

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALENTINA ŠAVRIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

VALENTINA ŠAVRIČ

**POMEN NIZKIH SERUMSKIH KONCENTRACIJ
INFLIKSIMABA ZA KLINIČNI IZID PRI BOLNIKI S
KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZNIJO**

**THE IMPORTANCE OF UNDETECTABLE INFLIXIMAB TROUGH
LEVELS FOR CLINICAL OUTCOME OF PATIENTS WITH
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. mag. Davida Drobneteta, dr. med., spec. gastroenterologa. Raziskovalno delo je del širšega projekta, ki je potekal na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo (KOG), UKC Ljubljana in ga je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko odobrila dne 13.5.2014.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za vodenje in pomoč pri ustvarjanju magistrske naloge. Še posebej se zahvaljujem somentorju asist. mag. Davidu Drobnetu, dr. med., spec. gastroenterologu, za vso posredovano znanje, prijazne nasvete in vse usmeritve pri delu. Zahvaljujem se tudi drugim članom KVČB ekipe Kliničnega oddelka za gastroenterologijo UKC Ljubljana (prof. dr. Ivan Ferkolj, dr. med., Nataša Smrekar, dr. med., Gregor Novak, dr. med., Matic Koželj, dr. med.) in predstojniku prof. dr. Borutu Štabucu, dr. med., da so omogočili ta projekt.

Velika zahvala gre staršema, ki sta mi ves čas šolanja stala ob strani in me spodbujala in fantu Marku za vso podporo, razumevanje in potrpežljivost tekom študija.

Hvala tudi sošolkam za vse lepe trenutke in nepozabne dogodivščine v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom asist. mag. Davida Drobneteta, dr. med., spec. gastroenterologa.

Valentina Šavrič

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	ETIOPATOGENEZA KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI	1
1.1.1	GENETSKI DEJAVNIKI	1
1.1.2	DEJAVNIKI OKOLJA	2
1.1.3	MIKROSKOPSKI NIVO PATOGENEZE	2
1.2	KLINIČNE ZNAČILNOSTI ULCEROZNEGA KOLITISA IN CROHNOVE BOLEZNI	3
1.2.1	ULCEROZNI KOLITIS	4
1.2.2	CROHNOVA BOLEZEN	5
1.3	ZDRAVLJENJE KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI	6
1.3.1	AMINOSALICILATI	7
1.3.2	KORTIKOSTEROIDI.....	8
1.3.3	IMUNOSUPRESIVI	8
1.3.4	TNF- α ZAVIRALCI	9
1.4	ARGUMENTI ZA RAZISKAVO.....	14
2	NAMEN DELA IN HIPOTEZE.....	15
3	METODOLOGIJA.....	16
3.1	PREISKOVANCI	16
3.2	ZDRAVLJENJE Z INFLIKSIMABOM.....	16
3.3	DOLOČANJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA IN ANTI- INFLIKSIMABNIH PROTITELES.....	17
3.3.1	MERITVE SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA.....	20
3.3.2	MERITVE SERUMSKIH KONCENTRACIJ ANTI-INFLIKSIMABNIH PROTITELES	20
3.4	LABORATORIJSKI DEL DOLOČANJA SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA IN ANTI-INFLIKSIMABNIH PROTITELES	21
3.4.1	DOLOČANJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA	21
3.4.2	DOLOČANJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ ANTI-INFLIKSIMABNIH PROTITELES...	26
3.5	DEFINICIJE KLINIČNIH IZIDOV	32
3.5.1	KLINIČNA REMISIJA.....	32
3.5.2	ZAZNAVNA IN NEZAZNAVNA SERUMSKA KONCENTRACIJA INFLIKSIMABA	32
3.5.3	PRISOTNOST PROTITELES	32

3.5.4	DELNA ODPOVED INFLIKSIMABA	32
3.5.5	DOKONČNA ODPOVED INFLIKSIMABA.....	33
3.6	STATISTIČNE METODE.....	33
3.7	ETIČNI VIDIKI.....	34
4	REZULTATI.....	35
4.1	Bolniki.....	35
4.2	Kaplan-Meier analiza dokončne odpovedi infliksimaba (IFX) skozi čas glede na prisotnost vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX	36
4.2.1	Bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB).....	36
4.2.2	Bolniki s Crohnovo boleznijo (CB).....	37
4.2.3	Bolniki z ulceroznim kolitisom (UK)	39
4.3	Dokončna odpoved infliksimaba (IFX) glede na prisotnost vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB).....	41
4.4	Kaplan-Meier analiza dokončne odpovedi infliksimaba (IFX) skozi čas glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX	42
4.4.1	Bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB).....	42
4.4.2	Bolniki s Crohnovo boleznijo (CB).....	44
4.4.3	Bolniki z ulceroznim kolitisom (UK)	45
4.5	Dokončna odpoved infliksimaba (IFX) glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX	47
4.5.1	Bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB).....	47
4.5.2	Bolniki s Crohnovo boleznijo (CB).....	48
4.5.3	Bolniki z ulceroznim kolitisom (UK)	49
4.6	Kaplan-Meier analiza dokončne odpovedi infliksimaba (IFX) skozi čas za bolnike s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) glede na prisotnost protiteles proti IFX	50
4.7	Dokončna odpoved infliksimaba (IFX) glede na prisotnost protiteles proti IFX pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB).....	51
4.8	Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX po optimizaciji zdravljenja glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo	53

5	RAZPRAVA.....	55
6	SKLEP	58
7	LITERATURA	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Nekatere razlike med Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom (18).....	3
Slika 2: Algoritem uporabe zdravil pri KVČB (27)	7
Slika 3: Zgradba infliksimaba (47).....	10
Slika 4: Mehanizem delovanja infliksimaba proti TNF- α (49)	11
Slika 5: Farmakokinetični profil serumskih koncentracij infliksimaba glede na prisotnost protiteles proti infliksimabu pri človeku (65).....	13
Slika 6: Farmakokinetični serumski profil infliksimaba po večkratni aplikaciji infliksimaba pri človeku (65)	17
Slika 7: Shema poteka raziskave (hipoteza 1 in 2).....	18
Slika 8: Shema poteka raziskave (hipoteza 3 in 4).....	19
Slika 9: Teoretični primer določitve koncentracije IFX v serumu z interpolacijo	25
Slika 10: Teoretični primer določitve koncentracije ATI v serumu z interpolacijo	31
Slika 11: Vpliv vedno zaznavnih ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s KVČB	37
Slika 12: Vpliv vedno zaznavnih ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s CB	39
Slika 13: Vpliv vedno zaznavnih ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih z UK	41
Slika 14: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s KVČB.....	42
Slika 15: Vpliv vedno zaznavnih, ter enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s KVČB	43
Slika 16: Vpliv vedno zaznavnih, ter enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s CB.....	45
Slika 17: Vpliv vedno zaznavnih, ter enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih z UK	46
Slika 18: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX, v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s KVČB.....	47

Slika 19: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX, v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s CB	48
Slika 20: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX, v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih z UK.....	49
Slika 21: Vpliv vedno zaznavnih, ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s KVČB	51
Slika 22a: Dokončna odpoved IFX glede na bolnike z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ in $> 10 \mu\text{g/mL}$ v primerjavi z bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, pri bolnikih s KVČB	52
Slika 22b: Dokončna odpoved IFX glede na bolnike z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ v primerjavi z bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$, pri bolnikih s KVČB	53
Slika 23: Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo odmerka IFX	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razdelitev ulceroznega kolitisa (Montrealska klasifikacija) (21).....	4
Preglednica II: Razdelitev Crohnove bolezni (Montrealska klasifikacija) (22).....	5
Preglednica III: Reagenti in pripomočki uporabljeni v apDia IFX ELISA metodi.....	22
Preglednica IV: Reagenti in pripomočki uporabljeni v apDia anti-IFX ELISA metodi	27
Preglednica V: Demografski podatki bolnikov	35
Preglednica VI: Dokončna odpoved IFX pri bolnikih s KVČB glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX	36
Preglednica VII: Dokončna odpoved IFX pri bolnikih s CB glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX	38
Preglednica VIII: Dokončna odpoved IFX pri bolnikih z UK glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX	40
Preglednica IX: Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo odmerka IFX.....	54

POVZETEK

Zdravilo izbora pri zdravljenju bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB), kadar se ti ne odzovejo na konvencionalno zdravljenje (aminosalicilati, kortikosteroidi, tiopurini, metotreksat), so zaviralci TNF-alfa, kot je tudi infliksimab. Največji problem pri zdravljenju z infliksimabom je sekundarna odpoved, kar pomeni izgubo učinka zdravila po tem, ko so bolniki sprva odgovorili na indukcijsko zdravljenje. Med faktorji, ki privedejo do izgube učinka infliksimaba je nezaznavna serumska koncentracija zdravila (TL; angl. trough level/concentration) in prisotnost protiteles proti infliksimabu.

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali lahko z določanjem TL infliksimaba in protiteles proti infliksimabu predvidimo uspešnost zdravljenja z infliksimabom, tj. možnost za dokončno odpoved infliksimaba in ali lahko predvidimo uspešnost optimizacije odmerka infliksimaba enkrat, ko so serumske koncentracije infliksimaba nezaznavne in/ali so prisotna anti-infliksimabna protitelesa. V raziskavo smo vključili 146 bolnikov s KVČB, zdravljenih na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo (KOG), UKC Ljubljana. Serumske koncentracije infliksimaba (TL) in protitelesa proti infliksimabu smo izmerili z metodo encimske imunoadsorpcije (ELISA).

Z metodo Kaplan-Meier in Coxovo regresijo smo ugotavljali vpliv nezaznavnih serumskih koncentracij infliksimaba in protiteles proti infliksimabu na odzivnost bolnikov na terapijo z infliksimabom in na uspešnost optimizacije odmerka infliksimaba med zdravljenjem. Ugotovili smo, da so imeli bolniki z vedno zaznavnimi TL infliksimaba skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved infliksimaba (HR, 0,35; 95 % interval zaupanja: 0,20–0,61; $P < 0,0001$) in so imeli manjše število dokončnih odpovedi infliksimaba (24/106, 23 %) kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi TL infliksimaba (24/40, 60 %) ($P < 0,0001$). Ugotovili smo, da delež bolnikov z dokončno odpovedjo infliksimaba ni bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne TL infliksimaba (7/10, 70 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne TL infliksimaba (16/27, 59 %) ($P = 0,55$). Dokazali smo, da so imeli bolniki s KVČB z vedno zaznavnimi TL infliksimaba skozi čas bistveno manjšo ogroženost za dokončno odpoved infliksimaba (HR, 0,45; 95% interval zaupanja: 0,20–1,01; $P = 0,05$) kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi TL infliksimaba in anti-infliksimabnimi protitelesi $> 10 \mu\text{g/mL}$ (prisotnost protiteles) in tudi manjše število dokončnih odpovedi infliksimaba (10/23, 44 %) kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi TL

infliksimaba in anti-infliksimabnimi protitelesi $< 10 \mu\text{g/mL}$ (odsotnost protiteles) (14/17, 82 %) ($P = 0,01$). Prav tako smo ugotovili, da so imeli bolniki z nezaznavnimi TL infliksimaba in anti-infliksimabnimi protitelesi $< 10 \mu\text{g/mL}$ po optimizaciji odmerka infliksimaba statistično značilno večjo uspešnost dviga TL infliksimaba (8/12, 67 %), v primerjavi z bolniki z nezaznavnimi TL infliksimaba in anti-infliksimabnimi protitelesi $> 10 \mu\text{g/mL}$ (1/8, 13 %) ($P = 0,028$).

Ključne besede: kronična vnetna črevesna bolezen, Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis, zaznavna in nezaznavna serumska koncentracija infliksimaba, protitelesa proti infliksimabu

ABSTRACT

The drug of choice in the treatment of patients with inflammatory bowel disease (IBD), when they do not respond to conventional therapies (aminosalicylates, corticosteroids, thiopurines, and methotrexate) are TNF- α inhibitors, such as infliximab. The biggest problem with TNF α inhibitors is secondary failure of infliximab which occurs in 10 % of patients annually. The main factors that leads to the loss of response to infliximab are undetectable serum concentrations (TL) of the drug and the presence of antibodies to infliximab.

We aimed to explore whether the determination of TL and antibodies to infliximab can predict permanent infliximab failure and successful infliximab dose optimization in case of undetectable infliximab TLs with or without antibodies to infliximab. Our prospective study included 146 patients with IBD, treated at the Department of Gastroenterology of the University Medical Centre Ljubljana, Slovenia. Infliximab serum concentrations and antibodies to infliximab were measured with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Kaplan-Meier and Cox regression were used to study the impact of undetectable serum concentrations of infliximab and antibodies to infliximab on clinical outcome of infliximab treated patients and success of infliximab dose optimization in case of undetectable infliximab TL. We found that patients with always detectable TL of infliximab had lower risk for loss of response to infliximab than patients with at least once undetectable TL (HR, 0,35; 95 % confidence interval: 0,20–0,61; $P < 0,0001$), and experienced permanent loss of response to infliximab less frequently (24/106, 23 %) than patients with at least once undetectable TL of infliximab (24/40, 60 %) ($P < 0,0001$). We found that the proportion of patients with permanent loss of response to infliximab was not significantly higher among patients with twice undetectable TL of infliximab (7/10, 70 %) compared to patients with once undetectable TL of infliximab (16/27, 59 %) ($P = 0,55$). We observed a major negative impact of high antibodies to infliximab ($>10 \mu\text{g/mL}$) as patients with at least once undetectable TL of infliximab and antibodies to infliximab $> 10 \mu\text{g/mL}$ (antibodies presence) had much higher risk for permanent loss of response to infliximab than patients with at least once undetectable TL of infliximab and antibodies to infliximab $< 10 \mu\text{g/mL}$ (HR, 0,45; 95 % confidence interval: 0,20–1,01; $P = 0,05$); the proportion of patients with permanent loss of response was substantially higher in patients

with antibodies to infliximab $> 10 \mu\text{g/mL}$ (14/17, 82 %) compared to patients without antibodies to infliximab (10/23, 44 %) ($P = 0,01$). Antibodies to infliximab also importantly influenced success of infliximab dose optimization in patients with undetectable TL of infliximab, as only 1/8 patients with antibodies to infliximab $> 10 \mu\text{g/mL}$ (13 %) developed detectable TL after dose optimization compared to 8/12 patients without antibodies to infliximab (67 %) ($P = 0,028$).

Key words: inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, detectable and undetectable serum concentrations of infliximab, antibodies to infliximab

SEZNAM OKRAJŠAV (po abecednem vrstnem redu)

5-ASA	5-aminosalicilna kislina
ATI	protitelesa proti infliksimabu (angl. <i>antibodies to infliximab</i>)
AZA	azatioprin
CB	Crohnova bolezen
CRP	C-reaktivni protein
ELISA	Encimska imunoadsorpcijska preiskava (angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
IFX	infliksimab
IS	intermediarni sindrom
IL-1	interlevkin 1
IL-6	interlevkin 6
IL-23	interlevkin 23
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
6-MP	6-merkaptopurin
MTX	metotreksat
NK	naravne celice ubijalke (angl. <i>natural killer cells</i>)
nKVČB	nerazvrščena oblika KVČB
NOD2	protein2 oligomerizacijska domena, ki veže nukleotide
sTNFR	receptor za topno obliko TNF- α
TL	najnižja serumska koncentracija zdravila med zdravljenjem (angl. <i>trough level/concentration</i>)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze alfa
TNFR1	receptor 1 za transmembransko obliko TNF- α
TNFR2	receptor 2 za transmembransko obliko TNF- α
UK	ulcerozni kolitis

1 UVOD

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je bolezen prebavil neznane etiologije, ki traja vse življenje. Zanja je značilen kroničen potek s pogostimi zagoni (relapsi), ko so bolezenski znaki hujši in vmesnimi različno dolgimi obdobji remisije, ko se znaki bolezni umirijo (1). KVČB ima tri poglavitne fenotipe bolezni: Crohnovo bolezen (CB), ulcerozni kolitis (UK) in intermediarni sindrom (IS) oz. nerazvrščeno obliko KVČB (nKVČB). CB lahko prizadene celotno črevo od ust do anusa, medtem ko je pri UK prizadeto le debelo črevo. Še vedno ni jasen natančen vzrok za razvoj bolezni, se pa domneva, da imajo genetski dejavniki, dejavniki iz okolja in pretirana imunska reakcija na neškodljive znotrajčrevesne antigene pri nekaterih ljudeh, ki imajo genetsko predispozicijo za tako reakcijo, pomembno vlogo tako pri nastanku, kot tudi poteku bolezni (2,3). Dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) je eden glavnih provnetnih citokinov, odgovornih za nastanek in vzdrževanje vnetja črevesne sluznice pri KVČB in je zato primarna tarča bioloških terapij (4).

1.1 ETIOPATOGENEZA KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI

Etiopatogeneza KVČB ni povsem jasna kljub številnim raziskavam v zadnjih desetletjih, saj gre za kompleksno in multifaktorsko naravo bolezni, na katero vpliva preplet imunske deregulacije, genetskih polimorfizmov in okoljskih faktorjev. Kronično vnetje v prebavni cevi je posledica povečanega imunskega odziva gostitelja na intraluminalne antigene v genetsko predisponiranih posameznikih (3,5).

1.1.1 GENETSKI DEJAVNIKI

Genetski dejavniki imajo pomembno vlogo pri patogenezi bolezni, saj je tveganje za razvoj bolezni pri bolnikovih sorodnikih povečano. Obe bolezni se pogosteje pojavljata v določenih družinah, ki imajo tendenco nagnjenosti h CB ali UK, v nekaterih družinah pa se obe bolezni prepletata (6). Genetski dejavniki so bolj pomembni pri CB kot pri UK, saj je genetska konkordanca za CB do 67 %, za UK pa med 13 % in 20 % (7).

Ugotovili so, da so genetske spremembe pri KVČB povezane s patofiziološkimi mehanizmi, kot so prepoznavanje mikrobov, limfocitna aktivacija, citokinski signali in epitelna intestinalna obramba.

Geni vpleteni v nastanek KVČB kodirajo proteine, ki so potrebni za prirojeno in pridobljeno imunost (npr. signalna pot IL-23, transkripcijski faktorji kot je NK2, itd.). Nekateri geni so specifično povezani s CB (npr. geni, ki regulirajo avtofagijo NOD 2, itd.), nekateri z UK (s sluznično barierno integriteto in glavnim histokompatibilnostnim kompleksom (6p21)) (8–11).

1.1.2 DEJAVNIKI OKOLJA

Še vedno ni jasno kako dejavniki okolja vplivajo na razvoj bolezni. Lahko vplivajo na sestavo intestinalne mikrobiote, ali pa se zaradi spremenjene prehrane in okoljskih toksinov pojavijo novi antigeni v lumnu črevesa (3). V zadnjem času se veliko govori tudi o higienski hipotezi, ki pravi, da vodi izboljšanje higiene do mikrobiološkega neravnovesja v prebavnem traktu in posledično do nastanka KVČB. Prav tako naj bi v bolj razvitih družbah premajhna izpostavljenost raznolikim antigenom v otroštvu, vodila v porast imunoloških motenj in do razvoja avtoimunskih bolezni, med njimi tudi KVČB (12). KVČB se mnogo bolj pogosto pojavlja v razvitih družbah, kot v državah v razvoju, bolj pogosto v mestih, kot na podeželju, bolj pogosto na severu in zahodu, kot na jugu in vzhodu (13,14)

Številne študije so potrdile protektivni učinek kajenja pri UK, kar se kaže tudi z nižjim številom relapsov. Nasprotno, pa je kajenje dejavnik tveganja za pojav CB, slabši klinični potek CB, pogostejše relapse in zaplete (15).

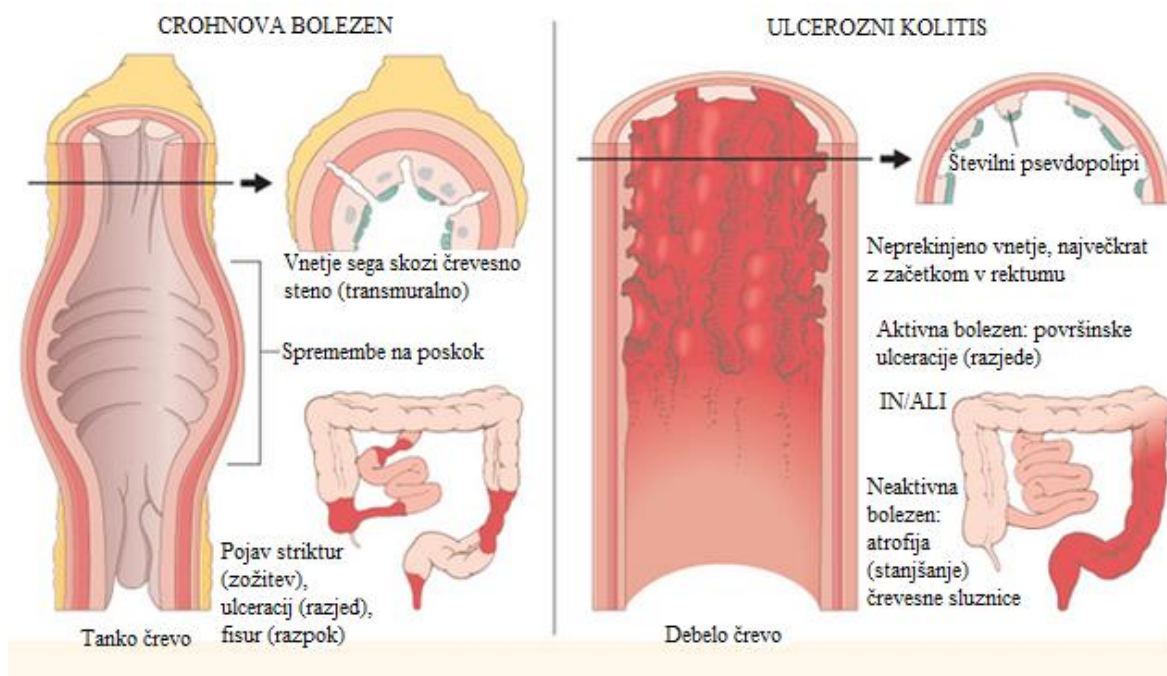
1.1.3 MIKROSKOPSKI NIVO PATOGENEZE

Osrednjo vlogo pri razvoju KVČB ima interakcija med luminalnimi bakterijami in imunskimi celicami v črevesni steni. Pri KVČB je intestinalna homeostaza porušena, kar pride do defektov v epitelijski sluznični barieri, kar omogoči tesnejši stik luminalnih bakterij z imunskimi celicami v sluznici črevesa in njihovo aktivacijo. Pri genetsko predisponiranih osebah, je posledica napačen in premočan imunski odziv na neškodljive znotraj črevesne antigene bakterij, kar se kaže v aktivaciji T celic. Citokini, ki jih izločajo aktivirane T celice spodbujajo makrofage, da izločajo velike količine TNF- α , IL-1 in IL-6.

Poleg aktivacije specifičnega imunskega sistema, pa pride tudi do disregulacije prirojene imunosti, kjer naravne celice ubijalke NK (angl. natural killer cells) z direktnim citotoksičnim učinkom prispevajo k destrukciji tkiv in izločajo provnetne citokine. Destrukcijo tkiv povzročijo NO (dušikov oksid), kisikovi radikali, proteaze, prostaglandini, endopeptidaze (3,16,17).

1.2 KLINIČNE ZNAČILNOSTI ULCEROZNEGA KOLITISA IN CROHNOVE BOLEZNI

Bolezniški znaki KVČB so odvisni od lokalizacije in razširjenosti bolezni. Ni specifičnih simptomov za KVČB, zato se za postavitev diagnoze pogosto potrebuje nekaj mesecev do nekaj let. Za UK so značilne ponavljajoče se epizode vnetja, omejenega le na sluznico debelega črevesa. Značilen znak je krvava driska s sluzjo ali brez sluzi. Klinični znaki CB so veliko bolj raznovrstni od tistih pri UK. Značilni so utrujenost, dolgotrajna driska s krvjo ali brez krvi, bolečina v trebuhu, hujšanje in povišana telesna temperatura (3).



Slika 1: Nekatere razlike med Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom (18)

1.2.1 ULCEROZNI KOLITIS

Ulcerozni kolitis (UK) je kronična bolezen, ki poteka v nekaj tedenskih ali nekaj mesečnih zagonih krvavih drisk, remisije so lahko dolge tudi po več let. Značilni simptomi UK so driska, krvavitve iz danke, številna odvajanja krvavkastega sluzavega blata, krčevite bolečine v trebuhu, lažni pozivi k odvajanju, povišana telesna temperatura, slabokrvnost in hujšanje (3). UK prizadene le debelo črevo. Vnetje se lahko razširi na preostale predele debelega črevesa in je omejeno le na sluznico črevesa (19). Približno 67 % bolnikov ima v 10 letih od postavitve diagnoze vsaj še en zagon vnetja. V 5 letih od postavitve diagnoze se vnetje razširi proksimalno pri ≥ 20 % bolnikov. Pri do 20 % bolnikov je potrebna kolektomija zaradi zapletov bolezni ali zaradi izčrpanega zdravljenja z zdravili (20).

Glede na razširjenost bolezni ločimo (21):

Preglednica I: Razdelitev ulceroznega kolitisa (Montrealska klasifikacija) (21)

E1	Ulcerozni proktitis: prizadeta sluznica rektuma
E2	Levostranski ulcerozni kolitis: prizadeta sluznica distalno od lienalne fleksure
E3	Razširjen ulcerozni kolitis (pankolitis): prizadeta sluznica proksimalno od lienalne fleksure, vnetje lahko zajame celotno debelo črevo

V klinični praksi je velikega pomena opredelitev teže vnetne aktivnosti UK, saj se lahko le na ta način izbere pravilno zdravljenje bolezni. Glede na Montrealsko klasifikacijo, UK opredelimo kot (22):

- Blago potekajoči UK – bolniki odvajajo mehkejše/tekoče blato do štirikrat dnevno, znaki sistemskega vnetja so odsotni.
- Zmerno potekajoči UK – bolniki odvajajo več kot štirikrat dnevno, blato je tekoče, krvavo-sluzasto, občutijo nežne bolečine v trebuhu, prisotni so znaki blago izraženega sistemskega vnetja s porastom telesne temperature.
- Težko potekajoči UK – značilna so številna odvajanja krvavo-sluzastega blata. Bolniki tožijo zaradi krčevitih bolečin v trebuhu, izraženi so znaki sistemskega vnetja s porastom telesne temperature preko 37,5 °C in tahikardijo. Zaradi izgube vode, elektrolitov in krvi, nastopi progresivna izsušenost, slabokrvnost, hujšanje in hipoalbuminemija.

1.2.2 CROHNOVA BOLEZEN

Crohnova bolezen (CB) je kronična bolezen, ki lahko prizadene katerikoli del prebavne cevi. Vnetje zajame vse plasti prebavne cevi in se širi tudi v sosednje organe. Najpogostejši črevesni simptomi so dlje časa trajajoča driska, bolečine v trebuhu, ter simptomi zaradi zapletov, kot so fistule in abscesi. Od splošnih simptomov so značilni utrujenost, hujšanje, ki je ali posledica malabsorpcije ali zmanjšane vnosa hrane zaradi strahu bolnika pred bolečinami in blago povišana telesna temperatura, ki je posledica ali vnetnega dogajanja v črevesu ali nastajanja zapletov. Pogost zaplet je ognojek (absces). Če se vnetje širi skozi vse plasti črevesne stene in prodre v sosednje organe, nastane med njimi nenormalna povezava – fistula (3). Mlajši kot so bolniki ob pričetku težav, težji je potek njihove bolezni in več zapletov imajo (23).

Klinične značilnosti CB opredeljuje Montrealska klasifikacija na osnovi starosti bolnika ob postavitvi diagnoze, lokalizacije bolezni in tipa vnetnega izražanja (preglednica II) (22).

Preglednica II: Razdelitev Crohnove bolezni (Montrealska klasifikacija) (22)

<i>Starost ob odkritju bolezni</i>		<i>Lokalizacija</i>		<i>Oblika bolezni</i>	
A1	16 let in mlajši	L1	Terminalni ileum	B1	Nepenetrantna, nestenozantna
		L2	Kolon		
A2	17 do 40 let	L3	Ileum in kolon	B2	Stenozantna
A3	nad 40 let	L4	Zgornja prebavna cev	B3	Penetrantna

Klinične značilnosti CB so odvisne od lokalizacije in razširjenosti vnetnega dogajanja. Pri 30 % bolnikov vnetje zajame le ileum, pri 50 % ileum in kolon, pri 20 % kolon in le redko tudi zgornji prebavni trakt (24).

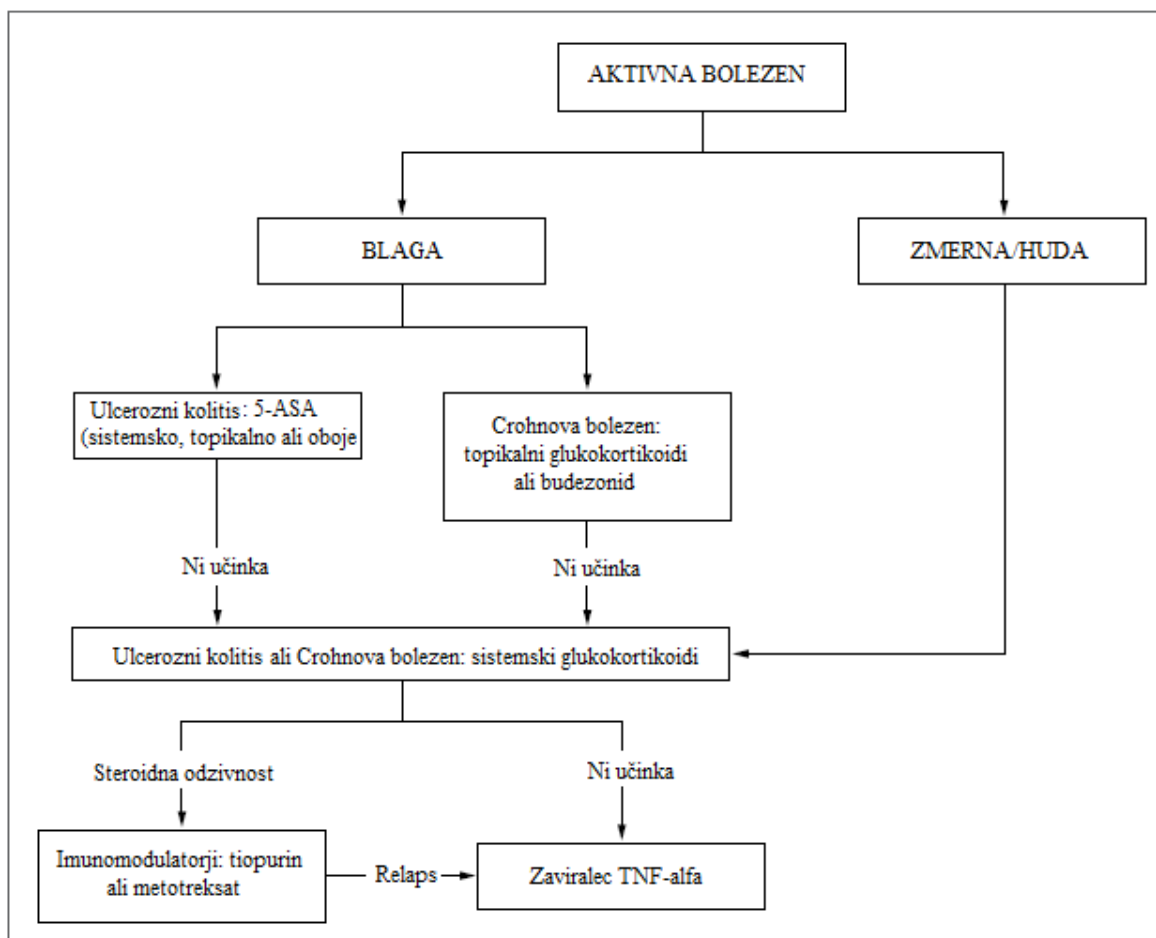
- **Crohnov kolitis** – bolniki imajo enake simptome kot bolniki z UK; številna odvajanja krvavkastega sluzavega blata, krčevite bolečine v trebuhu in lažne pozive k odvajanju.

- **CB terminalnega ileuma** – kaže se z znaki malabsorpcije, z drisko, z bolečinami v trebuhu, s hujšanjem in anoreksijo, ki je pri teh bolnikih posledica strahu pred uživanjem hrane, zaradi težav povzročenih s hrano.
- **CB ustne votline** – nanjo pomislimo pri bolečini in globokih aftoidnih razjedah v ustih.
- **CB požiralnika** – kaže se z odinofagijo in disfagijo.
- **Gastro-duodenalna CB** – redka oblika; bolniki opisujejo bolečino v žlički, lahko imajo tudi pasażne ovire na nivoju želodca.
- **Perianalna CB** – prizadetih je do 30 % bolnikov s CB. Kaže se lahko z zadebeljenimi perianalnimi kožnimi gubami, z analnimi fisurami in razjedami, z abscesi, s fistulami, s strikturo, vnetje se lahko razširi tudi v perinej. Bolniki opisujejo bolečino, izcedek iz danke, motnje spanja, spolne motnje, ob neugodnem poteku je mogoč razvoj sepse. Je oblika CB, ki drastično zmanjša kakovost bolnikovega življenja (24,25).

1.3 ZDRAVLJENJE KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI

V preteklosti smo KVČB zdravljenje usmerili zgolj na lajšanje simptomov (klinična remisija), vendar pa se je izkazalo, da tak način zdravljenja ni ustrezen, saj ne zmanjša števila hospitalizacij in operacij in ne prepreči trajne okvare prebavil, zato je danes jasno, da je cilj zdravljenja popoln nadzor vnetja, tj. popolna odsotnost kliničnih znakov bolezni, popolnoma normalni vnetni označevalci in odsotnost vnetnih sprememb na sluznici črevesa, kar imenujemo globoka remisija (3).

Zdravljenje KVČB sestavljata dve fazi, in sicer indukcija remisije in vzdrževanje remisije. V ta namen se za zdravljenje uporabljajo aminosalicilati, lokalni in sistemski kortikosteroidi, imunosupresivi in biološka zdravila (zaviralci TNF- α), pri otrocih pa se za indukcijo remisije uporablja še popolna enteralna prehrana (26).



Slika 2: Algoritem uporabe zdravil pri KVČB (27)

1.3.1 AMINOSALICILATI

Aminosalicilati (ASA) so skupina zdravil, ki kot zdravilno učinkovino vsebujejo 5-aminosalicilno kislino (5-ASA) ali njene derivate. Eden glavnih učinkov aminosalicilatov je zaviranje kemotakse makrofagov in zaviranje učinkov TNF- α (28). V terapiji KVČB se najpogosteje uporabljata mesalazin in sulfasalazin, ki pa na žalost povzročata tudi določene neželene učinke, kot so: diareja, slabost, bruhanje, glavobol, šibkost in mialgija (29). Aminosalicilati so prva izbira pri zdravljenju UK, tako za indukcijo kot za vzdrževanje remisije. Pri zdravljenju CB aminosalicilati načeloma niso učinkoviti, izjema je le blag Crohnov kolitis, ki se biološko vede podobno kot UK (30).

1.3.2 KORTIKOSTEROIDI

Sistemiški kortikosteroidi (metilprednizolon) se uporabljajo za zdravljenje akutnih zagonov, vendar zaradi številnih neželenih učinkov (osteopenija, hipertenzija, glukozna intoleranca, edemi) niso primerni za vzdrževanje remisije. Večkrat so tudi pokazali, da sistemiški steroidi samo omilijo simptome bolezni, ne vplivajo pa na zacelitev sluznice, kar je moderni cilj zdravljenja. So zdravilo izbora pri zmerni do hudi obliki KVČB (31,32). Za indukcijo klinične remisije se uporablja metilprednizolon v odmerku 0,5–1 mg/kg telesne mase, saj s takšnim režimom po 3 tednih več kot 90 % bolnikov doseže klinično remisijo (33). Pri blagi do zmerni CB, omejeni na ileocekalno področje se lahko uporablja budezonid (topikalni kortikosteroid), ki ga po 4 tednih, če je odziv neustrezen zamenja metilprednizolon, ki je drugače prva izbira za indukcijo remisije pri zmerni CB (26,34). Pri UK kot tudi CB se po indukciji remisije s sistemskimi kortikosteroidi pri večini bolnikov uvede vzdrževalno zdravljenje s tiopurini, metotreksatom in/ali zaviralci TNF- α (35).

1.3.3 IMUNOSUPRESIVI

Tiopurinski imunosupresivi kot sta azatioprin (AZA) in 6-merkaptopurin (6-MP) so pomembne in uspešne zdravilne učinkovine pri bolnikih s KVČB. Uporabljajo se predvsem pri tistih bolnikih, ki so razvili odpornost na kortikosteroide (36). Mehanizem delovanja ni povsem jasen, vendar naj bi aktivni tiopurinski metaboliti ovirali sintezo proteinov in nukleotidov celic, vpletenih v patogenezo KVČB, in povzročali apoptozo aktiviranih limfocitov T (37). Tiopurini so učinkovita zdravila za vzdrževanje remisije, medtem ko za indukcijo remisije niso primerni, saj se njihov polni učinek izrazi šele po 3–4 mesecih zdravljenja (38).

Alternativa tiopurinskim imunosupresivom je metotreksat (MTX), antagonist dihidrofolat-reduktaze, ki se vpleta v sintezo purinskih in pirimidinskih prekurzorjev za DNA in RNA. S tem zavira aktivacijo in proliferacijo limfocitov T, protivnetni učinek pa gre tudi na račun zaviranja ekspresije nekaterih adhezijskih molekul in moduliranja sekrecije citokinov, monocitov in makrofagov (39). Metotreksat je učinkovit tako za indukcijo kot tudi za vzdrževanje remisije pri bolnikih s CB, pri bolnikih z UK pa ni učinkovit. Kljub začetnemu uspehu in pogosti uporabi pri zdravljenju CB, pa pogosto pride do potrebe po povišanju odmerka zdravila, ker metotreksat na dolgi rok izgubi učinkovitost (40,41).

1.3.4 TNF- α ZAVIRALCI

Biološka zdravila iz skupine zaviralcev TNF- α , zavirajo sproščanje in delovanje vnetnih citokinov. Najpomembnejši mediator vnetja pri bolnikih s KVČB je dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α). Zaviralci TNF- α vežejo topni TNF- α kot glavni vnetni mediator in na ta način zmanjšajo vnetje, poleg tega se z vezavo na membransko vezani TNF- α sproži apoptoza oz. programirana celična smrt vnetnih celic, kar vodi v zmanjšanje vnetja. Biološka zdravila so trenutno namenjena skupini bolnikov s KVČB, ki so neodzivni na standardno zdravljenje ali pa se pri njih pojavijo hudi neželeni učinki ob jemanju standardnih zdravil in so tako v fazi hudega UK ali hude CB (26,31). Za zdravljenje KVČB sta v Evropi registrirana dva zaviralca TNF- α , infliksimab in adalimumab, v ZDA in Švici pa še certolizumab (42).

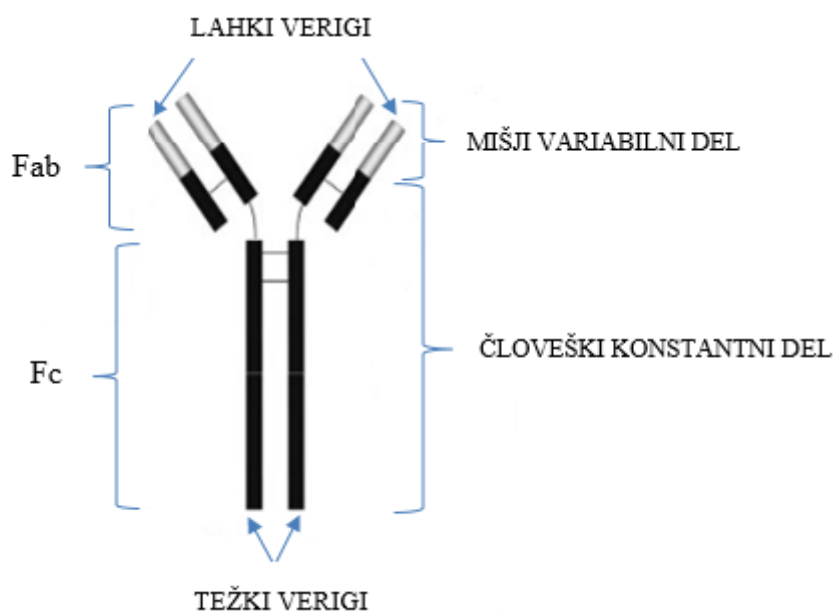
Zaradi visoke cene teh zdravil (10.000–15.000 EUR letno) in možnih resnih neželenih učinkov se zaviralec TNF- α v Sloveniji in večini držav po svetu lahko uvede v zdravljenje samo kadar je dokazano, da je konvencionalno zdravljenje neučinkovito in/ali imajo bolniki kontraindikacije (26). Pri teh bolnikih s KVČB konzilij odloča o primernosti uvedbe biološke terapije, na podlagi sprejetih smernic. Odločitev o uvedbi biološke terapije sprejemata Konzilij za KVČB v UKC Ljubljana ali Konzilij za KVČB v UKC Maribor (3).

1.3.4.1 VLOGA TNF- α V PATOGENEZI KVČB

Vnetni citokin TNF- α ima dokazano ključno vlogo v kroničnem vnetnem procesu črevesa pri KVČB (43). TNF- α izločajo z antigeni stimulirani limfociti T, celice NK in mastociti. Pod vplivom TNF- α začnejo aktivirani makrofagi proizvajati sinergistično delujoča interlevkin 1 (IL-1) in interlevkin 6 (IL-6). TNF- α tudi poveča migracijo levkocitov preko proženja ekspresije adhezijskih molekul na površini endotelijskih celic in levkocitov tekom vnetja, ter spodbuja številne ostale vnetne signale, ki igrajo glavno vlogo v patogenezi KVČB. Med drugim povečuje število nevtrofilcev na mestih vnetja, aktivira koagulacijo in fibrolizo in sproži tvorbo granulomov (4,44). V *in vitro* študijah so v črevesni sluznici KVČB bolnikov, še posebej pri CB odkrili povišano proizvodnjo TNF- α (45). V tkivu bolnikov s CB je bil TNF- α najden globoko v lamini proprii, medtem ko je bila lokacija TNF- α pri UK predvsem v subepitelijskih makrofagih (46).

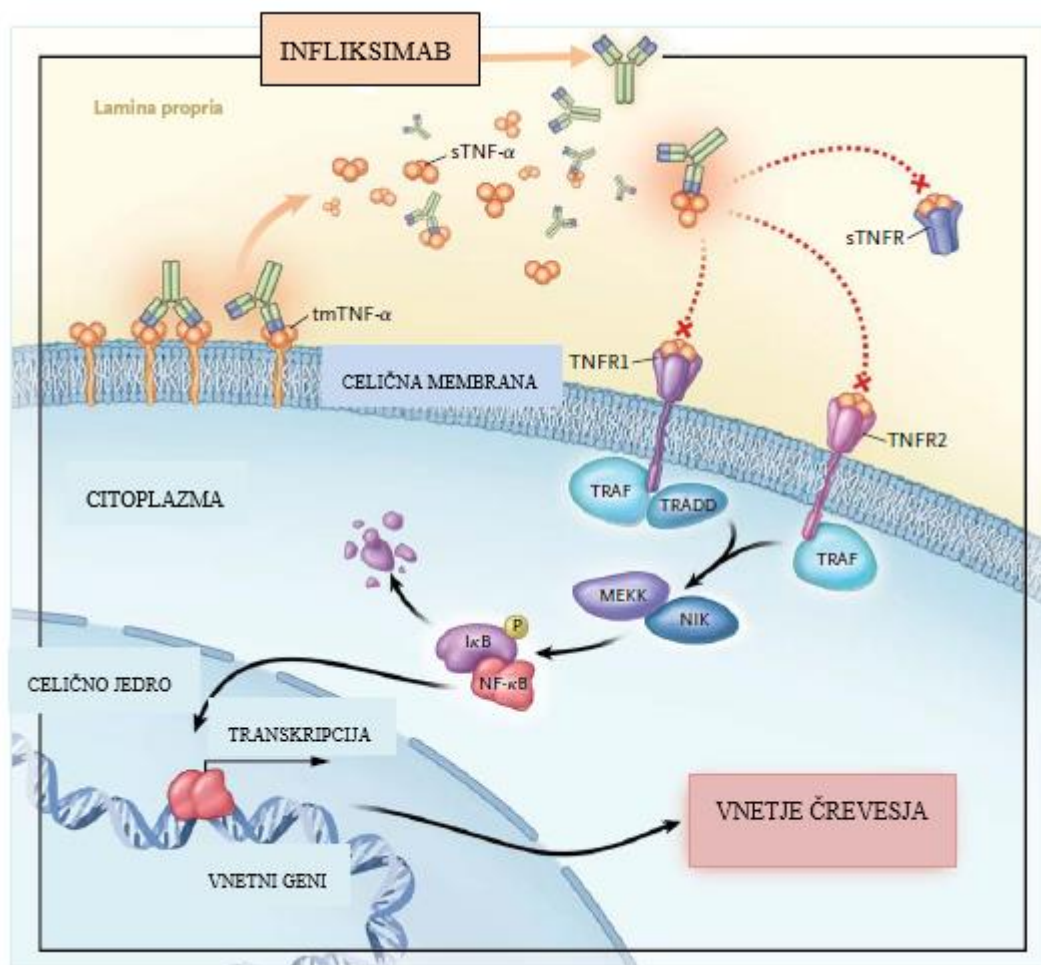
1.3.4.2 INFLIKSIMAB

Infliksimab (IFX) kot tudi drugi zaviralci TNF- α so makromolekule v obliki črke Y in so sestavljeni iz dveh identičnih lahkih in težkih verig (Slika 3). IFX je mišje-človeško (25 % mišje, 75 % človeško) IgG1 himerno monoklonsko protitelo, ki se s fragmentom Fab veže tako na topni kot na membransko vezani TNF- α (47,48).



Slika 3: Zgradba infliksimaba (47)

IFX nevtralizira biološko aktivnost TNF- α tako, da prepreči njegovo vezavo na specifične receptorje TNFR1 in TNFR2 pri membranski in na sTNFR pri topni obliki TNF- α , čemur sledi blokada provnetnih signalov, ki naj bi sledili po aktivaciji TNF- α (Slika 4) (27,49). IFX deluje na TNFR1 tako, da prepreči aktivacijo kaspaz (endoproteaze), ki drugače povzročijo programirano celično smrt ali apoptozo, z vezavo na TNFR2 pa prepreči aktivacijo jedrnega transkripcijskega dejavnika NF- κ B in s tem prepreči njegov pomik v celično jedro in sproženje različnih genov, ki so pomembni za nastanek in vzdrževanje vnetja črevesja (50).



Slika 4: Mehanizem delovanja infliksimaba proti TNF- α (49)

Legenda: *tmTNF- α* – membransko vezani TNF- α ; *sTNF- α* – topni TNF- α ; *TNFR1* – receptor 1 za membransko vezani TNF- α ; *TNFR2* – receptor 2 za membransko vezani TNF- α ; *sTNFR* – receptor za topni TNF- α ; *TRAF* (angl. *TNFR associated factors group of protein*) – skupina proteinov, ki uravnavajo signalizacijo TNF receptorja; *TRADD* (angl. *TNFR1 associated death domain protein*) – protein, ki uravnava signalizacijo celične smrti; *MEKK* (angl. *mitogen-activated protein kinase kinase*) – kinaza, ki povzroči fosforilacijo I κ B in posledično propad I κ B; *NIK* (angl. *NF- κ B-inducing kinase*) – kinaza, ki povzroči aktivacijo alternativne poti in tako pomik NF- κ B v jedro; *I κ B* (angl. *inhibitor of κ B*) – κ B zaviralec; *NF- κ B* (angl. *nuclear transcription factor κ B*) – jedrni transkripcijski dejavnik κ B

1.3.4.2.1 Serumska koncentracija infliksimaba

Serumska koncentracija oz. serumski nivo biološkega zdravila je t. i. trough level/concentration (TL), ki nam pove najnižjo koncentracijo zdravila med vzdrževalnim zdravljenjem. Točna optimalna serumska koncentracija, ki jo med zdravljenjem z IFX želimo doseči, še ni znana, so pa v eni izmed študij dokazali, da so se bolniki, ki so dosegli TL med 3 in 5 µg/mL dlje časa uspešno odzivali na IFX v primerjavi z bolniki, ki takšnega TL niso dosegli (51).

V eni izmed študij so dokazali, da je zaznavni TL IFX najpomembnejši napovednik za klinično remisijo ne glede na aktivnost bolezni, medtem ko nezaznavni TL močno poveča število bolnikov s potrebo po kolektomiji. V študiji so potrdili tudi strategijo povišanja TL IFX, in sicer pri 2/3 bolnikov so zvišali TL in dosegli remisijo z zvišanjem odmerka IFX iz 5 na 10 mg/kg TM (telesne mase) ali s skrajšanjem odmernega intervala (52,53). Vzrokov za pojav nezaznavnih serumskih koncentracij in posledično sekundarno odpoved terapije je veliko, največkrat pa je kriv nastanek protiteles proti IFX (ATI; angl. antibodies to infliximab), ki povzročijo hitrejše odstranjevanje zdravilne učinkovine iz telesa (54).

1.3.4.3 SEKUNDARNA ODPOVED ZAVIRALCEV TNF- α

Na terapiji z IFX pride v približno 40 % primerih glede na študijo ACCENT 1, kljub uspešnemu začetnemu zdravljenju, pri vzdrževalnem zdravljenju do izgube odziva na IFX, oz. do sekundarne odpovedi terapije (55). Do sekundarne odpovedi IFX pride takrat, ko pride do popuščanja učinka zdravila po tem, ko je bolnik odgovoril na indukcijsko zdravljenje. Ločimo med delno in popolno odpovedjo učinka zdravila. O delni odpovedi govorimo takrat, ko kljub dokazanemu zagonu bolezni, bolniki odreagirajo na optimizacijo odmerka zaviralca TNF- α , medtem ko o popolni odpovedi govorimo takrat, ko kljub optimizaciji odmerka pride do popolne izgube učinka, zato je potrebno zdravilo ukiniti in preiti na drug način zdravljenja (56). Za primarno rezistenco na zaviralec TNF- α naj bi bile odgovorne predvsem genetske razlike med bolniki (genetski polimorfizmi, različna ekspresija genov v črevesni sluznici pred uvedbo terapije), medtem ko naj bi bili za sekundarno odpoved krivi farmakokinetični mehanizmi, predvsem imunogenost zaviralcev TNF- α (57).

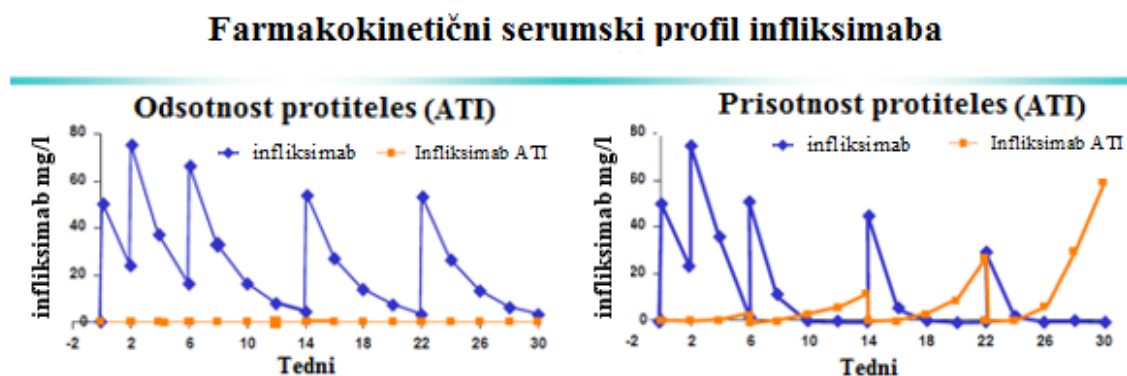
1.3.4.3.1 Farmakokinetika zaviralcev TNF- α

Na farmakokinetične lastnosti zaviralcev TNF- α vpliva aktivnost bolezni, koncentracija albuminov, telesna masa in imunogenost zaviralcev TNF- α .

Bolniki z visokim vnetnim bremenom bolezni imajo nižje serumske koncentracije zaviralcev TNF- α , saj močno vnetje poveča katabolično aktivnost retikuloendotelijskega sistema, kar poveča očistek IFX kot tudi albuminov. Slednje tudi pojasni enega izmed razlogov za pojavnost nizkih koncentracij albuminov, kar še dodatno vodi do nezaznavnih koncentracij IFX. Zanimiv je tudi vpliv telesne mase na očistek IFX in posledično nizke koncentracije IFX v serumu. Kljub enakemu režimu odmerjanja IFX, je očistek bolnikov z nizko telesno maso izrazito višji kot pri težjih bolnikih, kar je problem predvsem pri otrocih, saj so ti posledično večkrat poddozirani (58–60). Značilno za bolnike s KVČB je tudi večja izguba IFX v blatu, ker se zdravilna učinkovina pospešeno izloča skozi poškodovano sluznico črevesa (61).

1.3.4.3.1.1 Imunogenost zaviralcev TNF- α

Protitelesa s svojimi nevtralizirajočimi in vezalnimi sposobnostmi vplivajo na farmakokinetiko pri presnovi bioloških zdravil, ter tako zmanjšajo njihovo učinkovitost (62). Protitelo z vezavo na Fab podenoto zdravilne učinkovine onemogoči vezavo TNF- α , z vezavo na ostale dele pa pospeši imunsko pogojeno odstranjevanje zdravilne učinkovine preko retikuloendotelijskega sistema (63). Povečano izločanje IFX je za kar 30 % večje pri bolnikih s prisotnimi protitelesi (64). Na sliki 5 vidimo kako prisotnost protiteles vpliva na znižanje serumskih koncentracij IFX (65).



Slika 5: Farmakokinetični profil serumskih koncentracij infliksimaba glede na prisotnost protiteles proti infliksimabu pri človeku (65)

Na področju genetike naj bi prisotnost polimorfizmov citokinov, imunoglobulinov in drugih celic imunskega sistema povečalo imunogenost in povzročilo tvorbo protiteles (66). Velikega pomena v imunogenosti ima tudi struktura bioloških zdravil, na katero vplivajo okoljski dejavniki, katerim je zdravilo izpostavljeno tekom sinteze, prevoza, priprave, apliciranja. Nepravilna izpostavljenost svetlobi, ekstremnim temperaturam, nepravilnemu mešanju (agitaciji) raztopine biološkega zdravila vodi do tvorbe agregatov in razpada na številne delce, kar samo še poveča imunogenost zdravila (54,67). Pomembno naj bi bilo tudi, da bolniki na redni, vzdrževalni terapiji z IFX razvijejo neke vrste toleranco na zdravilno učinkovino v smislu imunogenosti in ne razvijejo toliko protiteles kot če je zdravljenje epizodično oz. so med zdravljenjem prisotne prekinitve (68).

1.4 ARGUMENTI ZA RAZISKAVO

Glede na razhajanja v številnih raziskavah je še vedno veliko zmešnjave glede koristnosti spremljanja in merjenja TL in ATI (69). Tako v eni izmed študij Maser (59) ni našel nobene razlike v trajanju klinične remisije pri bolnikih z nezaznavnimi TL IFX, ki so imeli prisotna ATI in pri tistih kjer ATI niso bila prisotna. Po drugi strani so v številnih raziskavah na bolnikih s KVČB potrdili, da višji kot je bil TL IFX, dlje časa so bili bolniki v klinični remisiji (53,70,71). Čeprav se zdi povezava med nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in posledično izgubo kliničnega učinka in pomembnostjo prisotnosti protiteles proti IFX smiselna, pa zaenkrat v literaturi ni dovolj podatkov, da bi določanje koncentracije IFX lahko vpeljali v redno klinično prakso (69).

Tako je bil namen naše raziskave ugotoviti, ali lahko z določanjem TL in ATI predvidimo uspešnost zdravljenja z IFX, tj. možnost za dokončno odpoved IFX in ali lahko predvidimo uspešnost optimizacije odmerka IFX enkrat, ko so serumski koncentracijami IFX nezaznavni in/ali so prisotna anti-infliksima protitelesa.

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

Namen našega dela je ugotoviti, ali je pojav enkrat ali večkrat nezaznavnih serumskih koncentracij infliksimaba povezan z večjo možnostjo za dokočno odpoved infliksimaba pri bolnikih s KVČB. Namen je tudi ugotoviti, ali pojav protiteles proti infliksimabu v različnih titrih (nizkih vs. visokih) vpliva na možnost uspešne optimizacije odmerka infliksimaba in s tem na možnost dokončne odpovedi infliksimaba.

V ta namen smo si zastavili štiri hipoteze:

HIPOTEZA 1: Bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami infliksimaba imajo manjšo možnost za dokončno odpoved infliksimaba kot tisti, ki imajo vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije infliksimaba.

HIPOTEZA 2: Večkrat kot imajo bolniki nezaznavne serumske koncentracije infliksimaba večja je možnost za dokončno odpoved infliksimaba.

HIPOTEZA 3: Prisotnost protiteles proti infliksimabu zmanjša možnost uspešne optimizacije odmerka infliksimaba in poveča možnost za dokončno odpoved infliksimaba.

HIPOTEZA 4: Povišanje odmerka infliksimaba privede do povišanja serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih brez prisotnih protiteles proti infliksimabu, ne pa tudi pri bolnikih s prisotnimi anti-infliksimabnimi protitelesi.

3 METODOLOGIJA

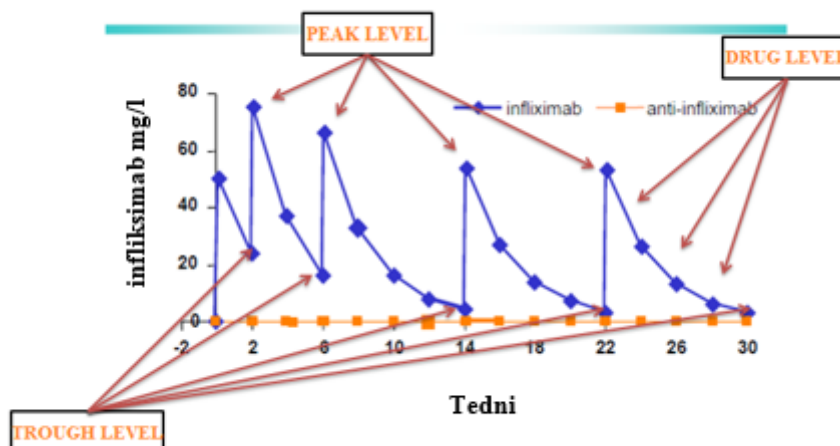
3.1 PREISKOVANCI

Šlo je za raziskavo 146 bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB), ki so prejeli vzdrževalno zdravljenje z infliksimabom (IFX), na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo (KOG), UKC Ljubljana. V raziskavi smo s podrobnim pregledom elektronskih kliničnih izvidov bolnikov iz celotnega obdobja zdravljenja na KOG zbirali klinične podatke. Zbirali smo demografske podatke (spol, starost ob postavitvi diagnoze), podatke o fenotipu bolezni (CB, UC, IS) ter podatke o zdravljenju z IFX (odmerek ob prvi in zadnji infuziji IFX, trajanje zdravljenja (čas na IFX), izid bolnikov ob koncu raziskave) in o aktivnosti bolezni skozi čas. Aktivnost bolezni je bila ocenjena pred vsako aplikacijo IFX klinično, ter včasih še s pomočjo biomarkerjev (CRP, kalprotektin) in endoskopije.

3.2 ZDRAVLJENJE Z INFLIKSIMABOM

Na kliničnem oddelku za gastroenterologijo (KOG), UKC Ljubljana se zdravljenje z infliksimabom (IFX) po postavitvi diagnoze KVČB, začne z začetnim odmerkom 5 mg/kg TM (telesne mase) v obliki intravenske infuzije, ki bolniku teče v žilo približno dve uri. Bolniki so v tem času v posebni sobi, kjer jih po končani infuziji zadržijo še kratek čas zaradi nevarnosti pojava infuzijskih reakcij. Začetnemu odmerku sledita še dodatni infuziji zdravila v odmerku 5 mg/kg TM v 2. tednu po prvi infuziji in nato še ena infuzija v istem odmerku 6 tednov po prvem odmerku zdravila (oz. 4 tedne po drugem odmerku), čemur nato sledijo infuzije na vsakih 8 tednov. Pri zdravljenju tako ločimo obdobje indukcije (5 mg/kg TM ob tednu 0-2-6) in obdobje vzdrževalnega zdravljenja (5 mg/kg TM/8 tednov). Pri vzdrževalnem zdravljenju pred vsako ponovno aplikacijo IFX bolnika pregleda zdravnik gastroenterolog, sledi tudi kratek pogovor o bolnikovem počutju in morebitnih težavah.

Farmakokinetični serumski profil infliksimaba



Slika 6: Farmakokinetični serumski profil infliksimaba po večkratni aplikaciji infliksimaba pri človeku (65)

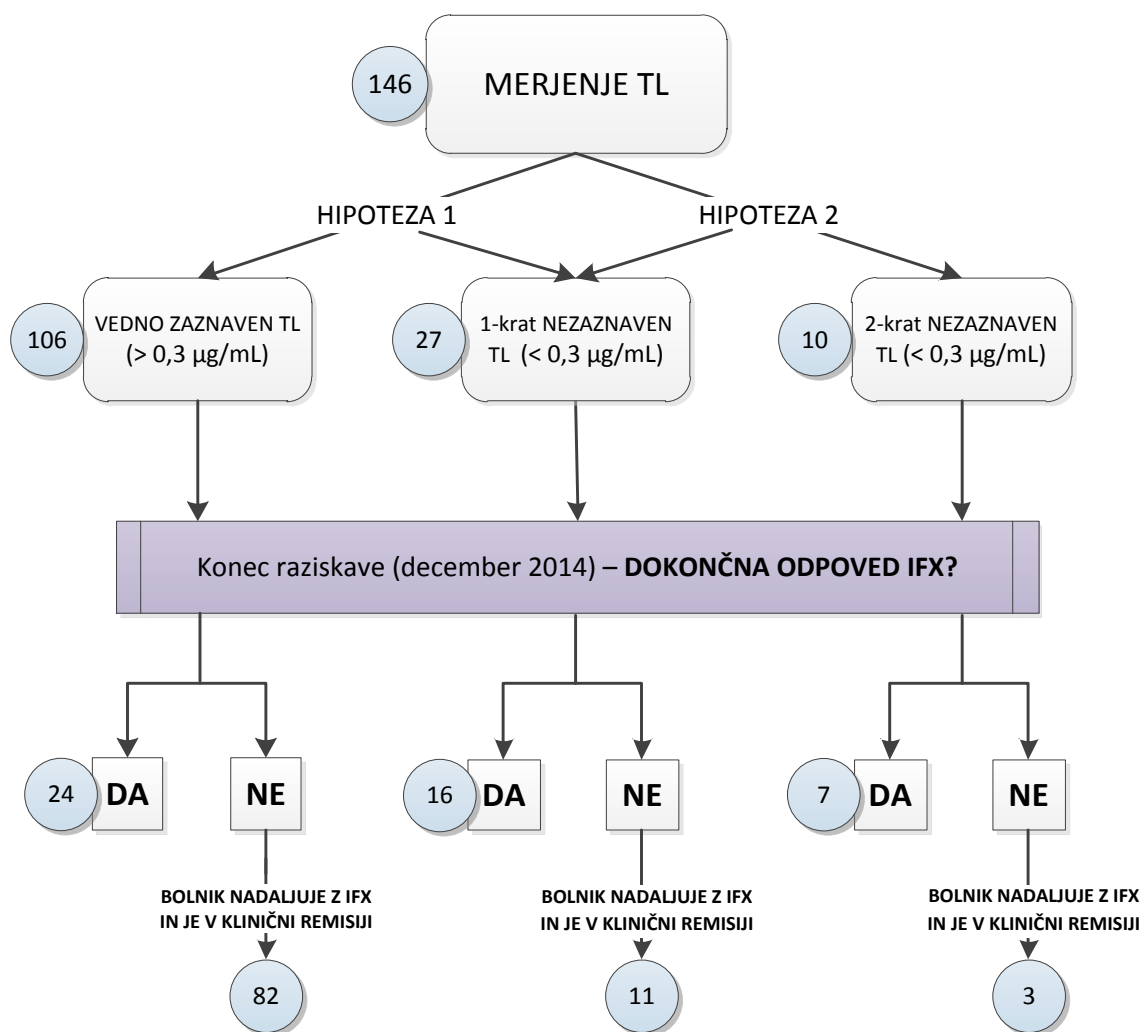
Legenda: *Trough level* – najnižja serumska koncentracija zdravila v telesu; *Peak level* – najvišja serumska koncentracija zdravila v telesu; *Drug level* – serumske koncentracije zdravila izmerjene med najvišjo in najnižjo koncentracijo zdravila v serumu

3.3 DOLOČANJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA IN ANTI-INFLIKSIMABNIH PROTITELES

V raziskavo je bilo vključenih 146 bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB), ki se že več let zdravijo na KOGE. Raziskava je obsegala čas od začetka zdravljenja bolnikov z IFX do konca decembra 2014 (Mediana: 27 mesecev; interkvartilni razpon: 14–44 mesecev). Magistrska naloga je del te raziskave v okviru katere se je pridobivanje kliničnih podatkov bolnikov zaključilo decembra 2014. V nalogi smo vključili podatke o zdravljenju bolnikov in serumske koncentracije IFX in anti-infliksimabnih protiteles, ki so bile izmerjene v Belgiji do konca decembra 2014, in smo jih pridobili s pomočjo pregleda elektronskih kartonov bolnikov. Del magistrske naloge je bilo tudi praktično določanje serumskih koncentracij IFX in anti-infliksimabnih protiteles, ki pa je potekalo marca 2016 na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Ljubljana in sicer po principu novejšega ELISA kita, ki pa ga na inštitutu uporabljajo šele od začetka leta 2016. Namen merjenja je bila seznanitev s protokolom in postopkom merjenja, čeprav teh meritev v magistrsko nalogo nismo vključili. Skozi celotno raziskavo so bili vzorci serumov bolnikov odvzeti na dan infuzije IFX, tik pred naslednjo aplikacijo zdravila ali pa tekom hospitalizacije bolnikov.

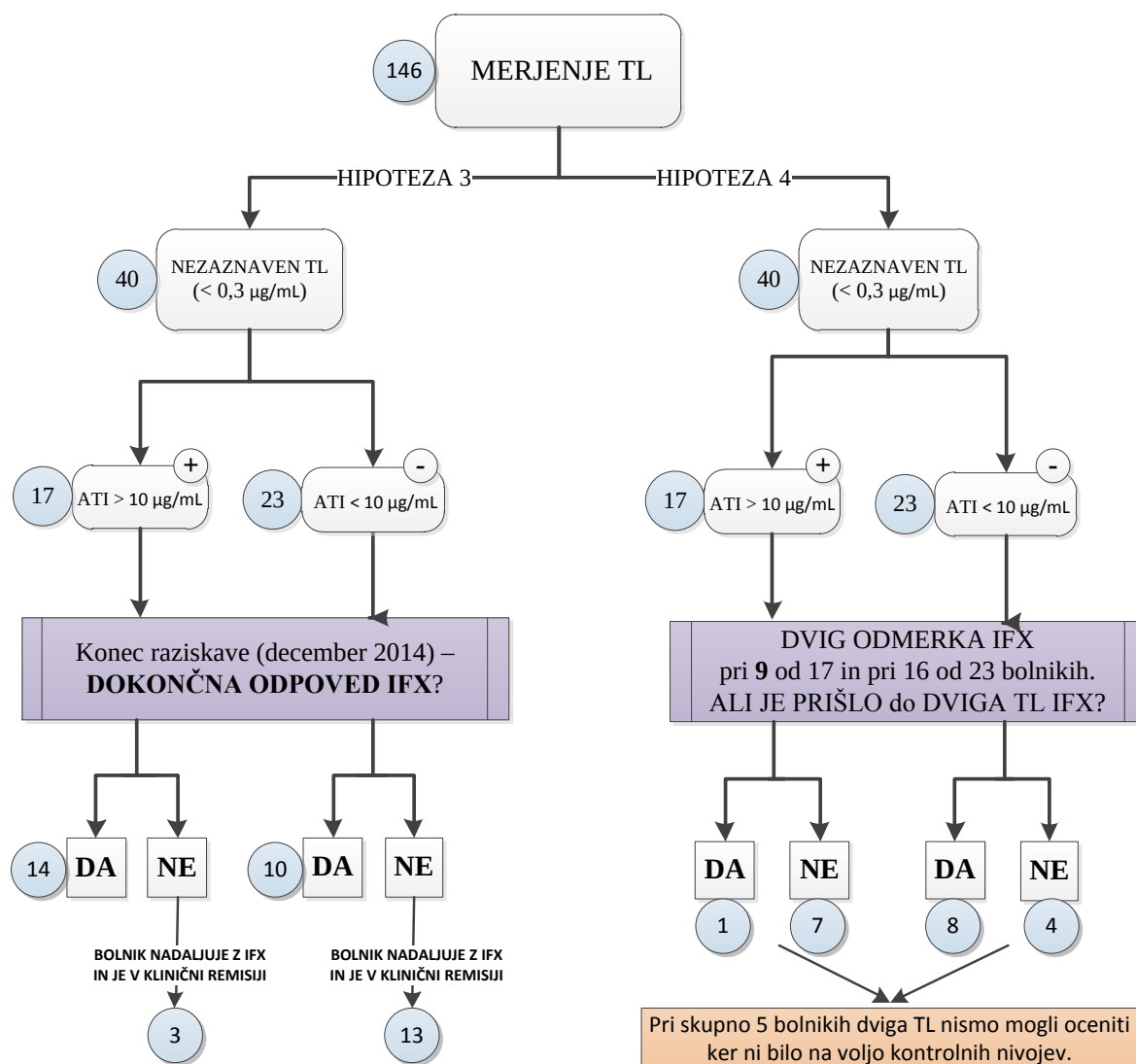
V analizo naše raziskave smo za vsakega bolnika vključili vsaj 1 serumski vzorec, če pa so bili na voljo smo vključili več vzorcev. Skupno smo imeli na voljo 301 serumski vzorec. Bolnike smo analizirali glede na zastavljene hipoteze.

1. Za hipotezo 1 in 2 smo vse bolnike (N = 146) razdelili na tiste z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami (TL) IFX (N = 106) in tiste z vsaj enkrat nezaznavnimi (N = 40), te pa smo razdelili na bolnike z enkrat (N = 27) in dvakrat (N = 10) nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX. Bolnike s 3-krat, 4-krat in 5-krat nezaznavnimi koncentracijami smo iz analize izključili, saj je šlo vsakič samo za enega bolnika. Glede na zastavljeni hipotezi 1 in 2 smo bolnike ob koncu raziskave razdelili na tiste, ki so bili ob koncu oprazovanja še vedno na IFX; torej v remisiji bolezni in na tiste z dokončno odpovedjo terapije z IFX. (Slika 7).



Slika 7: Shema poteka raziskave (hipoteza 1 in 2)

2. Za hipotezo 3 in 4 smo se od vseh bolnikov (N = 146) osredotočili samo na tiste bolnike z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX (N = 40). Te bolnike smo nato razdelili na tiste s prisotnimi anti-infiksimabnimi protitelesi (ATI) (N = 17) in tiste pri katerih ATI niso bila prisotna (N = 23). Tudi pri hipotezi 3 smo bolnike ob koncu raziskave razdelili na tiste v remisiji ob zdravljenju z IFX in na tiste z dokončno odpovedjo IFX. Pri hipotezi 4 smo bili osredotočeni predvsem na uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX po optimizaciji odmerka zdravila iz 5 mg/kg TM (telesne mase) na 10 mg/kg TM glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo odmerka (Slika 8). Prisotnost protiteles proti IFX smo definirali s titrom; ko je bil titer pod 10 µg/mL smo šteli, da so protitelesa neprisotna, ko je bil titer nad 10 µg/mL pa da so protitelesa prisotna.



Slika 8: Shema poteka raziskave (hipoteza 3 in 4)

3.3.1 MERITVE SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA

Meritve serumskih koncentracij zdravila se izvajajo tik pred naslednjo aplikacijo zdravila, ko je koncentracija zdravila v serumu najnižja, kar s kratico označimo kot TL oziroma angl. trough level (63). Meritve TL se pri vsakem bolniku začnejo takoj po indukcijskem obdobju in se nato izvajajo dvakrat letno ne glede na klinično stanje bolnika. Takšnemu načinu merjenja pravimo angl. proactive način oz. preventivno merjenje TL bolnika. Drug način merjenja TL je angl. reactive način, kjer gre za dodatna merjenja serumskih koncentracij zdravila zaradi ponovnih simptomov aktivne bolezni (72).

Za določanje serumskih koncentracij IFX smo v naši raziskavi uporabili validirano ELISA metodo, ki so jo razvili v laboratoriju za terapevtska in diagnostična protitelesa na Univerzi v Leuvnu v Belgiji. Pri metodi ELISA so plošče prekrte z rekombinantnim TNF- α , na katere se veže IFX iz seruma bolnikov. Za detekcijo je pomembno sekundarno protitelo, specifično za IFX. (73). Natančen opis materialov in potek metode je predstavljen v laboratorijskem delu.

3.3.2 MERITVE SERUMSKIH KONCENTRACIJ ANTI- INFLIKSIMABNIH PROTITELES

Protitelesa proti IFX določamo le kadar je serumska koncentracija IFX nezaznavna, tj. pod 0,30 $\mu\text{g/mL}$. To je izrednega pomena, saj prisotnost IFX v vzorcu seruma med meritvijo protiteles pomeni tvorbo kompleksov med IFX in protitelesi in povzroči oviranje detekcije protiteles, kar imenujemo inerferenca zdravila (angl. drug interference).

Protitelesa proti IFX smo izmerili z dvojno antigensko ELISA metodo, ki je bila prav tako razvita in validirana v laboratoriju na Univerzi v Leuvnu v Belgiji. Gre za metodo pri kateri so ELISA plošče prekrte z IFX, na katerega se nato vežejo protitelesa proti IFX iz seruma bolnika. Anti-infliksimumna protitelesa se določijo s pomočjo IFX označenega s peroksidazo (73). Natančen opis materialov in potek metode je predstavljen v laboratorijskem delu.

3.4 LABORATORIJSKI DEL DOLOČANJA SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA IN ANTI-INFLIKSIMABNIH PROTITELES

3.4.1 DOLOČANJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ INFLIKSIMABA

Za kvantitativno določanje IFX (Remicade®, anti-TNF- α) v človeškem serumu in plazmi smo uporabili encimsko imunoadsorpcijsko preiskavo ***apDia IFX ELISA***.

3.4.1.1 Princip *apDia IFX ELISA* metode

Mikrotitrne plošče, ki so prekrte s TNF- α , inkubiramo istočasno s kalibratorji, kontrolami in razredčenimi vzorci bolnika. Med postopkom inkubacije se IFX specifično veže na TNF- α na trdnem nosilcu. Sledi proces spiranja nevezanih serumskih proteinov in nato detekcija kompleksa antigen-protitelo s pomočjo specifičnega monoklonskega protitelesa (clone 6B7) označenega s peroksidazo in usmerjenega proti IFX. Po odstranitvi nevezanih konjugatov, plošče inkubiramo s kromogeno raztopino, ki vsebuje tetrametilbenzidin in vodikov peroksid. Pride do razvoja modre barve v sorazmerju glede na količino vezanega imunokompleksa v vdolbinah mikrotitrne plošče.

Po prekinitvi encimske reakcije z dodatkom 0,5 M H₂SO₄, sledi meritev absorbance pri valovni dolžini 450 nm.

Standardno krivuljo dobimo z nanašanjem vrednosti absorbanc kalibratorjev glede na pripadajoče koncentracije kalibratorjev. Koncentracijo IFX v vzorcu bolnika določimo z interpolacijo iz kalibratorske krivulje (standardna krivulja).

3.4.1.2 Uporabljeni reagenti in pripomočki

Preglednica III: Reagenti in pripomočki uporabljeni v apDia IFX ELISA metodi

Komponente	Ime + simbol
1 × mikrotitrna plošča (12 × 8 vdolbinic)	Prevlečene vdolbinice (Precoated Strips) MTP
Vdolbinice prevlečene s človeško TNF- α	
6 × viala, 1300 μ L, pripravljene za uporabo	Kalibrator (Calibrator) CAL N
Vsaka viala vsebuje kalibratorsko raztopino z N sledečimi vrednostmi: CAL0: 0 ng/mL; CAL5: 5 ng/mL; CAL10: 10 ng/mL ; CAL20: 20 ng/mL; CAL60: 60 ng/mL; CAL120: 120 ng/mL Viale vsebujejo 0,09 % NaN ₃ *	
1 × viala, 1300 μ L, pripravljena za uporabo	Pozitivna kontrola 1 (Positive Control 1) CTL1
Viala vsebuje pozitivno kontrolo za IFX s koncentracijo 3 ng/mL; vsebuje 0,09 % NaN ₃ *	
1 × viala, 1300 μ L, pripravljena za uporabo	Pozitivna kontrola 2 (Positive Control 2) CTL2
Viala vsebuje pozitivno kontrolo za IFX s koncentracijo 7 ng/mL, vsebuje 0,09 % NaN ₃ *	
1 × 100 mL steklenica za razredčenje vzorca	Razredčevalec vzorca (Sample Diluent) DILSAM
Proteinski vzorec. Vsebuje 0,09 % NaN ₃ *	
1 × 12 mL steklenica, pripravljena za uporabo	Konjugat (Conjugate) CONJ
1 × viala, vsebuje specifična anti-IFX monoklonska protitelesa (clone 6B7) označena s peroksidazo	
1 × 12 mL viala, pripravljena za uporabo	Raztopina kromogena (Chromogen Solution) CHROM
Viala vsebuje raztopino substrata (H ₂ O ₂) in kromogena (tetrametilbenzidin)	

1 × 50 mL steklenica, 20 × koncentrirano	Raztopina za spiranje (Wash Solution) Wash 20×
Vsebuje detergent v pufrni raztopini fosfata	
1 × 6 mL steklenica, pripravljena za uporabo	Raztopina za prekinitev reakcije (Stop Solution) STOP
Vsebuje 0,5 M H ₂ SO ₄	
2 × pokrivalo mikrotitrne plošče	-
Dodaten zahtevan material	
Precizne mikropipete in standardne laboratorijske pipete	-
Čista standardna laboratorijska volumetrična steklovina	-
Čiste steklene ali plastične epruvete za redčenje vzorcev	-
Čitalec mikrotitrskih plošč, s sposobnostjo merjenja absorbanco pri 450 nm	-

*Nekatere komponente opreme vsebujejo natrijev azid (NaN₃) kot konzervans. Za preprečitev nastanka eksplozivnih azidov po zlitju v odtok, moramo odtok temeljito sprati.

3.4.1.3 Prenašanje in priprava vzorca

1. Priporočena je uporaba epruvet namenjenih shranjevanju seruma z dodanim aktivatorjem koagulacije in gelnim ločevalcem.
2. Po koagulaciji čim hitreje ločimo serum od strdka da preprečimo hemolizo. Lipemični in hemolitični vzorci lahko povzročijo lažne rezultate.
3. Vzorce shranjujemo pri temperaturi 2–8 °C, 3–4 dni ali pa jih zamrznemo za daljše obdobje.
4. Izogibamo se večkratnemu zamrzovanju in odtajanju vzorcev.
5. Vzorce redčimo z razredčevalcem po navodilih.

3.4.1.4 Postopek apDia IFX ELISA metode

1. Osnovna navodila

- Pri prenašanju vzorcev za vsak vzorec uporabljamo ločeno konico, da preprečimo kontaminacijo vzorcev med sabo.
- Pred uporabo vse reagente hranimo na sobni temperaturi. Pazimo da pri mešanju reagenta ne pride do penjenja.
- Ko enkrat začnemo s postopkom metode vse korake izpeljemo do konca brez prekinitev.
- Priporočena je uporaba ELISA spiralca, vendar lahko postopek spiranja prilagodimo glede na uporabljeno aparaturo.

2. Priprava reagentov

- **Raztopina za spiranje:** z destilirano vodo razredčimo 50 mL koncentrirane raztopine za spiranje na 1000 mL. Tako pripravljeno raztopino hranimo približno en mesec na temperaturi 2–8 °C. Če hranimo koncentrirano raztopino pri višji temperaturi, le-ta lahko postane motna, vendar ne izgubi učinka. Po razredčitvi je raztopina znova bistra.

3. Postopek testa

- Pipetiramo 100 µL raztopine kalibratorjev, kontrol in razredčenih vzorcev, vsako v dve sosednji vdolbinici na plošči.
- Inkubiramo pokrite mikrotitrne plošče za 60 +/- 2 min na 37 °C (+/- 2 °C)
- Poskusimo popolnoma izprazniti vdolbine na plošči z izsesavanjem. Vdolbinice popolnoma napolnimo z 350–400 µL razredčene raztopine za spiranje in pri tem pazimo na izlivanje tekočine iz ene vdolbinice v drugo. Spiranje ponovimo še 2-krat, skupno spiramo 3-krat. Na koncu popolnoma izsesamo vsebino vdolbin in odstranimo preostanek tekočine z rahlim obračanjem vdolbinic na vpojen papir. Pomankljivo spiranje negativno vpliva na izid poskusa.
- Dodamo 100 µL raztopine konjugata in inkubiramo pokrite mikrotitrne plošče za 30 +/- 2 min na 37 °C (+/- 2 °C).
- Po inkubaciji zopet ponovimo postopek spiranja.

- V vsako vdolbinico dodamo 100 μL raztopine kromogena.
- Inkubiramo za 10 $\pm$ 1 min na 37 $^{\circ}\text{C}$ ($\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$), zaščiteno pred svetlobo.
- V vsako vdolbinico dodamo 50 μL raztopine za prekinitev reakcije.
- Znotraj 30 min po ustavitvi reakcije z dodatkom H_2SO_4 , pomerimo absorbanco vsake vdolbinice pri 450 nm.

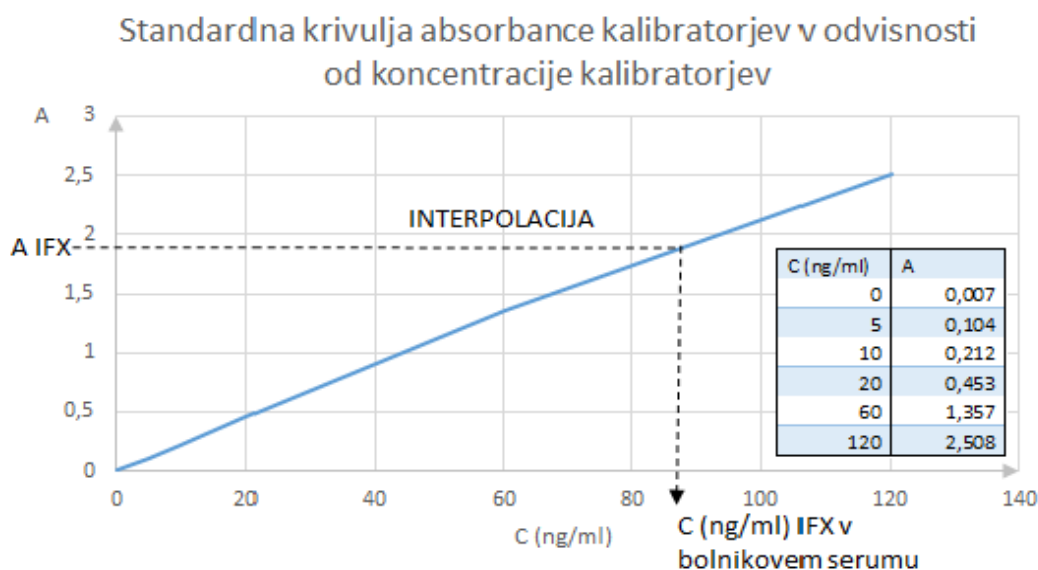
3.4.1.5 Faktor redčenja vzorca

Pri pmerjanju trough level (TL) IFX 14 tednov ali več po zadnjem odmerku Remicade® vzorce redčimo 1:100. Priporočeno je, da vzorce, ki jih pmerjamo dva tedna po zadnjem odmerku Remicade® redčimo 1:400, po šestih tednih pa 1:250. Pri določanju koncentracije IFX v vzorcih obvezno upoštevamo faktor razredčitve, zato je koncentracija IFX izražena v $\mu\text{g/mL}$, medtem, ko so vrednosti kalibratorjev in kontrol v ng/mL (nerazredčeni, pripravljeni za uporabo).

Spodnja meja detekcije koncentracije IFX je približno 2,5 ng/mL , z upoštevanjem faktorja redčenja 1:100 pa 0,25 $\mu\text{g/mL}$.

3.4.1.6 Rezultati

Za določitev koncentracije IFX v vzorcu bolnikov uporabimo povprečno vrednost absorbance vsakega vzorca (y os) in jo interpoliramo glede na kalibracijsko krivuljo na x os. Dobljeno vrednost nato pomnožimo s faktorjem razredčitve.



Slika 9: Teoretični primer določitve koncentracije IFX v serumu z interpolacijo

3.4.1.7 Veljavnost testa

Za veljavnost testa morajo biti dosežene določene specifikacije:

Vrednost Absorbance ničelnega kalibratorja (CAL0): < 0.080

Vrednost Absorbance najvišjega kalibratorja (CAL120): > 1.400

Vrednost koncentracije pozitivne kontrole 1 (CTL1): 3 ng/mL, območje 2–4 ng/mL

Vrednost koncentracije pozitivne kontrole 2 (CTL2): 7 ng/mL, območje 5–10 ng/mL

Če specifikacije niso dosežene je potrebno test ponoviti. V primeru visokega signala ozadja (CAL0 > 0.080) je krivec nezadostno spiranje, kar upoštevamo pri ponovitvi testa.

3.4.2 DOLOČANJE SERUMSKIH KONCENTRACIJ ANTI- INFLIKSIMABNIH PROTITELES

Za kvantitativno določanje protiteles proti IFX (ATI) v človeškem serumu in plazmi smo uporabili encimsko imunoadsorpcijsko preiskavo ***apDia anti-IFX ELISA***.

3.4.2.1 Princip *apDia anti-IFX ELISA* metode

Pri metodi uporabljamo za kalibratorje in kontrole visoko specifično monoklonsko protitelo (clone 10F9), razvito na Univerzi v Leuvnu, ki prepozna izključno samo IFX.

Mikrotitrne plošče, ki so prekrte z IFX (Remicade®) inkubiramo istočasno s kalibratorji, kontrolami in razredčenimi vzorci bolnika. Med postopkom inkubacije se ATI specifično vežejo na IFX na trdnem nosilcu. Sledi proces spiranja nevezanih serumskih proteinov in nato inkubacija z IFX, ki je konjugiran z biotinom (vitamin H) (sekundarno protitelo), ki se veže direktno na kompleks antigen-protitelo. Po odstranitvi nevezanega biotinskega konjugata ploščo inkubiramo s peroksidazo konjugirano s streptavidinom. Streptavidin ima veliko afiniteto vezave na biotin. Po odstranitvi nevezanih peroksidaznih konjugatov, plošče inkubiramo s kromogeno raztopino, ki vsebuje tetrametilbenzidin in vodikov peroksid. Pride do razvoja modre barve v sorazmerju glede na količino vezanega imunokompleksa v vdolbinah mikrotitrne plošče. Po prekinitvi encimske reakcije z dodatkom 0,5 M H₂SO₄, sledi meritev absorbance pri valovni dolžini 450 nm.

Standardno krivuljo dobimo z nanašanjem vrednosti absorbanč kalibratorjev glede na pripadajoče koncentracije kalibratorjev. Koncentracijo ATI v vzorcu bolnika določimo z interpolacijo iz kalibratorske krivulje (standardna krivulja).

3.4.2.2 Uporabljeni reagenti in pripomočki

Preglednica IV: Reagenti in pripomočki uporabljeni v apDia anti-IFX ELISA metodi

Komponente	Ime + simbol
1 × prevlečena mikrotitrna plošča (12 × 8 vdolbinic)	Prevlečene vdolbinice (Precoated Strips) MTP
Vdolbinice prevlečene z IFX	
6 × viala, 1300 µL, pripravljene za uporabo	Kalibrator (Calibrator) CAL N
Vsaka viala vsebuje kalibratorsko raztopino z N sledečimi vrednostmi: CAL0: 0 ng/mL; CAL5: 5 ng/mL; CAL10: 10 ng/mL ; CAL20: 20 ng/mL; CAL60: 60 ng/mL; CAL120: 120 ng/mL anti-IFX clone 10F9 Viale vsebujejo 0,09 % NaN ₃ *	
1 × viala, 1300 µL, pripravljena za uporabo	Pozitivna kontrola 1 (Positive Control 1) CTL1
Viala vsebuje pozitivno kontrolo za ATI s koncentracijo 0,375 ng/mL anti-IFX clone 10F9. Viala vsebuje 0,09 % NaN ₃ *	
1 × viala, 1300 µL, pripravljena za uporabo	Pozitivna kontrola 2 (Positive Control 2) CTL2
Viala vsebuje pozitivno kontrolo za ATI s koncentracijo 3 ng/mL anti-IFX clone 10F9. Viala vsebuje 0,09 % NaN ₃ *	
1 × 100 mL steklenica, pripravljena za uporabo	Razredčevalec vzorca (Sample Diluent) DILSAM
Pufna raztopina razredčevalca vzorcev, vsebuje 0,09 % NaN ₃ * in inertno oranžno barvo	

1 × 12 mL steklenica, pripravljena za uporabo	Konjugat 1 (Conjugate 1) CONJ 1
Vsebuje IFX konjugiran z biotinom. Vsebuje antimikrobno sredstvo in inertno modro barvo.	
1 × 12 mL steklenica, pripravljena za uporabo	Konjugat 2 (Conjugate 2) CONJ 2
Vsebuje peroksidazo konjugirano s strepavidinom. Vsebuje antimikrobno sredstvo in inertno rdečo barvo.	
1 × 12 mL viala, pripravljena za uporabo	Raztopina kromogena (Chromogen Solution) CHROM
Viala vsebuje raztopino substrata (H ₂ O ₂) in kromogena (tetrametilbenzidin).	
1 × 50 mL steklenica, 20 × koncentrirano	Raztopina za spiranje (Wash Solution) Wash 20×
Vsebuje detergent v pufrni raztopini fosfata in antimikrobno sredstvo.	
1 × 6 mL steklenica, pripravljena za uporabo	Raztopina za prekinitev reakcije (Stop Solution) STOP
Vsebuje 0,5 M H ₂ SO ₄	
4 × pokrivalo mikrotitrne plošče	-
Dodaten zahtevan material	
Precizne mikropipete in standardne laboratorijske pipete	-
Čista standardna laboratorijska volumetrična steklovina	-
Čiste steklene ali plastične epruvete za redčenje vzorcev	-
Čitalec mikrotitrskih plošč, s sposobnostjo merjenja absorbanc pri 450 nm	-

*Nekatere komponente opreme vsebujejo natrijev azid (NaN₃) kot konzervans. Za preprečitev nastanka eksplozivnih azidov po zlitju v odtok, moramo odtok temeljito sprati.

3.4.2.3 Prenašanje in priprava vzorca

1. Priporočena je uporaba epruvet namenjenih shranjevanju seruma z dodanim aktivatorjem koagulacije in gelnim ločevalcem.
2. Po koagulaciji čim hitreje ločimo serum od strdka da preprečimo hemolizo. Lipemični in hemolitični vzorci lahko povzročijo lažne rezultate.
3. Vzorce shranjujemo pri temperaturi 2–8 °C 3–4 dni ali pa jih zamrznemo za daljše obdobje.
4. Izogibamo se večkratnemu zamrzovanju in odtajanju vzorcev.
5. Vzorce redčimo z razredčevalcem po navodilih.

3.4.2.4 Postopek apDia anti-IFX ELISA metode

1. Osnovna navodila

- Pri prenašanju vzorcev, za vsak vzorec uporabljamo ločeno konico, da preprečimo kontaminacijo vzorcev med sabo.
- Pred uporabo vse reagentne hranimo na sobni temperaturi. Pazimo da pri mešanju reagenta ne pride do penjenja.
- Ko enkrat začnemo s postopkom metode vse korake izpeljemo do konca brez prekinitev
- Priporočena je uporaba ELISA spiralca, vendar lahko postopek spiranja prilagodimo glede na uporabljeno aparaturo

2. Priprava reagentov

- **Raztopina za spiranje:** z destilirano vodo razredčimo 50 mL koncentrirane raztopine za spiranje na 1000 mL. Tako pripravljeno raztopino hranimo približno en mesec na temperaturi 2–8 °C. Če hranimo koncentrirano raztopino pri višji temperaturi le-ta lahko postane motna vendar ne izgubi učinka. Po razredčitvi je raztopina znova bistra.

3. Redčenje vzorcev

Pred samim postopkom najprej redčimo vzorce bolnikov 1:25 in 1:200.

- Za določanje koncentracij ATI med 2,5 in 125 ng/mL, redčimo vzorce 1:25.

Postopek: V 600 μ L raztopine za redčenje dodamo 25 μ L bolnikovega vzorca.

- Za določanje koncentracij ATI med 20 in 1000 ng/mL, redčimo vzorce 1:200.

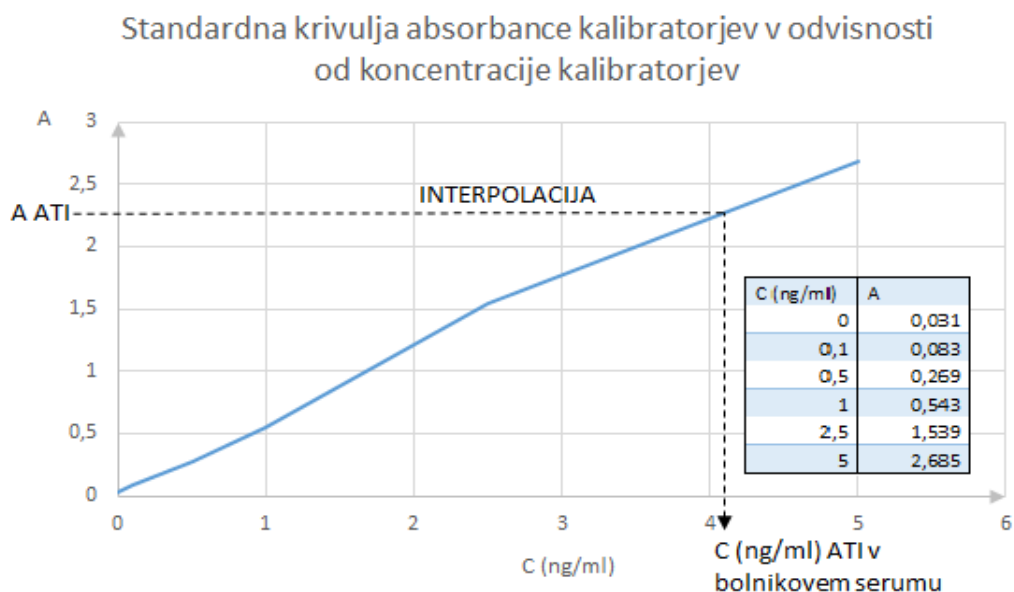
Postopek: V 700 μ L raztopine za redčenje dodamo 100 μ L 1:25 razredčene raztopine.

4. Postopek testa

- Pipetiramo 100 μ L raztopine kalibratorjev, kontrol in razredčenih vzorcev, v vdolbinice na mikrotitrski plošči.
- Inkubiramo pokrite mikrotitrne plošče za 60 $\pm$ 2 min na 37 °C ($\pm$ 2 °C)
- Poskusimo popolnoma izprazniti vdolbine na plošči z izsesavanjem. Vdolbinice popolnoma napolnimo z 350–400 μ L razredčene raztopine za spiranje in pri tem pazimo na izlivanje tekočine iz ene vdolbinice v drugo. Spiranje ponovimo še dvakrat, skupno spiramo trikrat. Na koncu popolnoma izsesamo vsebino vdolbinic in odstranimo preostanek tekočine z rahlim obračanjem vdolbinic na vpojen papir. Pomankljivo spiranje negativno vpliva na izid poskusa.
- Dodamo 100 μ L raztopine konjugata 1 in inkubiramo pokrite mikrotitrne plošče za 30 $\pm$ 2 min na 37 °C ($\pm$ 2 °C).
- Po inkubaciji zopet ponovimo postopek spiranja.
- Dodamo 100 μ L raztopine konjugata 2 in inkubiramo pokrite mikrotitrne plošče za 15 $\pm$ 1 min na 37 °C ($\pm$ 2 °C).
- Po inkubaciji zopet ponovimo postopek spiranja.
- V vsako vdolbinico dodamo 100 μ L raztopine kromogena.
- Inkubiramo pokrite mikrotitrne plošče za 15 $\pm$ 1 min na 37 °C ($\pm$ 2 °C) zaščiteno pred svetlobo.
- V vsako vdolbinico dodamo 50 μ L raztopine za prekinitev reakcije.
- Znotraj 30 min po ustavitvi reakcije z dodatkom H₂SO₄, pomerimo absorbanco vsake votlinice pri 450 nm.

3.4.2.5 Rezultati

Za določitev koncentracije ATI v vzorcu bolnikov uporabimo povprečno vrednost absorbance vsakega vzorca (y os) in jo interpoliramo glede na kalibracijsko krivuljo na x os. Dobljeno vrednost nato pomnožimo s faktorjem razredčitve.



Slika 10: Teoretični primer določitve koncentracije ATI v serumu z interpolacijo

3.4.2.6 Veljavnost testa

Za veljavnost testa morajo biti dosežene določene specifikacije:

Vrednost Absorbance ničelnega kalibratorja (CAL0): < 0.080

Vrednost Absorbance najvišjega kalibratorja (CAL120): > 1.400

Če specifikacije niso dosežene je potrebno test ponoviti. V primeru visokega signala ozadja (CAL0 > 0.080) je krivec nezadostno spiranje, kar upoštevamo pri ponovitvi testa.

3.5 DEFINICIJE KLINIČNIH IZIDOV

3.5.1 *KLINIČNA REMISIJA*

Vsi bolniki, ki so bili vključeni v našo raziskavo, so bili pred vsako aplikacijo infliksimaba (IFX) pregledani s strani specialista gastroenterologa, ki je na osnovi pregleda in laboratorijskih izvidov ocenil aktivnost bolezni. Če po pregledu ni bilo kliničnih znakov, da gre za aktivno bolezen (driska, krvavo blato, bolečine v trebuhu, vročina) in so bili glede na laboratorijske izvide vnetni kazalci (kalprotektin, CRP) nizki, je bil bolnik v **klinični remisiji** in je tako nadaljeval režim vzdrževalnega zdravljenja.

3.5.2 *ZAZNAVNA IN NEZAZNAVNA SERUMSKA KONCENTRACIJA INFLIKSIMABA*

Pri vseh bolnikih, ki so imeli med zdravljenjem kadarkoli izmerjeno serumsko koncentracijo infliksimaba (IFX), smo bolnike razdelili na tiste, ki so imeli serumsko koncentracijo vedno nad 0,3 µg/mL in tiste, ki so imeli vsaj enkrat pod 0,3 µg/mL. Koncentracijo nad 0,3 µg/mL smo definirali kot **zaznavna serumska koncentracija infliksimaba**, koncentracijo pod 0,3 µg/mL pa kot **nezaznavna serumska koncentracija infliksimaba**. Pri teh bolnikih smo tudi določili število nezaznavnih serumskih koncentracij.

3.5.3 *PRISOTNOST PROTITELES*

Pri bolnikih z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami infliksimaba (IFX) smo določali koncentracijo protiteles proti IFX (ATI). Če je bila izmerjena koncentracija protiteles pod 10 µg/mL protitelesa niso bila prisotna. Vrednosti nad 10 µg/mL pa smo definirali kot **prisotnost protiteles**.

3.5.4 *DELNA ODPOVED INFLIKSIMABA*

Če je specialist gastroenterolog ob ponovnem obisku bolnika zaznal znake aktivne bolezni (klinično, laboratorijsko in v primeru dvomov tudi endoskopsko oziroma radiološko), je bil cilj povišanje serumskih koncentracij infliksimaba (IFX), bodisi tako, da so povišali odmerke IFX (iz 5 mg/kg TM (telesne mase) vsakih 8 tednov na 10 mg/kg TM vsakih 8 tednov) ali pa skrajšali interval aplikacij (iz 5 mg/kg TM vsakih 8 tednov na 5 mg/kg TM vsake 4 tedne). Če je takšni optimizaciji zdravljenja sledil dvig serumskih koncentracij IFX in klinično izboljšanje je bilo to opredeljeno kot **delna odpoved infliksimaba**.

3.5.5 DOKONČNA ODPOVED INFLIKSIMABA

Če kljub optimizaciji zdravljenja, bodisi povišanju odmerka infliksimaba (IFX) ali skrajšanju intervala aplikacij ni sledil dvig serumskih koncentracij IFX in izboljšanje in je bila bolezen še vedno aktivna, je bila potrebna ukinitve IFX in prehod na drugo zdravilo (Humira (adalimumab)) ali pa operativno zdravljenje. To je bilo definirano kot **dokončna odpoved infliksimaba**.

3.6 STATISTIČNE METODE

Dolgoročni klinični izid bolnikov smo analizirali s pomočjo analize preživetja (metoda Kaplan-Meier, test Log-Rank ter Coxova regresija). Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX smo analizirali s Hi-kvadrat testom ali Fisherjevim eksaktnim testom glede na velikost vzorca.

Za hipotezo 1 smo bolnike najprej analizirali kot celoto, torej bolnike s CB, UK in IS skupaj. Za vsakega bolnika posebej smo izračunali čas zdravljenja z IFX in bolnike nato razdelili v dve skupini na osnovi serumskih koncentracij IFX (TL). Tako smo imeli dve skupini bolnikov in sicer prvo skupino z zaznavnimi TL in drugo z vsaj enkrat nezaznavnimi TL IFX. Nato je sledila analiza bolnikov razdeljenih na tiste s CB in UK, bolnikov z IS je bilo številčno premalo zato jih posebej nismo ovrednotili zaradi pomanjkanja statistične moči.

Za hipotezo 2 smo bolnike zopet najprej analizirali kot celoto (CB,UK,IS), nato pa posebej bolnike s CB in UK, bolnikov z IS iz enakega razloga kot pri hipotezi 1 posebej nismo ovrednotili. Analiza je potekala enako kot pri hipotezi 1, le da so bili v tem primeru bolniki razdeljeni v tri skupine in sicer na bolnike z vedno zaznavnimi TL IFX, bolnike z enkrat nezaznavnimi TL in na bolnike z dvakrat nezaznavnimi TL IFX.

Za hipotezo 3 kjer smo želeli ovrednotiti negativen vpliv protiteles proti IFX na prognozo bolnikov, smo bolnike analizirali razdeljene na tiste z vedno zaznavnimi koncentracijami IFX, in na tiste z vsaj enkrat nezaznavnimi koncentracijami, te pa smo razdelili še na podskupini glede na osnovi titra protiteles, in sicer na $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ (odsotnost protiteles) in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (prisotnost protiteles). Bolnike smo v tem primeru analizirali samo kot celoto (CB,UK,IS), saj bi bile skupine bolnikov sicer premajhne za analizo.

Pri hipotezi 4 nas je zanimal vpliv titra protiteles proti IFX na povišanje TL IFX po povišanju odmerka IFX. Bolnike smo razdelili na tiste z $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$. Znotraj teh dveh skupin so nas zanimali samo bolniki pri katerih je šlo za dvig odmerka IFX in ali je po dvigu odmerka prišlo do dviga TL IFX. Analizirali smo vse bolnike tudi tiste z IS.

Pri vseh analizah smo za statistično značilno rezultat šteli, kadar je bila p vrednost $< 0,05$.

Za analize smo uporabili programski paket SPSS 17.0 (IBM Inc.).

3.7 ETIČNI VIDIKI

Vse informacije, ki smo jih pridobili v okviru retrospektivne analize so anonimne. Nobena informacija, ki je bila kakorkoli posredovana v okviru raziskave ni bila osebno razpoznavna v javnosti dostopnih analizah ali v raziskovalnih poročilih.

Etična vloga je bila oddana v sklopu širšega projekta, ki je potekal na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo (KOG), UKC Ljubljana.

Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko je tako na seji 13. maja 2014 ocenila, da je raziskava etično sprejemljiva in s tem podala soglasje (št. 45/5/14).

4 REZULTATI

4.1 Bolniki

Demografski podatki bolnikov so prikazani v Preglednici V.

Preglednica V: Demografski podatki bolnikov

Bolniki vključeni v raziskavo (N = 146)		Zaznaven TL (N = 106)	Nezaznaven TL (N = 40)	
			ATI + (N = 17)	ATI – (N = 23)
Starost bolnikov v letih ob postavitvi diagnoze kronične vnetne črevesne bolezni (mediana, interkvartilni razpon)	24 (18–33)			
Starost bolnikov v letih ob prvem odmerku infliksimaba (mediana, interkvartilni razpon)	32 (23–43)			
Spol	Moški	64 (60 %)	9 (53 %)	8 (35 %)
	Ženske	42 (40 %)	8 (47 %)	15 (65 %)
Fenotip bolezni	Crohnova bolezen	66 (62 %)	6 (35 %)	16 (70 %)
	Ulcerozni kolitis	36 (34 %)	10 (59 %)	6 (26 %)
	Intermediarni sindrom	4 (4 %)	1 (6 %)	1 (4 %)
Klinični izid na koncu raziskave	Remisija na IFX	82 (77 %)	3 (18 %)	13 (57 %)
	Dokončna odpoved IFX	24 (23 %)	14 (82 %)	10 (43 %)

4.2 Kaplan-Meier analiza dokončne odpovedi infliksimaba (IFX) skozi čas glede na prisotnost vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX

4.2.1 Bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB)

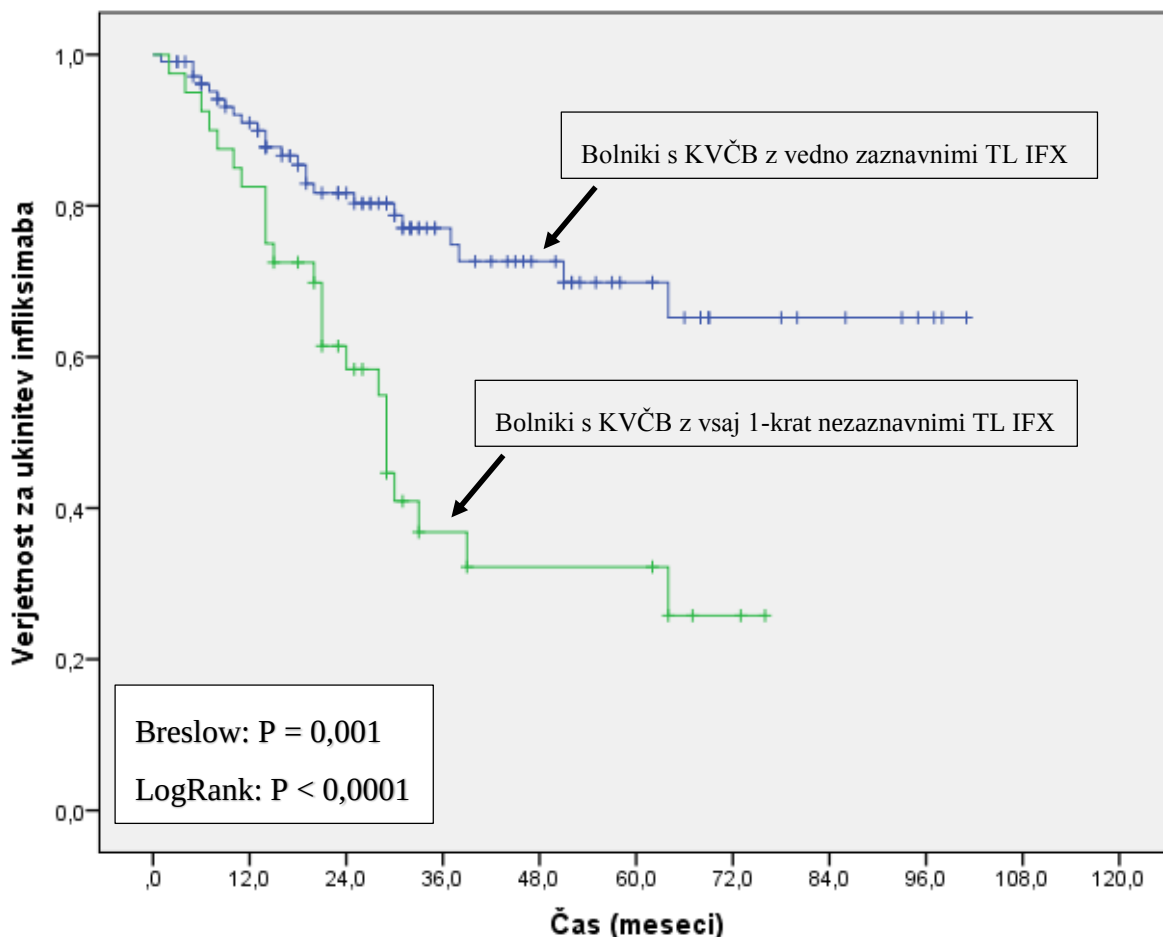
Pri celotnem številu bolnikov s KVČB (N = 146) smo izračunali mediano časa do ukinitve IFX ali do konca raziskave za bolnike pri katerih ni prišlo do dokončne odpovedi IFX in je znašala 29,0 mesecev (95 % interval zaupanja: 22,9–35,1). Bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX so imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX, saj so imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX (HR, 0,35; 95 % interval zaupanja: 0,20–0,61; $P < 0,0001$). Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 75,4 mesecev (95 % interval zaupanja: 66,6–84,3), pri bolnikih z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pa je znašal v povprečju 37,6 mesecev (95 % interval zaupanja: 28,5–46,7).

Preglednica VI: Dokončna odpoved IFX pri bolnikih s KVČB glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX

	Število bolnikov (N)	Bolniki z dokončno odpovedjo IFX do konca raziskave	Bolniki brez dokončne odpovedi IFX do konca raziskave
Bolnik je imel vedno zaznavne serumske koncentracije IFX	106	24 (22,6 %)	82 (77,4 %)
Bolnik je imel vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX	40	24 (60,0 %)	16 (40,0 %)
Skupno število bolnikov s KVČB	146	48 (32,9 %)	98 (67,1 %)

Preglednica VI prikazuje število bolnikov z dokončno odpovedjo IFX in brez dokončne odpovedi IFX, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami (N = 106) so imeli manjše število dokončnih odpovedi IFX (24/106, 22,6 %) kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami (24/40, 60,0 %) ($P < 0,0001$).

Slika 11 prikazuje bolnike s KVČB z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave. Modra krivulja prikazuje bolnike z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, medtem ko zelena krivulja prikazuje bolnike z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX.



Slika 11: Vpliv vedno zaznavnih ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s KVČB

4.2.2 Bolniki s Crohnovo boleznijo (CB)

Pri celotnem številu bolnikov s CB (N = 88) smo izračunali mediano časa do ukinitve IFX ali do konca raziskave za bolnike pri katerih ni prišlo do dokončne odpovedi IFX in je znašala 29,0 mesecev (95 % interval zaupanja: 21,4–36,6). Bolniki s CB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX so imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX, saj so imeli skozi čas bistveno manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX (HR, 0,28; 95 % interval zaupanja: 0,13–0,60; P = 0,001).

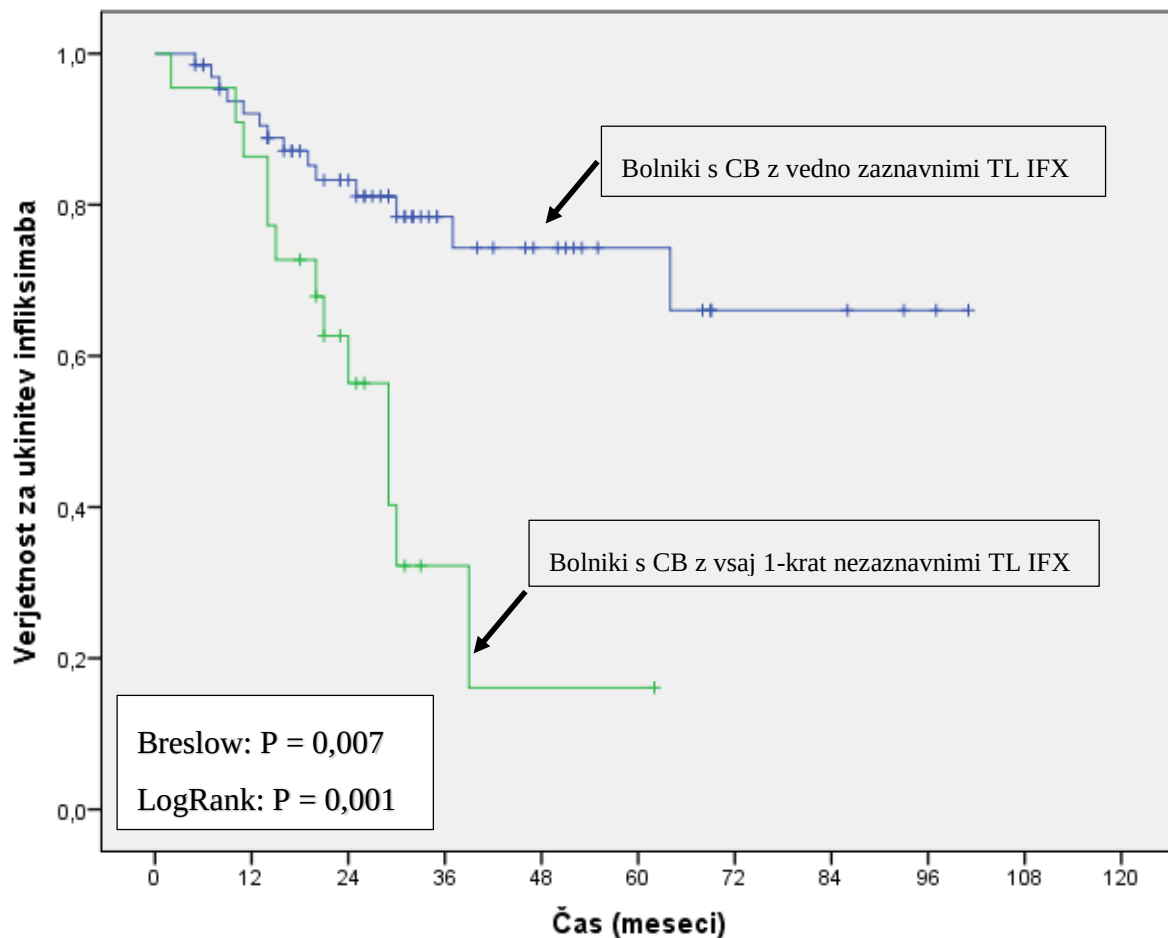
Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih s CB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 77,0 mesecev (95% interval zaupanja: 65,7–88,2), pri bolnikih z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pa je znašal v povprečju 29,9 mesecev (95 % interval zaupanja: 21,0–38,9).

Preglednica VII: Dokončna odpoved IFX pri bolnikih s CB glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX

	Število bolnikov (N)	Bolniki z dokončno odpovedjo IFX do konca raziskave	Bolniki brez dokončne odpovedi IFX do konca raziskave
Bolnik je imel vedno zaznavne serumske koncentracije IFX	66	14 (21,2 %)	52 (78,8 %)
Bolnik je imel vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX	22	13 (59,1 %)	9 (40,9 %)
Skupno število bolnikov s CB	88	27 (30,7 %)	61 (69,3 %)

Preglednica VII prikazuje število bolnikov s CB z dokončno odpovedjo IFX in brez dokončne odpovedi IFX, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Bolniki s CB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami (N = 66) so imeli manjše število dokončnih odpovedi IFX (14/66, 21,2 %) kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami (13/22, 59,1 %) ($P = 0,001$).

Slika 12 prikazuje bolnike s CB z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave. Modra krivulja prikazuje bolnike s CB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, medtem ko zelena krivulja prikazuje bolnike s CB z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX.



Slika 12: Vpliv vedno zaznavnih ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s CB

4.2.3 Bolniki z ulceroznim kolitisom (UK)

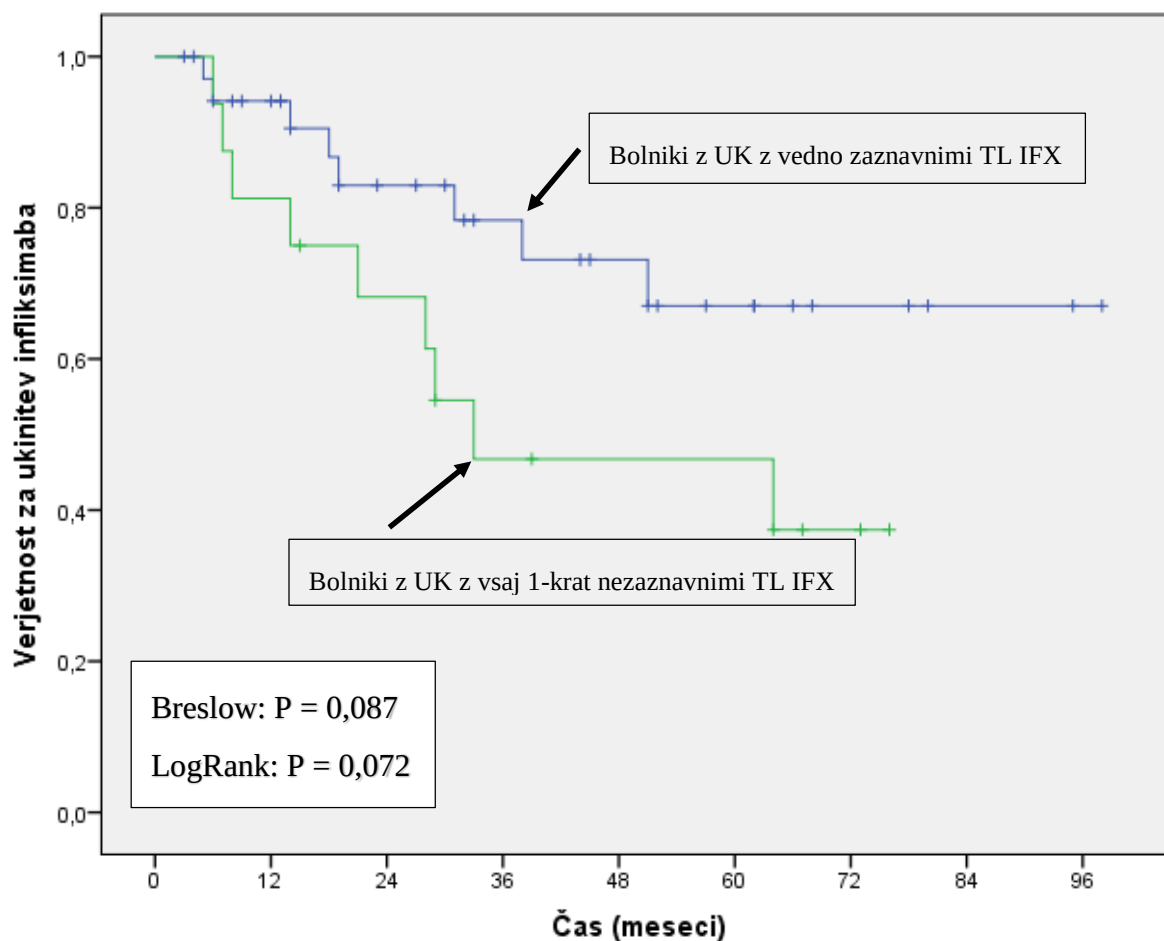
Pri celotnem številu bolnikov z UK (N = 52) smo izračunali mediano časa do ukinitve IFX ali do konca raziskave za bolnike pri katerih ni prišlo do dokončne odpovedi IFX in je znašala 33,0 mesecev (95 % interval zaupanja: 00,0–71,6). Med bolniki z UK z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX ni bilo signifikantne razlike v ogroženosti za dokončno odpoved IFX (HR, 0,43; 95% interval zaupanja: 0,16–1,11; P = 0,082). Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih z UK z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 74,4 mesecev (95 % interval zaupanja: 60,7–88,2), pri bolnikih z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pa je znašal v povprečju 44,5 mesecev (95 % interval zaupanja: 30,0–58,9).

Preglednica VIII: Dokončna odpoved IFX pri bolnikih z UK glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX

	Število bolnikov (N)	Bolniki z dokončno odpovedjo IFX do konca raziskave	Bolniki brez dokončne odpovedi IFX do konca raziskave
Bolnik je imel vedno zaznavne serumске koncentracije IFX	36	8 (22,2 %)	28 (77,8 %)
Bolnik je imel vsaj enkrat nezaznavne serumске koncentracije IFX	16	9 (56,3%)	7 (43,8 %)
Skupno število bolnikov z UK	52	17 (32,7 %)	35 (67,3 %)

Preglednica VIII prikazuje število bolnikov z UK z dokončno odpovedjo IFX in brez dokončne odpovedi IFX, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Bolniki z UK z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX (N = 36) niso imeli signifikantno manjše število dokončnih odpovedi IFX (8/36, 22,2 %) kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX (9/16, 56,3 %) ($p = 0,072$).

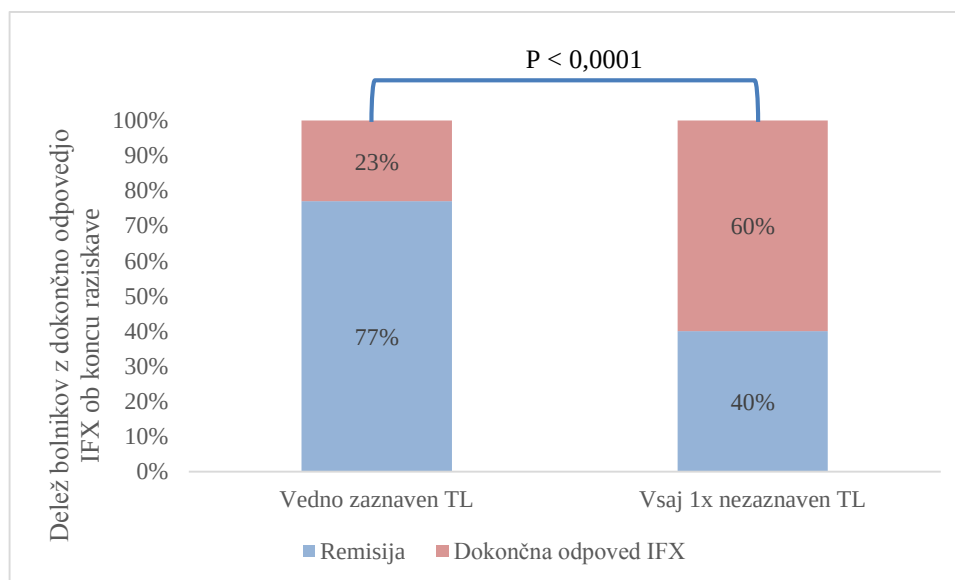
Slika 13 prikazuje bolnike z UK z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave. Modra krivulja prikazuje bolnike z UK z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, medtem ko zelena krivulja prikazuje bolnike z UK z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX.



Slika 13: Vpliv vedno zaznavnih ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih z UK

4.3 Dokončna odpoved infliksimaba (IFX) glede na prisotnost vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB)

Slika 14 prikazuje bolnike s KVČB ob koncu raziskave glede na to, ali je prišlo do dokončne odpovedi IFX, ali pa so bili bolniki v remisiji, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije (24/40, 60 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (24/106, 23 %) ($P < 0,0001$).



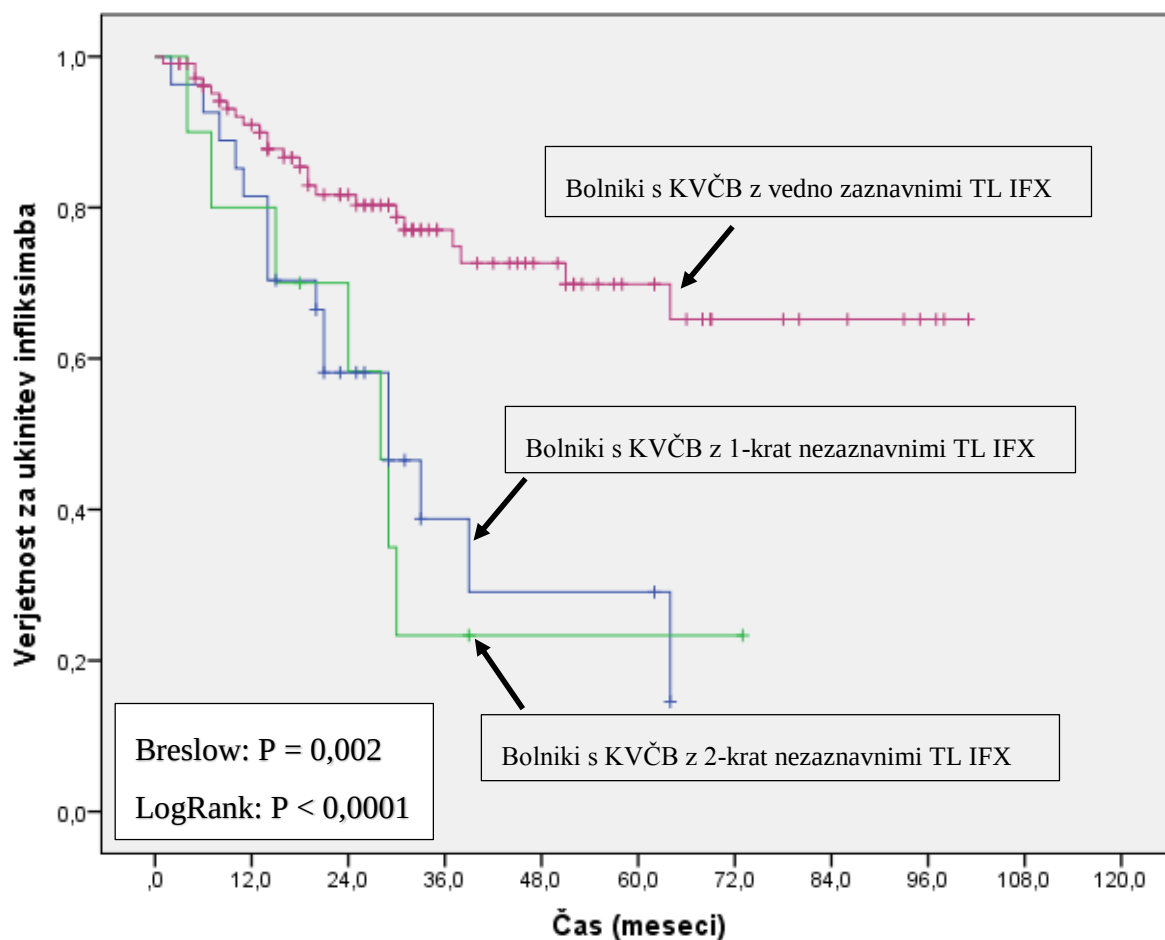
Slika 14: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s KVČB

4.4 Kaplan-Meier analiza dokončne odpovedi infliksimaba (IFX) skozi čas glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX

4.4.1 Bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB)

Bolniki s KVČB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX so imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (HR, 0,87; 95 % interval zaupanja: 0,80–0,94; $P = 0,01$) in dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (HR, 0,84; 95 % interval zaupanja: 0,74–0,94; $P = 0,03$), saj so imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX. Med bolniki s KVČB z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in bolniki z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX ni bilo signifikantne razlike v ogroženosti za dokončno odpoved IFX (HR, 1,12; 95 % interval zaupanja: 0,46–2,70; $P = 0,80$). Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih s KVČB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 75,4 mesecev (95 % interval zaupanja: 66,6–84,3), pri bolnikih z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je znašal v povprečju 33,8 mesecev (95 % interval zaupanja: 24,1–43,5), pri bolnikih z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pa v povprečju 32,6 mesecev (95 % interval zaupanja: 17,1–48,1).

Slika 15 prikazuje bolnike s KVČB z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave. Modra krivulja prikazuje bolnike z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, zelena krivulja prikazuje bolnike z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, vijolična krivulja pa prikazuje bolnike z vedno zaznavnimi koncentracijami IFX.



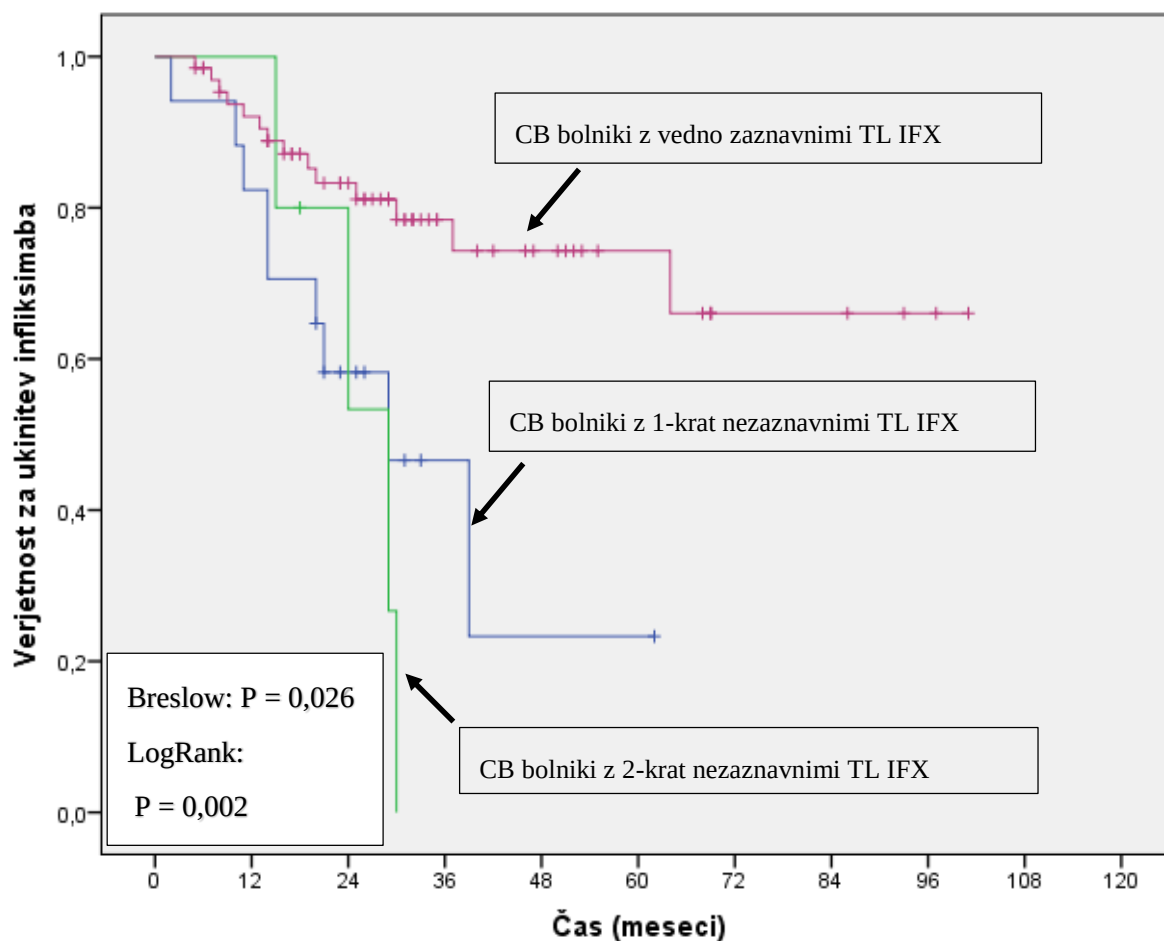
Slika 15: Vpliv vedno zaznavnih, ter enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s KVČB

4.4.2 Bolniki s Crohnovo boleznijo (CB)

Bolniki s CB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX so imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (HR, 0,87; 95 % interval zaupanja: 0,78–0,97; $P = 0,01$) in dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (HR, 0,80; 95 % interval zaupanja: 0,68–0,94; $P = 0,008$), saj so imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX. Bolniki s CB z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX niso imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX, saj niso imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX (HR, 1,48; 95 % interval zaupanja: 0,44–4,93; $P = 0,52$).

Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih s CB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 77,0 mesecev (95 % interval zaupanja: 65,7–88,2), pri bolnikih z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je znašal v povprečju 32,4 mesecev (95 % interval zaupanja: 20,7–44,2), pri bolnikih z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pa v povprečju 25,1 mesecev (95 % interval zaupanja: 19,3–31,0).

Slika 16 prikazuje bolnike s CB z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave. Modra krivulja prikazuje bolnike z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, zelena krivulja prikazuje bolnike z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, vijolična krivulja pa prikazuje bolnike z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX.



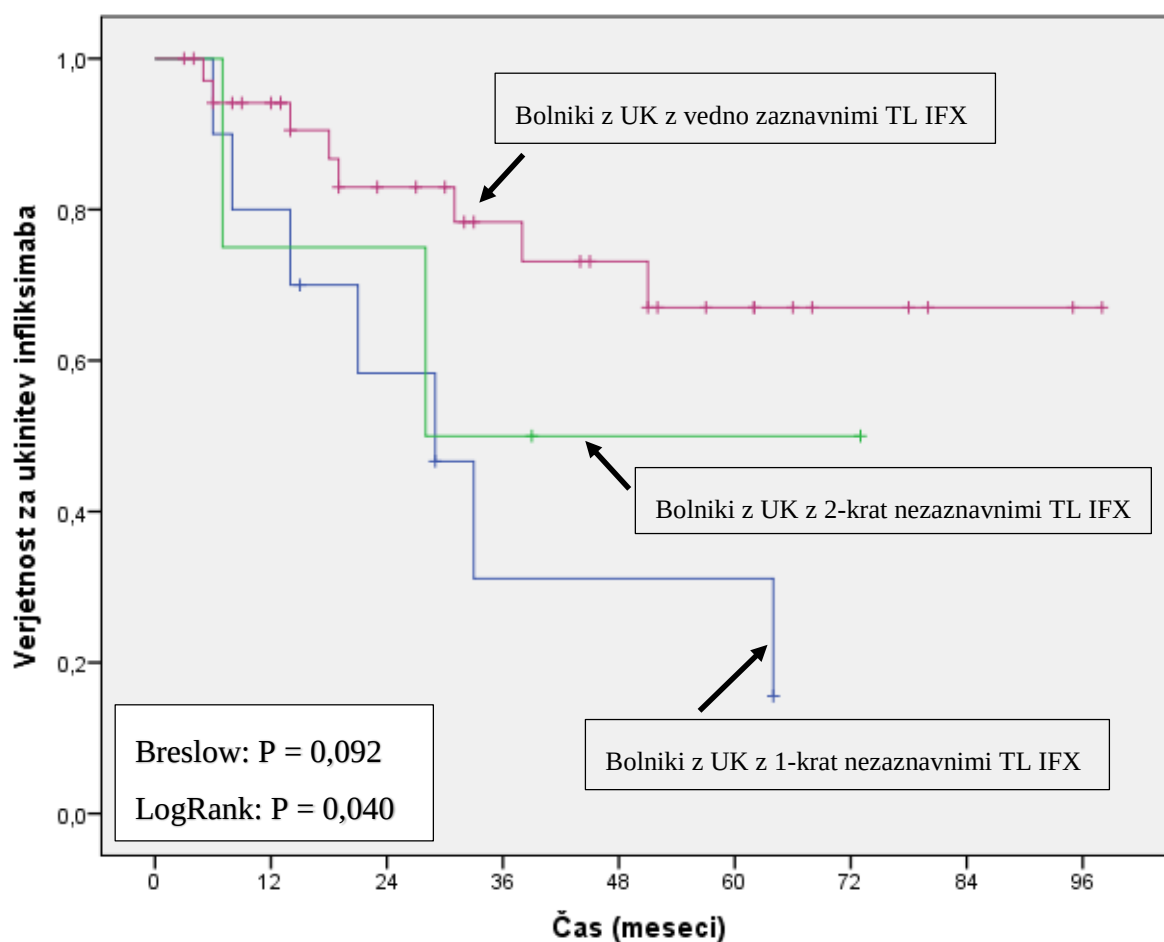
Slika 16: Vpliv vedno zaznavnih, ter enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s CB

4.4.3 Bolniki z ulceroznim kolitisom (UK)

Bolniki z UK z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX so imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (HR, 0,86; 95 % interval zaupanja: 0,75–0,97; P = 0,016), saj so imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX in niso imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX, saj niso imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX (HR, 0,90; 95 % interval zaupanja: 0,72–1,13; P = 0,36). Bolniki z UK z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX niso imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki, ki so imeli dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX, saj niso imeli skozi čas manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX (HR, 0,62; 95 % interval zaupanja: 0,13–2,98; P = 0,55).

Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih z UK z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 74,4 mesecev (95 % interval zaupanja: 60,7–88,2), pri bolnikih z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je znašal v povprečju 33,7 mesecev (95 % interval zaupanja: 17,8–49,6), pri bolnikih z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pa v povprečju 45,3 mesecev (95 % interval zaupanja: 17,1–73,4).

Slika 17 prikazuje bolnike z UK z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave. Modra krivulja prikazuje bolnike z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, zelena krivulja prikazuje bolnike z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, vijolična krivulja pa prikazuje bolnike z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX

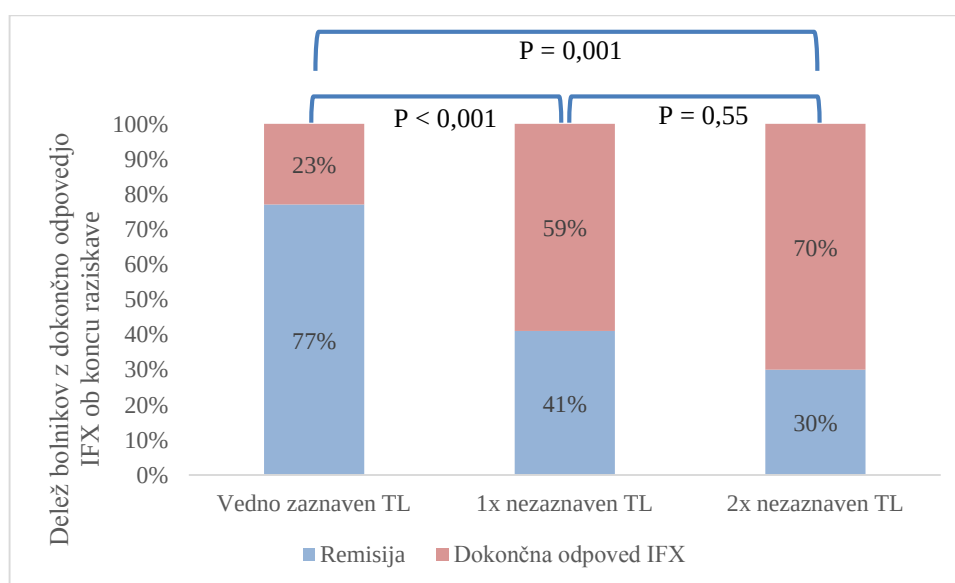


Slika 17: Vpliv vedno zaznavnih, ter enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih z UK

4.5 Dokončna odpoved infliksimaba (IFX) glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX

4.5.1 Bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB)

Slika 18 prikazuje bolnike s KVČB ob koncu raziskave glede na to ali je prišlo do dokončne odpovedi IFX, ali pa so bili bolniki v remisiji, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (16/27, 59 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (24/106, 23 %) ($P < 0,001$). Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX ni bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (7/10, 70 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (16/27, 59 %) ($P = 0,55$). Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (7/10, 70 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (24/106, 23 %) ($P = 0,001$).

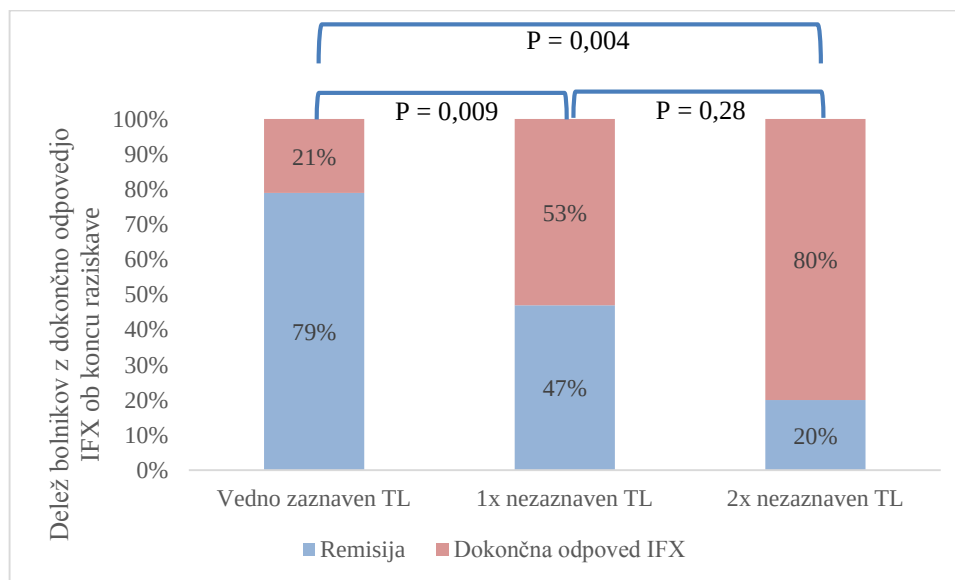


Slika 18: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX, v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s KVČB

4.5.2 Bolniki s Crohnovo boleznijo (CB)

Slika 19 prikazuje bolnike s CB ob koncu raziskave glede na to ali je prišlo do dokončne odpovedi IFX, ali pa so bili bolniki v remisiji, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (9/17, 53 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (14/66, 21 %) ($P = 0,009$). Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX ni bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (4/5, 80 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (9/17, 53 %) ($P = 0,28$).

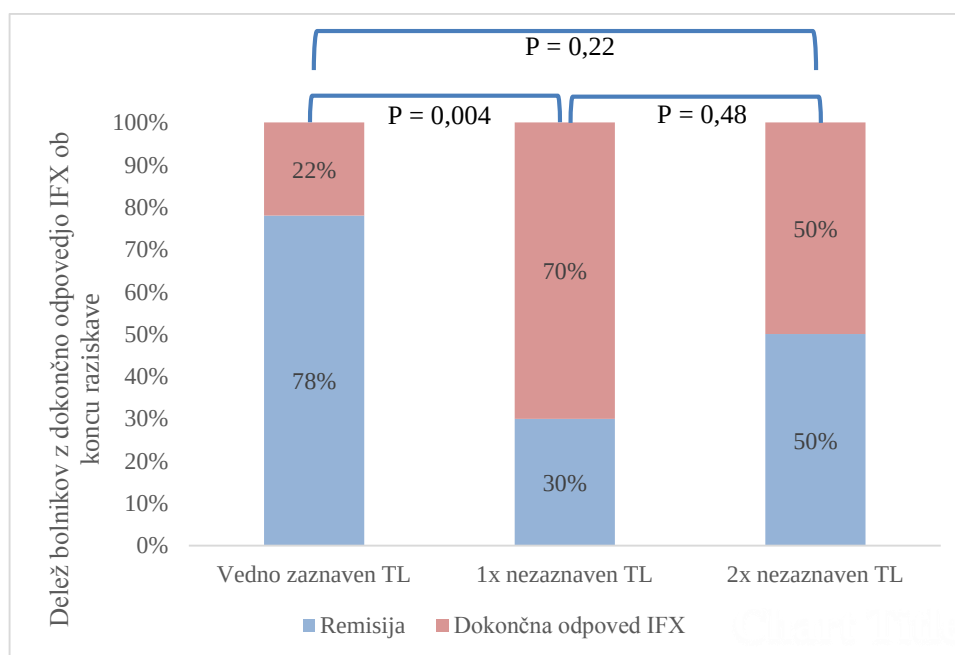
Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (4/5, 80 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (14/66, 21 %) ($P = 0,004$).



Slika 19: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX, v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih s CB

4.5.3 Bolniki z ulceroznim kolitisom (UK)

Slika 20 prikazuje bolnike z UK ob koncu raziskave glede na to ali je prišlo do dokončne odpovedi IFX, ali pa so bili bolniki v remisiji, glede na zaznavnost serumskih koncentracij IFX. Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne serumske koncentracije (7/10, 70 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (8/36, 22 %) ($P = 0,004$). Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX ni bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne serumske koncentracije (2/4, 50 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX (7/10, 70 %) ($P = 0,48$). Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX ni bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem dvakrat nezaznavne serumske koncentracije (2/4, 50 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (8/36, 22 %) ($P = 0,22$).

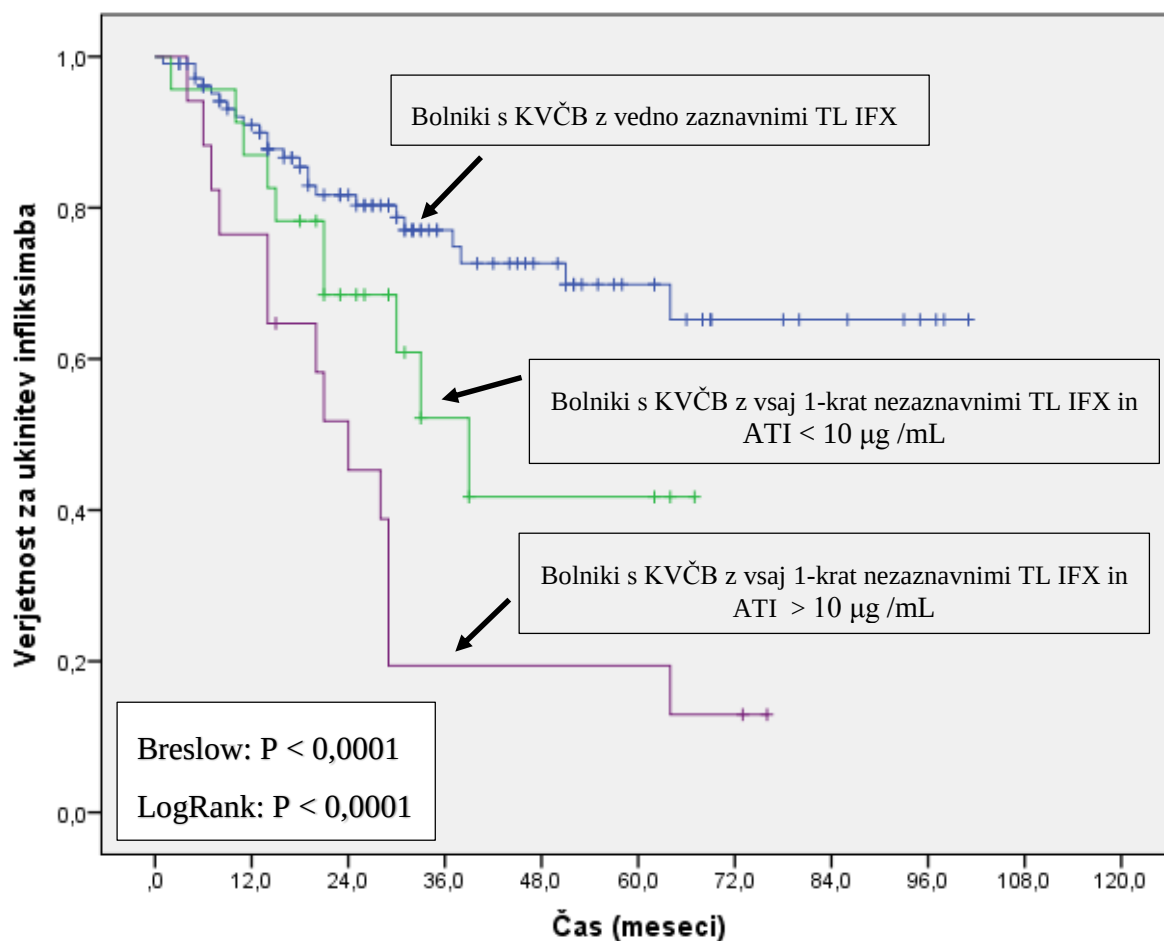


Slika 20: Dokončna odpoved IFX glede na prisotnost enkrat in dvakrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX, v primerjavi z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX pri bolnikih z UK

4.6 Kaplan-Meier analiza dokončne odpovedi infliksimaba (IFX) skozi čas za bolnike s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) glede na prisotnost protiteles proti IFX

Bolniki s KVČB z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ IFX so imeli signifikantno daljši čas do dokončne odpovedi IFX kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$, saj so imeli skozi čas bistveno manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX (HR, 0,45; 95 % interval zaupanja: 0,20–1,01; $P = 0,05$). Izračunani čas do dokončne odpovedi IFX po metodi Kaplan-Meier pri bolnikih s KVČB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX je bil v povprečju 75,4 mesecev (95 % interval zaupanja: 66,6–84,3), pri bolnikih z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ je znašal v povprečju 41,5 mesecev (95 % interval zaupanja: 30,3–52,7), pri bolnikih z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ pa v povprečju 28,7 mesecev (95 % interval zaupanja: 17,5–39,9). Bolniki s KVČB z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ so bili tako v povprečju 1,44-krat dlje časa zdravljeni z IFX kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (Slika 21).

Slika 21 prikazuje bolnike s KVČB z verjetnostjo za dokončno odpoved/ukinitev IFX skozi čas raziskave.

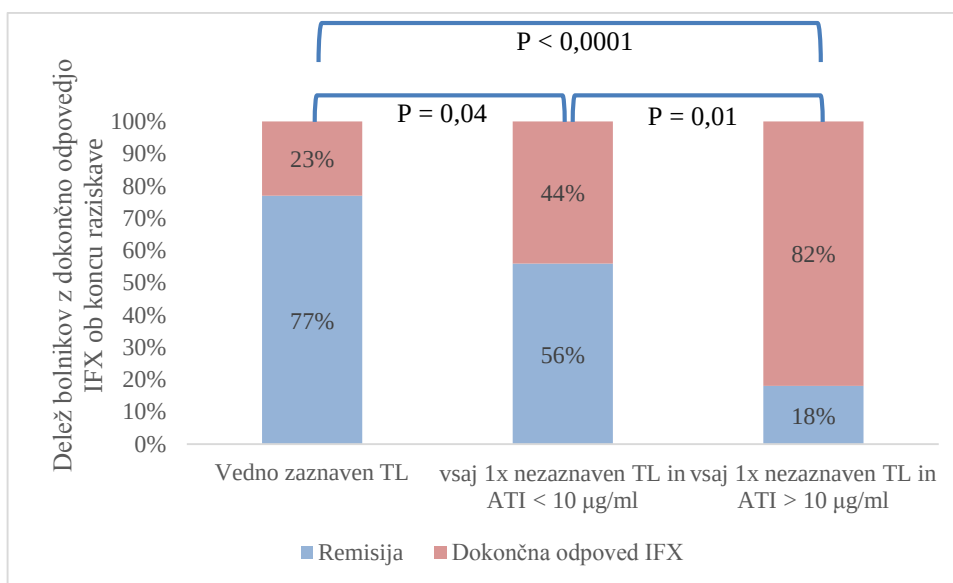


Slika 21: Vpliv vedno zaznavnih, ter vsaj enkrat nezaznavnih serumskih koncentracij IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX na uspešnost zdravljenja z IFX pri bolnikih s KVČB

4.7 Dokončna odpoved infliksimaba (IFX) glede na prisotnost protiteles proti IFX pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB)

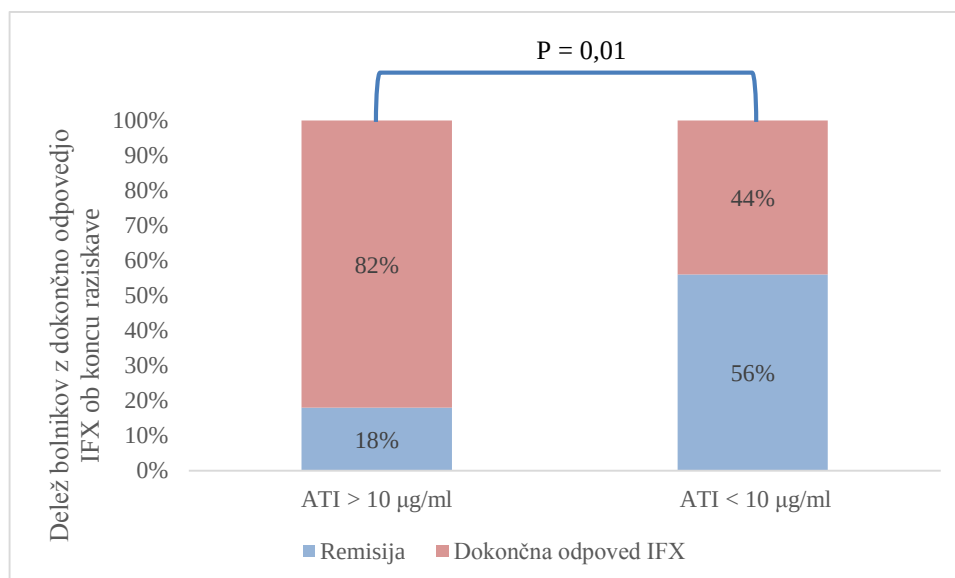
Slika 22a prikazuje bolnike s KVČB ob koncu raziskave glede na to ali je prišlo do dokončne odpovedi IFX, ali pa so bili bolniki v remisiji, glede na prisotnost protiteles proti IFX. Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX in ATI < 10 µg/mL (10/23, 44 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (24/106, 23 %) ($P = 0,04$). Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX in ATI > 10 µg/mL (14/17, 82 %), v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX in ATI < 10 µg/mL (10/23, 44 %) ($P = 0,01$).

Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (14/17, 82 %), v primerjavi z bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vedno zaznavne serumske koncentracije IFX (24/106, 23 %) ($p < 0,0001$).



Slika 22a: Dokončna odpoved IFX glede na bolnike z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ in $> 10 \mu\text{g/mL}$ v primerjavi z bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, pri bolnikih s KVČB

Slika 22b prikazuje 40 bolnikov s KVČB ob koncu raziskave, glede na to ali je prišlo do dokončne odpovedi IFX, ali pa so bili bolniki v remisiji, glede na prisotnost protiteles proti IFX. Od 40 bolnikov je imelo 23 bolnikov $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$, 17 bolnikov pa $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$. Delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX je bil statistično značilno višji med bolniki, ki so imeli med zdravljenjem vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (14/17, 82 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli vsaj enkrat nezaznavne serumske koncentracije IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ (10/23, 44 %) ($P = 0,01$).



Slika 22b: Dokončna odpoved IFX glede na bolnike z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in ATI < 10 µg/mL v primerjavi z bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in ATI > 10 µg/mL, pri bolnikih s KVČB

4.8 Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX po optimizaciji zdravljenja glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo

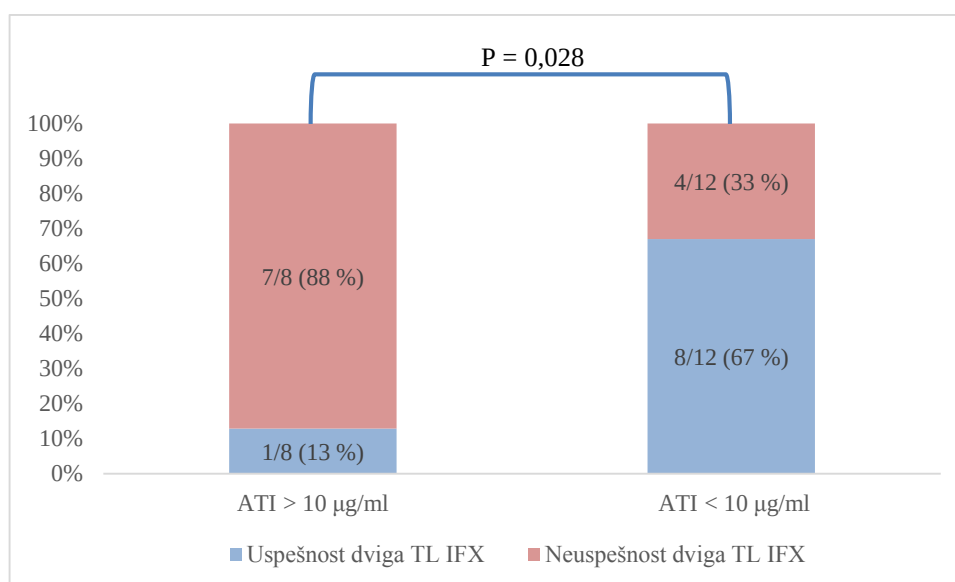
Število bolnikov z ATI < 10 µg/mL je bilo 23, od tega je imelo 16 bolnikov dvignjen odmerek IFX po tem, ko je bil ugotovljena nezaznavna serumska koncentracija IFX. Za 4 od 16 bolnikov ni bilo na voljo kontrolnih koncentracij po optimizaciji odmerka, v analizo smo torej vključili 12 bolnikov z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in ATI < 10 µg/mL. Število bolnikov z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in ATI > 10 µg/mL je bilo 17, od tega je imelo 9 bolnikov dvignjen odmerek IFX. Za enega bolnika nismo imeli na voljo kontrolne serumske koncentracije, v analizo smo torej vključili 8 bolnikov z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in ATI > 10 µg/mL. Skupno smo torej v analizo vključili 12 + 8 = 20 bolnikov, ki so imeli na voljo serumske koncentracije pred in po optimizaciji odmerka IFX.

Preglednica IX prikazuje uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX po optimizaciji odmerka IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo.

Preglednica IX: Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo odmerka IFX

*	ATI > 10 µg/mL	ATI < 10 µg/mL
Uspešnost dviga TL IFX	1/8 (13 %)	8/12 (67 %)
Neuspešnost dviga TL IFX	7/8 (88 %)	4/12 (33 %)

*P = 0,028



Slika 23: Uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo odmerka IFX

5 RAZPRAVA

Rezultati naše raziskave so pokazali, da so bili bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami infliksimaba (IFX) dlje časa uspešno zdravljeni z IFX in so imeli manjše število dokončnih odpovedi IFX kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi koncentracijami. Ugotovili smo, da se torej prognoza bolnikov bistveno poslabša, ko se enkrat pojavijo nezaznavni serumski koncentracijami IFX. V nekaterih primerih se da z optimizacijo odmerka IFX (dvig odmerka ali skrajšanje odmernega intervala) vseeno ponovno doseči dvig serumske koncentracije IFX in s tem uspešen klinični izid za bolnika. Ena pomembnejših ugotovitev naše raziskave je, da je uspešnost optimizacije odmerka IFX odvisna prav od titra protiteles proti IFX (ATI), saj je bila optimizacija neuspešna praktično pri vseh bolnikih z $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$. To je izjemnega pomena za klinično prakso, saj se lahko na osnovi poceni meritve (približno 40 EUR) pravilno odločimo kako obravnavati bolnika, torej bodisi dvig odmerka IFX ali prehod na drugo biološko zdravilo. Ker gre za izjemno draga zdravila je to tudi zelo učinkovito iz ekonomskega stališča, saj lahko en sam odmerek IFX stane tudi do 2000 EUR.

Bolniki s KVČB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX so bili v povprečju 2,0-krat dlje časa uspešno zdravljeni z IFX, kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX. Ločeno smo analizirali tudi bolnike razdeljene na CB in UK. Pri bolnikih s CB ($N = 88$) smo ugotovili enako kot pri analizi vseh bolnikov s KVČB. Med bolniki s CB so imeli bistveno daljši čas do dokončne odpovedi IFX in posledično ob koncu raziskave manjše število dokončnih odpovedi bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, napram tistim z vsaj enkrat nezaznavnimi koncentracijami. Po drugi strani pa znotraj skupine bolnikov z UK ($N = 52$) nismo dokazali razlike v ogroženosti za dokončno odpoved IFX med bolniki z vedno zaznavnimi in tistimi z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX ($P = 0,082$), vendar pa gre za jasen trend k statistični signifikanci zato ocenjujemo, da gre zgolj za pomanjkanje statistične moči zaradi premajhnega vzorca ($N = 52$).

V raziskavi smo želeli tudi ovrednotiti vpliv večkrat (1-krat, 2-krat nezaznavna serumska koncentracija) nezaznavnih serumskih koncentracij IFX na čas trajanja zdravljenja z IFX in na prognozo bolnikov s takšnimi koncentracijami.

Analiza je potekala enako kot pri bolnikih z vedno, napram bolnikom z vsaj enkrat nezaznavnimi koncentracijami IFX. Najprej smo analizirali vse bolnike s KVČB in nato bolnike razdeljene na tiste s CB in UK. Ker smo pri prejšnji analizi dobili različen izid pri bolnikih s CB in UK smo razdelitev ohranili tudi v primeru analize enkrat in dvakrat nezaznavnih koncentracij IFX, saj nas je zanimalo, če bo razlika prisotna tudi v tem primeru. Ugotovili smo naslednje: v primeru analize bolnikov s KVČB z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, napram tistim z enkrat in dvakrat nezaznavnimi koncentracijami, so imeli bolniki z vedno zaznavnimi koncentracijami pričakovano daljši čas do dokončne odpovedi IFX in ob koncu raziskave tudi manjše število bolnikov z dokončno odpovedjo IFX. Vendar pa nismo uspeli dokazati razlike pri analizi med bolniki z enkrat in dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX. Tudi delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX ni bil statistično značilno različen med tema dvema skupinama bolnikov. Pričakovano nismo razlike dokazali niti v primeru, ko smo bolnike s KVČB analizirali razdeljene na CB in UK. To je verjetno posledica neuspešne optimizacije odmerka IFX pri bolnikih z enkrat nezaznavnimi koncentracijami IFX, kar dodatno govori v prid sočasnemu določanju protiteles proti IFX, kadar so serumski koncentracijami IFX nezaznavni.

V naši raziskavi smo velik pomen namenili prisotnosti protiteles proti IFX (ATI). Ker lahko določamo protitelesa samo takrat, ko so vrednosti serumskih koncentracij IFX nezaznavne, smo imeli skupno 40 bolnikov s KVČB z nezaznavnimi koncentracijami pri katerih smo analizirali ATI. Če bi te bolnike razdelili še naprej na CB in UK, bi bilo v obeh skupinah izrazito malo bolnikov in bi bile te skupine premajhne za smiselno statistično analizo, zato smo analizirali bolnike s KVČB brez delitve. Tako smo s Kaplan-meier analizo ugotovili, da so imeli bolniki s KVČB z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ (odsotnost protiteles) IFX daljši čas do dokončne odpovedi IFX, kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (prisotnost protiteles), saj so imeli skozi čas bistveno manjšo ogroženost za dokončno odpoved IFX. Tudi delež bolnikov z dokončno odpovedjo IFX, je bil statistično značilno nižji med bolniki z odsotnostjo protiteles (10/23, 44 %) v primerjavi z bolniki, ki so imeli prisotna protitelesa proti IFX (14/17, 82 %) ($P = 0,01$) (slika 22b). Izrazita je bila razlika v deležu bolnikov z dokončno odpovedjo IFX med bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX (23 %) in bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi

serumskimi koncentracijami in ATI > 10 µg/mL (82 %). Naše ugotovitve so skladne s podobnimi mednarodnimi raziskavami (71,74,75).

V naši raziskavi smo tudi analizirali uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX po optimizaciji zdravljenja (dvig odmerka IFX) glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo. Skupno smo v analizo vključili 20 bolnikov, za katere smo imeli na voljo serumske koncentracije IFX pred in po optimizaciji zdravljenja. Ugotovili smo, da je bila uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX pri bolnikih z ATI > 10 µg/mL samo 13 %, pri bolnikih z ATI < 10 µg/mL pa kar 67 %, na podlagi česar lahko zaključimo, da kadar imajo bolniki prisotna protitelesa v pomembnem titru (> 10 µg/mL), je nesmiselna optimizacija odmerka IFX, saj se ta v večini primerov ne bo odrazila tudi v dvigu serumskih koncentracij IFX. Naša ugotovitev se tako sklada tudi z izsledki študije, kjer je Afif (76) ugotavljal klinično korist merjenja serumskih koncentracij IFX in ATI pri bolnikih s sekundarno odpovedjo IFX. Dokazal je, da večina bolnikov s prisotnimi ATI ni odgovorila na povišanje odmerka IFX, medtem ko so bolniki, ki protiteles niso imeli prisotnih, imeli korist od povišanja odmerka. Zanimiva ugotovitev naše raziskave pa je, da je bil dvig serumske koncentracije IFX tudi v primeru bolnikov z odsotnostjo protiteles proti IFX kar v 33 % primerov neuspešen, saj smo pričakovali nižji odstotek neuspešnosti. To je verjetno posledica naše metode za določanje ATI, saj metoda verjetno ne zazna nižjih koncentracij ATI, ki pa so verjetno vseeno prisotna vsaj pri določenem deležu bolnikov z nezaznavnimi koncentracijami IFX.

Rezultati naše raziskave podpirajo uvedbo določanja serumskih koncentracij IFX in ATI, tako iz stališča klinične, kot tudi stroškovne učinkovitosti. Takoj, ko se pojavijo nezaznavni serumski koncentracijami IFX, se možnost, da bo pri bolniku prišlo do dokočne odpovedi IFX podvoji. Bistvo je, da se bolnikom z nezaznavnimi koncentracijami IFX določijo še ATI, saj lahko na ta način izberemo bolnike pri katerih bo dvig odmerka IFX uspešen in bo vodil v ponovno remisijo bolezni.

6 SKLEP

Na podlagi naše raziskave smo ugotovili:

1. Bolniki z vedno zaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX, so bili dlje časa uspešno zdravljeni z IFX in so imeli manjše število dokončnih odpovedi IFX, kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX. Hipotezo 1 smo tako potrdili.
2. Pri analizi bolnikov z večkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX (1-krat, 2-krat nezaznavna serumska koncentracija) ne moremo potrditi hipoteze 2, saj nismo uspeli dokazati, da so imeli bolniki z dvakrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX večjo ogroženost za dokončno odpoved IFX in da so imeli večje število dokončnih odpovedi IFX, v primerjavi z bolniki z enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX.
3. Prisotnost protiteles proti IFX (ATI) ima ključno vlogo pri uspešnosti zdravljenja bolnikov s KVČB. Ugotovili smo, da so imeli bolniki s KVČB z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (prisotnost ATI) skozi čas bistveno večjo ogroženost za dokončno odpoved IFX in večje število dokončnih odpovedi IFX (82 %), kot bolniki z vsaj enkrat nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ (odsotnost ATI) (44 %). Hipotezo 3 smo tako potrdili.
4. V raziskavi smo analizirali uspešnost dviga serumskih koncentracij IFX po optimizaciji zdravljenja (dvig odmerka IFX), glede na prisotnost protiteles proti IFX pred optimizacijo. Ugotovili smo, da so imeli bolniki z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI < 10 \mu\text{g/mL}$ po optimizaciji odmerka IFX večjo (67 %) uspešnost dviga TL IFX, v primerjavi z bolniki z nezaznavnimi serumskimi koncentracijami IFX in $ATI > 10 \mu\text{g/mL}$ (13 %). Hipotezo 4 smo tako potrdili.

Naše ugotovitve imajo velik klinični pomen, saj smo ugotovili, da pojav nezaznavnih serumskih koncentracij infliksimaba poveča možnost dokončne odpovedi infliksimaba, še posebej kadar so prisotna protitelesa proti infliksimabu v visokem titru.

7 LITERATURA

1. Smrekar Nataša. kronična vnetna črevesna bolezen, ulcerozni kolitis, Crohnova bolezen. Med Razgl 2010 49 511–6.
2. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med. 2002 Aug 8;347(6):417–29.
3. Gastroenterolog; letnik 18, suplement 1, december 2014 / Volume 18, Supplement 1, December 2014. Rev Slov Združ Za Gastroenterol Hepatol.
4. Hulya over Hamzaoglu SY. YAPALI, S., HAMZAOGLU, H.. Anti-TNF Treatment in Inflammatory Bowel Disease. Annals of Gastroenterology, North America, 20, apr. 2007. Available at: <<http://www.annalsgastro.gr/index.php/annalsgastro/article/view/553>>. (Dostopano do 22. 1. 2016.). Ann Gastroenterol. 2007;
5. Basso PJ, Fonseca MTC, Bonfá G, Alves VBF, Sales-Campos H, Nardini V, et al. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al. 2014 Sep;47(9):727–37.
6. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. Gastroenterology. 1996 Sep;111(3):597–603.
7. Dorn SD, Abad JF, Panagopoulos G, Korelitz BI. Clinical characteristics of familial versus sporadic Crohn's disease using the Vienna Classification. Inflamm Bowel Dis. 2004 May;10(3):201–6.
8. Brant SR, Wang M-H, Rawsthorne P, Sargent M, Datta LW, Nouvet F, et al. A population-based case-control study of CARD15 and other risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis. Am J Gastroenterol. 2007 Feb;102(2):313–23.
9. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, et al. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. Nat Genet. 2008 Jun;40(6):710–2.
10. Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Hedderich J, May S, Lu T, et al. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. Nat Genet. 2008 Jun;40(6):713–5.
11. Cho JH, Brant SR. Recent insights into the genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2011 May;140(6):1704–12.
12. Koloski N-A, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. World J Gastroenterol. 2008 Jan 14;14(2):165–73.

13. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004 May;126(6):1504–17.
14. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, et al. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2007 Dec;5(12):1424–9.
15. Solberg IC, Vatn MH, Høie O, Stray N, Sauar J, Jahnsen J, et al. Clinical course in Crohn's disease: results of a Norwegian population-based ten-year follow-up study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2007 Dec;5(12):1430–8.
16. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet Lond Engl*. 2007 May 12;369(9573):1627–40.
17. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*. 2006 Jul;3(7):390–407.
18. How To Tell The Difference Between The Two Major Forms Of IBD By Amber J. Tresca Inflammatory Bowel Disease (IBD) Expert; <http://medprecautions.com/the-differences-between-ulcerative-colitis-and-crohns-disease/> (Dostopano do 9.3.2016).
19. <http://emedicine.medscape.com/article/179037-overview#a3> (dostopano do 1.3.2016).
20. Solberg IC, Lygren I, Jahnsen J, Aadland E, Høie O, Cvancarova M, et al. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(4):431–40.
21. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol J Can Gastroenterol*. 2005 Sep;19 Suppl A:5A–36A.
22. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006 Jun;55(6):749–53.
23. Loly C, Belaiche J, Louis E. Predictors of severe Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2008 Aug;43(8):948–54.
24. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology*. 1975 Apr;68(4 Pt 1):627–35.
25. Annunziata ML, Caviglia R, Papparella LG, Cicala M. Upper gastrointestinal involvement of Crohn's disease: a prospective study on the role of upper endoscopy in the diagnostic work-up. *Dig Dis Sci*. 2012 Jun;57(6):1618–23.

26. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis*. 2010 Feb;4(1):28–62.
27. Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2013 Aug 22;369(8):754–62.
28. Kaiser GC, Yan F, Polk DB. Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and nuclear factor kappaB activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology*. 1999 Mar;116(3):602–9.
29. Loftus EV, Kane SV, Bjorkman D. Systematic review: short-term adverse effects of 5-aminosalicylic acid agents in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Jan 15;19(2):179–89.
30. Tromm A, Bunganič I, Tomsova E, Tulassay Z, Lukáš M, Kykal J, et al. Budesonide 9 mg is at least as effective as mesalamine 4.5 g in patients with mildly to moderately active Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2011 Feb;140(2):425–434.
31. Hanauer SB, Present DH. The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord*. 2003;3(2):81–92.
32. Singleton JW, Law DH, Kelley ML, Mekhjian HS, Sturdevant RA. National Cooperative Crohn's Disease Study: adverse reactions to study drugs. *Gastroenterology*. 1979 Oct;77(4 Pt 2):870–82.
33. Brignola C, De Simone G, Belloli C, Iannone P, Belluzzi A, Gionchetti P, et al. Steroid treatment in active Crohn's disease: a comparison between two regimens of different duration. *Aliment Pharmacol Ther*. 1994 Aug;8(4):465–8.
34. Sandborn WJ, Hanauer S, Van Assche G, Panés J, Wilson S, Petersson J, et al. Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohns Colitis*. 2014 Sep;8(9):927–35.
35. Modigliani R, Mary JY, Simon JF, Cortot A, Soule JC, Gendre JP, et al. Clinical, biological, and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology*. 1990 Apr;98(4):811–8.
36. Ardizzone S, Maconi G, Russo A, Imbesi V, Colombo E, Bianchi Porro G. Randomised controlled trial of azathioprine and 5-aminosalicylic acid for treatment of steroid dependent ulcerative colitis. *Gut*. 2006 Jan;55(1):47–53.
37. Thomas CW, Myhre GM, Tschumper R, Sreekumar R, Jelinek D, McKean DJ, et al. Selective inhibition of inflammatory gene expression in activated T lymphocytes: a mechanism of immune suppression by thiopurines. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Feb;312(2):537–45.
38. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2000;(2):CD000545.

39. Role and Place of Methotrexate in Vasculitis Management: Mechanisms of Action, Metabolism and Pharmacology of Methotrexate (dostopano do 3.3.2016) http://www.medscape.org/viewarticle/712891_2.
40. Suares NC, Hamlin PJ, Greer DP, Warren L, Clark T, Ford AC. Efficacy and tolerability of methotrexate therapy for refractory Crohn's disease: a large single-centre experience. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012 Jan;35(2):284–91.
41. Oren R, Arber N, Odes S, Moshkowitz M, Keter D, Pomeranz I, et al. Methotrexate in chronic active ulcerative colitis: a double-blind, randomized, Israeli multicenter trial. *Gastroenterology*. 1996 May;110(5):1416–21.
42. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis*. 2008 Oct;8(10):601–11.
43. Ordás I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Apr;91(4):635–46.
44. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med*. 1997 Oct 9;337(15):1029–35.
45. MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 1998 Feb;4(1):54–67.
46. Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 1993 Dec;34(12):1705–9.
47. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther*. 2008 Feb;117(2):244–79.
48. Sandborn WJ, Hanauer SB. Antitumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease: a review of agents, pharmacology, clinical results, and safety. *Inflamm Bowel Dis*. 1999 May;5(2):119–33.
49. Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1756–67.
50. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 2012 Jan 19;119(3):651–65.
51. Vaughn BP, Martinez-Vazquez M, Patwardhan VR, Moss AC, Sandborn WJ, Cheifetz AS. Proactive therapeutic concentration monitoring of infliximab may improve outcomes for patients with inflammatory bowel disease: results from a pilot observational study. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Nov;20(11):1996–2003.

52. Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med*. 2005 Dec 8;353(23):2462–76.
53. Seow CH, Newman A, Irwin SP, Steinhart AH, Silverberg MS, Greenberg GR. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut*. 2010 Jan;59(1):49–54.
54. Moss AC, Brinks V, Carpenter JF. Review article: immunogenicity of anti-TNF biologics in IBD - the role of patient, product and prescriber factors. *Aliment Pharmacol Ther*. 2013 Nov;38(10):1188–97.
55. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2002 May 4;359(9317):1541–9.
56. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: definitions, frequency and pharmacological aspects. *J Crohns Colitis*. 2010 Oct;4(4):355–66.
57. JESENOVČEVI dnevi (7 ; 2015 ; Ljubljana) Raziskovalni dnevi laboratorijske biomedicine : zbornik predavanj / 7. Jesenovčevi dnevi, 30. september 2015, Ljubljana ; [organizator srečanja Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana in Katedra za klinično biokemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani ; urednika Milan Skitek in Darko Černe]. - Ljubljana : Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center, 2015.
58. Ferrante M, Vermeire S, Fidder H, Schnitzler F, Noman M, Van Assche G, et al. Long-term outcome after infliximab for refractory ulcerative colitis. *J Crohns Colitis*. 2008 Sep;2(3):219–25.
59. Maser EA, Vilella R, Silverberg MS, Greenberg GR. Association of trough serum infliximab to clinical outcome after scheduled maintenance treatment for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2006 Oct;4(10):1248–54.
60. Dotan I, Ron Y, Yanai H, Becker S, Fishman S, Yahav L, et al. Patient factors that increase infliximab clearance and shorten half-life in inflammatory bowel disease: a population pharmacokinetic study. *Inflamm Bowel Dis*. 2014 Dec;20(12):2247–59.
61. Brandse JF, van den Brink GR, Wildenberg ME, van der Kleij D, Rispens T, Jansen JM, et al. Loss of Infliximab Into Feces Is Associated With Lack of Response to Therapy in Patients With Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):350–355.e2.
62. Rosenberg AS. Immunogenicity of biological therapeutics: a hierarchy of concerns. *Dev Biol*. 2003;112:15–21.

63. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP. Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 May;35(9):971–86.
64. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Blank M, Zhou H, Davis HM. Pharmacokinetic properties of infliximab in children and adults with Crohn's disease: a retrospective analysis of data from 2 phase III clinical trials. *Clin Ther.* 2011 Jul;33(7):946–64.
65. Immunogenicity of therapeutic antibodies Clinical Significance Gertjan Wolbink Rheumatologist Jan van Breemen Instituut Sanquin research Amsterdam; http://www.e-i-p.eu/wp-content/uploads/2013/01/Wolbink_EIP_Leiden_2009.pdf; (Dostopano do 10.3.2016).
66. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Wolbink GJ, de Vries N, Tak PP, et al. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum.* 2009 Aug;60(8):2541–2.
67. Jiskoot W, Randolph TW, Volkin DB, Middaugh CR, Schöneich C, Winter G, et al. Protein instability and immunogenicity: roadblocks to clinical application of injectable protein delivery systems for sustained release. *J Pharm Sci.* 2012 Mar;101(3):946–54.
68. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, Mayer L, Travers S, Diamond RH, et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2004 Jul;2(7):542–53.
69. Pallagi-Kunstár É, Farkas K, Szepes Z, Nagy F, Szűcs M, Kui R, et al. Utility of serum TNF- α , infliximab trough level, and antibody titers in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2014 May 7;20(17):5031–5.
70. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2004 Feb 26;350(9):876–85.
71. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2013 Jan;108(1):40–47; quiz 48.
72. Vaughn BP, Sandborn WJ, Cheifetz AS. Biologic concentration testing in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015 Jun;21(6):1435–42.
73. Vande Casteele N, Buurman DJ, Sturkenboom MGG, Kleibeuker JH, Vermeire S, Rispens T, et al. Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012 Oct;36(8):765–71.
74. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2003 Feb 13;348(7):601–8.

75. Farrell RJ, Alsahli M, Jeen Y-T, Falchuk KR, Peppercorn MA, Michetti P. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2003 Apr;124(4):917–24.
76. Afif W, Loftus EV, Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2010 May;105(5):1133–9.