

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Nataša J. Strelić

**ZNAČAJ MOLEKULARNE DETEKCIJE  
BAKTERIJA U PROCENI EFIKASNOSTI  
TERAPIJE RAJTEROVOG SINDROMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Nataša Strelić

SIGNIFICANCE OF MOLECULAR  
DETECTION OF BACTERIA IN ASSESSING  
EFFECTIVENESS OF TREATMENT OF  
REITER'S SYNDROME

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015

## **PODACI O MENTORIMA I ČLANOVIMA KOMISIJE:**

Mentori:

**Dr sci. med. Zvonko Magić**

Redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije  
Univerziteta odbrane u Beogradu

**Dr Jelena Knežević-Vukčević**

Redovni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Član komisije:

**Dr Bojana Cikota-Aleksić**

Naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske  
akademije u Beogradu

Datum odbrane \_\_\_\_\_ 2015. godine

## ZAHVALNICA

*Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru profesoru Zvonku Magiću na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da budem deo tima koji je pod njegovim rukovodstvom stvarao Laboratoriju za molekulsku genetiku u Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije i njegovoj nesebičnoj podršci, posebno u najtežim trenucima tokom izrade doktorske disertacije.*

*Takođe najiskrenije želim da se zahvalim mentoru sa Biološkog fakulteta, profesorki Jeleni Knežević-Vukčević na ogromnom trudu i vremenu koje je uložila na pažljivo čitanje ove disertacije, primedbama i sugestijama koje su doprinele da ovaj rad bude bolji.*

*Veliku zahvalnost dugujem profesorki Ljiljani Pavlici koja je pedantno i precizno vodila kliničke podatke o bolesnicima u Klinici za reumatologiju i kliničku imunologiju Vojnomedicinske akademije bez čije pomoći ova doktorska disertacija ne bi mogla biti urađena niti ostvareno moje naučno usavršavanje na Medicinskom fakultetu u Detroitu u Sjedinjenim američkim državama.*

*Profesorki Dragani Vučević, načelnici Odeljenja za molekulsku genetiku Instituta za medicinska istraživanja, se zahvaljujem na korisnim savetima, razumevanju i stalnoj podršci.*

*Posebno bih se zahvalila mojim koleginicama iz Laboratorije za molekulsku genetiku: dr Bojani Cikoti-Aleksić na velikoj pomoći u analizi rezultata i pisanju rada kao i podršci, dr Vesni Ilić na dugogodišnjoj toleranciji, pozitivnoj atmosferi i bodrenju, docentkinji Gordani Šupić i magistri Aleksandri Petković-Čurćin na podršci, diplomiranom biohemičaru Stevi Jovandiću na tehničkoj pomoći u obradi teksta, molekularnom biologu Bojani Miličević i svim članovima Instituta za medicinska istraživanja.*

*Neizmernu zahvalnostu dugujem roditeljima, bratu, rođacima i prijateljima koji su doprineli da budem sve ono što danas jesam i naravno mojoj porodici, Draganu, Sari, Strahinji i Stefanu bez čije ljubavi sve ove ne bi imalo smisla.*

## Abstrakt

Nalaz bakterija u sinoviji i sinovijskoj tečnosti inflamiranog zgloba je pobudilo nadu da bi antibiotska terapija mogla biti terapija izbora kod bolesnika sa Rajterovim sindromom. Cilj ove studije je bio da se evaluiira efekat sinovijektomije i antibiotske terapije na klinički tok i ishod artritisa kod bolesnika sa dijagnostikovanim urogenitalnim oblikom Rajterovog sindroma.

Posle sinovijektomije je kod 20 bolesnika primenjena antibiotska terapija azitromicinom (prva grupa), a kod 22 bolesnika kombinovana antibiotska terapija ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom (druga grupa). Prisustvo bakterija (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*) u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi je detektovano testom lančane reakcije polimerizacije (PCR). Vijabilnost *C. trachomatis*, najčešće nađene bakterije u drugoj grupi bolesnika, je u pomenutim uzorcima određivana RT- i „*real-time*” PCR testom.

Pre uvođenja terapije, DNK jedne ili više ispitivanih bakterija je detektovana kod svih bolesnika u najmanje jednom od ispitivanih uzoraka, izuzev kod jedne bolesnice lečene azitromicinom. Posle terapije, 8/16 bolesnika kod kojih je primenjena monoterapija azitromicinom i 9/18 bolesnika lečenih kombinovanom antibiotskom terapijom su imali negativan PCR nalaz u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, dok su vijabilne bakterije *C. trachomatis* nađene u mononuklearnim ćelijama periferne krvi bolesnika kod kojih nije postignuta klinička remisija.

Hirurška metoda sinovijektomije zajedno sa antibiotskom terapijom dovodi do postizanja kliničke remisije kod većine bolesnika. Na molekularnom nivou, remisija je povezana s negativnim PCR nalazom i/ili smanjenom ekspresijom hlamidijskih gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi.

**Ključne reči:** Rajterov sindrom, terapija, lančana reakcija polimerizacije

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Molekularna biologija

**UDK:** 579.882/.887:[616.72.002: [617.583+617.585]](043.3)

## Abstract

The finding of bacteria in the synovial fluid and tissue of the inflamed joint implied the possibility that the antibiotic treatment would be the therapy of choice for patients with Reiter's syndrome. The aim of this study was to evaluate effects of synovectomy followed by an antibiotic therapy on the clinical course and outcome of arthritis in patients with the urogenital form of Reiter's syndrome.

After synovectomy, the group of 20 patients received azithromycin (the first group), and another group of 22 patients underwent an antibiotic combination therapy with ciprofloxacin, tetracycline and roxithromycin (the second group). The synovial tissue and fluid obtained during the synovectomy and the peripheral blood mononuclear cells collected before and after the therapy were assessed by polymerase chain reaction (PCR) and Real-time PCR for (1) the presence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia pneumoniae* and (2) the viability of *Chlamydia trachomatis*, the most frequently found bacteria in the second group of patients.

Before the introduction of the therapy, the bacterial DNA was identified in at least one of investigated samples from all the patients, except for one in the azithromycin group. After the treatment, 8/16 patients receiving the azithromycin monotherapy, as well as 9/18 patients treated with an antibiotic combination therapy became PCR-negative for bacteria in the peripheral blood mononuclear cells. The patients who didn't achieve the clinical remission had viable *Chlamydia trachomatis* in the peripheral blood mononuclear cells.

The surgical method, synovectomy, in addition to the antibiotic therapy resulted in clinical remission in the majority of patients. At molecular level, the remission was

associated with the negative PCR findings and/or decreased expression of chlamidial genes in the mononuclear cells of peripheral blood.

**Keywords:** Reiter's syndrome, therapy, polymerase chain reaction

**Scientific field:** Biology

**Narrower scientific field:** Molecular Biology

**UDK:** 579.882/.887:[616.72.002: [617.583+617.585]](043.3)



## SADRŽAJ

UVOD .....	1
Rajterov sindrom.....	1
Etiologija urogenitalnog oblika Rajterovog sindroma .....	4
Infektivni agensi.....	4
Hlamidije .....	6
Opšte osobine .....	6
Građa ćelije hlamidija.....	8
Životni ciklus .....	9
Perzistentna infekcija hlamidija .....	12
Detekcija hlamidija.....	14
Mikoplazme .....	16
<i>Mycoplasma hominis</i> .....	18
<i>Ureaplasma urealyticum</i> .....	18
Detekcija mikoplazmi.....	19
Genetička predispozicija.....	19
Imunski mehanizmi .....	21
Urođena imunost .....	22
Stečena imunost.....	23
Terapija Rajterovog sindroma .....	24
HIPOTEZA I CILJEVI .....	26
MATERIJAL I METODE.....	29
Bolesnici.....	30
Uzorci.....	30
Metode.....	30
Izdvajanje mononuklearnih ćelija iz periferne krvi.....	30
Izolacija nukleinskih kiselina.....	31
Elektroforeza nukleinskih kiselina .....	32
Gelovi od agaroze.....	33
Gelovi od poliakrilamida .....	33
Lančana reakcija polimeraze .....	34
Reverzna transkripcija - PCR.....	39

Real-time PCR .....	40
REZULTATI .....	43
Kliničko demografski podaci o bolesnicima .....	44
Detekcija mikroorganizama.....	47
Prva grupa bolesnika (antibiotska terapija azitromicinom) .....	48
<i>Chlamydia trachomatis</i> .....	51
<i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	52
<i>Mycoplasma hominis</i> .....	53
<i>Ureaplasma urealyticum</i> .....	54
Druga grupa bolesnika (kombinovana antibiotska terapija) .....	55
<i>Chlamydia trachomatis</i> .....	58
<i>Chlamydia pneumoniae</i> .....	61
<i>Mycoplasma hominis</i> .....	64
Analiza vijabilnosti bakterija .....	65
DISKUSIJA .....	71
ZAKLJUČCI .....	84
LITERATURA .....	88
BIOGRAFIJA .....	105
PRILOZI .....	107

## SKRAĆENICE

<b>AG</b>	antigen
<b>Cp</b>	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<b>Ct</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>DIF test</b>	direktni imunofluorescentni test
<b>DNK</b>	dezoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic Acid, DNA</i> )
<b>dNTP</b>	dezoksiribonukleozid-trifosfat (engl. <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
<b>ET</b>	elementarno telo
<b>HeLa ćelije</b>	ćelije karcinoma grlića materice bolesnice H.L. (Henrietta Lacks)
<b>Hep-2 ćelije</b>	humane epitelne ćelije
<b>HLA-B27</b>	humani (ljudski) leukocitni antigen (engl. <i>Human Leucocyte Antigen</i> )
<b>hsp60</b>	gen koji kodira protein toplotnog šoka (engl. <i>heat shock protein</i> )
<b>HSP60</b>	protein toplotnog šoka
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	interferon gama
<b>IgA</b>	imunoglobulin A
<b>IgG</b>	imunoglobulin G
<b>IgM</b>	imunoglobulin M
<b>iRNK</b>	informaciona RNK
<b>LGV</b>	<i>Lymphogranuloma venereum</i>
<b>LPS</b>	lipopolisaharid
<b>Mh</b>	<i>Mycoplasma hominis</i>
<b>MHC</b>	glavni kompleks tkivne kompatibilnosti (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>MNC<sup>1</sup></b>	mononuklearne ćelije periferne krvi pre terapije
<b>MNC<sup>2</sup></b>	mononuklearne ćelije periferne krvi posle terapije
<b>MOMP</b>	glavni protein spoljašnje membrane (engl. <i>Major Outer Membrane Protein</i> )
<b>NK ćelije</b>	ćelije prirodne ubice (engl. <i>Natural Killer</i> )
<b>NSAIL</b>	nesteroidni anti - inflamatorni lekovi (engl. <i>nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs</i> )
<b>omp A</b>	gen koji kodira spoljašnji protein membrane

<b>PCR</b>	lančana reakcija polimerizacije (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RT</b>	retikularno telo
<b>ReA</b>	reaktivni artritis
<b>RF</b>	reumatoidni faktor
<b>RNK</b>	ribonukleinska kiselina (engl. <i>Ribonucleic Acid, RNA</i> )
<b>RQ</b>	relativna kvantifikacija
<b>rRNK</b>	ribozomalna RNK
<b>RS</b>	Rajterov sindrom
<b>RT-PCR</b>	reverzna transkripcija PCR
<b>S</b>	sinovija
<b>SAPHO</b>	sinovitis, akne, palmo-plantarna pustuloza, hiperostoza, osteitis
<b>ST</b>	sinovijska tečnost
<b>TAP</b>	transporter uključen u preradu antigena (engl. <i>transporter associated with antigen processing</i> )
<b>Th</b>	pomoćnički T-limfocit (engl. <i>T helper cells</i> )
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	faktor nekroze tumora
<b>Uu</b>	<i>Ureaplasma urealyticum</i> ;
<b>VD</b>	varijabilni domen

**UVOD**

Reumatske bolesti su oboljenja lokomotornog sistema (kostiju, zglobova, mišića i okolnih struktura) koja često zahvataju druge organe i organske sisteme. Njihova etiologija je nedovoljno poznata a patogeneza je delimično izučena. Svima su zajednički simptomi bol i ograničeni pokreti zahvaćenih delova tela što utiče na svakodnevni kvalitet življenja.

Seronegativne spondiloartropatije predstavljaju skupinu reumatskih bolesti koje zahvataju kičmu, periferne zglobove, pripoje tetiva, ligamente a mogu da budu udružene i sa bolestima očiju, kože, srca i pluća. Seronegativne se nazivaju zato što je vrednost autoantitela reumatoidnog faktora (RF) u krvi obolelih unutar referentnih vrednosti. Kod nekih od ovih bolesti je humani leukocitni antigen (HLA)-B27 prisutan kod većine bolesnika pa je za njihovo pojavljivanje pokazana jasna genetički određena sklonost. Međutim, na pojavu bolesti, pored genetičke predispozicije utiču i drugi faktori kao što su pol, godine života, infektivni agensi.

Spondiloartropatijama pripadaju: Rajterov sindrom (RS)/reaktivni artritis (ReA), ankilozirajući spondilitis, psorijazni artritis, enteropatijski artritis, SAPHO sindrom i nediferencirana spondiloartropatija (Popović, 2000).

### Rajterov sindrom

Rajterov sindrom je seronegativni reaktivni artritis koji se ispoljava posle 4-6 nedelja od akutne urogenitalne ili enterokolitisne infekcije. Klasična triada koja uključuje artritis, uretritis i konjunktivitis, nije prisutna kod svih bolesnika (Tabela 1).

Tabela 1. Kliničke manifestacije\* Rajterovog sindroma

<u>Artritisne</u>	<u>Urogenitalne</u>	<u>Kožne</u>	<u>Okularne</u>	<u>Kardiološke</u>
Asimetrične	Nespecifični uretritis	Keratoderma	Konjunktivitis	Aortitis
Oligo	Cervicitis	blenorhagica	Akutni	Insuficijencija aorte
Donji ekstremiteti	Cistitis	Balanitis circinata	prednji uveitis	Blokada srca
Entezitis	Hematurija	Ulceracija na jeziku		
Sakroilitis	Hidronefroza			

\* Bolesnici mogu imati jednu, više od jedne ili sve pomenute kliničke manifestacije (Barth, 1999).

Pridružene oftamološke i/ili mukokutane promene čine kliničku sliku potpunog oblika bolesti.

Hipokrat je u četvrtom veku pre nove ere verovatno bio prvi koji je povezao reaktivni artritis i infekciju u urogenitalnom traktu kada je primetio da „mladi muškarci ne pate od gihta dok ne počnu sa seksualnom aktivnošću“ (giht je bio sinonim za akutni artritis u to vreme) (Colmegna, 2004). Interesantno je da historijske zabeleške koje se odnose na Kristofera Kolumba ukazuju na to da je i on patio od artritisa povezanog sa inflamacijom oka koji se javio na njegovom prvom putovanju ka Novom svetu. Bolest je bila progresivna na donjim ekstremitetima i poslednjih godina života usled reumatoloških problema nije bio u mogućnosti da se kreće (Hoenig, 1992).

Engleski lekar Benjamin Brodie je 1818. godine prvi opisao klasičnu „triadu“ (artritis, uretritis i konjunktivitis) kod pet bolesnika (Brodie, 1818).

Dva francuska naučnika, Fiessinger i Leroy su 1916. godine opisali četiri slučaja uretritisa, artritisa, konjunktivitisa i dijareje kao „okulo-uretro-sinovijski“ sindrom (Fiessinger i Leroy, 1916). Ova klinička asocijacija je još uvek poznata u Francuskoj kao Fiessinger i Leroy-ev sindrom.

Hans Conrad Reiter je opisao sličan klinički sindrom kod mladog nemačkog vojnika i naveo spirohetalnu infekciju kao okidač za pojavu bolesti (Reiter, 1916). Eponim Rajterov sindrom (engl. *Reiter's syndrome*) je usvojen u američkoj medicinskoj literaturi ali se za ovo oboljenje poslednjih godina koristi i naziv reaktivni artritis (Braun, 2000; Wallace, 2000; Gottlieb, 2003; Panush, 2007).

Učestalost Rajterovog sindroma je oko 30-200 slučajeva na 100 000 stanovnika, ali postoje velike razlike između različitih geografskih lokacija. To je bolest mladih ljudi koja se podjednako javlja i kod muškaraca i kod žena najčešće u trećoj deceniji života mada mogu oboleti i deca i starije osobe. Muškarci češće oboljevaju od urogenitalnog oblika i taj odnos se kreće od 3:1 do 15:1 (Hamdulay, 2006; Kwiatkowska, 2009). Belci oboljevaju češće nego crnci što se dovodi u vezu sa većom učestalosti HLA-B27 gena kod bele populacije.

Prema ranijim shvatanjima artritis u Rajterovom sindromu je reaktivne prirode, što podrazumeva nemogućnost izolacije prouzrokovala iz obolelog zgloba. Međutim, u

poslednje vreme ima sve više autora koji na osnovu dosadašnjih rezultata o nalazu hlamidije i ureaplazme u obolelom zglobu, iznose uverenje da je artritis u Rajterovom sindromu uslovljen prisustvom infektivnog agensa (Schumacher, 2000).

Tipičan Rajterov sindrom počinje akutnom urogenitalnom ili enteralnom infekcijom koja obično prođe za nekoliko dana. Za infekciju uretre (uretritis) najčešće je odgovorna bakterija iz roda *Chlamidya* koja se prenosi seksualnim putem. Hlamidijski uretritis je jedna od nekoliko bolesti koje su poznate pod zajedničkim nazivom negonokokni uretritis. Preko 50% slučajeva negonokoknog uretritisa čini uretritis uzrokovan hlamidijom, 25% uretritis uzrokovan ureaplazmom, a preostalih 20% su nepoznati prouzrokaivači.

Enteralne infekcije uzrokuju različite bakterije kao što su npr. bakterije iz rodova *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobakter* i *Yersinia*. U početku se mogu javiti opšti simptomi (povišena telesna temperatura, nelagodnost, umor, znojenje) a posle perioda od jedne do četiri nedelje se javljaju oftamološke manifestacije bolesti (najčešće konjunktivitis) i artritis (zapaljenje zgloba). Artritis je vodeći znak bolesti koji počinje naglo i obično zahvata jedan ili nekoliko zglobova asimetrično na donjim ekstremitetima (kolena, skočni zglobovi, mali zglobovi stopala), a ređe zglobove na gornjim ekstremitetima. Kod artritisa koji je uzrokovan hlamidijama, kolena su zahvaćena kod 70%, skočni zglobovi u 57%, nožni prsti u 35% i ručni zglobovi i prsti u 45% bolesnika (Kwiatkowska, 2009). Kada se javi otok prsta, on u celini poprima kobasičast izgled (Slika 1)



**Slika 1. Daktilitis III prsta desnog stopala**  
(Preuzeto sa [http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRdnea0TA4-hRhwJmfXtkCL\\_5GmsN-THDJ90MHhfmgVG300JE-Ny](http://t2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcRdnea0TA4-hRhwJmfXtkCL_5GmsN-THDJ90MHhfmgVG300JE-Ny))

U isto vreme, neposredno pre ili posle simptoma na zglobu, javljaju se promene na koži i sluzokoži a kod nekih bolesnika i zapaljenske promene u drugim organima ili sistemima (kardiovaskularnom, centralnom i perifernom nervnom sistemu, plućima) što ovoj bolesti daje multisistemski karakter (Popović, 2000).

Nije moguće predvideti koliko dugo će bolest trajati. U nekim slučajevima simptomi bolesti traju nekoliko nedelja. Kod većine bolesnika simptomi traju 3 - 6 meseci i zatim



nestaju bez ostavljanja posledica, a kod jednog od tri bolesnika artritis traje duže od šest meseci, ponekad i godinama. Rajterov sindrom ima recidivski ili hronični karakter kod 15-50% bolesnika (najčešće kod onih kod kojih je artritis uzrokovan bakterijama koje pripadaju rodu *Chlamydia*). U najvećem broju slučajeva ima dobru prognozu jer ne ostavlja funkcionalne poremećaje.

Ne postoje specifični laboratorijski pokazatelji na osnovu kojih bi se mogla postaviti dijagnoza bolesti. U akutnoj fazi, u recidivu bolesti kao i kod pogoršanja bolesti hroničnog oblika Rajterovog sindroma povećani su nespecifični pokazatelji zapaljenja: sedimentacija eritrocita, fibrinogen, C reaktivni protein, haptoglobin i  $\alpha_2$  - globulin.

Reumatoidni faktor klase IgM se može naći do 5% kao i u populaciji zdravih.

#### Etiologija urogenitalnog oblika Rajterovog sindroma

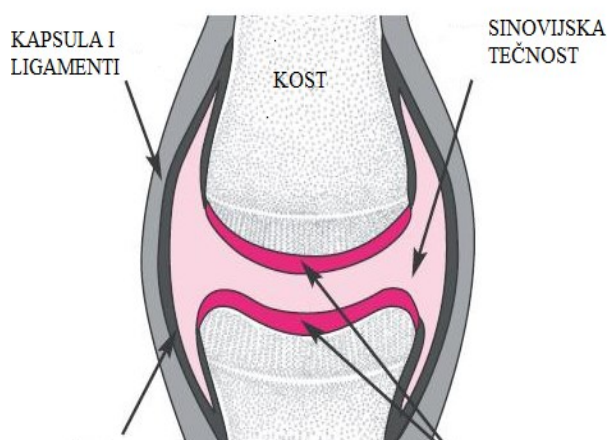
Za etiopatogenezu Rajterovog sindroma su odgovorni infektivni agensi, genetička predispozicija i imunski mehanizmi (humoralni i celularni imunski odgovor).

#### Infektivni agensi

Uspostavljanje veze između mikroorganizma i nastanka bolesti godinama predstavlja problem. Da bi se odredilo da je neki mikroorganizam uzročnik određene bolesti npr. artritisa, on bi trebao da se detektuje kod većine, ako ne i kod svih bolesnika, kao i da dovede do razvoja bolesti u životinjskim modelima (ovde treba imati na umu da je to nemoguće u slučajevima gde patogeni imaju specifičnog domaćina). Takođe, trebalo bi da dođe do specifičnog imunskog odgovora. Originalni Kohovi postulati nisu mogli da pokriju sve kriterijume koji su bili potrebni istraživačima da bi potvrdili da je neki mikroorganizam etiološki faktor u nastanku artritisa kod ljudi. Zato su oni modifikovani i prošireni (Taylor-Robinson, 2001).

Nije jasno zašto se simptomi razvijaju u telu na mestima koja su udaljena od mesta primarne infekcije. Jedna teorija je da delovi mrtvih bakterija ulaze u cirkulaciju i dospevaju u sinoviju zgloba i predstavljaju okidač za zapaljenje zgloba.

Zglob je mesto gde se sastaju dve kosti. Zglobovi omogućavaju kretanje i pokretljivost različitih delova tela. Kretanje kostiju je moguće zahvaljujući mišićima koji su tetivama pričvršćeni za kost. Između hrskavica koje pokrivaju krajeve dve kosti u zglobu nalazi se mala količina tečnosti nazvana sinovijska tečnost koja „podmazuje“ zglob i obezbeđuje glatko kretanje. Sinovijsku tečnost stvara sinovija - tkivo koje obavija zglob. Spoljašnji deo sinovije se naziva kapsula. Taj deo je čvrst, daje stabilnost zglobu i zaustavlja kretanje kostiju van zgloba. Okolni ligamenti i mišići takođe pomažu u davanju čvrstine i stabilnosti zglobova (Slika 2).



**Slika 2. Anatomija zgloba**

(Preuzeto sa:

[http://www.arthritiscare.org.uk/AboutArthritis/Howjointwork/main\\_content/EeaF/small](http://www.arthritiscare.org.uk/AboutArthritis/Howjointwork/main_content/EeaF/small) i modifikovano)

sterilna struktura već zona koja može biti naseljena bakterijama koje vode poreklo iz okoline ili iz endogene flore (Sibilia, 2002). Tako mikroorganizmi unutar zgloba, ovisno o karakteristikama domaćina, mogu biti eliminisani ili mogu dovesti do infekcije sinovije.

Pokretači urogenitalnog oblika Rajterovog sindroma su *Chlamydia trachomatis* i genitalne mikoplazme (*Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*, ređe) a enterokolitnog bakterije iz rodova *Shigella*, *Salmonella* i *Yersinia*, *Campilobacter jejuni* i *Clostridium difficile* (Barth, 1999).

Zglobovi se ponašaju u mnogo čemu kao deo retikuloendotelnog sistema i predstavljaju glavna mesta za „smeštaj“ infektivnih agenasa (Schumacher, 1995). Infektivnih agensi mogu ući u zglob preko krvnih sudova cirkulišući krvlju ili unutar mononuklearnih ćelija, vrste belih krvnih zrnaca (leukocita) koje im služe za transport ili kao deo imunskih kompleksa.

Otkriće bakterijske DNK i istovremenog prisustva RNK u uzorcima sinovije je pokazalo da sinovija nije

## Hlamidije

### Opšte osobine

Hlamidije pripadaju među najstarije opisane humane patogene i interesantne su istraživačima zbog njihovog obligatnog intracelularnog životnog ciklusa, malog genoma i velikog broja bolesti koje uzrokuju.

Ranije se smatralo da su hlamidije virusi jer su prolazile kroz filtere koji inače zadržavaju bakterije i nisu mogle da rastu na veštačkim podlogama. Da hlamidije nisu virusi postalo je jasno 1965. godine zahvaljujući tehnikama kulture tkiva i elektronskoj mikroskopiji kada je dokazano prisustvo bakterijskog ćelijskog zida, DNK i ribozoma.

Sve hlamidije su obligatni intracelularni paraziti koji uzrokuju široki spektar različitih bolesti ljudi i životinja. Po strukturi ćelijskog zida su slične Gram negativnim bakterijama. Sferičnog su oblika prečnika 0.2-1.5 $\mu$ m (Vivoda, 2011). Prema najnovijoj klasifikaciji hlamidije su taksonomski svrstane u red Chlamydiales sa jednom porodicom Chlamydiaceae unutar koje se nalaze dva roda: *Chlamydia* i *Chlamydofila* (Bush, 2001).

*Chlamydia trachomatis* i *Chlamydia pneumoniae* su humani patogeni. Njihov način prenošenja sa osobe na osobu, učestalost i kliničke manifestacije se značajno razlikuju pa je 1999. godine predložena nova taksonomska klasifikacija prema kojoj je *Chlamydia pneumoniae* dobila naziv *Chlamydofila pneumoniae* (Everett, 1999). Međutim, predložena promena u taksonomskoj nomenklaturi za porodicu Chlamydiaceae još uvek nije u potpunosti prihvaćena pa su tako oba naziva i sada u upotrebi kod različitih autora.

*C. trachomatis* je glavni uzročnik slepila i seksualno prenosivih bolesti. Često se govori o „tihoj bolesti“ jer hlamidije ne dovode do obimnog oštećenje tkiva pa tako 80-90% inficiranih osoba nema simptome, ne leče se i mogu nezajući preneti bolest na druge osobe. Ako se jave simptomi (jedna do tri nedelje posle izlaganja), oni nastaju zbog inflamacije do koje dolazi zbog odgovora imunskog sistema u cilju sprečavanja širenja infekcije (Pommerville, 2011). Infekcije hlamidijama su znatno učestalije kod mladih polno aktivnih žena pa bi se skrining programi trebali fokusirati na ovu ciljnu grupu (Wilson, 2002; Harkins, 2011).

Na osnovu sekvenciranja gena *ompA* razlikuje se najmanje 15 seroloških tipova *C. trachomatis*. Dvanaest seroloških tipova su ograničeni na infekciju okularnih ili genitalnih epitelnih ćelija i nisu invazivni (Caldwell, 2003). A, B i C serološki tipovi izazivaju trahom - vodeći uzrok slepila u zemljama u razvoju. Najstariji podaci o ovoj bolesti su stari hiljadu godina i potiču iz Kine i Egipta. Iako zahvaljujući poboljšanim uslovima života sredinom prošlog veka trahom gotovo nestaje iz industrijalizovanog sveta, on i dalje predstavlja veliki problem u zemljama u razvoju. U najsiromašnijim područjima Afrike, Azije i na Bliskom istoku te u nekim delovima Latinske Amerike i Australije trahom je endemska bolest. Trenutno, oslabljeni vid koji je nastao kao posledica ove bolesti ima približno osam miliona ljudi dok od aktivne infekcije pati 84 miliona ljudi. Trahom se prenosi izravnim kontaktom sa sekretima oka, nosa i grla zaraženih osoba, odnosno sa predmetima koji su došli u dodir sa tim sekretima, kao što su npr. peškiri i optički instrumenti. D-K serološki tipovi izazivaju urogenitalne infekcije. Prenose se seksualnim kontaktom sa obolelom osobom. Takođe se mogu preneti u toku vaginalnog porođaja sa inficirane majke na novorođenče.

L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> i L<sub>3</sub> uzrokuju retke invazivne sistemske seksualno prenosive infekcije u tropskim predelima jugoistočne Azije, centralne i južne Amerike koje dovode do bolesti limfgranuloma venerum (LGV) (Blandea, 2001). LGV se češće javlja kod muškaraca nego kod žena i praćen je groznicom, slabošću, oticanjem i osetljivošću limfnih čvorova u preponama (Pommerville, 2011).

Za razliku od *C. trachomatis* koja se prenosi seksualnim putem, *C. pneumoniae* je respiratorni patogen koja se sa osobe na osobu prenosi respiratornim sekretima. Najčešće uočene manifestacije infekcije sa *C. pneumoniae* su pneumonia i bronhitis, ali se poslednjih godina ova bakterija dovodi u vezu i sa nerrespiratornim bolestima, uključujući inflamatorni artritis, arterosklerozu, multiplu sklerozu i Alchajmerovu bolest (Skowach, 2003; Contini, 2010).

Više laboratorija je u zglobu detektovalo prisustvo bakterijske DNK i/ili antigena iz ovog mikroorganizma koji se nije ranije dovodio u vezu sa bolestima zglobova (Schumacher, 1999; Gérard, 2000; Pavlica, 2003; Rizzo, 2012). Nije posve jasno da li je patogenezu u zglobu uzrokovana ili podržana sa *C. pneumoniae* ali je činjenica da je DNK

ove bakterije nađena u sinovijalnim tkivima kod malog ali još uvek značajnog broja bolesnika sa različitim oblicima artritisa. Neke analize su pokazale da je 13% tih bolesnika PCR pozitivno na ovu bakteriju (Schumacher, 1999). Obzirom na poznatu patobiologiju *C. pneumoniae* u kontekstu drugih bolesti, teško je poverovati da ova bakterija nije uključena u bolesti zglobova barem kod nekih bolesnika. Svakako će daljnja istraživanja rasvetliti sadašnje nepoznanice.

Ostale hlamidije uzrokuju bolesti kod životinja ali *Chlamydophila psittaci*, vrsta koja pripada istom rodu kao i *C. pneumoniae*, može biti uključena u respiratorne bolesti kod ljudi. *C. psittaci* prenose inficirane ptice pa je to rizik za zaposlene u prodavnicama kućnih ljubimaca i na farmama koje se bave uzgojem živine (Deschuyffeleer, 2012).

#### Građa ćelije hlamidija

Hlamidije imaju citoplazmatsku membranu i ćelijski zid koji sadrži lipopolisaharid što je karakteristika Gram-negativnih bakterija ali za razliku od njih, hlamidije u svom ćelijskom zidu nemaju peptidoglikan. Ova razlika u strukturi je najverovatnije funkcionalno povezana sa jedinstvenim životnim ciklusom hlamidija u kojem dolazi do reorganizacije ekstracelularnog oblika bakterija u intracelularni. Spoljašnja membrana se uvećava približno pet puta a takođe se menja i njena propustljivost da bi se omogućio ulazak velikih egzogenih metabolita kao što su npr. nukleozid trifosfati koje intracelularni oblik hlamidija ne može da sintetiše. Struktura spoljašnje membrane bez peptidoglikana omogućava veću funkcionalnu fleksibilnost nego što bi se moglo očekivati u prisustvu ovog protein-polisaharidnog jedinjenja (Caldwell, 1981).

Glavni protein spoljašnje membrane (engl. *major outer membrane protein, MOMP*) čini do 60% ukupnih proteina spoljašnje membrane. Sastoji se iz četiri varijabilna domena (VD) koji se nalaze na površini. Smatra se da ovaj protein osim strukturne uloge ima važnu ulogu u transmembranskom prolasku nutritivnih materija, otpadnih produkata, antibiotika a može biti i receptor za bakteriofage. Takođe se smatra da ovaj protein ima najveću ulogu u vezivanju hlamidija za ćeliju domaćina što je od presudne važnosti kod infekcije hlamidijom (Wang, 2006).

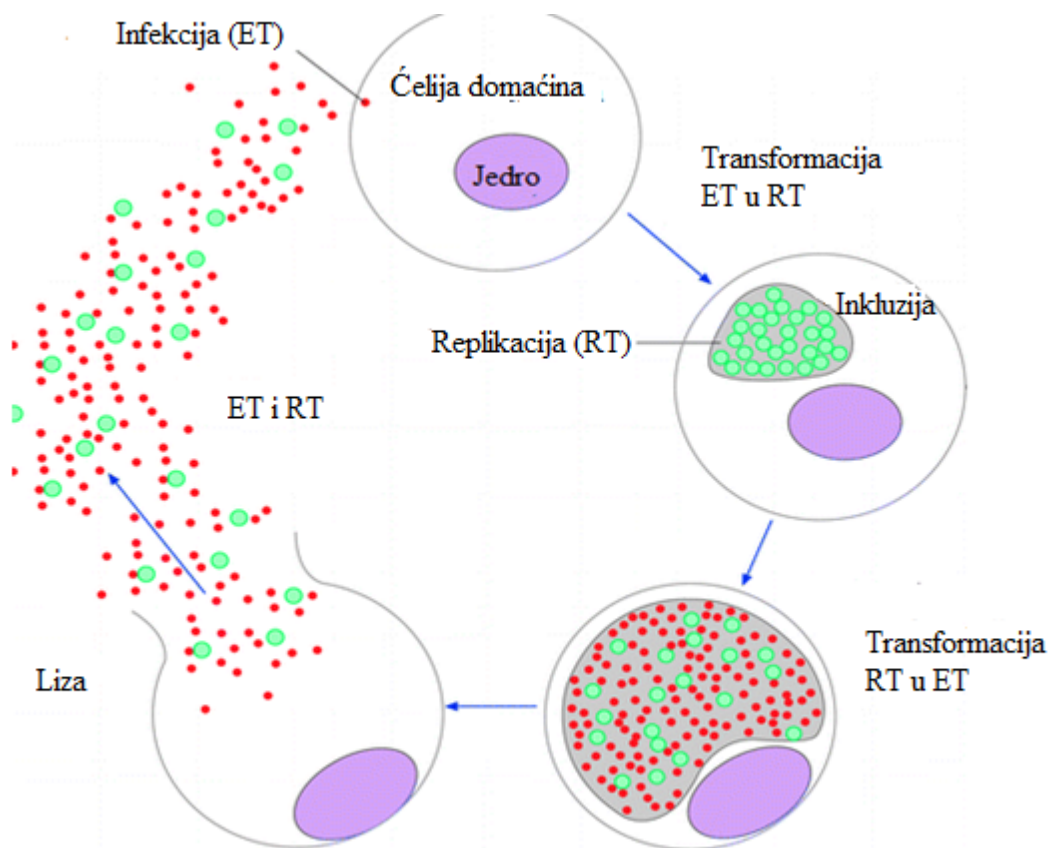
Hlamidije imaju mali genom. Analize sekvenci su pokazale da je u evoluciji obligatnih intracelularnih patogena došlo do značajne redukcije genoma praćeno gubitkom metaboličkih funkcija. U ustaljenoj sredini ćelije domaćina, obligatni patogeni nisu imali više potrebu za različitim genima koji su slobodno živućim organizmima omogućavali brzo prilagođavanje na uslove sredine. Ako je bilo potrebno to su mogli dobiti direktno od domaćina (Pommerville, 2011).

*C. trachomatis* pored malog i visoko konzervativnog genoma ima i plazmid od približno 7 kb (Commanducci, 1993). Retki su izolati koji ne poseduju plazmide. Plazmidi su vrlo korisni kao target u dijagnostičkim testovima jer su relativno stabilni i mnogo rezistentniji na delovanje nukleaza nego genom, a i prisutni su i do deset kopija po genomu (Seth-Smith, 2009). Nisu neophodni za vijabilnost bakterija ali su nedavne studije upoređivanjem patobioloških osobina vrsta bez plazmida i onih koje poseduju plazmid pokazale da plazmid može imati ulogu u virulenciji (Carlson, 2008).

### Životni ciklus

Zajednička osobina svih hlamidija je njihov specifičan razvojni ciklus koji se razlikuje u odnosu na razvojni ciklus ostalih bakterijskih vrsta. Hlamidije se javljaju u dva morfološka oblika: elementarno telo (ET) i retikularno telo (RT) (Slika 3).

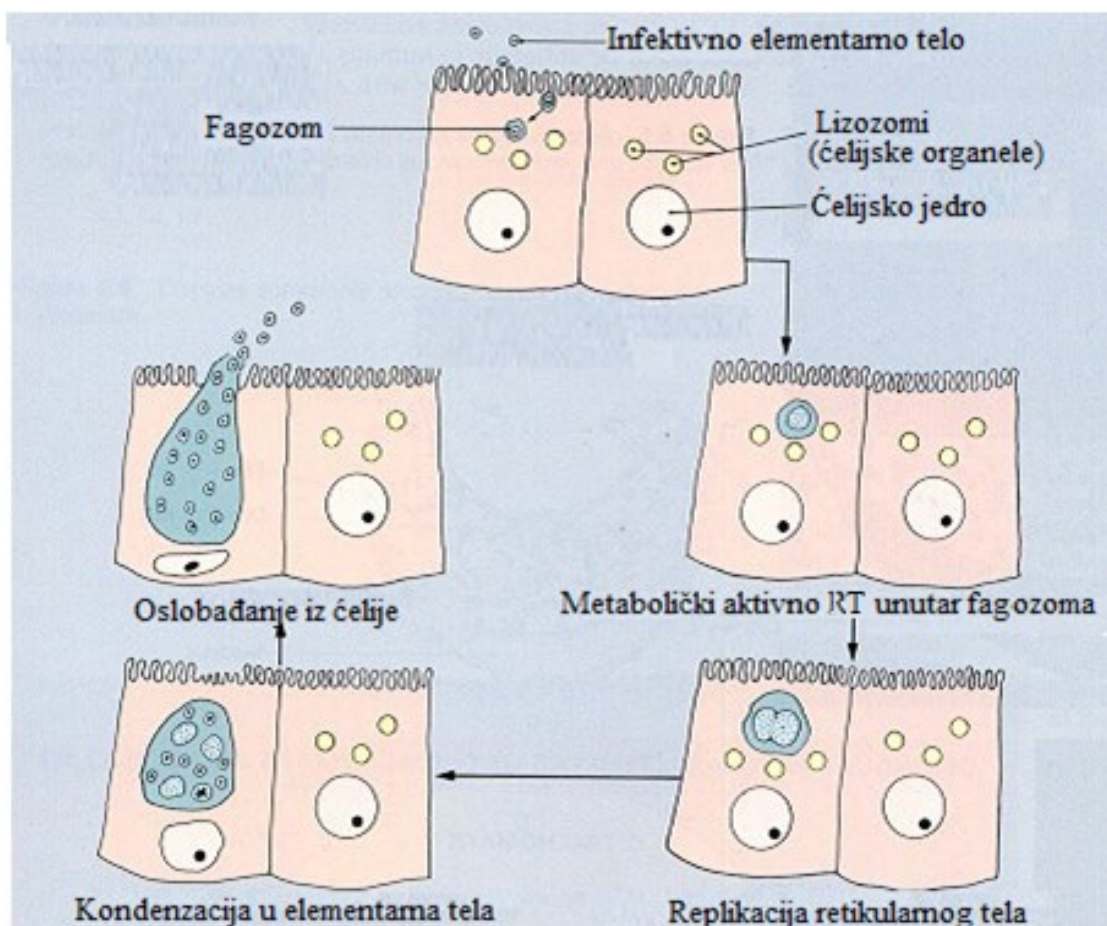
Elementarno i retikularno telo predstavljaju evolutivne forme adaptacije ovih bakterija na ekstracelularne i intracelularne uslove života. Prečnik elementarnog tela varira od 0,2-0,6  $\mu\text{m}$  dok je kod retikularnog tela veći i iznosi 1,5  $\mu\text{m}$ . Elementarno telo je metabolički neaktivno, predstavlja infektivni oblik i poseduje veoma izdržljiv ćelijski zid prilagođen za ekstracelularno preživljavanje. Ono se vezuje za odgovarajuću eukariotsku ćeliju domaćina - primarno epitelnu ćeliju, kod sisara mukozne površine grlića materice, uretre, rektuma, nazofarinksa i konjunktive (Bobo, 1990) ali mogu biti inficirane i mnoge druge ćelije kao što su vaskularne endotelne ćelije, glatke mišićne ćelije, monociti, neki ćelijski tipovi u centralnom nervnom sistemu i druge.



**Slika 3. Životni ciklus hlamidija:** ET= elementarno telo, RT= retkularno telo  
(Preuzeto sa: <http://www.cytologystuff.com/images/bioinfl> i modifikovano)

Elementarno telo ulazi u ćeliju endocitozom i životni ciklus hlamidija se odvija unutar vakuole obavijene membranom i poznate pod nazivom inkluzija ili fagozom (Slika 4). Preživljavanje različitih seroloških tipova hlamidija je u direktnoj vezi sa sposobnošću hlamidijskih fagozoma da izbegnu fuziju sa lizozomima (Scidmore, 2003).

Svako elementarno telo prolazi transformaciju koja se posle nekoliko časova završava stvaranjem metabolički aktivnog retikularnog tela prilagođenog za intracelularno preživljavanje i umnožavanje. Retikularno telo ima sposobnost sinteze DNK, RNK i proteina. Unutar fagozoma bakterije se razmnožavaju binarnom deobom obrazujući intracelularnu inkluziju koja može kroz 18-30 sati zauzeti do dve trećine volumena ćelije domaćina.



Slika 4. Shematski prikaz ulaska elementarnog tela u ćeliju endocitozom i oslobađanja lizom ćelije;  
RT=retikularno telo

(Preuzeto sa: [http://www.tjclarkinc.com/bacterial\\_diseases/hold/lifecycle](http://www.tjclarkinc.com/bacterial_diseases/hold/lifecycle) i modifikovano)

Ćelijski zid retikularnog tela nema čvrstinu kao kod elementarnog tela i retikularno telo ne može preživeti izvan ćelije domaćina. Da bi se retikularno telo kondenzovalo i reorganizovalo nazad u elementarno telo potrebno je da prođe nekoliko ćelijskih deoba (vremenski otprilike jedan dan). Ova nova elementarna tela se oslobađaju iz ćelije domaćina lizom ili egzocitozom i iniciraju infekciju susednih ćelija i tako se infekcija širi ili prenosi na drugu individuu (Owlia, 2010). Saznanja o životnom ciklusu hlamidija proizlaze iz *in vitro* studija u kojima su inficirane ćelije domaćina dopuštale aktivan rast hlamidija (Gérard, 1997).



Dužina kompletnog razvojnog ciklusa zavisi od bakterijskog soja, osobina ćelije domaćina kao i od uslova sredine. *C. trachomatis* je potrebno 50 sati da završi svoj životni ciklus u inficiranim HeLa ćelijama. *C. pneumoniae* je potrebno 72 sata da bi završila životni ciklus u Hep-2 ćelijama (Villareal, 2002).

Premda je pomoću mikroskopa razvojni ciklus hlamidija dobro karakterisan, nisu u potpunosti poznati molekularni mehanizmi koji dovode do međusobne konverzije morfološki različitih oblika. Nicholson i saradnici su svojim istraživanjima pridoneli razumevanju globalne regulacije gena i intracelularne biologije ovog jedinstvenog patogena (Nicholson, 2003). Regulacija gena se odvija u tri faze. Fazi I pripadaju geni koji se eksprimiraju rano posle infekcije i koji su uključeni u osnovno funkcionisanje ćelije (DNK replikacija, transkripcija, translacija, transport, stvaranje energije). Strukturalna stabilnost bakterija se postiže disulfidnim vezama proteina membrane. Redukovanjem ovih veza u membrani omogućena je transformacija elementarnih tela u veća retikularna tela (Hackstadt, 1985). Produkcija retikularnih tela doseže svoj maksimum osamnaest časova posle infekcije i tada dolazi do inicijacije reorganizacije retikularnih tela. U fazu II su uključeni geni čiji produkti imaju ključnu ulogu u ranim fazama prelaska retikularnih tela u elementarna tela (inicijacija DNK kondenzacije koja prethodi reorganizaciji spoljašnje membrane). Fazi III pripadaju geni koji se aktivno ne eksprimiraju pre 24-og časa od trenutka infekcije. Među njima se nalaze geni *omcA* i *omcB* koji kodiraju dva membranska proteina.

#### Perzistentna infekcija hlamidija

Perzistentna infekcija hlamidija predstavlja njihov izmenjen životni ciklus koji se razlikuje od aktivnog rasta (Koehler, 1997; Gérard, 2002; Klos, 2009). Iako tačan molekularni mehanizam kojim hlamidije ulaze i izlaze iz perzistentne faze još nije u potpunosti poznat nema sumnje da ova faza ima veoma važnu ulogu u preživljavanju ovih dobro prilagođenih intracelularnih patogena. Odstupanje od tipičnog razvojnog ciklusa je vezano za promenjene uslova sredine kao što su: prisustvo antibiotika, nedostatak esencijalnih nutritivnih materija, izlaganje interferonu- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (Harper, 2000; Al-Younes, 2001; Byrne, 2001). Ovakvi uslovi odlažu sazrevanje retikularnih tela, inhibiraju njihovu

diferencijaciju u infektivno elementarno telo i povezani su sa brojnim morfološkim izmenama retikularnog tela koje se odnose na postojanje krupnih atipičnih formi hlamidija. Ove promene su reverzibilne kada se odstrani faktor koji inhibira rast (Beatty, 1994; Hogan, 2004).

Do izmenjenog oblika bakterije najverovatnije dovodi smanjenje transkripcije gena *omp1* koji kodira hlamidijski glavni protein spoljašnje membrane. Produkt ovog gena je najvažnija komponenta na površini bakterije. Ekspresija gena *hsp60* koji kodira visoko imunogeni protein HSP60 je povećana (Gérard, 1998, 2004). Postoje i druge razlike u transkripciji gena između aktivnog rasta hlamidija i njene perzistentne infekcije. Geni čiji su produkti uključeni u replikaciju DNK i deobu eksprimiraju se i u jednom i u drugom životnom ciklusu, ali je u perzistentnom stanju smanjena ekspresija gena čiji su produkti neophodni za citokinezu (Gerard, 2001). Na taj način je značajno smanjena produkcija novih infektivnih elementarnih tela.

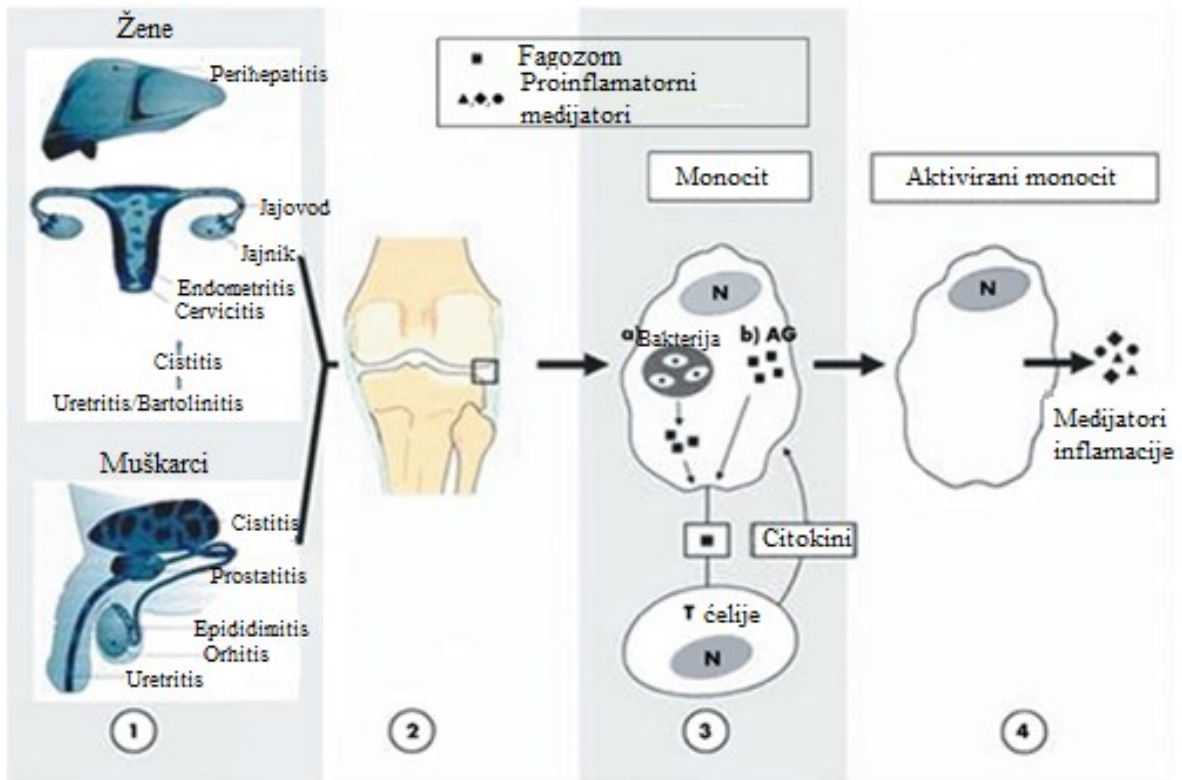
Uspostavljanje perzistentne infekcije u zglobu je verovatno potrebno za kontinuiranu sintezu antigena neophodnih za održavanje sinovijske inflamacije (Slika 5).

U toku perzistentne infekcije, u uzorcima sinovije detektovana je hlamidijska RNK (Gérard, 1998) što predstavlja dokaz o vijabilnosti organizma budući se PCR-om može detektovati i DNK mrtvih hlamidija.

Za vreme dugotrajne infekcije sinovije, ćelije domaćini za perzistentne organizme su mononuklearne ćelije: monociti i makrofage (Munoz-Elias, 2002).

Nema podataka o tome koliko dugo mogu opstati inficirani monociti/makrofagi u sinoviji odnosno koliko dugo bakterije u perzistentnom stanju mogu egzistirati u monocitima/makrofagama. Odgovor na ovo pitanje bi svakako imao veliki klinički značaj. Takođe se ne zna da li je *C. trachomatis* potpuno odstranjena iz sinovije bolesnika sa akutnim artritismom kod kojih se ne razvija hronični oblik bolesti kao i da li organizmi mogu ostati u sinoviji u perzistentnom stanju, a da nema znakova bolesti.

Sledeće važno pitanje je zašto se kod mnogih bolesnika sa hroničnim artritismom smenjuju epizode aktivne i pritajene bolesti.



**Slika 5. Patogeneza artritisa koji je uzrokovan hlamidijom.** [1] Primarna urogenitalna infekcija; [2] diseminacija bakterija u zglob; [3] intracelularna perzistentna infekcija bakterija (a) i sinteza antigena (AG) unutar fagozoma (b) koje detektuju T ćelije koji aktiviraju monocyte sa više citokina; [4] proizvodnja i oslobađanje proinflammatory medijatora od strane aktiviranih monocita što dovodi do uspostavljanja i održavanja inflamacije. (Preuzeto iz Rihl, 2006 i modifikovano)

Sva ova pitanja su važna sa kliničkog/terapijskog i naučnog stanovišta jer neadekvatna antibiotska terapija može omogućiti hlamidijama da perzistiraju *in vivo* (Nanagara, 1995; Wolf, 2000; Villareal, 2002).

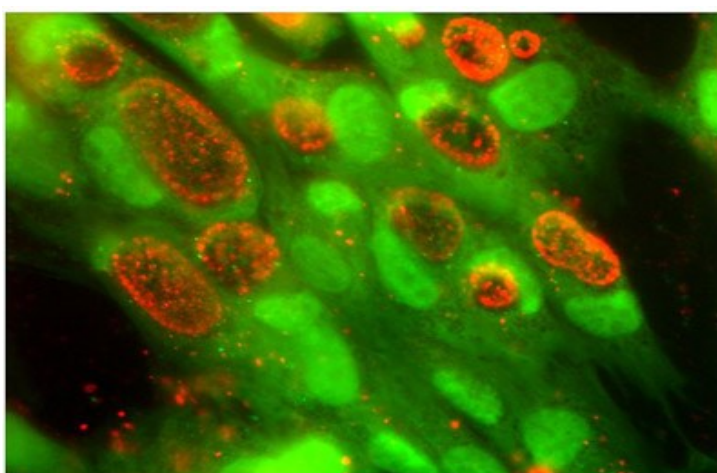
### Detekcija hlamidija

Postoje različiti testovi kojima se mogu detektovati hlamidije koji su manje ili više specifični.

Elementarna tela se mogu detektovati izolacijom organizma u ćelijskoj kulturi koja je bila tradicionalna metoda u laboratorijskoj dijagnostici zbog svoje specifičnosti ali je sistem ćelijske kulture tehnički komplikovan, zahteva mnogo vremena (2-3 dana), skupu opremu i posebne podloge za transport (Peterson, 1989; Peeling, 1996). Takođe su česti negativni nalazi *C. trachomatis* korišćenjem standardne laboratorijske kulture sinovijskog tkiva. Zbog malog broja pozitivnih nalaza *C. trachomatis* u laboratorijskim kulturama sinovijskog materijala ranije se smatralo da je živi mikroorganizam veoma retko ili nikada prisutan u sinoviji i da je inflamacija karakteristična za reaktivni artritis jednostavno rezultat imunopatoloških procesa koji su pokrenuti kao odgovor na mrtve organizme i njihove ostatke.

Hlamidijske inkluzije se mogu detektovati direktnim imunofluorescentnim (DIF) testom (Ozdağ, 2007). Ovaj test se bazira na činjenici da se upotrebom monoklonskih fluorescentnih antitela na hlamidiju mogu detektovati antigeni hlamidije direktno sa mikroskopskih razmaza napravljenih od kliničkih uzoraka. Razmazi se zatim pregledaju pod fluorescentnim mikroskopom (Slika 6). Testovi koji identifikuje hlamidijske inkluzije u ćelijama na osnovu imunofluorescentnog bojenje su 100% specifični, ali im je senzitivnost, tj. osetljivost 80-90 %.

Serološki testovi su se pokazali neefikasnim u dijagnostici infekcija uzrokovanih *C.*



**Slika 6. Direktni imunofluorescentni test na hlamidiju** (slika pod mikroskopom: crvena boja označava hlamidiju) (Preuzeto sa <http://polnebolesti.com/slike/otkrivanje-hlamidije-dif-metodom.jpg>)

*trachomatis* iz dva razloga: prisustvo visokog titra pozitivnih antitela kod kontrola kao i moguća „krosreaktivnost“ sa antitelima koja su usmerena protiv *C. pneumoniae*. Kod ovih testova je takođe ograničena senzitivnost budući da je hlamidija obligatni intracelularni patogen koja se bori dominantno sa ćelijskim, a manje (ili uopšte ne) sa humoralnim imunskim

odgovorom. Antitela IgG podklase ne mogu pružiti podatak o nedavnoj infekciji jer ona mogu biti povećana mesecima posle infekcije (Colmegna, 2004). Iz toga razloga bi trebalo kombinovati i testove za IgM i IgA antitela koji ukazuju na akutnu ili perzistentnu infekciju. Međutim, ova antitela takođe mogu biti pozitivna kod kontrolne populacije što opet rezultira u smanjenju specifičnosti testa (Sieper, 2002).

Istraživačima koji su uključeni u studije vezane za artritis je potrebna pouzdana, brza i objektivna metoda za detekciju i identifikaciju mikroorganizama „okidača“ (eng. *triggering microorganisms*). PCR tehnologija, koja se zasniva na amplifikaciji nukleinskih kiselina korišćenjem lančane reakcije polimerizacije, je ultrasenzitivna molekularna tehnika kojom se može detektovati bilo koja vrsta bakterija čak i onda ako su prisutne i u malom broju u zglobu, mestu koje je udaljeno od primarnog mesta infekcije. Molekularno biološke tehnike se mogu koristiti za detekciju hlamidija u uzorcima cervikalnih i uretralnih briseva, urina, sinovijske tečnosti, sinovije i monocita periferne krvi bolesnika sa perzistentnom infekcijom (Class, 1990; Nikkari, 1997; Taylor-Robinson, 1992; Jatou, 2006; Schnitger, 2007; Carter, 2009).

Razvoj novih tehnika u poslednje dve dekade je omogućio da se dođe do novih veoma važnih saznanja da je prisustvo hlamidija u sinoviji pravilo, a ne izuzetak. Sledeći korak je bio ustanoviti da li su hlamidije u sinoviji zaista vijabilne i metabolički aktivne i, ako je tako, objasniti zašto je sinovijski materijal koji sadrži ove mikroorganizme negativan u kulturi.

Transkripcione analize kojima su ciljane sekvence bile različite hlamidijske informacione RNK (iRNK) kao i primarni transkripti ribozomalnih RNK (rRNK) operona su pokazale da su hlamidije u sinoviji zaista i vijabilne i metabolički aktivne (Gérard, 1998; Mathews, 1999).

## Mikoplazme

Bakterijskoj klasi Mollicutes pripada red Mycoplasmatales sa porodicom Mycoplasmataceae koja sadrži dva roda: *Mycoplasma* i *Ureaplasma*.

Naziv mikoplazme potiče od grčkih reči *mikes* (gljivice) i *plasma* (formirane) jer se usled njihovih karakteristika smatralo da su gljivice. Jedno vreme se smatralo da su i

mikoplazme virusi jer su prolazile kroz filtere koji su inače sprečavali prolaz bakterija. Prečnik im je manji od 1 mikrona ( $\mu\text{m}$ ) i zato ih je teško detektovati pomoću konvencionalnog mikroskopa. Nemaju čvrst ćelijski zid već samo plazma membranu i time se razlikuju od konvencionalnih bakterija. Kao posledica toga one su neosetljive na antibiotike koji deluju na sintezu ćelijskog zida (Taylor-Robinson, 1997). Za stabilnost njihove citoplazmatske membrane potrebni su steroli iz okoline, najčešće holesterol domaćina.

Mikoplazme imaju relativno mali genom što utiče na male biosintetske mogućnosti i objašnjava ovisnost o domaćinu. Premda mala veličina mikoplazmi i njihovog genoma sugerise da su oni najprimitivniji postojeći organizmi, hibridizacija nukleinskih kiselina i



**Slika 7. Kolonije Mycoplasma hominis i Ureaplasma urealyticum**

(Preuzeto sa [http://www.ureaplasma.info/images/photoalbum/album\\_1/mycoplasma\\_and\\_ureaplasma\\_t1.jpg](http://www.ureaplasma.info/images/photoalbum/album_1/mycoplasma_and_ureaplasma_t1.jpg))

sekvenciranje pokazuju da one potiču od grane gram-pozitivnih eubakterija sa ćelijskim zidom. Njihova evolucija je išla u smeru znatnog smanjenja veličine genoma, uključujući gubitak funkcija koje su potrebne za sintezu i održavanje ćelijskog zida bakterije.

Ova grupa bakterija uključuje više od 70 različitih vrsta. Mogu da budu parazitne ili saprofitne. Nekoliko vrsta su ljudski patogeni odgovorni za široki spektar bolesti pre svega respiratornog (*Mycoplasma pneumoniae*) i urogenitalnog (*Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*) trakta (Slika 7). Jedna od najznačajnijih odlika im je mnoštvo serotipova (antigenska različitost), što uspostavljanje trajnog imuniteta čini praktično nemogućim. Zbog toga su ponovljene infekcije mikoplazmama veoma česta pojava.

Mikoplazme su nađene u uzorcima krvi i tkiva bolesnika sa različitim hroničnim oboljenjima sa značajno većom učestalosti u poređenju sa zdravim kontrolama. Budući da se mikoplazme mogu naći kao deo normalne flore na površini urogenitalnog trakta i usne duplje ranije se smatralo da nisu patogene. Međutim, kada penetriraju u cirkulaciju i posebno u ćelije različitih tkiva ispoljavaju svoje patogene efekte.

Perzistentna infekcija mikoplazmom ima mnogo sličnosti sa perzistentnom infekcijom hlamidija.

#### *Mycoplasma hominis*

Kao i sve mikoplazme, tako i *Mycoplasma hominis* nema tipičan bakterijski ćelijski zid već je odvojena od okoline samo plazma membranom. *Mycoplasma hominis* pokazuje značajnu fenotipsku i genotipsku raznovrsnost. Serološke analize su pokazale da se heterogenost uglavnom odnosi na površinske antigene, dok su citoplazmatski antigeni konzervativni (Blanchard,1993).

*Mycoplasma hominis* je vrsta mikoplazme koja je najčešće (u odnosu na ostale mikoplazme) uključena u polne infekcije kod žena. Kao i ureaplazma, često se nalazi u vagini i može da uzrokuje infekcije ženskog i muškog genitalnog trakta. Takođe može uzrokovati infekcije van genitalija pogotovo kod osoba sa smanjenim imunitetom, kao i infekcije kod novorođenčadi.

#### *Ureaplasma urealyticum*

*U. urealyticum* je mala gram negativna bakterija koja je dobila naziv zbog njene sposobnosti digestije uree u hranjivim podlogama. Poznata je i pod nazivom T-mikoplazma (T-tiny=sićušan) zbog sićušnih kolonija koje stvara na hranjivoj podlozi. Može se pronaći u cerviksu i/ili vagini kod 40-80% seksualno zrelih, asimptomatskih žena. Kod muškaraca je rasprostranjenost ove bakterije u uretri nešto niža. Učestalost *U. urealyticum* je veća kod mlađih žena crne populacije, nižeg ekonomskog statusa, seksualno aktivnih sa više partnera (Cassell, 1993). *U. urealyticum* uzrokuje uretritis čiji su simptomi slični kao kod hlamidijskog uretritisa. Jedna od posledica infekcije ureaplazmom je sterilitet zbog malog broja i pokretljivosti spermatozoida. Takođe može da kolonizuje placentu za vreme trudnoće što može dovesti do spontanih pobačaja i prevremenih porođaja (Pommerville, 2011).

Urogenitalne mikoplazme se takođe mogu rasejati iz urogenitalnog trakta do drugih mesta posebno zglobova i biti uključene u patogenezu Rajterovog sindroma (Horowitz, 1994; Vittecoq, 1997).

Prema tome, nekoliko različitih vrsta bakterija mogu biti uzročnici istog sindroma koji uključuje uretritis, konjunktivitis i artritis.

### Detekcija mikoplazmi

Jedan od najvećih problema u detekciji mikoplazmi je bila relativna neosetljivost raspoloživih tehnika, seroloških i ćelijske kulture, u detekciji intracelularnih infekcija. Problem kultivisanja je prisutan kod mnogih vrsta, a konvencionalnu serološku detekciju infekcije mikoplazmom otežava odsustvo humoralnog imunog odgovora kod većine bolesnika. Takođe, metode detekcije u kojima se koriste antitela protiv antigena mikoplazme nisu pouzdane zbog toga što se mikoplazme mogu „sakriti“ unutar ćelija. Najpouzdanije kliničko testiranje infekcija mikoplazmom iz pune krvi, leukocita i tkivnih biopsija je postignuto PCR-om (Nicolson, 1998; Stellrecht, 2004; Dhawan, 2012).

### Genetička predispozicija

Rajterov sindrom se razvija samo kod malog procenta individua sa urogenitalnom ili gastrointestinalnom infekcijom. Oko 1% bolesnika sa negonokoknim uretritisom i do 3% bolesnika sa bakterijskim enteralnim infekcijama razvije artritis (Isomäki, 1978; Söderlin, 2002; Hannu, 2004). Prema tome, uspostavljanje dugotrajne bakterijske infekcije i inicijacije patoloških procesa koji dovode do nastanka bolesti izgleda da uključuje faktore koji su specifični za genetički "*back-ground*" onih bolesnika kod kojih se razvija bolest (Yu, 2003). Potpuno razumevanje genetičkih i drugih faktora domaćina još nije postignuto. Međutim, jedan od tih faktora koji je zaokupio pažnju istraživača kao faktor koji ima udela u razvoju bolesti je prisustvo HLA-B27 antigena.

Gen HLA-B27 je smešten na hromozomu 6 i kodira humani leukocitni antigen koji se nalazi na površini belih krvnih ćelija (Reveille, 2001).

HLA-B27 je doveden u čvrstu vezu sa spondiloartropatijama (Aho, 1974) (Slika 8). Veza između HLA sistema i Rajterovog sindroma je utvrđena 1973. godine nalazom HLA-B27 antigena u visokom procentu kod obolelih u odnosu na njegovu učestalost u kontrolnoj

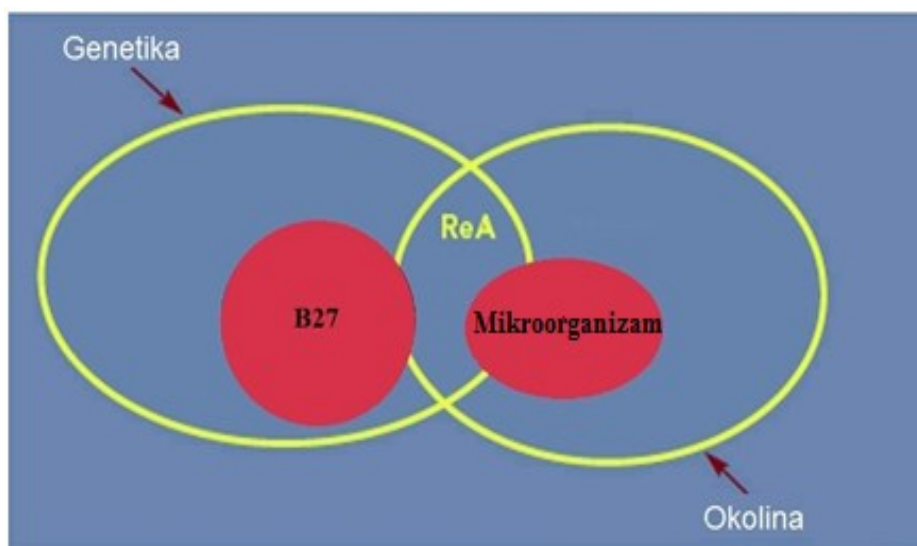


grupi zdravih. HLA-B27 antigen je prisutan u 65-96% bolesnika sa Rajterovim sindromom koji pripadaju beloj rasi, dok je Rajterov sindrom kod crnaca često HLA-B27 negativan. Verovatnoća razvoja Rajterovog sindroma se povećava pedeset puta kod bolesnika koji su pozitivni na HLA-B27 antigen, ali oboleti mogu i osobe koje su HLA-B27 negativne gde se Rajterov sindrom dovodi u vezu sa genima HLA-B39, HLA-B60 i HLA-DR1 (Hamdulay, 2006; Lozada, 2010).

Objašnjenje asocijacije HLA sistema i Rajterovog sindroma se zasniva na četiri postojeće teorije.

- Najstarija teorija je teorija molekularne mimikrije - patogeni agens po svom „izgledu“ podseća na HLA-B27 antigen pa obzirom da ga imunski sistem ne prepoznaje kao tuđe izostaje odbrana i razvija se bolest.
- Prema drugoj teoriji HLA-B27 antigen kao receptor vezuje patogeni agens na površini epitelnih ćelija urogenitalnog i intestinalnog trakta tako da esencijalne bakterijske peptide neadekvatno predstavlja imunskom sistemu. Usled toga izostaje efikasan lokalni imunski odgovor i dolazi do bakterijske diseminacije.
- Teorija „artritogenih peptida“ se zasniva na sposobnosti bakterije da izmeni strukturu HLA-B27 antigena. Ovako izmenjen HLA-B27 antigen citotoksični T limfocit prepoznaje kao tuđi što dovodi do lize inficiranih ćelija i pokretanju autoimunog procesa.
- Model vezanih gena. U blizini regiona glavnog kompleksa tkivne kompatibilnosti (MHC) na šestom hromosomu nalazi se gen za faktor nekroze tumora-alfa (eng. *tumor necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ) i geni za transportere uključene u preradu antigena (eng. *transporters associated with antigen processing*, TAP). TAP geni su polimorfni i njihovi produkti imaju ulogu u transportu antigenih peptida koji se vezuju za ćelije nosioce HLA-B27 antigena. Na taj način funkcionalno povezani zajedno doprinose stvaranju predispozicije za razvoj Rajterovog sindroma.

Svaki od navedenih modela podrazumeva učešće spoljnog agensa u nastanku bolesti. U osobe kod koje će se razviti bolest postoji genetička predispozicija, a infektivni agens koji igra ulogu „okidača“ dovodi do razvoja bolesti (Slika 8).



**Slika 8. Interakcija gen-okolina u reaktivnom artritisu**

(Preuzeto sa [http://www.theheumatologist.org/SpringboardWebApp/userfiles/thr/image/THR\\_2010\\_10\\_pp24\\_t02\\_LG.jpg](http://www.theheumatologist.org/SpringboardWebApp/userfiles/thr/image/THR_2010_10_pp24_t02_LG.jpg) i modifikovano)

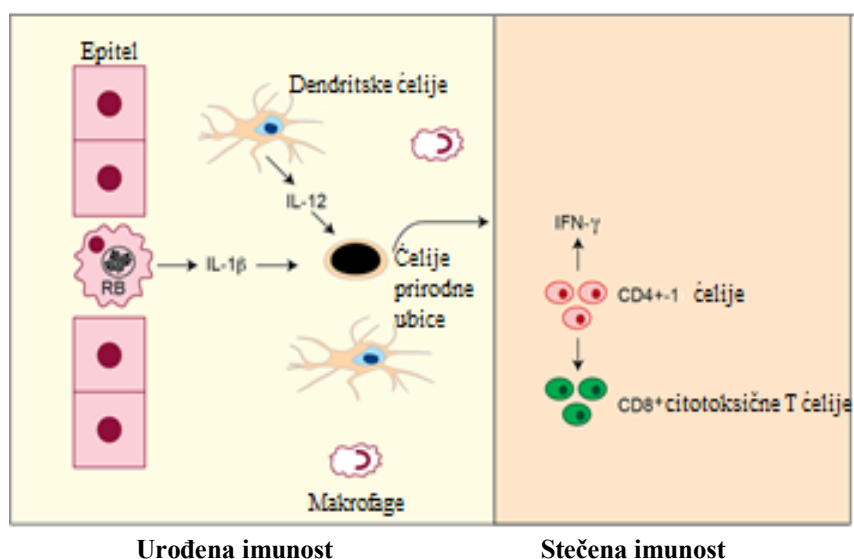
### Imunski mehanizmi

Jedna od najvažnijih fizioloških uloga imunskog sistema je odbrana od infekcija. Da li će doći do uspostavljanja infekcije, kakav će biti njen tok i na kraju ishod ovisi o veoma kompleksnoj interakciji između mikroorganizma i imunskog sistema domaćina. Budući su infektivni agensi veoma heterogeni, imunski sistem je morao da razvije različite mehanizme odbrane urođene i stečene imunosti koji su najefikasniji za borbu protiv određenog mikroorganizma.

## Urođena imunost

Nespecifični imunitet čini prvu liniju odbrane organizma. Prevladavajući zadatak urođene imunosti u odbrani od intracelularnih bakterija je da ih drži pod kontrolom i sprečava njihovo širenje dok se ne razvije stečeni imunski odgovor.

Površina epitela predstavlja prirodnu barijeru za infektivne agense. Jednom kada patogen prođe epitelnu zaštitnu barijeru aktiviraju se ćelijski efektorski mehanizmi (Slika 9) koji ga eliminišu ili neutrališu (Mascellino, 2011).



Slika 9. Imunski odgovor na *C. trachomatis* (Preuzeto sa <http://bitesized.immunology.org/presentations/Chlamydia%20trachomatis/data/images/img3.png> i modifikovano)

Glavne ćelije urođene imunosti u odbrani od bakterija su fagociti (neutrofil, monociti, makrofagi, dendritske ćelije) i ćelije prirodne ubice, NK ćelije (eng, *Natural Killer*).

Tokom infekcije, hemijski signali privlače fagocite do mesta gde su patogeni napali organizam. Kad fagociti dođu u kontakt sa bakterijama, receptori na površini fagocita se vežu za njih. Vezivanje receptora za odgovarajuće strukture na mikroorganizmima ili partikulama dovodi do promena na membrani fagocita koje omogućavaju stvaranje

vezikula, fagozoma, i isporučivanje signala koji stimuliše fagocite da unište mikroorganizme.

Najefikasniji su neutrofilni jer uništavaju mikroorganizme u roku od nekoliko minuta nakon ingestije, za razliku od makrofaga u kojima intracelularni patogeni mogu da prežive i umnožavaju se, i dendritskih ćelija kod kojih ovaj proces može da traje satima. Nakon fagocitoze, makrofage i dendritske ćelije učestvuju u prezentaciji antigena drugim ćelijama imunskog sistema (Kaufmann, 2002).

NK ćelije imaju sposobnost da prepoznaju različite ciljne ćelije i da ih unište bez prethodne aktivacije (Kataranovski, 2012).

Lokalnoj inflamaciji i fagocitozi može da doprinese i aktivacija komplementa odnosno proteina plazme koji aktiviraju kaskadu proteolitičkih reakcija na površini bakterijske ćelije (Parihar, 2009).

#### Stečena imunost

Dok komponente urođenog imuniteta učestvuju u prvoj liniji odbrane, stečeni ili specifični imunski sistem se aktivira kada se mikroorganizam ne može eliminisati ili bar neutralisati nespecifičnim efektorskim mehanizmima. Specifični imunitet se razvija u kontaktu sa uzročnicima bolesti i ne postoji pre prvog kontakta. Karakterišu ga dve glavne osobine, a to su da je antigen specifičan i razvija pamćenje što omogućava brzi odgovor efektorskih ćelija (T i B limfocita) prilikom drugog susreta sa odgovarajućim antigenom.

Ćelijska imunost koja je posredovana T-limfocitima predstavlja najvažniji mehanizam stečene imunosti u odbrani od intracelularnih bakterija i obuhvata aktivnost CD4<sup>+</sup> T ćelija i CD8<sup>+</sup> T ćelija (Romagnani, 1999; Sieper, 1995, 2000).

Od velike je važnosti znati koji se citokini produkuju u sinoviji bolesnika sa Rajterovim sindromom. Prema obrascu proizvodnje citokina, T ćelije su podeljene na Th1 ćelije (dominira interferon  $\gamma$ ) i Th2 ćelije (dominira interleukin-4). U Rajterovom sindromu, antibakterijski Th1 citokinski odgovor koji je neophodan za eliminaciju bakterija je smanjen. Sa druge strane, Th2 preovlađuje i doprinosi perzistentnoj infekciji bakterija u zglobovima (Braun, 1999; Yin, 1997; Gaston, 2000; Vicetti, 2012).

Postoje dokazi da su genotipovi TNF $\alpha$  koji su povezani sa njegovom niskom produkcijom prisutni u većem procentu kod bolesnika sa Rajterovim sindromom (Zhao, 2000). Budući su IFN $\gamma$  i TNF $\alpha$  ključni za eliminaciju bakterija, nedovoljna proizvodnja ovih citokina pridonosi perzistenciji bakterija, a bolesnici sa manjom sekrecijom TNF $\alpha$  imaju duže trajanje bolesti nego bolesnici sa većom (Braun, 1999).

Antitela mogu imati ulogu u sprečavanju reinfekcije, posebno kada su proizvedena lokalno u genitalnom traktu – primarnom mestu infekcije ali u većini slučajeva imaju malu ili nikakvu ulogu u uklanjanju mikroorganizma.

### Terapija Rajterovog sindroma

U lečenju Rajterovog sindroma najčešće se primenjuju nesteroidni anti - inflamatorni lekovi (NSAIL). Anti - inflamatorni lekovi smanjuju bol i ukočenost. Vrsta, doza i dužina primene leka zavise od težine kliničke slike. U akutnoj fazi, kod težih oblika bolesti, mogu se kratkotrajno primeniti i kortikosteroidi sa produženim delovanjem, sistemski i/ili lokalno. Istovremeno se počinje sa antibiotskom terapijom (posle identifikacije uzročnika inicijalne infekcije) koja se primenjuje do eradikacije mikroorganizama. Za prouzrokovane urogenitalne infekcije lečenje se sprovodi primenom antibiotika iz grupe tetraciklina, hinolina ili makrolida a za lečenje enteralne infekcije koriste se antibiotici iz grupe penicilina ili cefalosporina (Popović, 2000).

Lečenje antibioticima aktivne cervikalne i uretralne infekcije prouzrokovane sa *C. trachomatis* je efikasna u zaustavljanju rasta bakterija. Sa druge strane antibiotski tretman perzistentnih bakterija u sinoviji je razočaravajući. Dok jedna grupa istraživača navodi napredak u lečenju bolesnika sa artritismom izazvanim hlamidijom (Pavlica, 2005) drugi izveštavaju o malom ili nikakvom pomaku u lečenju (Kvien, 2004). Kod određenog broja slučajeva ove razlike se mogu pripisati vrsti korišćenih antibiotika pošto se zna da svi antibiotici nisu jednako efikasni protiv *C. trachomatis*. Takođe se postavlja pitanje dostupnosti bilo kojeg antibiotika sinoviji standardnom oralnom ili drugom primenom. Iako su zglobovi dobro vaskularizovani vrlo je važno odrediti koncentraciju antibiotika koja će biti efikasna protiv bakterija.

Efikasnost antibiotske terapije *C. trachomatis* se obično procenjuje na osnovu rezultata dobijenih u *in vitro* sistemima u kojima se lek i hlamidijska elementarna tela istovremeno ili gotovo istovremeno dodaju u kulturu ćelija domaćina. Međutim, bolesnici sa urogenitalnim hlamidijskom infekcijom imaju bakterije koje su već napredovale u svom životnom ciklusu, a oni sa hroničnim reaktivnim artritismom imaju perzistentne organizme. Iz toga razloga, u slučaju akutnog i hroničnog artritisa, standardna *in vitro* metoda za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije bilo kojeg antibiotika za hlamidije se pokazala neodgovarajućom.

Villareal navodi da tretiranje već inficiranih ćelija domaćina sa standardnim koncentracijama antibiotika indukuje pre perzistentno stanje nego uklanjanje bakterija. Nameće se pitanje da li se odstranjivanje perzistentnih hlamidija može postići samo antibioticima. Bilo bi korisno naći neki način da se perzistentni mikroorganizmi vrate u aktivan životni ciklus koji ih čini mnogo osetljivijim delovanju antibiotika (Villareal, 2002).

Kod hroničnih oblika bolesti koristi se lek metotreksat a sulfasalazin se uvodi u terapiju kod bolesnika sa težim kliničkim tokom.

Osim medikamentne, u lečenju bolesnika sa Rajterovim sindromom primenjuje se i fizikalna terapija (Popović, 2000). Ako su zglobovi veoma otečeni, tečnost iz njih mora biti odstranjena iglom i špricom da bi se smanjila bol. Otečene zglobove je potrebno odmarati, ali je važno početi sa pokretanjem zahvaćenog zgloba i vežbanjem što je pre moguće. Fizioterapija pomaže u održavanju pokretljivosti zgloba kao i tonusa mišića. Ako simptomi traju više od nekoliko meseci ili je terapija neuspešna, u lečenje se uključuje sulfasalazin i metotreksat sa ciljem da se smanji oštećenje zglobova. Ovi lekovi ne deluju odmah na bol i inflamaciju. Potrebno je nekoliko nedelja da bi se ispoljio njihov efekat (Lozada, 2010).

Kod upornih sinovitis, rezistentnih na konvencionalnu terapiju, primenjuje se hirurška i/ili radiohemijska sinovijektomija (Pavlica, 1997).

## **HIPOTEZA I CILJEVI**

Ranije se smatralo da je artritis u Rajterovom sindromu reaktivne prirode a ne infektivne jer nije bilo moguće izolovati prouzrokovača iz obolelog zgloba. Nove tehnologije, imaju pre svega za cilj da doprinesu rasvetljavanju etiologije reumatskih bolesti, a samim tim da omoguće bolju prevenciju i etiološku terapiju. Noviji, sve učestaliji nalazi bakterija/delova bakterija u obolelom zglobu su ukazali da je artritis u urogenitalnom obliku Rajterovog sindroma uslovljen prisustvom infektivnog agensa. Saznanja o nalazu nukleinskih kiselina hlamidija i drugih bakterija u sinovijskoj tečnosti i sinoviji inflamiranog zgloba pobudila su nadu da bi antibiotska terapija mogla biti terapija izbora kod ovih bolesnika. Međutim, u nekim studijama pokazano je da hlamidija može da ostane u zglobu čak i posle agresivne primene pravilno odabranih antibiotika, što se objašnjava neadekvatnom dužinom lečenja i njihovom perzistentnom infekcijom, odnosno modifikovanim biološkim stanjem kada pokazuju drukčije morfološke, metaboličke, transkripcione i druge osobine . Zbog toga je u proceni etiologije i uspešnosti terapije Rajterovog sindroma neophodno koristiti osetljive metode molekularne biologije.

Polazeći od hipoteze da će u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi biti detektovano prisustvo bar jednog infektivnog agensa, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum*, kod svih bolesnika sa urogenitalnim oblikom Rajterovog sindroma, i da su pojava i ishod bolesti povezani sa prisustvom ispitivanih mikroorganizama postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Korišćenjem PCR metode utvrditi prisustvo sledećih mikroorganizama: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* i *Ureaplasma urealyticum* u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa urogenitalnim oblikom Rajterovog sindroma pre antibiotske terapije (azitromicin i kombinovana antibiotska terapija ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom).
2. Utvrditi prisustvo navedenih infektivnih agenasa u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa urogenitalnim oblikom



Rajterovog sindroma posle sprovedene hirurške (artroskopska sinovijektomija) i antibiotske terapije (azitromicin ili kombinovana antibiotska terapija).

3. Ispitati povezanost prisustva infektivnih agenasa u sinoviji, sinovijskoj tečnosti i mononuklearnim ćelijama periferne krvi sa pojavom bolesti i ishodom lečenja kod bolesnika sa Rajterovim sindromom.
4. “*Real-time*” PCR metodom utvrditi vijabilnost *C. trachomatis* kod bolesnika sa Rajterovim sindromom kod kojih je bakterija detektovana PCR metodom pre i posle kombinovane antibiotske terapije i korelirati dobijene rezultate sa kliničkim karakteristikama bolesti.

## **MATERIJAL I METODE**

Istraživanje je sprovedeno u Odeljenju za molekulska medicinu Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije (VMA) u Beogradu. Izvođenje ove studije je odobreno od strane Etičkog komiteta Vojnomedicinske akademije u skladu sa Helsinškom deklaracijom o zaštiti ljudskih prava i svi bolesnici su dali pismenu saglasnost za učešće u studiji.

### Bolesnici

Istraživanje je obuhvatilo 42 bolesnika koja su ispitivana i lečena u Klinici za reumatologiju i kliničku imunologiju i Klinici za ortopediju Vojnomedicinske akademije u Beogradu u periodu od 2001. do 2009. godine. Svi bolesnici su ispunjavali kriterijum za dijagnozu Rajterovog sindroma.

### Uzorci

Uzorci sinovijske tečnosti i sinovije su uzimani prilikom artroskopije u operacionoj sali, trenutno zamrzavani u tečnom azotu i transportovani do Laboratorije za molekulska genetikum Instituta za medicinska istraživanja VMA gde su čuvani na  $-70^{\circ}\text{C}$  do početka analize. Uzorci krvi (10 mL) su uzimani na klinikama jedan dan pre hirurške intervencije i nakon završene terapije u ambulanti Instituta za medicinska istraživanja, transportovani na sobnoj temperaturi do laboratorije i iz njih su odmah izolovane mononuklearne ćelije (MNC) koje su takođe čuvane na  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Metode

#### Izdvajanje mononuklearnih ćelija iz periferne krvi

Periferna krv sa natrijum citratom kao antikoagulansom je razblaživana u rastvoru natrijum hlorida (9g/L) u odnosu 1:1, nanošena na gradijent za izolaciju mononuklearnih ćelija, limfoprep (LSM 1077 Lymphocyte, PAA Laboratories GmbH, Austria), i centrifugirana na 800g 20 minuta na sobnoj temperaturi. Izdvojene mononuklearne ćelije

perifernu krv su dva puta isprane rastvorom natrijum hlorida centrifugiranjem na 560 g 10 minuta na sobnoj temperaturi.

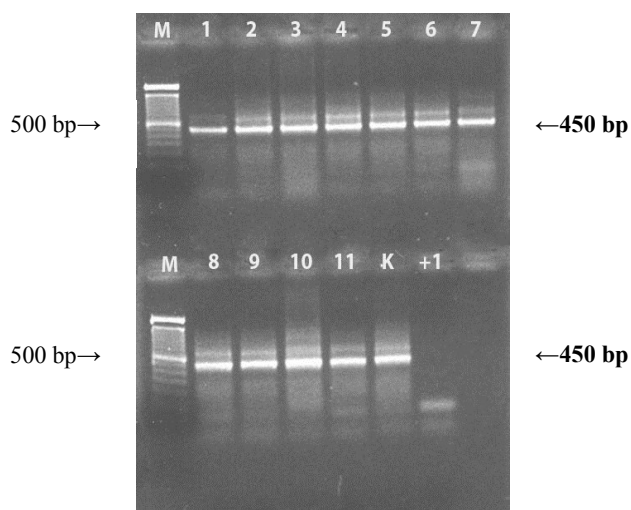
#### Izolacija nukleinskih kiselina

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je izolovana iz zamrznute sinovijske tečnosti, sinovije i mononuklearnih ćelija perifernu krvi. Uzorci sinovijske tečnosti su otapani na sobnoj temperaturi i zatim centrifugirani na 14 000 rpm 20 minuta da bi se izdvojile ćelije. Mononuklearne ćelije su dobijene izdvajanjem iz perifernu krvi na separacionom medijumu kao što je prethodno opisano.

Tkivo (sinovija) i ćelije (sinovijske tečnosti i mononuklearne ćelije perifernu krvi) su homogenizovani u Dounce – ovom homogenizatoru u 1 mL fenola i 0,5 mL pufera (25 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0.5% SDS) prethodno zagrejanu na 65°C. Nakon homogenizacije, smeša je centrifugirana i sakupljena je vodena faza sa nukleinskim kiselinama. Sledila je dva puta ekstrakcija sa smešom hloroform : izoamil alkohol (24:1). Ukupna DNK je dobijena precipitacijom etanolom i rastvorena u destilovanoj vodi (Sambrook, 1990; Freise, 2001).

Količina DNK u svim vrstama izolovanih uzoraka je merena spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 260 nm (GeneQuant, Pharmacia LKB, Švedska). Uzorci su razblaživani 100 puta (5µl uzorka je rastvoreno u 500 µl sterilisane destilovane vode), a koncentracije DNK su izračunate po formuli  $c(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (A_{260} \times R \times F \times OP) / 1000$ , gde je  $A_{260}$  apsorbancija uzorka na 260 nm, R razblaženje (100), F faktor konverzije za dvolančanu DNK (50µg/ml), a OP optički put svetlosti (1cm). Kvalitet je proveravan na 1% agaroznom gelu (Serva) posle amplifikacije dela humanog β globin gena (Slika 10).

Ribonukleinska kiselina (RNK) za RT- i „real-time“ PCR analize je izolovana iz mononuklearnih ćelija perifernu krvi, sinovijske tečnosti i sinovije Trizolom® (Invitrogen, California, SAD) prema uputstvu proizvođača. Sve izolovane RNK (1 µg ukupne RNK) su tretirane enzimom RNase – free DNase I (Fermentas) i odsustvo DNK u uzorcima je provereno PCR-om (aktin gen domaćina je korišćen kao target).



**Slika 10. PCR produkti amplifikacije dela humanog  $\beta$  globin gena na 1% agaroznom gelu: M-marker molekulske težine (100 baznih parova), 1-11 uzorci sinovijskog tkiva, K-pozitivna kontrola (genomska DNK), +1-negativna kontrola (sve komponente PCR reakcije izuzev DNK).**

### Elektroforeza nukleinskih kiselina

Jednostavnost i ekonomičnost izvođenja, kao i dobra moć razdvajanja, učinile su da elektroforeza bude najprimenljivija tehnika za analizu nukleinskih kiselina. Elektroforeza se zasniva na kretanju naelektrisanih čestica u nekom medijumu pod dejstvom električnog polja. Za veličine molekula nukleinskih kiselina, najpogodniji su gelovi agaroze i poliakrilamida. Izbor vrste i koncentracije gela zavisi prvenstveno od veličine molekula nukleinskih kiselina koje treba razdvojiti (Tabela 2).

Tabela 2. Gelovi koji se primenjuje za razdvajanje linearnih DNK

Veličina DNK (kb)	% agaroze	Veličina DNK (bp)	% akrilamida
0,1-3	2	5-100	20
0,2-4	1,5	50-200	12
0,4-6	1,2	50-400	8
0,8-10	0,7	100-500	5
1-20	0,6	100-1000	3,5
5-60	0,3		

Kao indikatorske boje za praćenje toka elektroforeze koriste se bromfenol plavo i ksilen cijanol koji komigriraju sa fragmentima DNK dužine 500, odnosno 5000 bp.

### Gelovi od agaroze

Agaroz je inertni prirodni polisaharid. Kada se vodeni rastvor agaroze zagreje do ključanja agaroz se u potpunosti rastvori i tokom hlađenja dolazi do umrežavanja polimera na takav način da se formira matriks (gel) sa ravnomernim porama, čija veličina zavisi od koncentracije rastvora agaroze. Kada se tako formiran gel potopi u odgovarajući puffer i primeni električno polje, dolazi do kretanja molekula kroz matriks u pravcu električnog polja. DNK kao negativno naelektrisan molekul na neutralnom pH kreće se u smeru anode. Brzina kretanja naelektrisanih molekula u električnom polju zavisi od njihove veličine (mase ili dužine), naelektrisanja ili konformacije, kao i veličine pora gela i jačine primenjenog električnog polja. Poređenjem brzine kretanja molekula DNK koji ispituje, sa brzinom kretanja DNK poznate veličine (DNK markerom), elektroforezom se može proceniti veličina ispitivanog DNK fragmenta. Mogućnost razdvajanja molekula DNK različitih dužina zavisi od gustine gela.

Uzorci su nanoseni na agarozni gel uronjen u 0.5 x Tris-Borat-EDTA (TBE) puffer (44,5 mM Tris, 44,5 mM borna kiselina, 1 mM EDTA) u aparaturi za elektroforezu (Pharmacia LKB, Švedska). Elektroforeza se odvijala 20 minuta pri naponu od 80V i struji od 40mA.

Za vizuelizaciju molekula DNK u gelu korišćen je etidijum bromid, interkalirajući agens. Etidijum bromid je molekul koji se umeće između lanaca dvostrukog heliksa DNK i fluorescira narandžasto (560 nm) kada se osvetli UV svetlom (260-360 nm) (Slika 10). Intenzitet fluorescencije proporcionalan je količini DNK molekula u datoj „traci“ na gelu.

### Gelovi od poliakrilamida

Prednost poliakrilamidnog gela u odnosu na agarozni gel je veća rezolucija. Poliakrilamidni gel nastaje polimerizacijom akrilamida, koji formira linearne polimere i N,N-metilen-bis-akrilamida koji ih umrežava u matriksnu strukturu gela. Polimerizacija akrilamida se aktivira prisustvom katalizatora amonijum-persulfata, koji je izvor slobodnih radikala značajnih za aktivaciju monomera, i N,N,N,N-tetrametilendiamina (TEMED-a) koji služi kao katalizator i stabilizator polimerizacije. Koncentracija katalizatora mora biti

optimalna, kako bi gel imao odgovarajuće mehaničke (čvrstoća, elastičnost, veličina pora) i hemijske osobine (pH). Veličinu pora određuju koncentracije akrilamida i N,N-metilen-bis-akrilamida.

Poliakrilamidni gel sa nanesenim uzorcima je postavljan u aparaturu za elektroforezu (Pharmacia LKB, Švedska) u kojoj se nalazio 0.5x TBE pufer. Elektroforeza se odvijala 2h pri naponu od 150V i struji od 20mA.

Za vizuelizaciju DNK u gelu korišćena je metoda bojenja gela srebro-nitratom, koji se vezuje za DNK i daje tamno obojene trake.

### Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) se definiše kao in vitro amplifikacija određenog, željenog segmenta DNK molekula. Sama reakcija predstavlja imitaciju replikacije DNK, procesa koji se normalno odvija u svim živim organizmima, i moguća je zahvaljujući enzimu DNK polimerazi koja zadržava svoju aktivnost i posle izlaganja visokim temperaturama (95°C i više).

Uzorci DNK izolovani iz sinovijske tečnosti, sinovije i mononuklearnih ćelija periferne krvi su analizirani PCR metodom korišćenjem različitih visoko specifičnih parova prajmera (sekvence su date u Tabeli 3) kojima su target bili geni za:

- 16S ribozomalnu RNK (DS,P2), plazmidnu DNK (CTP A, CTP B, CTP A'', CTP B''), veliki spoljašnji protein membrane, (OMCT F, OMCT R, IMCT F, IMCT R) *C. trachomatis*
- 16S rRNK (CPN A, CPN B), plazmidnu DNK (Cpn1046 O us, Cpn1046 O ds, Cpn1046 I us, Cpn1046 I ds), veliki spoljašnji protein membrane (CP01, CP06, CP02, CP05) *C. pneumoniae*
- 16S rRNK (MPH1, MPH2) *M. hominis*
- ureazu (UU9A, UU4AR) *U. urealyticum*.

Tabela 3: DNK sekvence prajmera korišćenih u PCR detekciji i identifikaciji mikroorganizama

Prajmeri	Sekvence prajmera	Veličina produkta
<b><i>C. trachomatis</i></b>		
DS	5'-ctgcaacctccgtagagtctggcagtgtc-3'	429 bp *
P2	5'-gccagtatagatgcttgtagga-3'	
CTP A	5'-ttccccttgtaattcgttc-3'	201 bp
CTP B	5'-tagtaactgccacttcatca-3'	
CTP A''	5'-ccaccttgaaaatcagaagt-3'	141 bp
CTP B''	5'-cttggatagctgctaatgc-3'	
OMCT F	5'-gccgcttgagttctgcttctc-3'	780 bp
OMCT R	5'-acttgctgccattcatggt-3'	
IMCT F	5'-tccttgcaagctctgcctgtg-3'	745 bp
IMCT R	5'-catccttagttctctgt-3'	
<b><i>C. pneumoniae</i></b>		
CPN A	5'-tgacaactgtagaatacagc-3'	463 bp #
CPN B	5'-cgctctctctataaat-3'	
CP01	5'-tattatccgccgcatg-3'	535 bp
CP06	5'-gagggtgctgtgtaaagttc-3'	
CP02	5'-tgaacgctgtagagtttc-3'	344 bp
CP05	5'-tacaatatgggagggtgctgc-3'	
Cpn 1046 O us	5'-agtgagttctaccagttcatc-3'	729 bp
Cpn 1046 O ds	5'-gaagggtgctcactgatatg-3'	
Cpn 1046 I us	5'-agaccatcaagcagtcattaaa-3'	521 bp
Cpn 1046 I ds	5'-gtggagttgatgtattga-3'	
<b><i>M. hominis</i></b>		
MPH1	5'-caatggctaagccgatacgc-3'	334 bp &
MPH2	5'-ggtaccgtcagctgcaat-3'	
<b><i>U. urealyticum</i></b>		
UU9A	5'-aggagataatgattatgtagg-3'	264 bp °
UU4AR	5'-cgaacgacgtccataagcaac-3'	
β aktin s	5'-gaaatcgtgcgtgacattaag-3'	450 bp ♡
β aktin as	5'-ctagaagcatttgcggtggacgatggggcc-3'	

\*Branigan 1996, # Gaydos 1992, &Blanchard 1993, °Blanchard 1990, ♡Gérard 1998



Jedan ciklus PCR reakcije je obuhvatao:

- denaturaciju DNK (raskidanje vodoničnih veza između dva komplementarna lanca DNK pod uticajem temperature)
- hibridizaciju prajmera sa matricom (uspostavljanje vodoničnih veza između prajmera i komplementarne sekvence na matrici)
- elongaciju prajmera (katalizovanu DNK polimerazom).

Prvom ciklusu PCR-a je prethodila inicijalna denaturacija koja je veoma bitna za uspešnu amplifikaciju jer se u ovom koraku obezbeđuje kompletna denaturacija DNK matrice, a nakon poslednjeg ciklusa je sledila finalna elongacija u kojoj dolazi do kompletiranja parcijalno elongiranih produkata (Tabela 4).

Tabela 4. Uslovi za PCR amplifikaciju

Geni	Početna denaturacija	Denaturacija	Hibridizacija	Elongacija	Finalna elongacija	Broj ciklusa
1	95°C/5 min	95°C/1 min	52°C/1 min	72°C/1 min	72°C/10 min	35
2	95°C/5 min	95°C/1 min	52°C/1 min	72°C/1 min	72°C/10 min	40
3	95°C/5 min	95°C/1 min	54°C/1 min	72°C/1 min	72°C/10 min	25
4	95°C/5 min	95°C/1 min	55°C/1 min	72°C/1 min	72°C/10 min	30
5	95°C/5 min	95°C/20 sek	62°C/20 sek	72°C/20 sek	72°C/15 min	40

1: β-aktin, 16S rRNK *C. trachomatis*, 16S rRNK *C. pneumoniae*

2: *omp1* gen *C. trachomatis*, *omp1* gen *C. pneumoniae*

3: plazmid *C. trachomatis*, plazmid *C. pneumoniae*

4: 16S rRNK *M. hominis*

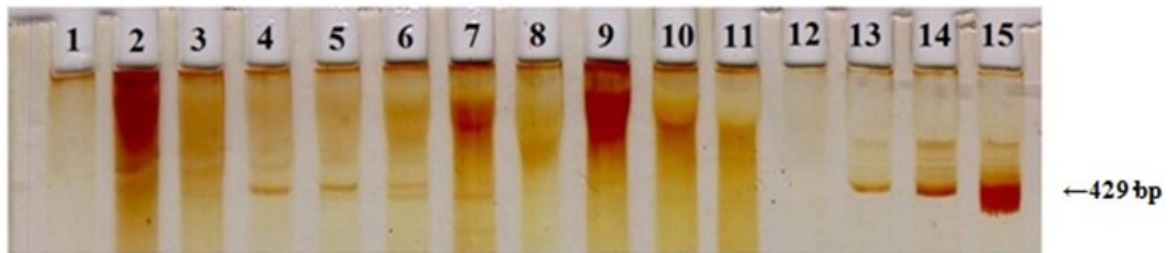
5: Ureaza gen *U. urealyticum*

Sve PCR amplifikacije (Mastercycler gradient, Eppendorf, Germany) su rađene u duplikatu u finalnom volumenu od 50 µL sa 400-600 ng genomske DNK. Negativne (sve komponente PCR-a izuzev genomske DNK) kao i pozitivne kontrole (genomska DNK izolovana iz čistih kultura mikroorganizama dobijenih sa Instituta za mikrobiologiju,

VMA) su bile uključene u sve PCR analize. Reakciona smeša je sadržavala 1 x PCR pufer (20 mM Tris-HCL (pH 8,3), 20 mM KCl, 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dezoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP-a), 1 U Taq DNK polimeraze (Fermentas, Lithuania) i 0,5 μM prajmera. Dužina svih amplifikata je navedena u Tabeli 2.

Uspešnost PCR amplifikacije je procenjivana na osnovu elektroforetske provere veličine produkata amplifikacije (10 μL) na 2% agarozu u 0,5 x TBE puferu. Za vizualizaciju traka gelovi su bojeni etidijum bromidom (Sambrook, 1990).

Detekcija bakterijske DNK je vršena na 8% vertikalnom poliakrilamidnom gelu koji je bojen srebro nitratom (Slika 11). Pozitivna kontrola je korišćena za procenu dužine amplifikata.

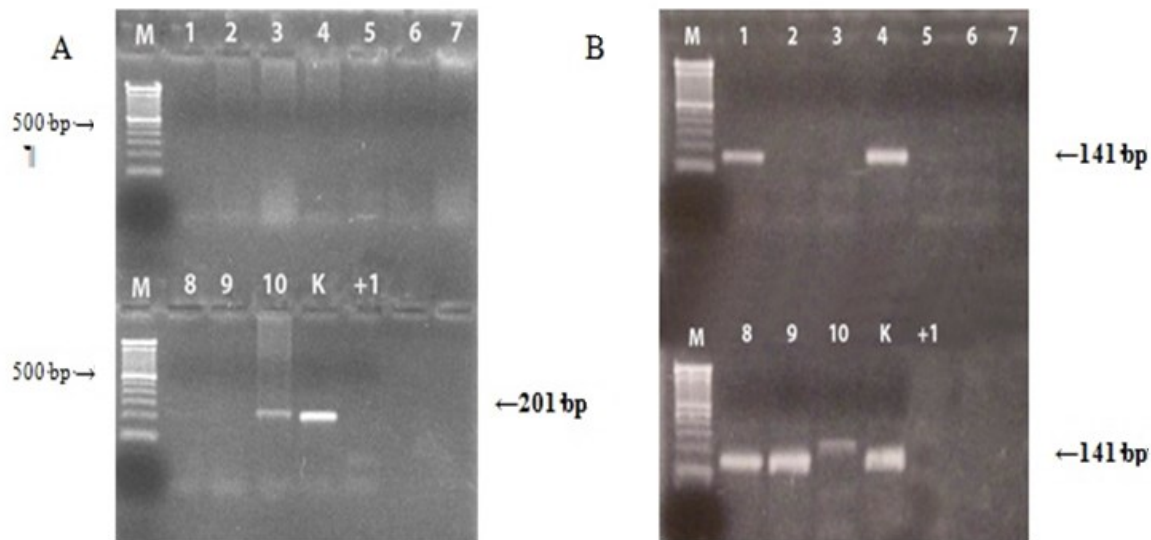


**Slika 11. Detekcija 16S rRNK *C. trachomatis* na 10% poliakrilamidnom gelu posle bojenja srebro-nitratom.** 1-11 uzorci bolesnika, 12 kontrola PCR-a (uzorak bez DNK), 13-15 pozitivne kontrole (genomska DNK izolovana iz čistih kultura *C. trachomatis*).

## Nested (umetnut) PCR

Nested PCR je PCR tehnika koja koristi dva seta prajmera ("unutrašnji" i "spoljašnji") čime se omogućuje specifična amplifikacija target gena. Uzorak se prvo amplifikuje spoljašnjim prajmerima, a zatim se produkt amplifikuje unutrašnjim prajmerima. Ciljna sekvenca unutrašnjih prajmera je locirana u okviru regiona koji amplifikuju spoljašnji prajmeri. Ovaj proces ponovne amplifikacije može popraviti osetljivost testa i omogućuje veću specifičnu amplifikaciju (Slika 12).

Nested PCR je korišćen u amplifikaciji plazmidne DNK i gena za veliki spoljašnji protein membrane *C. trachomatis* i *C. pneumoniae*.



**Slika 12. PCR produkti amplifikacije plazmidne DNK *C. trachomatis* na 1% agaroznom gelu (nested PCR: A - amplifikacija sa „spoljašnjim” setom prajmera, B - amplifikacija sa „unutrašnjim” setom prajmera):** M-marker molekulske težine (100 baznih parova), 1-10 uzorci sinovijskog tkiva, K-pozitivna kontrola (DNK izolovana iz čistih kultura *C. trachomatis*), +1-negativna kontrola (sve komponente PCR reakcije izuzev DNK).

## Reverzna transkripcija - PCR

Reverzna transkripcija - PCR (RT-PCR) predstavlja jednu od modifikacija PCR-a odnosno PCR kome prethodi reverzna transkripcija. Ova metoda podrazumeva prethodno izolovanje ukupne ribonukleinske kiseline ili informacione RNK (iRNK). Molekul ribonukleinske kiseline ne može da služi kao matrica za PCR. Taq polimeraza kao matricu koristi isključivo jednolančani molekul DNK. RNK se pomoću enzima reverzne transkriptaze (RNK zavisna DNK polimeraza) u procesu reverzne transkripcije prepisuje u komplementarni prvi lanac cDNK. Reverzna transkriptaza je isto tako i DNK zavisna DNK polimeraza koja sintetiše drugi lanac DNK komplementaran sa reverzno transkribovanom jednolačnom cDNK nakon degradacije originalne iRNK. cDNK se zatim koristi kao matrica za PCR.

Reverzna transkripcija RNK u cDNK je rađena kitom za reverznu transkripciju (High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems, California, SAD) prema uputstvu proizvođača (Tabela 5).

Tabela 5. Priprema 2xRT smeše.

Reagensi	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
10xRT pufer	2,0
25xdNTP smeša (100 mM)	0,8
10xRT nasumični heksameri	2,0
Reverzna transkriptaza, 50U/ $\mu\text{L}$	1,0
Inhibitor RNaze	1,0
H <sub>2</sub> O	3,2
Ukupno po reakciji	10,0

U svaku epruvetu je sipano po 10  $\mu\text{L}$  RT smeše i dodavano po 10  $\mu\text{L}$  RNK uzorka. Uslovi za RT-PCR reakciju su dati u Tabeli 6.

Tabela 6. Uslovi za RT-PCR reakciju

	Inkubacija	Reverzna transkripcija	Inaktivacija enzima
Temperatura	25°C	37°C	85°C
Vreme	10 min	120 min	5 min

Uspešnost reverzne transkripcije i kvalitet cDNK su proveravani na agaroznim gelovima koji su bojeni etidijim bromidom nakon završene PCR reakcije u kojoj je  $\beta$ -aktin gen korišćen kao target. cDNK je čuvana na -20°C do izvođenja „*real-time*” PCR-a.

#### Real-time PCR

„*Real-time*” PCR je modifikovni PCR koji omogućuje praćenje amplifikacije (akumulacije amplifikata) u „realnom vremenu“, tj. nakon svakog ciklusa PCR-a. Koriste se isti reagensi (prajmeri, enzimi, dNTP-ovi) kao i u običnom PCR-u. Najveća razlika između običnog i „*real-time*” PCR-a je upotreba fluorescentnih boja. „*Real-time*” PCR metodom se može dobiti precizan podatak o aktivnosti (transkripciji) gena. Postoje dva tipa kvantitativnog „*real-time*” PCR-a: apsolutni i relativni. Pod relativnom kvantifikacijom (RQ) se podrazumeva praćenje promena u ekspresiji gena u ispitivanom uzorku u odnosu na uzorak koji služi kao kalibrator.

U ovome radu, relativna kvantifikacija je rađena u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti (pre terapije) i mononuklearnih ćelija (posle terapije) bolesnika koji su imali pozitivan nalaz *C. trachomatis* određivanjem ekspresije gena za: protein HSP60, prolil-tRNK sintetazu, bakarporfirinogen III oksidazu, ATPazu koja transportuje katjone i komponentu čestice koja prepoznaje signal, koji pripadaju imunskim i metaboličkim kategorijama

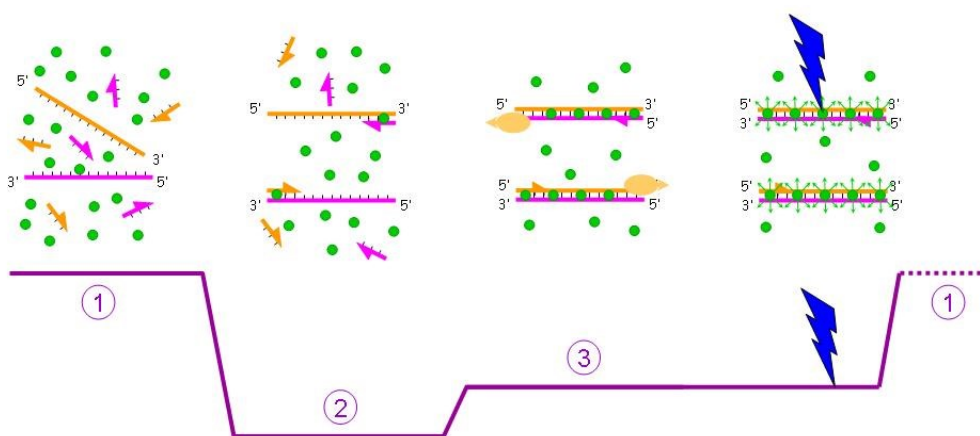
Prajmeri za amplifikaciju navedenih gena su ranije dizajnirani i opisani (Gérard, 2004, 2005), a njihove sekvence su date u Tabeli 7.

Tabela 7. DNK sekvence prajmera korišćenih u „*real-time*” PCR-u

Prajmeri	Sekvence prajmera
<i>Ct 604</i> (s) <sup>ψ</sup>	5'-ttatctagcgcagtggtt-3'
<i>Ct 604</i> (as)	5'-tattctaccgttctcttcc-3'
<i>Ct 110</i> (s) <sup>ψ</sup>	5'-tcactctaggcctaaggacg-3'
<i>Ct 110</i> (as)	5'-tcatgtttgctggcaagctc-3'
<i>Ct 755</i> (s) <sup>ψ</sup>	5'-aaactcgcacgtatacaca-3'
<i>Ct 755</i> (as)	5'-gtgttgagtttagcgtttgaga-3'
<i>Ct 393/proS</i> (s) <sup>#</sup>	5'-tcgtggctcagtggttaa-3'
<i>Ct 393/proS</i> (as)	5'-aactctttggcacgataa-3'
<i>Ct 052/hemN</i> (s) <sup>&amp;</sup>	5'-ctctcccaatccaacacac-3'
<i>Ct 052/hemN</i> (as)	5'-ccttgattcttagtctctt-3'
<i>Ct 727/cadA</i> (s) <sup>*</sup>	5'-tctccgcaactttttcc-3'
<i>Ct 727/cadA</i> (as)	5'-ttccgcatcctgat-3'
<i>Ct 820/ftsY</i> (s) <sup>°</sup>	5'-gaaacaaactccgctctctt-3'
<i>Ct 820/ftsY</i> (as)	5'-gccccctcatcaggatt-3'

<sup>ψ</sup>geni koji kodiraju HSP60 proteine, <sup>#</sup>prolil-tRNK sintetazu, <sup>&</sup>bakarporfirinogen III oksidazu, <sup>\*</sup> ATPazu koja transportuje katione, <sup>°</sup>komponentu čestice koja prepoznaje signal

U „*real-time*” PCR reakciji je korišćena *SYBR*<sup>®</sup>*Green* boja koja se veže samo na dvolančanu DNK i ima sposobnost da fluorescira (Slika 13).

Slika 13. Vezivanje SYBR<sup>®</sup>Green boje na dvolančanu DNK u toku PCR reakcije

(Preuzeto sa:

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6b/PCR\\_with\\_SYBR\\_green.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6b/PCR_with_SYBR_green.jpg) i modifikovano)

Reakciona smeša se sastojala iz 1 x *Power SYBR<sup>®</sup>Green-a*, 2 µM prajmera (finalna koncentracija), 10% cDNK i vode do finalnog volumena 25 µL.

Temperaturni profil Real-time PCR-a je obuhvatao inicijalni korak aktivacije *AmpliTagGold<sup>®</sup>* DNK polimeraze na 95°C u trajanju deset minuta, nakon čega je sledilo 40 ciklusa PCR-a: denaturacija na 95°C/15 s, hibridizacija/ekstenzija na 60°C/1 min i na kraju korak disocijacije: 95°C/15 s, 60°C/1 min, 95°C/15 s, 60°C/15 s.

Što je više dvolančane DNK bilo u toku PCR reakcije, to se više boje vezalo. Količina fluorescentnog signala je bila proporcionalna količini dvolančane DNK nastale u reakciji. Da bi se izbegli lažno pozitivni signali, nakon završenog „*real-time*” PCR-a, analizirana je kriva topljenja.

Analiza i vizuelizacija rezultata dobijenih „*real-time*” PCR-om je rađena u SDS softveru verzija 1.4 (7500 Real-Time PCR, Applied Biosystems). Kao kalibrator su korišćeni uzorci mononuklearnih ćelija pre početka terapije, a nivo ekspresije gena je normalizovan prema nivou ekspresije 16S rRNK (endogene kontrole) za svakog bolesnika.

#### Statističke analize

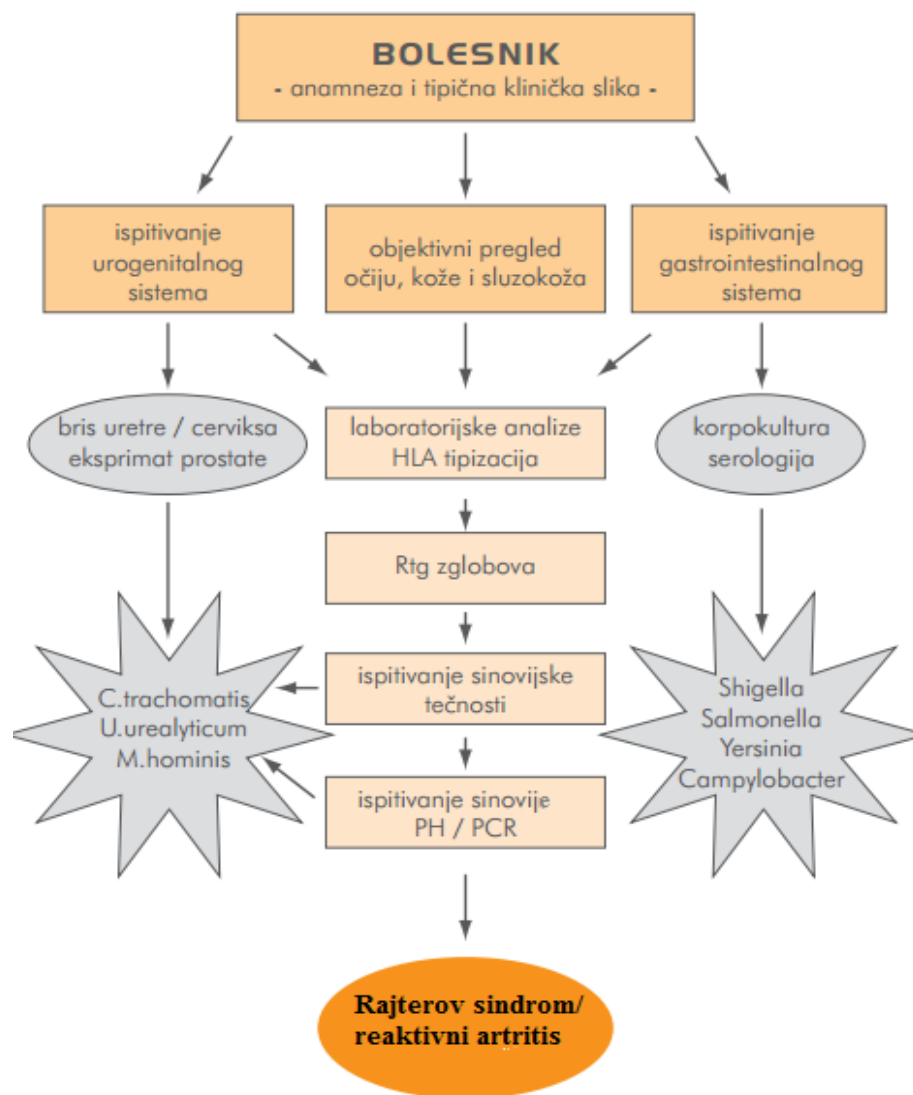
Statističke analize su obuhvatale deskriptivna merenja: srednju vrednost, medianu, standardnu devijaciju (SD), raspon i analitička merenja. Mek Nemarov test je korišćen za određivanje statističke značajnosti učestalosti pozitivnih nalaza bakterija kod bolesnika pre i posle terapije. Podaci dobijeni iz različitih terapijskih grupa su upoređivani Pearsonovim hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom. Numerički podaci su analizirani pomoću Koglmorov-Smirnovovog testa i ukoliko su bili normalno distribuirani korišćen je t-test. Man Vitnjev test je primenjen za analizu neparametrijskih podataka. Pod statističkom značajnosti se podrazumevao  $P < 0.05$ . Sve statističke analize su rađene u SPSS programu verzija 11.5 (SPSS inc., Chicago, IL).

**REZULTATI**



Kliničko demografski podaci o bolesnicima

Studija je obuhvatila ukupno 42 bolesnika koji su ispunjavali kriterijume za dijagnozu urogenitalnog oblika Rajterovog sindroma (Slika 14). Dijagnoza bolesti je postavljena na osnovu kliničkog nalaza osnovnih odlika Rajterovog sindroma: akutne urogenitalne infekcije (uretritis, cervicitis, cistitis, epididimitis, prostatitis), artritisa, oftamoloških i mukokutanih promena. Svi bolesnici su ispitivani i lečeni u Klinici za



Slika 14. Algoritam koji se koristi u dijagnostičkom postupku.

(Preuzeto iz Pavlica, 2009)

reumatologiju i kliničku imunologiju i Klinici za ortopediju Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Demografski podaci o bolesnicima su dati u Tabeli 8.

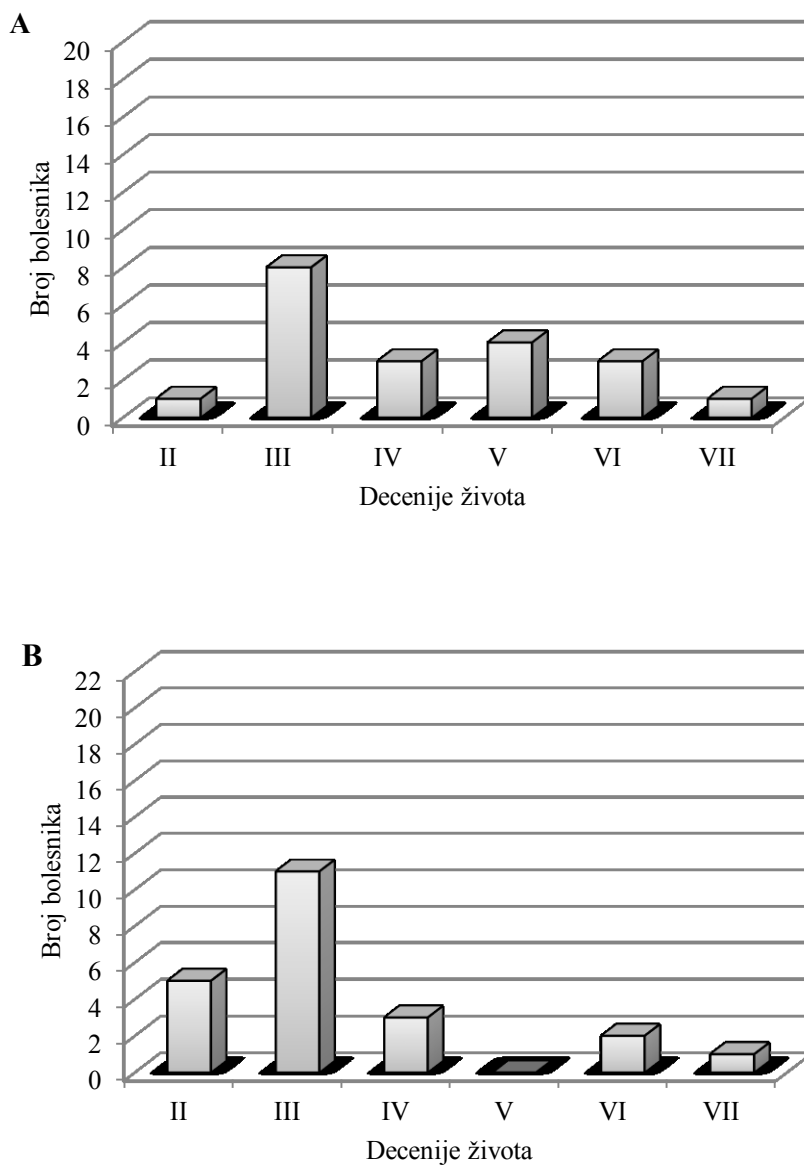
Tabela 8: Demografski podaci o bolesnicima

		I grupa bolesnika	II grupa bolesnika	Značajnost
Broj bolesnika N		20	22	
Starost (X±SD (Med, min-max))		36,70±14,83 (36; 15-68)	30,0±12,38 (28; 14-66)	<sup>a</sup> p=0,119
Pol n (%)	Muškarci	14 (70,0%)	14 (64,6%)	<sup>b</sup> p=0,662
	Žene	6 (30,0%)	8 (36,4%)	
Dužina trajanja bolesti (meseći)		16,58±20,44 (11,5; 1-78)	49,55±40,84 (30; 2-120)	<sup>c</sup> p=0,002*
HLA-B27	Negativan	5 (25,0%)	2 (9,1%)	<sup>b</sup> p=0,167
	Pozitivan	15 (75,0%)	20 (90,9%)	
Zahvaćenost zglobova	Monoartritis	16 (80,0%)	11 (50,0%)	<sup>b</sup> p=0,043*
	Oligoartritis	4 (20,0%)	11 (50,0%)	

\*statistički značajna razlika; <sup>a</sup>t-test; <sup>b</sup>χ<sup>2</sup>-test; <sup>c</sup>Man Vitnijev U test

Nije bilo statistički značajne razlike u starosnoj strukturi između dve grupe bolesnika. Najveći broj bolesnika je bio u trećoj deceniji života (Slika 15). Statistički značajne razlike između dve grupe nije bilo takođe u pripadnosti muškom odnosno ženskom polu kao i u prisutnosti HLA-B27 antigena.

Dužina trajanja bolesti i učestalost bolesnika sa zahvaćenim jednim (monoartritis) ili više zglobova (oligoartritis) su se statistički značajno razlikovali (Tabela 8). Oligoartritis je bio zastupljeniji u drugoj grupi bolesnika kod kojih je trajanje bolesti bilo duže.

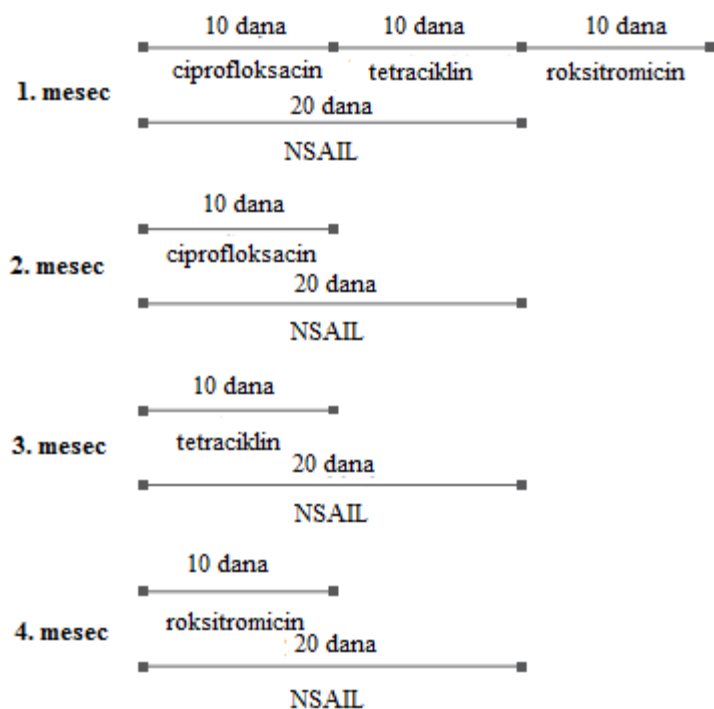


**Slika 15. Distribucija bolesnika prema godinama starosti u prvoj (A) i drugoj grupi (B).**

U prvoj grupi od 20 bolesnika je sprovedena hirurška (artroskopska sinovijektomija) i medikamentna - tromesečna terapija azitromicinom (500 mg/dan prvih pet dana, a nakon toga ista doza dva puta nedeljno do kraja terapije).

U drugoj grupi od 22 bolesnika je takođe primenjena artroskopska sinovijektomija, ali uz primenu drugog terapijskog protokola - četveromesečne kombinovane antibiotske terapije (ciprofloksacin 500 mg/d, tetraciklin 1g/d, roksitromicin 300 mg/d po 10 dana u

prvom mesecu potom naredna tri meseca po 10 dana u mesecu svaki od navedenih antibiotika) (Slika 16)



**Slika 16. Shema kombinovane antibiotske terapije** (Preuzeto iz Pavlica, 2009)

Evaluacija efikasnosti terapije je rađena posle završetka antibiotske terapije. Klinička remisija je definisana kao odsustvo oticanja zgloba i drugih znakova bolesti.

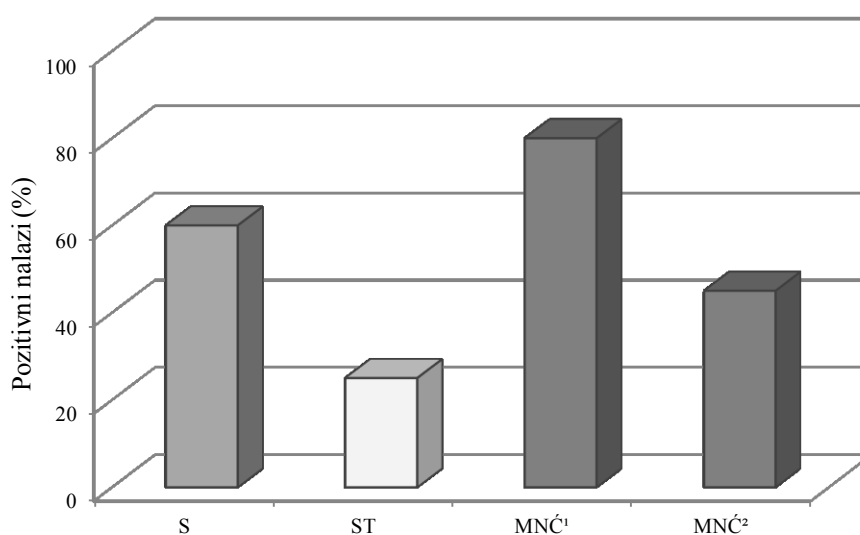
#### Detekcija mikroorganizama

Prisustvo mikroorganizama u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika prve grupe koji su lečeni azitromicinom je utvrđivano PCR metodom korišćenjem visoko specifičnih parova prajmera za 16S ribozomalnu RNK (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *M. hominis*) i ureazu (*Ureaplasma urealyticum*). U drugoj grupi bolesnika koji su lečeni kombinovanom antibiotskom terapijom, detekcija DNK *C. trachomatis* i *C. pneumoniae* je pored gena za 16S

ribozomalnu RNK uključivala i gene za veliki spoljašnji protein membrane i plazmidnu DNK.

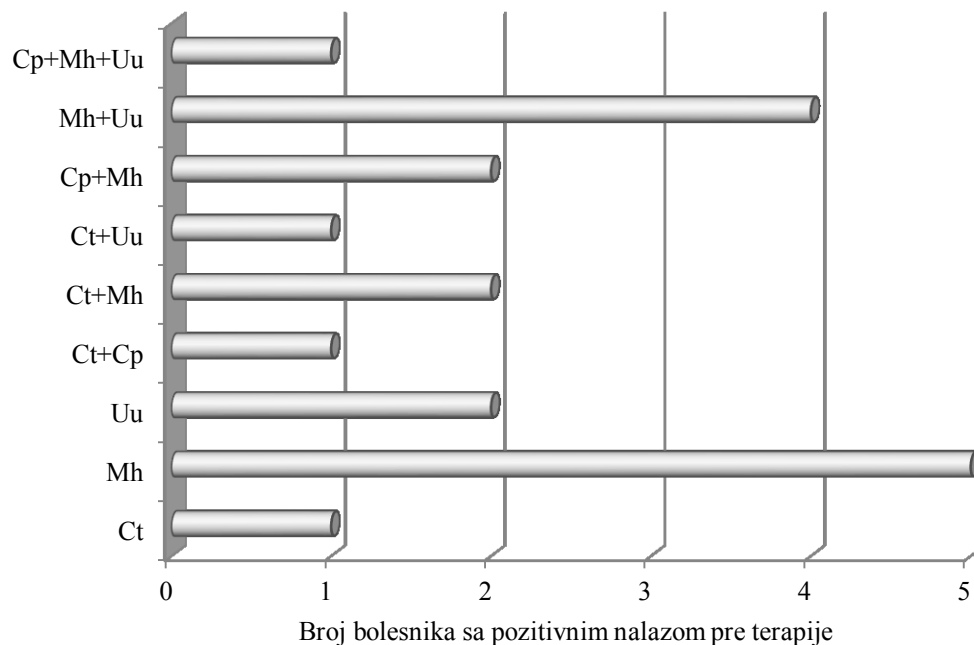
Prva grupa bolesnika (antibiotska terapija azitromicinom)

Pre terapije, pozitivan nalaz bakterijske DNK u sinoviji kod prve grupe je imalo 12/20 (60,0%), u sinovijskoj tečnosti 5/20 (25,%) dok je pozitivan nalaz u mononuklearnim ćelijama periferne krvi imalo 16/20 (80,0%) bolesnika (Slika 17).



**Slika 17. Učestalost pozitivnih nalaza bakterijske DNK u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle terapije azitromicinom) bolesnika prve grupe.**

Kod većine bolesnika je pre terapije bar u jednom od ispitivanih uzoraka bila prisutna koinfekcija sa dve vrste bakterije (kod jednog bolesnika je detektovano prisustvo čak tri bakterije). Uglavnom su u koinfekciji učestvovala *C. trachomatis* ili *C. pneumoniae* sa mikoplazmama, a kod manjeg broja bolesnika samo mikoplazme (*M. hominis* i *U. urealyticum*). Prisustvo jedne vrste bakterije je detektovano kod osam bolesnika. (Slika 18).



**Slika 18. Broj bolesnika prve grupe sa pozitivnim nalazom bakterijske DNK pre terapije azitromicinom: *Chlamydia trachomatis* (Ct), *Chlamydia pneumoniae* (Cp), *Mycoplasma hominis* (Mh), *Ureaplasma urealyticum* (Uu)**

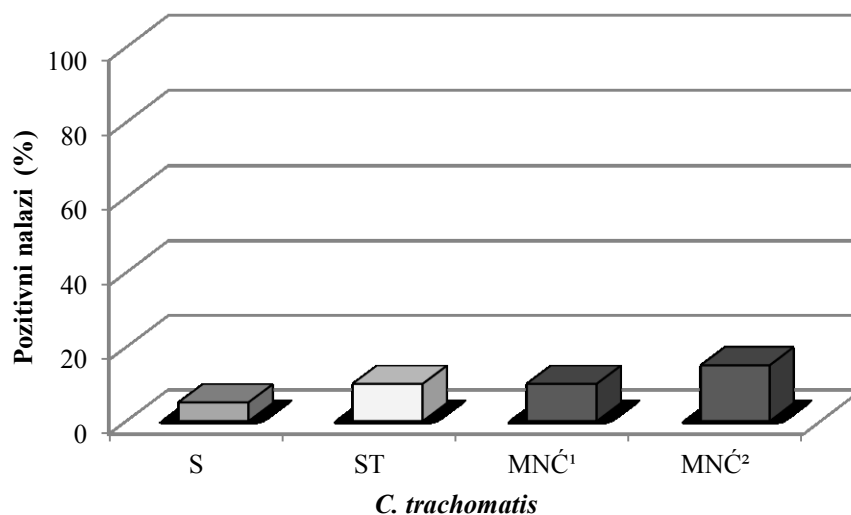
Nalaz mikroorganizama u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi pre i posle terapije se statistički značajno razlikovao (Mek Nemarov test;  $P=0,046$ ). Posle primenjene terapije pozitivan nalaz se zadržao kod osam bolesnika, a jedan od četiri bolesnika sa negativnim nalazom pre terapije je imao pozitivan nalaz posle lečenja (Tabela 9).

Tabela 9. PCR analiza prisutnosti bakterijske DNK u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>- pre terapije; MNC<sup>2</sup>- posle terapije azitromicinom) bolesnika prve grupe: Ct-*Chlamydia trachomatis*; Cp-*Chlamydia pneumoniae*; Mh-*Mycoplasma hominis*; Uu-*Ureaplasma urealyticum*.

Bolesnici	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>
1	-	-	-	-
2	-	-	Mh	-
3	-	-	Mh, Uu	Mh, Uu
4	-	-	Ct, Mh	Ct, Mh
5	-	Ct	Mh	Mh
6	Uu	Uu	-	-
7	-	-	Ct	Ct, Mh
8	-	-	Mh	Mh
9	-	Mh	Mh	-
10	Uu	Ct, Uu	-	-
11	Mh, Uu	-	Mh	Mh, Uu
12	Uu	Uu	Uu	-
13	Cp	-	Cp, Mh	-
14	Uu	-	Mh	-
15	Cp, Uu	-	Mh	-
16	Mh	-	Mh	Mh
17	Mh	-	Mh	Ct, Mh
18	Uu	-	Mh	-
19	Ct, Cp	-	-	Mh
20	Cp, Mh	-	Mh	-

*Chlamydia trachomatis*

Pozitivan nalaz DNK *C. trachomatis* u prvoj grupi pre terapije azitromicinom je imalo pet bolesnika: u sinoviji - 1, sinovijskoj tečnosti - 2, mononuklearnim ćelijama periferne krvi- 2 (Slika 19).



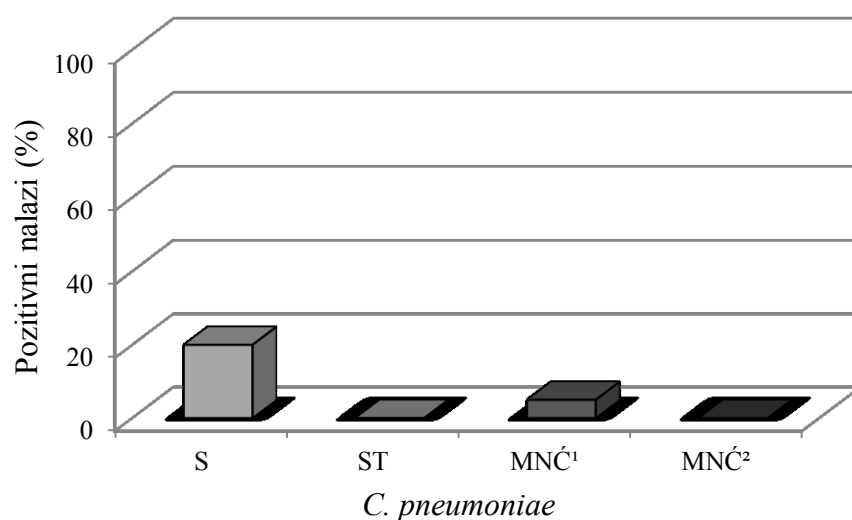
Slika 19. Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle terapije azitromicinom) bolesnika prve grupe.

Zastupljenost bolesnika sa pozitivnim i negativnim nalazom *C. trachomatis* u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, dobijenim PCR analizom, pre i posle terapije azitromicinom nije se statistički značajno razlikovala (Mek Nemarov test;  $P=1,000$ ). Oba bolesnika koji su pre terapije azitromicinom imali pozitivan nalaz *C. trachomatis* u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi su bili pozitivni i posle terapije, dok je jedan bolesnik kod kojeg nije detektovana DNK *C. trachomatis* pre terapije imao pozitivan nalaz ove bakterije u uzorku mononuklearnih ćelija posle terapije.



*Chlamydia pneumoniae*

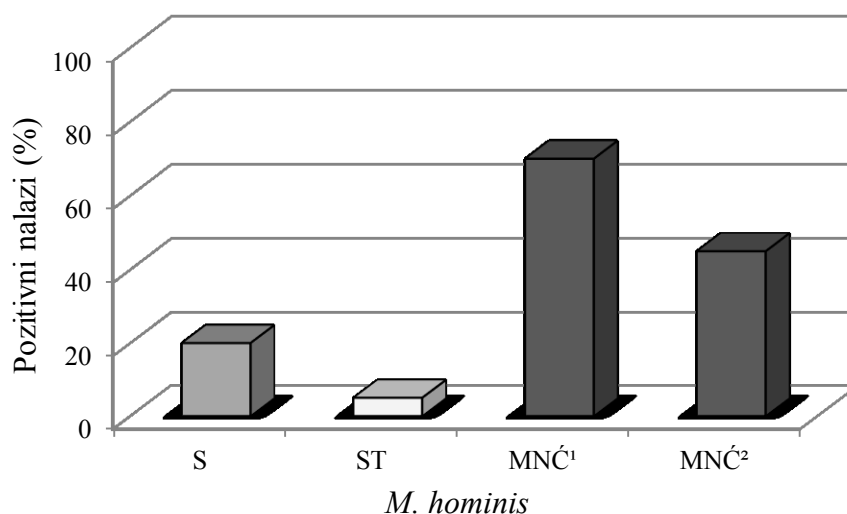
Pre početka terapije azitromicinom, DNK *C. pneumoniae* je detektovana u uzorcima četiri bolesnika prve grupe. Kod tri bolesnika je detektovana samo u sinoviji, a kod jednog bolesnika i u sinoviji i u mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Nakon završene terapije, svi bolesnici su imali negativan nalaz (Slika 20). Nije nađena statistički značajna razlika između broja pozitivnih i negativnih nalaza DNK *C. pneumoniae* pre i posle terapije azitromicinom u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi (Mek Nemarov test;  $P=1,000$ ).



Slika 20. Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. pneumoniae* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle terapije azitromicinom) bolesnika prve grupe.

*Mycoplasma hominis*

Četrnaest bolesnika (70,0%) prve grupe je bilo pozitivno na DNK *M. hominis* pre terapije azitromicinom u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi, a četiri od tih bolesnika su takođe bili pozitivni i u sinoviji dok je jedan, osim u uzorku mononuklearnih ćelija, bio pozitivan i u uzorku sinovijske tečnosti (Slika 21). Posle terapije azitromicinom, pet bolesnika je imalo negativan nalaz DNK dok je devet i dalje bilo pozitivno na DNK *M. hominis* u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi, pa prema tome nije nađena statistički značajna razlika u broju pozitivnih nalaza pre i posle terapije (Mek Nemarov test;  $P=0,182$ ).



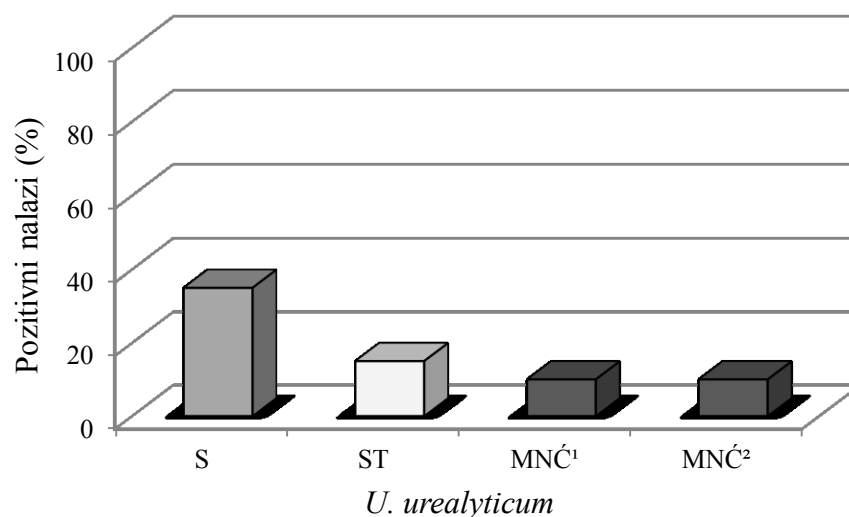
Slika 21. Učestalost pozitivnih nalaza DNK *M. hominis* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle terapije) bolesnika prve grupe.

*Ureaplasma urealyticum*

Pre početka terapije azitromicinom, pozitivnih nalaza DNK *U. urealyticum* je bilo više u uzorcima sinovije, 7 (35,0%), nego u sinovijskoj tečnosti, 3 (15,0%) kod prve grupe bolesnika (Slika 22). DNK *U. urealyticum* je detektovana u uzorcima sinovije (4), mononuklearnih ćelija periferne krvi (1), sinovije i sinovijske tečnosti (2), a kod jednog bolesnika u svim analiziranim uzorcima.

Posle terapije azitromicinom, DNK *U. urealyticum* je detektovana kod dva bolesnika u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi.

Nije nađena statistički značajna razlika između broja pozitivnih i negativnih nalaza DNK *U. urealyticum* u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi pre i posle terapije azitromicinom (Mek Nemarov test;  $P=0,480$ ).

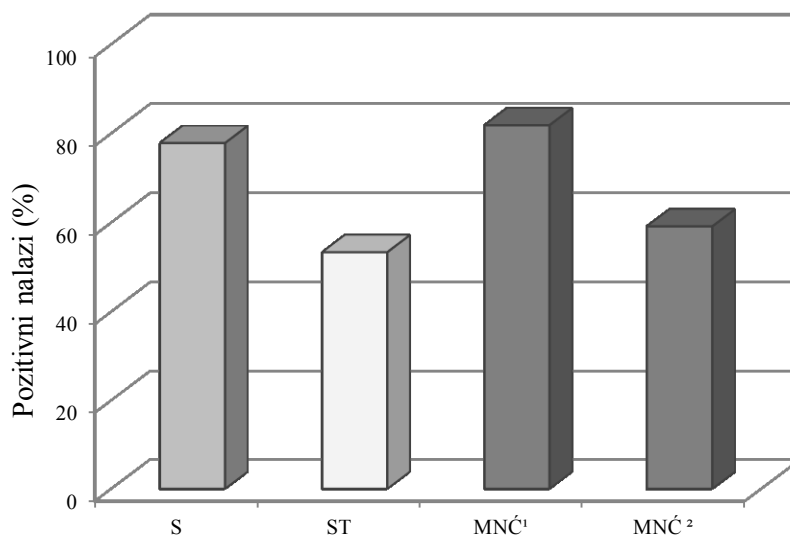


Slika 22. Učestalost pozitivnih nalaza DNK *U. urealyticum* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle terapije azitromicinom) bolesnika prve grupe.

Druga grupa bolesnika (kombinovana antibiotska terapija)

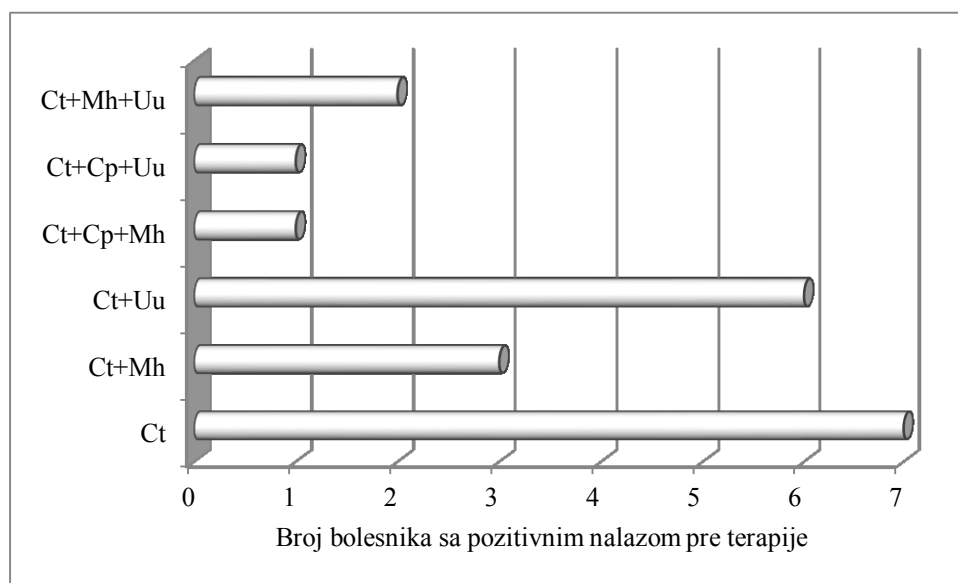
Budući da se radi samo artroskopija kolena, sinovija četiri bolesnika iz druge grupe kod kojih su bili zahvaćeni skočni zglobovi nije bila dostupna za PCR analize. Uzorak sinovije bolesnice kod koje je bolest zahvatila kuk je dobijen posle hirurškog zahvata. Sinovijsku tečnost je bilo moguće punktirati kod 15 bolesnika.

U ovoj grupi, 14/18 (77,8%) bolesnika je imalo pozitivan nalaz bakterijske DNK u sinoviji, 8/15 (53,3%) u sinovijskoj tečnosti i 18/22 (81,8%) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pre kombinovane antibiotske terapije (Slika 23).



**Slika 23. Učestalost pozitivnih nalaza bakterijske DNK u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe.**

Prisustvo samo jedne vrste bakterije, *C. trachomatis*, je detektovano kod sedam bolesnika pre terapije, ali je ipak kod većine bolesnika bila prisutna koinfekcija sa dve vrste bakterija bar u jednom od ispitivanih uzoraka kao i kod prve grupe. Kod četiri bolesnika je istovremeno detektovano prisustvo tri bakterije. Treba napomenuti da je u svim oblicima koinfekcije bila prisutna *C. trachomatis* (Slika 24).



**Slika 24. Broj bolesnika druge grupe sa pozitivnim nalazom bakterijske DNK pre kombinovane antibiotse terapije: *Chlamydia trachomatis* (Ct), *Chlamydia pneumoniae* (Cp), *Mycoplasma hominis* (Mh), *Ureaplasma urealyticum* (Uu)**

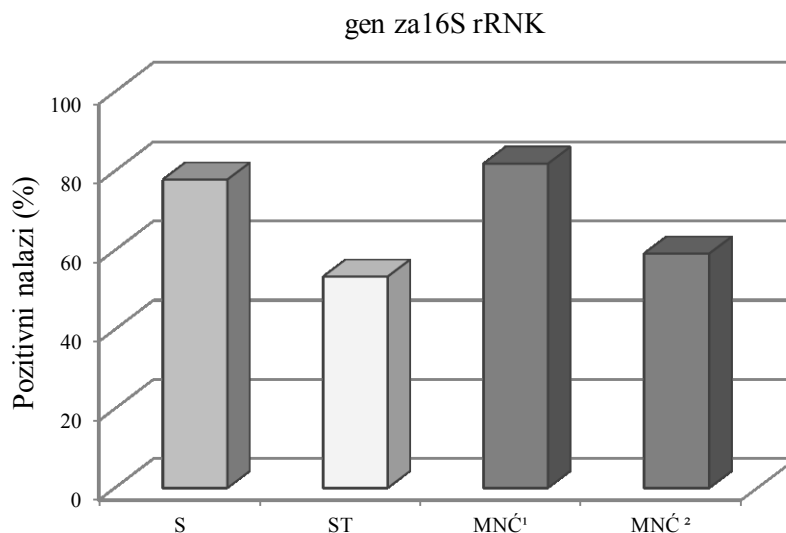
Nalaz mikroorganizama u uzorcima mononuklearnih ćelija pre i posle terapije nije se statistički značajno razlikovao (Mek Nemarov test;  $P=0,267$ ). Od 18 bolesnika sa pozitivnim nalazom pre terapije, pozitivan nalaz se zadržao kod devet bolesnika i posle terapije dok je kod devet bio negativan. Sva četiri bolesnika koji su imali negativan nalaz pre terapije su imali pozitivan nalaz posle kombinovane antibiotске terapije (Tabela 10).

Tabela 10. PCR analiza prisutnosti bakterijske DNK u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup> - pre terapije, MNC<sup>2</sup>- posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe: Ct-*Chlamydia trachomatis*; Cp-*Chlamydia pneumoniae*; Mh-*Mycoplasma hominis*; Uu-*Ureaplasma urealyticum*; nt-nije testirano (uzorak sinovije odnosno sinovijske tečnosti nije bio na raspolaganju).

Bolesnici	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>
1	Ct	nt	-	Ct
2	-	-	Ct	Ct, Cp
3	-	Ct, Uu	Ct	Ct
4	Ct, Mh	nt	Ct, Mh	-
5	Ct	Ct, Uu	Ct, Mh	Ct, Mh
6	Ct, Mh	Ct	Ct, Mh	-
7	nt	nt	Ct	-
8	nt	nt	Ct	Ct, Cp
9	Ct, Mh	Ct	Ct, Cp	-
10	Ct	Ct	-	Ct, Cp
11	Ct	Ct	Ct, Cp, Uu	Ct
12	Ct, Mh	-	Ct, Uu	-
13	-	nt	Ct, Uu	-
14	Ct	-	Ct, Uu	Ct
15	Ct	-	Ct, Uu	-
16	Ct	-	Ct	-
17	nt	nt	Ct, Uu	Ct
18	nt	nt	-	Ct
19	Ct, Mh	-	-	Ct
20	-	-	Ct	Ct
21	Ct	Ct, Uu	Ct	Ct
22	Ct	Ct	Ct	-

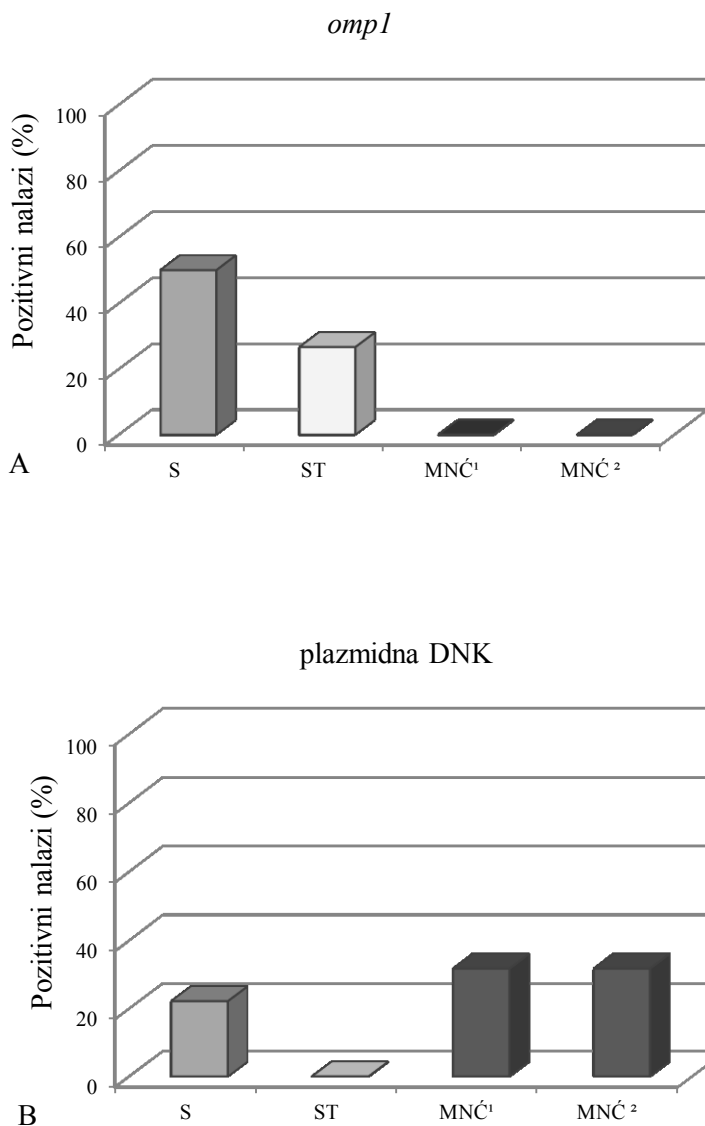
*Chlamydia trachomatis*

Korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca gen za 16S ribozomalnu RNK, 21/22 (94,5%) bolesnika druge grupe je bilo pozitivno na DNK *C. trachomatis* u najmanje jednom od analiziranih uzoraka pre kombinovane antibiotske terapije. Šest bolesnika je bilo pozitivno u svim ispitivanim uzorcima. Pre terapije 18/22 (81,8%) bolesnika je imalo pozitivan nalaz DNK *C. trachomatis* u uzorcima mononuklearnih ćelija a posle terapije je njeno prisustvo detektovano kod 13/22 (59,1%) bolesnika u istoj vrsti uzoraka (Slika 25). Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti pozitivnih nalaza DNK ove bakterije pre i posle kombinovane antibiotske terapije (Mek Nemarov test;  $P=0,267$ ).



**Slika 25.** Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe nakon PCR detekcije korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca gen za 16S ribozomalnu RNK.

Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije i sinovijske tečnosti koji su detektovani PCR-om na osnovu ciljne sekvence gena za veliki spoljašnji protein membrane (Slika 26A) je bila niža nego kada su korišćeni prajmeri za gen za 16S ribozomalnu RNK. Razlika u detekciji DNK *C. trachomatis* je postojala i u uzorcima mononuklearnih ćelija kod kojih sa ovim prajmerima nije detektovano prisustvo *C. trachomatis* niti u jednom uzorku pre i posle kombinovane antibiotske terapije.



**Slika 26. Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe nakon PCR detekcije korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca gen za veliki spoljašnji protein membrane -*omp1* (A) i plazmidnu DNK (B).**

Detekcijom plazmidne DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije (4) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (7) utvrđeno je prisustvo ove bakterije kod 11 bolesnika (Slika 26B).



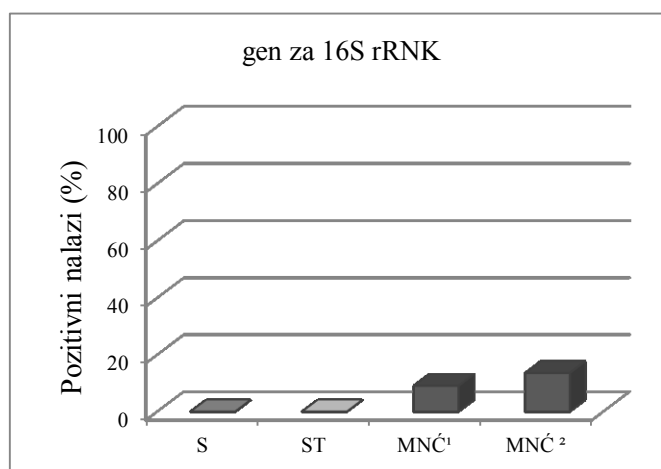
U Tabeli 11 su prikazani rezultati koji se odnose na prisustvo *C. trachomatis* u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika druge grupe koji su lečeni kombinovanom antibiotskom terapijom dobijeni detekcijom bakterijske DNK visoko specifičnim prajmerima za gen za 16S ribozomalnu RNK, *ompI* i plazmidnu DNK.

Tabela 11. Detekcija DNK *C. trachomatis* PCR testom (u kojem su target bili gen za 16S rRNK, *ompI* i plazmidnu DNK *C. trachomatis*) u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup> - pre terapije, MNC<sup>2</sup> - posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe; nt-nije testirano (uzorak sinovije odnosno sinovijske tečnosti nije bio na raspolaganju).

Bolesnici	<i>Chlamydia trachomatis</i>											
	16S rRNK				<i>ompI</i>				plazmid			
	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>
1	+	nt	-	+	-	nt	-	-	+	nt	-	+
2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
3	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	nt	+	-	+	nt	-	-	+	nt	-	+
5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
6	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
7	nt	nt	+	-	nt	nt	-	-	nt	nt	+	-
8	nt	nt	+	+	nt	nt	-	-	nt	nt	-	+
9	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
10	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
12	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	nt	+	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-
14	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
15	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
16	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
17	nt	nt	+	+	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-
18	nt	nt	-	+	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-
19	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
21	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-

*Chlamydia pneumoniae*

Na osnovu rezultata amplifikacije gena za 16S ribozomalnu RNK *C. pneumoniae*, dva bolesnika druge grupe su imala pozitivan nalaz DNK *C. pneumoniae* u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije (Slika 27). Posle završene kombinovane antibiotske terapije oni su imali negativan nalaz bakterijske DNK u uzorcima mononuklearnih ćelija. Tri bolesnika kod kojih nije detektovana DNK *C. pneumoniae* pre terapije su imali pozitivan nalaz na kraju terapije u uzorcima mononuklearnih ćelija. Treba napomenuti da su dva bolesnika imala pozitivan nalaz na plazmidnu DNK u uzorcima sinovije pre terapije. Nije bilo statističke značajnosti u učestalosti pozitivnih i negativnih nalaza DNK *C. pneumoniae* u uzorcima mononuklearnih ćelija pre i posle kombinovane antibiotske terapije (Mek Nemarov test;  $P=1,000$ ).

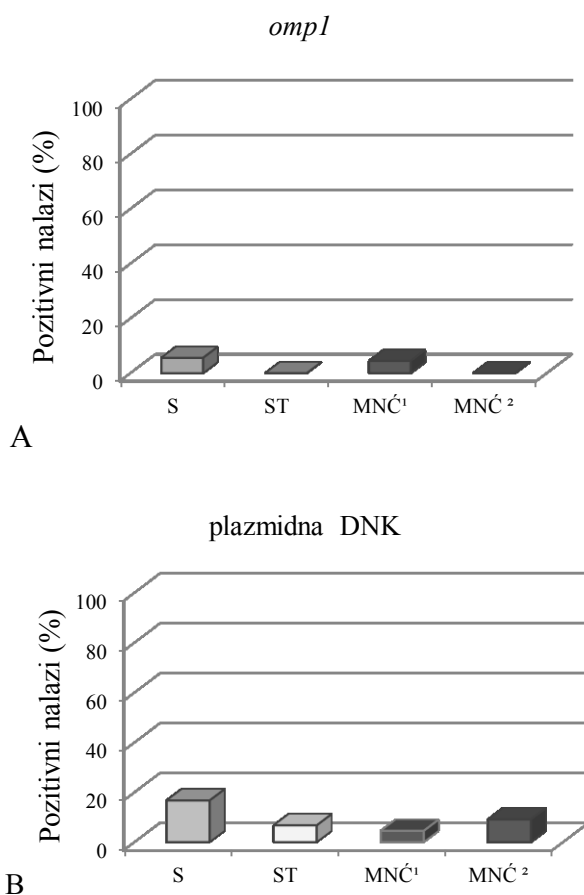


**Slika 27. Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. pneumoniae* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe nakon PCR detecije korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca gen za 16S ribozomalnu RNK.**

Korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca gen za veliki spoljašnji protein membrane - *omp1*, DNK *C. pneumoniae* je detektovana u uzorku sinovije kod samo jednog bolesnika pre kombinovane antibiotske terapije (Slika 28A). Takođe, amplifikacijom DNK izolovane iz uzorka mononuklearnih ćelija istim prajmerima je dobijen pozitivan nalaz *C.*

*pneumoniae* kod jednog bolesnika a u uzorcima sinovijske tečnosti nije detektovana DNK *C. pneumoniae* pre terapije.

Plazmidna DNK *C. pneumoniae* je detektovana kod tri bolesnika u sinoviji a kod jednog u oba uzorka inflamiranog zgloba - sinoviji i sinovijskoj tečnosti pre kombinovane antibiotske terapije (Slika 28B). Kod jednog bolesnika je detektovana pre terapije u uzorku mononuklearnih ćelija.



**Slika 28.** Učestalost pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe nakon PCR detekcije korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca gen za veliki spoljašnji protein membrane - *omp1* (A) i plazmidna DNK (B).

Posle kombinovane antibiotske terapije, pozitivan nalaz DNK *C. pneumoniae* u uzorcima

mononuklearnih ćelija kod jednog bolesnika je dobijen sa dva para prajmera kojima su ciljane sekvence gen *omp1* i gen za 16S rRNK.

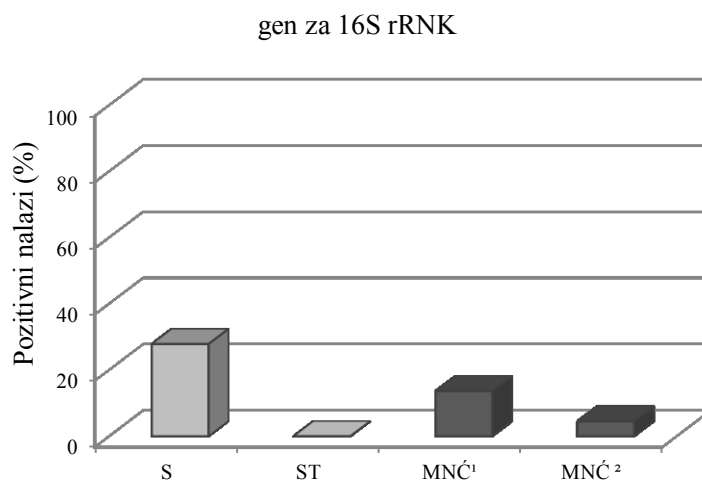
U Tabeli 12 su prikazani rezultati koji se odnose na prisustvo *C. pneumoniae* u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika druge grupe koji su lečeni kombinovanom antibiotskom terapijom dobijeni detekcijom bakterijske DNK visoko specifičnim prajmerima za gen za 16S ribozomalnu RNK, *omp1* i plazmidnu DNK.

Tabela 12. Detekcija DNK *C. pneumoniae* PCR testom (u kojem su target bili gen za 16S rRNK, *omp1* i plazmidnu DNK *C. pneumoniae*) u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup> - pre terapije, MNC<sup>2</sup>- posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe; nt-nije testirano (uzorak sinovije odnosno sinovijske tečnosti nije bio na raspolaganju).

Bolesnici	<i>Chlamydia pneumoniae</i>											
	16S rRNK				<i>omp1</i>				plazmid			
	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>
1	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-
2	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	nt	+	-
5	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
7	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-
8	nt	nt	-	+	nt	nt	-	+	nt	nt	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
10	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	nt	-	-	-	nt	-	-	-	nt	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
17	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-
18	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-	nt	nt	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Mycoplasma hominis*

U drugoj grupi, šest bolesnika je imalo pozitivan nalaz DNK ove bakterije pre kombinovane antibiotske terapije: tri samo u sinoviji, jedan u mononuklearnim ćelijama periferne krvi, a dva u sinoviji i mononuklearnim ćelijama periferne krvi. Posle završene terapije, pet bolesnika je imalo negativan nalaz, a samo kod jednog se zadržao pozitivan nalaz (Slika 29). Nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti pozitivnih nalaza na DNK *M. hominis* u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi pre i posle kombinovane antibiotske terapije (Mek Nemarov test;  $P=0,479$ ).

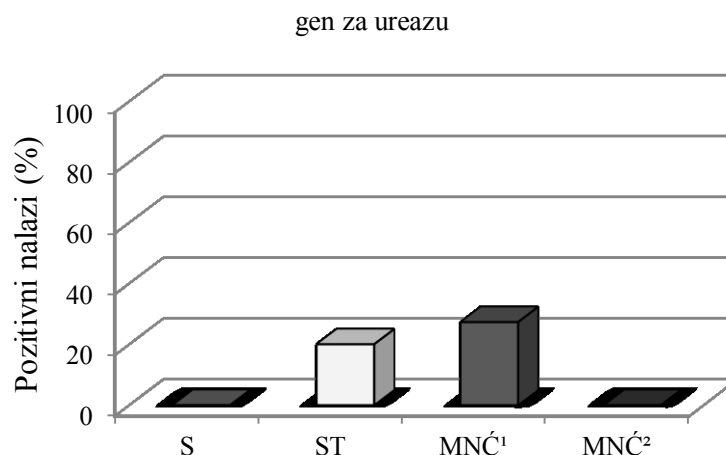


**Slika 29.** Učestalost pozitivnih nalaza DNK *M. hominis* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNČ<sup>1</sup>-pre terapije, MNČ<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe.

*Ureaplasma urealyticum*

U drugoj grupi je devet bolesnika bilo pozitivno na DNK *U. urealyticum* - tri u sinovijskoj tečnosti i šest u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi pre terapije. Posle kombinovane antibiotske terapije, svi bolesnici su imali negativan nalaz bakterijske DNK (Slika 30). Učestalost pozitivnih i negativnih nalaza DNK *U. urealyticum* u uzorcima

mononuklearnih ćelija periferne krvi se statistički značajno razlikovala (Mek Nemarov test;  $P=0,041$ ).



**Slika 30.** Učestalost pozitivnih nalaza DNK *U. urealyticum* u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup>-pre terapije, MNC<sup>2</sup>-posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe.

Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti pozitivnih nalaza bakterijske DNK u uzorcima sinovije ( $P=0,086$ ), sinovijske tečnosti ( $P=0,238$ ) i mononuklearnih ćelija periferne krvi ( $P=0,881$ ) između ispitivanih grupa pre terapije azitromicinom (prva grupa) odnosno kombinovane antibiotske terapije (druga grupa). Pozitivan nalaz u sinovijskoj tečnosti je imalo pet bolesnika iz prve grupe i osam bolesnika iz druge grupe. U sinovijskom tkivu, pozitivan nalaz je imalo dvanaest bolesnika iz prve grupe i četrnaest iz druge. Kod obe grupe je bilo više pozitivnih nalaza u sinovijskom tkivu nego u sinovijskoj tečnosti. U uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi, pozitivan nalaz bakterijske DNK je imalo 80,0 % bolesnika u obe grupe.

#### Analiza vijabilnosti bakterija

U uzorcima druge grupe bolesnika najučestalija bakterija detektovana konvencionalnim PCR - om je bila *C. trachomatis*. Budući da se konvencionalnim PCR-om

moгу detektovati i mrtve bakterije korišćeni su RT- i „*real-time*” PCR da bi se utvrdilo da li su bakterije u trenutku uzimanja uzoraka sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija bile žive (vijabilne) ili ne. U uzorcima koji su konvencionalnim PCR-om bili pozitivni na DNK *C. trachomatis*, vijabilnost bakterija je analizirana na osnovu detekcije primarnog transkripta rRNK operona *C. trachomatis*. Primarni transkript bakterijskog rRNK operona sadrži kodirajuće sekvence za 16S i 23S rRNK i nekodirajuću sekvencu od nekoliko stotina baznih parova. Procesiranje primarnih transkripta u funkcionalne molekule 16S i 23S rRNK je ekstremno brzo. Utvrđeno je da je *C. trachomatis* bila vijabilna u svim ispitivanim uzorcima u trenutku uzimanja uzoraka (Tabela 13). Takođe je detekcijom primarnog transkripta rRNK operona dokazana vijabilnost *C. trachomatis* u uzorcima mononuklearnih ćelija koji su bili pozitivni na DNK ove bakterije PCR-om posle kombinovane antibiotske terapije.

Tabela 13. RT- and „real-time” PCR analiza prisutnosti primarnog transkripta rRNK operona u uzorcima sinovije (S), sinovijske tečnosti (ST) i mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC<sup>1</sup> - pre terapije, MNC<sup>2</sup>- posle kombinovane antibiotske terapije) bolesnika druge grupe: Ct- pozitivan nalaz DNK *Chlamydia trachomatis* konvencionalnim PCR-om, (+) primarni transkript rRNK operona; nt-nije testirano (uzorak sinovije odnosno sinovijske tečnosti nije bio na raspolaganju)

Bolesnici	S	ST	MNC <sup>1</sup>	MNC <sup>2</sup>
1	Ct (+)	nt	-	Ct (+)
2	-	-	Ct (+)	Ct (+)
3	-	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)
4	Ct (+)	nt	Ct (+)	-
5	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)
6	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)	-
7	nt	nt	Ct (+)	-
8	nt	nt	Ct (+)	Ct (+)
9	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)	-
10	Ct (+)	Ct (+)	-	Ct (+)
11	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)
12	Ct (+)	-	Ct (+)	-
13	-	nt	Ct (+)	-
14	Ct (+)	-	Ct (+)	Ct (+)
15	Ct (+)	-	Ct (+)	-
16	Ct (+)	-	Ct (+)	-
17	nt	nt	Ct (+)	Ct (+)
18	nt	nt	-	Ct (+)
19	Ct (+)	-	-	Ct (+)
20	-	-	Ct (+)	Ct (+)
21	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)
22	Ct (+)	Ct (+)	Ct (+)	-

Nadalje, „real-time” PCR-om je ispitivana ekspresija gena za: proteine HSP60, prolil-tRNK sintetazu, bakarporfirinogen III oksidazu, ATPazu koja transportuje katjone i komponentu čestice koja prepoznaje signal, koji pripadaju imunskim i metaboličkim kategorijama.

Gen *Ct 110 (groEL)* kodira autentični protein toplotnog šoka HSP60 koji je uključen u pokretanje inflamatornog odgovora domaćina na infekcije hlamidijama. Ovaj gen je bio povećano eksprimiran u uzorcima sinovijskog tkiva kod tri bolesnika i



sinovijskoj tečnosti kod jednog bolesnika u odnosu na njegovu ekspresiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pre kombinovane antibiotske terapije. Jedan bolesnik je imao smanjenu ekspresiju gena *Ct 110* u uzorcima sinovije i sinovijske tečnosti u poređenju sa ekspresijom ovog gena u uzorku mononuklearnih ćelija. Pored *Ct 110* gena identifikovana su još dva gena *C. trachomatis* - *Ct 604* i *Ct 755* koji kodiraju homologne proteine HSP60. Najveća vrednost za ekspresiju svih ispitivanih gena u odnosu na njihove ekspresije u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije je dobijena za gen *Ct 604* u uzorku sinovijskog tkiva jedne bolesnice. Povećana ekspresija gena za *Ct 755* u odnosu na njegovu ekspresiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pre kombinovane antibiotske terapije je detektovana kod šest bolesnika (u sinovijskom tkivu kod tri bolesnika i u sinovijskoj tečnosti takođe kod tri bolesnika).

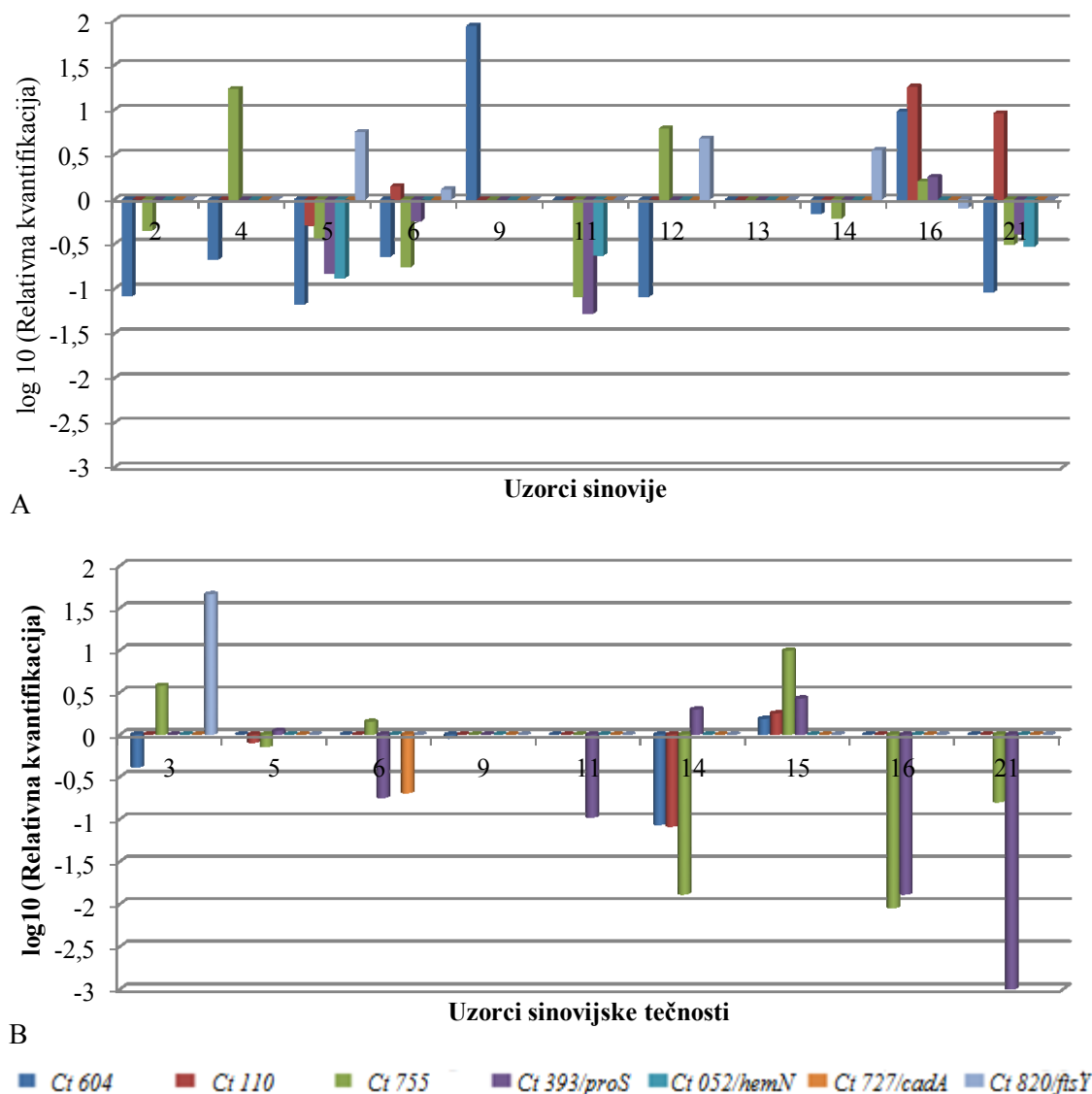
U odnosu na ekspresiju u uzorku mononuklearnih ćelija pre terapije, ekspresija gena za prolil - tRNK sintetazu (*Ct 393/proS*) je bila povećana u uzorku sinovijskog tkiva jednog bolesnika koji je u isto vreme imao smanjenu ekspresiju ovog gena u uzorku sinovijske tečnosti. Suprotno tome, bolesnik koji je u uzorku sinovije imao smanjenu ekspresiju gena *Ct 393/proS* je imao povećanu ekspresiju istog gena u uzorku sinovijske tečnosti. Kod tri bolesnika je utvrđena smanjena ekspresija ovog gena u oba uzorka (sinoviji i sinovijskoj tečnosti) u odnosu na onu koja je dobijena u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije.

Sva tri bolesnika koja su imala nižu ekspresiju gena za bakarporfirinogen III oksidazu (*Ct 052/hemN*) su imali i nižu ekspresiju gena za prolil - tRNK sintetazu u uzorcima sinovije u odnosu na ekspresiju gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pre terapije.

Ekspresija gena za ATPazu koja transportuje katjone (*Ct 727/cadA*) je utvrđena samo u jednom uzorku sinovijske tečnosti gde je bila smanjena u odnosu na ekspresiju ovog gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pre terapije.

Gen za komponentu čestice koja prepoznaje signal (*Ct 820/ftsY*) je bio povećano ekspimiran kod četiri bolesnika - u uzorcima sinovijskog tkiva (3) i sinovijske tečnosti (1) u odnosu na dobijenu ekspresiju u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije.

Ekspresija svih navedenih gena je prikazana na Slici 31.



**Slika 31. Ekspresija gena za: proteine toplotnog šoka HSP60 (*Ct 604*, *Ct 110*, *Ct 755*), za prolil - tRNK sintetazu (*Ct 393/proS*), bakarporfirinogen III oksidazu (*Ct 052/hemN*), ATPazu koja transportuje katjone (*Ct 727/cadA*) i komponentu čestice koja prepoznaje signal (*Ct 820/ftsY*) u uzorcima sinovije (A) i sinovijske tečnosti (B) bolesnika druge grupe u odnosu na nivo ekspresije istih gena u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije. 16S rRNK je korišćena kao endogena kontrola da bi se kompenzovale razlike u koncentraciji cDNK uzoraka u svakoj reakciji, a uzorci mononuklearnih ćelija pre terapije kao kalibrator. Nivo ekspresije ciljnih gena je normalizovan prema nivou ekspresije endogene kontrole, a zatim prema kalibratoru. Vrednost relativne kvantifikacije (RQ) za kalibrator je uvek bila 1. Budući da je ekspresija gena prikazana kao vrednosti  $\log_{10}$  (a  $\log_{10}$  od 1 je 0), vrednost za kalibrator u grafikonu se pojavljuje kao 0.**

Vrednosti za ekspresiju ispitivanih gena u uzorcima mononuklearnih ćelija posle kombinovane antibiotske terapije u odnosu na vrednosti ekspresije gena koje su dobijene u mononuklearnim ćelijama pre terapije su navedene u Tabeli 14.

Tabela 14. Ekspresija gena za: proteine toplotnog šoka HSP60 (*Ct 604*, *Ct 110*, *Ct 755*), za prolil - tRNK sintetazu (*Ct 393/proS*), bakarporfirinogen III oksidazu (*Ct 052/hemN*), ATPazu koja transportuje katjone (*Ct 727/cadA*) i komponentu čestice koja prepoznaje signal (*Ct 820/ftsY*) u uzorcima mononuklearnih ćelija (MNC) periferne krvi posle terapije u odnosu na ekspresiju istih gena u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije. Povećana ekspresija najmanje jednog od analiziranih gena je nađena kod četiri bolesnika (3, 5, 8, 21) i kod niti jednog od njih nije postignuta klinička remisija. Kod 3/5 bolesnika (2, 11, 17) sa smanjenom ekspresijom gena je posle terapije postignuta remisija. Kod preostala dva bolesnika, nije postignuta remisija bolesti, ali je oligoartritis konvertovan u monoartritis (14, 20).

Bolesnici	<i>Ct 604</i>	<i>Ct 110</i>	<i>Ct 755</i>	<i>Ct 393/proS</i>	<i>Ct 052/hemN</i>	<i>Ct 727/cadA</i>	<i>Ct 820/ftsY</i>
2	0.393	-	0.646	-	-	-	-
3	0.165	-	9.984	-	69.183	-	40.503
5	0.056	0.367	0.766	1.320	0.442	-	0.903
8	0.609	1.077	0.335	1.622	-	-	0.073
11	-	-	0.759	0.237	-	-	-
14	-	-	0.389	-	-	-	-
17	-	-	0.840	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-	-
21	0.008	-	0.052	0.034	-	-	2.965

■ povećana ekspresija gena *C. trachomatis*

**DISKUSIJA**

Rajterov sindrom je seronegativni artritis koji nastaje kao posledica infekcije u udaljenim mestima, akutne nespecifične urogenitalne ili enteralne infekcije. Za Rajterov sindrom su karakteristični nesimetrični artritis na donjim ekstremitetima i promene na očima, koži i sluzokoži. Bolest počinje naglo i postepeno se smiruje nakon 6 do 12 meseci od početka nastanka. Međutim, u oko polovine od ukupnog broja bolesnika, akutni oblik bolesti prelazi u hronični oblik (Villareal, 2002; Gérard, 2004). Dolazi do ponovljenih epizoda bolesti (recidiva) koje ne moraju uvek biti praćene svim kliničkim manifestacijama Rajterovog sindroma. Obično se javljaju nakon 2 do 5 godina od nastanka bolesti. Razvoju Rajterovog sindroma doprinosi više faktora a centralno mesto u patogenezi zauzimaju prisustvo bakterija ili njihovih produkata, interakcija između bakterije i domaćina i imunski odgovor domaćina usmeren prema bakterijama.

Svaka urogenitalna infekcija ne dovodi do razvoja bolesti. Zapravo mali broj osoba kod kojih je *C. trachomatis* uzročnik infekcije oboli od akutnog oblika Rajterovog sindroma. Zašto se kod nekih inficiranih individua razvija Rajterov sindrom, a kod drugih ne, nije do kraja razjašnjeno. Sve ukazuje na kompleksan odnos između bakterije i domaćina. Naravno, važan je genetički "*back-ground*" bolesnika (Koehler, 1998). HLA-B27 antigen je nađen kod 81% od ukupnog broja bolesnika uključenih u studiju što je u skladu sa rezultatima koji su objavljeni u literaturi (Kwiatkowska, 2009). Kod osoba koje imaju antigen HLA-B27, Rajterov sindrom se češće razvija ako je prisutan i infektivni agens.

Istraživanja su pokazala da značajan udeo u sklonosti prema spondiloartropatijama, kojima pripada i Rajterov sindrom, potiče od gena izvan HLA regiona. Sve je više dokaza da obrazac sekrecije citokina utiče na razvoj spondiloartropatija (Rudwaleit, 2001). Th2 obrazac sekrecije citokina (nizak faktor nekroze tumora alfa, nizak inteferon gama i visok interleukin -10) dominira u zglobovima kod Rajterovog sindroma. Znatan udeo u sekreciji citokina za interleukin -10 i faktor nekroze tumora alfa je genetički kontrolisan i pod uticajem polimorfizama gena. Određivanjem genskih polimorfizama gena za citokine mogu se identifikovati osobe sa visokim rizikom za razvoj bolesti.

Proinflamatorni citokini tipa I, posebno faktor nekroze tumora - alfa (TNF $\alpha$ ), imaju važnu ulogu u patogenezi spondiloartropatija pa su anti - TNF $\alpha$  agensi veoma efikasni u kontroli aktivnosti bolesti i sprečavanju oštećenja koja se mogu radiografski detektovati.

Rajterov sindrom se najčešće razvija kod osoba između 20 i 40 godina starosti (kao što je bio slučaj i sa našim bolesnicima) što se dovodi u vezu sa činjenicom da su one polno najaktivnije i zbog toga izložene najvećem riziku od uretralnih infekcija koje se prenose seksualnim putem . Međutim, oboleti se može u bilo kojoj životnoj dobi. U našoj studiji, najmlađi bolesnik je imao 14 godina a najstariji 68. Muškarci i žene podjednako oboljevaju od Rajterovog sindroma ali je veća učestalost urogenitalnog oblika ove bolesti kod muškaraca. Na urogenitalni oblik Rajterovog sindroma treba posumnjati kada su u skoroj istoriji bolesti prisutni cistitis, prostatitis, neobjašnjeni simptomi vezani za urogenitalni trakt, infekcija hlamidijama ili konjunktivitis (Klinkhoff, 2000).

Za pravilnu terapiju primarne infekcije kao i za sprečavanje prenošenja infekcije na druge individue, brza identifikacija patogenih mikroorganizama u urogenitalnom traktu je od presudne važnosti (Bobo, 1990; Khan, 2011). Nadalje, uspešna identifikacija mikroorganizama i njihovih nukleinskih kiselina u zglobovima bolesnika sa Rajterovim sindromom (Taylor-Robinson, 1992; Branigan, 1996; Freise 2001; Gérard 2010) je važan pomoćni dokaz u dijagnostici ove bolesti (Schumacher, 1998).

Prouzrokovajući urogenitalnog oblika Rajterovog sindroma su: *Chlamydia trachomatis* i genitalne mikoplazme (*Ureaplasma urealyticum* i *Mycoplasma hominis*) a u novije vreme se kao uzročnik navodi i bakterija *Chlamydia pneumoniae* koji je inače poznata kao respiratorni patogen. Za razliku od *C. trachomatis* koja se rasejava iz urogenitalnog trakta (prvobitnog mesta infekcije) i pomoću monocita dospeva do udaljenih anatomskih lokacija - zglobova, *C. pneumoniae* se širi aerosolima u respiratornim infekcijama (Inman, 2000). Obe bakterije mogu biti prisutne kroz duži vremenski period u zglobovima bolesnika sa Rajterovim sindromom (Gérard, 1998; Rihl, 2006).

Za detekciju bakterija se koriste različiti dijagnostički testovi. *C. trachomatis* je striktno intracelularna bakterija pa se kultivisanje ove bakterije izvodi u sistemu živih ćelija. Izolacija *C. trachomatis* na kulturi ćelija (najčešće McCoy) se smatrala zlatnim standardom u dijagnostici. Testovi u kojima se inkluzije hlamidija u ćelijskim kulturama identifikuju korišćenjem imunofluorescentnog bojenja su 100 % specifični ali je kultivisanje *C. trachomatis* tehnički teško, zahteva mnogo vremena i specijalne podloge za transport. Česti su i negativni nalazi *C. trachomatis* u standardnoj laboratorijskoj kulturi

sinovije. Pomoću seroloških testova se detektuje prisustvo specifičnih antitela. U praksi se najčešće koriste ELISA testovi (*enzyme linked immunosorbent assay*) koji detektuju antitela na lipopolisaharide hlamidije (Tomanović, 2010).

Rutinske procedure koje se izvode u našoj bolnici za dijagnozu Rajterovog sindroma, između ostalog uključuju mikrobiološku analizu uretralnih i cervikalnih briseva i sinovijske tečnosti.

U našim istraživanjima, korišćene su osetljive metode molekularne detekcije, PCR i „*real-time*” PCR za identifikaciju infektivnih agenasa (*C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *M. hominis* i *U. urealyticum*) i procenu efekata dva različita terapijska protokola za lečenje urogenitalnog oblika Rajterovog sindroma.

Rezultati PCR analiza koji se odnose na uzorke sinovijske tečnosti pre kombinovane antibiotske terapije su se razlikovali od rezultata dobijenih ćelijskom kulturom u toku rutinskih dijagnostičkih procedura. Šest bolesnika druge grupe je bilo pozitivno na bakterijsku DNK u uzorcima sinovijske tečnosti samo PCR testom. Izolacija u kulturi ćelija je tehnika sa visokom osetljivošću (80%) i specifičnošću (100%) ali su testovi na molekularnom nivou koji amplifikuju DNK *C. trachomatis* omogućili otkrivanje prisustva nukleinskih kiselina ove bakterije u različitim kliničkim uzorcima i onda kada postoji mali broj ćelija u uzorku.

Statistički značajno više pozitivnih nalaza *C. trachomatis* same ili u kombinaciji sa drugim mikroorganizmima (*C. pneumoniae*, *U. urealyticum* ili *M. hominis*) je nađeno PCR metodom u odnosu na izolaciju na kulturi ćelija u drugoj grupi bolesnika pre terapije. PCR metodom, *C. trachomatis* je nađena u uzorcima sinovijske tečnosti kod osam bolesnika dok je ćelijskom kulturom detektovana samo kod tri bolesnika ( $\chi^2$ ,  $df=1$ ,  $p=0.02$ ). Ovi rezultati ukazuju na veću osetljivost PCR metode u detekciji *C. trachomatis*. Zbog problema koji se odnose na kultivisanje *C. trachomatis* iz uzoraka sinovijskog tkiva, PCR test se preporučuje kao metoda izbora u rutinskoj dijagnostici infekcije sa *C. trachomatis*.

Naši rezultati koji su u saglasnosti sa ranije objavljenim podacima u literaturi ukazuju da su testovi u kojima se za detekciju bakterije *C. trachomatis* koristi amplifikacija nukleinskih kiselina bolji od ostalih (Jalava, 2001; Sieper, 2002; Watson, 2002; Hannu, 2011; Zarco Montejo, 2012).

Metoda lančane reakcije polimeraze, PCR, je veliko otkriće u oblasti molekularne biologije i zauzima važno mesto kako u istraživanjima tako i u dijagnostici. Visoka senzitivnost PCR reakcije je omogućila pouzdanu i objektivnu detekciju i identifikaciju različitih mikroorganizama čak i onda kada su prisutni u malom broju (npr. u zglobu).

Međutim, procenat PCR pozitivnih uzoraka na *C. trachomatis* varira između laboratorija. Jedan od razloga je činjenica da neke laboratorije analiziraju DNK iz sinovijske tečnosti dok druge analiziraju DNK koja je izolovana iz sinovije. Branigan i saradnici (1996) smatraju da, kada je god to moguće, trebalo bi analizirati i sinovijsku tečnost i sinoviju.

U našim istraživanjima su ispitivane tri vrste uzoraka: sinovija, sinovijska tečnost i mononuklearne ćelije periferne krvi da bi se povećala mogućnost detekcije bakterijske DNK. Najveći broj pozitivnih nalaza bakterijske DNK je detektovan u uzorcima mononuklearnih ćelija u obe ispitivane grupe bolesnika pre terapije azitromicinom (80,0%) i kombinovane antibiotske terapije (81,8%). Takođe, visoki procenat pozitivnih nalaza bakterijske DNK je nađen u uzorcima sinovije bolesnika iz obe grupe pre terapije azitromicinom (60,0%) odnosno pre kombinovane antibiotske terapije (77,8). Najmanji broj pozitivnih nalaza bakterijske DNK (samo 25%), je detektvan u uzorcima sinovijske tečnosti prve grupe bolesnika pre terapije azitromicinom.

Analize rezultata detekcije bakterijske DNK dobijenih PCR testom su pokazale da je u svim ispitivanim uzorcima kod bolesnika druge grupe najčešća bakterija pre kombinovane antibiotske terapije bila *C. trachomatis*. Više pozitivnih nalaza je bilo u uzorcima mononuklearnih ćelija i sinovijskog tkiva nego u uzorcima sinovijske tečnosti. Pre terapije, 14/18 (77,8%) uzoraka sinovije je imalo pozitivan nalaz DNK *C. trachomatis*, 18/22 (81,8%) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi dok je samo u 8/15 (53,3%) uzoraka sinovijske tečnosti detektovana DNK ove bakterije. Treba napomenuti da je na početku studije istovremeno pozitivan nalaz bio prisutan u sinovijskoj tečnosti i sinoviji 7 od 13 (53,8%) bolesnika druge grupe kod kojih su za analizu na raspolaganju bile obe vrste uzoraka dok u grupi bolesnika koja je lečena azitromicinom nije bilo istovremeno pozitivnih uzoraka sinovijske tečnosti i sinovije. Ovi rezultati pokazuju da se oni bolesnici kod kojih su testirani samo uzorci sinovijske tečnosti ne mogu smatrati negativnim na *C.*



*trachomatis*. Slični podaci su dati i u literaturi (Branigan, 1996). Hlamidijska DNK je često prisutna u visokoj koncentraciji u sinoviji bolesnika sa Rajterovim sindromom. Mikroorganizam je u sinoviji zgloba verovatno najstabilniji i ostaje duže nego u ćelijama sinovijske tečnosti.

Visoki procenat pozitivnih rezultata (81,8%) dobijenih PCR testiranjem uzoraka mononuklearnih ćelija periferne krvi u našim istraživanjima ukazuje na mogućnost upotrebe PCR-a kao brze i pouzdane metode za detekciju bakterijske DNK u uzorcima koji se dobijaju manje invazivnim zahvatom nego što je slučaj sa uzorcima sinovije (artroskopska sinovijektomija) i, samim tim, više pogodne za rutinsku upotrebu. Međutim, najbolja opcija je da se analiziraju svi raspoloživi uzorci.

Različiti preparativni sistemi odnosno metode za izolaciju genomske ili plazmidne DNK iz mikroorganizma takođe mogu uticati na proces amplifikacije i dobijanje produkata na osnovu kojih se PCR testom vrši detekcija bakterijske DNK (Bas, 1997; Bandea, 2001; Freise, 2001, 2009). Izolacija DNK fenolom je jedna od prvih metoda za izolaciju DNK koja je opisana u literaturi. Iako je teža i zahteva više vremena u odnosu na komercijalne kitove za izolaciju DNK, ova metoda se još uvek koristi u mnogim laboratorijama zbog dobrog prinosa i visokog kvaliteta izolovane DNK. Zbog jednostavnosti, pouzdanosti i netoksičnosti neki autori preporučuju Qiagen kit u rutinskoj dijagnostici a izolaciju DNK fenolom kao najbolju tehniku za istraživačke svrhe (Freise, 2001).

U našim istraživanjima je DNK izolovana iz uzoraka sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi bolesnika sa Rajterovim sindromom fenolskom ekstrakcijom. Prinos i kvalitet izolovane DNK su bili visoki što je utvrđeno spektrofotometrijski i elektroforetski na 1% agaroznom gelu. Kvalitet izolovane DNK je potvrđen i uspešnom PCR amplifikacijom  $\beta$  aktin gena (neuspešna amplifikacija ovog gena ukazuje na prisustvo inhibitornih komponenti PCR-a u uzorku ili da je DNK degradovana).

Pored vrste uzorka iz kojih se vrši analiza DNK, preparativnih sistema za izolaciju DNK, na procenat PCR pozitivnih uzoraka svakako utiče i vrsta PCR esejja. PCR esej sa prajmerima kojima je ciljna sekvenca gen za ribozomalnu RNK, inače prisutna u dve kopije na hlamidijskom hromosomu (Engel, 1987), je mnogo osetljiviji nego esej kod koga je ciljna sekvenca jedna kopija DNK kao što je slučaj sa genom za veliki spoljašnji protein

membrane (*omp1*). Visoku osetljivost u detekciji hlamidija bi takođe trebao dati esej kod kojeg je ciljna sekvenca plazmid budući da je on prisutan u svakoj hlamidijskoj ćeliji u 10-20 puta većem broju nego gen u jednoj kopiji.

Međutim, 2006. godine otkrivena je *C. trachomatis* sa delecijom 377 baznih parova u regionu plazmidne DNK koji se inače koristi kao target za amplifikaciju nukleinskih kiselina u komercijalnim molekularnim dijagnostičkim testovima za detekciju mikroorganizma. Nemogućnost detekcije izmenjene sekvence plazmida dovodi do negativnih dijagnostičkih nalaza, pa se infekcije ovom bakterijom ne leče što ima za posledicu značajno povećanje novih slučajeva (Seth-Smith, 2009). Zbog ovakvih slučajeva detekcija hlamidija se ne bi trebala zasnivati samo na detekciji plazmidne DNK.

Sva tri navedena PCR testa su korišćena u našoj studiji za detekciju bakterije *C. trachomatis* u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija druge grupe bolesnika koji su uzeti pre kombinovane antibiotske terapije. Najveći broj pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* pre terapije (u uzorcima sinovije - 77,8%, sinovijske tečnosti - 53,3%, mononuklearnim ćelijama periferne krvi - 81,8%) je dobijen korišćenjem prajmera kojima je ciljna sekvenca bio gen za 16S ribozomalnu RNK. PCR test u kojem su korišćeni prajmeri za plazmidnu DNK dao je manji broj pozitivnih nalaza DNK *C. trachomatis* u odnosu na PCR u kojem su korišćeni prajmeri za gen *omp1* izuzev u uzorcima mononuklearnih ćelija.

PCR testovi za detekciju DNK *C. pneumoniae* su takođe podrazumevali korišćenje različitih visoko specifičnih prajmera kojima su ciljne sekvence bili geni za 16S ribozomalnu RNK, *omp1* gen i plazmid. U uzorcima sinovije i sinovijske tečnosti su dobijeni bolji rezultati detekcije DNK *C. pneumoniae* sa prajmerima za plazmidnu DNK pre kombinovane antibiotske terapije u odnosu na detekciju sa prajmerima kojima je ciljna sekvenca bio gen za 16S rRNK.

Za detekciju DNK *M. hominis* PCR testom korišćeni su prajmeri kojima je ciljna sekvenca bio gen za 16S rRNK a za detekciju DNK *U. urealyticum* gen za ureazu. Genitalne mikoplazme (*M. hominis* i *U. urealyticum*) su takođe potencijalni pokretači akutnog i hroničnog artritisa (Taylor-Robinson, 2001). Pre terapije azitromicinom najčešće detektovane bakterije PCR-om kod prve grupe bolesnika su bile *M. hominis* (70%) i *U.*

*urealyticum* (40%). Kod bolesnika druge grupe, mikoplazme su bile prisutne u zglobovima sa manjom učestalošću u poređenju sa hlamidijama pre kombinovane antibiotske terapije.

Saznanje da su hlamidije i druge bakterije prisutne u sinovijalnoj tečnosti i sinovijalnom inflamiranom zglobovima je dalo veliku nadu da bi antibiotska terapija za ove bolesnike mogla biti terapija izbora. To je bio razlog zašto su doziranje i trajanje antibiotske terapije u lečenju Rajterovog sindroma bili predmet istraživanja u velikom broju studija. Rana antibiotska terapija primarne infekcije (kao što je npr. uretritis uzrokovan *C. trachomatis*) je efikasna u sprečavanju razvoja Rajterovog sindroma, ali kada se on već razvio, kratkotrajna konvencionalna antibiotska terapija nije u mogućnosti da promeni tok bolesti (Leirisalo-Repo, 1998). U lečenje hlamidijske infekcije su obično uključeni tetraciklin ili doksiciklin ali i drugi antibiotici mogu biti efikasni protiv hlamidija. Mikoplazme su neosetljive na one antibiotike koji deluju na bakterijski ćelijski zid (npr. peniciline i cefalosporine) jer one imaju samo plazmatsku membranu. Važno je da seksualni partneri takođe budu uključeni u program lečenja.

Brojni autori smatraju da kratkotrajna antibiotska terapija nije dovoljna da se bakterije eliminišu iz zglobova i da period lečenja mora trajati najmanje tri meseca (Schumcher, 1998) ili čak i duže (Carter, 2010).

Rizzo i saradnici su 2012. godine opisali slučaj bolesnika sa Rajterovim sindromom kome je dijagnoza postavljena na osnovu kliničke slike, simptomatske respiratorne i prethodne uretralne infekcije. Bolesnik je istovremeno imao infekciju sa *C. pneumoniae* i *C. trachomatis* i u prikazu slučaja autori su dali svoj predlog lečenja Rajterovog sindroma koji se dovodi u čvrstu vezu sa ovim bakterijama. Hronična infekcija bakterijom *C. trachomatis* i akutna infekcija bakterijom *C. pneumoniae* su tretirane kombinacijom azitromicina i rifampina. Rifampin ima odličnu penetraciju u tkiva i obavezan je u terapiji protiv obligatnih intracelularnih patogena kao što su hlamidije, a azitromicin blokira sintezu proteina. Bolesnik je lečen tri meseca nakon čega je sledila jednomesečna pauza i nastavak antibiotske terapije u trajanju od dva meseca. Svrha pauze je vraćanje mikroorganizma iz perzistentnog stanja u aktivan životni ciklus što ih čini mnogo osetljivijim u drugom ciklusu antibiotske terapije pa je to od presudnog značaja za tok i ishod lečenja. Simptomi

bolesti su počeli da se povlače posle prva tri meseca terapije a posle šest meseci je došlo do potpunog oporavka bolesnika.

U našem istraživanju, analizirani su efekti sinovijektomije praćene antibiotskom terapijom (azitromicin ili kombinovana terapija sa ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom). Rezultati koje smo dobili pokazuju da je kod većine bolesnika moguće postići kliničku remisiju. Visoki procenat izlečenja (75,0% kod bolesnika koji su lečeni azitromicinom i 68,2% kod bolesnika koji su lečeni kombinovanom antibiotskom terapijom ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom) verovatno je posledica istovremeno sprovedene hirurške i antibiotske terapije. Naime, kod svih bolesnika (kod kojih je artritisom bilo zahvaćeno koleno), prilikom uzimanja uzoraka sinovije za analizu urađena je i artroskopska sinovijektomija. Na taj način je fizički odstranjeno hipertrofično sinovijsko tkivo. Obe terapije (terapija azitromicinom i kombinovana antibiotska terapija) su dovele do povećanja broja bolesnika sa negativnim nalazom bakterija u uzorcima mononuklearnih ćelija. Ovo povećanje je bilo statistički značajno kod bolesnika koji su lečeni azitromicinom. Treba napomenuti da je većina bolesnika prve grupe lečenih azitromicinom imalo monoartritis, dok je polovina bolesnika druge grupe lečenih kombinovanom antibiotskom terapijom imalo oligoartritis.

Od šesnaest (80,0%) bolesnika prve grupe sa pozitivnim nalazom bakterijske DNK u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije, negativan nalaz je imalo osam (50,0%) posle terapije azitromicinom. Posle kombinovane antibiotske terapije, od osamnaest (81,8%) bolesnika druge grupe sa pozitivnim nalazom bakterijske DNK pre terapije, negativan nalaz je imalo devet (50,0%). Od četiri bolesnika sa negativnim nalazom pre terapije, jedan bolesnik je imao pozitivan nalaz posle terapije u prvoj grupi bolesnika koji su lečeni azitromicinom. Kod druge grupe sva četiri bolesnika, koji su imali negativan nalaz bakterijske DNK pre terapije, su imali pozitivan nalaz DNK *C. trachomatis* a kod jednog bolesnika je bila prisutna koinfekcija *C. trachomatis* i *C. pneumoniae* u uzorku mononuklearnih ćelija posle kombinovane antibiotske terapije. Nalazi da neki pacijenti koji su bili negativni na bakterijske DNK pre terapije mogu postati pozitivni nakon terapije su opisani u literaturi (Carter, 2010). To može biti objašnjeno mogućom reinfekcijom od

seksualnog partnera koji je asimptomatski nosilac bakterije i ne pridržavanja propisanog terapijskog protokola.

Uprkos visokoj osetljivosti PCR metode, ona ne može da pruži odgovor na jedno od najvažnijih pitanja vezano za procenu toka bolesti i ishod lečenja - da li su bakterije žive jer se ovom metodom detektuju i mrtvi mikroorganizmi ili samo delovi njihovih genoma.

Da bismo utvrdili da li su bakterije žive (vijabilne) ili ne koristili smo RT- i „*real-time*” PCR testove. Bolesnici koji su konvencionalnim PCR testom bili pozitivni na *C. trachomatis* su imali vijabilne bakterije u zglobovima (uzorci sinovije i sinovijske tečnosti) i perifernoj krvi (uzorci mononuklearnih ćelija). U svim uzorcima je bio eksprimiran gen za 16S rRNA. Prisutnost vijabilnih bakterija u uzorcima mononuklearnih ćelija posle kombinovane antibiotske terapije ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom ukazuje na bakteriostatski a ne baktericidni efekat primenjenih antibiotika. Koristeći kvantitativni „*real-time*” PCR za određivanje osetljivosti intracelularnih bakterija na antibiotike, Peachuant i saradnici (2011) su testirali četiri antibiotika (ofloksacin, moksifloksacin, azitromicin i doksiciklin) i utvrdili da oni inhibiraju razmnožavanje *C. trachomatis* ali nisu baktericidni prema ovom mikroorganizmu.

Na osnovu dokaza da je hlamidija u sinoviji bolesnika sa Rajterovim sindromom vijabilna, metabolički aktivna, ali intracelularna i u kulturi sinovijskog materijala negativna zbog neuobičajene adaptacije bakterijskog metabolizma, smatra se da je zaustavljena u nekoj tački životnog ciklusa i da se kao posledica toga ne stvaraju nova elementarna tela.

Indukciju latentnog odnosno perzistentnog oblika hlamidije može prouzrokovati i lečenje antibioticima. Postoje mišljenja da je hlamidija kada dosegne zglob već u perzistentnom stanju, pa čak i da je akutna bolest izazvana pre perzistentnim bakterijama nego onim koje prolaze aktivni životni ciklus. Stoga bi reumatolozi koji leče bolesnike sa akutnim oblikom artritisa uzrokovanog hlamidijama, kao i hronične bolesnike, trebali imati u vidu pri odabiru lečenja da se radi o perzistentnim bakterijama i njihovom izmenjenim biološkim karakteristikama. Perzistentne hlamidije pokazuju drukčiji transkripcioni profil u odnosu na transkripcioni profil kod aktivne infekcije (Gérard, 1998; Harper, 2000; Freise, 2001). Na primer, informaciona RNK koja kodira glavni spoljašnji protein membrane *C. trachomatis* se ne detektuje RT-PCR-om u uzorcima sinovije čija RNK pokazuje bogate

transkripte za ribozomske komponente (Gérard, 1998). Ovaj protein kojeg kodira gen *ompI* čini 30,0% proteinske sinteze kod normalnog vegetativnog rasta hlamidija i predstavlja važnu strukturnu i funkcionalnu komponentu spoljašnje površine hlamidijskih ćelija. Njegovo odsustvo dovodi do izmenjene morfologije mikroorganizma u dugotrajnim sinovijskim infekcijama kao i u *in vitro* sistemima humanih monocita iz periferne krvi inficiranih hlamidijom u prisustvu interferona  $\gamma$ .

Iako postoje određena saznanja o transkripcionim i morfološkim karakteristikama hlamidija u perzistentnom obliku, nije u potpunosti poznata genetička osnova uspostavljanja perzistentne infekcije. Potpuno razumevanje ovog stanja je otežano zbog odsustva sistema za genetičku manipulaciju hlamidija i velikog broja gena u njihovom genomu koji kodiraju proteine nepoznate funkcije (Read, 2000). Budući da genetička manipulacija hlamidija nije moguća, identifikacija gena hlamidija koji su ortolgnu u odnosu na gene drugih perzistentnih organizama može biti od koristi za nova saznanja o perzistentnoj infekciji (Cole, 1998; Zahrt, 2003; Stewart, 2003). Gérard i saradnici (2006) su utvrdili da 67/194 (35,0%) gena *Mycobacterium tuberculosis* ima svoje ortologe kod *C. trachomatis*. To su geni koji kodiraju produkte uključene u ćelijsku sintezu, sintezu kofaktora, transport, translaciju i dr. kao što su prolil - tRNK sintetaza (*Ct 393/proS*), bakarporfirinogen III oksidaza (*Ct 052/hemN*), ATPaza koja transportuje katjone (*Ct 727/cadA*) i komponenta čestice koja prepoznaje signal (*Ct 820/ftsY*) (Sasseti, 2003). U genomu *C. trachomatis* je prisutno 900 kodirajućih sekvenci i svaka od njih se eksprimira pre ili kasnije u toku aktivnog rasta organizma (Read, 2000; Nicholson, 2003; Belland, 2003) i ne postoji gen ili set gena čija bi funkcija bila samo uspostavljanje perzistentnog stanja. Dok perzistencija *M. tuberculosis* uglavnom proizlazi usled ekspresije specifičnog seta gena, smatra se da kod *C. trachomatis* ovo stanje nastaje podešavanjem nivoa transkripcije gena koji su već ekspimirani.

U našoj studiji smo ispitivali ekspresiju gena koji kodiraju proteine HSP60, prolil-tRNK sintetazu, bakarporfirinogen III oksidazu, ATPazu koja transportuje katjone i komponentu čestice koja prepoznaje signal. Ispitivali smo ekspresiju tri gena za proteine HSP60 (*Ct 604*, *Ct 110*, *Ct 755*). Oni su imali različite profile ekspresije što ukazuje da se svaki od ovih gena eksprimira nezavisno. "Heat shock" proteini su uključeni u mnoge

processe koji su neophodni za normalno funkcionisanje ćelije i njihova sekvenca je visoko konzervativna. Poznato je da protein HSP60 indukuje jaku inflamatornu reakciju na mestu njegove proizvodnje i zajedno sa hlamidijskim lipopolisaharidom (LPS) mogao bi biti glavni promotor inflamacije koja je karakteristična za sinoviju bolesnika sa Rajterovim sindromom. Istraživanja su pokazala da je imunogeni protein HSP60 koji proizvode hlamidije u velikoj meri odgovoran za izazivanje inflamacije sinovije u oba oblika bolesti, akutnom i hroničnom. Većina sinovijskih CD4<sup>+</sup> T ćelijskih klonova proliferiše kao odgovor na protein HSP60 hlamidija a manjina kao odgovor na produkt *omp1* gena (Campbell, 1996; Martinez-Prado, 2010).

Analize sinovijske tečnosti i tkiva su pokazale različite transkripcione profile hlamidijskih gena. Prema literaturnim podacima, različiti profili genske ekspresije mogu biti odraz razlike u kliničkim karakteristikama uključujući godine starosti, trajanje bolesti, genetičku osnovu i složen odnos između mikroorganizama i domaćina (Gérard, 2004). Kod sva četiri bolesnika sa povećanom ekspresijom jednog ili više gena (*Ct 110*, *Ct 755*, *Ct 393/proS*, *Ct 052/hemN*, *Ct 820/ftsY*) u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi nije postignuta klinička remisija kombinovanom antibiotskom terapijom.

Konačno, naši rezultati o kliničkoj korisnosti upotrebe različitih PCR metoda mogu biti ilustrovani jednim interesantnim slučajem bolesnice koja je bila uključena u studiju. Žena starosti trideset godina je primljena u našu bolnicu zbog monoartrisa levog kolena. Prisustvo DNK *C. trachomatis* u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi je potvrđeno PCR testom. Prisustvo *U. urealyticum* u sinovijskoj tečnosti je detektovana i sa PCR-om i testovima ćelijske kulture dok je za detekciju njihovog prisustva u cervikalnom i uretralnom brisu korišćena samo metoda ćelijske kulture. Nakon sinovijektomije i četveromesečne antibiotske terapije ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom postignuta je klinička remisija. Ćelijska kultura cervikalnog i uretralnog brisa kao i sinovijske tečnosti je dala negativne rezultate vezane za prisustvo bakterija. Međutim, PCR testom je detektovana *C. trachomatis* u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi. „Real-time” PCR testom je utvrđena povećana ekspresija hlamidijskih gena koja je bila približno deset puta veća za gen *Ct 755*, sedamdeset puta za gen *Ct 052/hemN* i četrdeset puta za gen *Ct 820/ftsY*. Tri meseca

kasnije, bolesnica je hospitalizovana zbog monoartritisa desnog kolena. Tada je ćelijskom kulturom u sinovijskoj tečnosti detektovana *M. hominis*. PCR analizom je potvrđeno prisustvo *M. hominis* u uzorku sinovijske tečnosti, a *C. trachomatis* i *C. pneumoniae* su takođe detektovane u svim analiziranim uzorcima PCR metodom. Ekspresija gena *Ct 604* je bila približno 87 puta veća nego u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi. Posle terapije azitromicinom, postignuta je i klinička i molekularna remisija praćena negativnim nalazom bakterijske DNK u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi kod bolesnice.

Detekcija i identifikacija različitih mikroorganizama „okidača“ je veoma važna za ranu dijagnozu bolesti i lečenje.

Rezultati koji su dobijeni analizom efekata sinovijektomije praćene antibiotskom terapijom (azitromicin ili kombinovana terapija sa ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom) pokazuju da je kod većine bolesnika moguće postići kliničku remisiju. Visoki procenat izlečenja verovatno je posledica istovremeno sprovedene hirurške i antibiotske terapije.

Određivanje prisustva vijabilnih bakterija je važno za određivanje dužine trajanja antibiotske terapije. Još uvek se ne zna da li se bakterije eliminišu u potpunosti antibiotskom terapijom iz sinovije bolesnika kod kojih bolest nije prešla u hronični oblik ili se one tu zadržavaju u perzistentnom ali subkliničkom obliku. Sinovijektomija podrazumeva delimično uklanjanje sinovijalnog dela zglobne kapsule (potpuno uklanjanje je tehnički vrlo teško, ako ne i nemoguće) pa se bakterije ne mogu u potpunosti eliminisati ovim oblikom lečenja ali se njihov broj odstranjivanjem hipertrofičnog sinovijskog tkiva u kojem se nalaze može znatno smanjiti. Dalja istraživanja su usmerena na rešavanje ovog problema i dobijanje najefikasnije kombinacije antibiotske terapije uključujući doziranje i trajanje.



**ZAKLJUČCI**

Na osnovu rezultata dobijenih konvencionalnim PCR testom (detekcija bakterijske DNK) i RT- i „*real-time*” PCR testovima (utvrđivanje vijabilnosti *C. trachomatis*) doneseni su sledeći zaključci:

1. Korišćenjem osetljive metode molekularne detekcije bakterijske DNK kod bolesnika sa urogenitalnim oblikom Rajterovog sindroma je utvrđeno prisustvo sledećih bakterija: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* (gen za 16S rRNK) i *Ureaplasma urealyticum* (gen za ureazu) u uzorcima sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi pre terapije azitromicinom ili kombinovane antibiotske terapija ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom. Rezultati koji su dobijeni u ovom radu potvrđuju da je Rajterov sindrom i infektivne, a ne samo reaktivne prirode.
2. Najveći broj pozitivnih nalaza bakterijske DNK je detektovan u obe ispitivane grupe bolesnika pre terapije azitromicinom (80,0%) i kombinovane antibiotske terapije (81,8%) u uzorcima mononuklearnih ćelija. Takođe, visoki procenat pozitivnih nalaza bakterijske DNK je nađen u uzorcima sinovije bolesnika iz obe grupe - 60% pre terapije azitromicinom odnosno 77,8% pre kombinovane antibiotske terapije a najmanji (samo 25%) je detektvan u uzorcima sinovijske tečnosti prve grupe bolesnika pre terapije azitromicinom. Ovi rezultati pokazuju da se oni bolesnici kod kojih su testirani samo uzorci sinovijske tečnosti ne mogu smatrati negativnim na *C. trachomatis*.
3. Visoki procenat pozitivnih rezultata dobijenih PCR testiranjem uzoraka mononuklearnih ćelija periferne krvi (80%) ukazuje na mogućnost testiranja uzoraka koji se dobijaju manje invazivnim zahvatom i, samim tim, više pogodnim za rutinsku upotrebu dok bi se uzorci sinovije i sinovijske tečnosti koristili samo u slučajevima kada je nalaz bakterijske DNK u uzorcima mononuklearnih ćelija negativan.

4. Najčešće detektovane bakterije kod bolesnika prve grupe pre terapije azitromicinom su bile *M. hominis* - 14/20 (70,0%) i *U. urealyticum* 8/20 (40,0%) a kod druge grupe bolesnika pre kombinovane antibiotske terapije, *C. trachomatis* - 21/22 (95,5%) bolesnika.
5. Kod većine bolesnika je pre terapije bila prisutna koinfekcija sa dve vrste bakterije. Kod jednog bolesnika prve grupe pre terapije azitromicinom i kod četiri bolesnika druge grupe pre kombinovane antibiotske terapije detektovano je prisustvo čak tri bakterije. Uglavnom su u koinfekciji učestvovala *C. trachomatis* ili *C. pneumoniae* sa mikoplazmama, a kod manjeg broja bolesnika samo mikoplazme (*M. hominis* i *U. urealyticum*).
6. PCR analize DNK, koje su podrazumevale korišćenje visoko specifičnih prajmera za gen *omp1* i plazmidnu DNK, su ukazale na prisustvo *C. pneumoniae* pre terapije kod pet bolesnika kod kojih DNK ovih bakterija nije detektovana prethodnim PCR testom (gen za 16S rRNK).
7. Bolesnici druge grupe koji su konvencionalnim PCR testom bili pozitivni na *C. trachomatis* su imali vijabilne bakterije u zglobovima (uzorci sinovije i sinovijske tečnosti) i perifernoj krvi (uzorci mononuklearnih ćelija). Utvrđivanje vijabilnosti bakterija posle terapije je važno za procenu efikasnosti terapije.
8. Prisustvo vijabilnih bakterija (*C. trachomatis*) u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi posle kombinovane antibiotske terapije ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom ukazuju da ova tri antibiotika imaju bakteriostatki efekat ali nisu baktericidni prema ovom mikroorganizmu.
9. „Real-time” analize uzoraka sinovije, sinovijske tečnosti i mononuklearnih ćelija periferne krvi su pokazale različite transkripcione profile hlamidijskih gena. Posle terapije kod svih bolesnika sa smanjenom ekspresijom jednog ili više ispitivanih gena u odnosu na ekspresiju istih gena pre terapije u uzorcima mononuklearnih ćelija, postignuta je remisija ili poboljšanje u toku bolesti (oligoarthritis je

konvertovan u monoartritis). Kod sva četiri bolesnika sa povećanom ekspresijom jednog ili više gena koji kodiraju proteine HSP60 (*Ct 110*, *Ct 755*), proilil-tRNK sintetazu (*Ct 393/proS*), bakteriporfirinogen III oksidazu (*Ct 052/hemN*) i komponentu čestice koja prepoznaje signal (*Ct 820/ftsY*) u uzorcima mononuklearnih ćelija periferne krvi posle terapije u odnosu na ekspresiju istih gena u uzorcima mononuklearnih ćelija pre terapije, nije postignuta klinička remisija kombinovanom antibiotskom terapijom.

10. Rezultati dobijeni analizom efekata sinovijektomije praćene antibiotskom terapijom (azitromicin ili kombinovana antibiotska terapija ciprofloksacinom, tetraciklinom i roksitromicinom) ukazuju da je kod većine bolesnika moguće postići kliničku remisiju. Obe terapije su dovele do povećanja broja bolesnika sa negativnim nalazom bakterija. Ovo povećanje je kod bolesnika koji su lečeni azitromicinom bilo statistički značajno ( $\chi^2$ ,  $P=0.022$ ). Visoki procenat izlečenja posle terapije azitromicinom (75%) i kombinovane antibiotske terapije (68,2%) verovatno je posledica istovremeno sprovedene hirurške i antibiotske terapije.

## **LITERATURA**

- Aho K, Ahvonen P, Lassus A, Sievers K, Tiilikainen A. HL-A27 in reactive arthritis. A study of Yersinia arthritis and Reiter's disease. *Arthritis Rheum* 1974;17:521-6.
- Al-Younes HM, Rudel T, Brinkmann V, Szczeppek AJ, Meyer TF. Low iron availability modulates the course of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Cell Microbiol* 2001;3:427-37.
- Bandea CI, Kubota K, Brown TM, Kilmarx PH, Bhullar V, Yanpaisarn S, Chaisilwattana P, Siriwasin W, Black CM. Typing of *Chlamydia trachomatis* strains from urine samples by amplification and sequencing the major outer membrane protein gene (*omp1*). *Sex Transm Infect* 2001;77:419-22.
- Barth WF, Segal K. Reactive arthritis (Reiter's syndrome). *Am Fam Physician* 1999;60:499-503.
- Bas S, Ninet B, Delaspre O, Vischer TL. Evaluation of commercially available tests for Chlamydia nucleic acid detection in synovial fluid of patients. *Br J Rheumatol* 1997;36:198-202.
- Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev* 1994;58:686-99.
- Belland RJ, Zhong G, Crane DD, Hogan D, Sturdevant D, Sharma J, Beatty WL, Caldwell HD. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8478-83.
- Blanchard A. *Ureaplasma urealyticum* urease genes; use of a UGA tryptophan codon. *Mol Microbiol* 1990;4:669-76.
- Blanchard A, Yáñez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31:1358-61.

- Bobo L, Coutlee F, Yolken RH, Quinn T, Viscidi RP. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* cervical infection by detection of amplified DNA with an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1990;28:1968-73.
- Branigan PJ, Gérard HC, Hudson AP, Schumacher HR. Comparison of synovial tissue and synovial fluid as the source of nucleic acids for detection of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum* 1996;39:1740-6.
- Braun J, Yin Z, Spiller I, Siegert S, Rudwaleit M, Liu L, Radbruch A, Sieper J. Low secretion of tumor necrosis factor  $\alpha$ , but no other Th1 or Th2 cytokines, by peripheral blood mononuclear cells correlates with chronicity in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2039-44.
- Braun J, Kingsley G, van der Heijde D, Sieper J. On the difficulties of establishing a consensus on the definition of and diagnostic investigations for reactive arthritis. Results and discussion of a questionnaire prepared for the 4th International Workshop on Reactive Arthritis, Berlin, Germany, July 3-6, 1999. *J Rheumatol* 2000;27:2185-92.
- Brodie BC. Pathological and surgical observations on diseases of the joints. London: Longman 1818:51-63.
- Bush RM, Everett K.D.E. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:203-20.
- Byrne GI, Ouellette SP, Wang Z, Rao JP, Lu L, Beatty WL, Hudson AP. *Chlamydia pneumoniae* express genes required for DNA replication but not cytokinesis during persistent infection of Hep-2 cells. *Infect Immun* 2001;69:5423-9.
- Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J. Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun* 1981;31:1161-76.

- Caldwell HD, Wood H, Crane D, Bailey R, Jones RB, Mabey D, Maclean I, Mohammed Z, Peeling R, Roshick C, Schachter J, Solomon AW, Stamm WE, Suchland RJ, Taylor L, West SK, Quinn TC, Belland RJ, McClarty G. Polymorphisms in *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase genes differentiate between genital and ocular isolates. *J Clin Invest* 2003;111:1757-69.
- Campbell F, Birkelund S, Ward ME, Panayi GS, Kingsley GH. Sexually-acquired reactive arthritis synovial T cells respond to *Chlamydia trachomatis* 57kd heat shock protein but not the major outer membrane protein. *Arthritis Rheum* 1996;39:S184
- Carlson, JH, Whitmire WM, Crane DD, Wicke L, Virtaneva K, Sturdevant DE, Kupko III JJ, Porcella SF, Martinez-Orengo N, Heinzen RA, Kari L, Caldwell HD. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor. *Infect Immun* 2008;76:2273-83.
- Carter JD, Gérard HC, Espinoza LR, Ricca LR, Valeriano J, Snelgrove J, Oszust C, Vasey FB, Hudson AP. Chlamydiae as etiologic agents in chronic undifferentiated spondylarthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1311-6.
- Carter JD, Espinoza LR, Inman RD, Sneed KB, Ricca LR, Vasey FB, Valeriano J, Stanich JA, Oszust C, Gerard HC, Hudson AP. Combination antibiotics as a treatment for chronic *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:1298-307.
- Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:69-87.
- Claas HC, Melchers WJ, de Bruijn IH, de Graaf M, van Dijk WC, Lindeman J, Quint WG. Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:864-8.



Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG.. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998;393:537-44.

Colmegna I, Cuchacovich R, Espinoza LR. HLA-B27-associated reactive arthritis: pathogenic and clinical considerations. Clin Microbiol Rev 2004;17:348-69.

Comanducci M, Cevenini R, Moroni A, Giuliani MM, Ricci S, Scarlato V, Ratti G. Expression of a plasmid gene of *Chlamydia trachomatis* encoding a novel 28 kDa antigen. J Gen Microbiol 1993;139:1083-92.

Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Castellazzi M, Granieri E, Fainardi E. *Chlamydofila pneumoniae* infection and its role in neurological disorders. Interdiscip Perspect Infect Dis 2010;2010:273573.

Deschuyffeleer TP, Tyberghien LF, Dickx VL, Geens T, Saelen JM, Vanrompany DC, Breackman LA. Risk assessment and management of *Chlamydia psittaci* in poultry processing plants. Ann Occup Hyg 2012;56:340-9.

Dhawan B, Malhotra N, Sreenivas V, Rawre J, Khanna N, Chaudhry R, Mittal S. Ureaplasma serovars & their antimicrobial susceptibility in patients of infertility & genital tract infections. Indian J Med Res 2012;136:991-6.

Engel JN, Ganem D. Chlamydial rRNA operons: gene organization and identification of putative tandem promoters. J Bacteriol 1987;169:5678-85.

- Everett KDE, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol* 1999;49:415-40.
- Fiessinger N, Leroy E. Contribution a l' etude d'une epidemie de dysenterie dans la Somme. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 1916;40:2030-69.
- Freise J, Gérard HC, Bunke T, Whittum-Hudson JA, Zeidler H, Köhler L, Hudson AP, Kuipers JG. Optimised sample DNA preparation for detection of *Chlamydia trachomatis* in synovial tissue by polymerase chain reaction and ligase chain reaction. *Ann Rheum Dis* 2001;60:140-5.
- Freise J, Bernau I, Meier S, Zeidler H, Kuipers JG. Detection of *Chlamydia trachomatis*-DNA in synovial fluid: evaluation of the sensitivity of different DNA extraction methods and amplification systems. *Arthritis Res Ther* 2009;11 (6):R175.
- Gaston JSH. Immunological basis of chlamydia induced reactive arthritis. *Sex Transm Infect* 2000;76:156-61.
- Gaydos CA, Quinn TC, Eiden JJ. Identification of *Chlamydia pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1992;30:796-800.
- Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Genes required for assembly and function of the protein synthetic system in *Chlamydia trachomatis* are expressed early in elementary to reticulate body transformation. *Mol Gen Genet* 1997;255:637-42
- Gérard HC, Köhler L, Branigan PJ, Zeidler H, Schumacher HR, Hudson AP. Viability and gene expression in *Chlamydia trachomatis* during persistent infection of cultured human monocytes. *Med Microbiol Immunol* 1998;187:115-20.

Gérard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter's syndrome are viable but show aberrant gene expression. J Rheumatol 1998;25:734-42.

Gérard HC, Schumacher HR, El-Gabalawy H, Goldbach-Mansky, Hudson AP. *Chlamydia pneumoniae* present in the human synovium are viable and metabolically active. Microb Pathog 2000;29:17-24.

Gérard HC, Krausse-Opatz B, Wang Z, Rudy D, Rao JP, Zeidler H, Schumacher HR, Whittum-Hudson JA, Köhler L, Hudson AP. Expression of *Chlamydia trachomatis* genes encoding products required for DNA synthesis and cell division during active versus persistent infection. Mol Microbiol 2001;41:731-41.

Gérard HC, Freise J, Wang Z, Roberts G, Rudy D, Krauss-Opatz B, Köhler L, Zeidler H, Schumacher HR, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. *Chlamydia trachomatis* genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs. persistent infection. Microbes Infect 2002;4:13-22.

Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Chlamydiae and inflammatory arthritis. In: Focus on arthritis research. In: Columbus F, ed. New York: Nova Science Publishers, 2004:175-99

Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Differential expression of three *Chlamydia trachomatis* hsp60-encoding genes in active vs. persistent infections. Microb Pathog 2004;36:35-9.

Gérard HC, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Synovial *Chlamydia trachomatis* up regulates expression of a panel of genes similar to that transcribed by *Mycobacterium tuberculosis* during persistent infection. Ann Rheum Dis 2006;65:321-7.

- Gerard HC, Stanich JA, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Carter JD, Hudson AP. Patients with Chlamydia-associated arthritis have ocular (trachoma), not genital, serovars of *C. trachomatis* in synovial tissue. *Microb Pathog* 2010;48:62-8
- Gottlieb NL, Altman RD. An ethical dilemma in rheumatology: should the eponym Reiter's syndrome be discarded? *Semin Arthritis Rheum* 2003;32:207.
- Hackstadt T, Todd WJ, Caldwell HD. Disulfide-mediated interactions of the chlamydial major outer membrane protein: role in the differentiation of *Chlamydiae*? *J Bacteriol* 1985;161:25-31.
- Hamdulay SS, Glynn SJ, Keat A. When is arthritis reactive? *Postgrad Med J* 2006;82:446-53.
- Hannu T, Kauppi M, Tuomala M, Laaksonen I, Klemets P, Kuusi M. Reactive arthritis following an outbreak of *Campylobacter jejuni* infection. *J Rheumatol* 2004;31:528-30.
- Hannu T. Reactive arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011;25:347-57.
- Harkins AL, Munson E. Molecular diagnosis of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* in the United States. *ISRN Obstet Gynecol* 2011;2011:279149.
- Harper A, Pogson CI, Jones ML, Pearce JH. Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infect Immun* 2000;68:1457-64.
- Hoening LJ. The arthritis of Christopher Columbus. *Arch Intern Med* 1992;152:274-7.
- Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, Summersgill JT, Timms P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun* 2004;72:1843-55.

- Horowitz S, Horowitz J, Taylor-Robinson D, Sukenik S, Apte RN, Bar-David J, Thomas B, Gilroy C. Ureaplasma urealyticum in Reiter's syndrome. J Rheumatol 1994;21:877-82.
- Inman RD, Whittum-Hudson JA, Schumacher HR, Hudson AP. Chlamydia and associated arthritis. Curr Opin Rheumatol 2000;12:254-62.
- Isomäki H, Raunio J, von Essen R, Hämeenkorpi R. Incidence of inflammatory rheumatic diseases in Finland. Scand J Rheumatolog 1978;7:188-92.
- Jalava J, Skurnik M, Toivanen A, Toivanen P, Eerola E. Bacterial PCR in the diagnosis of joint infection. Ann Rheum Dis 2001;60:287-9.
- Jaton K, Bille J, Greub G. A novel real-time PCR to detect Chlamydia trachomatis in first-void urine or genital swabs. J Med Microbiol 2006;55:1667-74.
- Kataranovski M, Miljković Đ, Stojanović I. Eksperimentalna imunologija, Osnovni pristup u istraživanju (tehnike ćelijske imunologije i animalni modeli), Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, 2012.
- Kaufmann SHE, Kabelitz D (2002). Methods in microbiology, Volume 32, Immunology of infection, second edition
- Khan ER, Hossain MA, Paul SK, Mahmud MC, Rahman MM, Alam MA, Hasan MM, Mahmud NU, Nahar K. Molecular diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection by polymerase chain reaction. Mymensingh Med J 2011;20:362-5.
- Klinkhoff A. Rheumatology: 5. Diagnosis and management of inflammatory polyarthritis. CMAJ 2000;162:1833-8.
- Klos A, Thalmann J, Peters J, Gérard H, Hudson AP. The transcript profile of persistent *Chlamydomphila (Chlamydia) pneumoniae in vitro* depends on the means by which persistence is induced. Microbiol Lett 2009;291:120-6.

- Koehler L, Nettelbreker E, Hudson AP, Ott N, Gérard HC, Branigan PJ, Schumacher HR, Drommer W, Zeidler H. Ultrastructural and molecular analysis of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb Pathog* 1997;22:133-42
- Koehler L, Zeidler H, Hudson AP. Aetiological agents: their molecular biology and phagocyte-host interaction. In: *Bailliers Clin Rheumatol* 1998;12:589-609.
- Kvien TK, Gaston JS, Bardin T, Butrimiene I, Dijkmans BA, Leirisalo-Repo M, Solakov P, Altwegg M, Mowinckel P, Plan PA, Vischer T Three month treatment of reactive arthritis with azithromycin: a EULAR double blind, placebo controlled study. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1113-9
- Kwiatkowska B, Filipowicz-Sosnowska A. Reactive arthritis. *Pol Arch Med Wewn* 2009;119:60-6.
- Leirisalo-Repo M. Therapeutic aspects of spondyloarthropathies-a review. *Scand J Rheumatol* 1998;27:323-8.
- Lozada CJ. Reactive Arthritis; chapter in *Emedicine (emedicine.com)*; Zevitz M ed. Online published, Jan 2010.
- Martínez-Prado E, Camejo Bermúdez MI. Expression of IL-6, IL-8, TNF-alpha, IL-10, HSP-60, anti-HSP-60 antibodies, and anti-sperm antibodies, in semen of men with leukocytes and/or bacteria. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:233-43.
- Mascellino MA, Boccia P, Oliva A. Immunopathogenesis in *Chlamydia trachomatis* infected woman. *ISRN Obstet Gynecol* 2011;2011:436936.
- Mathews SA, Volp KM, Timms P. Development of a quantitative gene expression assay for *Chlamydia trachomatis* identified temporal expression of sigma factors. *FEBS Lett* 1999;458:354-8.

- Munoz-Elias EJ, McKinney JD (2002). Bacterial persistence: strategies for survival. In: Immunology of infectious diseases (S.H.E. Kaufmann, A. Sher and R. Ahmed, Eds), pp.331-56. ASM Press, Washington, DC
- Nanagara R, Li F, Beutler A, Hudson A, Schumacher HR. Alteration of *Chlamydia trachomatis* biologic behavior in synovial membranes: suppression of surface antigen production in reactive arthritis and Reiter's syndrome. *Arthritis Rheum* 1995;38:1410-7.
- Nicholson TL, Olinger L, Chong K, Schoolnik G, Stephens RS. Global stage-specific gene regulation during the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 2003;185:3179-89.
- Nicolson GL, Nasralla MY, Nicolson NL. The pathogenesis and treatment of mycoplasmal infections. *Antimicrob Infect Dis* 1998;17:81-7.
- Nikkari S, Puolakkainen M, Yli-Kerttula U, Luukkainen R, Lehtonen O-P, Toivanen P. Ligase chain reaction in detection of *Chlamydia* DNA in synovial fluid cells. *Br J Rheumatol* 1997;36:763-5.
- Owlia M-B, Eley AR. Is the role of *Chlamydia trachomatis* underestimated in patients with suspected reactive arthritis. *Int J Rheum Dis* 2010;13:27-38.
- Ozdağ D, Us D, Demirezen S, Beksaç S. Investigation of *Chlamydia trachomatis* positivity in woman with and without gynecologic complaints by cytologic and direct immunofluorescence methods. *Mikrobiyol Bul* 2007;41:51-61.
- Panush RS, Wallace DJ, Dorff RE, Engleman EP. Retraction of the suggestion to use the term "Reiter's syndrome" sixty-five years later: the legacy of Reiter, a war criminal, should not be eponymic honor but rather condemnation. *Arthritis\_Rheum* 2007;56:693-4.

- Parihar P (2009). Microbiology&Immunology. SWASTIC Publishers & distributors, Delhi, India
- Pavlica LJ, Drašković N, Kuljić-Kapulica N, Nikolić D. Isolation of *Chlamydia trachomatis* or *Ureaplasma urealyticum* from the synovial fluid of patients with Reiter's syndrome. Vojnosanit Preg 2003;60:5-10.
- Pavlica Lj, Nikolic D, Magic Z, Brajuskovic G, Strelac N, Milicic B, Jovelić A. Successful treatment of postvenereal reactive arthritis with synovectomy and 3 months' azithromycin. J Clin Rheumatol 2005;11:257-63.
- Pavlica Lj, Nikolic D, Vukomanović-Đurđević Biserka. Dijagnoza i terapija reaktivnog artritisa. Hemofarm A.D. Vršac, 2009
- Peeling RW, Brunham RC. Chlamydiae as Pathogens: New Species and New Issues. Emerg Infect Dis 1996;2:307-19.
- Peterson EM, Oda R, Alexander R, Greenwood JR, De la Maza LM. Molecular techniques for the detection of *Chlamydia trachomatis*. J Clin Microbiol 1989;27:2359-63.
- Peuchant O, Duvert JP, Clerc M, Raheison S, Bébéar C, Bébéar C, De Barbeyrac B. Effects of antibiotics on *Chlamydia trachomatis* viability as determined by real-time quantitative PCR. J Med Microbiol 2011;60:508-14.
- Pommerville JC. Sexually transmitted diseases caused by bacteria. In: Alcamo's fundamentalas of microbiology, 9<sup>th</sup> ed. Jones and Bartlett 2011
- Popović M, Stefanović D, Mitrović D et al. Spondiloartropatije. In: Đurđević S, editor. Reumatične i srodne bolesti. Beograd: Vojnoizdavački zavod & INFOhome d.o.o; 2000.p.430-9.
- Read TD, Brunham RC, Shen C, Gill SR, Heidelberg JF, White O, Hickey, EK, Peterson J, Utterback T, Berry K, Bass S, Linher K, Weidman J, Khouri H, Craven B, Bowman



- C, Dodson R, Gwinn M, Nelson W, DeBoy R., Kolonay J, McClarty G, Salzberg SL, Eisen J, Fraser CM. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res* 2000;28:1397-406.
- Reiter H. Über eine bisher unerkannte Spirochäten infection (Spirochaetosis arthritica). *Dtsch Med Wochenschr* 1916;42:1535-6.
- Reveille JD, Ball EJ, Khan MA. HLA-B27 and genetic predisposing factors in spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:265-72.
- Rihl M, Köhler L, Klos A, Zeidler H. Persistent infection of *Chlamydia* in reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:281-84.
- Rizzo A, Domenico MD, Carratelli CR, Paolillo R. The role of *Chlamydia* and *Chlamydophila* infections in reactive arthritis. *Intern Med* 2012;51:113-7.
- Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:285-94.
- Rudwaleit M, Höhler T. Cytokine gene polymorphisms relevant for the spondyloarthropathies. *Curr Opin Rheumatol* 2001;13:250-4.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2nd ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sassetti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12989-94.
- Schnitger K, Njau F, Wittkop U, Liese A, Kuipers JG, Thiel A, Morgan MA, Zeidler H, Wagner AD. Staining of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies: A suitable method for identifying infected human monocytes by flow cytometry. *J Microbiol Methods* 2007;69:116-21.

Schumacher HR. How microorganisms are handled to localize joints and within joints. Scand J Rheumatol Suppl 1995;101:199-202.

Schumacher HR. Reactive arthritis. Rheum Dis Clin North Am 1998;24:261-73.

Schumacher HR Jr, Arayssi T, Crane M, Lee J, Gérard H, Hudson AP, Klippel J. Chlamydia trachomatis nucleic acids can be found in the synovium of some asymptomatic subjects. Arthritis Rheum 1999;42:1281-4 (a).

Schumacher HR, Gérard HC, Arayssi TK, Pando JA, Branigan PJ, Saaibi DL, Hudson AP. Lower prevalence of *Chlamydia pneumoniae* DNA compared with *Chlamydia trachomatis* DNA in synovial tissue of arthritis patients. Arthritis Rheum 1999;42:1889-93.

Schumacher HR. *Chlamydia*-associated arthritis. Isr Med Assoc J 2000;2:532-5

Scidmore MA, Fischer ER, Hackstadt T. Restricted fusion of *Chlamydia trachomatis* vesicles with endocytic compartments during the initial stages of infection. Infect Immun 2003;71:973-84.

Seth-Smith HM, Harris SR, Persson K, Marsch P, Barron A, Bignell A, Bjartling C, Clark L, Cutcliffe LT, Lambden PR, Lennard N, Lockey SJ, Quail MA, Salim O, Skilton RJ, Wang Y, Holland MJ, Parkhill J, Thomson NR, Clarke IN. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. BMC Genomics 2009;10:239-49.

Sibilia J, Limbach FX. Reactive arthritis or chronic infectious arthritis? Ann Rheum Dis 2002;61:580-7.

Sieper J, Braun J. Pathogenesis of spondylarthropathies. Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both? Arthritis Rheum 1995;1547-54.

Sieper J, Braun J, Kingsley GH. Report on the fourth international workshop on reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:720-34.

Sieper J, Rudwaleit M, Braun J, van der Heijde D. Diagnosing reactive arthritis: role of clinical settings in the value of serologic and microbiologic assays. *Arthritis Rheum* 2002;46:319-27.

Skowasch D, Yeghiazaryan K, Schrempf S, Golubnitschaja O, Welsch U, Preusse CJ, Likungu JA, Welz A, Lüderitz B, Bauriedel G. Persistence of *Chlamydia pneumoniae* in degenerative aortic valve stenosis indicated by heat shock protein 60 homologues. *J Heart Valve Dis* 2003;12:68-75.

Söderlin MK, Börjesson O, Kautiainen H, Skogh T, Leirisalo-Repo M. Annual incidence of inflammatory joint diseases in a population based study in southern Sweden. *Ann Rheum Dis* 2002;61:911-5.

Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1528-33.

Stewart GR, Robertson BD, Young DB. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nat Rev Microbiol* 2003;1:97-105.

Taylor-Robinson D, Gilroy CB, Thomas BJ, Keat ACS. Detection of *Chlamydia trachomatis* DNA in joints of reactive arthritis patients by polymerase chain reaction. *Lancet* 1992;340:81-2.

Taylor-Robinson D, Bébéar C. Antibiotic susceptibilities of mycoplasmas and treatment of mycoplasmas infections. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:622-30.

- Taylor-Robinson D, Keat A. How can a causal role for small bacteria in chronic inflammatory arthritides be established or refuted? *Ann Rheum Dis* 2001;60:177-84.
- Tomanović S, Đukić S. Classical and molecular methods for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Med Pregl* 2011;LXIV (9-10): 477-80.
- Vicetti Miguel RD, Cherpès TL. Hypothesis: *Chlamydia trachomatis* infection of the female genital tract is controlled by Type 2 immunity. *Med Hypotheses* 2012;79:713-6.
- Villareal C, Whittum-Hudson JA, Hudson AP. Persistent *Chlamydiae* and chronic arthritis. *Arthritis Res* 2002;4:5-9.
- Vittecoq O, Schaefferbeke T, Favre S, Daragon A, Biga N, Cambon-Michot C, Bébéar C, Le Loët X. Molecular diagnosis of *Ureaplasma urealyticum* in an immunocompetent patient with destructive reactive polyarthritis. *Arthritis Rheum* 1997; 40:2084-9.
- Vivoda M, Ćirković I, Aleksić Đ, Ranin L, Đukić, S. Biology and intracellular life of chlamydia. *Med Pregl* 2011;64:561-4.
- Wallace DJ, Weisman M. Should a war criminal be rewarded with eponymous distinction? The double life of Hans Reiter (1881-1969). *J Clin Rheumatol* 2000;6:49-54.
- Wang Y, Berg EA, Feng X, Shen L, Smith T, Costello CE, Zhang YX. Identification of surface-exposed components of MOMP of *Chlamydia trachomatis* serovar F. *Protein Science* 2006;15:122-34.
- Watson EJ, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, Pederson BS. The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review. *J Med Microbiol* 2002;51:1021-31.

- Wilson JS, Honey E, Templeton A, Paavonen J, Mardh PA, Stary A, Stray-Pedersen B. A systematic review of the prevalence of *Chlamydia trachomatis* among European women. *Hum Reprod Update* 2002;8:385-394.
- Wolf K, Fischer E, Hackstadt T. Ultrastructural analysis of developmental events in *Chlamydia pneumoniae* –infected cells. *Infect Immun* 2000;68:2379-85.
- Yin Z, Braun J, Neure L, Wu P, Liu L, Eggens U, Sieper J. Crucial role of interleukin-10/interleukin-12 balance in the regulation of the type 2 T helper cytokine response in reactive arthritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:1788-97.
- Yu D, Kuipers JG. Role of bacteria and HLA-B27 in the pathogenesis of reactive arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2003;29:21-36
- Zahrt TC. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes Infect* 2003;5:159-67.
- Zarco Montejo P. Diagnosis and treatment of *Chlamydia*-induced reactive arthritis. *Reumatol Clin* 2012;8:S20-5.

## **BIOGRAFIJA**

Nataša Strelić je rođena 22.09.1964. godine u Gospiću, Hrvatska. Godine 1983/84 upisala Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smer: Eksperimentalna biologija. Diplomirala sa opštim uspehom 4,5 i ocenom 5 na diplomskom ispitu (raspon ocena 1-5).

U Institutu za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu zaposlena od 1994. godine. Magistrirala 2001. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer: Molekularna biologija i biohemija. Tokom 1997. godine završila kurs „Osnovi genetičkog inženjerstva” u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu, 2006. godine bila na usavršavanju u Department of Immunology and Microbiology, Wayne State University, School of Medicine, Detroit, SAD a 2008. godine bila na obuci za „*Real-time*” PCR i sekvenciranje u Voringtonu, V. Britanija. Učestvovala na projektu VMA/06-08/A.11.

Član je dva naučna društva i autor i koautor u više radova: 3 rada u časopisima međunarodnog značaja, 3 u časopisima nacionalnog značaja, 3 saopštenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu i 10 saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanog u izvodu.

**PRILOZI**



Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписана Наташа Стрелић

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Значај молекуларне детекције бактерија у процени ефикасности терапије Рајтеровог синдрома

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршила ауторска права и користила интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 27.11.2014. године

Nataša Strelić

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Наташа Стрелић

Студијски програм Биологија, генетика

Наслов рада Значај молекуларне детекције бактерија у процени ефикасности  
терапије Рајгеровог синдрома

Ментори проф. др Звонко Магић, проф. др Јелена Кнежевић-Вукчевић

Потписани Наташа Стрелић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предала за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

Nataša Strelić

У Београду, 27.11.2014. године

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Значај молекуларне детекције бактерија у процени ефикасности терапије Рајтеровог синдрома

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ③. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

Nataša Strelić

У Београду, 27.11.2014. godine

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.