dio slučajne svjetlosti. Senzori strateški postavljeni oko protoka ćelija prikupljaju raspršenu svjetlost od interesa. Kombinacija niskofrekventne struje, visokofrekventne struje i tehnologije raspršivanja laserskog svjetla daje informacije o svakoj ćeliji koje se prevode putem Upravitelja sistema u dijagrame sa podacima (Beckman, 2009).

3.2.1. Brzina sedimentacije eritrocita (ESR)

Sedimentacija eritrocita (ESR, engl. *Erythrocyte Sedimentation Rate*) je laboratorijska analiza krvi kojom se određuje sposobnost taloženja krvnih ćelija u epruveti sa graduiranom pipetom u kojoj je izvađena venska krv, ako je dodavanjem antikoagulantnog sredstva spriječeno zgrušavanje krvi. S obzirom da je broj eritrocita u odnosu na druge ćelije krvi jako veliki, govori se o sedimentaciji eritrocita. Brzina sedimentacije eritrocita zavisi od dužine vremena stajanja krvi, od broja i osobine eritrocita i odnosa pojedinih komponenti u krvnoj plazmi.

Za određivanje brzine sedimentacije eritrocita je uzeto 1,8 ml venske krvi u vakutainer epruvete sa antikoagulansom Na-citratom (omjer krvi i natrijum citrata je 1:3). U epruvete pune krvi se postavljaju graduirane pipete od 150 mm. Zatim se uzorci krvi stavljaju u stalak za sedimentaciju jedan sat. Brzina sedimentacije eritrocita je izražena u mm/h (normalne vrijednosti su bile 0 – 10 mm/h). Ako je stopa ESR visoka, to može biti povezano sa upalnim stanjem koje može biti reakcija na infekciju ili ozljedu, hroničnu bolest, imuni poremećaj ili drugo medicinsko stanje.

3.2.2. C-reaktivni protein (CRP)

Biohemijska analiza, koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP, engl. *C-reactive Protein*) je značajan dijagnostički laboratorijski parametar za praćenje toka bolesti kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa.

C-reaktivni protein je imunološki protein koji se sintetiše u jetri. Sastoji se od pet identičnih polipeptidnih lanaca koji formiraju petočlani prsten molekularne mase 105 kD. Koristi se u laboratorijskoj dijagnostici kao marker akutnih upalnih reakcija i infekcije. Značajan je za praćenje reakcije učinkovitosti farmakološke terapije. Uzorci krvi za kvantitativno određivanje C-reaktivnog proteina u serumu, uzeti su standardnom tehnikom venepunkcije u biohemijske epruvete koje ne sadrže antikoagulans. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 rpm, prema uputama proizvođača i time su osigurani uslovi za potpuno odvajanje seruma od krvnih ćelija (Tabela 2).

Tabela 2. Reagensi za biohemijsku analizu C-reaktivnog proteina (CRP)

R1 reagens; TRIS hidroksimetil aminometanski pufer sadrži serumski albumin goveđeg porijekla i konzervans	
R2 reagens sastoji se od tri komponente;	
<ul style="list-style-type: none">- Čestice lateksa obložene sa anti CRP monoklonalnim antitijelima koja su porijeklom od miša i nalaze se u glicerinskom puferu.- Imunoglobulini porijeklom od miša- Konzervans	
Volumen reagensa	Diluent (H ₂ O)
R1 150 µl	
R2 48 µl	24 µl

Biohemijska analiza C-reaktivnog proteina rađena je na biohemijskom analizatoru Roch/Hitachi cobas c311. Imunoturbidimetrijski test za *in vitro* kvantitativnu determinaciju C-reaktivnog proteina je rađen primjenom Test principa (Price *et al.*, 1987; Eda *et al.*, 1988).

Talasna dužina: 800/570

Referentni interval (serum): 0 – 5 mg/l

Reakcija antigen – antitijelo je posljedica reakcije između CRP u uzorku koji aglutinira sa česticama lateksa koje su obložene monoklonalnim anti CRP antitijelima. Aglutinacija se manifestira kao promjena absorbancije, gdje je stepan promjene proporcijalan koncentraciji CRP u uzorku.

3.3. HLA genotipizacija

U ovom radu za određivanje alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa i gena *HLA-DRB3*; *HLA-DRB4*; *HLA-DRB5*, korištena je metoda reakcije lančane polimeraze (engl. *polimerse chain reaction*, PCR) s prajmerima specifičnim za određenu sekvencu DNK (engl. *Polymerase Chain Reaction with Sequence – Specific Primers*, PCR-SSP). PCR-SSP je metoda visokosenzitivna i specifična. Za izvođenje ove metode korišteni su testovi HLA – *Ready Inno* – Train Njemačka.

PCR-SSP je sistem molekularne biološke detekcije, zasnovan na lančanoj reakciji polimeraze u kojoj je sekvenca prajmera na 3' kraju odgovorna za specifičnu identifikaciju alelne grupe.

PCR uzorci u kojima se prajmer vezuje za specifičnu ciljnu sekvencu imaju specifičnu amplifikaciju nakon PCR-a dok se uzorci bez specifičnog prajmera ne vezuju. Poslije uspješne amplifikacije definisanih DNK sekvenci genomska DNK je prisutna u detektabilnoj koncentraciji.

Metode molekularne tipizacije, uključujući lančanu reakciju polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) uz primjenu specifičnih prajmera za određenu sekvencu (engl. *sequence-specific priming*, SSP), oligonukleotidnih proba specifičnih za sekvencu (engl. *sequence specific oligonucleotide*, SSOP) i tipizacije direktnim sekvencioniranjem (engl. *sequence-based typing*, SBT), koriste se sve više u praksi.

Kod SSP-PCR metode, izolira se DNK 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 DNK 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. Kod SSOP metode, DNK koju treba tipizirati se amplificira i hibridizira s probama specifičnim za alele ili grupe alela. Jedinствене fluorescentne oznake razlikuju one probe koje su komplementarne DNK, tako da je moguća identifikacija jedinstvenih HLA alela. SBT tehnika je bazirana na direktnom DNK sekvencioniranju koje određuje tačan redoslijed nukleotida u ispitivanom genu, a HLA tip se određuje poređenjem s objavljenim sekvencama HLA alela.

3.3.1. Izolacija genomske DNK

Procedura izolacije genomske DNK iz ćelija periferne krvi rađena je primjenom protokola koji je baziran na metodi isoljavanja uz neznatne modifikacije (Miller *et al.*,1988). Metoda po Milleru se zasniva na sukcesivnoj realizaciji četiri osnovne faze: liziranje lipoproteinskog i nukleohistonskog kompleksa primjenom digestivnih pufera, isoljavanje 6M NaCl-om, precipitacija apsolutnim etanolom i resolubilizacija u destilovanoj vodi.

Protokol izolacije DNK;

- Uzorak krvi 3ml koji sadrži antikoagulans EDTA stavljen je u tubicu od 50 ml.
- Dodati 10 ml hladnog (+ 4) Lysis pufera (Tabela 3) u tubicu, okrenuti par puta, ostavljeno na led u trajanju od 20 minuta i nastaje precipitacija leukocita.
- Centrifugirati 10 min. na vrijednosti od 2000 rpm.
- Odliti supernatant nakon centrifugiranja i okrenuti tubicu da se suši.
- Alikvotirati 5 ml pufera PBS-a.
- Snažno promućkati tubicu i centrifugirati na 2000 rpm u trajanju od 10 minuta.
- Odliti supernatant i ostaviti tubicu da se suši.
- Alikvotirati 3ml Kern-Lysis pufera.
- Sadržaj snažno promućkati u trajanju od 1 min.
- Dodati 100 μ l 20% SDS (sodium dodecil sulfat) i 70 μ l pronase.
- Zatvoriti tubicu i ponovo promućkati 15 sekundi.
- Inkubirati tubicu na 37⁰C preko noći.
- Nakon inkubacije dodati 500 μ l 6M NaCl.
- Mućkati snažno 1 min.
- Centrifugirati na 3000 rpm 15 minuta.
- Odliti supernatant u novu tubicu i snažno promućkati.
- Mućkati snažno 15 sek.
- Centrifugirati na 3000 rpm tokom 15 min
- Odliti supernatant u novu tubicu
- Dodati dvostruki volumen apsolutnog etanola i ostaviti 15 minuta.
- Okrenuti tubicu u kojoj se nalazi DNK.
- Centrifugirati na 6000 rpm 4 min.

- Odliti supernatant i DNK isprati sa 70% etanolom (300µl).
- Centrifugirati na 6000 rpm u trajanju od 4min.
- Odliti etanol i uzorak ostaviti na sušenje.
- DNK se rastvori u ddH₂O ili puferu.

Uzorci DNK nakon završene analize se označavaju i pohranjuju na – 20⁰C.

Tabela 3. Puferi korišteni za izolaciju genomske DNK iz ćelija periferne krvi

Puferi	Komponente pufera	pH
Lysis pufer	155mM NH ₄ Cl, 10mM KHCO ₃ 0,1mM Na ₂ EDTA	7,4
PBS pufer	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 2mM KH ₂ PO ₄	7,4
Kern-Lysis pufer	400mM NaCl 10mM Tris- HCl 2mM EDTA	8,2

Za izolaciju DNK korišteni su puferi Lysis, PBS, Kern-Lysis (Tabela 3).

3.3.2. Horizontalna agarozna gel – elektroforeza genomske DNK

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu izolovane genomske DNK iz ćelija periferne krvi u ovom istraživanju primjenjena je metoda gel – elektroforeza.

Priprema agaroznog gela se vrši na sljedeći način:

1% agarozni gel se priprema tako što se 1 g agaroze rastvara u 100 ml 1x SB pufera i zagrijava do tačke topljenja. Agarozni gel ohladiti na 55 °C i dodati 10µl etidijum bromida (EtBr), koji se ugrađuje u lance DNK i omogućava njihovu vizualizaciju pod UV svjetlom. Gel izliti u kadicu u koju su postavljeni češljevi. Kada se agarozna ohladi i polimerizuje češljevi se izvade i formiraju se mjesta za uzorke.

Formirani gel se prebaci u sistem za elektroforezu koji je napunjen 1x SB puferom. Prije nanošenja na gel 5 µl uzorka DNK pomješati sa 1 µl boje po uzorku (LDSB – *Load Dye Buffer* – 300 µl 20x SB pufer, 690 µl 87% glicerol, 10 µl ddH₂O, 0,03% brom fenol plava). Za određivanje veličine fragmenata korišten je uzorak poznate koncentracije od 380 ng/µl i 10 µl DNK markera. Elektroforeza se odvijala u trajanju od 20 minuta i jačini od 70 V.

Tabela 4. Puferi korišteni za gel – elektroforezu

Pufer	Komponente pufera
SB pufer	NaOH Borna kiselina
LDSB	300µl 20x SB puffer 690µl 87% glicerol 10µl ddH ₂ O, 0,03% brom – fenol plava

Za vizualizaciju fragmenata i kvantitativno-kvalitativnu analizu izolovane DNK korišteni su SB pufer i LDSB (Tabela 4).

3.3.3. Molekularna metoda PCR-SSP

Molekularne analize su provedene na grupi od 83 pacijenta sa dijagnozom RA i 82 ispitanika kontrolne grupe u laboratoriju genetike odsjeka za biologiju (Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Sarajevu, Bosna i Hercegovina). Kontrolna grupa je uključivala zdrave ispitanike koji nemaju dijagnozu RA.

Genomska DNK, prethodno izolovana iz pune krvi prikupljene u EDTA korištenjem postupka isoljavanja (Miller *et al.*, 1988), je bila podvrgnuta PCR amplifikaciji. Za amplifikaciju HLA-DRB1 genskog lokusa, HLA-gotovi genski testni sistem klase II je korišten u skladu sa uputama proizvođača. Svaki uzorak je genotipiziran setom od 24 PCR. Ovaj sistem omogućava nisko-rezolucijsku tipizaciju HLA-DRB1, DRB3, DRB4 i DRB5 genskih lokusa. Unaprijed alikvotirani i osušeni kokteli prajmera sačinjeni od sekvencijski specifičnih i unutrašnjih kontrolnih prajmera su amplificirani.

Kod PCR-SSP samo sekvenca prajmera na 3' kraju je odgovorna za specifikaciju alela koji će biti identificiran. Za potpunu PCR-SSP analizu, izvedeno je nekoliko amplifikacija paralelno. PCR uzorci u kojim se prajmer veže za svoju specifičnu metu imaju specifične amplifikacijom praćene PCR, dok uzorci bez ovih prajmer-specifičnih vezanja nemaju. Nakon uspješne amplifikacije, genomska DNK ciljna sekvenca je prisutna u detektovanoj koncentraciji.

Prajmeri su također bili prisutni za amplifikaciju uzoraka unutrašnje kontrole. Pozitivni kontrolni amplifikat (HGH) u svakoj reaktivnoj tubi je bio prisutan u dvije različite veličine (430 bp i 800 bp) sa iznimkom prve tube koja sadrži negativnu kontrolu (NC). Ako specifični produkt nije prisutan prije PCR, amplifikat ove pozitivne kontrole mora biti jasno detektovan.

Amplifikacija *HLA-DRB1* genskog lokusa i priprema PCR radne smjese i temperaturnih uslova genske amplifikacije rađena je prema uputstvu proizvođača. Kit sadrži komercijalni Ready PCR sa svim aditivima (dNTPs, PCR buffer, crezol red, glicerol) koji je neophodan za odvijanje reakcije. Procedura podrazumjeva 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. Test se sastoji od 24 reakcije (23 + 1 reakcija za negativnu kontrolu). Preporučena količina DNK za ove testove je 50 ng/μl.

Tabela 5. Za pripremu mastermiksa PCR radne smjese za amplifikaciju *HLA-DRB1* genskog lokusa korišten je naredni obrazac

Sterilna dejonizirana voda	168 μl
Amplifikacijski pufer Ready PCR	84 μl
Taq Polimeraza (5U/μl)	2,2 μl

Za amplifikaciju *HLA-DRB1* genskog lokusa korišten je aparat Eppendorf Mastercycler gradijent (Hamburg, Germany). PCR smjesa za gensku amplifikaciju: 236μl mastermiksa i 26μl genomske DNK. U bazenčić za negativnu kontrolu se stavi 10μl mastermiksa koja ne sadrži DNK. U svaki bazenčić se stavi 10μl pripremljene smjese za gensku PCR amplifikaciju (Tabela 5).

Inicijalna denaturacija se odvija 2 minuta na 96 °C nakon čega slijedi 10 ciklusa od kojih svaki traje 15 sec. na 96 °C i 60 sec. na 65 °C, zatim 20 ciklusa u trajanju po 15 sec. na 96 °C, 50 sec, na 61 °C i 30 sec. na 72 °C, a zatim čuvanje na 4 °C (Tabela 6).

Tabela 6. DNK amplifikacija – PCR program

PCR Program		
1.	96 °C 2min	1 ciklus
2.	96 °C 15 sec 65 °C 60 sec	10 ciklusa
3.	96 °C 15 sec 61 °C 50 sec 72 °C 30 sec	20 ciklusa
4.	4 °C	Mirovanje

Mastermiks je sadržavao destiliranu vodu, gotov PCR (dNTPs, PCR pufer, crveni krezol i glicerol) i *Taq*-polimerazu dodavanjem DNK uzoraka (koncentracije oko 50 ng/μl). Program je bio potvrđen (testiran) sa termosajklerom Eppendorf Mastercycle gradijenta (Hamburg, Njemačka). PCR reakcije su izvedene u 10 μl volumenima. Uzorci su prvo denaturirani na 96 °C 2 minute, a slijedilo je 10 ciklusa na 96 °C 15 sekundi, 65 °C 60 sekundi zatim 20 ciklusa na 96 °C 15 sekundi, 61 °C 50 sekundi i 72 °C 30 sekundi. Procjena rezultata je izvedena 2% agaroznom gel elektroforezom u TBP pufer na 70 volti za 15 – 20 minuta. Pod UV svjetlom, lanci su vizualizirani interkalacijskim etidium bromidom (0.7 μg/μl) i fotografirani za dokumentaciju. Interpretacija rezultata je izvedena korištenjem proizvođačeve liste podataka.

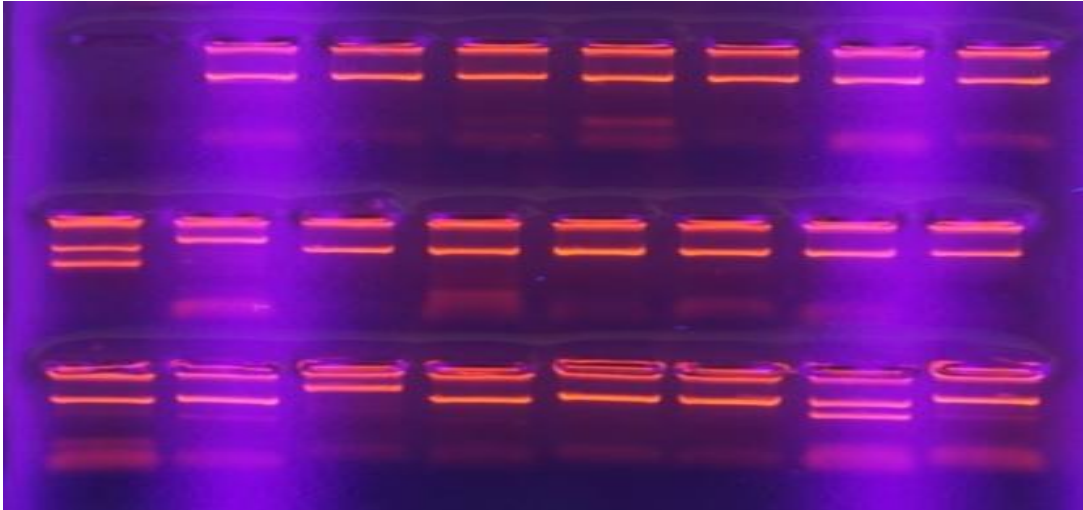
3.3.4. Elektroforeza PCR produkata

Nakon PCR reakcije evaluacija rezultata se vrši gel elektroforezom. Kvalitativna i kvantitativna analiza amplificiranih genskih produkata rađena je na 2% agaroznom gelu. U gel je dodat etidium bromid da bi se dobila koncentracija EtBr 0,7 µg/ml. Gel je potopljen u 1x TBE puferu (Tabela 7).

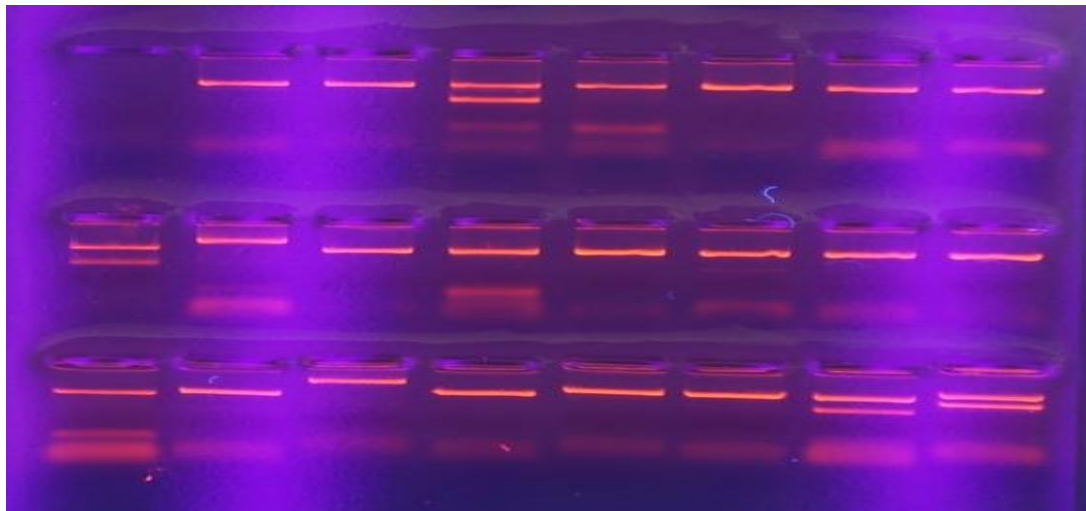
Tabela 7. Komponente TBE pufera (volumen 100 ml)

TRIS (hidroksimetil – aminometan)	12,1 g
Borna kiselina	6,17 g
EDTA (Dinatrijeva sol etilendiaminotetraoctenekiseline)	0,744 g

Elektroforeza je rađena 20 minuta na 70 volti. U električnom polju se amplikoni odvajaju prema njihovoj veličini i posmatraju pod UV svjetlom. Evaluacija rezultata iz HLA baterija rađena je primjenom protokola proizvođača kita (Slika 6 i Slika 7).



Slika 6. Genotipizacija *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) primjenom PCR-SSP metode. Pacijent je homozigotan za alelnu grupu *HLA-DRB1*04* ovog genskog lokusa. Prisutna je i alelna grupa *HLA-DRB4* gena.



Slika 7. HLA tipizacija *DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) primjenom PCR-SSP metode. Pacijent ima genotip *HLA-DRB1*04/DRB1*15*. Prisutne su i varijante gena *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5*.

3.4. Biostatističke metode

Biostatistička analiza ostvarenih rezultata je rađena korištenjem odgovarajućih populaciono-genetičkih i statističkih metoda i upotrebom odabranih statističkih programskih 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 korišten je statistički programski paket *PowerMarker*, verzija 3.25. Za sve određene biohemijsko-hematološke parametre korištene su deskriptivne metode: mjere centralne tendencije - srednje vrijednosti i standardna devijacija (SD). Za utvrđivanje statistički signifikantne razlike srednjih vrijednosti između upoređivanih grupa primjenjen je T-test uz primjenu odgovarajućih programskih paketa. Vrijednosti razlika $p < 0.05$ uzete su kao statistički značajne.

Frekvencija genskih varijanti (f_a) analiziranih genskih lokusa je izračunata tako što se ukupan broj utvrđenih genskih varijanti u uzorku podijelio sa dvostrukim brojem ($2N$) ispitanika, a frekvencija genotipova (f_g) analiziranih lokusa u uzorku tako što se ukupan broj opaženih genotipova podijelio sa brojem (N) ispitanika. Procjena odstupanja od *Hardy-Weinbergovog* ekvilibrijuma za *HLA-DRB1* genski lokus je rađena pomoću testa egzaktnosti za izračunavanje P vrijednosti. Ukoliko je vrijednost $P > 0,05$ onda se može reći da je analizirani genski lokus u ekvilibrijumu, a ako je vrijednost $P < 0,05$ odstupanje od ekvilibrijuma je statistički značajno.

Parametri za procjenu polimorfizma unutar analiziranih genskih lokusa su heterozigotnost, genski diverzitet i informacija o udjelu polimorfizma (PIC). Heterozigotnost je proporcija heterozigotnih jedinki analiziranog genskog lokusa u populaciji, dok se genski diverzitet analiziranog genskog lokusa, koji se često naziva i očekivana heterozigotnost, definiše kao vjerovatnoća razlike dva nasumično odabrana alela u populaciji. Informacija o udjelu polimorfizma (*Polymorphism Information Content*, PIC) predstavlja mjeru za procjenu polimorfizma unutar analiziranog genskog lokusa.

Kompjuterski program *OpenEpi* v2.3.1 je korišten za procjenu statističke značajnosti razlika u frekvenciji alelnih varijanti, za izračunavanje omjera izgleda (OR) i 95% intervala pouzdanosti (95% CI) za OR vrijednost. Statistička značajnost razlika u frekvenciji genskih varijanti između skupine RA pacijenata i kontrolne skupine se procjenjuje korištenjem „*two-tail*“ Fisher egzaktnog testa.

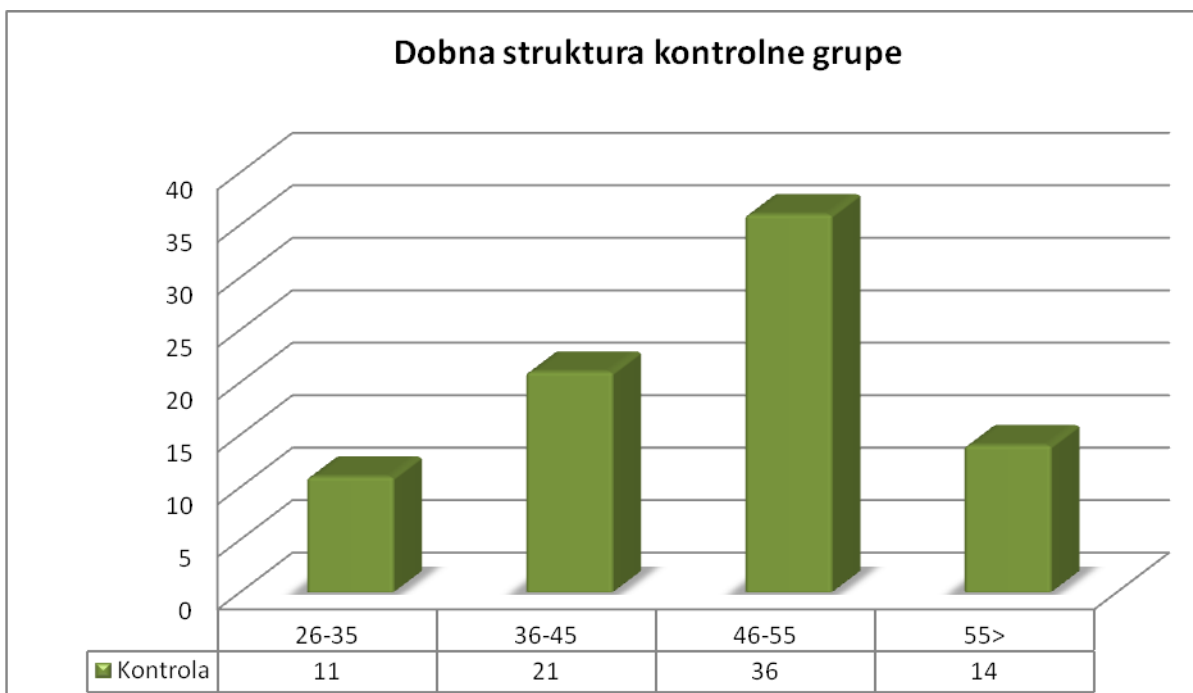
Jačina asocijacije između prisustva određene genske varijante i javljanja bolesti procjenjuje se računanjem OR (engl. *odds ratio*, omjer izgleda) vrijednosti. Označava se i kao relativna vjerovatnoća ili približni relativni rizik. Predstavlja odnos frekvencija javljanja faktora rizika u skupini oboljelih i kontrolnoj grupi. Za procjenu preciznosti dobijenih vrijednosti se izračunava 95% interval pouzdanosti (95% CI) za OR vrijednost.

Prilikom statističke obrade rezultata izvršeno je grupiranje i sređivanje, prikazivanje i interpretiranje dobijenih rezultata prema starosnoj dobi oboljelih. Svi prikupljeni i analizirani rezultati su prikazani tabelarno i grafički.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

U okviru ove studije izvršena je analiza rezultata biohemijско-hematoloških parametara zdravih ispitanika kontrolne grupe i pacijenata sa dijagnozom reumatoidnog artritisa (RA).

U provedenom istraživanju je uključeno 82 ispitanika zdrave kontrolne grupe za koje su analizirani biohemijско-hematološki parametri: kompletna krvna slika (CBC), diferencijalna krvna slika (DBC), brzina sedimentacije eritrocita (ESR) i koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP). Najveći broj, 36 ispitanika, pripadao je dobnoj skupini od 46 do 55 godina. U kontrolnoj grupi ispitanika od 36 do 45 godina bilo je 21. U skupini ispitanika koji su imali 55 i više godina bilo je 14. Nesrodnih zdravih Ispitanika od 26 do 35 godina bilo je 11. Srednja dob kontrolne grupe ispitanika je bila 46.50 ± 8.52 godina (između 30 i 59 godina starosti) (Grafikon 1).



Grafikon 1. Prikaz dobne strukture kontrolne grupe

4.1. Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti kod ispitanika kontrolne grupe

Rezultati biohemijsko-hematoloških analiza, uključujući srednju vrijednost i standardnu devijaciju, prikazani su u Tabeli 8. i upoređeni su sa referentnim vrijednostima. Sve vrijednosti hematološko-biohemijških parametara kontrolne grupe su bile unutar normalnog raspona. Omjer vrijednosti hematoloških parametara neutrofila i limfocita (NLR) i omjer između trombocit i limfocita (PLR) su također u okviru normalnih vrijednosti.

Tabela 8. Pregled biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe

Parametri	Normalne vrijednosti za žene	Kontrola (mean ± SD)
Starost (godine)		46.50±8.52
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	3.4 - 9.7	7.00±1.38
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	3.86 - 5.08	4.73±0.32
HGB (g/dL)	11.9 - 15.7	13.52±0.96
HCT (%)	35.6 - 47.0	42.37±2.75
MCV (fL)	83.0 - 97.2	89.64±3.68
MCH (pg)	27.4 - 33.9	28.65±1.48
MCHC (g/dL)	32.0 - 34.5	32.00±0.61
RDW (%)	9.0 - 15.0	13.51±0.85
RDW-SD (fL)	36.5 - 45.9	41.90±2.46
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	158 - 424	248.09±47.92
MPV (fL)	6.8 - 10.4	8.93±0.86
NE# ($10^3/\mu\text{L}$)	1.1 - 7.0	3.96±1.09
LY# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.7 - 4.5	2.28±0.58
MO# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 - 1.2	0.53±0.14
EO# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 - 0.7	0.18±0.12
BA# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 - 0.2	0.05±0.05
ESR (mm/h)	0.0 - 10.0	5.02±1.92
CRP (mg/l)	0.0 - 5.0	1.98±1.03
NLR		1.85±0.68
PLR		115.47±34.48

NAPOMENA: mean ± SD – aritmetička sredina i standardna devijacija; NLR - omjer između neutrofila i limfocita; PLR - omjer između trombocita i limfocita

Vrijednosti leukocita (DBC) među ispitanicima su bile u okviru referentnih vrijednosti sa rasponom za WBC 4.8 - 9.8; NE# 2.3 - 6.4; LY# 1.2 - 3.5; MO# 0.1 - 0.9; EO# 0.0 - 0.5; i BA# 0.0 - 0.1 (Tabela 7.4. u Prilogu).

Vrijednosti eritrocitne konstante su bile u referentnim vrijednostima među ispitanicima sa rasponom za RBC 4.0 - 5.4; HGB 11.6 - 15.8; HCT 36.7 - 48.7; MCV 80.9 - 97.4; MCH 27.3 - 32.5; MCHC 30.0 - 33.8; i RDW 12.1 - 14.9. Vrijednosti ESR su raspona od 2 - 9 mm/h (Tabela 7.4 u Prilogu).

Korištenjem koeficijenta korelacije, nije utvrđena statistički značajna korelacija između analiziranih biohemijsko-hematoloških parametara i ESR u kontrolnoj grupi (Tabela 9).

Tabela 9. Uporedna analiza biohemijsko-hematoloških parametara sa brzinom sedimentacije eritrocita (ESR) kod kontrolne grupe korištenjem koeficijenta korelacije (*r*)

Parametri	ESR (mm/h)		
	95% CI za <i>r</i>	<i>r</i>	P-vrijednost
Starost (godine)	-0.1206 to 0.3094	0.09900	P=0.3762
WBC (10 ³ /μL)	-0.2797 to 0.1524	-0.06678	P=0.5511
RBC (10 ⁶ /μL)	-0.3593 to 0.06484	-0.1543	P=0.1662
HGB (g/dL)	-0.3789 to 0.04227	-0.1764	P=0.1130
HCT (%)	-0.4061 to 0.01011	-0.2074	P=0.0616
MCV (fL)	-0.2922 to 0.1391	-0.08030	P=0.4733
MCH (pg)	-0.2573 to 0.1759	-0.04273	P=0.7031
MCHC (g/dL)	-0.1154 to 0.3141	0.1042	P=0.3513
RDW (%)	-0.1434 to 0.2882	0.07593	P=0.4978
RDW-SD (fL)	-0.1972 to 0.2366	0.02068	P=0.8537
PLT (10 ³ /μL)	-0.08925 to 0.3377	0.1303	P=0.2434
MPV (fL)	-0.2352 to 0.1987	-0.01916	P=0.8643
NE (10 ³ /μL)	-0.3519 to 0.07325	-0.1461	P=0.1903
LY (10 ³ /μL)	-0.1169 to 0.3128	0.1028	P=0.3582
MO (10 ³ /μL)	-0.2152 to 0.2188	0.001905	P=0.9864
EO (10 ³ /μL)	-0.2150 to 0.2190	0.002128	P=0.9849
BA (10 ³ /μL)	-0.1307 to 0.3001	0.08887	P=0.4272
CRP (mg/l)	-0.1746 to 0.2586	0.04405	P=0.6944

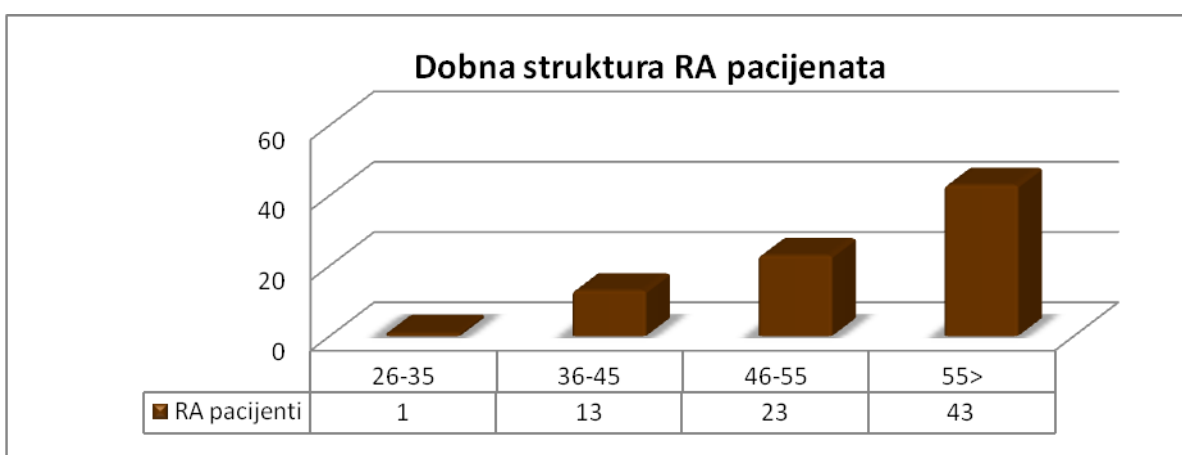
Korištenjem koeficijenta korelacije, nije nađena statistički značajna korelacija između analiziranih hematoloških parametara i CRP u kontrolnoj grupi (Tabela 10).

Tabela 10. Uporedna analiza hematoloških parametara sa koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) kod kontrolne grupe primjenom koeficijenta korelacije (*r*)

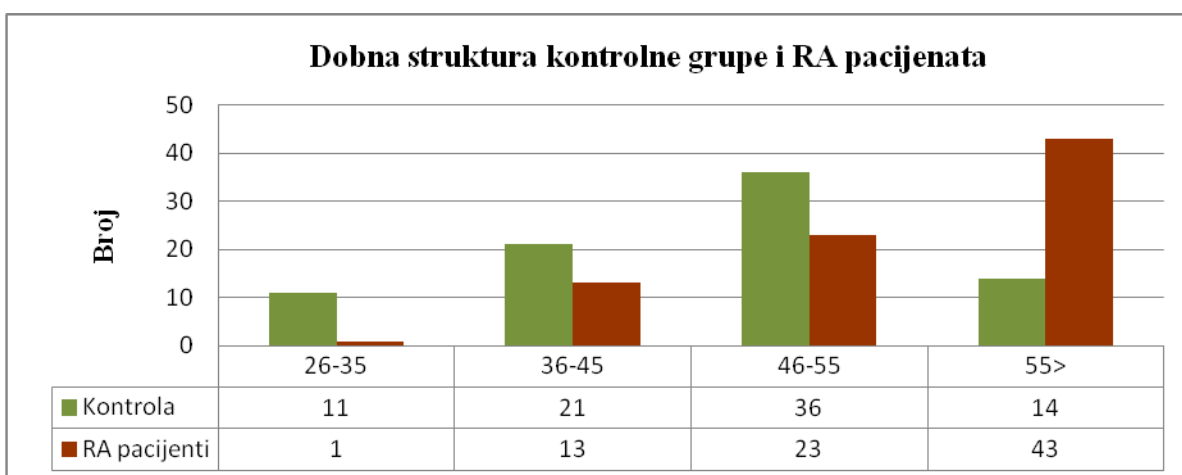
Parametri	CRP (mg/l)		
	95% CI za <i>r</i>	<i>r</i>	P-vrijednost
Starost (godine)	-0.2090 - 0.2250	0.008442	P=0.9400
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.08120 - 0.3449	0.1382	P=0.2155
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	-0.3013 - 0.1294	-0.09016	P=0.4205
HGB (g/dL)	-0.3002 - 0.1306	-0.08894	P=0.4269
HCT (%)	-0.2890 - 0.1426	-0.07680	P=0.4929
MCV (fL)	-0.1697 - 0.2633	0.04915	P=0.6610
MCH (pg)	-0.2293 - 0.2047	-0.01292	P=0.9083
MCHC (g/dL)	-0.3506 - 0.07480	-0.1446	P=0.1951
RDW (%)	-0.3337 - 0.09379	-0.1258	P=0.2602
RDW-SD (fL)	-0.3230 - 0.1056	-0.1140	P=0.3079
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1838 - 0.2497	0.03456	P=0.7579
MPV (fL)	-0.1461 - 0.2857	0.07323	P=0.5132
NE ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1468 - 0.2851	0.07254	P=0.5172
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1436 - 0.2881	0.07582	P=0.4984
MO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.04253 - 0.3786	0.1761	P=0.1135
EO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.05022 - 0.3720	0.1686	P=0.1299
BA ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.07428- 0.3510	0.1451	P=0.1935
ESR (mm/h)	-0.1746 to 0.2586	0.04405	P=0.6944

4.2. Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA)

U provedenom istraživanju su analizirani biohemijsko-hematološki parametri 80 uzoraka krvi pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA). U skupini oboljelih od reumatoidnog artritisa najviše je bilo pacijenata dobne skupine od 55 i više godina, ukupno 43. Pacijenata sa dijagnozom reumatoidni artritisa dobne grupe od 46 do 55 godina bilo je 23. Trinaest oboljelih pacijenata je bilo između 36 i 45 godina i jedan pacijent je pripadao dobnoj skupini od 26 do 35 godina (Grafikon 2). Uporedni prikaz dobne strukture RA pacijenata i kontrolne grupe dat je u Grafikonu 3.



Grafikon 2. Prikaz dobne strukture pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)



Grafikon 3. Uporedni prikaz dobne strukture kontrolne grupe i pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

Analiza biohemijsko-hematoloških parametara kod pacijenata oboljelih od RA potvrđuje da su vrijednosti bile unutar normalnog raspona osim za MCHC koje su bile

nešto niže (31.94 ± 0.70 g/dL) u odnosu na normalne vrijednosti (32.0 - 34.5 g/dL). Vrijednosti za ESR su bile povišene kod pacijenata sa RA (23.94 ± 16.54) u poređenju sa referentnim vrijednostima za žene (0 - 10 mm/h) (Tabela 11).

CRP kod pacijenata sa RA (9.01 ± 13.44) je bio znatno viši u odnosu na normalne CRP vrijednosti (0 – 5 mg/l) (Tabela 11).

Tabela 11. Pregled biohemijско-hematoloških parametara kod oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

Parametri	Normalne vrijednosti za žene	RA pacijenti (mean ± SD)
Starost (godine)		52.51±7.26
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	3.4 - 9.7	7.83±2.47
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	3.86 - 5.08	4.59±0.33
HGB (g/dL)	11.9 - 15.7	13.16±1.21
HCT (%)	35.6 - 47.0	41.14±3.41
MCV (fL)	83.0 - 97.2	89.91±6.07
MCH (pg)	27.4 - 33.9	28.75±2.25
MCHC (g/dL)	32.0 - 34.5	31.94±0.70
RDW (%)	9.0 - 15.0	14.63±1.64
RDW-SD (fL)	36.5 - 45.9	44.98±3.53
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	158 - 424	255.38±72.33
MPV (fL)	6.8 - 10.4	8.95±1.02
NE# ($10^3/\mu\text{L}$)	1.1 - 7.0	4.54±1.96
LY# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.7 - 4.5	2.30±0.74
MO# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 - 1.2	0.65±0.24
EO# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 - 0.7	0.26±0.20
BA# ($10^3/\mu\text{L}$)	0.0 - 0.2	0.08±0.06
ESR (mm/h)	0.0 - 10.0	23.94±16.54
CRP (mg/l)	0.0 - 5.0	9.01±13.44
NLR		2.12±1.17
PLR		120.75±48.23

NAPOMENA: srednja ± SD – aritmetička sredina i standardna devijacija; NLR - omjer između neutrofila i limfocita; PLR - omjer između trombocita i limfocita

Korištenjem koeficijenta korelacije je nađena statistički značajna negativna korelacija između ESR i HGB (95% CI = -0.4282-0.01100; $r = -0.2302$; $p = 0.0400$) ali pozitivna asocijacija između ESR i RDW (95% CI = 0.1460-0.5326; $r = 0.3543$; $P = 0.0013$); RDW-SD (95% CI = 0.2378-0.5975; $r = 0.4348$; $p = 0.0001$), PLT (95% CI = 0.1033-0.5008; $r = 0.3158$; $P = 0.0043$) ili NE (95% CI = 0.09439-0.4940; $r = 0.3077$; $P = 0.0055$) (Tabela 12).

Tabela 12. Komparativna analiza rezultata biohemijsko-hematoloških parametara i ESR kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) korištenjem koeficijenta korelacije (r)

Parametri	ESR (mm/h)		
	95% CI za r	r	P-vrijednost
Starost (godine)	-0.2425 to 0.1967	-0.02408	P=0.8321
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.03564 - 0.3894	0.1855	P=0.0994
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	-0.3719 - 0.05598	-0.1658	P=0.1417
HGB (g/dL)	-0.4282 - -0.01100	-0.2302	P=0.0400
HCT (%)	-0.4070 - 0.01473	-0.2057	P=0.0672
MCV (fL)	-0.3056 - 0.1303	-0.09202	P=0.4169
MCH (pg)	-0.3375 - 0.09520	-0.1272	P=0.2609
MCHC (g/dL)	-0.3815 - 0.04491	-0.1766	P=0.1172
RDW (%)	0.1460 - 0.5326	0.3543	P=0.0013
RDW-SD (fL)	0.2378 - 0.5975	0.4348	P=0.0001
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	0.1033 - 0.5008	0.3158	P=0.0043
MPV (fL)	-0.3599 - 0.06987	-0.1522	P=0.1778
NE ($10^3/\mu\text{L}$)	0.09439 - 0.4940	0.3077	P=0.0055
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.3663 - 0.06248	-0.1594	P=0.1578
MO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.2381 - 0.2011	-0.01944	P=0.8641
EO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1874 - 0.2516	0.03372	P=0.7665
BA ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.3135 - 0.1216	-0.1008	P=0.3738
CRP (mg/l)	0.2818 to 0.6269	0.4722	P<0.0001

NAPOMENA: Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Utvrđeno je da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između CRP vrijednosti na jednoj strani i vrijednosti WBC (95% CI = 0.07535-0.4794; $r = 0.2903$; $P = 0.0090$), RDW-SD (95% CI = 0.01708-0.4332; $r = 0.2359$; $P = 0.0351$), PLT (95% CI = 0.1048-0.5020; $r = 0.3172$; $P = 0.0041$), NE (95% CI = 0.2194-0.5848; $r = 0.4189$; $P = 0.0001$) ili ESR (95% CI = 0.2818-0.6269; $r = 0.4722$; $p < 0.0001$) na drugoj strani kod pacijenata sa RA (Tabela 13).

Tabela 13. Komparativna analiza rezultata hematoloških parametara sa koncentracijom CRP kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) primjenom koeficijenta korelacije (r)

Parametri	CRP (mg/l)		
	95% CI za r	r	P-vrijednost
Starost (godine)	-0.1722 - 0.2663	0.04943	P=0.6632
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	0.07535 - 0.4794	0.2903	P=0.0090
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	-0.1604 - 0.2775	0.06150	P=0.5879
HGB (g/dL)	-0.2127 - 0.2267	0.007323	P=0.9486
HCT (%)	-0.2140 - 0.2255	0.006055	P=0.9575
MCV (fL)	-0.2851 - 0.1524	-0.06970	P=0.5390
MCH (pg)	-0.2762 - 0.1617	-0.06012	P=0.5963
MCHC (g/dL)	-0.1947 - 0.2444	0.02610	P=0.8183
RDW (%)	-0.05354 - 0.3741	0.1682	P=0.1359
RDW-SD (fL)	0.01708 - 0.4332	0.2359	P=0.0351
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	0.1048 - 0.5020	0.3172	P=0.0041
MPV (fL)	-0.3223 - 0.1120	-0.1104	P=0.3294
NE ($10^3/\mu\text{L}$)	0.2194 - 0.5848	0.4189	P=0.0001
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.3871 - 0.03831	-0.1830	P=0.1043
MO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1143 - 0.32	0.1082	P=0.3395
EO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1568 - 0.2809	0.06521	P=0.5655
BA ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1632 - 0.2748	0.05857	P=0.6058
ESR (mm/h)	0.2818 - 0.6269	0.4722	P<0.0001

NAPOMENA: Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

4.3. Uporedna analiza biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA)

Analizom vrijednosti biohemijsko-hematoloških parametara između ispitanika kontrolne grupe i pacijenata sa RA je utvrđeno da su ove vrijednosti bile povišene kod pacijenata sa RA osim vrijednosti za RBC, HGB, HCT i MCHC (Tabela 14). Vrijednosti za ESR i koncentraciju C-reaktivnog proteina kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom su bile povišene i u odnosu na referentne vrijednosti dok je vrijednost za MCHC bila nešto niža od referentnih (Tabela 14).

Tabela 14. Pregled biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe i pacijenata sa RA

Parametri	Normalne vrijednosti za žene	Kontrola (mean ± SD)	RA pacijenti (mean ± SD)
Starost (godine)		46.50±8.52	52.51±7.26
WBC (10 ³ /μL)	3.4 - 9.7	7.00±1.38	7.83±2.47
RBC (10 ⁶ /μL)	3.86 - 5.08	4.73±0.32	4.59±0.33
HGB (g/dL)	11.9 - 15.7	13.52±0.96	13.16±1.21
HCT (%)	35.6 - 47.0	42.37±2.75	41.14±3.41
MCV (fL)	83.0 - 97.2	89.64±3.68	89.91±6.07
MCH (pg)	27.4 - 33.9	28.65±1.48	28.75±2.25
MCHC (g/dL)	32.0 - 34.5	32.00±0.61	31.94±0.70
RDW (%)	9.0 - 15.0	13.51±0.85	14.63±1.64
RDW-SD (fL)	36.5 - 45.9	41.90±2.46	44.98±3.53
PLT (10 ³ /μL)	158 - 424	248.09±47.92	255.38±72.33
MPV (fL)	6.8 - 10.4	8.93±0.86	8.95±1.02
NE# (10 ³ /μL)	1.1 - 7.0	3.96±1.09	4.54±1.96
LY# (10 ³ /μL)	0.7 - 4.5	2.28±0.58	2.30±0.74
MO# (10 ³ /μL)	0.0 - 1.2	0.53±0.14	0.65±0.24
EO# (10 ³ /μL)	0.0 - 0.7	0.18±0.12	0.26±0.20
BA# (10 ³ /μL)	0.0 - 0.2	0.05±0.05	0.08±0.06
ESR (mm/h)	0.0 - 10.0	5.02±1.92	23.94±16.54
CRP (mg/l)	0.0 - 5.0	1.98±1.03	9.01±13.44
NLR		1.85±0.68	2.12±1.17
PLR		115.47±34.48	120.75±48.23

NAPOMENA: srednja ± SD – aritmetička sredina i standardna devijacija; NLR - omjer između neutrofila i limfocita; PLR - omjer između trombocita i limfocita

Analizom rezultata kompletne krvne slike (CBC) i diferencijalne krvne slike (DBC) je utvrđeno da se vrijednosti kreću za PLT 182 - 408, LY 23.0 - 45.1. PLT 131 - 471, LY 13.7 -53.3 za pacijente RA (u prilogu tabele 7.4 i 7.5).

Rezultati istraživanja potvrđuju da je omjer između neutrofila i limfocita (NLR) 1,736 odnosno 1.85 ± 0.68 za kontrolnu grupu i 1.977 odnosno 2.12 ± 1.17 za pacijente sa RA dok je omjer između trombocita i limfocita (PLR) 108.786 odnosno 115.47 ± 34.48 za kontrolnu grupu i 111.274 odnosno 120.75 ± 48.23 za RA pacijente. Ove vrijednosti su bile povišene kod pacijenata sa RA u odnosu na kontrolnu grupu ali razlike nisu bile statistički značajne, (Tabela 15).

Tabela 15. Broj neutrofila, limfocita i trombocita

Parametri	Kontrola (mean \pm SD)	Ukupno	RA pacijenti (mean \pm SD)	Ukupno
NE ($10^3/\mu\text{L}$)	3.96 \pm 1.09	324.70	4.54 \pm 1.96	363.00
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	2.28 \pm 0.58	187.00	2.30 \pm 0.74	183.60
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	248.09 \pm 47.92	20343.00	255.38 \pm 72.33	20430.00
NLR	1.85 \pm 0.68	1.736	2.12 \pm 1.17	1.977
PLR	115.47 \pm 34.48	108.786	120.75 \pm 48.23	111.274

NAPOMENA: NLR - omjer između neutrofila i limfocita; PLR - omjer između trombocita i limfocita

Za određivanje statističke značajnosti razlika hematološko-biohemijskih parametara između pacijenata sa RA i zdrave kontrolne grupe korišten je t-test. Vrijednosti ESR (95% CI = 15.295-22.545, $t = 10.307$; $P < 0.0001$) i CRP (95% CI = 4.09-9.97; $t = 4.723$; $P < 0.0001$) su bile statistički značajno povećane kod RA pacijenata u poređenju sa onim u kontrolnoj grupi. Vrijednosti MCV, MCH, PLT, MPV i LY su bile neznatno povećane kod RA pacijenata. Omjer neutrofila i leukocita (NLR) i omjer trombocita i limfocita (PLR) je bio povišen kod pacijenata sa RA u odnosu na zdravu kontrolnu grupu ali ove razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 16).

Vrijednost RBC (95% CI = -0.241 - -0.0391; t = -2.741; P = 0.0068), HGB (95% CI = - 0.698 – 0.0215; t = -2.100;P = 0.0373) i HCT (95% CI = -2.19-0.27; t = -2.530; P = 0.0124) je bila značajno snižena kod pacijenata sa RA u odnosu na kontrolnu dok su vrijednosti MCHC bile snižene ali ne statistički značajno.

Tabela 16. Uporedna analiza biohemijско-hematoloških parametara kontrolne grupe i oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) primjenom t-testa

Parametri	Kontrola (mean ± SD)	RA pacijenti (mean ± SD)	95% CI	t-test	P-vrijednost
Starost (godine)	46.50±8.52	52.51±7.26	3.551 - 8.469	4.827	P<0.0001
WBC (10 ³ /μL)	7.00±1.38	7.83±2.47	0.211 - 1.449	2.649	P=0.0089
RBC (10 ⁶ /μL)	4.73±0.32	4.59±0.33	-0.241 - -0.0391	-2.741	P=0.0068
HGB (g/dL)	13.52±0.96	13.16±1.21	-0.698 - -0.0215	-2.100	P=0.0373
HCT (%)	42.37±2.75	41.14±3.41	-2.19 - -0.27	-2.530	P=0.0124
MCV (fL)	89.64±3.68	89.91±6.07	-1.283 - 1.823	0.343	P=0.7318
MCH (pg)	28.65±1.48	28.75±2.25	-0.49 - 0.69	0.335	P=0.7381
MCHC (g/dL)	32.00±0.61	31.94±0.70	-0.264 - 0.144	-0.582	P=0.5614
RDW (%)	13.51±0.85	14.63±1.64	0.716 - 1.524	5.476	P<0.0001
RDW-SD (fL)	41.90±2.46	44.98±3.53	2.138 - 4.022	6.456	P<0.0001
PLT (10 ³ /μL)	248.09±47.92	255.38±72.33	-11.704 - 26.284	0.758	P=0.4496
MPV (fL)	8.93±0.86	8.95±1.02	-0.272 - 0.312	0.135	P=0.8927
NE (10 ³ /μL)	3.96±1.09	4.54±1.96	0.0895 - 1.071	2.335	P=0.0208
LY (10 ³ /μL)	2.28±0.58	2.30±0.74	-0.186 - 0.226	0.192	P=0.8482
MO (10 ³ /μL)	0.53±0.14	0.65±0.24	0.0592 - 0.181	3.899	P=0.0001
EO (10 ³ /μL)	0.18±0.12	0.26±0.20	0.029 - 0.131	3.096	P=0.0023
BA (10 ³ /μL)	0.05±0.05	0.08±0.06	0.0129 - 0.0471	3.461	P=0.0007
ESR (mm/h)	5.02±1.92	23.94±16.54	15.295 - 22.545	10.307	P<0.0001
CRP (mg/l)	1.98±1.03	9.01±13.44	4.09 - 9.97	4.723	P<0.0001
NLR	1.85±0.68	2.12±1.17	-0.0261 - 0.566	1.801	P=0.0736
PLR	115.47±34.48	120.75±48.23	-7.704 - 18.264	0.803	P=0.4231

NAPOMENA: mean ± SD – aritmetička sredina i standardna devijacija
Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Utvrđeno je da su vrijednosti WBC (95% CI = 0.211-1.449; $t = 2.649$; $P = 0.0089$), RDW (95% CI = 0.716-1.524; $t = 5.476$; $P < 0.0001$), RDW-SD (95% CI = 2.138-4.022; $t = 6.456$; $P < 0.0001$), NE (95% CI = 0.0895-1.071; $t = 2.335$; $P = 0.0208$), MO (95% CI = 0.0592-0.181; $t = 3.899$; $P = 0.0001$), EO (95% CI = 0.029-0.131; $t = 3.096$; $P = 0.0023$) i BA (95% CI = 0.0129-0.0471; $t = 3.461$; $P = 0.0007$) bile statistički značajno povišene kod RA pacijenata (Tabela 16).

Tabela 17. Komparacija hematoloških parametara sa brzinom sedimentacije eritrocita (ESR) i koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) u grupi RA pacijenata korištenjem koeficijenta korelacije (r)

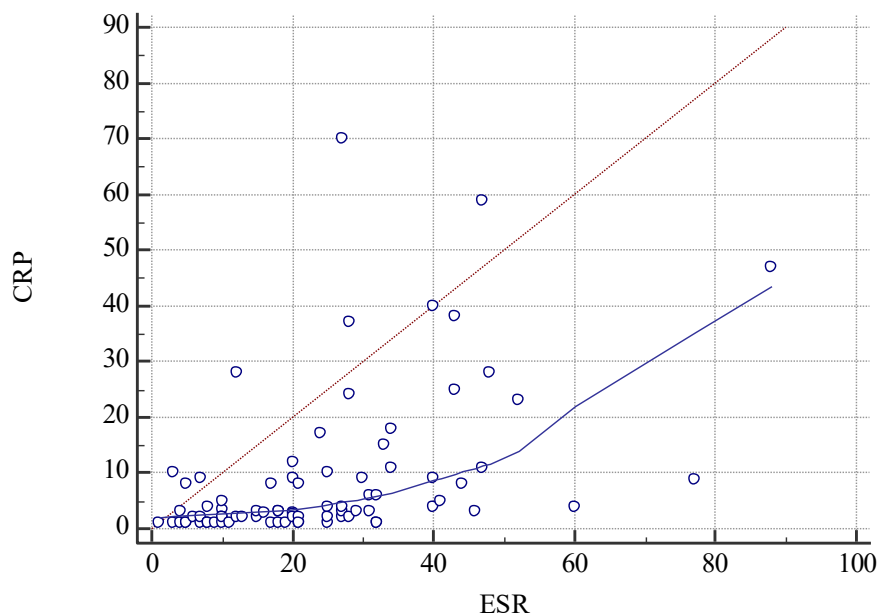
Parametri	ESR (mm/h)			CRP (mg/l)		
	95% CI za r	r	P	95% CI za r	r	P
WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.03564 - 0.3894	0.1855	P=0.0994	0.07535 - 0.4794	0.2903	P=0.0090
RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	-0.3719 - 0.05598	-0.1658	P=0.1417	-0.1604 - 0.2775	0.06150	P=0.5879
HGB (g/dL)	-0.4282 - -0.01100	-0.2302	P=0.0400	-0.2127 - 0.2267	0.007323	P=0.9486
HCT (%)	-0.4070 - 0.01473	-0.2057	P=0.0672	-0.2140 - 0.2255	0.006055	P=0.9575
MCV (fL)	-0.3056 - 0.1303	-0.09202	P=0.4169	-0.2851 - 0.1524	-0.06970	P=0.5390
MCH (pg)	-0.3375 - 0.09520	-0.1272	P=0.2609	-0.2762 - 0.1617	-0.06012	P=0.5963
MCHC (g/dL)	-0.3815 - 0.04491	-0.1766	P=0.1172	-0.1947 - 0.2444	0.02610	P=0.8183
RDW (%)	0.1460 - 0.5326	0.3543	P=0.0013	-0.05354 - 0.3741	0.1682	P=0.1359
RDW-SD (fL)	0.2378 - 0.5975	0.4348	P=0.0001	0.01708 - 0.4332	0.2359	P=0.0351
PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	0.1033 - 0.5008	0.3158	P=0.0043	0.1048 - 0.5020	0.3172	P=0.0041
MPV (fL)	-0.3599 - 0.06987	-0.1522	P=0.1778	-0.3223 - 0.1120	-0.1104	P=0.3294
NE ($10^3/\mu\text{L}$)	0.09439 - 0.4940	0.3077	P=0.0055	0.2194 - 0.5848	0.4189	P=0.0001
LY ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.3663 - 0.06248	-0.1594	P=0.1578	-0.3871 - 0.03831	-0.1830	P=0.1043
MO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.2381 - 0.2011	-0.01944	P=0.8641	-0.1143 - 0.32	0.1082	P=0.3395
EO ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.1874 - 0.2516	0.03372	P=0.7665	-0.1568 - 0.2809	0.06521	P=0.5655
BA ($10^3/\mu\text{L}$)	-0.3135 - 0.1216	-0.1008	P=0.3738	-0.1632 - 0.2748	0.05857	P=0.6058
ESR (mm/h)				0.2818 - 0.6269	0.4722	P<0.0001

NAPOMENA: Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Primjenom koeficijenta korelacije (r) utvrđeno je da postoji statistički značajna negativna korelacija između ESR vrijednosti i HGB (95% CI = -0.4282 - 0.01100; $r = -0.2302$; $P = 0.0400$) ali pozitivna povezanost između ESR i RDW (95% CI = 0.1460-0.5326; $r = 0.3543$; $P = 0.0013$), RDW-SD (95% CI = 0.2378-0.5975; $r = 0.4348$; $P = 0.0001$), PLT (95% CI = 0.1033-0.5008; $r = 0.3158$; $P = 0.0043$) ili NE (95% CI = 0.09439-0.4940; $r = 0.3077$; $P = 0.0055$) kod pacijenata sa RA (Tabela 17).

Postojala je statistički značajna pozitivna korelacija između vrijednosti CRP s jedne strane i vrijednosti WBC (95% CI = 0.07535-0.4794; $r = 0.2903$; $P = 0.009$), RDW-SD (95% CI = 0.01708-0.4332; $r = 0.2359$; $P = 0.0351$), PLT (95% CI = 0.1048-0.5020; $r = 0.3172$; $P = 0.0041$) ili NE (95% CI = 0.2194-0.5848; $r = 0.4189$; $P = 0.0001$) na drugoj strani (Tabela 17).

Korelacija između ESR i CRP kod pacijenata sa RA je takođe utvrđena i ukazuje da se sa povećanjem vrijednosti ESR, vrijednosti CRP (95% CI = 0.2818-0.6269; $r = 0.4722$; $P < 0.0001$) isto povećava (Tabela 17; Grafikon 4).



Grafikon 4. Korelacija između koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i brzine sedimentacije eritrocita (ESR) kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

4.4. Rezultati analize alelnih grupa HLA-DRB1 genskog lokusa ispitanika kontrolne grupe

U ovoj studiji je rađena molekularna tipizacija *HLA-DRB* gena za 82 uzorka periferne venske krvi nesrodnih ispitanika zdrave kontrolne grupe (Tabela 18).

Tabela 18. Rezultati analize *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* gena kod kontrolne grupe

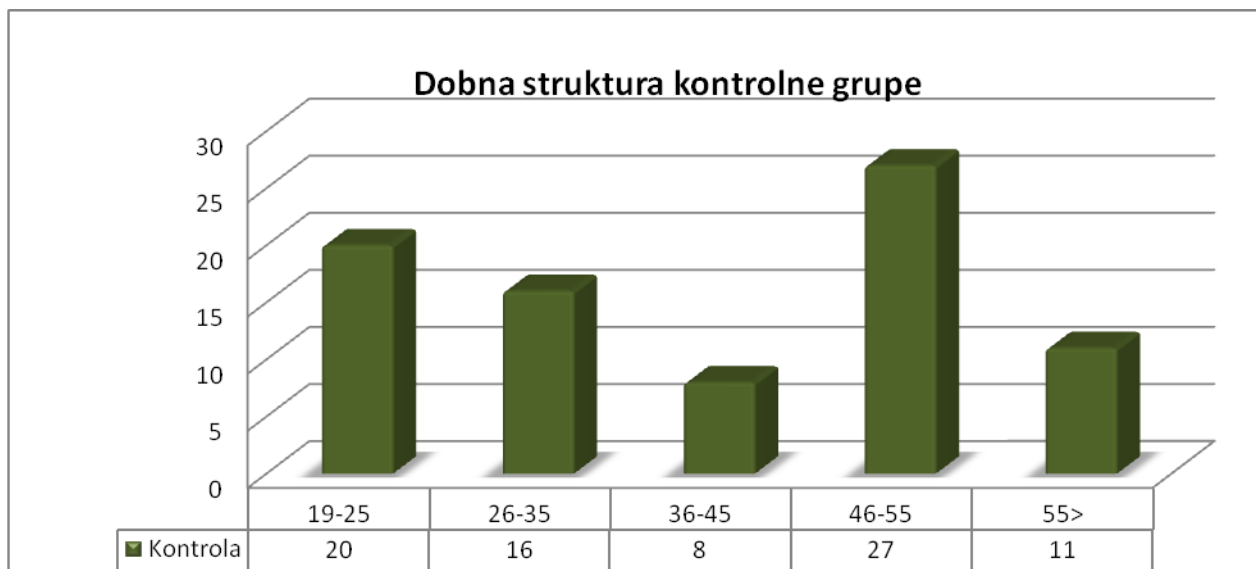
Redni broj	HLA-DRB1		HLA-DRB3	HLA-DRB4	HLA-DRB5
	AG1	AG2	Veličina PCR produkta (pb)		
1	DRB1*03	DRB1*11	230		
2	DRB1*10	DRB1*16			265
3	DRB1*01	DRB1*15			265
4	DRB1*11	DRB1*16	230		265
5	DRB1*01	DRB1*07		215	
6	DRB1*11	DRB1*13			
7	DRB1*01	DRB1*07		215	
8	DRB1*14	DRB1*16	230		265
9	DRB1*01	DRB1*08			
10	DRB1*01	DRB1*16			265
11	DRB1*12	DRB1*16	230		265
12	DRB1*01	DRB1*07		215	
13	DRB1*03	DRB1*13	230		
14	DRB1*14	DRB1*16	230		265
15	DRB1*11	DRB1*16	230		265
16	DRB1*03	DRB1*04	230	215	
17	DRB1*08	DRB1*15			265
18	DRB1*04	DRB1*07		215,130	
19	DRB1*03	DRB1*12	230		
20	DRB1*04	DRB1*13	230	215	
21	DRB1*01	DRB1*15			265
22	DRB1*04	DRB1*13	230	215	
23	DRB1*07	DRB1*11	230	215,130	
24	DRB1*07	DRB1*15		215	265
25	DRB1*14	DRB1*15	230		265
26	DRB1*15	DRB1*16			265
27	DRB1*13	DRB1*15	230		265
28	DRB1*01	DRB1*07			
29	DRB1*07	DRB1*10		215	
30	DRB1*03	DRB1*16	230		265
31	DRB1*03	DRB1*15	230		265
32	DRB1*01	DRB1*15			265
33	DRB1*07	DRB1*16		215	265
34	DRB1*01	DRB1*01			

Tabela 18. (nastavak)

Redni broj	HLA-DRB1		HLA-DRB3	HLA-DRB4	HLA-DRB5
	AG1	AG2	Veličina PCR produkta (pb)		
35	DRB1*13	DRB1*16	230		265
36	DRB1*11	DRB1*16	230		265
37	DRB1*13	DRB1*15	230		265
38	DRB1*01	DRB1*15			265
39	DRB1*01	DRB1*04		215	
40	DRB1*13	DRB1*14	230		
41	DRB1*01	DRB1*15			265
42	DRB1*08	DRB1*14	230		
43	DRB1*13	DRB1*15	230		265
44	DRB1*07	DRB1*16		215	265
45	DRB1*13	DRB1*15	230		265
46	DRB1*01	DRB1*04		215	
47	DRB1*13	DRB1*14	230		
48	DRB1*04	DRB1*08		215	265
49	DRB1*01	DRB1*04		215	
50	DRB1*13	DRB1*15	230		265
51	DRB1*15	DRB1*15			265
52	DRB1*03	DRB1*11	230		
53	DRB1*01	DRB1*14	230		
54	DRB1*07	DRB1*11	230	215,130	
55	DRB1*15	DRB1*15			265
56	DRB1*01	DRB1*11	230		
57	DRB1*04	DRB1*07		215,130	
58	DRB1*01	DRB1*04		215	
59	DRB1*01	DRB1*15			265
60	DRB1*07	DRB1*16		215	265
61	DRB1*01	DRB1*13	230		
62	DRB1*04	DRB1*11	230	215	
63	DRB1*07	DRB1*16		215	265
64	DRB1*11	DRB1*16	230		265
65	DRB1*11	DRB1*11	230		
66	DRB1*03	DRB1*16	230		265
67	DRB1*03	DRB1*15	230		265
68	DRB1*10	DRB1*11	230		
69	DRB1*10	DRB1*13	230		
70	DRB1*07	DRB1*16		215	265
71	DRB1*07	DRB1*13	230	215,130	
72	DRB1*03	DRB1*16	230		
73	DRB1*15	DRB1*15			265
74	DRB1*07	DRB1*13	230	215	
75	DRB1*08	DRB1*13	230		
76	DRB1*07	DRB1*13	230	215	
77	DRB1*11	DRB1*16	230		265
78	DRB1*01	DRB1*04		215	
79	DRB1*09	DRB1*14	230		
80	DRB1*01	DRB1*16		215	
81	DRB1*01	DRB1*15			265
82	DRB1*11	DRB1*15	230		265

NAPOMENA: alelna grupa 1 (AG1), alelna grupa 2 (AG2)

U kontrolnoj grupi bilo je 20 pacijenata dobne skupine od 19 do 25 godina. Najveći broj ispitanika 27 je bio dobne skupine od 46 do 55 godina. Nesrodnih ispitanika od 26 do 35 bilo je 16. Zatim osam ispitanika dobne skupine od 36 do 45 godina i 11 ispitanika sa 55 i više godina (Grafikon 5).



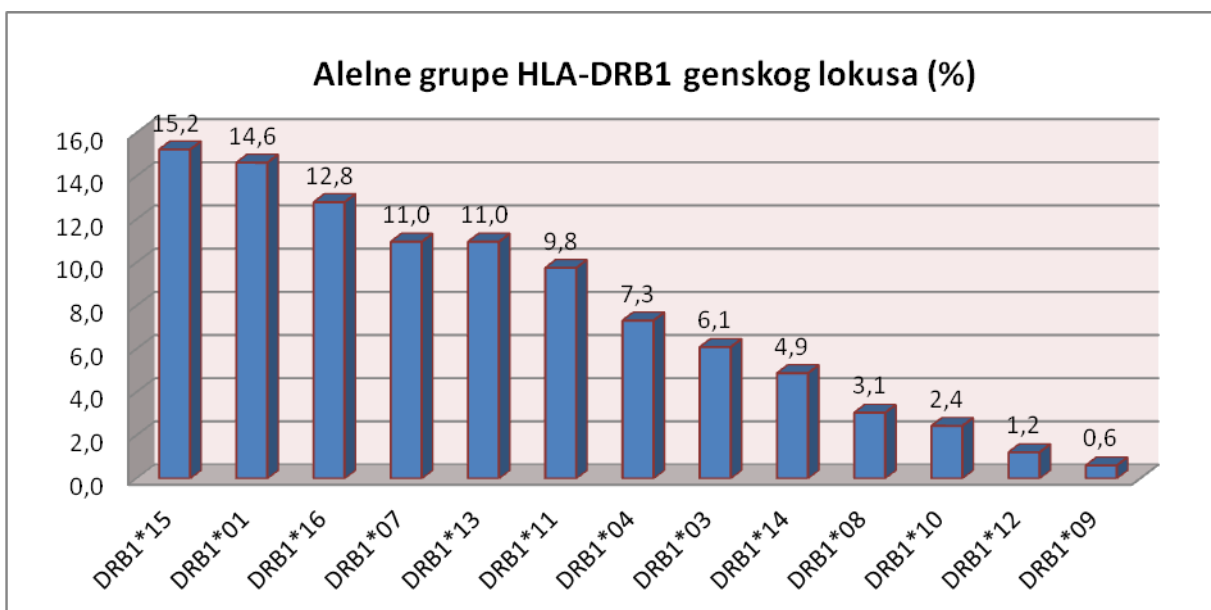
Grafikon 5. Prikaz dobne strukture kontrolne grupe

Među ispitanicima kontrolne grupe, od 13 različitih alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa (*HLA-DRB1*01*, *DRB1*03*, *DRB1*04*, *DRB1*07*, *DRB1*08*, *DRB1*09*, *DRB1*10*, *DRB1*11*, *DRB1*12*, *DRB1*13*, *DRB1*14*, *DRB1*15* i *DRB1*16*), uočeno je svih 13 (Tabela 19).

Tabela 19. Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB1* lokusa kontrolne grupe ($n = 82$; $2n = 164$)

Red. br.	Alelna grupa	Frekvencija		
		Broj	f	%
1	DRB1*01	24	0.1463	14.63
2	DRB1*03	10	0.0609	6.09
3	DRB1*04	12	0.0732	7.32
4	DRB1*07	18	0.1097	10.97
5	DRB1*08	5	0.0305	3.05
6	DRB1*09	1	0.0061	0.61
7	DRB1*10	4	0.0244	2.44
8	DRB1*11	16	0.0976	9.76
9	DRB1*12	2	0.0122	1.22
10	DRB1*13	18	0.1097	10.97
11	DRB1*14	8	0.0488	4.88
12	DRB1*15	25	0.1524	15.24
13	DRB1*16	21	0.1280	12.80

Najučestalije alelne grupe među kontrolnim ispitanicima su bile *HLA-DRB1*15* (15.24%), *DRB1*01* (14.63%) i *DRB1*16* (12.80%). Zatim slijede alelne grupe *DRB1*07* (10.97%), *DRB1*13* (10.97%) i *DRB1*11* (9.76%). Druge alelne grupe, uključujući *DRB1*04* (7.32%), *DRB1*03* (6.09%), *DRB1*14* (4.88%), *DRB1*08* (3.05%), *DRB1*10* (2.44%), *DRB1*12* (1.22 %) i *DRB1*09* (0.61%), bile su manje zastupljene među ispitanicima kontrolne grupe (Grafikon 6).



Grafikon 6. Prikaz alelnih grupa *HLA-DRB1* lokusa kontrolne grupe

4.5. Rezultati analize genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa kontrolne grupe

Najučestaliji genotipovi kod kontrolnih ispitanika su bili *DRB1*01/DRB1*15* (8.54%), zatim *DRB1*01/DRB1*04*, *DRB1*11/DRB1*16*, *DRB1*13/DRB1*15* i *DRB1*07/DRB1*16* sa 6.09% svaki, *DRB1*01/DRB1*07* sa 4.88%, a zatim slijede genotipovi *DRB1*07/DRB1*13*, *DRB1*03/DRB1*16* i *DRB1*15/DRB1*15* sa 3.66% (Tabela 20). Preostala 34 genotipa su imala učestalost manju od 2.5%.

Tabela 20. Frekvencija genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa kontrolne grupe

Red. Br.	Genotip	Frekvencija		
		Broj	<i>f</i>	%
1	DRB1*01/ DRB1*15	7	0.0854	8.54
2	DRB1*01/ DRB1*04	5	0.0609	6.09
3	DRB1*07/ DRB1*16	5	0.0609	6.09
4	DRB1*11/ DRB1*16	5	0.0609	6.09
5	DRB1*13/ DRB1*15	5	0.0609	6.09
6	DRB1*01/ DRB1*07	4	0.0488	4.88
7	DRB1*03/ DRB1*16	3	0.0366	3.66
8	DRB1*07/ DRB1*13	3	0.0366	3.66
9	DRB1*15/ DRB1*15	3	0.0366	3.66
10	DRB1*01/ DRB1*16	2	0.0243	2.43
11	DRB1*03/ DRB1*11	2	0.0243	2.43
12	DRB1*03/ DRB1*15	2	0.0243	2.43
13	DRB1*04/ DRB1*07	2	0.0243	2.43
14	DRB1*04/ DRB1*13	2	0.0243	2.43
15	DRB1*07/ DRB1*11	2	0.0243	2.43
16	DRB1*13/ DRB1*14	2	0.0243	2.43
17	DRB1*14/ DRB1*16	2	0.0243	2.43
18	DRB1*01/ DRB1*01	1	0.0122	1.22
19	DRB1*01/ DRB1*08	1	0.0122	1.22
20	DRB1*01/ DRB1*11	1	0.0122	1.22
21	DRB1*01/ DRB1*13	1	0.0122	1.22
22	DRB1*01/ DRB1*14	1	0.0122	1.22
23	DRB1*03/ DRB1*04	1	0.0122	1.22
24	DRB1*03/ DRB1*12	1	0.0122	1.22
25	DRB1*03/ DRB1*13	1	0.0122	1.22
26	DRB1*04/ DRB1*08	1	0.0122	1.22

Tabela 20. (nastavak)

Red br.	Genotip	Frekvencija		
		Broj	<i>f</i>	%
27	DRB1*04/ DRB1*11	1	0.0122	1.22
28	DRB1*07/ DRB1*10	1	0.0122	1.22
29	DRB1*07/ DRB1*15	1	0.0122	1.22
30	DRB1*08/ DRB1*13	1	0.0122	1.22
31	DRB1*08/ DRB1*14	1	0.0122	1.22
32	DRB1*08/ DRB1*15	1	0.0122	1.22
33	DRB1*09/ DRB1*14	1	0.0122	1.22
34	DRB1*10/ DRB1*11	1	0.0122	1.22
35	DRB1*10/ DRB1*13	1	0.0122	1.22
36	DRB1*10/ DRB1*16	1	0.0122	1.22
37	DRB1*11/ DRB1*11	1	0.0122	1.22
38	DRB1*11/ DRB1*13	1	0.0122	1.22
39	DRB1*11/ DRB1*15	1	0.0122	1.22
40	DRB1*12/ DRB1*16	1	0.0122	1.22
41	DRB1*13/ DRB1*16	1	0.0122	1.22
42	DRB1*14/ DRB1*15	1	0.0122	1.22
43	DRB1*15/ DRB1*16	1	0.0122	1.22

Analizom *HLA-DRB1* genskog lokusa 82 ispitanika kontrolne grupe utvrđeno je prisustvo 43 različita genotipa (Tabela 21). Korištenjem testa Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuma (HWE) za *HLA-DRB1* genski lokus, P vrijednosti je iznosila 0.1171 ($P > 0,05$) i nije bilo odstupanja od ekvilibrijuma. Dalja analiza parametara polimorfizma *HLA-DRB1* genskog lokusa u kontrolnoj grupi je pokazala da je heterozigotnost 0.939, genski diverzitet 0.8922 i udio polimorfizma 0.8822 (PIC).

Tabela 21. Prikaz vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma *HLA-DRB1* genskog lokusa u kontrolnoj grupi

Lokus HLA-DRB1	Broj genotipova	HWE test	Heterozigotnost	Genski diverzitet	PIC
Kontrola (n = 82)	43	0.1171	0.939	0.8922	0.8822

NAPOMENA: HWE: Hardy-Weinbergov ekvilibrijum; PIC: Informacije o udjelu polimorfizma

4.6. Rezultati analize alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA)

Molekularna tipizacija *HLA-DRB1* gena je provedena kod 83 pacijenta sa dijagnozom reumatoidnog artritisa (RA) (Tabela 22).

Tabela 22. Rezultati analize *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* gena u grupi pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA)

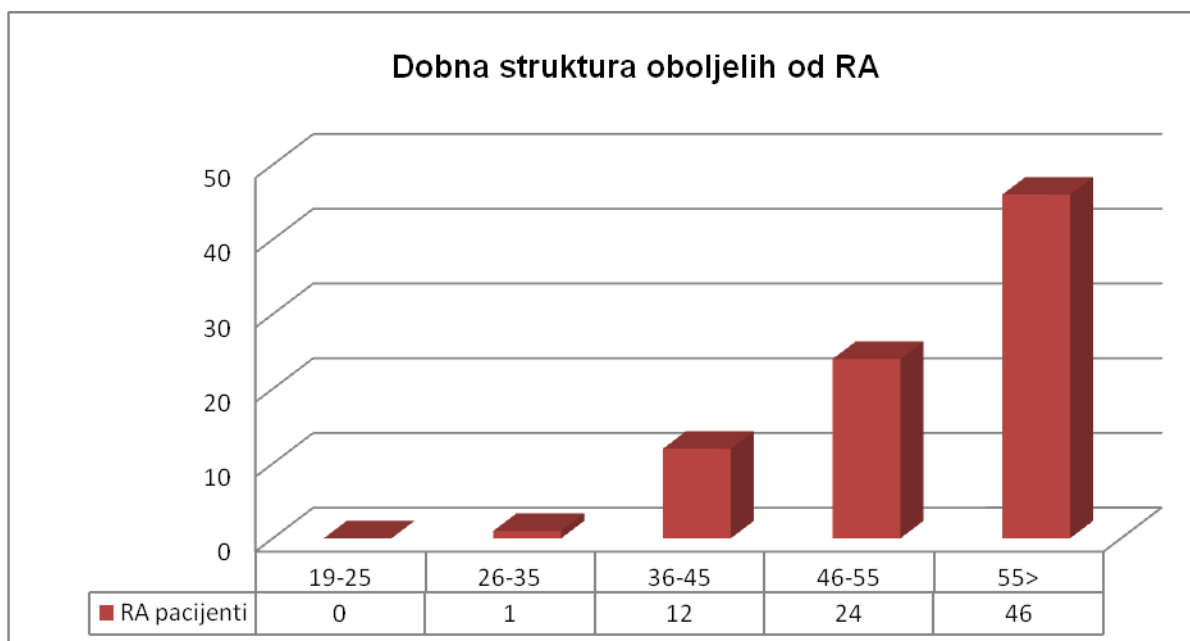
Redni broj	HLA-DRB1		HLA-DRB3	HLA-DRB4	HLA-DRB5
	AG1	AG2	Veličina PCR produkta (pb)		
1	DRB1*10	DRB1*16			265
2	DRB1*04	DRB1*16		215	265
3	DRB1*01	DRB1*07		215,130	
4	DRB1*11	DRB1*15	230		
5	DRB1*03	DRB1*16	230		
6	DRB1*04	DRB1*13	230	215	
7	DRB1*11	DRB1*16	230		265
8	DRB1*01	DRB1*03	230		
9	DRB1*04	DRB1*11	230	215	
10	DRB1*07	DRB1*15		215,130	265
11	DRB1*01	DRB1*14	230		
12	DRB1*01	DRB1*08			
13	DRB1*11	DRB1*16	230		
14	DRB1*03	DRB1*04	230	215	
15	DRB1*01	DRB1*07		215,130	
16	DRB1*03	DRB1*15	230		265
17	DRB1*07	DRB1*13			
18	DRB1*01	DRB1*14	230		
19	DRB1*11	DRB1*15	230		265
20	DRB1*03	DRB1*15	230		
21	DRB1*04	DRB1*15		215	265
22	DRB1*01	DRB1*11	230		
23	DRB1*15	DRB1*16			265
24	DRB1*03	DRB1*08	230		
25	DRB1*01	DRB1*12	230		
26	DRB1*16	DRB1*16			265
27	DRB1*07	DRB1*13	230		
28	DRB1*13	DRB1*15			265
29	DRB1*01	DRB1*07		215	
30	DRB1*03	DRB1*16	230		265
31	DRB1*15	DRB1*15			265
32	DRB1*07	DRB1*15		215	265
33	DRB1*10	DRB1*11	230		
34	DRB1*10	DRB1*11	230		
35	DRB1*13	DRB1*15	230		265
36	DRB1*04	DRB1*04		130	

Tabela 22. (nastavak)

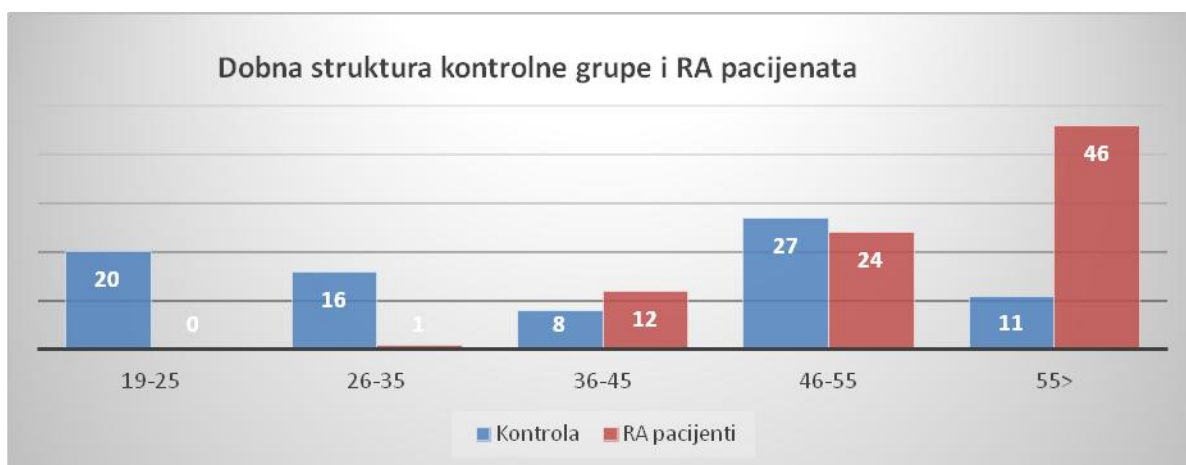
Redni broj	HLA-DRB1		HLA-DRB3	HLA-DRB4	HLA-DRB5
	AG1	AG2	Veličina PCR produkta (pb)		
37	DRB1*13	DRB1*16	230		265
38	DRB1*03	DRB1*11	230		
39	DRB1*04	DRB1*11	230	215	
40	DRB1*07	DRB1*13	230	215	
41	DRB1*04	DRB1*07		215	
42	DRB1*15	DRB1*16			265
43	DRB1*07	DRB1*14	230	215, 130	
44	DRB1*03	DRB1*04	230		
45	DRB1*09	DRB1*14	230	215	
46	DRB1*01	DRB1*04		215	
47	DRB1*11	DRB1*14	230		
48	DRB1*01	DRB1*08			
49	DRB1*03	DRB1*04	230	215	
50	DRB1*04	DRB1*16		215	
51	DRB1*07	DRB1*15			
52	DRB1*13	DRB1*16	230		265
53	DRB1*04	DRB1*04		215	
54	DRB1*01	DRB1*07		215, 130	
55	DRB1*03	DRB1*11	230		
56	DRB1*11	DRB1*13	230		
57	DRB1*08	DRB1*15			265
58	DRB1*11	DRB1*15	230		265
59	DRB1*04	DRB1*12	230	215	
60	DRB1*01	DRB1*14	230		
61	DRB1*03	DRB1*11	230		
62	DRB1*13	DRB1*16	230		265
63	DRB1*11	DRB1*15	230		265
64	DRB1*03	DRB1*15	230		265
65	DRB1*01	DRB1*11	230		
66	DRB1*01	DRB1*14	230		
67	DRB1*01	DRB1*04		215	
68	DRB1*03	DRB1*04	230	215	
69	DRB1*01	DRB1*08			
70	DRB1*03	DRB1*03	230		
71	DRB1*03	DRB1*03	230		
72	DRB1*03	DRB1*03	230		
73	DRB1*15	DRB1*16			265
74	DRB1*03	DRB1*04		130	
75	DRB1*04	DRB1*15		215	265
76	DRB1*04	DRB1*04		215	
77	DRB1*01	DRB1*13	230		
78	DRB1*08	DRB1*13	230		
79	DRB1*01	DRB1*07		215	
80	DRB1*04	DRB1*15		215	265
81	DRB1*07	DRB1*16		215, 130	265
82	DRB1*04	DRB1*04		215	
83	DRB1*04	DRB1*16			

NAPOMENA: AG1- alelna grupa 1; AG2 – alelna grupa 2

Najveći broj pacijenata, i to 46, je bio u dobnoj skupini 55 i više godina. U dobnoj skupini od 46 do 55 godina su bila 24 pacijenta. Zatim je bilo 12 pacijenata u dobnoj skupini od 36 do 45 godina. Samo jedan ispitanik je bio u dobnoj skupini od 26 do 35 godina (Grafikon 7). Uporedni prikaz dobne strukture RA pacijenata i kontrolne grupe dat je u Grafikonu 8.



Grafikon 7. Prikaz dobne strukture pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)



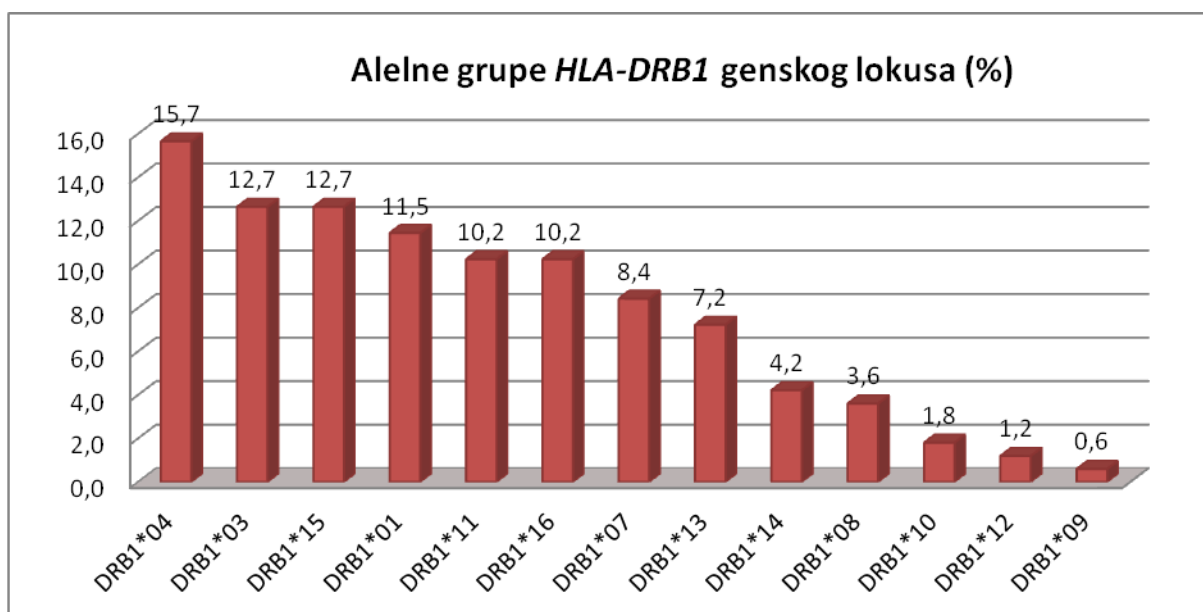
Grafikon 8. Uporedni prikaz dobne strukture kontrolne grupe i pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

Od 13 različitih alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa (*DRB1*01*, *DRB1*03*, *DRB1*04*, *DRB1*07*, *DRB1*08*, *DRB1*09*, *DRB1*10*, *DRB1*11*, *DRB1*12*, *DRB1*13*, *DRB1*14*, *DRB1*15* i *DRB1*16*) svih 13 je bilo prisutno među pacijentima sa reumatoidnim artritisom (Tabela 23).

Tabela 23. Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB1* lokusa među pacijentima oboljelim od reumatoidnog artritisa ($n = 83$; $2n = 166$)

Red. br.	Alelna grupa	Frekvencija		
		Broj	<i>f</i>	%
1	DRB1*01	19	0.1145	11.45
2	DRB1*03	21	0.1265	12.65
3	DRB1*04	26	0.1566	15.66
4	DRB1*07	14	0.0843	8.43
5	DRB1*08	6	0.0361	3.61
6	DRB1*09	1	0.0060	0.60
7	DRB1*10	3	0.0181	1.81
8	DRB1*11	17	0.1024	10.24
9	DRB1*12	2	0.0120	1.20
10	DRB1*13	12	0.0723	7.23
11	DRB1*14	7	0.0422	4.23
12	DRB1*15	21	0.1265	12.65
13	DRB1*16	17	0.1024	10.24

Među pacijentima sa RA, od 13 alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa najučestaliji aleli su bili oni koji pripadaju grupama *DRB1*04* (15.66%), *DRB1*03* (12.65%) i *DRB1*15* (12.65%). Slijede druge alelne grupe, uključujući *DRB1*01* (11.45%), *DRB1*11* (10.24%), *DRB1*16* (10.24%), *DRB1*07* (8.43%), *DRB1*13* (7.23%), *DRB1*14* (4.22%), *DRB1*08* (3.61%), *DRB1*10* (1.81%), *DRB1*12* (1.20%) i *DRB1*09* (0.60%) (Grafikon 9).



Grafikon 9. Prikaz distribucije alelnih grupa *HLA-DRB1* lokusa kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

4.7. Rezultati analize genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritism (RA)

Najučestaliji genotipovi kod RA pacijenata su bili *DRB1*01/DRB1*07* i *DRB1*03/DRB1*04* sa 6.02%, zatim *DRB1*01/DRB1*14*, *DRB1*11/DRB1*15* i *DRB1*04/DRB1*04* sa 4.82%. Genotipovi *DRB1*07/DRB1*13*, *DRB1*03/DRB1*11*, *DRB1*03/DRB1*15*, *DRB1*01/DRB1*08*, *DRB1*07/DRB1*15*, *DRB1*13/DRB1*16*, *DRB1*15/DRB1*16*, *DRB1*03/DRB1*03*, *DRB1*04/DRB1*15* i *DRB1*04/DRB1*16* su imali učestalost od 3.61% svaki (Tabela 24). Ostatak od 24 različita genotipa je imao učestalost ispod 2.5%.

Tabela 24. Frekvencija genotipova *HLA-DRB1* lokusa među pacijentima oboljelim od reumatoidnog artritisa (RA)

Red. Br.	Genotip	Frekvencija		
		Broj	<i>f</i>	%
1	DRB1*01/ DRB1*07	5	0.0602	6.02
2	DRB1*03/ DRB1*04	5	0.0602	6.02
3	DRB1*01/ DRB1*14	4	0.0482	4.82
4	DRB1*04/ DRB1*04	4	0.0482	4.82
5	DRB1*11/ DRB1*15	4	0.0482	4.82
6	DRB1*01/ DRB1*08	3	0.0361	3.61
7	DRB1*03/ DRB1*03	3	0.0361	3.61
8	DRB1*03/ DRB1*11	3	0.0361	3.61
9	DRB1*03/ DRB1*15	3	0.0361	3.61
10	DRB1*04/ DRB1*15	3	0.0361	3.61
11	DRB1*04/ DRB1*16	3	0.0361	3.61
12	DRB1*07/ DRB1*13	3	0.0361	3.61
13	DRB1*07/ DRB1*15	3	0.0361	3.61
14	DRB1*13/ DRB1*16	3	0.0361	3.61
15	DRB1*15/ DRB1*16	3	0.0361	3.61
16	DRB1*01/ DRB1*04	2	0.0241	2.41
17	DRB1*01/ DRB1*11	2	0.0241	2.41
18	DRB1*03/ DRB1*16	2	0.0241	2.41
19	DRB1*04/ DRB1*11	2	0.0241	2.41

Tabela 24. (nastavak)

Red. Br.	Genotip	Frekvencija		
		Broj	<i>f</i>	%
20	DRB1*10/ DRB1*11	2	0.0241	2.41
21	DRB1*11/ DRB1*16	2	0.0241	2.41
22	DRB1*13/ DRB1*15	2	0.0241	2.41
23	DRB1*01/ DRB1*03	1	0.0120	1.20
24	DRB1*01/ DRB1*12	1	0.0120	1.20
25	DRB1*01/ DRB1*13	1	0.0120	1.20
26	DRB1*03/ DRB1*08	1	0.0120	1.20
27	DRB1*04/ DRB1*07	1	0.0120	1.20
28	DRB1*04/ DRB1*12	1	0.0120	1.20
29	DRB1*04/ DRB1*13	1	0.0120	1.20
30	DRB1*07/ DRB1*14	1	0.0120	1.20
31	DRB1*07/ DRB1*16	1	0.0120	1.20
32	DRB1*08/ DRB1*13	1	0.0120	1.20
33	DRB1*08/ DRB1*15	1	0.0120	1.20
34	DRB1*09/ DRB1*14	1	0.0120	1.20
35	DRB1*10/ DRB1*16	1	0.0120	1.20
36	DRB1*11/ DRB1*13	1	0.0120	1.20
37	DRB1*11/ DRB1*14	1	0.0120	1.20
38	DRB1*15/ DRB1*15	1	0.0120	1.20
39	DRB1*16/ DRB1*16	1	0.0120	1.20

Analizom *HLA-DRB1* genskog lokusa 83 pacijenta sa reumatoidnim artritismom (RA) utvrđeno je prisustvo 39 različitih genotipova (Tabela 25). Korištenjem testa Hardy-Weinbergovog ekvilibrijuma (HWE) za *HLA-DRB1* genski lokus, P vrijednosti je iznosila 0.0285 ($P < 0,05$) i odstupala je od HWE. Dalja analiza parametara polimorfizma *HLA-DRB1* genskog lokusa u grupi pacijenata sa RA je pokazala da heterozigotnost iznosi 0.8916, genski diverzitet 0.8935 i udio polimorfizma 0.8837 (PIC).

Tabela 25. Prikaz vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma *HLA-DRB1* genskog lokusa u skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

Lokus HLA-DRB1	Broj genotipova	HWE test	Heterozigotnost	Genski diverzitet	PIC
RA pacijenti (n = 83)	39	0.0285	0.8916	0.8935	0.8837

NAPOMENA: Informacija o udjelu polimorfizma (PIC, *Polymorphism Information Content*); Hardy-Weinbergov ekvilibrijum (HWE)
Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

4.8. Komparativna analiza rezultata *HLA-DRB1* genskog lokusa, frekvencija alelnih grupa, genotipova i haplotipova kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA)

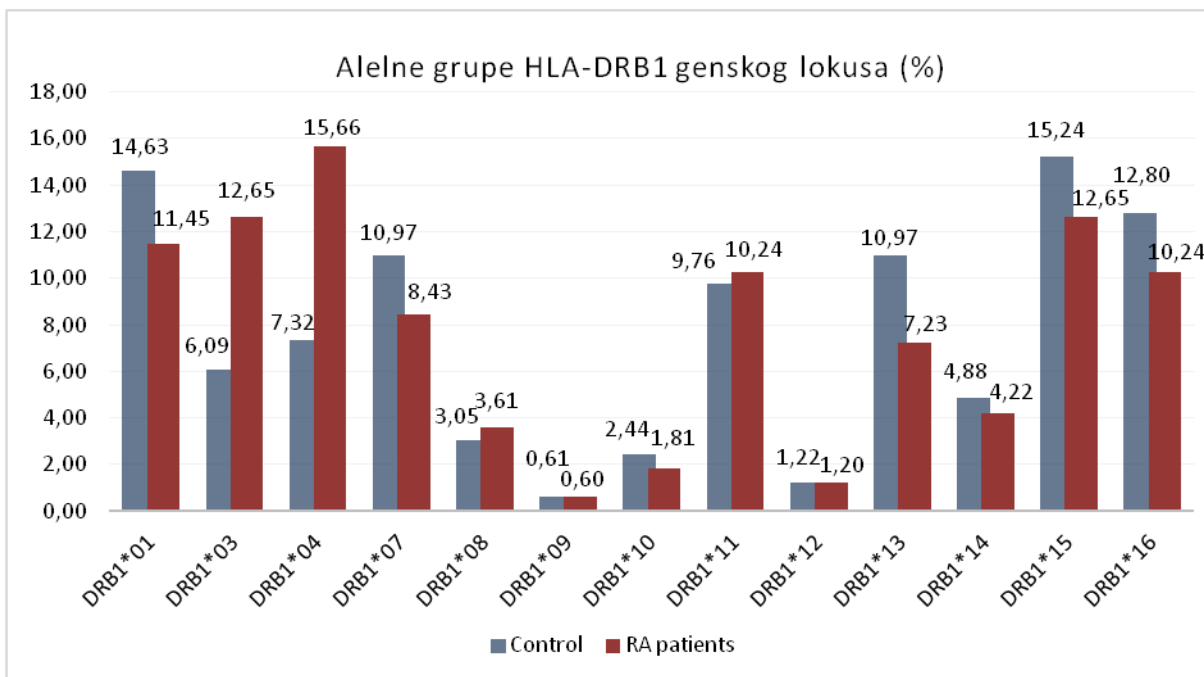
Distribucija *HLA-DRB1* varijanti kod RA pacijenata je upoređena sa distribucijom ovih varijanti kontrolne grupe (Tabela 26). Frekvencija *HLA-DRB1*04* ($P = 0.0177$, OR = 2.346, 95% CI = 1.093-5.311) i *HLA-DRB1*03* ($P = 0.04165$, OR = 2.225, 95% CI = 0.9639-5.482) alelne grupe kod RA pacijenata je bila znatno veća nego u kontrolnoj grupi (Tabela 26). Frekvencije alela koji su pripadali grupi *DRB1*08* i *DRB1*11* su bile neznatno veće kod RA pacijenata nego u kontrolnoj grupi ali ove razlike nisu bile statistički značajne.

Tabela 26. Komparativna analiza frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) i kontrolne grupe

R. br.	Alelna grupa	Kontrola		RA pacijenti		OR	95% CI	P
		2n	f	2n	f			
1	DRB1*01	24	0.1463	19	0.1145	0.7546	0.3729-1.508	0.3904
2	DRB1*03	10	0.0609	21	0.1265	2.225	0.9639-5.482	0.04165
3	DRB1*04	12	0.0732	26	0.1566	2.346	1.093-5.311	0.01774
4	DRB1*07	18	0.1097	14	0.0843	0.7477	0.331-1.657	0.4360
5	DRB1*08	5	0.0305	6	0.0361	1.192	0.34-4.322	0.7750
6	DRB1*09	1	0.0061	1	0.0060	0.9879	0.01251-78.02	0.9932
7	DRB1*10	4	0.0244	3	0.0181	0.7369	0.1063-4.43	0.6909
8	DRB1*11	16	0.0976	17	0.1024	1.055	0.4811-2.324	0.8835
9	DRB1*12	2	0.0122	2	0.0120	0.9878	0.07082-13.78	0.9903
10	DRB1*13	18	0.1097	12	0.0723	0.6329	0.268-1.445	0.2379
11	DRB1*14	8	0.0488	7	0.0422	0.8589	0.2584-2.783	0.7734
12	DRB1*15	25	0.1524	21	0.1265	0.8058	0.4083-1.577	0.4971
13	DRB1*16	21	0.1280	17	0.1024	0.7775	0.3687-1.618	0.4663

NAPOMENA: 2n – broj alelnih grupa; f – frekvencija alelne grupe
 Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Suprotno tome, frekvencije alelnih grupa *DRB1*01*, *DRB1*07*, *DRB1*13*, *DRB1*15* i *DRB1*16* su bile veće u kontrolnoj grupi nego kod RA pacijenata ali ne statistički značajno. Frekvencije *DRB1*09*, *DRB1*10*, *DRB1*12* i *DRB1*14* su bile nešto veće u kontrolnoj grupi (Grafikon 10).



Grafikon 10. Prikaz distribucije alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) i zdrave kontrolne grupe

Frekvencije *DRB1*04/DRB1*04* ($P=0.03669$, $OR=6.361$, $95\% CI = 0,49-410$) i *DRB1*03/DRB1*04* ($P= 0-0501$, $OR= 5.149$, $95\% CI = 0,5582-248.6$) genotipova su bile statistički značajno veće među RA pacijentima nego u kontrolnoj grupi (Tabela 27). Genotip *DRB1*04/DRB1*04* nije bio uočen u kontrolnoj grupi. Frekvencije genotipa *DRB1*03/DRB1*03*, *DRB1*04/DRB1*15* i *DRB1*04/DRB1*16* ($P = 0.1985$, $OR = 6.9167$, $95\% CI = 0.3629-131.8425$ svaki) i genotipova *DRB1*01/DRB1*14* i *DRB1*11/DRB1*15* ($P = 0.08948$, $OR = 4.071$, $95\% CI = 0.3916-204.4$ svaki) su bile povećane kod RA pacijenata kada se uporedi sa kontrolnom grupom ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno.

Genotipovi *DRB1*03/DRB1*03*, *DRB1*04/DRB1*15*, *DRB1*04/DRB1*16*, *DRB1*01/DRB1*03*, *DRB1*01/DRB1*12*, *DRB1*03/DRB1*08*, *DRB1*04/DRB1*12*, *DRB1*07/DRB1*14*, *DRB1*11/DRB1*14* i *DRB1*16/DRB1*16* su bili prisutni kod RA pacijenata dok ih nije bilo u kontrolnoj grupi (Tabela 27).

Tabela 27. Komparativna analiza frekvencija genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) i kontrolne grupe

R. br.	Genotip	Kontrola		RA pacijenti		OR	95% CI	P
		<i>n</i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>f</i>			
1	DRB1*01/ DRB1*15	7	0.0854	0	0	0.143	0.003-1.18	0.0074
2	DRB1*01/ DRB1*04	5	0.0609	2	0.0241	0.3824	0.03542-2.42	0.1210
3	DRB1*11/ DRB1*16	5	0.0609	2	0.0241	0.3824	0.03542-2.42	0.1210
4	DRB1*13/ DRB1*15	5	0.0609	2	0.0241	0.3824	0.03542-2.42	0.1210
5	DRB1*07/ DRB1*16	5	0.0609	1	0.012	0.1894	0.003924-1.747	0.04712
6	DRB1*01/ DRB1*07	4	0.0488	5	0.0602	1.248	0.258-6.537	0.3733
7	DRB1*07/ DRB1*13	3	0.0366	3	0.0361	0.9876	0.1284-7.599	0.4940
8	DRB1*03/ DRB1*16	3	0.0366	2	0.0241	0.6519	0.05312-5.85	0.3204
9	DRB1*15/ DRB1*15	3	0.0366	1	0.012	0.3232	0.006045-4.122	0.1545
10	DRB1*03/ DRB1*11	2	0.0243	3	0.0361	1.496	0.1668-18.36	0.3303
11	DRB1*03/ DRB1*15	2	0.0243	3	0.0361	1.496	0.1668-18.36	0.3303
12	DRB1*04/ DRB1*07	2	0.0243	1	0.012	0.4899	0.00817-9.582	0.2771
13	DRB1*04/ DRB1*13	2	0.0243	1	0.012	0.4899	0.00817-9.582	0.2771
14	DRB1*01/ DRB1*16	2	0.0243	0	0	0.1976	0.009632-4.0544	0.2929
15	DRB1*07/ DRB1*11	2	0.0243	0	0	0.1976	0.009632-4.0544	0.2929
16	DRB1*13/ DRB1*14	2	0.0243	0	0	0.1976	0.009632-4.0544	0.2929
17	DRB1*14/ DRB1*16	2	0.0243	0	0	0.1976	0.009632-4.0544	0.2929
18	DRB1*03/ DRB1*04	1	0.0122	5	0.0602	5.149	0.5582-248.6	0.0500
19	DRB1*01/ DRB1*14	1	0.0122	4	0.0482	4.071	0.3916-204.4	0.08948
20	DRB1*11/ DRB1*15	1	0.0122	4	0.0482	4.071	0.3916-204.4	0.08948

Tabela 27. Nastavak

	Genotip	Kontrola		RA pacijenti		OR	95% CI	P
		<i>n</i>	<i>f</i>	<i>n</i>	<i>f</i>			
21	DRB1*01/ DRB1*08	1	0.0122	3	0.0361	3.019	0.2367-161.4	0.1594
22	DRB1*07/ DRB1*15	1	0.0122	3	0.0361	3.019	0.2367-161.4	0.1594
23	DRB1*13/ DRB1*16	1	0.0122	3	0.0361	3.019	0.2367-161.4	0.1594
24	DRB1*15/ DRB1*16	1	0.0122	3	0.0361	3.019	0.2367-161.4	0.1594
25	DRB1*01/ DRB1*11	1	0.0122	2	0.0241	1.992	0.1018-119.4	0.2842
26	DRB1*04/ DRB1*11	1	0.0122	2	0.0241	1.992	0.1018-119.4	0.2842
27	DRB1*10/ DRB1*11	1	0.0122	2	0.0241	1.992	0.1018-119.4	0.2842
28	DRB1*01/ DRB1*13	1	0.0122	1	0.012	0.9879	0.01243-78.48	0.4966
29	DRB1*08/ DRB1*13	1	0.0122	1	0.012	0.9879	0.01243-78.48	0.4966
30	DRB1*08/ DRB1*15	1	0.0122	1	0.012	0.9879	0.01243-78.48	0.4966
31	DRB1*09/ DRB1*14	1	0.0122	1	0.012	0.9879	0.01243-78.48	0.4966
32	DRB1*10/ DRB1*16	1	0.0122	1	0.012	0.9879	0.01243-78.48	0.4966
33	DRB1*11/ DRB1*13	1	0.0122	1	0.012	0.9879	0.01243-78.48	0.4966
34	DRB1*01/ DRB1*01	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
35	DRB1*03/ DRB1*12	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
36	DRB1*03/ DRB1*13	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
37	DRB1*04/ DRB1*08	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
38	DRB1*07/ DRB1*10	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
39	DRB1*08/ DRB1*14	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
40	DRB1*10/ DRB1*13	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
41	DRB1*11/ DRB1*11	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
42	DRB1*12/ DRB1*16	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
43	DRB1*14/ DRB1*15	1	0.0122	0	0	0.3294	0.01361-7.9699	0.4945
44	DRB1*04/ DRB1*04	0	0	4	0.0482	6.361	0.49-410	0.03669
45	DRB1*03/ DRB1*03	0	0	3	0.0361	6.9167	0.3629-131.8425	0.06662
46	DRB1*04/ DRB1*15	0	0	3	0.0361	6.9167	0.3629-131.8425	0.06662
47	DRB1*04/ DRB1*16	0	0	3	0.0361	6.9167	0.3629-131.8425	0.06662
48	DRB1*01/ DRB1*03	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039
49	DRB1*01/ DRB1*12	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039
50	DRB1*03/ DRB1*08	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039
51	DRB1*04/ DRB1*12	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039
52	DRB1*07/ DRB1*14	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039
53	DRB1*11/ DRB1*14	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039
54	DRB1*16/ DRB1*16	0	0	1	0.012	2.9643	0.1225-71.729	0.5039

NAPOMENA: *n* – broj genotipova; *f* – frekvencija genotipa
 Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Statistički značajno povećana frekvencija *DRB1*01/DRB1*15* ($P = 0.007366$, $OR = 0.143$, $95\% CI = 0.003077-1.185$) i *DRB1*07/DRB1*16* ($P = 0.04712$, $OR = 0.1894$, $95\% CI = 0.003924-1.747$) genotipova je pronađena kod kontrolnih ispitanika u poređenju sa RA pacijentima (Tabela 27). Ovi genotipovi vjerojatno imaju zaštitnu ulogu u razvoju RA te nisu uočeni kod pacijenata sa RA (*DRB1*01/DRB1*15*) ili su rijetko prisutni (*DRB1*07/DRB1*16*). *DRB1*01/DRB1*04*, *DRB1*11/DRB1*16* i *DRB1*13/DRB1*15* ($P = 0.1210$, $OR = 0.3824$, $95\% CI = 0.03542-2.42$) genotipovi su bili mnogo učestaliji u kontroli u poređenju sa RA ali ne statistički značajno.

Genotipovi *DRB1*01/DRB1*16*, *DRB1*07/DRB1*11*, *DRB1*13/DRB1*14*, *DRB1*14/DRB1*16*, *DRB1*01/DRB1*01*, *DRB1*03/DRB1*12*, *DRB1*03/DRB1*13*, *DRB1*04/DRB1*08*, *DRB1*07/DRB1*10*, *DRB1*08/DRB1*14*, *DRB1*10/DRB1*13*, *DRB1*11/DRB1*11*, *DRB1*12/DRB1*16* i *DRB1*14/DRB1*15* su bili prisutni u kontrolnoj grupi dok ih nije bilo kod RA pacijenata.

Homozigotni genotipovi *DRB1*04/DRB1*04*, *DRB1*03/DRB1*03* i *DRB1*16/DRB1*16* su bili prisutni kod RA pacijenata ali nisu detektovani u kontrolnoj grupi dok su homozigotni genotipovi *DRB1*01/DRB1*01* i *DRB1*11/DRB1*11* bili prisutni u kontrolnoj grupi ali nisu uočeni kod RA pacijenata.

Vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma (heterozigotnost, genetički diverzitet i informacija o udjelu polimorfizma, PIC) *HLA-DRB1* genskog lokusa u kontrolnoj grupi i grupi pacijenata sa RA su prikazane u Tabeli 28. Kontrolna grupa je bila u Hardy-Weinbergovom ekvilibrijumu ($P > 0.05$) dok u grupi RA pacijenata postoji odstupanje od HWE ($P = 0.0285$). *HLA-DRB1* genski lokus je veoma polimorfan, kao što se može vidjeti i u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata sa RA. To pokazuje visok stepen heterozigotnosti (kontrolna grupa: 0.9390; RA pacijenti: 0.8916), genetički diverzitet (kontrolna grupa: 0.8922; RA pacijenti: 0.8935) i PIC (kontrolna grupa: 0.8822; RA pacijenti: 0.8837). Broj različitih genotipova u analiziranom genskom lokusu je visok (kontrolni: 43 i RA pacijenti: 39) što također ukazuje na visok polimorfizam ovog lokusa.

Tabela 28. Prikaz vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma *HLA-DRB1* genskog lokusa u kontrolnoj grupi i u skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

Lokus HLA-DRB1*	Broj genotipova	HWE test	Heterozigotnost	Genski diverzitet	PIC
Kontrola (n = 82)	43	0.1171	0.9390	0.8922	0.8822
RA (n = 83)	39	0.0285	0.8916	0.8935	0.8837

NAPOMENA: Informacija o udjelu polimorfizma (PIC); Hardy-Weinbergov ekvilibrijum (HWE); Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Frekvencije alelnih grupa gena *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* u kontrolnoj grupi i u pacijenata sa RA je data u tabeli 29. Analizama učestalosti *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* gena je pokazano da su varijante *HLA-DRB3* genskog lokusa bile najučestalije i u kontrolnoj grupi (39.47%) i u RA pacijenata (45.28%).

Tabela 29. Frekvencije alelnih grupa *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* genskih lokusa u kontrolnoj grupi i skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)

Lokus	Kontrola		RA pacijenti		OR	95% CI	P
	n = 82	f	n = 83	f			
DRB3*	45	0.3947	48	0.4528	1.268	0.7169-2.247	0.1923
DRB4*	28	0.2456	32	0.3019	1.326	0.7019-2.518	0.1751
DRB5*	41	0.3596	26	0.2453	0.5801	0.3078-1.079	0.03307
Ukupno	114		106				

NAPOMENA: n – broj alelnih grupa; f – frekvencija alelne grupe
 Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Međutim, frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB5* gena je bila znatno povećana u kontrolnoj grupi kada se uporedi sa RA pacijentima (P = 0.03307, OR = 0.5801, 95% CI = 0.3078-1.079). Frekvencije alelnih grupa *HLA-DRB3* (P = 0.1923, OR = 1.268, 95% CI = 0.7169-2.247) i *HLA-DRB4* (P = 0.1751, OR = 1.326, 95% CI = 0.7019-2.518) genskih lokusa su bile veće među RA pacijentima nego u kontrolnoj grupi ali te razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 29).

U studiji su ispitani haplotipovi *HLA-DRB* gena (*HLA-DRB1* pojedinačno kao i *HLA-DRB1-DRB3/4/5* haplotipovi). Pojava *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5* korelira sa dvoznamenkastim alelima *HLA-DRB1* gena (Tabela 30). Kada su *HLA-DRB1* aleli *DRB1*01*, *DRB1*08*, ili *DRB1*10* bili prisutni nijedan od tri druga *HLA-DRB* gena nije nađen na istom kromosomu. Suprotno tome, *HLA-DRB3* je bio prisutan kad god je bilo koji od alela koji pripadaju grupi *DRB1*03*, *DRB1*11*, *DRB1*12*, *DRB1*13* ili *DRB1*14* bio prisutan. Također, *HLA-DRB4* je bio prisutan kada je bilo koji od alela grupe *DRB1*04*, *DRB1*07* ili *DRB1*09* bio prisutan i na kraju, varijante *HLA-DRB5* gena su bile prisutne kad god je bilo koji od alela grupe *DRB1*15* i *DRB1*16* bio prisutan (Tabela 30).

Tabela 30. Rezultati analize frekvencije *HLA-DRB1* haplotipova kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA) i asocijacija sa RA

DRB-alelni haplotip	Kontrola		RA pacijenti		(OR (95% CI))	P vrijednost
	N	%	N	%		
DRB1*01	24	15.29	19	12.5	0.7923 (0.3901-1.589)	0.4799
DRB1*03 - DRB3	10	6.37	20	13.16	2.222 (0.9517-5.51912)	0.0443
DRB1*04 - DRB4	12	7.64	24	15.79	2.26 (1.037-5.172)	0.0259
DRB1*07 - DRB4	17	10.83	11	7.24	0.6434 (0.2623-1.517)	0.2735
DRB1*08	4	2.55	6	3.95	1.57 (0.3638-7.72)	0.4877
DRB1*09 - DRB4	0	0	1	0.66	1.703 (0.01764-164.4)	0.6655
DRB1*10	4	2.55	3	1.97	0.7708 (0.111-4.64)	0.7350
DRB1*11 - DRB3	15	9.55	17	11.18	1.191 (0.5358-2.674)	0.6388
DRB1*12 - DRB3	2	1.27	2	1.32	1.033 (0.07402-14.42)	0.9741
DRB1*13 - DRB3	17	10.83	10	6.58	0.581 (0.2292-1.398)	0.1870
DRB1*14 - DRB3	8	5.1	7	4.60	0.8994 (0.2701-2.92)	0.8414
DRB1*15 - DRB5	25	15.92	18	11.84	0.71 (0.3472-1.427)	0.3026
DRB1*16 - DRB5	19	12.1	14	9.21	0.7376 (0.3279-1.622)	0.4114

NAPOMENA: N – broj haplotipova; % – frekvencija haplotipova
 Statistički značaj: P-vrijednost < 0.05 (boldirano)

Posmatrano je ukupno 10 haplotipova. Frekvencije *DRB1*03-DRB3* (P = 0.04426, OR = 2.222, 95% CI = 0.9517-5.51912) i *DRB1*04-DRB4* (P=0.02590, OR = 2.26, 95% CI = 1.037-5.172) haplotipova su bile znatno veće među među RA pacijentima nego u kontrolnoj grupi.

Do danas, nije pronađen biohemijski i imunološki marker specifičan za RA. Neki laboratorijski testovi služe samo za skrining aktivnosti i terapijskog efekta kod RA. Multibiomarker test aktivnosti bolesti (MBDA) mjeri serumske koncentracije 12 biomarker proteina, uključujući CRP, pravi skor koji predstavlja aktivnost bolesti RA na skali od 1-100 (Curtis *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016). Međutim, MBDA skor često ukazuje na povišenu aktivnost RA bolesti i kada je CRP normalan.

Laboratorijski testovi našeg ispitivanja potvrđuju da su vrijednosti WBC, RDW, RDW-SD, NE, MO, EO i BA bile statistički znatno povećane kod RA pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, ali ove vrijednosti su bile unutar normalnih vrijednosti. Vrijednosti ESR (95% CI = 15.295-22.545; $t = 10.307$; $P < 0.0001$) i CRP (95% CI = 4.09-9.97; $t = 4.723$; $P < 0.0001$) su bile statistički znatno povećane kod RA pacijenata u poređenju sa onim u kontrolnoj grupi i bile su uglavnom iznad gornje granice normale. Vrijednost RBC, HGB i HCT je bila unutar normalnih vrijednosti ali statistički znatno snižena kod pacijenata sa RA u odnosu na kontrolnu grupu.

U kontrolnoj grupi, nije bilo korelacije između ESR ili CRP sa jedne i analiziranih hematoloških parametara sa druge strane. Međutim, nađena je značajna pozitivna korelacija između ESR i RDW, RDW-SD, PLT ili NE ali i negativna povezanost između ESR vrijednosti i HGB kod pacijenata sa RA. Također je nađena pozitivna korelacija između CRP vrijednosti i WBC, RDW-SD, PLT ili NE vrijednosti kod pacijenata sa RA.

Jaka povezanost između ESR i CRP kod pacijenata sa RA je također utvrđena (95% CI = 0.2818-0.6269; $r = 0.4722$; $P < 0.0001$): sa povećanjem ESR vrijednosti, vrijednost CRP se također povećava. Relativni rizik povezan sa ESR je bio više nego duplo (2.69 puta) veći od onog koji se odnosio na CRP (95% CI = 15.295-22.545 vs 95% CI = 4.09-9.97). Determinacija C-reaktivnog proteina može zamjeniti determinaciju ESR. Rezultati ove studije ukazuju da su ESR i CRP bili najosjetljiviji od reaktanata akutne faze i njihove koncentracije su se povećale tokom upalnog procesa.

CRP je kod zdravih osoba u rasponu od 0 do 5 mg/l. Nakon početka akutne faze, koncentracija CRP u serumu raste veoma brzo. Brojna upalna stanja mogu uzrokovati povišene vrijednosti CRP-a uključujući i RA. Perzistentnost visoke serumske koncentracije CRP je obično težak prognostički znak koji generalno ukazuje na prisustvo nekontrolirane upale. Prema rezultatima nekih studija postoje korelacije između rapidne radiološke progresije i povišenih CRP/ESR vrijednosti (Hassel *et al.*, 1993; Van Leeuwen *et al.*, 1994; Plant *et al.*, 2000). Wells i suradnici su otkrili da su oba DAS28 (CRP) i DAS28 (ESR) mjerenja korisna za procjenu aktivnosti bolesti kod pacijenata sa RA (Wells *et al.*, 2009).

PLR i NLR su markeri hronične upale kod pacijenata sa RA. Rezultati istraživanja koje su proveli Peng i suradnici (Peng *et al.*, 2015) sugeriraju da je postojala korelacija između ESR i RA. Zatim, također su opazili korelaciju između PLR i RA. Razlike između RA pacijenata i zdravih kontrola u pogledu broja leukocita, procenta neutrofilnih granulocita, LY, PLT, CRP, ESR i RF su također opažene. Međutim, povezanost između NLR ili CRP i RA nije nađena u njihovom istraživanju. U ovoj studiji, nije utvrđena statistički značajna razlika između omjera neutrofila i limfocita (NLR) ili omjera trombocita i limfocita (PLR) i upale kod pacijenata sa RA. Međutim, postoji korelacija između ESR i CRP kod pacijenata sa RA.

RA bolest je kompleksna i uključuje faktore okruženja koji pokreću bolest kod genetički podložnih individua. Predloženi rizični faktori okruženja koji mogu povećati rizik od razvoja RA uključuju pušenje, izlaganje siliciju, infektivne agense, nedostatak vitamina D, gojaznost i promjene u mikrobioti (Smolen *et al.*, 2018). Sljedeći negenetički faktori rizika koji doprinose RA su ženski spol, zapadnjačka dijeta i etnički faktori. Genetički faktori rizika (60% rizika) su podložni geni i epigenetičke modifikacije.

Uloga genetičkih faktora u etiologiji RA je determinirana pronalaskom povezanosti bolesti sa MHC kompleksom klase II. Od 1974 nekoliko studijskih grupa je izvijestilo o povezanosti između HLA i RA. Razvoj tehnika za detekciju HLA alela je otkrio snažnu povezanost između HLA-DR4 i RA (Thomsen *et al.*, 1979). Zapravo, mnogi od rizika pripisani MHC su povezani sa varijacijom HLA-DRB1 alela i najjačom povezanošću sa *HLA-DRB1*04*.

U ovom istraživanju je utvrđeno da su *HLA-DRB1*04* ($P = 1.093-5.311$) i *HLA-DRB1*03* ($P = 0.04165$, $OR = 2.225$, $95\% CI = 0.9639-5.482$) bili najučestaliji aleli u *HLA-DRB1* lokusu RA pacijenata i stoga predstavljaju faktor rizika za razvoj ove bolesti. Kod RA, HLA nosi omjer koeficijenta (OR) od ~ 2.8 (iako neki aleli nose veći rizik), dok većina ne-HLA lokusa ima OR u rasponu od 1.1 - 1.4. Uloga alelnih grupa *HLA-DRB1*08*, *DRB1*09*, *DRB1*10*, *DRB1*11*, *DRB1*12* i *DRB1*14* u razvoju RA nije potpuno definirana u ovoj studiji ali prisustvo *HLA-DRB1*08*, *DRB1*09*, *DRB1*11* i *DRB1*12* alelnih grupa povećava omjer izgleda.

Nadalje, *DRB1*04/DRB1*04* ($P = 0.03669$, $OR = 6.361$, $95\% CI = 0.49-410$) i *DRB1*03/DRB1*04* ($P = 0.0501$, $OR = 5.149$, $95\% CI = 0.5582-248.6$) genotipovi su bili viši među RA pacijentima nego u kontrolnoj grupi i predstavljaju rizične genotipove za pojavu RA. Obje alelne grupe (*DRB1*03* i *DRB1*04*) u ovim genotipovima mogu povećati rizik od razvoja RA.

Postoje podaci koji ukazuju da homozigotni genotipovi za alelnu grupu koja nosi rizik od razvoja RA, naročito za alelnu grupu *HLA-DRB1*04*, imaju teške kliničke efekte. Četiri pacijenta su ispoljila *HLA-DRB1*04* varijante na oba alela i 18 kombiniranih *HLA-DRB1*04* varijantu sa *HLA-DRB1*03*, *HLA-DRB1*15*, *HLA-DRB1*16*, *HLA-DRB1*11*, *HLA-DRB1*01*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*13* ili *HLA-DRB1*12* varijante. Homozigotnost za *HLA-DRB1*04:01* alel je bila karakterističan nalaz za RA pacijente sa velikom zahvaćenošću organa (Weyand *et al.*, 1992).

*HLA-DRB1*15* alelna grupa (12.65%) je uobičajena kod RA pacijenata ali također najučestalija alelna grupa među ljudima u kontrolnoj grupi (15.24%). Zbog evolucijskog pritiska, uobičajene varijante obično imaju relativno mali funkcionalni utjecaj, stoga ove varijante imaju odgovarajuće mali učinak na rizik bolesti.

Frekvencija genotipa *DRB1*03/DRB1*03* je bila povećana ali ne značajno, kod RA pacijenata kada se upoređi sa kontrolnom grupom. Slično, genotipovi *DRB1*01/DRB1*14* i *DRB1*11/DRB1*15* su bili viši među RA pacijentima nego u kontrolnoj grupi dok *DRB1*04/DRB1*15* i *DRB1*04/DRB1*16* genotipovi su prisutni kod RA pacijenata dok nisu prisutni u kontrolnoj grupi. Genotipovi koji nose rizik od razvoja RA u svojem sastavu generalno imaju barem jednu alelnu grupu koja nosi rizik od bolesti ali ovo ne mora uvijek biti slučaj.

Pored *DRB1*03/DRB1*04* genotipa, genotip *DRB1*01/DRB1*07* (6,02%) je najučestaliji genotip među RA pacijentima ali ovaj genotip je također uobičajen kod ispitanika kontrolne grupe (4,88%). Homozigotni genotipovi *DRB1*04/DRB1*04*, *DRB1*03/DRB1*03*, i *DRB1*16/DRB1*16* su bili prisutni kod pacijenata sa RA ali nisu uočeni u kontrolnoj grupi. Genotip *DRB1*15/DRB1*15* je bio uočen ili u RA grupi ili u kontrolnoj grupi ispitanika.

S druge strane, najučestaliji aleli u kontrolnoj grupi su *DRB1*15*, *DRB1*01*, *DRB1*16*, *DRB1*07* i *DRB1*13*. Analizom frekvencija ovih alelnih grupa je nađeno da imaju odbrambenu ulogu u nastanku RA, međutim, razlike uočene između kontrolne grupe i pacijenata koji boluju od ove bolesti nisu bile statistički značajne. Međutim *DRB1*01/DRB1*15* ($P = 0.007366$, $OR = 0.143,95\%$, $CI = 0,003077-1.185$) i *DRB1*07/DRB1*16* ($P = 0.04712$, $OR = 0.1894,95\%$, $CI = 0,003924-1.747$) genotipovi se mogu smatrati zaštitnim faktorima za RA jer sprječavaju razvoj bolesti. Ovi genotipovi nisu bili uočeni kod pacijenata sa RA ili je njihov broj bio smanjen. Oba alela u ovim genotipovima mogu imati odbrambenu (zaštitnu) ulogu.

Stoga, genotipovi *DRB1*01/DRB1*04*, *DRB1*11/DRB1*16* i *DRB1*13/DRB1*15* vjerojatno imaju odbrambenu ulogu u razvoju RA ali ovo nije statistički značajno. Rizične i protektivne varijante gena mogu biti prisutne zajedno u istom genotipu. Protektivni genotipovi imaju barem jednu alelnu grupu sa zaštitnim efektom. Homozigotni genotipovi *DRB1*01/DRB1*01* i *DRB1*11/DRB1*11* su bili prisutni u kontrolnoj grupi ali nisu otkriveni kod RA pacijenata.

Mali broj homozigotnih individua je uočen u grupi pacijenata sa RA (10.84% homozigota) ali više nego u zdravoj kontroli (6.1% homozigota). Niži broj različitih genotipova (39 različitih genotipova) i povišen broj homozigota kod RA pacijenata u odnosu na kontrolu (43 različita genotipa) može ukazati na prisutnost određenih alelnih grupa i genotipova karakterističnih za RA. Rezultati analiziranih parametara polimorfizma kao što su heterozigotizam, raznolikost gena i informacije o udjelu polimorfizma dobivene ovom studijom, potvrđuju da je *HLA-DRB1* genski lokus veoma polimorfan u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata sa RA. Kontrolna grupa je bila u Hardy-Weinbergovom ekvilibriju dok u grupi RA pacijenata postoji odstupanje od HWE ($P = 0.0285$).

Visoki stepen polimorfizma u lokusima klase dva je unikatna karakteristika MHC-a. Većina beta-lanaca polimorfizma je smještena u hipervarijabilnim regijama (HVRs). Lundberg i McDevitt (Lundberg et McDevitt, 1992) su postulirali da je HVR genetička jedinica rekombinacije, sa selekcijom za HVR sekvence i kombinacije HVR-ova ograničenih funkcionalnim razmatranjima.

Analize intronskih sekvenci, kako god, pružile su podršku novijeg porijekla i rapidnoj generaciji alela u *HLA-DRB1* lokusu. Jednom iznimkom, genetički mehanizmi (genska konverzija i tačkaste mutacije) imaju raznolike egzon 2 sekvence koje se ne šire u susjedne intronske sekvence. Dio egzona 2 koji kodira beta-ploču evolviru u suradnji sa okolnim intronima, dok α -heliks izgleda kao da je bio podvrgnut genskim događajima poput konverzije, upućuje da su takvi razmjenjujući događaji visoko lokalizirani i dešavaju se preko ekstremno kratkih sekvencijskih traka.

Von Salome i saradnici su našli da je diverzitet na sinonimnim mjestima bio sličan intronskom diverzitetu. Sa izuzetkom exona 2 i intronski i egzonski diverzitet upućuju na nedavno porijeklo više od 400 *HLA-DRB1* alela od divergencije *DRB1*03* što je uobičajena genska varijanta ljudi i majmuna. Čini se da antigen vezujuća mjesta imaju još starije porijeklo. Von Salome i suradnici 2007. godine su zaključili da je *HLA-DRB1* prošao relativno rapidno generiranje novih alela kroz događaje poput genske konverzije.

Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB5* genskog lokusa je bila značajno povećana u kontrolnoj grupi ($P = 0.03307$, $OR = 0.5801$, 95% $CI = 0.3078-1.079$) i ima odbrambenu ulogu kod RA u ovoj studiji. Ovo je dosljedno sa činjenicom da *HLA-DRB5* gen korelira sa *HLA-DRB1*15* ili *HLA-DRB1*16* alelom *HLA-DRB1* gena i ovi aleli imaju odbrambenu ulogu kod RA. Frekvencije alela *HLA-DRB3* i *HLA-DRB4* gena su bile povišene među RA pacijentima u odnosu na kontrolnu grupu i vjerojatno predstavljaju faktore rizika za RA. Štoviše, frekvencije *DRB1*03-DRB3* ($P = 0.04426$, $OR = 2.222$, 95% $CI = 0.9517 - 5.51912$) i *DRB1*04 - DRB4* ($P = 0.02590$, $OR = 0.2.26$, 95% $CI = 1.037-5.172$) haplotipova su bile značajno veće među RA pacijentima nego kod onih u kontrolnoj grupi.

HLA-DRB1 je najbitniji genski lokus za RA podložnost, specifični podset *HLA-DRB1* genskih varijanti (glavnih alela) na *DRB1*01*, *DRB1*04* i *DRB1*10* grupa. Teži oblik RA je povezan sa specifičnim HLA-DRB1 alelima koji kodiraju očuvanu sekvencu motiva sa 5 aminokiselina (QRRAA/RRRAA/QKRAA) na 70-74 u trećem hipervarijabilnom regionu (HVR3) DRβ1 lanca koje su nazvane zajedničkim epitopom (SE) (Gregerrsen *et al.*, 1987; Nepom *et al.*, 1989; Holoshitz, 2010; Kim *et al.*, 2016; Arango *et al.*, 2017). Ove rezidue sačinjavaju spiralnu domenu kreirajući jednu stranu antigen vezujućeg mjesta koja potencijalno utječe na prezentiranje antigena. Prosječna razlika aminokiselinskih sekvenci između *HLA-DRB5* i *HLA-DRB1*, *HLA-DRB2* i *HLA-DRB4* iznosi 13,5%.

Povezanost *HLA-DRB1* sa RA može odraziti važnu ulogu u strukturnim varijacijama u *HLA-DRBβ1* epitop vezujućem mjestu u prepoznavanju antigena kod RA. Alternativno, patogeni efekti *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* ili *HLA-DRB5* mogu biti veoma mali, možda zbog njihove relativno niske ispoljenosti ili slabe funkcije (na primjer, nizak afinitet za HLA-DRα), što može rezultirati u slaboj reprezentativnosti alela rizičnih za bolest kod pacijenata sa RA i stoga malu statističku moć za detekciju povezanosti bolesti takvih *HLA-DRB* gena. *HLA-DRB3* i *HLA-DRB4* su zapravo ispoljeni mnogo nižim stepenom nego *HLA-DRB1* iako je *HLA-DRB5* visoko ispoljen.

HLA-DR je prisutan na površini antigen-prezentujućih ćelija kao heterodimera sastavljenih od α lanca (HLA-DRα) i beta lanca (HLA-DRβ). HLA-DRα je kodiran sa *HLA-DRA* i *HLA-DRβ* koje kodiraju *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4* ili *HLA-DRB5*. HLA-DRβ ima varijabilno kodirajuće varijacije naročito u peptid-vezujućem žlijebu u suprotnosti sa proteinima beta lanca (Reche *et al.*, 2003).

Zajednički epitop je pozitivno nabijen i doprinosi jednom od džepova za peptidno učvršćivanje ovih MHC molekula II klase poznatih kao P4. MHC molekule II klase sa negativno nabijenim P4 džepom (kao što je *DRB1*04:02*) mogu pružiti zaštitu od bolesti (Reviron *et al.*, 2001) što sugerira da interakcije aminokiselinskih bočnih lanaca iz antigenskih peptida sa ovim MHC učvršćujućim džepom mogu biti kritične u pokretanju autoimunog odgovora.

SE-kodirani aleli uključuju članove *HLA-DRB1*04* alelne grupe (**04:01*, **04:04*, **04:05*, **04:08*, **04:10*), *HLA-DRB1*01:01* ili **01:02*, *HLA-DRB1*14:02* i *HLA-DRB1*10:01*. Sve individue klasificirane za ove alele se smatralo da imaju SE (SE+) što može biti prisutno u jednoj ili duploj dozi. Rizične povezanosti za RA između *HLA-DRB1* alela su bile izvedene na osnovu genotipskih kombinacija utvrđenih u odsustvu SE i u prisutnosti jedne ili duple doze SE. *HLA-DRB1* aleli su također bili povezani sa serološkim karakteristikama RA pacijenata.

Još jedan problem po pitanju povezanosti *HLA-DRB1* alela sa bolestima je genotipski efekat, uključujući efekt genskog doziranja svakog alela i kombinovani efekat dva različita alela. Kod europskih RA pacijenata, složeni heterozigoti SE alela (*DRB1*04:01/*04:04*) su značajno povezani sa teškom bolesti u poređenju sa homozigotima (Wordsworth *et al.*, 1992; MacGregor *et al.*, 1995). U Aziji, studija na Koreancima je pokazala da je *DRB1*04:05/*09:01* heterozigot donio veći rizik za RA nego homozigot *DRB1*04:05* (Lee *et al.*, 2004). HLA-SE aleli povećavaju rizik od razvoja RA u svakoj populaciji ali neki ne-SE aleli su bili također identificirani kao predisponirajući (*HLA-DRB1*09:01*) (Kampstra *et al.*, 2017).

U različitim etničkim grupama predominantni RA povezani *HLA-DRB1* aleli se značajno razlikuju: *HLA-DRB1*04:01*, **04:04* i **04:08* su predominantni RA povezani aleli kod bijelaca, (Stahl *et al.*, 2010) **04:05* kod Japanaca (Terao *et al.*, 2015), **01:01* i **01:02* kod Izraelskih židova (de Vries *et al.*, 1993) i **01:01*, **04:01*, **04:04* i **04:05* kod Latinskih Amerikanaca (Cruz *et al.*, 2012; Delgado-Vega et Anaya, 2007). Japanski RA pacijenti su bili pozitivno povezani sa *DRB1*01:01* i **04:05* i negativno povezani sa *DRB*07:01*, **08:02*, **13:02* i **14:05* (Wakitani *et al.*, 1997). Zajednički epitopi (SE) alela i *HLA-DRB1*09:01* su bili značajno povezani sa RA podložnošću kod Japanske populacije (Shimane *et al.*, 2013).

Istraživači su prethodno zabilježili da je *HLA-DRB1*09:01* povezan sa rizikom od seropozitivnog RA kod Azijaca (Lee *et al.*, 2016; Kochi *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2010). U poređenju sa heterozigotom, homozigot SE/SE je pokazao značajno povećanje rizika (Shimane *et al.*, 2013), koji potvrđuje efekt genskog doziranja SE alela kao što je prethodno bilo opisano (Wordsworth *et al.*, 1992) ali homozigot *DRB1*09:01* ukazuje na umjereno povećan rizik za RA u poređenju sa heterozigotom (Shimane *et al.*, 2013).

Pronađeno je da alelna grupa *HLA-DRB1*04* dominira kod RA populacije Sjeverne Europe (Van Jaarsveld *et al.*, 1998; Tuokko *et al.*, 2001), Engleska, Nizozemska (Van Jaarsveld *et al.*, 1998; Mađarska (Varga *et al.*, 2003), Slovačka (Stark *et al.*, 2009). Alelne grupe *HLA-DRB1*04* i **01* su jednako reprezentativne u Francuskoj i Španjolskoj populaciji (Balsa *et al.*, 2000) dok su *HLA-DRB1*01* i **10* dominirale u Mediteranskim populacijama (Balsa *et al.*, 2000; Kinikli *et al.*, 2003; Fathi *et al.*, 2008;). U Maleziji (Malezijci, Kinezi, Indijci), alelne grupe *HLA-DRB1*04*, **09* i **10* su bile znatno više zastupljene kod pacijenata sa RA nego kod kontrolnih ispitanika (Kong *et al.*, 2002). Povezanost sa *DRB1*09* je bila opisana kod Čileanskih RA pacijenata, Japanskih i Engleskih bijelaca. U populaciji Sjeverno Američkih domorodaca, RA je povezan sa alelnom grupom *HLA-DRB1*14*.

Suprotno tome, postoje drugi aleli koji su negativno povezani sa RA i stoga imaju odbrambenu ulogu. Sve individue klasificirane za *HLADRBI*01:03*, **04:02*, **08:02*, **11:02*, **11:03*, **13:01*, **13:02* i **13:04* alele smatralo se da imaju DERAA sekvencu (odbrambenu), koja može biti prisutna u jednoj ili duploj dozi. Alelna grupa *HLA-DRB1*13* je pronađena kao značajno smanjena kod RA pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom u mnogim studijama (Tuokko *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2009; Balsa *et al.*, 2000; Kinikkli *et al.*, 2003) ali u kontrolnoj grupi Meksičkih Amerikanaca, alelna grupa *HLA-DRB1*08* je statistički značajno više učestala i smatra se zaštitnom alelnom grupom. *HLA-DRB1*07* i **13* su pokazali zaštitne efekte u Slovačkoj populaciji (Stark *et al.*, 2009).

Zaštita protiv ACPA-pozitivnog RA je predominantno povezana sa *HLA-DRB1*13:01* (van der Woude *et al.*, 2010). Protektivni HLA aleli su bili kategorizirani prema prisustvu sekvence 'DERAA' na pozicijama 70-74 beta lanca, prisustvu aspartanske kiseline na poziciji 70 ili prisustvu izoleucina na poziciji 67. Prema jednoj hipotezi, ove varijante gena mogu posredovati uklanjanju autoreaktivnih T limfocita.

Prema Kampstri i Toes-u (Kampastra *et al.*, 2017) prisustvo HLA-SE alela: *HLA-DRB1*1:01* i **01:02*, *HLA-DRB1*04:01*, **04:04*, **04:05* i **04:08*, *HLA-DRB1*10:01* i *HLA-DRB1*14:02* je povezanosa ACPA'RA bolestima dok drugialeli imaju predispoziciju (*HLA-DRB1*9:01*) ili donose zaštitu protiv ove bolesti (*HLA-DRB1*01:03*, *HLA-DRB1*07*, *HLA-DRB1*13:01* i **13:02*).

Predloženi naslov teze do sada nije istražen u Bosni i Hercegovini. Rezultati istraživanja genskih varijanti *HLA-DRB1* lokusa kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa, a koje su opisane kao predisponirajuće variraju među različitim etničkim skupinama. Na području Engleske dominira alelna grupa *HLA-DRB1*04* dok u populaciji Španije su podjednako zastupljene alelne grupe *HLA-DRB1*04* (51,1%) i *HLA-DRB1*01* (44,7 %) (Balsa *et al.*, 2000). Studija iz Holandije pokazala je takođe učestalost alelne grupe *HLA-DRB1*04* u skupini RA pacijenata (van Jaarsveld *et al.*, 1988).

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). Analiziran je genski lokus *HLA-DRB1* na području Francuske i utvrđeno je da su zastupljene i alelna grupa *HLA-DRB1*04* i *HLA-DRB1*01* kod skupine pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa. 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). Prema kriterijima *American Rheumatism Association* (danas *American College of Rheumatology*), nakon što je uspostavljena dijagnoza reumatoidni artritis, dodatne pretrage ukazuju na komplikacije ili neočekivane promjene. Analiza kompletne krvne slike (KKS) i diferencijalne krvne slike (DKS) ukazuje da je kod većine osoba prisutna blaga anemija, u 1 – 2% slučajeva nađena je neutropenija. Reaktanti akutne faze, ubrzana sedimentacija i visoke vrijednosti C reaktivnog proteina, upućuju na odražavanje aktivnosti procesa kod oboljelih od reumatoidnog artritisa.

5. ZAKLJUČAK

Dijagnostički indikatori i biomarkeri težine bolesti kod pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) su visoka koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP) i povišene vrijednosti brzine sedimentacije eritrocita (ESR). CRP je protein koji jetra stvara u odgovoru na upalu. Povišene vrijednosti ESR-a su također indikator infektivnih ili upalnih stanja. U ovoj studiji su vrijednosti ESR-a ($P < 0.0001$) i CRP-a ($P < 0,0001$) bile statistički značajno povišene kod pacijenata koji boluju od RA u poređenju sa kontrolnom grupom i bile su znatno iznad gornje normalne granice. Također je utvrđena povezanost između ESR-a i CRP-a kod pacijenata sa RA ($P < 0,0001$): sa povećanjem ESR vrijednosti i vrijednost CRP-a se također povećava.

Među parametrima, CRP je najpouzdaniji, najobjektivniji test i koristan prognostički pokazatelj za progresiju bolesti. Više faktora, uključujući grupu *HLA-DRB1* genskih varijanti, utiču na RA podložnost. Svih 13 alelnih grupa *HLA-DRB1* genskog lokusa (*HLA-DRB1*01*, *DRB1*03*, *DRB1*04*, *DRB1*07*, *DRB1*08*, *DRB1*09*, *DRB1*10*, *DRB1*11*, *DRB1*12*, *DRB1*13*, *DRB1*14*, *DRB1*15* i *DRB1*16*) je bilo prisutno među ispitanicima kontrolne grupe i pacijenata sa RA (Javna ustanova Dom zdravlja Kantona Sarajevo, Bosna i Hercegovina).

Prisutnost određenih varijanti *HLA-DRB1* gena povećava rizik kod razvoja RA u svakoj populaciji iako postoje nedosljednosti u stepenu doprinosa svakog alela kada poredimo populacije ali neki aleli su bili identificirani kao predisponirajući (*HLA-DRB1*09:01*).

U ovoj studiji je 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) *HLA-DRB1* genskog lokusa bile su značajno povećana među pacijentima sa dijagnozom RA u poređenju sa zdravim kontrolama i stoga predstavljaju 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* ($P = 0.0501$, OR = 5.149,95% CI = 0.5582-248.6) su bile značajno povišene kod RA pacijenta u odnosu na kontrolnu grupu i stoga predstavljaju rizične genotipove za nastanak RA. Homozigotni genotip

*DRB1*04/DRB1*04* nije uočen u kontrolnoj grupi kao ni genotipovi *DRB1*03/DRB1*03* i *DRB1*16/DRB1*16*.

Osim toga, uočena je i jaka genetska asocijacija između *DRB1*04-DRB4* ($P = 0.02590$) odnosno *DRB1*03-DRB3* ($P = 0.04426$) haplotipa i rizika od razvoja reumatoidnog artritisa kod pacijenata.

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 može se smatrati zaštitnim faktorom za RA, to jeste prevencijom razvoja bolesti. Ovi genotipovi nisu bili uočeni (*DRB1*01/DRB1*15*) kod pacijenata sa RA ili je njihova frekvencija bila značajno smanjena (*DRB1*07/DRB1*16*). Homozigotni genotipovi *DRB1*01/DRB1*01* i *DRB1*11/DRB1*11* nisu detektovani kod RA pacijenata. Zaštitne HLA molekule imaju, umjesto SE-motiva, različitu ali zajedničku sekvencu na istoj lokaciji u beta lancu HLA-DR molekula, sastavljenu od amino kiselinskih rezidua DERAA.

Kontrolna grupa je bila u Hardy-Weinberg ekvilibrijumu dok je grupa RA pacijenata odstupala od HWE ($P = 0.0285$). Rezultati heterozigotnosti, genskog diverziteta i informacija o udjelu polimorfizma (PIC) dobiveni ovom studijom ukazuju da je *HLA-DRB1* genski lokus visoko polimorfan i u kontrolnoj grupi i kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom.

Frekvencija alelnih grupa *HLA-DRB5* gena je bila značajno povišena u kontrolnoj grupi u poređenju sa RA pacijentima ($P = 0.03307$). Prema rezultatima ove studije, aleli *HLA-DRB5* gena predstavljaju zaštitni faktor za RA.

Frekvencije alelnih grupa *HLA-DRB3* i *HLA-DRB4* genskog lokusa su bile povišene među RA pacijentima u odnosu na kontrolnu grupu ali ove razlike nisu bile statistički značajne.

Prisutnost nekih *HLA-DRB1* alela povećava rizik od razvoja RA dok drugi aleli pružaju zaštitu protiv bolesti. HLA tipizacija je odlična pomoć u utvrđivanju i potvrđivanju definitivnih dijagnoza kod autoimunih bolesti. Ovi biomarkeri, uključujući ESR i CRP, bi se mogli koristiti za procjenu aktivnosti bolesti i primjenu ranog agresivnog tretmana reumatoidnog artritisa.

6. LITERATURA

- Abbas A.K., Lichtman A.H. (2006-2007): *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*; Updated Edition; Elsevier Inc. NY, USA, 11:161-177.
- Abbas A.K., Lichtman A.H. (2006): *Osnovna imunologija. Funkcionisanje i poremećji imunskog sistema*. Drugo, obnovljeno izdanje. Data status, Beograd.
- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2015): *Cellular and Molecular Immunology*. Eighth Edition, Updated Edition. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. (2018): *Stanična i molekularna imunologija*. Medicinska knjiga Zagreb.
- Aletaha D., Neogi T., Silman A.J., Funovits J., Felson D.T., Bingham C.O. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 62:2569–81.
- 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.
- Andreis I. *et al.* *Imunologija*. 7. izd. 2010: Medicinska naklada Zagreb.
- Arango M.T., Perricone C., Kivity S., Cipriano E., Ceccarelli F., Valesini G., *et al.* HLA-DRB1 the notorious gene in the mosaic of autoimmunity. *Immunol Res* 2017; 65 (1):82–98.
- 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.
- Beckman, 2009 UniceL® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System instruction for USE, Beckman Coulter inc 2009.
- Bolon, B. Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Disease. *Toxicologic Pathology* 2012; 40(2):216–229.
- Caillat-Zucman S., Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2008; 73:1-8.
- Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2012; 51:v3–v11.
- Coenen M.J.H., Gregersen P.K. Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic

- landscape. *Genes Immun* 2009; 10:101–111.
- Cruz-Tapias P., Rojas-Villarraga A., Maier.Moore S., Anaya J.M. HLA and Sjögren's syndrome susceptibility .A meta-analysis of worldwide studies. *Autoimmun Rev* 2012; 11(4):281–7.
- Curtis J.R., van der Helm-van Mil A.H., Knevel R., Huizinga T.W., Haney D.J., Shen Y, *et al.* Validation of a novel multibiomarker test to assess rheumatoid arthritis disease activity. *Arthritis Care Res* 2012; 64:1794–803.
- Čulić V., Pavelić J., Radman M. (ured.) (2016): *Genetičko informiranje u praksi.* Medicinska naklada, Zagreb.
- Dai S., Crawford F., Marrack P., Kappler J. W. The structure of HLA-DR52c: comparison to other HLA-DRB3 alleles. *Proc Nat Acad Sci* 2008; 105:11893–11897.
- De Vries N., Renningen K.S., Tilanus M.G.J., Bouwens-Rambouts A., Segal R., Egeland T., *et al.* HLA- DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: Sequencing reveals that DRB1*0102 is the predominant HLA- DR1 subtype. *Tissue Antigens* 1993; 41(1):26–30.
- Delgado-Vega A.M., Anaya J.M. Meta-analysis of HLA-DRB1 polymorphism in Latin American patients with rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007; 6(6):402–8.
- 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.
- Emery P. 1997 *Rheumatology highlights.* Helath Press, Oxford.
- Eda S., Kaufmann J., Roos W., Pohl S. Development of a New Microparticle-Enhanced Turbidimetric Assay for C-Reactive Protein With Superior Features in Analytical Sensitivity and Dynamic Range. *Journal of Clinical laboratory Analysis*, 1998; 12:137-144.
- Eda S., Kaufmann J., Molwitz M., Vorberg E. A new method of measuring C-reactive protein, with a low limit of detection, suitable for risk assessment of coronary heart disease. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory*, 1999; 59(sup230):32-35.
- Fathi N.A., Ezz-Eldin A.M., Mosad E., Bakry R.M., Hamed H.B., Ahmed S., *et al.* 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.
- Feero, W.G., Gutmacher, A.E., Cho, J.H., and Gregersen P. K. Genomics and the Multifactorial Nature of Human Autoimmune Disease. *New England Journal of Medicine* 2011; 365(17):1612–1623.
- Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423:356–361.
- Furukawa H., Oka S., Shimada K., Hashimoto A. and Tohma S. Human leukocyte antigen polymorphisms and personalized medicine for rheumatoid arthritis. *Journal of Human Genetics* 2015; 1–6.
- Gabriel S.E., Crowson C.S., O'Fallon W.M. Costs of osteoarthritis: estimates from a geographically defined population. *Journal of Rheumatology* 1995; 22(43):23–25.
- Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205–13.
- Harris E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implication for therapy. *N. Eng. J. Med.* 1990; 322:1277-89.
- Hassell A.B., Davis M.J., Fowler P.D., Clarke S., Fisher J., Shadforth M.E., *et al.* The relationship between serial measures of disease activity and outcome in rheumatoid arthritis. *Q Journal of Medicine* 1993; 86:601–7.
- Holoshitz J. The Rheumatoid Arthritis HLA-DRB1 Shared Epitope. *Curr Opin Rheumatol.* 2010; 22(3):293–298.
- Jajić I. (1995): *Reumatologija*. Medicinska knjiga, Zagreb.
- Jajić I. (1982): *Klinička reumatologija*. 2. izd. Školska knjiga, Zagreb.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M., *Immunobiology: The immune system in health and disease*; Garland Science Publishing, (2005), 13:557-596.
- Jones M.A., Silman A.J., Whiting S., Barrett E.M., Symmons D.P.M. Occurrence of rheumatoid arthritis is not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 1996; 55:89–93.
- Kampstra A.S.B., Toes R.E.M. HLA class II and rheumatoid arthritis: the bumpy road of revelation. *Immunogenetics* 2017; 69(8):597–603.
- Kasper D., Fauci A., Hauser S., Longo D., Jameson J., Loscalzo J. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 19 edition. New York ; McGraw-Hill 2015; 2136-49.
- Kim K., Bang S.Y., Yoo D.H., Cho S.K., Choi C.B., Sung Y.K., *et al.* Imputing Variants in HLA-DR Beta Genes Reveals That HLA-DRB1 Is Solely Associated with

- Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *PLoS One* 2016; 11(2):e0150283.
- Kim K.W., Kim B.M., Moon H.W., Lee S.H., Kim H.R. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; 17:41.
- Kinikli G., Ateş A., Turgay M., Akay G., Kinikli S., Tokgöz G. HLA- DRB1 genes and disease severity in rheumatoid arthritis in Turkey. *Scand J Rheumatol* 2003; 32(5):277–280.
- Koch, A. E. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *American Journal of Orthopedics* 2007; 36(7):5–8.
- Kochi Y., Yamada R., Kobayashi K., Takahashi A., Suzuki A., Sekine A., *et al.* Analysis of single-nucleotide polymorphisms in Japanese rheumatoid arthritis patients shows additional susceptibility markers besides the classic shared epitope susceptibility sequences. *Arthritis Rheum* 2004; 50(1):63–71.
- Kong K.F., Yeap S.S., Chow S.K., and Phipps M.E. HLA-DRB1 Genes and Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Three Ethnic Groups from Malaysia. *Autoimmunity* 2002; 35(4):235-239.
- Kulski J.K., Inoko H. Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes. In: *Encyclopedia Of Life Sciences* 2005, John Wiley & Sons, Ltd. USA. 1-8.
- Kurkó J., Besenyei Z.T., Laki J., Glant T.T., Mikecz K., Szekanecz Z. Genetics of Rheumatoid Arthritis - A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013; 45(2): 170-9.
- Lee H.S., Lee K.W., Song G.G., Kim H.A., Kim S.Y., Bae SC. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum* 2004; 50(11):3468–75.
- Lee Y.C., Hackett J., Frits M., Iannaccone C.K., Shadick N.A., Weinblatt M.E., *et al.* Multibiomarker disease activity score and C-reactive protein in a cross-sectional observational study of patients with rheumatoid arthritis with and without concomitant fibromyalgia. *Rheumatology* 2016; 55:640–648.
- Lettre, G., Rioux J.D. Autoimmune diseases: Insights from genomewide association studies. *Human Molecular Genetics* 2008; 17(R2):116–121.
- Lundberg A.S., McDevitt H.O. Evolution of major histocompatibility complex class II allelic diversity: direct descent in mice and humans. *PNAS* 1992; 89(14):6545–6549.
- MacGregor A., Ollier W., Thomson W., Jawaheer D., Silman A. HLA-DRB1*0401/0404 genotype and rheumatoid arthritis: increased association in men, young age at onset,

- and disease severity. *J Rheumatol* 1995; 22:1032–6.
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16(3):1215.
- Nepom G.T., Byers P., Seyfried C., Healey L.A., Wilske K, Stage D. *et al.* HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989; 32:15–21.
- Okada Y., Suzuki A., Yamada R., Kochi Y., Shimane K., Myouzen K., *et al.* HLA-DRB1*0901 lowers anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1569–1570.
- Ozaki Y., Suzuki S., Shigenari A., Okudaira Y., Kikkawa E., Oka A., *et al.* HLA-DRB1, -DRB3, -DRB4 and -DRB5 genotyping at a super-high resolution level by long range PCR and high-throughput sequencing. *Tissue Antigens* 2014; 83:10–16.
- Peng D., Wang J., Zhang R, Tang S., Jiang F., Chen M., *et al.* C-reactive protein genetic variant is associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *BMC Endocr Disord* 2015; 15:8.
- Pincus T. Rheumatoid arthritis; a medical emergency? *Scand.J. Rheumatol.*1994; 23 (Suppl.1); 21-30.
- Plant M.J., Williams A.L., O’sullivan M.M., Lewis P.A., Coles E.D., Jessop J.D. Relationship between time-integrated C-reactive protein levels and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43(7):1473–1477.
- Popović M., Stefanović D., Mitrović D. i saradnici. (2000): Reumatske i srodne bolesti, dijagnoza i terapija “INFOO home” d.o.o., Beograd.
- Price C.P., Trull A.K., Berry D., Gorman E.G. Development and validation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay for C-reactive protein. *Journal of Immunological Methods*, 1987; 99(2):205-211.
- Raptopoulou A., Sidiropoulos P., Katsouraki M., i Boumpas D. T. Anti-citrulline antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis: evolving concepts. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2007; 44(4):339–363.
- Raza K., Holers V.M., Gerlag D. Nomenclature for the Phases of the Development of Rheumatoid Arthritis. *Clinical Therapeutics* 2019; 41(7):1279-1285.
- Reche P.A., Reinherz E.L. Sequence variability analysis of human class I and class II

- MHC molecules: functional and structural correlates of amino acid polymorphisms. *Journal of Molecular Biology* 2003; 331:623–641.
- Reviron D., Perdriger A., Toussiroit E., Wendling D., Balandraud N., Guis S., *et al.* Influence of shared epitope-negative HLA-DRB1 alleles on genetic susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44:535.
- Ruiz T.M., Pascual E., Bolumar F., Hernandez I. Reliability of the diagnosis of rheumatic conditions at primary health care level. *Rheumatology in Europe* 1995; Supp. 2:104-5.
- Sawcer S., Franklin, R.J.M., i Ban, M. Multiple sclerosis genetics Sup. *Lancet Neurology* 2014; 13(7):700–709.
- Scott D.L., Wolfe .F, Huizinga T.W.J. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376(9746):1094-108
- Sertić J. i sur. (2015): Klinička kemija i molekularna dijagnostika u kliničkoj praksi. Drugo, dopunjeno i obnovljeno izdanje. Medicinska naklada, Zagreb.
- Shimane K., Kochi Y., Suzuki A., Okada Y., Ishii T., Horita T., *et al.* An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of *09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology* 2013; 52:1172–1182.
- Silman A.J., MacGregor A.J., Thomson W., Holligan S., Carthy D., Farhan A., *et al.* Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *British journal of rheumatology* 1993; 32:903–907.
- Smolen J.S., Aletaha D., Barton A., Burmester G.R., Emery P., Firestein G.S., *et al.* Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis primer* 2018; 4:18001.
- Stahl E.A., Raychaudhuri S., Remmers E.F., Xie G., Eyre S., Thomson B.P., *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 2010; 42(6):508–14.
- Stark K., Rovensky J., Blažičkova S., Grosse-Wilde H., Ferencik S., Hengstenberg C., *et al.* 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 1-10.
- Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *The New England Journal of Medicine* 1978; 298(16):869–871.
- Terao C., Yano K., Ikari K., Furu M., Yamakawa N., Yoshida S., *et al.* Brief Report: Main Contribution of DRB1*04:05 Among the Shared Epitope Alleles and Involvement of

- DRB1 Amino Acid Position 57 in Association With Joint Destruction in Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2015; 67(7):1744–1750.
- Thomsen M., Morling N., Snorrason E., Svejgaard A., Sørensen S.F. HLA-Dw4 and Rheumatoid Arthritis. *Tissue Antigens* 1979; 13(1):56–60.
- Tuokko J., Nejentsev S., Luukkainen R., Toivanen A., Ilonen J. HLA haplotype analysis in Finnish patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44(2):315–22.
- UniCel® DxH 800 Coulter® Cellular Analysis System Instructions for Use, Beckman Coulter Inc. 2009.
- Van der Woude D., Lie B.A., Lundstrom E., Balsa A., Feitsma A.L., Houwing-Duistermaat J.J., *et al.* Protection Against Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive Rheumatoid Arthritis Is Predominantly Associated With HLA-DRB1*1301. A Meta-Analysis of HLA-DRB1 Associations With Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive and Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis in Four European Populations. *Arthritis Rheum* 2010; 62(5):12366–1245.
- Van Jaarsveld C.H.M., Otten H.G., Jacobs J.W.G., *et al.* 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.
- Van Leeuwen M.A., van der Heijde D.M., van Rijswijk M.H., Houtman P.M., van Riel P.L., van de Putte L.B., Limburg P.C. Interrelationships of outcome measures and process variables in early rheumatoid arthritis—a comparison of radiological damage, physical disability, joint counts and acute phase reactants. *J Rheumatol* 1994; 21:425–9.
- Varga E., Palkonyai E., Temesvari P., Toth F. and 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): 33-41.
- Viatte S., Plant D., Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9(3):141–53.
- Vojdani A. A potential link between environmental triggers and autoimmunity. *Autoimmune Diseases* 2014; 2014:437231.
- Von Salomé J., Gyllensten U., Bergström T.F. Full-length sequence analysis of the HLA-DRB1 locus suggests a recent origin of alleles. *Immunogenetics* 2007; 59(4):261-71.

- Wakitani S., Murata N., Toda Y., Ogawa R., Kaneshige T., Nishimura Y., *et al.* The relationship between HLA-DRB1 alleles and disease subsets of rheumatoid arthritis in Japanese. *British Journal of Rheumatology* 1997; 36:630–636.
- Wegner N., Lundberg K., Kinlosch A, Fisher B., Malmström V., Feldmann M., Venables P.J. Autoimmunity to specific citrulinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunology Reviews* 2010; 233(1):34-54.
- Wells G., Becker J.C., Teng J., Dougados M., Schiff M., Smolen J., Aletaha D., van Riel P.L. Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009; 68:954–960.
- Weyand C.M., Xie C., Goronzy J.J. Homozygosity for the HLA-DRB1 Allele Selects for Extraarticular Manifestations in Rheumatoid Arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 1992; 89:2033–2039.

7. PRILOZI

7.1. Pregled slika

Slika 1. Shematski prikaz složene stanične interakcije u sinovijalnoj membrani u reumatoidnom artritisu (Preuzeto sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/The-pathogenic-mechanisms-in-rheumatoid-arthritis-Ravli%20-%20GulanVrbani%20-%2087/8c70b475d2aabfc654afa6a857a88b8a619bde1e>).....8

654afa6a857a88b8a619bde1e).....8

Slika 2. Uporedni shematski prikaz normalnog zgloba i zgloba kod reumatoidnog artritisa (Preuzeto sa: <https://www.narodnilijek.com/web/reumatoidni-artritis/>).....10

Slika 3. Glavni kompleks tkivne podudarnosti (MHC) (Preuzeto sa: https://www.researchgate.net/figure/Human-major-histocompatibility-complex-MHC-a-Chromosomal-location-and-gene-map_fig1_6336320).....15

Slika 4. Uporedni prikaz strukturnih razlika između MHC molekula Klase I i MHC molekula Klase II. (Preuzeto sa: <http://www.biologydiscussion.com/immunology/major-histocompatibility-complex-mhc-molecule-microbiology/66216>).....17

Slika 5. Reducirana mapa MHC koja ilustrira grupiranje gena imunološkog sistema. (Preuzeto sa: <https://www.semanticscholar.org/paper/Human-MHC-architecture-and-evolution%3A-implications-Traherne/64864d64e49f31a585600d9485256a5e400efc46/figure/1>).....18

Slika 6. Genotipizacija *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) primjenom SSP-PCR metode. Pacijent je homozigotan za alelnu grupu *HLA-DRB1*04* ovog genskog lokusa. Prisutna je i alelna grupa *HLA-DRB4* gena.....36

Slika 7. HLA genotipizacija *DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) primjenom SSP-PCR metode. Pacijent ima alele koji pripadaju *DRB1*04* i *DRB1*15* grupi *HLA-DRB1* genskog lokusa. Prisutne su i varijante genskih lokusa *HLA-DRB4* i *HLA-DRB5*.....36

7.2. Pregled tabela

Tabela 1. Klasifikacijski kriterij za reumatoidni artritis (RA).....	11
Tabela 2. Reagensi za biohemijsku analizu C-reaktivnog proteina (CRP).....	27
Tabela 3. Pufferi korišteni za izolaciju genomske DNK iz ćelija periferne krvi.....	30
Tabela 4. Pufferi korišteni za gel – elektroforezu.....	31
Tabela 5. Za pripremu mastermiksa PCR radne smjese za amplifikaciju <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa korišten je naredni obrazac.....	33
Tabela 6. DNK amplifikacija – PCR program.....	34
Tabela 7. Komponente TBE pufera (volumen 100 ml).....	35
Tabela 8. Pregled biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe.....	40
Tabela 9. Uporedna analiza biohemijsko-hematoloških parametara sa brzinom sedimentacije eritrocita (ESR) kod kontrolne grupe korištenjem koeficijenta korelacije (r).....	41
Tabela 10. Uporedna analiza hematoloških parametara sa koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) kod kontrolne grupe primjenom koeficijenta korelacije (r).....	42
Tabela 11. Pregled biohemijsko-hematoloških parametara kod oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA).....	44
Tabela 12. Komparativna analiza rezultata biohemijsko-hematoloških parametara i ESR kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) korištenjem koeficijenta korelacije (r).....	45

Tabela 13. Komparativna analiza rezultata hematoloških parametara sa koncentracijom CRP kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) primjenom koeficijenta korelacije (r).....	46
Tabela 14. Pregled biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe i pacijenata sa RA.....	47
Tabela 15. Broj neutrofila, limfocita i trombocita.....	48
Tabela 16. Uporedna analiza biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe i oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) primjenom t-testa.....	49
Tabela 17. Komparacija hematoloških parametara sa brzinom sedimentacije eritrocita (ESR) i koncentracijom C-reaktivnog proteina (CRP) u grupi RA pacijenata korištenjem koeficijenta korelacije (r).....	50
Tabela 18. Rezultati analize <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DRB3</i> , <i>HLA-DRB4</i> i <i>HLA-DRB5</i> gena kod kontrolne grupe.....	52
Tabela 19. Frekvencija alelnih grupa <i>HLA-DRB1</i> lokusa kontrolne grupe ($n = 82$; $2n = 164$).....	55
Tabela 20. Frekvencija genotipova <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa kontrolne grupe.....	57
Tabela 21. Prikaz vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa u kontrolnoj grupi.....	58
Tabela 22. Rezultati analize <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DRB3</i> , <i>HLA-DRB4</i> i <i>HLA-DRB5</i> gena u grupi pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA).....	59
Tabela 23. Frekvencija alelnih grupa <i>HLA-DRB1</i> lokusa među pacijentima oboljelim od reumatoidnog artritisa ($n = 83$; $2n = 166$).....	62
Tabela 24. Frekvencija genotipova <i>HLA-DRB1</i> lokusa među pacijentima oboljelim od reumatoidnog artritisa (RA).....	64
Tabela 25. Prikaz vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa u skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA).....	66

Tabela 26. Komparativna analiza frekvencija alelnih grupa <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) i kontrolne grupe.....	67
Tabela 27. Komparativna analiza frekvencija genotipova <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) i kontrolne grupe.....	69
Tabela 28. Prikaz vrijednosti analiziranih parametara polimorfizma <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa u kontrolnoj grupi i u skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA).....	72
Tabela 29. Frekvencije alelnih grupa <i>HLA-DRB3</i> , <i>HLA-DRB4</i> i <i>HLA-DRB5</i> genskih lokusa u kontrolnoj grupi i skupini pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA).....	73
Tabela 30. Rezultati analize frekvencije <i>HLA-DRB</i> haplotipova kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritisom (RA) i asocijacija sa RA.....	74

7.3. Pregled grafikona

Grafikon 1. Prikaz dobne strukture kontrolne grupe.....	39
Grafikon 2. Prikaz dobne strukture pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) ...	43
Grafikon 3. Uporedni prikaz dobne strukture kontrolne grupe i pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)	43
Grafikon 4. Korelacija između koncentracije C-reaktivnog proteina (CRP) i brzine sedimentacije eritrocita (ESR) kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)...	51
Grafikon 5. Prikaz dobne strukture kontrolne grupe.....	54
Grafikon 6. Prikaz alelnih grupa <i>HLA-DRB1</i> lokusa kontrolne grupe.....	56
Grafikon 7. Prikaz dobne strukture pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)..	61
Grafikon 8. Uporedni prikaz dobne strukture kontrolne grupe i pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA).....	61
Grafikon 9. Prikaz distribucije alelnih grupa <i>HLA-DRB1</i> lokusa kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA)	63
Grafikon 10. Prikaz distribucije alelnih grupa <i>HLA-DRB1</i> genskog lokusa kod pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa (RA) i zdrave kontrolne grupe.....	68

Tabela 7.4 Tabela prikaz vrijednosti biohemijsko-hematoloških parametara kontrolne grupe

r/b	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	RDW-SD	PLT	MPV	NE	LY	MO	EO	BA	NLR	PLR	NE#	LY#	MO#	EO#	BA#	ESR	CRP
1.	5,50	4,94	14,20	43,90	88,80	28,70	32,30	13,30	41,10	220,00	8,90	64,40	26,50	6,90	1,60	0,60	2,50	157,10	3,50	1,40	0,40	0,10	0,00	5,00	3,00
2.	6,70	4,18	12,20	38,20	91,20	29,30	32,10	13,00	41,10	225,00	8,20	52,20	36,70	7,20	2,80	1,10	1,40	90,00	3,50	2,50	0,50	0,20	0,10	6,00	2,00
3.	7,20	4,69	13,30	41,50	88,40	28,30	32,00	12,40	38,10	301,00	8,70	48,60	39,00	9,50	2,60	0,30	1,25	107,50	3,50	2,80	0,70	0,20	0,00	5,00	1,00
4.	7,60	4,97	14,70	44,60	89,80	29,50	32,90	13,00	40,70	273,00	7,40	68,50	24,20	6,80	0,10	0,40	2,89	151,60	5,20	1,80	0,50	0,00	0,00	4,00	4,00
5.	5,00	4,41	12,70	38,90	88,10	28,80	32,70	12,60	38,50	232,00	9,00	68,10	24,60	5,90	0,90	0,50	2,83	193,33	3,40	1,20	0,30	0,00	0,00	6,00	2,00
6.	7,40	4,68	13,40	41,60	88,80	28,70	32,30	13,20	40,30	256,00	8,80	55,10	31,30	6,90	5,90	0,80	1,78	111,30	4,10	2,30	0,50	0,40	0,10	8,00	2,00
7.	8,30	4,19	12,20	38,10	90,80	29,10	32,10	13,80	43,80	214,00	10,30	46,70	41,20	8,10	3,40	0,06	1,15	62,94	3,90	3,40	0,70	0,30	0,10	8,00	4,00
8.	6,50	4,82	14,30	44,50	92,20	29,60	32,20	13,10	41,10	311,00	8,60	62,10	25,20	10,50	1,20	1,00	2,50	194,38	4,00	1,60	0,70	0,10	0,10	9,00	1,00
9.	5,90	4,98	14,50	44,90	90,10	29,20	32,40	12,90	40,70	282,00	7,80	52,60	35,10	9,10	2,50	0,70	1,48	134,28	3,10	2,10	0,50	0,10	0,00	6,00	1,00
10	7,50	4,10	12,00	37,30	91,10	29,40	32,20	14,50	45,90	220,00	9,10	69,10	23,00	6,00	0,70	1,20	3,06	129,41	5,20	1,70	0,40	0,10	0,10	8,00	2,00
11	9,40	5,08	14,80	45,50	89,50	29,10	32,60	13,50	42,40	240,00	9,00	56,30	35,30	5,60	2,10	0,70	1,61	72,73	5,30	3,30	0,50	0,20	0,10	5,00	3,00
12	6,30	4,74	14,60	45,80	96,70	30,90	32,00	12,90	43,30	244,00	8,10	49,40	38,30	7,30	4,20	0,80	1,29	101,67	3,10	2,40	0,50	0,30	0,10	8,00	1,00
13	8,70	4,58	12,60	39,40	86,00	27,40	32,00	14,10	42,40	217,00	8,70	66,90	22,80	7,30	2,20	0,80	2,90	108,50	5,80	2,00	0,60	0,20	0,10	3,00	1,00
14	7,30	5,07	14,80	46,10	90,50	29,10	32,20	14,10	43,80	207,00	10,40	55,60	30,70	9,60	3,20	0,90	1,82	94,09	4,00	2,20	0,70	0,20	0,10	5,00	4,00
15	8,50	4,52	13,20	41,50	91,80	29,10	32,10	13,10	41,60	289,00	8,20	63,90	27,40	4,20	3,50	1,00	2,35	125,65	5,40	2,30	0,40	0,30	0,10	6,00	1,00
16	6,30	4,35	12,50	39,80	91,60	28,80	32,10	13,60	42,90	236,00	8,90	52,00	33,80	10,20	3,20	0,80	1,57	112,38	3,30	2,10	0,60	0,20	0,10	7,00	2,00
17	7,10	4,61	13,30	41,70	90,40	28,80	32,20	12,70	39,80	182,00	9,60	51,30	37,50	7,60	3,10	0,50	1,38	70,00	3,60	2,60	0,50	0,20	0,00	4,00	3,00
18	6,50	5,03	13,70	42,30	84,20	27,50	32,50	13,90	41,10	199,00	8,70	48,10	44,20	6,20	0,80	0,70	1,07	68,62	3,10	2,90	0,40	0,10	0,00	8,00	1,00
19	8,00	4,88	13,30	41,70	85,60	27,50	32,10	14,70	43,30	209,00	9,80	62,00	29,90	5,90	1,50	0,70	2,08	87,08	5,00	2,40	0,50	0,10	0,10	5,00	1,00
20	5,50	4,76	12,80	40,70	85,50	27,60	32,20	13,90	41,10	219,00	9,30	47,80	40,80	9,20	1,70	0,50	1,18	99,54	2,60	2,20	0,50	0,10	0,00	7,00	2,00
21	7,70	5,06	14,60	46,00	88,60	28,10	32,40	14,70	45,10	287,00	8,90	45,80	40,60	9,80	2,70	1,10	1,13	92,58	3,50	3,10	0,80	0,20	0,10	9,00	1,00
22	6,80	4,54	12,50	39,70	87,40	27,60	32,20	13,50	41,10	242,00	8,90	46,60	42,60	4,20	2,70	0,30	1,07	83,45	3,10	2,90	0,50	0,20	0,00	6,00	1,00
23	5,00	4,06	13,30	41,10	96,80	32,80	32,40	13,00	45,50	196,00	9,40	53,30	35,70	8,20	2,00	0,80	1,50	108,89	2,70	1,80	0,40	0,10	0,00	2,00	1,00
24	8,40	4,25	12,90	40,10	94,40	30,30	32,10	12,80	42,00	295,00	10,30	55,50	31,30	6,50	6,10	0,60	1,81	113,46	4,70	2,60	0,50	0,50	0,10	5,00	3,00
25	8,30	4,67	13,60	42,10	90,00	29,00	32,20	13,40	42,00	279,00	9,20	67,20	20,40	6,80	4,80	0,80	3,50	174,38	5,60	1,60	0,60	0,40	0,10	4,00	3,00
26	9,50	4,65	13,00	41,20	88,60	28,00	32,40	14,10	43,80	272,00	8,60	54,40	36,40	7,10	1,70	0,40	1,48	77,71	5,20	3,50	0,70	0,20	0,00	3,00	1,00
27	5,80	4,72	13,30	41,70	88,30	28,10	32,10	12,80	39,40	307,00	8,10	48,60	33,80	10,60	6,10	0,90	1,40	153,50	2,80	2,00	0,60	0,40	0,10	5,00	2,00
28	5,90	4,67	15,20	46,10	97,00	32,50	32,90	13,80	46,80	206,00	8,80	46,70	43,60	7,90	1,40	0,40	1,04	79,23	2,70	2,60	0,50	0,10	0,00	7,00	1,00
29	5,50	4,60	13,20	41,60	90,50	28,80	32,20	13,20	41,10	228,00	9,30	49,60	34,90	34,90	6,60	0,90	1,42	120,00	2,70	1,90	0,40	0,40	0,00	6,00	4,00
30	4,80	4,12	12,00	36,70	89,20	28,60	32,00	13,80	42,40	224,00	8,80	53,00	31,10	11,50	3,50	0,90	1,73	149,33	2,60	1,50	0,60	0,20	0,00	8,00	1,00
31	6,80	4,42	12,60	38,40	86,90	28,50	32,80	13,20	39,80	405,00	7,50	43,50	45,10	7,60	3,00	0,80	0,82	122,73	2,70	3,30	0,50	0,20	0,10	9,00	3,00
32	7,00	4,81	13,30	42,90	89,20	27,60	32,10	14,90	45,10	199,00	9,30	52,20	37,50	8,70	1,20	0,40	1,42	76,54	3,70	2,60	0,60	0,10	0,00	3,00	1,00
33	6,20	4,58	12,10	38,70	84,50	27,50	32,10	14,40	42,40	163,00	9,90	51,70	37,70	6,50	3,80	0,30	1,39	70,87	3,20	2,30	0,40	0,20	0,00	6,00	1,00
34	6,80	5,04	14,20	45,30	89,80	28,10	32,10	13,80	40,70	204,00	10,30	44,30	45,40	8,80	1,30	0,20	0,79	60,00	2,70	3,40	0,60	0,10	0,00	5,00	1,00
35	5,70	4,96	14,30	44,80	90,50	28,90	32,10	13,80	43,30	244,00	10,40	68,40	29,00	7,80	0,10	0,70	3,00	174,28	4,20	1,40	0,10	0,00	0,00	9,00	1,00
36	7,80	5,06	14,50	44,70	88,40	28,80	32,50	13,50	41,60	272,00	10,20	54,80	34,00	7,30	3,40	0,50	1,59	100,74	4,30	2,70	0,60	0,30	0,00	4,00	1,00
37	4,80	5,48	15,70	48,50	88,60	28,60	32,30	13,30	41,10	262,00	9,40	60,90	31,60	5,20	2,00	0,30	1,93	174,67	2,90	1,50	0,20	0,10	0,00	2,00	1,00
38	6,90	5,18	15,60	48,70	94,00	30,20	32,10	13,70	44,20	262,00	8,40	64,60	25,10	7,70	2,20	0,40	2,65	154,12	4,50	1,70	0,50	0,20	0,00	5,00	2,00

39	4.80	4.82	13.90	43.00	89.10	28.80	32.30	13.10	40.30	211.00	9.30	51.20	37.90	9.30	1.40	0.20	1.39	117.22	2.50	1.80	0.40	0.10	0.00	4.00	1.00
40	8.30	4.49	13.70	42.30	94.20	30.50	32.40	14.00	45.50	245.00	10.30	49.60	37.00	7.50	4.70	1.20	1.32	79.03	4.10	3.10	0.60	0.40	0.10	6.00	3.00
41	9.80	4.53	14.30	44.70	98.60	31.50	32.00	12.80	43.30	256.00	9.20	59.80	30.40	6.90	2.10	0.80	1.97	85.33	5.90	3.00	0.70	0.20	0.10	3.00	0.00
42	6.70	4.81	13.60	43.00	89.40	28.30	31.70	13.80	42.90	299.00	9.10	61.80	28.10	6.20	3.40	0.50	2.16	157.37	4.10	1.90	0.40	0.20	0.00	3.00	2.00
43	4.70	4.82	13.80	43.40	90.10	28.80	31.70	13.00	41.10	213.00	8.90	61.00	29.60	6.80	1.60	1.00	2.07	152.14	2.90	1.40	0.30	0.10	0.00	4.00	1.00
44	9.30	4.87	14.50	44.90	92.10	29.80	32.40	13.70	43.80	168.00	10.60	58.40	32.40	6.10	1.90	1.20	1.80	56.00	5.40	3.00	0.60	0.20	0.10	6.00	3.00
45	9.40	5.00	14.20	44.20	88.40	28.40	32.20	12.90	39.80	223.00	8.80	60.80	28.10	9.00	1.30	0.80	2.19	85.77	5.70	2.60	0.90	0.10	0.10	5.00	2.00
46	7.80	4.74	13.00	40.50	85.40	27.50	32.20	14.30	42.00	392.00	7.30	52.90	33.60	11.30	0.80	1.40	1.58	150.77	4.10	2.60	0.90	0.10	0.10	4.00	2.00
47	6.90	4.79	14.60	43.70	91.10	30.50	33.50	12.50	39.80	248.00	8.70	56.40	35.80	5.90	1.40	0.50	1.56	99.20	3.90	2.50	0.40	0.10	0.00	5.00	1.00
48	8.20	4.74	13.70	43.90	92.70	28.90	31.20	12.50	39.80	252.00	9.20	50.10	39.00	8.20	1.80	0.90	1.28	78.75	4.10	3.20	0.70	0.20	0.10	2.00	3.00
49	6.60	4.70	13.10	41.50	88.40	27.80	31.50	13.90	42.40	261.00	9.20	59.80	21.80	7.30	10.20	0.90	2.78	186.43	3.90	1.40	0.50	0.70	0.10	3.00	2.00
50	5.70	4.98	14.30	45.50	91.30	28.70	31.40	12.00	37.60	212.00	9.40	47.90	34.20	10.60	6.70	0.60	1.35	106.00	2.70	2.00	0.60	0.40	0.00	2.00	3.00
51	9.90	4.76	14.90	46.30	97.40	31.20	32.10	13.50	45.10	293.00	9.50	63.90	26.60	6.70	1.60	1.20	2.42	112.69	6.30	2.60	0.70	0.20	0.10	3.00	2.00
52	5.00	4.81	13.10	42.10	87.50	27.30	31.20	13.30	40.30	316.00	8.10	57.20	33.00	5.00	3.30	1.50	1.71	185.88	2.90	1.70	0.30	0.20	0.10	4.00	3.00
53	9.00	5.22	14.50	45.10	86.50	27.80	32.10	12.70	38.10	303.00	8.30	69.70	23.10	6.00	0.60	0.60	3.00	144.28	6.30	2.10	0.50	0.10	0.10	5.00	0.00
54	6.70	4.49	12.60	40.10	89.20	28.00	31.40	13.80	42.90	275.00	9.70	51.00	39.00	6.20	2.60	1.20	1.31	105.78	3.40	2.60	0.40	0.20	0.10	3.00	1.00
55	7.10	4.58	13.00	40.10	87.50	28.50	32.50	13.90	42.40	269.00	7.20	55.60	33.30	6.70	3.30	1.10	1.69	116.96	3.90	2.30	0.50	0.20	0.10	5.00	2.00
56	6.40	4.31	13.10	41.30	95.70	30.40	31.70	12.80	42.00	185.00	10.00	47.00	41.70	7.00	3.20	1.10	1.11	68.52	3.00	2.70	0.50	0.20	0.10	4.00	3.00
57	7.10	4.35	13.40	42.30	97.20	30.90	31.80	13.80	46.40	307.00	7.10	49.20	39.90	7.90	1.90	1.10	1.25	109.64	3.50	2.80	0.60	0.10	0.10	2.00	3.00
58	6.30	5.05	15.50	46.00	90.90	30.70	33.80	12.80	41.10	204.00	6.90	66.50	26.00	6.20	0.80	0.50	3.41	127.50	4.20	1.60	0.40	0.10	0.00	3.00	1.00
59	5.60	5.07	13.80	42.40	83.60	27.20	32.50	13.50	39.40	268.00	8.40	58.50	28.80	7.60	4.60	0.50	2.06	167.50	3.30	1.60	0.40	0.30	0.00	4.00	1.00
60	8.00	4.83	13.80	42.80	88.50	28.50	32.20	13.40	40.70	282.00	7.30	60.80	30.00	6.50	2.10	0.60	2.04	117.50	4.90	2.40	0.50	0.20	0.00	6.00	4.00
61	7.30	5.01	14.90	46.00	91.70	29.70	32.30	15.30	48.60	263.00	9.20	63.60	26.00	8.20	1.90	0.30	2.42	138.42	4.60	1.90	0.60	0.10	0.00	3.00	3.00
62	8.50	4.41	12.50	39.20	88.90	28.40	32.00	14.00	42.40	213.00	8.00	68.70	21.40	6.70	2.50	0.70	3.28	118.33	5.90	1.80	0.60	0.20	0.10	3.00	1.00
63	6.70	5.32	15.80	49.40	92.90	29.70	32.00	13.60	43.30	201.00	7.90	53.40	37.80	6.50	2.00	0.30	1.44	80.40	3.60	2.50	0.40	0.10	0.00	3.00	2.00
64	8.60	4.11	12.40	38.40	93.40	30.20	32.40	13.40	43.30	208.00	9.40	74.00	19.60	5.10	0.50	0.80	3.76	122.35	6.40	1.70	0.40	0.00	0.10	4.00	2.00
65	5.80	4.46	12.30	39.50	88.60	27.50	31.10	13.20	40.30	217.00	8.90	54.10	34.00	8.00	2.90	1.00	1.55	108.50	3.10	2.00	0.50	0.20	0.10	4.00	1.00
66	7.00	5.09	13.10	43.20	85.00	25.70	30.20	13.30	39.40	186.00	10.50	59.80	29.30	8.90	1.20	0.80	2.00	88.57	4.20	2.10	0.60	0.10	0.10	4.00	3.00
67	8.80	5.30	13.40	43.40	81.90	25.20	30.80	13.60	38.50	222.00	9.70	67.00	23.50	7.30	1.30	0.90	2.81	105.71	5.90	2.10	0.60	0.10	0.10	2.00	3.00
68	4.10	4.84	14.20	44.20	91.30	29.40	32.20	13.00	41.10	182.00	9.40	59.60	31.30	7.00	1.40	0.70	1.92	140.00	2.50	1.30	0.30	0.10	0.00	2.00	1.00
69	7.60	4.98	13.70	44.50	89.40	27.60	30.80	13.60	42.00	20.00	10.50	63.00	25.90	6.80	3.30	1.00	2.40	100.00	4.80	2.00	0.50	0.30	0.10	8.00	3.00
70	8.00	4.76	13.20	41.30	86.80	27.70	31.90	14.20	42.40	254.00	8.20	47.30	42.00	8.20	1.50	1.00	1.12	74.71	3.80	3.40	0.70	0.10	0.10	4.00	1.00
71	6.50	4.91	11.90	39.70	80.90	24.30	30.00	18.20	51.60	244.00	9.50	52.70	37.90	7.20	1.60	0.60	1.36	97.60	3.40	2.50	0.50	0.10	0.00	5.00	1.00
72	5.40	5.43	14.00	45.00	82.90	25.80	31.10	14.30	41.10	208.00	9.00	43.60	42.60	6.90	4.90	2.00	1.00	90.43	2.30	2.30	0.40	0.30	0.10	6.00	2.00
73	5.90	4.58	13.20	41.50	90.60	28.90	31.90	14.20	44.20	266.00	8.70	62.50	27.10	8.20	1.80	0.40	2.31	166.25	3.70	1.60	0.50	0.10	0.00	6.00	2.00
74	5.20	4.53	12.50	39.50	87.30	27.50	31.50	13.30	40.30	227.00	9.20	50.90	35.60	8.80	3.30	1.40	1.42	119.47	2.70	1.90	0.50	0.20	0.10	4.00	3.00
75	6.00	4.57	13.10	41.50	90.90	28.70	31.60	12.20	38.10	254.00	9.10	44.50	43.00	10.00	2.00	0.50	1.00	97.69	2.60	2.60	0.60	0.10	0.00	6.00	3.00
76	6.90	4.72	13.80	43.40	91.80	29.30	31.90	12.50	39.40	239.00	8.70	52.90	35.50	9.60	1.30	0.70	1.48	95.60	3.70	2.50	0.70	0.10	0.00	6.00	2.00
77	9.10	4.47	12.80	40.10	89.70	28.60	31.90	13.60	41.60	276.00	9.40	64.40	27.60	6.50	0.80	0.70	2.36	110.40	5.90	2.50	0.60	0.10	0.10	4.00	3.00
78	6.50	4.87	13.00	42.10	86.50	26.80	31.00	13.20	39.40	260.00	8.60	60.90	26.10	9.10	2.90	1.00	2.35	152.94	4.00	1.70	0.60	0.20	0.10	5.00	1.00
79	6.10	4.42	13.00	40.70	92.10	29.30	31.90	12.10	38.50	220.00	7.80	56.40	29.70	11.80	1.40	0.70	1.94	122.22	3.50	1.80	0.70	0.10	0.00	7.00	4.00
80	7.90	4.60	12.30	38.90	84.70	26.70	31.50	13.00	38.10	275.00	8.80	50.20	38.80	8.70	1.70	0.60	1.30	91.67	3.90	3.00	0.70	0.10	0.00	4.00	3.00
81	6.20	4.00	11.60	37.50	93.80	29.00	30.90	13.40	43.30	408.00	8.50	50.70	38.70	8.20	1.50	0.90	1.29	170.00	3.10	2.40	0.50	0.10	0.10	7.00	2.00
82	9.50	4.97	12.50	40.20	80.90	25.20	31.20	14.90	41.60	315.00	7.80	60.50	30.60	6.20	1.50	1.20	1.96	108.62	5.70	2.90	0.60	0.10	0.10	8.00	3.00

Tabela 7.5 Tabela prikaz vrijednosti bihemijsko-hematoloških parametara kod pacijenata sa RA

r/b	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDW	RDW-SD	PLT	MPV	NE	LY	MO	EO	BA	NLR	PLR	NE#	LY#	MO#	EO#	BA#	ESR	CRP
1.	10,00	4,74	11,80	37,40	78,90	25,00	31,70	15,40	42,40	310,00	8,40	78,00	13,70	5,60	1,90	0,80	5,57	221,43	7,80	1,40	0,60	0,20	0,10	40,00	40,00
2.	10,50	4,64	12,90	40,60	87,40	27,80	31,80	15,90	48,10	196,00	8,00	71,80	18,80	6,30	2,10	1,00	3,75	98,00	7,50	2,00	0,70	0,20	0,10	25,00	10,00
3.	6,90	5,35	14,20	44,30	82,90	26,60	32,10	15,10	43,80	143,00	10,30	56,90	34,30	4,60	3,30	0,90	1,56	57,20	3,90	2,50	0,30	0,20	0,10	21,00	1,00
4.	5,90	4,24	10,90	34,10	80,30	25,60	31,90	15,30	42,90	224,00	8,90	55,70	32,10	9,20	2,40	0,60	1,74	117,89	3,30	1,90	0,50	0,10	0,00	32,00	1,00
5.	5,30	4,48	13,20	40,50	90,30	29,50	32,70	13,60	42,00	212,00	10,30	52,40	36,10	8,60	2,40	0,50	1,47	111,58	2,80	1,90	0,50	0,10	0,00	6,00	2,00
6.	6,50	4,81	13,10	40,90	85,10	27,10	31,90	16,50	48,10	184,00	9,40	52,30	29,20	13,10	3,90	1,50	1,79	96,84	3,40	1,90	0,90	0,30	0,10	11,00	1,00
7.	10,20	4,69	14,10	42,10	88,60	28,90	32,60	14,90	44,10	298,00	9,10	46,00	37,10	8,10	6,90	1,90	1,24	80,54	4,60	3,70	1,00	0,70	0,20	18,00	3,00
8.	10,00	4,85	13,80	39,30	90,20	29,10	31,50	13,90	43,20	323,00	8,90	56,30	27,30	7,30	7,50	1,60	2,07	119,63	5,60	2,70	0,70	0,80	0,20	21,00	8,00
9.	10,40	5,10	15,40	47,30	92,80	30,30	32,60	13,60	43,80	181,00	10,60	50,50	35,00	9,60	4,10	0,80	1,44	50,28	5,20	3,60	1,00	0,50	0,10	4,00	3,00
10.	10,30	4,49	13,40	41,00	91,40	29,90	32,70	14,40	45,50	331,00	8,10	46,50	38,50	6,50	7,30	1,20	1,21	84,87	4,70	3,90	0,70	0,80	0,20	8,00	1,00
11.	6,90	4,91	13,00	40,90	83,30	26,40	31,70	15,00	43,30	246,00	8,00	64,20	25,70	6,30	1,00	2,80	2,44	136,67	4,40	1,80	0,40	0,10	0,20	20,00	9,00
12.	7,70	4,61	14,00	44,50	96,50	30,40	31,50	14,80	49,40	231,00	9,00	59,60	22,80	7,70	8,60	1,30	2,71	135,88	4,60	1,70	0,60	0,70	0,10	27,00	2,00
13.	8,00	4,59	13,40	41,30	90,10	29,20	32,40	13,20	41,60	255,00	8,70	50,40	35,20	12,00	0,90	0,90	1,43	91,07	4,00	2,80	1,00	0,10	0,10	12,00	28,00
14.	8,40	4,17	12,30	37,50	89,90	29,50	32,90	15,00	46,40	341,00	8,80	66,90	22,40	7,80	2,20	0,70	2,95	179,47	5,60	1,90	0,70	0,20	0,10	18,00	3,00
15.	13,20	4,71	13,00	40,30	85,60	27,50	32,20	15,70	46,40	389,00	8,60	79,50	13,80	4,50	1,30	0,90	5,83	216,11	10,50	1,80	0,60	0,20	0,10	43,00	25,00
16.	4,00	4,24	13,70	40,80	96,30	32,30	33,50	12,70	42,90	123,00	8,00	47,80	44,70	6,10	0,30	1,10	1,06	68,93	1,90	1,80	0,20	0,00	0,00	21,00	1,00
17.	7,50	4,10	12,30	38,10	92,90	29,90	32,20	14,00	44,60	193,00	8,10	48,50	36,90	12,00	1,50	1,10	1,32	68,93	3,70	2,80	0,90	0,10	0,10	25,00	2,00
18.	5,70	4,23	12,40	38,60	91,30	29,40	32,20	13,10	41,60	279,00	9,40	55,90	29,40	10,60	3,00	1,10	1,88	164,12	3,20	1,70	0,60	0,20	0,10	20,00	2,00
19.	10,20	4,32	11,30	36,10	83,50	26,20	31,40	17,80	51,60	281,00	7,80	75,40	12,60	6,50	4,80	0,70	5,92	216,15	7,70	1,30	0,70	0,50	0,10	52,00	23,00
20.	8,60	4,32	13,10	40,40	93,40	30,30	32,50	12,70	41,10	193,00	11,10	56,00	33,00	6,90	3,00	1,10	1,71	68,93	4,80	2,80	0,60	0,30	0,10	5,00	1,00
21.	6,60	4,38	13,20	40,30	92,00	30,00	32,60	13,60	43,30	227,00	7,10	61,40	29,60	7,10	1,10	0,80	2,05	113,50	4,10	2,00	0,50	0,10	0,10	15,00	3,00
22.	9,20	4,47	13,50	41,60	93,10	30,30	32,60	14,70	41,70	305,00	9,20	52,70	33,40	9,30	3,20	1,40	1,58	98,39	4,90	3,10	0,90	0,30	0,10	60,00	4,00
23.	6,10	4,72	12,90	40,10	84,90	27,40	32,30	13,50	39,80	191,00	9,50	51,30	34,00	12,70	1,40	0,60	1,52	90,95	3,20	2,10	0,80	0,10	0,00	32,00	1,00
24.	8,20	4,44	12,40	38,10	85,90	28,00	32,60	13,40	39,80	228,00	10,30	51,60	32,30	11,90	3,40	0,80	1,62	87,69	4,20	2,60	1,00	0,30	0,10	8,00	4,00
25.	4,10	4,15	13,40	41,60	100,10	32,40	32,30	15,10	52,10	276,00	9,30	52,70	35,50	9,10	2,00	0,70	1,47	184,00	2,20	1,50	0,40	0,10	0,00	41,00	5,00
26.	6,40	4,77	13,20	40,90	85,80	27,70	32,30	15,40	45,90	279,00	9,50	73,70	16,80	6,70	1,80	1,00	4,27	253,64	4,70	1,10	0,40	0,10	0,10	34,00	11,00
27.	10,70	4,94	13,90	43,30	87,60	28,10	32,00	15,60	46,80	235,00	8,50	61,10	27,90	7,90	2,60	0,50	2,17	78,33	6,50	3,00	0,80	0,30	0,10	10,00	2,00
28.	3,50	4,45	13,10	39,80	89,60	29,50	32,90	13,40	41,10	306,00	8,00	30,70	53,30	12,10	3,60	0,30	0,58	161,05	1,10	1,90	0,40	0,10	0,00	5,00	1,00
29.	10,50	5,06	14,60	45,70	90,40	28,90	32,00	14,40	45,10	198,00	8,30	57,00	31,20	6,90	3,20	1,70	1,82	60,00	6,00	3,30	0,70	0,30	0,20	8,00	1,00
30.	7,50	4,80	14,30	43,70	91,80	29,80	32,70	13,30	42,00	233,00	8,80	55,60	29,70	9,20	2,70	2,80	1,86	105,91	4,10	2,20	0,70	0,20	0,20	3,00	1,00
31.	5,90	4,13	12,20	38,90	94,30	29,60	31,40	19,30	44,80	299,00	7,20	61,60	26,90	6,80	3,70	1,00	2,24	175,88	3,80	1,70	0,20	0,10	0,10	7,00	2,00
32.	3,90	4,49	14,70	46,40	103,30	32,80	31,80	12,90	45,50	196,00	8,80	46,20	38,20	10,10	4,40	1,10	1,20	130,67	1,80	1,50	0,40	0,20	0,00	10,00	1,00
33.	6,00	4,13	12,10	38,30	92,60	29,40	31,80	13,40	42,90	215,00	9,30	51,00	33,70	10,40	3,90	1,00	1,55	107,50	3,10	2,00	0,60	0,20	0,10	27,00	4,00
34.	6,60	4,42	12,50	39,00	88,30	28,40	32,20	14,00	42,40	277,00	8,00	37,00	46,20	8,30	7,30	1,20	0,80	92,33	2,40	3,00	0,50	0,50	0,10	27,00	3,00
35.	7,90	4,43	13,20	41,70	94,00	29,80	31,70	14,80	48,10	199,00	11,00	59,40	29,90	8,90	1,10	0,70	1,96	82,92	4,70	2,40	0,70	0,10	0,10	21,00	2,00
36.	10,00	4,17	11,50	36,60	87,80	27,50	31,40	16,80	50,80	393,00	9,30	57,00	23,10	9,80	9,00	1,10	2,48	170,87	5,70	2,30	1,00	0,90	0,10	47,00	28,00
37.	8,80	5,00	16,30	49,80	99,70	32,60	32,70	13,60	47,30	214,00	10,70	64,20	22,20	8,50	3,80	1,30	2,85	107,00	5,70	2,00	0,80	0,30	0,10	48,00	59,00
38.	6,70	5,37	16,60	50,50	94,10	31,00	32,90	13,00	42,40	191,00	8,80	46,00	39,60	9,80	3,60	1,00	1,19	73,46	3,10	2,60	0,60	0,20	0,10	1,00	1,00
39.	6,50	4,57	13,40	42,00	92,00	29,40	32,00	14,20	45,50	254,00	9,40	43,30	39,00	9,90	6,60	1,20	1,12	101,60	2,80	2,50	0,60	0,40	0,10	5,00	8,00
40.	9,20	4,88	14,80	46,30	94,80	30,30	32,00	14,10	46,40	244,00	9,70	52,40	36,00	9,60	1,20	0,80	1,45	73,94	4,80	3,30	0,90	0,10	0,10	17,00	1,00

41.	6.40	4.28	13.30	40.40	94.50	31.10	33.00	12.40	40.70	226.00	10.50	53.80	32.40	9.20	3.50	1.10	1.67	107.62	3.50	2.10	0.60	0.20	0.10	4.00	1.00
42.	4.70	4.56	13.00	40.70	89.20	28.60	32.00	13.10	40.30	116.00	9.10	45.30	41.40	8.40	4.30	0.60	1.11	61.05	2.10	1.90	0.40	0.20	0.00	7.00	9.00
43.	14.00	4.66	12.60	40.30	86.40	27.00	31.20	14.20	42.40	373.00	8.80	59.20	29.00	7.80	3.30	0.70	2.02	90.98	8.30	4.10	1.10	0.50	0.10	40.00	9.00
44.	7.50	3.87	11.30	35.60	92.00	29.10	31.60	15.90	50.30	241.00	9.50	57.60	32.00	8.60	3.40	0.40	1.75	100.42	4.20	2.40	0.60	0.30	0.00	44.00	8.00
45.	7.80	4.86	12.00	39.30	80.90	24.80	30.70	16.60	46.40	232.00	9.50	55.90	28.70	9.70	3.00	0.70	2.05	105.45	4.50	2.20	0.80	0.20	0.10	3.00	10.00
46.	5.40	4.92	14.70	45.00	91.50	29.90	32.70	15.40	48.10	174.00	7.50	48.90	34.50	12.00	3.90	0.70	1.44	96.67	2.60	1.80	0.60	0.20	0.00	17.00	8.00
47.	7.90	4.50	12.10	37.70	83.60	26.80	32.80	15.00	43.80	263.00	8.50	75.30	15.80	6.90	1.50	0.50	4.92	219.17	5.90	1.20	0.50	0.10	0.00	28.00	37.00
48.	12.80	4.66	13.00	41.20	88.40	27.80	31.50	13.90	42.90	374.00	8.10	65.40	22.90	8.80	2.30	0.60	2.90	128.96	8.40	2.90	1.10	0.30	0.10	24.00	17.00
49.	9.60	5.30	14.10	44.60	84.20	26.70	31.70	15.20	43.80	300.00	8.60	59.30	29.00	7.50	3.50	0.70	2.04	107.14	5.70	2.80	0.70	0.30	0.10	34.00	18.00
50.	8.00	4.46	12.30	38.40	86.10	27.70	32.10	14.20	42.00	244.00	9.00	62.20	27.30	9.00	0.80	0.70	0.26	106.09	4.60	2.30	0.50	0.10	0.10	7.00	1.00
51.	7.60	4.39	14.10	43.80	99.90	32.10	32.10	13.50	46.80	263.00	8.90	60.40	30.00	6.50	1.60	1.50	2.27	119.54	5.00	2.20	0.70	0.10	0.10	20.00	12.00
52.	8.00	4.26	12.30	38.60	90.70	28.90	31.80	13.90	44.20	185.00	8.70	60.10	29.10	7.70	2.40	0.70	2.09	80.43	4.80	2.30	0.60	0.20	0.10	10.00	5.00
53.	6.40	4.77	13.40	42.60	89.30	28.00	31.40	15.50	47.30	228.00	10.30	58.70	28.90	7.70	3.70	1.00	2.06	126.67	3.70	1.80	0.50	0.20	0.10	30.00	9.00
54.	14.10	4.76	13.00	40.80	85.80	27.40	32.00	16.10	47.70	459.00	8.30	77.40	13.70	5.20	2.60	1.10	5.74	241.58	10.90	1.90	0.70	0.40	0.20	43.00	38.00
55.	7.70	5.03	14.30	44.60	88.80	28.40	32.00	12.60	38.50	295.00	8.90	41.60	38.60	10.50	8.10	1.20	1.07	98.33	3.20	3.00	0.80	0.60	0.10	9.00	1.00
56.	10.90	4.44	10.00	33.00	74.30	22.50	30.30	18.20	46.80	330.00	6.60	65.10	26.50	6.00	1.60	0.80	2.45	113.79	7.10	2.90	0.70	0.20	0.10	32.00	6.00
57.	7.60	4.71	14.50	45.00	95.50	30.80	32.00	13.50	44.60	232.00	8.50	61.90	25.60	8.80	2.80	0.90	2.47	122.11	4.70	1.90	0.70	0.20	0.10	27.00	70.00
58.	7.40	4.72	14.10	43.20	91.50	29.80	32.60	13.40	42.40	224.00	7.30	64.20	25.30	7.50	1.60	1.40	2.53	117.89	4.80	1.90	0.60	0.10	0.10	77.00	8.90
59.	7.40	4.66	13.80	43.20	92.80	29.60	31.80	14.90	47.70	229.00	8.80	67.40	19.40	8.20	4.40	0.60	3.57	163.57	5.00	1.40	0.60	0.30	0.00	47.00	11.00
60.	9.90	4.26	13.10	41.50	97.30	30.80	31.60	17.40	57.80	295.00	7.20	52.70	42.80	3.30	0.70	0.50	1.24	70.24	5.00	4.20	0.30	0.10	0.00	33.00	15.00
61.	6.10	5.26	14.30	45.30	86.20	27.10	31.50	13.50	40.30	131.00	8.80	45.50	38.70	13.90	0.80	1.10	1.22	56.96	2.80	2.30	0.80	0.00	0.10	20.00	2.80
62.	6.00	4.36	13.20	41.80	95.90	30.40	31.70	13.60	45.50	226.00	8.60	47.90	40.20	9.60	1.60	0.70	1.21	94.17	2.90	2.40	0.60	0.10	0.00	10.00	3.40
63.	6.60	4.90	14.20	45.50	92.90	29.40	31.20	13.40	42.90	177.00	10.90	49.20	36.00	8.00	5.40	1.40	1.65	73.75	3.30	2.40	0.50	0.40	0.10	25.00	4.00
64.	9.40	4.99	10.60	35.30	70.70	21.30	30.10	18.70	45.90	409.00	8.20	57.60	30.90	9.80	1.50	0.20	1.86	141.03	5.40	2.90	0.90	0.10	0.00	16.00	2.80
65.	4.10	4.55	13.40	41.60	91.50	29.40	32.10	12.90	40.70	208.00	8.50	47.70	40.70	10.30	0.10	1.20	1.12	122.35	1.90	1.70	0.40	0.00	0.00	15.00	2.00
66.	7.30	4.65	13.80	42.90	92.30	29.60	32.10	13.30	42.40	290.00	8.20	52.80	33.50	9.10	4.00	0.60	1.90	120.83	3.80	2.40	0.70	0.30	0.00	20.00	2.60
67.	6.30	4.85	11.20	35.50	73.30	23.00	31.40	16.30	41.60	312.00	7.90	65.70	21.50	6.70	5.80	0.30	3.15	240.00	4.10	1.30	0.40	0.40	0.00	13.00	2.00
68.	10.20	5.14	14.90	46.90	91.20	29.10	31.90	14.80	45.90	320.00	8.60	40.70	48.40	8.10	2.00	0.80	0.84	65.31	4.10	4.90	0.80	0.20	0.10	19.00	1.00
69.	5.80	4.73	13.40	43.60	92.10	28.40	30.80	14.30	45.90	164.00	10.30	45.40	34.50	10.10	9.40	0.60	1.30	82.00	2.60	2.00	0.60	0.50	0.00	12.00	2.00
70.	8.20	4.58	10.20	35.00	76.40	22.20	29.00	20.80	54.30	338.00	9.00	58.50	30.00	7.00	3.40	1.10	1.92	135.20	4.80	2.50	0.60	0.30	0.10	46.00	3.00
71.	5.70	4.29	13.00	41.00	95.40	30.30	31.80	12.90	42.40	214.00	10.40	59.90	25.20	9.20	4.70	1.00	2.43	152.86	3.40	1.40	0.50	0.30	0.10	28.00	2.00
72.	5.30	4.11	12.60	40.50	94.30	30.50	31.50	12.10	42.10	208.00	10.10	59.30	25.80	9.50	4.30	1.10	2.38	160.00	3.10	1.30	0.50	0.30	0.10	25.00	1.00
73.	6.00	4.71	14.10	45.20	95.80	30.00	31.30	14.70	48.60	199.00	10.50	64.20	27.80	3.70	2.40	1.90	2.24	117.06	3.80	1.70	0.20	0.10	0.10	31.00	3.00
74.	4.70	4.32	11.90	37.30	86.30	27.70	32.10	17.70	52.50	358.00	8.00	57.50	35.50	4.90	1.80	0.30	1.59	210.59	2.70	1.70	0.20	0.10	0.00	88.00	47.00
75.	4.90	4.48	13.90	42.00	93.70	31.10	33.10	14.40	46.40	336.00	8.00	45.30	42.50	8.20	2.90	1.10	1.05	160.00	2.20	2.10	0.40	0.10	0.10	10.00	2.00
76.	16.00	4.49	12.10	38.60	86.00	27.00	31.50	15.10	45.10	471.00	9.30	66.30	17.30	9.70	5.70	1.00	3.78	168.21	10.60	2.80	1.60	0.90	0.20	28.00	24.00
77.	8.30	3.98	12.20	37.90	95.20	30.70	32.20	14.30	46.80	259.00	8.30	66.30	22.70	6.70	3.00	1.30	2.89	136.32	5.50	1.90	0.60	0.20	0.10	31.00	6.00
78.	7.20	4.59	13.70	43.20	94.20	29.80	31.70	15.00	48.10	216.00	8.00	49.00	37.60	10.40	2.60	0.40	1.30	80.00	3.50	2.70	0.70	0.20	0.00	40.00	4.00
79.	10.80	4.19	12.80	40.90	97.70	30.50	31.20	14.10	47.70	202.00	11.20	61.10	23.70	11.10	3.20	0.90	2.54	77.69	6.60	2.60	1.20	0.30	0.10	29.00	3.00
80.	5.90	4.31	13.00	41.00	95.80	30.50	31.80	12.80	41.90	216.00	10.60	59.30	25.80	9.80	4.80	1.10	2.57	154.28	3.60	1.40	0.50	0.30	0.10	18.00	1.00

УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ

ФАКУЛТЕТ: Prirodno-matematički fakultet



РЕПУБЛИКА РПСКА
УНИВЕРЗИТЕТ У БАЊОЈ ЛУЦИ
Природно-математички факултет
Број: 19-214/20
Датум: 03.02.2020. год.
БАЊА ЛУКА

ИЗВЈЕШТАЈ

о оцјени 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 „**Biohemijsko-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. godine, 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 последије дипломских 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 repozitorijumu 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. Objašnjeni su načini pripreme uzoraka za biohemijsko-hematološku i molekularnu 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 poglavlje obuhvata osam potpoglavlja: Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe (str. 40-42); Rezultati analize biohemijsko-hematoloških vrijednosti kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA) (str. 43-46); Uporedna analiza biohemijsko-hematoloških vrijednosti ispitanika kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (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 artritismom (RA) (str. 59-63). Rezultati analize genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa pacijenata sa reumatoidnim artritismom (RA) (str. 64-66); i Komparativna analiza rezultata *HLA-DRB1* genskog lokusa, frekvencije alelnih grupa, genotipova i haplotipova kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (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 artritismom (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) Истаћи основне податке о докторској дисертацији: обим, број табела, слика, шема, графикана, број цитиране литературе и навести поглавља.

IV УВОД И ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

1. Do danas nije pronađen specifičan biohemijski ili imunološki pokazatelj koji je specifičan za reumatoidni artritis. U dijagnosticanju 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 biohemijsko-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 biohemijsko-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-biohemijskim parametrima kao i u prisustvu različitih alelnih grupa i genotipova *HLA-DRB1* genskog lokusa između pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa i zdrave kontrolne skupine.

Biohemijsko-hematološki parametri

U dijagnosticanju reumatoidnog artritisa se često koriste krvne pretrage. Ove pretrage obuhvataju analize koje su usmjerene na ispitivanje ćelijskih elemenata krvi (krvna slika, hematološki parametri) i analize kojima se provjerava biohemijski sastav krvi. Hematološki testovi su obuhvatali kompletnu 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 biohemijskih parametara.

Povećan broj leukocita može ukazivati na upalni proces koji je uzrokovan 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 jedinice 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 antigena 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 antigena u organizmu i regulisanju imunog odgovora. MHC je genski lokus čiji glavni produkti pripadaju imunom sistemu i služe za prezentaciju antigena.

Jedna od osnovnih osobina HLA sistema je izrazit polimorfizam alela, koji se ogleda u izuzetno visokom stepenu genske varijabilnosti njegovih produkata (antigena). 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 klasa 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 antigene koji su ušli u ćelije endocitozom pomoćničkim T limfocitima za dalju prezentaciju B ćelijama i makrofagima (Allegritti et al., 1989; Abbas et al., 2018; Abbas et al., 2015).

2. Autoimune bolesti su posljedica imunorekacije 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 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 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) te da je kod većine autoimunih bolesti genetička predispozicija povezana sa genima koji kodiraju sintezu HLA antigena (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 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, bolovalo 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 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 je sistemska bolest vezivnog tkiva sa incidencom od 0,5% na 1000 žena i 0,2% na 1000 muškaraca (2 – 3 puta je češći kod žena nego kod muškaraca) i prevalencom 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 artritismom, pokazuje 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 antigena; 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 ukazu 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, najvjerovatnije 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, celijakija, 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 ozlijeđenim 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⁺T ćelije. Makrofagi i limfociti stvaraju upalne citokine i hemokine (TNF, GM-CSF, razni interleukini, interferon γ), a oslobađanje upalnih posrednika pridonosi kako zglobnim tako i opštim simptomima RA. Obložne ćelije sinovije izlučuju niz tvari, uključujući stromelizin 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*) nagrizava 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 (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 proupalnih 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* dominira 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, Stanislawski-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. Allegratti 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. Turpenney 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 is 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., Llàcer 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 naslijeđeni 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).

Primijenjene metode istraživanja 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 чему 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 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 ispitanicima kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (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 region (HVR3) DRβ1 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 jeste sprečavaju razvoj bolesti. Ovi genotipovi nisu 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 DERAA. 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 informacijam o preciznosti i tačnosti sa kojom se mogu odrediti pojedine varijante *HLA-DRB1* genskog lokusa, a postignuti rezultati bi trebali doprinijeti 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 direktan 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-kuantitativnu 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 usklađeni 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) Primijenjene 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 kompletnu 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 određivanje sedimentacije eritrocita (ESR) uzeto je 1,8 ml krvi u vakutainer epruvete sa antikoagulansom natrijum citratom u koju je postavljena gradušana 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 izoliranja 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, krezol red, glicerin) neophodnim za odvijanje reakcije. 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) 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 svjetlom. 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.

Primijenjene metode istraživanja 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 примјењени метод истраживања при чему је важно оцијенити сљедеће:

1. Да ли су примјењене 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 prijаве 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 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 ispitanicima kontrolne grupe i pacijenata sa reumatoidnim artritismom (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 region (HVR3) DRβ1 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 jeste sprečavaju razvoj bolesti. Ovi genotipovi nisu 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 DERAA. 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 artritismom (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) Ukratko navesti rezultate do kojih je kandidat došao;
- 2) Ocijeniti da li su dobijeni rezultati jasno prikazani, pravilno, logično i jasno tumačeni, upoređujući sa rezultatima drugih autora i da li je kandidat pri tome ispoljavao dovoljno kritičnosti;
- 3) Posebno je važno istaћи do kojih novih saznanja se došlo u istraživaњу, koji je њихов теоријски и практични допринос, као и који нови истраживачки задаци се на основу њих могу утврдити или назирати.

VII ЗАКЉУЧАК И ПРЕЈЕДЛОГ

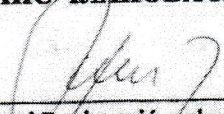
- 1) Doktorska disertacija mr. Biljane Klimenta je izrađena prema pravilima naučno-istraživačkog rada. Sveobuhvatnom analizom, utvrđeno je da ova doktorska disertacija predstavlja originalan naučni doprinos u oblasti primjenjene biohemije i molekularne biologije, što potvrđuju i objavljena dva originalna 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-hematološki 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 вредност, ако исте постоје дати позитивну вредност самој тези;
- 2) На основу укупне оцјене дисертације комисија предлаже:
- да се докторска дисертација прихвати, а кандидату одобри одбрана,
 - да се докторска дисертација враћа кандидату на дораду (да се допуни или измијени) или
 - да се докторска дисертација одбија.

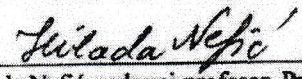
Датум: 29.01.2020. године

ПОТПИС ЧЛАНОВА КОМИСИЈЕ

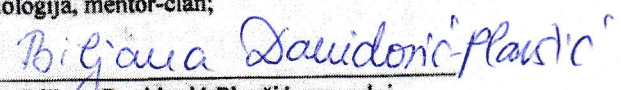
1.


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

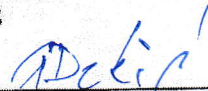
2.


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.

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 разлог због којих не жели да потпише извјештај.