

Povezanost polimorfizama gena za TNF- α s učinkovitošću terapije antagonistima TNF- α infliksimabom i adalimumabom i brzinom razvoja protutijela na te lijekove

Miler, Marijana

Doctoral thesis / Disertacija

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:600855>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Marijana Miler

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA
TNF- α S UČINKOVITOŠĆU TERAPIJE
ANTAGONISTIMA TNF- α INFLIKSIMABOM I
ADALIMUMABOM I BRZINOM RAZVOJA
PROTUTIJELA NA TE LIJEKOVE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marijana Miler

**ASSOCIATION BETWEEN *TNF- α* GENE
POLYMORPHISMS AND EFFICIENCY OF
THERAPY WITH THE *TNF- α* ANTAGONISTS
INFLIXIMAB AND ADALIMUMAB AND
DEVELOPMENT OF ANTIBODIES TO
THOSE DRUGS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Marijana Miler

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA
TNF- α S UČINKOVITOŠĆU TERAPIJE
ANTAGONISTIMA TNF- α INFLIKSIMABOM I
ADALIMUMABOM I BRZINOM RAZVOJA
PROTUTIJELA NA TE LIJEKOVE**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

Doc. dr. sc. Nora Nikolac Gabaj

Izv. prof. dr. sc. Nada Vrkić

Zagreb, 2022.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Marijana Miler

**ASSOCIATION BETWEEN *TNF- α* GENE
POLYMORPHISMS AND EFFICIENCY OF
THERAPY WITH THE *TNF- α* ANTAGONISTS
INFLIXIMAB AND ADALIMUMAB AND
DEVELOPMENT OF ANTIBODIES TO
THOSE DRUGS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Assist Prof Nora Nikolac Gabaj, PhD

Associate Prof Nada Vrkić, PhD

Zagreb, 2022

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskoga stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen na Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mojim mentoricama, prije svega izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić koja je uvijek bila uz mene i na više razina pomogla da se ovaj rad privede kraju. Posebno zahvaljujem prijateljici i mentorici doc. dr. sc. Nori Nikolac Gabaj koja mi je neizmjereno puno pomogla u znanstvenom dijelu, poticala kad je trebalo i tjerala dalje kad sam zapela na putu.

Hvala svim kolegama i kolegicama iz Kliničkog zavoda za kemiju na podršci i pomoći prilikom izrade rada. Hvala i kolegama i kolegicama iz Klinike za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju, Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju KBC Sestre milosrdnice te Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku i Zavoda za kliničku imunologiju i reumatologiju Kliničke bolnice Dubrava na pomoći prilikom uključivanja ispitanika.

Hvala mojim prijateljima na svim veselim trenucima.

Najviše zahvaljujem mojim dečkima, sinu Luki i mužu Mariju koji su moja istinska sreća i veselje te su sa mnom i uz mene sve ove godine.

Mrs. Wolowitz

SAŽETAK

Antagonisti faktora nekroze tumora α (engl. *Tumor necrosis factor*, TNF- α) učinkoviti su u liječenju autoimunih reumatoidnih i upalnih bolesti crijeva, ali se čak u 30 % bolesnika ne postiže remisija bolesti. Cilj istraživanja bio je ispitati postoji li razlika u kliničkom i biokemijskom odgovoru na terapiju anti-TNF- α protutijelima ovisno o polimorfizmima gena *TNF- α* na položajima -238 G/A (rs361525) i -308 G/A (rs1800629).

U istraživanje je bilo uključeno 112 bolesnika od čega 66 s upalnim bolestima crijeva te 46 bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima. Na terapiji infliksimabom (IFX) bilo je ukupno je 73 bolesnika, a 39 na terapiji adalimumabom (ADM). Bolesnici su praćeni 6 do 12 mjeseci od početka biološke terapije. Svim je bolesnicima određena koncentracija C reaktivnog proteina (CRP), lijekova IFX i ADM i protutijela na te lijekove kao i genotip polimorfizama rs361525 i rs1800629 gena *TNF- α* . Bolesnicima s upalnim bolestima crijeva određena je i koncentracija fekalnog kalprotektina (fKal), dok je onima s autoimunim reumatoidnim bolestima klinički odgovor praćen ocjenama aktivnosti reumatoidnih bolesti.

Ni koncentracije IFX i ADM kao ni pojavnost i koncentracije protutijela na studirane lijekove nisu se razlikovale ovisno o genotipovima polimorfizama rs361525 i rs1800629 gena *TNF- α* . Koncentracija CRP nakon 12 mjeseci terapije bila je viša u bolesnika s genotipom GG nego u onih s genotipom GA na položaju -238 gena *TNF- α* , dok nije bilo razlike u koncentraciji CRP kod različitih genotipova na položaju -308 gena *TNF- α* . Koncentracija fKal nije se razlikovala ovisno o genotipu polimorfizama rs361525 i rs1800629 gena *TNF- α* . Remisija je postignuta kod 63 % bolesnika, neovisno o genotipu studiranih polimorfizama. Bolesnici s autoimunim reumatoidnim bolestima genotipa GG u oba ispitivana polimorfizma (rs361525 i rs1800629) imali su statistički značajno bolji odgovor na terapiju u odnosu na bolesnike s genotipom GA ili AA. Univarijatnom regresijskom analizom pokazano je da je postizanje terapijske koncentracije IFX i ADM izglednije kod muškaraca, a pojava protutijela na lijekove manje izgledna. U bolesnika s RA izglednija je pojava protutijela na lijekove, a manje izgledno je postizanje terapijske koncentracije lijekova, dok kod ostalih bolesti univarijatnom regresijskom analizom nisu dobiveni statistički značajni omjeri izgleda. Remisiju bolesti može predvidjeti koncentracija CRP 6 i 12 mjeseci nakon terapije, dok se klinički odgovor na terapiju ne može predvidjeti ne temelju genotipa studiranih polimorfizama.

Ključne riječi: adalimumab, infliksimab, polimorfizmi gena *TNF- α* , protutijela na adalimumab i infliksimab, autoimune reumatoidne bolesti, upalne bolesti crijeva, C reaktivni protein, fekalni kalprotektin

SUMMARY

Background: Autoimmune diseases are a subset of inflammatory diseases characterized by altered activity of the immune system. Autoimmune diseases can be organ-specific and systemic and are characterized by impaired regulation of the immune system that leads to inflammation and damage of multiple organs. The most common systemic autoimmune diseases are rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) and others.

Inflammatory bowel diseases (IBD) (CD, UC) and autoimmune rheumatoid diseases (ARD) (RA, psoriatic arthritis (PsA), ankylosing spondylitis (AS)) are the results of an interplay of environmental and endogenous factors. These diseases have a high prevalence and incidence, especially in recent years.

Therapy of IBD and autoimmune rheumatoid diseases is long-term, whereas biological drugs, *i.e.*, specific antibodies are recommended as the final step in the treatment. Biological drugs used in ARD and IBD therapy inhibit the effects of inflammatory cytokines that trigger those diseases, such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL) interferon γ (IFN). Due to the high production of tumor necrosis factor α (TNF- α) in the IBD and ARD, the biological drugs that are mostly used are antibodies against TNF- α , especially infliximab (IFX) and adalimumab (ADM).

Despite the overall effectiveness of anti-TNF- α antibodies, almost 30 % of patients do not achieve remission due to primary or secondary failure of therapy.

We hypothesized that clinical and biochemical response to the therapy with anti-TNF- α antibodies depend on the genotype of the positions -238 and -308 in the promoter region of the *TNF- α* gene.

The aim of the study was to examine the association of genotypes of -238 G/A (rs361525) and -308 G/A (rs1800629) polymorphisms in the *TNF- α* gene with the clinical (clinical scores for RA, PsA, and AS and the achievement of remission) and biochemical response (concentration of IFX, ADM, antibodies to IFX and ADM, C reactive protein (CRP), fecal calprotectin (fCal)) to the therapy. In addition, we aimed to examine whether the determination of these polymorphisms before the introduction of therapy can contribute to the prediction of therapy's effectiveness.

Patients and methods: This study included 112 patients, 66 patients with inflammatory bowel disease (CD, UC) and 46 patients with autoimmune rheumatoid diseases (RA, PsA, AS). A total of 73 patients were on IFX therapy and 39 on ADM therapy. Patients were followed for 6 or 12 months from the beginning of the therapy with IFX or ADM.

The concentration of CRP was determined in serum with the immunoturbidimetric method on analyzer Architect c8000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) at the beginning of the therapy and after 6 and 12 months. The concentration of the IFX, ADM and antibodies to these drugs were determined with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) according to the manufacturer's declarations (Ridascreen, R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). In extracted feces of patients with IBD, the concentration of fCal was determined with particle enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) on Architect c8000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) (BÜHLMANN fCAL® turbo (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Swiss).

In patients with autoimmune rheumatoid diseases, the clinical response was followed by rheumatoid scores: disease activity score 28 (DAS28), Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and visual analog scale (VAS). Biochemical parameters were measured repeatedly after at least 6 months.

Genotyping of polymorphisms -238 G/A and -308 G/A of the *TNF- α* gene was performed for all patients with real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) on LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's declarations (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany).

Categorical data are presented as numbers (N) and ratios. The D'Agostino-Pearson test was used to determine the normality of the qualitative data distribution. Qualitative data are presented with medians and interquartile ranges. The age of the subjects was shown with median and range (minimum to maximum).

The χ^2 test was used for comparison of categorical data and calculation of Hardy-Weinberg equilibrium while Fisher's exact test was used for small groups (<5).

The differences for quantitative data were examined by non-parametric tests: the Mann-Whitney test for the difference between the two groups and the Kruskal-Wallis test between three or more groups examined. The Wilcoxon paired test and Friedman test were used to compare repeated measurements (for 2 and 3 groups, respectively).

Regression analysis was performed in two steps: univariate regression and multivariate regression with statistically significant predictors.

P value <0.05 was considered significant for all tests.

Statistical analysis was performed in the statistical program MedCalc v11.5.1.0 (Mariakerke, Belgium).

Results: This study included 54 % females. The median age of all participants was 39 (18-78), whereas patients with the autoimmune rheumatoid disease were significantly older than IBD patients (55 (20-78) vs. 31 (18-63), respectively with $P < 0.001$). The remission was achieved in 63 % of patients, without statistically significant differences between IBD and autoimmune rheumatoid disease or according to the used drug. Concentrations of IFX and ADM after at least 6 months of therapy did not differ depending on genotypes *TNF- α* gene polymorphisms -238 G/A and -308 G/A. The incidence of antibody development, as well as the concentration of anti-drug antibodies, did not differ depending on tested polymorphisms.

After 12 months of therapy, CRP concentration was higher in patients with GG than in patients with GA genotype in the -238 position of the *TNF- α* gene (3.3 (1.2-9.6) vs. 0.7 (0.6-2.1), respectively; $P = 0.027$). CRP concentration significantly decreased after 6 and 12 months only in patients with GG genotypes in both positions, -238 and -308 in the *TNF- α* gene (P values <0.001 for both GG genotypes). fCal concentration did not differ depending on the studied polymorphisms.

Remission was achieved in 63 % of patients, with no difference depending on the genotypes. Patients with autoimmune rheumatoid diseases carrying the GG genotypes in both positions, -238 and -308, had a significantly better response to the therapy according to clinical scores (DAS28, BASDAI, and VAS) compared to patients with GA or AA genotypes. The univariate logistic regression analysis has shown that males are more likely to achieve therapeutic levels of IFX and ADM and less likely to develop antibodies to drugs, while the diagnosis of rheumatoid arthritis has the opposite effect. The studied polymorphisms were not factors that can predict the clinical response to the therapy.

Conclusions: The difference in biochemical response to the anti-TNF- α antibody therapy, remission, or antibody development to the drugs in patients with inflammatory bowel disease and autoimmune rheumatoid diseases depending on the genotypes of -238 and -308 positions in the *TNF- α* gene promoter region was not found. In patients with autoimmune rheumatoid

diseases, a better clinical response to therapy was found, followed by clinical scores (DAS28, BASDAI and VAS) in patients with GG genotypes in both positions -238 and -308 in the *TNF- α* gene, while in carriers of polymorphic alleles no improvement was observed.

Genotyping of polymorphisms -238 G/A and -308 G/A in the *TNF- α* gene before the introduction of IFX and ADM therapy does not contribute to the prediction of clinical outcomes monitored by blood concentration of drugs and antibodies to the drugs, or clinical remission of inflammatory bowel disease or autoimmune rheumatoid disease.

Keywords: adalimumab, infliximab, polymorphisms in *TNF- α* gene, antibodies to adalimumab and infliximab, autoimmune rheumatoid diseases, inflammatory bowel disease, C reactive protein, fecal calprotectin.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
1.1	Autoimune bolesti i imunološki posredovane upalne bolesti	1
1.1.1	Incidencija i prevalencija autoimunih bolesti	3
1.1.2	Genetička osnova autoimunih bolesti	5
1.1.3	Uloga vitamina D u autoimunim bolestima	8
1.1.4	Upalne bolesti crijeva	9
1.1.5	Autoimune reumatoidne bolesti	11
1.2	Liječenje autoimunih i imunosno posredovanih upalnih bolesti	13
1.2.1	Biološki lijekovi	16
1.2.2	Faktor nekroze tumora (TNF- α)	16
1.2.3	Polimorfizmi gena <i>TNF-α</i>	18
1.2.4	Antagonisti TNF- α	20
1.2.5	Način primjene, doziranje, farmakokinetika i indikacije antagonista TNF- α	22
1.2.6	Imunogeničnost antagonista TNF- α	24
2	HIPOTEZA I CILJEVI	26
2.1	Hipoteza	26
2.2	Ciljevi	27
3	MATERIJALI I METODE	28
3.1	Ustroj istraživanja	28
3.2	Ispitanici	28
3.3	Klinički pokazatelji za procjenu aktivnosti bolesti i remisije	30
3.3.1	Procjena aktivnosti bolesti u bolesnika autoimunim reumatoidnim bolestima	30
3.3.1.1	Ocjena aktivnosti bolesti na 28 zglobova	30
3.3.1.2	Indeks aktivnosti ankilozantnog spondilitisa	31
3.3.1.3	Funkcionalni indeks za ankilozantni spondilitis	31
3.3.1.4	Procjena aktivnosti bolesti vizualnom analognom skalom (VAS)	31
3.3.2	Procjena aktivnosti bolesti u bolesnika upalnim bolestima crijeva	31
3.4	Uzorci	32
3.4.1	Uzorci krvi	32
3.4.2	Uzorci stolice	32
3.5	Određivanje koncentracije biokemijskih parametara	34
3.5.1	C-reaktivni protein (CRP)	34
3.5.2	Fekalni kalprotektin (fKal)	34
3.5.3	Vitamin D	34
3.5.4	Koncentracija bioloških lijekova i protutijela na lijekove	35
3.5.4.1	Određivanje koncentracije lijeka (infliksimaba i adalimumaba) – „sandwich“ ELISA	35
3.5.4.2	Određivanje koncentracije protutijela na infliksimab i adalimumab	37
3.6	Izolacija DNA	38
3.7	Genotipizacija	39
3.8	Statistička analiza	43
4	REZULTATI	45
4.1	Demografski podaci ispitanika	45

4.2	Koncentracije biokemijskih parametara	47
4.2.1	Koncentracije C reaktivnog proteina, lijekova infliksimab i adalimumab te protutijela na te lijekove u svih bolesnika, podijeljeno prema vrsti bolesti.....	47
4.2.2	Koncentracije fekalnog kalprotektina u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.....	50
4.2.3	Koncentracije vitamina D u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima	51
4.2.4	Koncentracije lijekova i protutijela na lijekove prema postignutoj remisiji bolesti	51
4.2.5	Koncentracije biokemijskih parametara u bolesnika koji su razvili protutijela na IFX ili ADM tijekom terapije	53
4.3	Povezanost genotipa polimorfizama -238 G/A i -308 G/A gena <i>TNF-α</i> s biokemijskim parametrima	56
4.3.1	Distribucija genotipova polimorfizama -238 G/A i -308 G/A gena <i>TNF-α</i>	56
4.3.2	Povezanost koncentracije lijeka (IFX i ADM) u krvi i genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A	57
4.3.3	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s pojavom protutijela na infliksimab i adalimumab	59
4.3.4	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom protutijela na lijek (anti-IFX i anti-ADM) u krvi	61
4.3.5	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom C-reaktivnog proteina u serumu	63
4.3.6	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom fekalnog kalprotektina	67
4.3.7	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom vitamina D u serumu	68
4.4	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s kliničkim odgovorom na terapiju	71
4.4.1	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s remisijom bolesti	71
4.4.2	Povezanost genotipa polimorfizama <i>TNF-α</i> -238 G/A i -308 G/A s kliničkim odgovorom na terapiju u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima.....	72
4.5	Multivarijatna regresijska analiza	76
4.5.1	Regresijski modeli za predviđanje kliničkih ishoda	76
5	RASPRAVA	81
6	ZAKLJUČCI.....	95
7	POPIS LITERATURE	96
8	POPIS KRATICA.....	112
9	ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA.....	115

1 UVOD

1.1 Autoimune bolesti i imunološki posredovane upalne bolesti

Autoimunost je mehanizam koji se javlja kada organizam razvija specifični imunosni odgovor naspram vlastitog. Autoimune bolesti nastaju kao patološki upalni odgovor organizma uzrokovan pretjeranom ili neprimjerenom aktivacijom limfocita T i B te stvaranjem protutijela na vlastite antigene. Autoimune bolesti jesu podskupina imunosno posredovanih upalnih bolesti koje karakterizira povećana aktivnost imunosnog sustava (1). Autotoksični učinak može djelovati sistemski ili organ-specifično na, primjerice, samo određene organe kao što su mozak, pluća, bubrezi, gastrointestinalni trakt, kosti i koža (2). Neke od organ-specifičnih autoimunih bolesti su primarna bilijarna ciroza, gdje imunosni sustav napada jetru, Gravesova bolest u kojoj se stvaraju protutijela na štitnjaču te šećerna bolest tipa 1 u kojoj se stvaraju protutijela na stanice gušterače. Sistemske autoimune bolesti obuhvaćaju širok raspon povezanih bolesti, koje sve karakterizira poremećena regulacija imunosnog sustava što posljedično dovodi do upale i oštećenja više organa (3). Neke od najčešćih sistemskih autoimunih bolesti su reumatoidni artritis (RA), sistemski eritematozni lupus (SLE), Crohnova bolest (engl. *Crohn's disease*, CD), ulcerozni kolitis (engl. *ulcerative colitis*, UC) i druge.

Mehanizmi nastanka imunosno posredovanih upalnih bolesti još uvijek nisu do kraja razjašnjeni. Pretpostavlja se da uključuju zajedničko djelovanje genskih, molekularnih, staničnih, kao i okolišnih čimbenika koji dovode do patološkog upalnog odgovora kojeg pokreću limfocite T specifične na auto-antigene. U razvoj autoimunih bolesti mogu biti uključena naslijeđena ili stečena oštećenja u regulatornim putevima imunosnog sustava, molekularna sličnost virusnim i bakterijskim proteinima kao i poremećaj uklanjanja apoptozom nastalog staničnog materijala (2).

Molekularna mimikrija je jedan od vodećih mehanizama nastanka autoimunih bolesti, a javlja se zbog sličnosti stranih (infektivnih ili kemijskih) antigena s vlastitim molekulama, najčešće peptidima što dovodi do aktivacije autoreaktivnih limfocita T i B. Četiri su glavna kriterija potrebna za identifikaciju molekularne mimikrije: homologija u epitopima mikroorganizma i domaćina, detekcija autoprotutijela ili autoreaktivnih limfocita T na vlastite epitope i epitope mikroorganizama, epidemiološka povezanost izloženosti okolišnih čimbenika i razvoja

autoimunosti te reproducibilnost razvoja autoimunosti u životinjskom modelu. Molekularna mimikrija može se očitovati kao istovjetnost proteina, zajednički ili slični epitopi te strukturne sličnosti mikroorganizma i domaćina (4).

Tablica 1. Okolišni i endogeni čimbenici i njihovi mehanizmi koji mogu dovesti do razvoja autoimunih bolesti (5).

Čimbenici	Mehanizam djelovanja (ukratko)	Autoimune bolesti
Apoptoza	Aktivacija humoralne imunosti, prezentacija antigena, regulacija sekrecije citokina iz makrofaga.	PBC, T1D
Cjepiva	Stimulacija imunskog sustava putem transmembranskih <i>toll-like</i> receptora (TLR) povećava rizik od nastanka ili progresije autoimunih bolesti.	AIH, MS, PBC, RA, SLE
Hormoni	Učinak na urođeni i stečeni imunski odgovor, utječu na signalne puteve.	MS, RA, SLE
Jod	Povećava afinitet receptora na limfocitima T ili MHC prezentirajućim molekulama.	AITD
Pušenje	Aktivira stečenu imunost posredovanu dendritičkim stanicama, dovodi do porasta broja cirkulirajućih T limfocita, povećava autoreaktivne limfocite B, otpušta protutijela na vlastite antigene.	AIT, PBC, RA, SLE, SS
Teški metali	Dovode do neravnoteže Th1 i Th2 stanica, povećavaju stvaranje protutijela na vlastite antigene, mijenjaju citokinsku mrežu, povećavaju T- i B-stanični odgovor.	AIH, RA, SLE; SS
Ultraljubičasto zračenje	Uzrokuje oksidativno oštećenje DNA i RNA koje dovodi do apoptoze i stanične smrti, otpuštanje liganda s TLR7 i TLR9.	MS, RA, SLE, T1D
Virusne i bakterijske infekcije	Molekularna mimikrija – sličnost sekvenci patogena s peptidima u organizmu, promjena primarnih epitopa, aktivacija autoreaktivnih imunskih stanica, trajna prisutnost virusnih antigena dovodi do imunskog odgovora.	AIH, ARF, MS, PBC, PBC, RA, SLE, SS, T1D
Vitamin D	Sudjeluje u staničnom rastu, proliferaciji i apoptozi, prilagođava naslijeđeni (dendritičke stanice, makrofagi) i stečeni imunski odgovor (Th1, Th2, Th17, limfociti B).	CD, MS, PBC, RA, SLE, SS, T1D

AIH, autoimuni hepatitis; AITD, autoimuna bolest štitnjače; ARF, akutna reumatska groznica; CD, Crohnova bolest; MS, multipla skleroza; PBC, primarna bilijarna ciroza; RA, reumatoidni artritis; SLE, sistemski eritematozni lupus; SS, Sjögrenov sindrom; T1D, šećerna bolest tipa 1.

Okolišni čimbenici koji mogu različitim mehanizmima pridonijeti razvoju autoimunih bolesti su prehrana, poremećaj mikrobiote (disbioza), različite zarazne bolesti, bakterije, lijekovi, pušenje, hormoni, ultraljubičasto zračenje, teški metali, cjepiva i drugo. Tako, primjerice, pušenje može dovesti do povećanog broja cirkulirajućih limfocita T te stvaranja protutijela na vlastite na antigene. Cjepiva mogu aktivirati imunosti sustav što može dovesti i do stvaranja protutijela na vlastite antigene. Vitamin D sudjeluje u staničnom rastu i proliferaciji te modulira urođeni i stečeni imunosti odgovor preko makrofaga i limfocita Th1, Th2, Th17 i B. Ovisno o mehanizmima djelovanja, dolazi do razvoja različitih autoimunih bolesti od kojih su neke navedene u tablici (Tablica 1).

1.1.1 Incidencija i prevalencija autoimunih bolesti

Incidencija i prevalencija autoimunih bolesti razlikuju se ovisno o geografskom području, a mogu ovisiti i o socio-ekonomskom stanju nekog područja, etničkoj pripadnosti i brojnim okolišnim čimbenicima. Autoimune bolesti mogu se javiti u svim dobnim skupinama, uz karakteristične razlike ovisno o tipu bolesti.

Najčešće autoimune bolesti uključuju reumatoidni artritis (RA), celijakiju, sistemski eritematozni lupus (SLE), multiplu sklerozu (MS), šećernu bolest tipa 1 (engl. *type 1 diabetes*, T1D), upalne bolesti crijeva, Hashimotovu i Gravesovu bolest štitnjače te druge. Prevalencija se definira kao broj slučajeva pojedine bolesti na 100000 stanovnika u određenom vremenskom razdoblju. Prevalencija autoimunih bolesti u općoj je populaciji od 3 do 5 %, a povećava se posljednjih nekoliko godina, posebice u industrijskim zemljama. Prema istraživanju Lerner i suradnika (6), ukupan porast prevalencije autoimunih bolesti u razdoblju od 1985. do 2015. godine iznosi čak 19,1 %. U istom istraživanju najveći porast prevalencije bolesti primijećen je kod reumatoloških bolesti (RA, SLE) i iznosi čak 7,1 %. Tijekom godina je uočen nešto manji porast pojavnosti za endokrinološke (6,3 %) i gastrointestinalne (6,2 %) autoimune bolesti, dok je najmanje porasla prevalencija neuroloških autoimunih bolesti (multipla skleroza, mijastenija gravis) te porast iznosi 3,7 % (6). Prevalencija, ali i porast pojavnosti autoimunih bolesti razlikuje se ovisno o vrsti bolesti. Prevalencija za RA iznosi od 0,5-1 % u populaciji, s tim da se kod žena javlja i do tri puta češće nego kod muškaraca (7). Prevalencija psorijaznog artritisa niska je u općoj populaciji te na području Europe iznosi do najviše 0,25 %. Za razliku od opće populacije, prevalencija psorijaznog artritisa u bolesnika sa psorijazom je značajno viša te

iznosi od 6 % do čak 41 % (8). Ankilozantni spondilitis javlja se s prevalencijom od 5 do 6 % (9). Upalne bolesti crijeva javljaju se s manjom prevalencijom od reumatoidnih te njihova prevalencija iznosi oko 0,3 % u Europi i Sjevernoj Americi za Crohnovu bolest i do 0,5 % za ulcerozni kolitis (10).

Prevalencija autoimunih bolesti razlikuje se i ovisno o spolu i dobi, pa tako, reumatoidne bolesti uglavnom zahvaćaju žene starije dobi, dok se, primjerice, upalne bolesti crijeva javljaju u približno sličnom omjeru kod muškaraca i žena, ali uz nešto češću pojavnost kod osoba mlađih od 30 godina (11).

Incidencija bolesti je učestalost novih slučajeva određene bolesti u određenom vremenskom razdoblju. Uz porast prevalencije u razdoblju od 30 godina (od 1985. do 2015. godine) porasla je i incidencija autoimunih bolesti za čak 12,5 % (6). Incidencije različitih autoimunih bolesti u Europi prikazane su u tablici (Tablica 2).

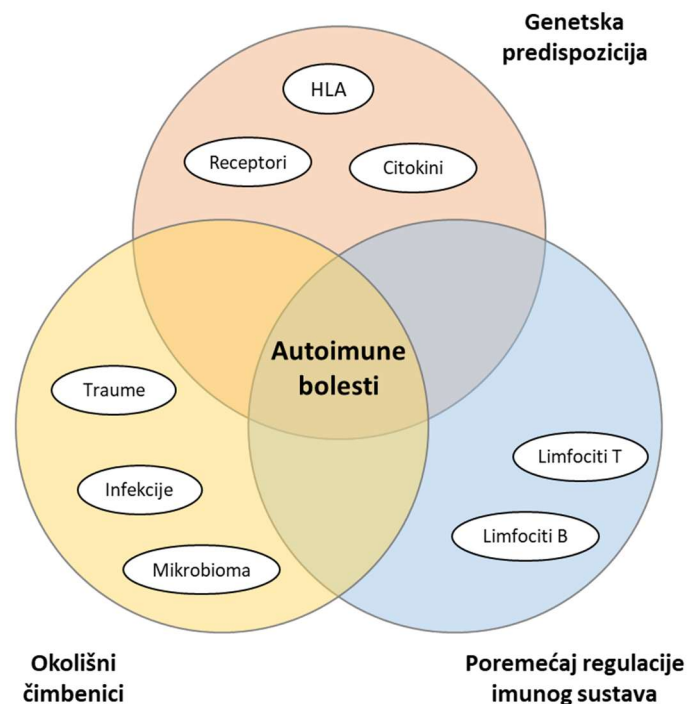
Tablica 2. Incidencije autoimunih bolesti u Europi, podaci iz 2015. godine (5).

Autoimuna bolest	Incidencija na 100000 stanovnika po godini
Addisonova bolest	0,56-6,20
Autoimuni hepatitis	1,07-3,0
Celijakija	1,5-8,7
Crohnova bolest	6,9-20,2
Gravesova bolest	21-50
Multipla skleroza	0,8-8,7
Primarna bilijarna ciroza	1,4-3,1
Reumatoidni artritis	9-36
Sistemski eritematozni lupus	1,0-5,0
Sjögrenov sindrom	5,3
Šećerna bolest tipa 1	>20
Ulcerozni kolitis	4,1-16,5

1.1.2 Genetička osnova autoimunih bolesti

Monogenske autoimune bolesti koje nastaju mutacijama u samo jednom genu su vrlo rijetke. Neke od monogenских autoimunih bolesti su: sindrom autoimune poliendokrinopatije tipa I (engl. *Autoimmune Polyendocrinopathy Syndrome*, APS) koji nastaje zbog mutacije transkripcijskog faktora, autoimunog regulatora (AIRE gen), zatim imunodisregulacija, poliendokrinopatija i enteropatija vezana uz X kromosom (engl. *Immunodysregulation, Polyendocrinopathy, and Enteropathy, X-linked*, IPEX) te autoimuni limfoproliferativni sindrom (engl. *Auto-immune Lymphoproliferative Syndrome*, ALPS) (12). Osim navedenih i neki podtipovi sistemskog eritematoznog lupusa također nastaju zbog mutacija u samo jednom genu (13).

Većina autoimunih bolesti uglavnom nastaje zajedničkim djelovanjem više gena, promijenjenom regulacijom imunog sustava te okolišnim čimbenicima (Slika 1).



Slika 1. Mehanizam nastanka autoimunih bolesti (14).

U prethodnim istraživanjima otkrivena je povezanost nastanka autoimunih bolesti s regijom u kojoj su smješteni geni koji kodiraju molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) odnosno humanih leukocitnih antigena (engl. *Human Leukocyte Antigens*, HLA). Pronađena je povezanost HLA-DRB alela s brojnim

autoimunim bolestima, kao što su SLE, RA, PsA, psorijaza, sistemska skleroza, MS, mijastenija gravis. Nastanak SLE se povezuje uz polimorfizme gena koji kodira podjedinicu pi receptora γ -aminomaslačne kiseline (engl. *Gamma-Aminobutyric Acid Receptor subunit Pi*, *GABRP* gene) kao i polimorfizme gena za modulator cikličkog AMP-a (engl. *Cyclic AMP-Responsive Element Modulator α* , *CREM- α*). Sjögrenova bolest povezana je s genskim varijantama lokusa MHC kompleksa, dok se autoimuni hepatitis povezuje s polimorfizmima u HLA-DRB1 genu, ali i u genu za IL-13. Primarni sklerozirajući kolangitis može nastati zbog poremećaja ekspresije sulfotransferaze 2A1 (engl. *Sulfotransferase Family 2A member 1*, *SULT2A1*), a psorijaza se povezuje s mutacijama u brojnim genima: *CLMN* (engl. *Calmin*), *FBXL19* (engl. *F-Box and Leucine Rich Repeat Protein 19*), *CCL4L* (engl. *C-C Motif Chemokine Ligand 4 Like 1*), *C17orf51* (engl. *Chromosome 17 open reading frame 51 pseudogene*), *TYK2* (engl. *Tyrosine Kinase 2*), *IL-13* (engl. *Interleukin 13*), *SLC22A4* (engl. *Solute Carrier Family 22 Member 4*), *CDKAL1* (engl. *CDK5 regulatory subunit Associated Protein 1 Like 1*) i *HLA-B/MICA* (engl. *Human Leukocyte Antigen Complex B/Human Major Histocompatibility Complex (MHC) class I chain-related gene A (MICA)*) te *PSORS6* (engl. *Psoriasis Susceptibility 6*), *TNF- α* (engl. *Tumor Necrosis Factor α*), *FCGR2A* (engl. *Fc Gamma Receptor IIa*), *TNFR1* (engl. *TNF Receptor Superfamily Member 1A*), *CD226* (engl. *CD226 Molecule*), *HLA-C* (engl. *Human Leukocyte Antigen Complex C*), *TNFAIP3* (engl. *TNF Alpha Induced Protein 3*), *CCHCR1* (engl. *Coiled-Coil Alpha-Helical Rod Protein 1*) (15). Polimorfizmi u *PTPN22* (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor type 22*) genu povezani su s više autoimunih bolesti kao što su šećerna bolest tipa 1, SLE, Gravesova bolest i RA, a mutacije u istom genu mogu djelovati protektivno kod Behcetove i Crohnove bolesti (16).

Unatoč stalnom istraživanju povezanosti različitih gena s autoimunim bolestima te provođenju brojnih cjelogenomskih asocijacijskih studija (engl. *Genome-Wide Association Studies, GWAS*) (Tablica 3) (17), najčešće se ipak istražuje MHC kompleks koji regulira specifičnost stečenog imunskog odgovora, a polimorfizmi se povezuju s RA i većinom drugih autoimunih bolesti. Polimorfizmi u MHC regiji na kromosomu 6 povećavaju rizik od nastanka RA za 30-40 %, od čega većina rizika od nastanka bolesti otpada na HLA-DRB1 varijantu (18).

Tablica 3. Genski lokusi povezani s autoimunim bolestima (17).

Gen	Lokacija	Funkcija	Autoimune bolesti
Unutarstanične signalne molekule i receptori			
<i>PTPN22</i>	1p13.3	signalni putevi preko receptora na limfocitima T i B	RA, SLE, AITD, T1D
<i>BANK1</i>	4q22	aktivacija limfocita B	SLE
<i>TNFAIP3</i>	6q23	ubikvitin, inhibitor signalnih puteva receptora TNF/NF- κ B	RA, SLE, CD
<i>BLK</i>	8p23	aktivacija limfocita B	SLE
<i>PTPN2</i>	8p11.3	negativni regulator aktivacije limfocita T	CD, T1D
<i>TRAF1</i>	9q33	regulacija signalnih puteva receptora TNF/NF- κ B	RA
Unutarstanični receptori koji prepoznaju molekulske strukture (PRR)			
<i>IFIH1</i>	2q24	receptor za virusnu dsRNA	T1D, GD
<i>NOD2/CA RD15</i>	16q12	unutarstanični receptor za bakterije, signalni put preko NF- κ B	CD
Transkripcijski čimbenici			
<i>REL</i>	2p13	član NF- κ B	RA
<i>STAT4</i>	2q32.2	regulira IFN- γ put	RA, SLE
<i>IRF5</i>	7q32	regulira put IFN tipa 1	SLE
<i>NKX2-3</i>	10q24.2	regulira razvoj intestinalnih i sekundarnih limfoidnih organa	CD
Citokini i citokinski receptori			
<i>IL2/IL21</i>	4q26	regulacija limfocita T	T1D, RA, celijakija
<i>IL23R</i>	1p31.1	homeostaza Th17	PSA, PSO, CD, AS
<i>IL7RA</i>	5p13	homeostaza memorijskih limfocita T	MS
<i>IL2RA</i>	10p15.1	homeostaza limfocita T i T regulatornih stanica	MS, T1D, GD
<i>IL12B</i>	15q31.1	razvoj Th1 i Th17	PSO, CD

Gen	Lokacija	Funkcija	Autoimune bolesti
Membranski receptori i kostimulatorne molekule			
<i>CTLA4</i>	2q33	inhibitorni kostimulatorni limfociti T	T1D, RA
<i>ITGAM</i>	16p11.2	klirens imunskih kompleksa i adhezija leukocita	SLE
<i>CD40</i>	20q12	kostimulacija limfocita T i B, stvaranje IgM, TNF- α , IL-2 preko NF- κ B signalnog puta	RA
Geni povezani s autofagijom			
<i>ATG16L1</i>	2q37.1	autofagija	CD
<i>IRGM</i>	5q33.1	autofagija	CD
Enzimi			
<i>ARTS1</i>	5q15	peptidno skraćivanje MHC I	AS
<i>PADI4</i>	1p36.13	enzimska citrulinacija peptida	RA
Autoantigeni			
<i>INS</i>	11p15.5	ciljni autoantigen	T1D
<i>TSHR</i>	14q31	ciljni autoantigen	AITD

AIH, autoimuni hepatitis; AITD, autoimuna bolest štitnjače; ARF, akutna reumatska groznica; AS, ankilozantni spondilitis; CD, Crohnova bolest; GD, Gravesova bolest; MS, multipla skleroza; PBC, primarna bilijarna ciroza; PSA, psorijazni artritis; PSO, psorijaza; RA, reumatoidni artritis; SLE, sistemski eritematozni lupus; SS, Sjögrenov sindrom; T1D, šećerna bolest tipa 1.

1.1.3 Uloga vitamina D u autoimunim bolestima

Ključna uloga vitamina D je u regulaciji homeostaze kalcija i održavanja zdravih kostiju. Osim toga, vitamin D je neophodan u modulaciji i regulaciji prirođenog i stečenog imunskog odgovora organizma. Sazrijevanje, diferencijaciju imunskih stanica kao i proizvodnju citokina i kemokina te prezentaciju antigena regulira 1,25-dihidroksi-vitamin D (1,25(OH)₂D). Dodatno, 1,25(OH)₂D inhibira upalu supresijom ekspresije *Toll-like* receptora (TLR) te smanjuje stvaranje upalnih citokina interleukina 1 i 6 te faktora nekroze tumora (TNF- α) koji imaju ključnu ulogu u nastanku autoimunih bolesti. Uz navedeno, 1,25(OH)₂D utječe na aktivaciju

limfocita B, tako da suprimira diferencijaciju u plazma stanice te stvaranje imunoglobulina i protutijela.

Niske koncentracije vitamina D povezuju se s povećanim rizikom pojave autoimunih bolesti i veće aktivnosti bolesti. U nekim istraživanjima pokazana je povezanost razine estrogena i vitamina D te njihovo zajedničko djelovanje na nastanak autoimunih bolesti kao što su multipla skleroza, reumatoidni artritis i sistemski eritematozni lupus (19). Vitamin D ima ulogu i u zaštiti epitelne barijere crijeva, regulira upalni odgovor inhibicijom razvoja limfocita Th17 te jednostavnijim stvaranjem regulatornih limfocita Treg, otpuštanjem IL-10 i supresijom sinteze IgE. Osim navedenog, vitamin D inhibira ekspresiju molekula na dendritičkim stanicama čime se blokira aktivacija limfocita Th i stvaranje citokina (20).

U prethodnim istraživanjima uočena je visoka prevalencija (30-40 %) niske koncentracije vitamina D kod oboljelih od upalnih bolesti crijeva. Niske koncentracije vitamina D povezane su s većom aktivnošću upalnih bolesti crijeva, upalama te relapsom bolesti (21). Unatoč svim dobrobitima vitamina D i njegovim ulogama u upalama i smanjenju upalnih stanja, nije dokazana konačna uloga vitamina D u liječenju autoimunih bolesti.

1.1.4 Upalne bolesti crijeva

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory Bowel Diseases*, IBD) su kronične upalne bolesti tkiva u gastrointestinalnom traktu koje karakteriziraju učestale upale crijevne sluznice. Najčešće upalne bolesti crijeva su Crohnova bolest i ulcerozni kolitis. Obje bolesti mogu imati slične kliničke karakteristike, ali i vrlo različite simptome. Patogeneza nastanka upalnih bolesti crijeva još uvijek nije potpuno poznata.

Cjelogenomskim asocijacijskim studijama (engl. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) kao i drugim genetičkim istraživanjima, otkriveno je preko 240 genskih lokusa koji mogu biti povezani s upalnim bolestima crijeva (22).

Osim genetičkih čimbenika, do bolesti može dovesti i poremećaj imunog odgovora na crijevnu mikrobiotu zbog raznih dijeta, poremećaja u prehrani uz velik unos šećera i masti, uzimanja antibiotika, probiotika te drugi čimbenici kao što su pušenje, stres ili neki lijekovi (23).

Upalne bolesti crijeva karakterizirane su poremećajem u regulaciji imunosnog odgovora, oštećenjem epitela te povećanim stvaranjem sluzi. Limfociti T i B, makrofagi, dendritičke stanice i neutrofili infiltriraju u laminu propriju te dovode do poremećaja u regulaciji upalnog odgovora. Zbog aktivacije sluznice, stanice lamine proprije pojačano stvaraju proupalne citokine, TNF- α , interleukin 12 (IL-12), interferon γ (IFN- γ) i druge (24).

U bolesnika s upalnim bolestima crijeva koncentracija TNF- α je povišena u sluznici crijeva, stolici i krvi (25). Povišena koncentracija TNF- α povećava propusnost intestinalne epitelne barijere induciranjem apoptoze epitela čime se omogućava prolaz bakterija i proteina u lumen crijeva što dodatno dovodi do oštećenja crijevnog epitela (26).

Prevalencija upalnih bolesti crijeva izrazito ovisi o socio-ekonomskim karakteristikama područja. Urbani dijelovi imaju veću prevalenciju bolesti od ruralnih. Jedna od teorija kojom se može objasniti veća incidencija upalnih bolesti crijeva u gradovima je manja izloženost enterobakterijama tijekom djetinjstva. Zbog većeg stupnja higijene kod djece u urbanim područjima može doći do razvoja neprimjerenog imunosnog odgovora prilikom izloženosti novim antigenima, odnosno gastrointestinalnim infekcijama kasnije tijekom života. Osim toga, veća je izloženost drugim okolišnim čimbenicima kao što su pušenje, zagađenost zraka, smanjena izloženost parazitima te učestalije korištenje antibiotika. Dodatno, zanimanja kojim se ljudi bave u gradovima, uključuju sjedilački način života te manje kretanja. Svi navedeni čimbenici mogu utjecati na razvoj autoimunih bolesti, a posebice na razvoj upalnih bolesti crijeva (27). S druge strane, u ruralnim je područjima, zbog načina prehrane i fizički aktivnijeg života, uz manje stresa, prevalencija upalnih bolesti crijeva manja, ali je također primijećen porast prevalencije od čak 30 % tijekom 10 godina (28, 29). Upalne bolesti crijeva javljaju se u podjednakom omjeru kod muškaraca i žena, s tim da su u mlađoj dobi češće kod muškaraca, a u starijoj kod žena.

Ovisno o geografskim područjima, čak i klinička prezentacija bolesti može biti različita, odnosno bolesnik može imati zahvaćene različite organe izvan gastrointestinalnog trakta. Unatoč brojnim razlikama u prezentaciji bolesti, najčešći simptomi su povezani s upalnim oštećenjima probavnog trakta koji dovode do učestalih proljeva, krvavih ili sluzavih stolica, konstipacije i/ili opstipacije, boli i krvarenja u rektumu, abdominalnih grčeva, a kod Crohnove bolesti, moguće su mučnine i povraćanje te rjeđe povišena tjelesna temperatura, gubitak teka i težine (30).

Dijagnoza upalnih bolesti crijeva se, osim fizičkim pregledom i uzimanjem anamneze od bolesnika, postavlja i laboratorijskim testovima. Od posebnog su značaja pregled stolice na parazite i bakterije te okultno krvarenje, kao i određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina u stolici kojim je moguće mjeriti aktivnost bolesti. Osim navedenih, određuje se i koncentracija upalnog biokemijskog parametra C-reaktivnog proteina u krvi, kompletna krvna slika, koncentracija feritina i drugi biokemijski parametri. Za konačnu dijagnozu potrebne su i slikovne tehnike (radiografija) te endoskopija (kolonoskopija i gastroskopija) i biopsija (31).

1.1.5 Autoimune reumatoidne bolesti

Autoimune reumatoidne bolesti najčešće su kronične bolesti mišićno-koštanog sustava. Do današnjih dana patogeneza bolesti nije u potpunosti razjašnjena, a najvjerojatnije, kao i druge autoimune bolesti, nastaje zajedničkim djelovanjem genetičkih i okolišnih čimbenika. Najčešće imunosno posredovane reumatoidne bolesti su reumatoidni artritis, ankilozantni spondilitis te psorijazni artritis.

Reumatoidni artritis najčešća je kronična sistemska upalna bolest koja napada zglobove ruku, šaka i koljena i to više simetričnih zglobova istovremeno. Prevalencija RA u sjevernoj Europi i Americi je 0,5 – 1 % s prosječnom godišnjom incidencijom od 0,02 - 0,05 %. RA se 3-4 puta češće javlja kod žena nego kod muškaraca. Socio-ekonomski čimbenici utječu na tijek i ishod bolesti više nego na njezin razvoj. U brojnim istraživanjima pokazana je povezanost prevalencije RA s alelima na HLA-DRB1 lokusu te se HLA geni smatraju jednim od važnijih genetičkih čimbenika za razvoj bolesti. Dijagnoza reumatoidnog artritisa postavlja se na temelju zbroja bodova koje donose pojedini klinički simptomi. Kod procjene kliničkog stanja bolesnika u obzir se uzima broj uključenih bolnih (BBZ) i otečenih zglobova (BOZ) od ukupno 28 zglobova koji su uključeni u DAS28 (engl. *Disease Activity Score*), pozitivni serološki testovi od kojih su najčešći reumatoidni faktor i protutijela na citrulinirani cirkulirajući peptid, koncentracija C reaktivnog proteina (CRP) ili vrijednosti sedimentacije eritrocita te trajanje simptoma i slikovne tehnike (32).

Ankilozantni spondilitis česta je spondiloartropatija koja zahvaća uglavnom kralježnicu te uzrokuje tešku kroničnu bol. Najčešće zahvaća muškarce mlađe od 45 godina, a prevalencija bolesti iznosi 0,04 do 0,1 %. Pojava bolesti povezana je s polimorfizmima gena HLA-B27 (33).

Psorijazni artritis (PsA) je imunogeno posredovana reumatoidna upalna bolest. Zahvaća aksijalne kosti, ali i nokte te uzrokuje upalu vezivnog tkiva. Zbog različite kliničke prezentacije teže se dijagnosticira od ostalih reumatoidnih bolesti (34). Prevalencija psorijaze iznosi oko 2 % u svjetskoj populaciji, a iako se može javiti u svim životnim dobima, najčešće se javlja između 15 i 20 godina te u kasnijoj dobi, između 55 i 60 godine. Prevalencija psorijaznog artritisa značajno raste kod oboljelih od psorijaze te se kreće od 6 do čak 42 %. PsA češće zahvaća muškarce (33).

1.2 Liječenje autoimunih i imunosno posredovanih upalnih bolesti

Upalne bolesti crijeva i autoimune reumatoidne bolesti zahtijevaju dugotrajno liječenje u nekoliko etapa. Kod obje vrste bolesti cilj liječenja je poboljšati opće stanje bolesnika te umanjiti simptome, uz što duža razdoblja bez kortikosteroidne terapije.

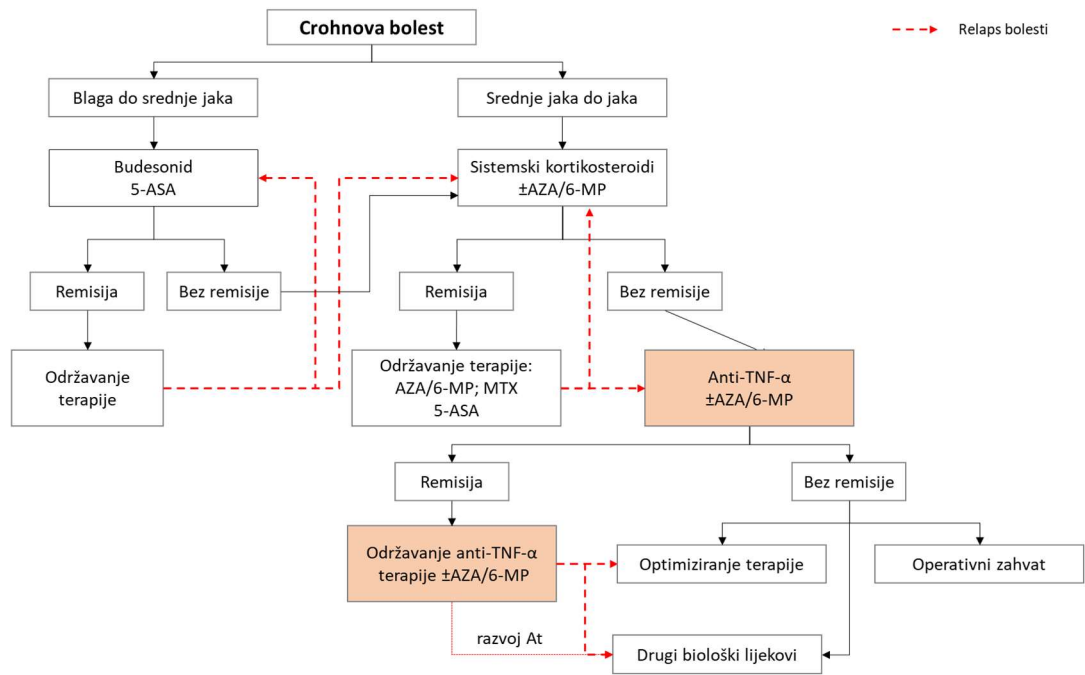
Kod upalnih bolesti crijeva najčešće se provodi kombinirana terapija. U prvom redu to su protuupalni lijekovi: 5-aminosalicilna kiselina (engl. *5-Aminosalicylic Acid*, 5-ASA), sulfasalazin, budesonid, koji se koriste za smanjenje akutnih upala kao i za indukciju remisije. Tiopurini i kortikosteroidi značajno smanjuju upalu i olakšavaju simptome te se koriste u održavanju remisije, ali ne služe trajnom održavanju remisije.

Metotreksat (MTX) može inducirati remisiju ili održavati stanje remisije do kojeg su doveli kortikosteroidi. Kod agresivnijih oblika bolesti prvi lijek izbora su antagonisti TNF- α . Za teži oblik CD bez odgovarajućeg odgovora na prethodnu terapiju, koriste se antagonisti TNF- α : infliksimab, adalimumab i certolizumab.

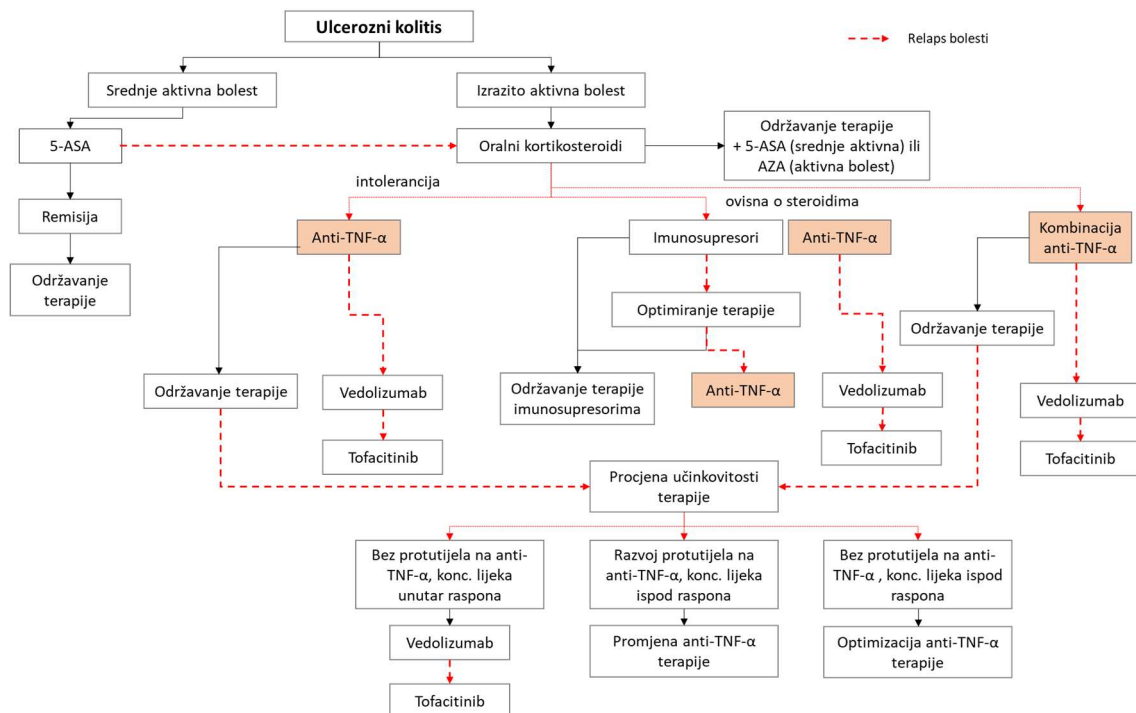
Osim antagonista TNF- α , u posljednje vrijeme koristi se i vedolizumab koji je protutijelo na $\alpha_4\beta_7$ integrin. Integrini su transmembranski glikoproteini koji omogućavaju adheziju stanica s izvanstaničnim matriksom. $\alpha_4\beta_7$ integrin većinom je eksprimiran na limfocitima B i T te u instestinalnoj sluznici dolazi do međudjelovanja s adhezijskim molekulama, mukoznim adresinima (engl. *Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1*, MAdCAM-1) (35). Vedolizumab ima manje nuspojava od antagonista TNF- α . Krajnji korak u liječenju bolesnika s upalnim bolestima crijeva kirurško je odstranjivanje zahvaćenih dijelova crijeva i to kod čak do 75 % bolesnika s Crohnovom bolešću i do 30 % bolesnika s ulceroznim kolitisom (30, 36, 37).

Svaka bolest ovisno o svojim simptomima na početku bolesti, trajanju bolesti kao i uspjehu odnosno neuspjehu terapije, ima algoritme liječenja koje su preporuke svjetskih, europskih ili hrvatskih stručnih društava.

Na slikama su prikazani algoritmi liječenja Crohnove bolesti (Slika 2) (38) i ulceroznog kolitisa (Slika 3) (39).



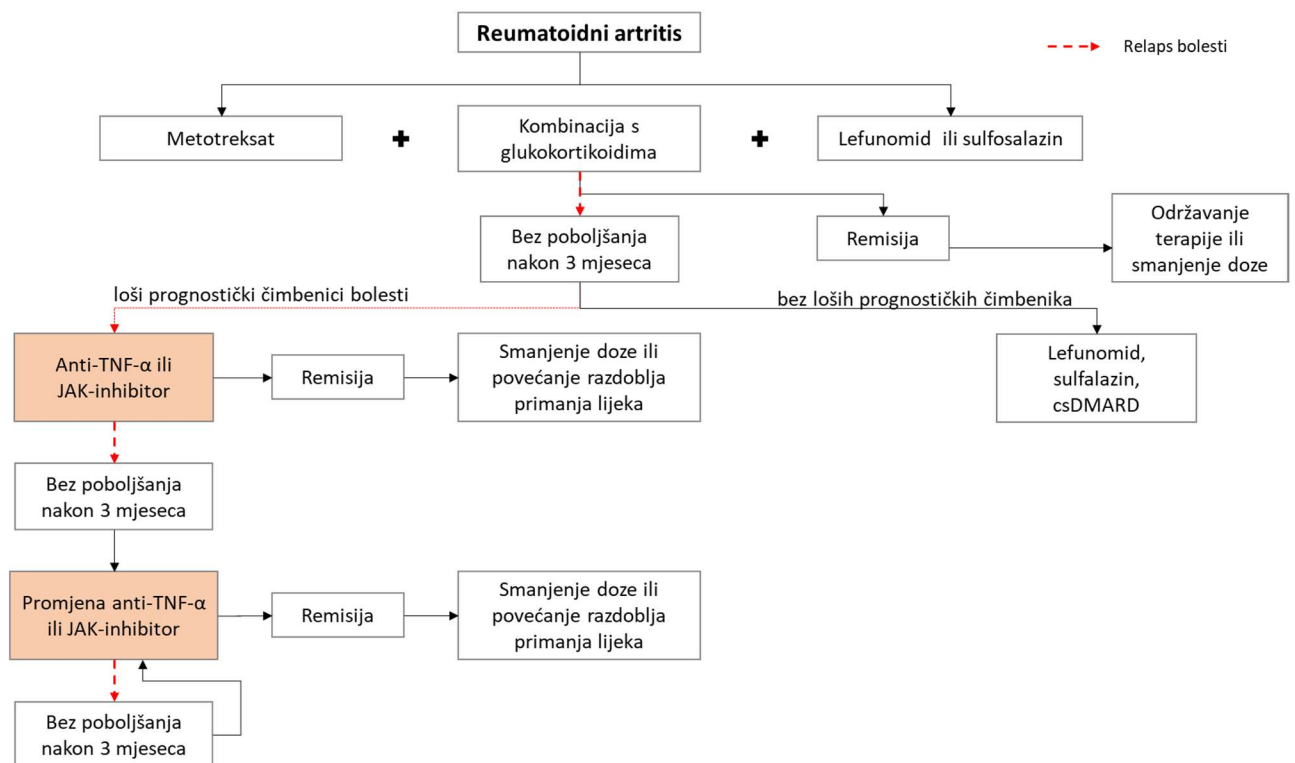
Slika 2. Algoritam liječenja Crohnove bolesti (prilagođeno prema 38). 5-ASA – 5-aminosalicilna kiselina; 6-MP – 6-merkaptopurin; anti-TNF-α – protutijela na faktor nekroze tumora; At – protutijela; AZA – azatioprin; MTX– metotreksat.



Slika 3. Algoritam liječenja ulceroznog kolitisa (prilagođeno prema 39). 5-ASA – 5-aminosalicilna kiselina; anti-TNF-α – protutijela na faktor nekroze tumora α; AZA – azatioprin; konc. – koncentracija.

Liječenje autoimunih reumatoidnih bolesti započinje konvencionalnim sintetskim lijekovima koji modificiraju tijek bolesti (engl. *conventional synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*, csDMARD), najčešće s metotreksatom (MTX) kako bi se postigla remisija bolesti. Ako je MTX kontraindiciran ili se razvije intolerancija, umjesto njega se koriste imunosupresivni lijekovi leflunomid ili sulfasalazin. Bez postignute remisije unutar 3 mjeseca, sljedeći lijekovi izbora su biološki DMARD lijekovi (bDMARD) odnosno antagonisti TNF- α i to najčešće infliksimab (IFX), adalimumab (ADM) ili etanercept. Ako se primjenom prvog biološkog lijeka ne postigne remisija, preporuka je zamijeniti lijek drugim antagonistom TNF- α do odgovarajućeg odgovora na terapiju, odnosno remisije bolesti (40). Liječenje ankilozantnog spondilitisa i psorijaznog artritisa započinje nesteroidnim protuupalnim lijekovima i glukokortikoidima, također uz prijelaz na biološke lijekove kod neodgovarajućeg odgovora na takvu terapiju (41,42).

Na slici (Slika 4) prikazan je algoritam liječenja za RA (40).



Slika 4. Algoritam liječenja reumatoidnog artritisa (prilagođeno prema 40). *anti-TNF- α* – protutijela na faktor nekroze tumora α ; *csDMARD* – konvencionalni sintetski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti; *JAK inhibitor* – inhibitor Janus kinaza.

1.2.1 Biološki lijekovi

Prema preporukama gastroenteroloških i reumatoidnih društava, ako se liječenjem imunosno posredovanih upalnih bolesti crijeva (CD, UC) i reumatoidnih bolesti (RA, AS, PsA) ne postigne očekivana remisija bolesti s protuupalnim lijekovima, metotreksatom i glukokortikoidima, sljedeća razina liječenja uključuje biološke lijekove. Biološki lijekovi djeluju specifično na pojedine komponente imunskog sustava kao što su, primjerice, limfociti T i B te upalni citokini. Cilj bioloških lijekova je inhibirati samo te komponente koje, ukoliko im se naruši homeostaza u organizmu, dovode do razvoja autoimunih bolesti, bez utjecaja na imunski sustav općenito (43). Biološki lijekovi koji se koriste u terapiji autoimunih reumatoidnih bolesti i upalnih bolesti crijeva inhibiraju upalne citokine uključene u patogenezu bolesti, kao što su faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF), pojedini interleukini (IL) interferon γ (IFN) ili drugi (44).

Prema mehanizmu djelovanja razlikuje se nekoliko vrsta bioloških lijekova:

- antagonisti TNF- α : infliksimab, adalimumab, certolizumab, golimumab, etanercept;
- antagonist transmembranskih glikoproteina, $\alpha_4\beta_7$ integrina: vedolizumab;
- antagonist IL-17A: secukinumab;
- antagonist IL-12/23 p40: ustekinumab.

1.2.2 Faktor nekroze tumora (TNF- α)

TNF- α je pleiotropni proupalni citokin koji pripada superporodici TNF-a (engl. *TNF superfamily member 2*, *TNFSF2*). Uz TNF- α , superporodici TNF-a pripada i TNF- β koji se još naziva i limfotoksin α (LT- α). LT- α je strukturno sličan TNF- α te ima i sličnu biološku funkciju, a pokazano je njihovo zajedničko djelovanje u nekim fiziološkim procesima (45).

Transmembranski TNF- α (engl. *transmembrane TNF- α* , tmTNF- α) je prekursor topljivog TNF- α (engl. *soluble TNF- α* , sTNF- α). Transmembranski TNF- α eksprimiran je na površini aktiviranih makrofaga i limfocita, a sastoji se od 233 aminokiselinska ostatka i veličine je 26 kDa. Transmembranski TNF- α djeluje kao ligand koji se veže na TNF- α receptore na ciljnim stanicama te prenosi signale u stanice koje stvaraju TNF- α . Metaloproteinaza TNF- α

konvertirajući enzim (engl. *TNF- α Converting Enzyme*, TACE) kida transmembranski TNF- α i nastaje sTNF- α koji se sastoji od 157 aminokiselinskih ostataka i veličine je 17 kDa. Topljivi TNF- α je homotrimer, koji se može kidati do monomera, dok tmTNF- α ostaje u obliku homotrimeru. Transmembranski i topljivi TNF- α vežu se za receptore TNF- α tipa 1 i 2 (TNFR1 i TNFR2) i na taj način se aktivira njihova biološka funkcija (46).

TNF- α ima značajnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora, stanične proliferacije, fiziološkim i patofiziološkim funkcijama organizma te sudjeluje u mreži regulacije staničnih funkcija. Djeluje vezanjem na dva transmembranska receptora: TNFR1 i TNFR2. TNFR1 je eksprimiran u većini tkiva kod sisavaca dok je TNFR2 eksprimiran u stanicama imunskog sustava. TNF- α stvaraju u različite stanice, primjerice limfociti B, NK stanice, endotelne i mišićne stanice, fibroblasti i osteoklasti, a najviše makrofagi. Vrlo se brzo otpušta nakon traume ili izloženosti lipopolisaharidima iz bakterija. Glavna funkcija TNF- α je regulacija stvaranja proupalnih citokina te ima središnju ulogu u aktivaciji stanica prilikom upale (47). TNF- α pokreće preživljavanje stanice te aktivira proupalni transkripcijski faktor NF- κ B i te aktivira MAP kinaze, aktivira fagocite koji uklanjaju uzročnike infekcije te povećava ekspresiju adhezijskih molekula na vaskularnom endotelu koje omogućavaju neutrofilima i makrofagima prolaz do oštećenih tkiva i upale. Uloga TNF- α vrlo je raznolika i kontradiktorna, a stvaranje TNF- α povezuje se s polimorfizmom u promotorskoj regiji gena *TNF- α* na položaju -308, iako još uvijek točan mehanizam nije u potpunosti razjašnjen (48).

Od nedavno je TNF- α prepoznat i kao adipokin te je otkrivena njegova pojačana proizvodnja u adipoznom tkivu kod pretilih osoba i osoba s drugim metaboličkim bolestima (49).

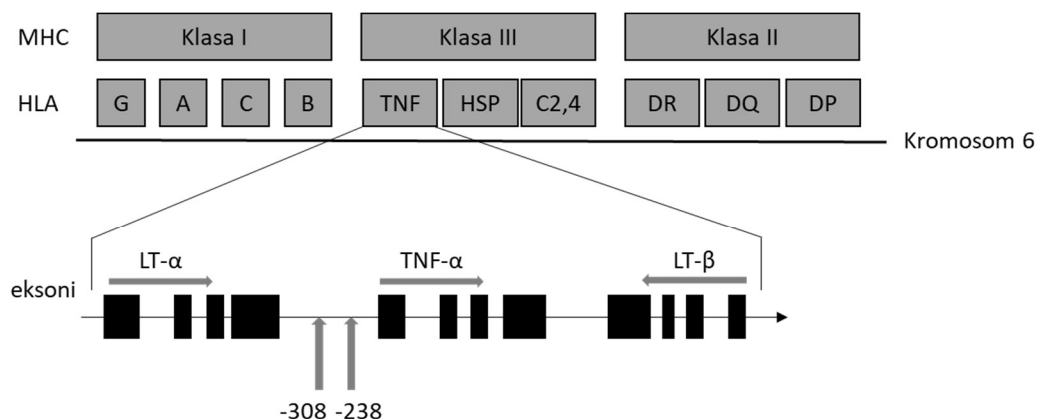
Ako dođe do neravnoteže u proizvodnji TNF- α , zbog endogenih čimbenika ili stimulacije mikroorganizmima, dolazi do povećanog stvaranja citokina (IL-1, IL-6, IL-17) i kemokina (IL-8, MCP, RANTES) što posljedično dovodi do još većeg stvaranja TNF- α . Kaskada staničnih odgovora uzrokuje razvoj kroničnih i autoimunih upalnih bolesti, najčešće reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti crijeva, psorijaznog artritisa, ankilozantnog spondilitisa, ateroskleroze i sepse (50). S obzirom na to da ima ključnu ulogu u patofiziologiji brojnih bolesti, blokiranje stvaranja TNF- α važan je terapijski pristup, posebice kod autoimunih bolesti (51).

Premda ima značajnu ulogu u patofiziologiji upalnih bolesti crijeva i imunsko posredovanih reumatoidnih bolesti, TNF se ne može koristiti kao biljeg aktivnosti ili remisije navedenih

bolesti. Jedan od razloga je što koncentracija TNF- α može biti povišena kod brojnih drugih upalnih stanja, ali može biti i snižena zbog uzimanja nekih lijekova. Isto tako, koncentracija TNF- α ne mora biti povišena u autoimunim bolestima (52).

1.2.3 Polimorfizmi gena *TNF- α*

Gen koji kodira TNF- α nalazi se na kromosomu 6 (6p21.33). Gen *TNF- α* ima 2772 parova baza i 4 kodirajuće sekvence (eksona) veličine 363, 45, 47 i 1220 bp s tim da se najveći eksoni nalaze na početku i na kraju gena. Gen se nalazi u regiji MHC kompleksa klase III između gena HLA-B i HLA-DR (Slika 5). Gen *TNF- α* je eksprimiran u različitim stanicama, najviše u makrofagima, ali i limfocitima T i B, NK stanicama, mastocitima, dendritičkim stanicama i fibroblastima (53). Unutar promotorske regije gena *TNF- α* postoji nekoliko polimorfizama koji se povezuju s promijenjenom proizvodnjom i učinkom TNF- α : -1031 T/C (rs1799964), -863 C/A (rs1800630), -857 C/A (rs1799724), -308 G/A (rs1800629) i -238 G/A (rs361525). (54).



Slika 5. Položaj gena za TNF- α na kromosomu 6p21.31 i polimorfizmi u promotorskoj regiji gena *TNF- α* na položajima -238 i -308 (prilagođeno prema 48, 55). *LT- α* – limfotoksin α ; *LT- β* – limfotoksin β ; MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti; *TNF- α* – faktor nekroze tumora α .

Od navedenih polimorfizama jedini za koji je pokazano da direktno utječe na ekspresiju TNF- α nalazi se na položaju -308 u promotorskoj regiji gena *TNF- α* . Genotip AA na tom položaju povezan je s povećanom spontanom ili stimuliranom proizvodnjom TNF- α u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (56). Osim direktnog utjecaja, polimorfizmi u promotorskoj regiji gena *TNF- α* dovode

do promijenjene ekspresije TNF- α te posljedično do povećanja koncentracije i/ili aktivacije drugih molekula koje imaju direktan ili indirektan učinak na stvaranje TNF- α .

U prethodnim istraživanjima pronađena je povezanost alela -238 G, -863 A i -1031 C s visokom razinom ekspresije gena *TNF- α* u bolesnika s multiplom sklerozom i kod zdravih ispitanika (57, 58). U kasnijem istraživanju Kaluza i suradnici su pokazali smanjenu transkripcijsku aktivnost gena *TNF- α* s alelom -238 A u bolesnika sa psorijazom (59). Osim u navedenim genima, ekspresija TNF- α mijenja se i ovisno o polimorfizmima gena *TNF- α* ili u drugim genima (60). Polimorfizmi na položajima -238 i -308 u promotorskoj regiji gena *TNF- α* povezani su i s većom podložnošću razvoju autoimunim bolestima uz različite, često i kontradiktorne rezultate u raznim istraživanjima. Tako je, primjerice, u istraživanju Mosaada i suradnika pokazano da su osobe nositelji alela -308 A u genu *TNF- α* podložnije razvoju RA (61), dok Hadinedoushana i suradnika. u svom istraživanju nisu potvrdili povezanost bolesti s genotipovima GA ili AA na položaju -238 u genu *TNF- α* (62).

Kontradiktorni su rezultati dobiveni u studijama povezanosti polimorfizama na položajima -238 i -308 u promotorskoj regiji gena *TNF- α* s povećanim odnosno smanjenim rizikom razvoja psorijaznog artritisa, pa su tako Li i suradnici pokazali da bolesnici s genotipovima GA i AA na položaju -238 gena *TNF- α* imaju povećani rizik od razvoja ove bolesti, dok genotipovi GA i AA na položaju -308 gena *TNF- α* smanjuju rizik od bolesti (63).

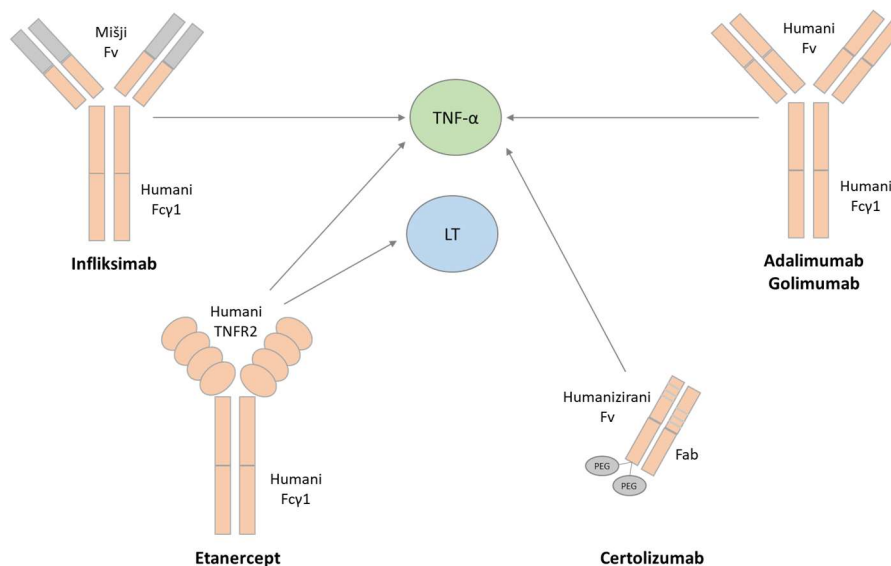
Za razliku od reumatoidnih, kod upalnih bolesti crijeva, rezultati su malo ujednačeniji. U prethodno objavljenom istraživanju pronađena je povezanost s polimorfizmom na položaju -308 gena *TNF- α* s podložnošću ulceroznom kolitisu, odnosno utvrđena je veća frekvencija A alela kod oboljelih. U istom istraživanju veća frekvencija genotipa GA na položajima -238 i -308 gena *TNF- α* zabilježena je i kod oboljelih od ulceroznog kolitisa u odnosu na kontrolnu skupinu (64).

Osim većoj podložnosti razvoju autoimunih reumatoidnih bolesti i upalnih bolesti crijeva, polimorfizmi gena *TNF- α* mogu dovesti i do primarnog izostanka odgovora na terapiju. Čak do 20 % bolesnika s Crohnovom bolešću ne odgovara na anti-TNF terapiju, prema nekim istraživanjima i zbog polimorfizama u promotorskoj regiji *TNF- α* (65, 66, 67). Kod reumatoidnog artritisa postotak bolesnika koji ne odgovaraju na terapiju penje se i preko 30 %. U meta-analizi koju su proveli Bek i suradnici, pronađeni su brojni polimorfizmi primjerice, u

genima *CTCN5* (engl. *Circulating Tumor Cells*), *NUBPL* (engl. *NUBP Iron-Sulfur Cluster Assembly Factor, Mitochondrial*), *EYA4* (engl. *EYA Transcriptional Coactivator and Phosphatase 4*), *PTPRC* (engl. *Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C*), *TRAF1/C5* (engl. *TNF Receptor Associated Factor 1/Complement 5*), *NFKBIB* (engl. *NFKB Inhibitor Beta*), *FCGR2A* (engl. *Fc Gamma Receptor IIa*) i *IRAK3* (engl. *Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 3*) koji mogu utjecati na odgovor na terapiju kod RA (68). U istraživanju Songa i suradnika pronađena je povezanost divljih genotipova -308 GG, -238 GG i -857 CC gena *TNF- α* s boljim odgovorom na terapiju antagonistima *TNF- α* u bolesnika s Crohnovom bolešću, spondiloartropatijama i psorijazom (69). Pallio i suradnici slično su pokazali kod RA odnosno pokazali su povezanost genotipa -308 GG gena *TNF- α* i boljeg odgovora na terapiju infliksimabom, adalimumabom i etanerceptom (70).

1.2.4 Antagonisti *TNF- α*

Antagonisti *TNF- α* su najčešće monoklonska protutijela koji suprimiraju odgovor organizma na upalni citokin *TNF- α* . Većina antagonista *TNF- α* sastavljena je od 2 teška i 2 laka lanca povezana disulfidnim vezama. Svaki monomer ima varijabilnu regiju specifičnu za antigen (engl. *Fragment antigen-binding*, Fab) i konstantnu regiju (engl. *Fragment constant*, Fc). Konstantna regija je humanog podrijetla kako bi se osigurala farmakokinetika lijeka dok Fab regija može biti mišjeg ili humanog podrijetla. Infliksimab, adalimumab i golimumab su bivalentna IgG monoklonska protutijela. Infliksimab je kimerni protein koji sadrži oko 25 % mišjih aminokiselina, dok je kod adalimumaba i golimumaba sastav protutijela isključivo humanog podrijetla. Certolizumab je monovalentni isječak Fab na koji su kovalentno vezane dvije molekule polietilen-glikola (PEG) kako bi mu se povećala topljivost. Etanercept je genetički stvoren fuzijski protein koji sadrži Fc isječak humanog IgG1 vezan na dimer izvanstaničnog dijela humanog *TNF* receptora 2. Za razliku od ostalih, etanercept kompetitivno inhibira vezanje *TNF- α* za receptore. Na slici (Slika 6) prikazana je molekularna struktura svih navedenih antagonista *TNF- α* .



Slika 6. Prikaz molekularne strukture antagonista TNF- α : IFX, ADM, golimumaba, certolizumaba i etanercepta. *Fab* – varijabilna regija specifična za antigen; *Fcy1* – konstantna regija IgG1; *Fv* – varijabilna regija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; LT – limfotoksin; PEG – polietilenglikol; TNFR2 – receptor TNF- α tipa 2.

Svi antagonisti TNF- α vežu topljivi (sTNF- α) i transmembranski TNF- α (tmTNF- α), dok samo etanercept veže i limfotoksin (LT) odnosno TNF- β . Antagonisti TNF- α djeluju tako da liziraju stanice aktivacijom citotoksičnosti ovisnoj o komplementu (engl. *Complement-Dependent Cytotoxicity*, CDC) ili stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*, ADCC). Vezanjem na tmTNF- α aktiviraju kaskadu citokina na taj način dovode do apoptoze (51). Antagonisti TNF- α neutraliziraju biološku funkciju TNF- α i kompetitivnim mehanizmom inhibiraju vezanje TNF- α na receptore, ali s različitim kliničkom djelotvornošću kod različitih autoimunih bolesti. Smatra se da su različite varijante polimorfizama gena za TNF povezane s nastankom različitih bolesti (71, 72).

Antagonisti TNF- α djeluju na više načina, a neki mehanizmi su (73):

- neutralizacija topljivog i membranskog TNF- α ,
- prijenos signala usmjeren izvana prema unutrašnjosti stanice (engl. *outside-to-inside-signalling*),
- apoptoza (direktna, indirektna i ovisna o Fc komponenti),
- aktivacija imunskog sustava, stvaranje protuupalnih citokina.

1.2.5 Način primjene, doziranje, farmakokinetika i indikacije antagonista TNF- α

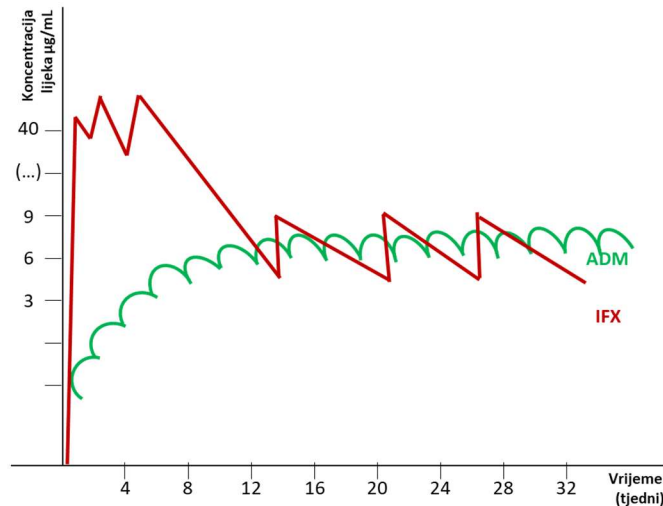
Ovisno o vrsti antagonista TNF- α , razlikuje se način i učestalost primjene terapije te količina lijeka koja se unosi u organizam (Tablica 4) (74). Učestalost terapije, osim o lijeku, ovisi i o bolesti koja se liječi te učinkovitosti terapije odnosno postizanju remisije bolesti. Ako se remisija ne postigne u očekivanom vremenu, razdoblje između dviju doza lijeka može se smanjiti, a vrijedi i obrnuto, kod postignute remisije bolesti doza se može smanjiti ili se može povećati razdoblje do uzimanja sljedeće doze lijeka. Zbog mogućih promjena u dozi primljenog lijeka kao i učestalosti uzimanja, potrebno je pratiti koncentraciju lijeka. Koncentraciju lijeka u krvi najbolje je određivati netom prije primjene sljedeće doze lijeka (engl. *trough concentration*) jer je tada koncentracija najniža, a ako je preniska, postoji indikacija za povećanje doze ili promjenu vrste terapije (75).

Tablica 4. Način primjene, doza i farmakokinetika antagonista TNF- α .

	Infliksimab	Adalimumab	Certolizumab	Golimumab	Etanercept
Način primjene	Intravenski	Supkutano	Supkutano	Supkutano	Supkutano
Prosječna doza	3-10 mg/kg	40 mg	100-400 mg	50-100 mg	25-50 mg
Učestalost primjene terapije	4-8 tjedana	1-2 tjedna	4 tjedna	2-4 tjedna	1-2x tjedno
Vrijeme poluživota	8-10 dana	10-20 dana	oko 14 dana	7-20 dana	4 dana

S obzirom na različito razdoblje primjene lijekova, svaki lijek postiže maksimum koncentracije nakon različitog vremenskog razdoblja (Slika 7). Ovisno o vremenu poluživota i dozi lijeka, ravnotežna koncentracija lijekova se razlikuje. Infliksimab se u induksijskoj fazi odnosno početnom razdoblju daje 2 i 6 tjedana nakon prve doze, a zatim slijedi faza održavanja kada se lijek primjenjuje svakih 8 tjedana (76). Infliksimab postiže ravnotežnu koncentraciju nakon 14 tjedana terapije. U bolesnika na terapiji adalimumabom maksimalna koncentracija lijeka

postiže se nakon otprilike 9 dana, a ravnotežna koncentracija, odnosno koncentracija kojom se postiže najbolji klinički odgovor (mjeren CRP-om i DAS28) postiže se nakon 20 tjedana od početka primjene lijeka (Slika 7). Kod primjene većih doza adalimumaba (80 ili 160 mg) ravnotežna koncentracija se može postići i već nakon 2-3 doze (77).



Slika 7. Ravnotežna koncentracija infliksimaba (IFX) i adalimumaba (ADM) i promjene koncentracije lijeka ovisno o vremenu i učestalosti primjene .

Učinkovitost određenih antagonista pokazana je samo za neke autoimune bolesti, dok kod drugih nema učinka, a najčešće indikacije za svaki lijek prikazane su u tablici (Tablica 5) (71, 78).

Tablica 5. Indikacije za upotrebu antagonista TNF- α

Lijek	Indikacije
Infliksimab	RA, CD (odrasli i djeca), UC (odrasli i djeca), AS, PsA, psorijaza
Adalimumab	RA (odrasli i djeca), CD
Certolizumab	RA
Golimumab	RA, AS, PsA
Etanercept	RA (odrasli i djeca), AS, PsA, psorijaza (odrasli i djeca)

AS, ankilozantni spondilitis; CD, Crohnova bolest; PsA, psorijazni artritis; RA, reumatoidni artritis; UC, ulcerozni kolitis.

Prema izvješću HALMED-a o najprodavanijim lijekovima prema financijskoj potrošnji u kunama za 2020. godinu, adalimumab i infliksimab se nalaze na 25. i 28. mjestu s ukupnom godišnjom potrošnjom preko 100 milijuna kuna. Oba lijeka registrirana su za liječenje upalnih bolesti crijeva i autoimunih reumatoidnih bolesti. Ostali antagonisti TNF- α ne nalaze se na listi 50 najprodavanijih lijekova (79).

1.2.6 Imunogeničnost antagonista TNF- α

Unatoč velikom uspjehu terapije autoimunih bolesti antagonistima TNF- α , kod pojedinih bolesnika učinak terapije se s vremenom smanjuje ili bolesnici razviju razne nuspojave. Obje pojave mogu biti uzrokovane razvojem protutijela na antagoniste TNF- α .

Stvaranje protutijela na antagoniste TNF- α smanjuje učinkovitost lijekova na dva načina. Neutralizirajuća protutijela na antagoniste TNF- α blokiraju vezanje lijeka na ciljne molekule. Vezanje neutralizirajućih i ne-neutralizirajućih protutijela na lijek dovodi do stvaranja imunskih kompleksa koji se uklanjaju cirkulacijom što u konačnici dovodi do smanjenja vremena poluživota lijeka (80).

Premda je u prosjeku kod 13 % bolesnika primijećen razvoj protutijela na antagoniste TNF- α , postoci razvoja protutijela jako variraju ovisno o bolesti i upotrijebljenom lijeku. Tako se, primjerice u bolesnika na terapiji infliksimabom protutijela razvijaju u oko 25 % slučajeva, kod adalimumaba u oko 14 %, dok su za certolizumab, golimumab i etanercept postoci manji od 10 % i iznose oko 7 %, 4 % i 1 % (81).

Imunosupresivni lijekovi kao metotreksat, azatioprin i 6-merkaptopurin mogu smanjiti imunogeničnost antagonista TNF- α te usporiti razvoj protutijela i pojačati učinak lijeka. Koncentracija protutijela na lijek može se mijenjati tijekom terapije te nije nužno da protutijela ostanu u krvi jednom kad se razviju. Kod nastavka terapije ili promjenom u drugi lijek koji je antagonist TNF- α ili drugog citokina, može se postići remisija bolesti, uz nestanak protutijela na prethodno upotrebljavani lijek (82).

Infliksimab je zbog svog sastava dijelova protutijela koji su mišjeg podrijetla najimunogeničniji, dok su ostali antagonisti manje imunogenični jer su isključivo humanog

porijekla. Protutijela na antagoniste TNF- α razvijaju se češće u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (16 %) nego u bolesnika s reumatoidnim artritisom (12 %). Ako se razviju protutijela na lijekove, klinički odgovor na terapiju može biti i za 67 % manji (83).

2 HIPOTEZA I CILJEVI

2.1 Hipoteza

Visoka cijena biološke terapije te učestalo korištenje infliksimaba i adalimumaba u liječenju autoimunih i imunosno posredovanih bolesti (79), zahtijeva personalizirani pristup liječenju te mogućnost predviđanja učinkovitosti terapije u bolesnika s navedenim bolestima (84, 85).

Hipoteza ovog istraživanja je da postoji razlika u kliničkom i biokemijskom odgovoru na terapiju antagonistima TNF- α u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i autoimunim reumatoidnim bolestima ovisno o polimorfizmima na položajima -238 i -308 u proksimalnoj promotorskoj regiji gena *TNF- α* . Za očekivati je da postoji povezanost mutiranih genotipova (GA i/ili AA) s lošijim odgovorom na terapiju, češćim razvojem protutijela na lijek te težim postizanjem i održavanjem remisije bolesti. Uz to, bilo je očekivano da će se ovisno o genotipu ili kombinaciji haplotipova oba polimorfizma moći procijeniti izgled od neuspjeha terapije odnosno izostanka postizanja remisije tijekom liječenja infliksimabom i adalimumabom.

2.2 Ciljevi

Ciljevi ovog rada su:

1. Ispitati povezanost polimorfizama -308 G/A (rs1800629) i -238 G/A (rs361525) gena *TNF- α* s odgovorom na terapiju iskazanim kroz:
 - a) koncentraciju lijeka (infliksimaba i adalimumaba) u krvi;
 - b) koncentraciju protutijela na infliksimab i adalimumab u krvi;
 - c) koncentraciju biokemijskih upalnih pokazatelja: fekalnog kalprotektina kod upalnih bolesti crijeva te CRP-a kod ispitivanih autoimunih i imunosno posredovanih bolesti,
 - d) praćenjem kliničkog odgovora u bolesnika s upalnim bolestima crijeva i autoimunim reumatoidnim bolestima prema odgovarajućim smjernicama (86, 87, 88, 89);
2. Ispitati može li određivanje polimorfizama prije uvođenja terapije biološkim lijekovima pridonijeti boljoj procjeni učinkovitosti terapije te pojavi protutijela na lijek.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Ustroj istraživanja

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2015. do 2020. godine u suradnji Kliničkog zavoda za kemiju, Klinike za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju i Zavoda za gastroenterologiju i hepatologiju Klinike za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice te Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku i Zavoda za kliničku imunologiju i reumatologiju Kliničke bolnice Dubrava.

Istraživanje su odobrila etička povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Kliničke bolnice Dubrava i Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svi uključeni bolesnici potpisali su informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

3.2 Ispitanici

U istraživanje su uključeni uzastopni bolesnici s upalnim reumatskim bolestima i upalnim bolestima crijeva na terapiji biološkim lijekovima, antagonistima TNF- α infliksimabom i adalimumabom. Bolesnike su u istraživanje uključivali liječnici specijalisti reumatologije ili gastroenterologije koji su postavljali dijagnozu i procjenjivali kliničko stanje bolesnika prema odgovarajućim smjernicama. Dijagnoze reumatoidnih autoimunih bolesti postavljene su prema preporukama Hrvatskog reumatološkog društva:

- Prijedlog preporuka Hrvatskoga reumatološkog društva za liječenje bolesnika s reumatoidnim artritismom biološkim i ciljanim sintetskim lijekovima, 2017. (90).
- Prijedlog preporuka Hrvatskoga reumatološkog društva za liječenje odraslih bolesnika s aksijalnim spondiloartritismom i psorijaznim artritismom biološkim lijekovima i ciljanim sintetskim molekulama, 2017. (91).

Dijagnoze upalnih bolesti crijeva postavljene su prema preporukama Hrvatskog gastroenterološkog društva i Europske organizacije za Crohnovu bolest i kolitis:

- Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva biološkom terapijom (92),
- ECCO-ESGAR smjernica za dijagnostičku procjenu IBD (87, 88),
- ECCO smjernice za dijagnozu Crohnove bolesti (93, 94).

Svim bolesnicima uzeti su i osnovni demografski podaci: spol i dob te podaci o vrsti bolesti, trajanju bolesti prije početka terapije biološkim lijekovima, vrsti i dozi lijeka.

Kriteriji uključivanja bolesnika bili su:

- bolesnici stariji od 18 godina,
- terapija antagonistima TNF- α , infliksimabom ili adalimumabom,
- bolesnici s autoimunim reumatoidnim bolestima: reumatoidnim artritisom (RA), psorijaznim artritisom (PsA) ili ankilozantnim spondilitisom (AS),
- bolesnici s upalnim bolestima crijeva, Crohnovom bolešću (CD) ili ulceroznim kolitisom (UC).

Kriteriji isključenja bolesnika:

- bolesnici s oštećenom funkcijom jetre i bubrega;
- bolesnici na terapiji drugim biološkim lijekovima (antagonisti interleukina, integrina i drugi);
- bolesnici koji su tijekom terapije razvili neki od neželjenih učinaka (primjerice, virusne infekcije, glavobolju, mučninu, alergijsku reakciju ili druge) zbog čega im je liječnik specijalist odlučio promijeniti terapiju.

Svi bolesnici uključeni u istraživanje praćeni su najmanje 6 mjeseci od početka terapije antagonistima TNF- α . Liječnici specijalisti su procjenjivali kriterije za uključivanje ispitanika u istraživanje prema aktivnosti bolesti, odnosno temeljem različitih biokemijskim i kliničkim pokazateljima.

3.3 Klinički pokazatelji za procjenu aktivnosti bolesti i remisije

Za procjenu aktivnosti bolesti autoimunih reumatoidnih bolesti i upalnih bolesti crijeva korišteni su klinički alati i ocjene prema najnovijim kliničkim smjernicama (90, 91, 92).

3.3.1 Procjena aktivnosti bolesti u bolesnika autoimunim reumatoidnim bolestima

3.3.1.1 OCJENA AKTIVNOSTI BOLESTI NA 28 ZGLOBOVA

Ocjena aktivnosti bolesti na 28 zglobova (engl. *Disease Activity Score*, DAS28) u bolesnika s RA i PsA koja kombinira broj bolnih zglobova (BBZ) i broj otečenih zglobova (BOZ) od ukupno 28 mogućih zahvaćenih zglobova s globalnom bolesnikovom procjenom (engl. *Patient's Global Assessment*, PGA) i koncentracijom reaktanta akutne faze (CRP). DAS28 računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{DAS28-CRP} = 0,56 \cdot \sqrt{(\text{BBZ}28)} + 0,28 \cdot \sqrt{(\text{BOZ}28)} + 0,014 \cdot \text{VAS} + 0,36 \cdot \ln(\text{CRP}+1) + 0,96$$

Dobivena vrijednost može iznositi od 0 do 10, gdje 10 označava najveću aktivnost bolesti, a 0 najmanju aktivnost. Prema vrijednostima DAS28 ocjene, moguće je procijeniti aktivnost bolesti, odgovor na terapiju i remisiju bolesti (Tablica 6). Poboljšanjem bolesti odnosno smanjenjem aktivnosti bolesti smatra se pad vrijednosti DAS28 najmanje za 1,2 od početne procjene (95).

Tablica 6. Procjena aktivnosti bolesti prema vrijednostima DAS28 ocjene.

Vrijednosti DAS28	Tumačenje rezultata
>5,1	Visoka aktivnost bolesti
3,3-5,1	Umjerena aktivnost bolesti
2,6-3,2	Niska aktivnost bolesti
<2,6	Remisija

3.3.1.2 INDEKS AKTIVNOSTI ANKILOZANTNOG SPONDILITISA

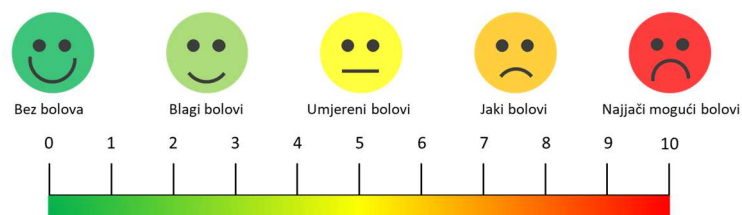
Indeks aktivnosti ankilozantnog spondilitisa (engl. *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index*, BASDAI) sadrži 6 različitih pitanja u kojima se procjenjuju osnovni simptomi bolesti: umor, bol u kralježnici, bolni i otečeni zglobovi, osjetljivost enteza (spojeva mišića i ligamenata) te intenzitet i trajanje zakočenosti (96). BASDAI indeks veći od 4 definira aktivnu bolest.

3.3.1.3 FUNKCIONALNI INDEKS ZA ANKILOZANTNI SPONDILITIS

Funkcionalni indeks za ankilozantni spondilitis (engl. *Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index*, BASFI) ima 10 pitanja, a procjenjuje ograničenja u svakodnevnim strukturnim lokomotornim ili ukupnim aktivnostima bolesnika (97).

3.3.1.4 PROCJENA AKTIVNOSTI BOLESTI VIZUALNOM ANALOGNOM SKALOM (VAS)

Vizualna analogna skala (engl. *Visual Analog Scale*, VAS) je milimetarska skala na kojoj bolesnici križićem obilježavaju razinu boli. Na VAS skali 0 označava stanje bez boli, dok 10 označava najveću moguću bol (Slika 8).



Slika 8. Vizualna analogna skala.

3.3.2 Procjena aktivnosti bolesti u bolesnika upalnim bolestima crijeva

Aktivnost upalnih bolesti crijeva procjenjivala se prema smjernicama Hrvatskog gastroenterološkog društva, a u ovisnosti o kliničkoj slici (broju proljevastih stolica i/ili krvavih stolica dnevno, endoskopskim nalazima i dr.) te koncentraciji C-reaktivnog proteina (92).

3.4 Uzorci

3.4.1 Uzorci krvi

Prilikom uključivanja bolesnika u istraživanje, uzorkovana su dva uzorka venske krvi: uzorak pune krvi s K₃EDTA (engl. *Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*, etilendiamin tetraoctena kiselina) antikoagulansom za izolaciju DNA i uzorak seruma za biokemijske pretrage u epruvetu bez antikoagulansa, s aktivatorom zgrušavanja. Kod kontrolnih pregleda čija je učestalost ovisila o vrsti bolesti i kliničkom stanju bolesnika uzorkovan je samo serum. Korištene su epruvete s podtlakom (Greiner BioOne GmbH, Kremstünster, Austrija), volumena 4 mL za uzorkovanje seruma i 3 mL za epruvete s K₃EDTA antikoagulansom.

Uzorci seruma uzorkovani su netom prije primjene sljedeće doze lijeka. Uzorci su nakon venepunkcije ostavljeni najmanje 30 minuta na sobnoj temperaturi da se spontano zgrušaju, a zatim su centrifugirani na 4141 x g 7 minuta. Koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP), određena je odmah nakon centrifugiranja uzorka, nakon čega su uzorci seruma alikvotirani i zamrznuti na -20 °C do određivanja koncentracije lijeka i protutijela na lijek, najduže u trajanju do 6 mjeseci.

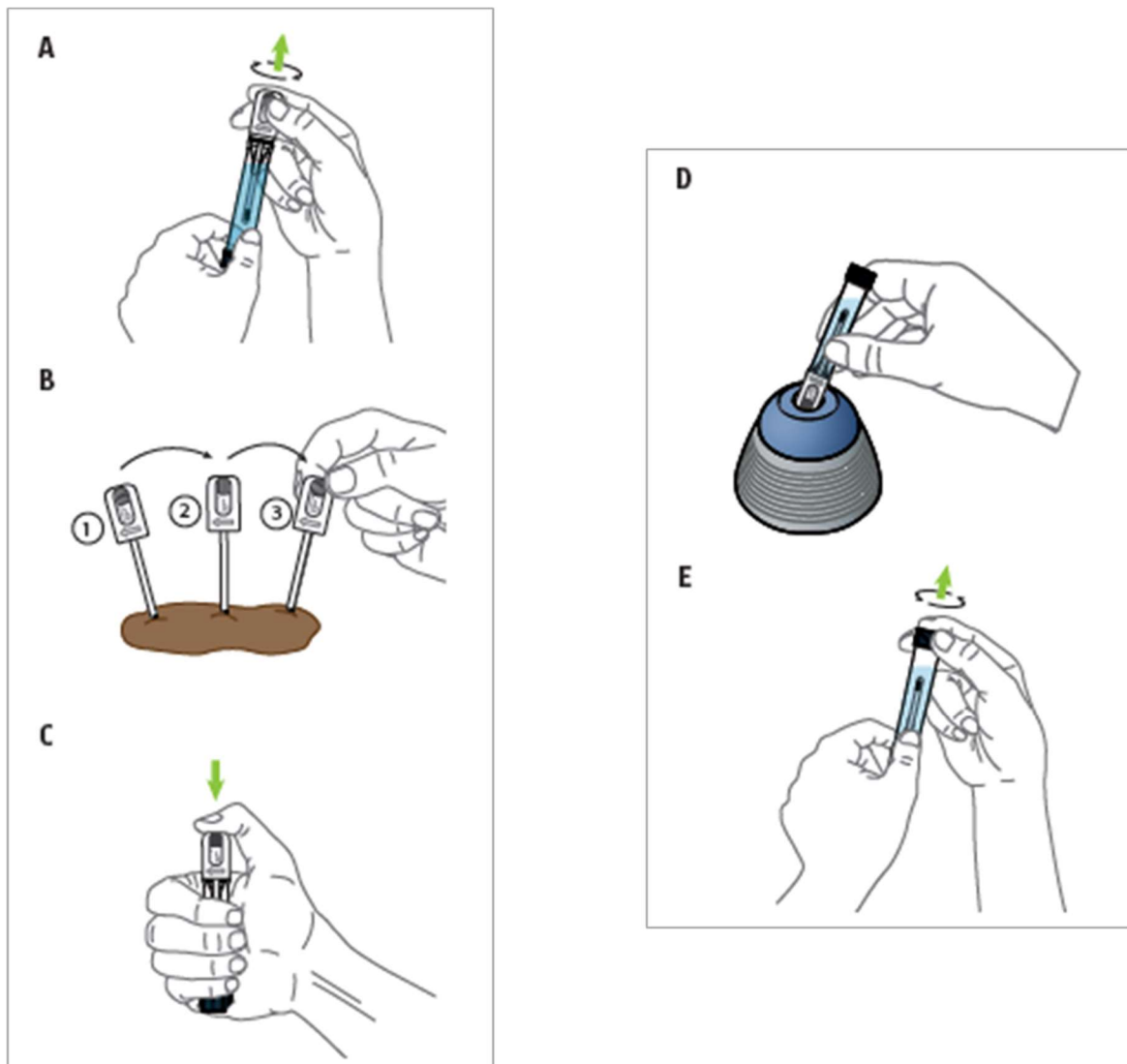
Uzorci s K₃EDTA antikoagulansom pohranjeni su u hladnjak do izolacije DNA najduže do 6 mjeseci, a nakon izolacije, izolirana DNA je pohranjena u hladnjak na 2-8 °C do genotipizacije.

3.4.2 Uzorci stolice

Bolesnicima s upalnim bolestima crijeva (CD i UC) tijekom redovne kontrole uzorkovana je i stolica. Uzorak stolice dostavljen je u laboratorij gdje je isti dan ekstrahiran prema protokolu proizvođača (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska) (Slika 9).

Ukratko, pomoću vrška za doziranje (Slika 9A) iz jednokratnih epruveta CALEX® Cap (Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska) uzet je uzorak stolice iz jednokratnog spremnika. Na vršku za doziranje nalaze se utori koje je potrebno u potpunosti ispuniti uzorkom stolice okretanjem vrška 3-5 puta u uzorku (Slika 9B). Kod kompaktnije stolice, uzorak se promiješa na tresilici kako bi se smanjila tvrdoća uzorka. U slučaju mekše ili proljevaste stolice, prema preporukama proizvođača, u otore je potrebno pipetirati 10 µL uzorka. Potom se vršak s

uzorkom iz sustava za uzorkovanje vraća u epruvetu (Slika 9C) na čijem se ulazu nalazi lijevak koji osigurava uklanjanje viška uzorka stolice i standardiziranu masu uzorka. U epruveti se nalazi 5 mL ekstrakcijskog pufera s kojim se sadržaj uzorkovane stolice dobro miješa 30 sekundi na tresilici (Slika 9D) nakon čega je uzorak ostavljen stajati najmanje 10 minuta. Postupak je ponavljan sve dok se uzorak stolice nije potpuno otopio. Uzorak stolice dobiven ekstrakcijom prenijet je u sekundarne epruvete (Slika 9E) i tako pripremljen bio je spreman za određivanje koncentracije kalprotektina na analizatoru. Ekstrakt stolice pohranjen je u hladnjak na 2-8 °C najviše do tjedan dana do određivanja koncentracije fekalnog kalprotektina.



Slika 9. Prikaz ekstrakcije stolice za određivanje koncentracije fekalnog kalprotektina. A) Vršak za doziranje; B) uzimanje uzorka pomoću vrška za doziranje; C) uranjanje vrška s uzorkom u ekstrakcijski pufer; D) miješanje na tresilici; E) prebacivanje ekstrakta u epruvetu.

3.5 Određivanje koncentracije biokemijskih parametara

3.5.1 C-reaktivni protein (CRP)

Koncentracija C-reaktivnog proteina određena je imunoturbidimetrijskom metodom na analizatoru Architect c8000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, SAD), korištenjem originalnog reagensa prema uputama proizvođača. Princip metode: CRP iz uzorka seruma veže se na anti-CRP protutijelo koje je vezano na lateks čestice u reagensu pri čemu dolazi do aglutinacije. Aglutinacija CRP-a i protutijela detektira se kao promjena apsorbancije pri 572 nm koja je proporcionalna koncentraciji CRP-a u serumu. Koncentracija CRP-a izražena je u mg/L, a referentna vrijednost je < 5 mg/L.

3.5.2 Fekalni kalprotektin (fKal)

Koncentracija fekalnog kalprotektina određena je na analizatoru Architect c8000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, SAD), korištenjem reagensa BÜHLMANN fCAL® turbo (BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Švicarska) prema uputama proizvođača. Koncentracija fekalnog kalprotektina određena je u ekstraktu stolice turbidimetrijskom imunometodom na pojačanim lateks imunočesticama (engl. *Particle Enhanced Turbidimetric Immunoassay*, PETIA). Princip metode: ekstrakt stolice inkubira se s reakcijskim puferom te se miješa s polistirenskim nanočesticama koje su obložene specifičnim protutijelima na kalprotektin. Kalprotektin iz uzorka stolice posreduje u aglutinaciji imunočestica. Zamućenost uzorka povećava se stvaranjem kompleksa između kalprotektina i imunočestica, a izmjerena apsorbancija proporcionalna je koncentraciji kalprotektina. Dobiveni rezultati izraženi su u mg/kg stolice. Prema navodima proizvođača, referentna vrijednost kalprotektina je <80 mg/kg dok se koncentracija >160 mg/kg smatra povišenom.

3.5.3 Vitamin D

Koncentracija 25-hidroksi (25-OH) vitamina D određena je na analizatoru Architect i2000 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, SAD) kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom s mikročesticama (engl. *Chemiluminescent Microparticle Immunoassay*, CMIA). Koncentracija vitamina D određena je originalnim reagensom tvrtke Abbott Laboratories

(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, SAD) prema uputama proizvođača. Princip metode: serum se u kivetama analizatora miješa s diluentom i paramagnetskim mikročesticama koje su obložene protutijelima na vitamin D (anti-vitamin D). 25-OH vitamin D iz uzorka odvaja se s transportnog proteina i veže na paramagnetske mikročestice stvarajući pritom kompleks antigena i protutijela. Nakon inkubacije u reakcijsku smjesu se dodaje konjugat koji sadrži akridinijem obilježen vitamin D koji se veže na preostala slobodna mjesta na paramagnetskim mikročesticama obloženim protutijelima na vitamin D. Nakon još jedne inkubacije i ispiranja nevezanih antigena u reakcijsku smjesu dodaju se vodikov peroksid (*pre-trigger* otopina) i natrijev hidoksid (*trigger* otopina) nakon čega se mjeri nastala kemiluminiscencija izražena u relativnim jedinicama svjetlosti (engl. *Relative Light Units*, RLU) koja je proporcionalna koncentraciji vitamina D u serumu. Koncentracija vitamina D je izražena u nmol/L. Preporučena koncentracija vitamina D u serumu je >75 nmol/l, a nedostatkom vitamina D smatra se koncentracija <25 nmol/L.

3.5.4 Koncentracija bioloških lijekova i protutijela na lijekove

Koncentracije bioloških lijekova infliksimaba i adalimumaba, kao i protutijela na oba biološka lijeka, određene su enzimskom imunokemijskom metodom (engl. *enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) komercijalno dostupnim reagensima.

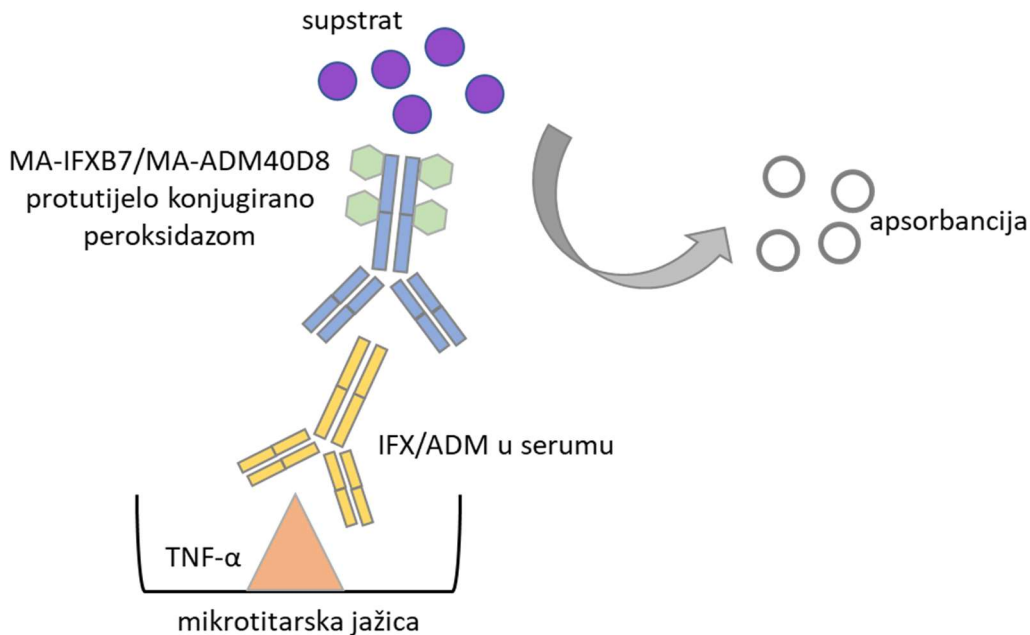
3.5.4.1 Određivanje koncentracije lijeka (infliksimaba i adalimumaba) – „sandwich“ ELISA

Koncentracija infliksimaba određena je originalnim reagensom RIDASCREEN® IFX Monitoring (R-Biopharm AG, Darmstadt, Njemačka), a koncentracija adalimumaba reagensom RIDASCREEN® ADM Monitoring (R-Biopharm AG, Darmstadt, Njemačka). Uzorak seruma potrebno je u omjeru 1:100, odnosno 10 µL seruma razrijediti s 990 µL pufera za diluciju (0.09 % NaN₃). Princip obje metode: molekule TNF-α vezane su na površinu jažica mikrotitarske ploče. Uzorak razrijeđenog seruma se pipetira u jažice i inkubira. Tijekom prve inkubacije na 37 °C u trajanju sat vremena infliksimab odnosno adalimumab iz uzorka se vežu na TNF-α na jažicama. Nakon ispiranja, u sljedećoj fazi inkubacije na 37 °C koja traje 30 minuta, ako je u serumu prisutan lijek, na vezani IFX ili ADM se veže specifično monoklonsko protutijelo na IFX (MA-IFX6B7) ili ADM (MA-ADM40D8) konjugirano s peroksidazom iz hrena. Monoklonska

protutijela, koja se nisu vezala na kompleks TNF- α -lijek, se ispiru tijekom sljedeće faze ispiranja. Dodatkom supstrata tijekom inkubacije od 10 minuta na 37 °C u mraku mijenja se boja vezane peroksidaze u plavu, a dodatkom stop otopine boja se mijenja u žutu, a apsorbancija koja se mjeri pri 450 nm proporcionalna je koncentraciji lijeka u serumu (Slika 10).

Kalibracijska krivulja se konstruira temeljem podataka dobivenih mjerenjem apsorbancije pri 450 nm u uzorcima kalibratora (standarda) koji sadrže infliksimab u koncentracijama: 0, 5, 10, 20, 60, 120 ng/mL. Izmjerene koncentracije lijekova izražavaju se u $\mu\text{g/mL}$, a mjerni raspon im je od 0,5 do 12 $\mu\text{g/mL}$ za uzorke razrijeđene u omjeru 1:100. U bolesnika koji su u početnoj fazi terapije, koncentracije lijeka su više od navedenog mjerenog raspona te se serum može razrijediti u omjeru 1:400 čime se postiže mjerni raspon od 2 do 48 $\mu\text{g/mL}$.

Terapijske koncentracije, u fazi održavanja terapije su 3-7 $\mu\text{g/mL}$ za infliksimab i 4-8 $\mu\text{g/mL}$ za adalimumab. Koncentracije lijeka ispod terapijskih u fazi održavanja smatraju se neadekvatnom koncentracijom lijeka. Zbog navedenog razloga, izmjerene koncentracije IFX ≥ 3 $\mu\text{g/mL}$, odnosno ADM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ odabrane su kao jedan od kliničkih ishoda koji je uvršten u regresijski model.



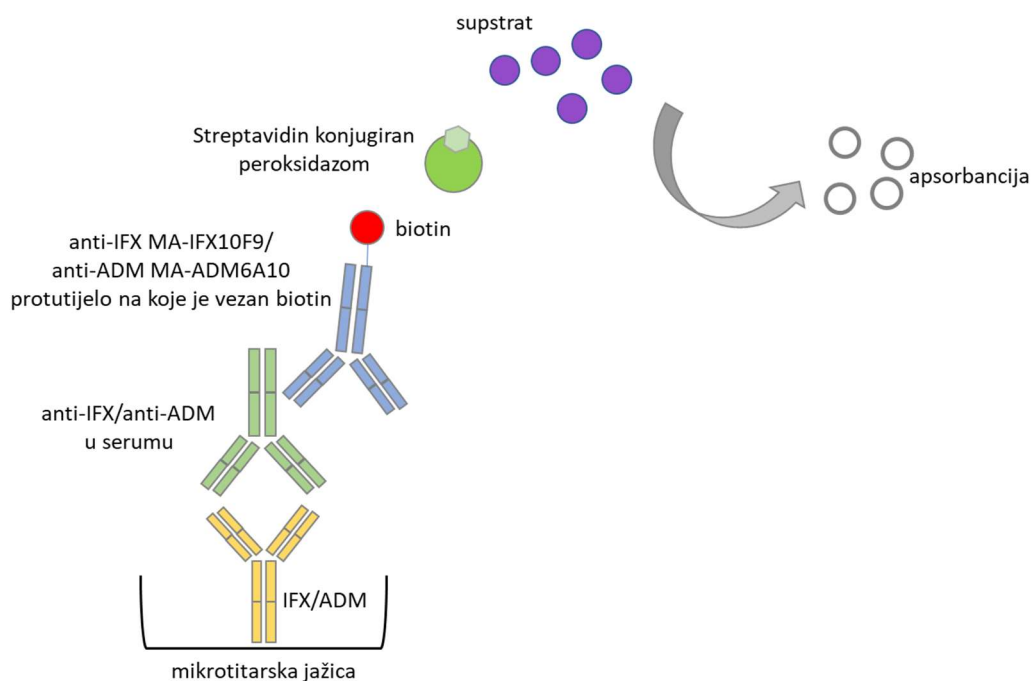
Slika 10. Shema određivanja koncentracije infliksimaba i adalimumaba. ADM, adalimumab; IFX, infliksimab; TNF- α , faktor nekroze tumora α .

3.5.4.2 Određivanje koncentracije protutijela na infliksimab i adalimumab

Koncentracija protutijela na infliksimab određena je reagensom RIDASCREEN® Anti-IFX Antibodies (R-Biopharm AG, Darmstadt, Njemačka), a koncentracija protutijela na adalimumabom reagensom RIDASCREEN® Anti-ADM Antibodies (R-Biopharm AG, Darmstadt, Njemačka). Prije postavljanja uzorka na mikrotitarsku pločicu serum je potrebno razrijediti u omjeru 1:25, odnosno 10 μ L seruma razrijediti s 240 μ L pufera za diluciju (0.09 % NaN_3). Princip obje metode: na površinu jažica u mikrotitarskim pločicama vezane su molekule infliksimaba ili adalimumaba. Tijekom prve inkubacije na 37 °C u trajanju od sat vremena, protutijela na lijek iz razrijeđenog uzorka seruma se vežu za molekule IFX ili ADM koje su vezane na površinu jažica. Ispiranjem se uklanjaju nevezani proteini iz seruma. Zatim se u jažice dodaje IFX ili ADM konjugiran s biotinom, koji se veže na kompleks antigen-protutijelo tijekom inkubacije 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije i ispiranja konjugata s biotinom, dodaje se streptavidin konjugiran peroksidazom i smjesa se inkubira 15 minuta na 37 °C. Dodatkom supstrata, ako postoje protutijela, vezani enzimi mijenjaju boju otopina u jažicama u plavu u mraku na 37 °C tijekom još 10 minuta inkubacije, a reakcija se zaustavlja dodatkom stop otopine koja mijenja boju u žutu. Izmjerena apsorbancija na 450 nm proporcionalna je koncentraciji protutijela na lijek (Slika 11).

Kalibracijska krivulja se konstruira temeljem podataka dobivenih mjerenjem apsorbancije pri 450 nm u uzorcima kalibratora (standarda) koji sadrže monoklonska protutijela anti-IFX MA-IFX10F9 ili anti-ADM MA-ADM6A10 u poznatim koncentracijama: 0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 i 5,0 ng/mL.

Koncentracija protutijela određivala se u fazi održavanja terapije, u razdoblju od 6 do 12 mjeseci nakon početka terapije. Koncentracija protutijela $>2,5$ ng/mL smatra se pozitivnim rezultatom, a za niže rezultate smatra se da protutijela na lijek nisu pronađena. Ako je bilo kada tijekom navedenog razdoblja zabilježen porast protutijela na antagoniste TNF- α , smatra se da je bolesnik razvio protutijela. Prema deklaraciji proizvođača, metode za oba protutijela na lijek imaju mjerni raspon od 0,5 do 125 ng/mL za razrjeđenje 1:25. Kod koncentracija iznad navedenog mjernog raspona, uzorak je moguće razrijediti u omjeru 1:200, čime se postiže mjerni raspon od 20 do 1000 ng/mL za uzorke razrijeđene u omjeru 1:200.



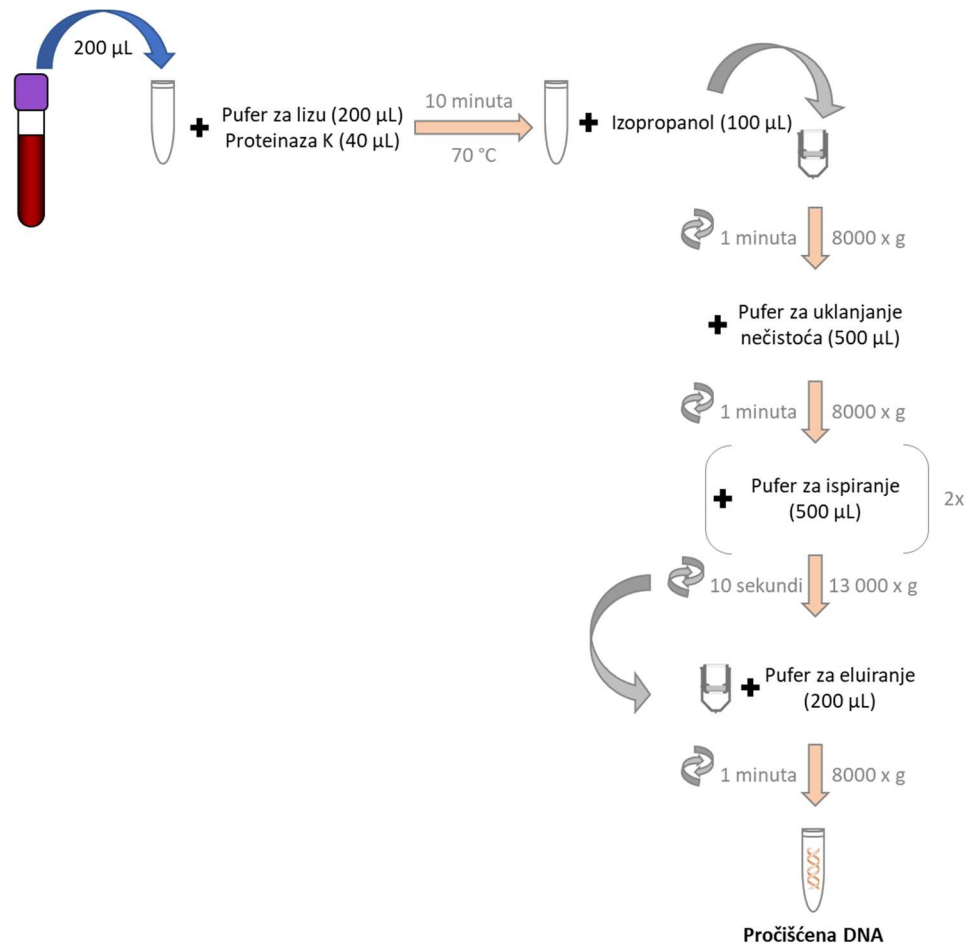
Slika 11. Shema određivanja koncentracije protutijela na infliksimab i adalimumab. *ADM*, adalimumab; *Anti-ADM*, protutijela na adalimumab; *anti-IFX*, protutijela na infliksimab; *IFX*, infliksimab.

3.6 Izolacija DNA

DNA je izolirana korištenjem komercijalno dostupnog paketa reagensa High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) prema uputama proizvođača.

Uzorak pune krvi inkubiran je s puferom za vezanje (engl. *Binding Buffer*) i proteinazom K na 70 °C 10 min. Nakon dodatka izopropanola i vorteksiranja, uzorak je prebačen u posebne epruvete (engl. *High Pure Purification Filter Tube*) u kojima se stanične nukleinske kiseline selektivno vežu za površinu stakla. Vezane nukleinske kiseline pročišćene su dodavanjem pufera za uklanjanje nečistoća (engl. *Inhibitor Removal Buffer*) i centrifugiranjem čime se uklanjanju denaturirani proteini i stanične komponente u uzorku. Nakon pročišćavanja puferom za ispiranje (engl. *Wash Buffer*), nukleinske kiseline vezane za stijenke eluirane su puferom (engl. *Elution buffer*) čime je dobiven uzorak pročišćene DNA koji je pohranjen na +4 °C do

genotipizacije, a najduže do 6 mjeseci (Slika 12). Uzorak izolirane DNA stabilan je do 3 godine (98).



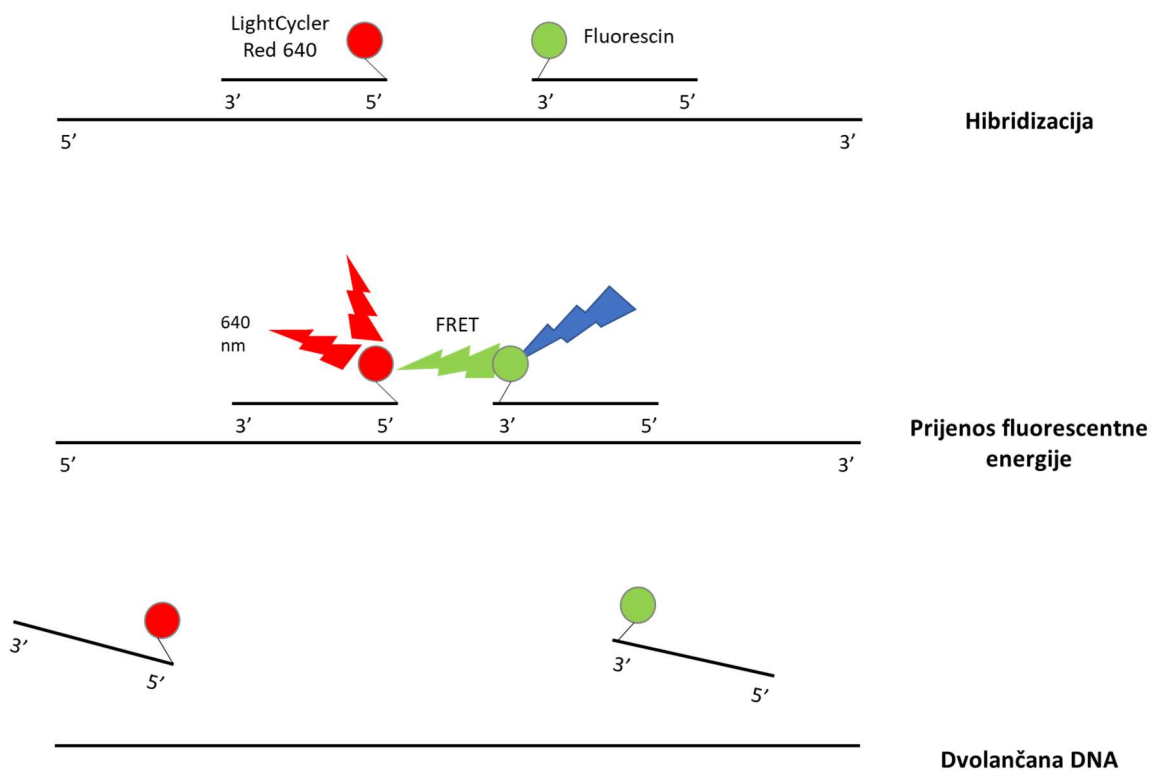
Slika 12. Prikaz izolacije DNA pomoću *High Pure PCR Template Preparation Kit*.

3.7 Genotipizacija

Genotipizacija polimorfizama gena *TNF- α* napravljena je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) na analizatoru LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema uvjetima navedenim u tablici (Tablica 7).

Princip genotipizacije na analizatoru LightCycler uključuje metodu prijenosa fluorescencijske rezonantne energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) u kojem su dvije sekvence oligonukleotidnih proba (donorska i primateljska) duljine 15-40 baza obilježene

različitim bojama i vežu se za DNA jedna blizu druge, a do prijenosa energije dolazi samo ako su dvije probe udaljene 1 do najviše 5 nukleotida. Hibridizacijska proba 1 na 3' kraju obilježena je donorskom bojom (fluoresceinom). Na 5' kraju hibridizacijska proba 2 obilježena je akceptorskom bojom (LightCycler-Red 640). Ako je DNA u dvolančanom obliku ne dolazi do hibridizacije DNA i probi te fluorescencija neće biti detektirana pri 640 nm. Kada zbog porasta temperature na 95 °C DNA denaturira (prijede u jednolančanu DNA), a obilježene se hibridizacijske probe vežu na jednolančanu DNA na temperaturi 60 °C i nađu jedna pored druge, fluorescein se ekscitira plavim laserom pri 495 nm i emitira zelenu svjetlost pri 520 nm. Emitirana energija s fluoresceina ekscitira akceptorsku boju pri 625 nm koja emitira crvenu fluorescenciju koja se mjeri pri 640 nm. Na kraju svakog ciklusa vezanja proba, fluorescencija je maksimalna. Nakon toga, porastom temperature na 72 °C dolazi do stvaranja nove dvolančane DNA te se fluorescencija na 640 nm smanjuje. Količina fluorescencije direktno je proporcionalna količini ciljne DNA koja se stvara tijekom procesa lančane reakcije polimeraze (Slika 13).



Slika 13. Prikaz principa genotipizacije na analizatoru LightCycler (prema 99). *FRET* – engl. *fluorescence resonance energy transfer* (prijenos fluorescencijske rezonantne energije); *DNA*, deoksiribonukleinska kiselina.

Tablica 7. Uvjeti lančane reakcije polimeraze za određivanje polimorfizama rs361525 i rs1800629.

Proces	Temperatura	Trajanje ciklusa	Broj ciklusa
Denaturacija	95 °C	10 minuta	1
Umnažanje:			
Denaturacija	95 °C	10 sekundi	45
Vežanje početnica	60 °C	10 sekundi	
Produljivanje lanca	72 °C	15 sekundi	
Krivulja taljenja	95 °C	30 sekundi	1
	40 °C	2 minute	
	75 °C		
Hlađenje	40 °C	30 sekundi	1

Za svaki polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µL, a prema navodima proizvođača (Tablica 8).

Tablica 8. Reakcijska smjesa za određivanje polimorfizama rs361525 i rs1800629.

Reagens/otopina	Volumen
H ₂ O	12,0 µL
FastStart DNA Master HybProbe	2,0 µL
Reagens mix (specifične probe)	1,0 µL
MgCl ₂	1,6 µL
Uzorak izolirane DNA	3,4 µL

Za genotipizaciju korištene su specifične probe (engl. *primer*): za rs361525 (TNF G-238A) i rs1800629 (TNF G-308A) TIB Molbiol, LightSNIP (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Njemačka) (Tablica 9).

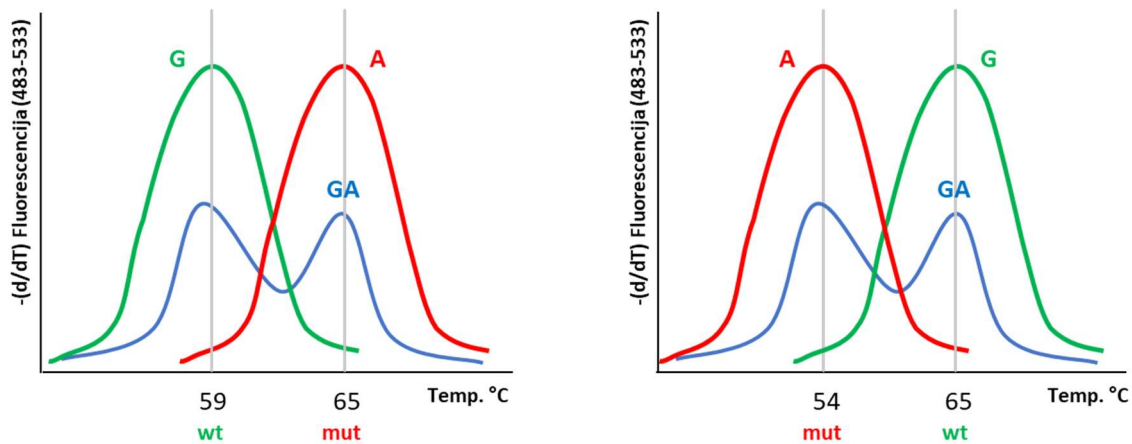
Tablica 9. Probe (engl. *primers*) za rs361525 i rs1800629.

SNP (rs)	Smjer	Sekvenca (5'-3')	Duljina sekvence
-238 (rs361525)	Fw	CAGAAGACCCCCCTCGGAATC	21
	Rv	ACACTCCCCATCCTCCCTGCTC	22
-308 (rs1800629)	Fw	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCATG	25
	Rv	CTGGAGGCTGAACCCCGTCC	20

Nakon umnažanja DNA fragmenata metodom lančane reakcije, genotipovi se određuju metodom analize taljenja (engl. *melting curve analysis*).

Temperatura taljenja je temperatura pri kojoj je 50 % DNA u dvolančanom obliku, a 50 % u jednolančanom obliku. Na početku analize krivulje taljenja temperatura reakcijske smjese se snižava kako bi cjelokupna DNA bila u dvolančanom obliku. Kada je DNA u dvolančanom obliku, ne dolazi do vezanja fluorescentnih proba na DNA. Postupnim podizanjem temperature do temperature taljenja (T_m), DNA prelazi u jednolančani oblik, čime se omogućava vezanje hibridizacijskih proba na lanac DNA i nastaje signal.

Temperatura taljenja dvolančane DNA ovisi o duljini fragmenta, udjelu GC parova i stupnju homologije između dva DNA lanca. Ako postoji više GC parova, T_m je viša zbog više vodikovih veza koje je potrebno prekinuti kako bi se dobila jednolančana DNA. Kada polimorfizam nije prisutan hibridizacijske probe savršeno se vežu za DNA lanac. U slučaju prisutnosti polimorfizma, hibridizacijska se proba neće savršeno spojiti s DNA te je potrebna viša T_m da bi se razdvojili lanci. Prema razlikama u temperaturi taljenja mogu se detektirati divlji, mutirani ili heterozigotni genotip (Slika 14).



Slika 14. Temperature taljenja i očitavanje rezultata na LightCycler analizatoru 1.5 za polimorfizme rs361525 (lijevo) i rs1800629 (desno). GG je divlji tip (wt), AA je mutirani tip (mut), a GA je heterozigotni tip genotipa.

3.8 Statistička analiza

Kategorički podaci, kao primjerice, spol, dijagnoza, genotip, postizanje remisije, pojava protutijela na lijekove u bolesnika i drugi, prikazani su kao broj (N) i udio.

Normalnost raspodjele svih kvantitativnih podataka ispitana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Kvantitativni podaci (primjerice, koncentracije biokemijskih parametara) prikazani su medijanom i interkvartilnim rasponom dok je dob ispitanika prikazana medijanom i rasponom od minimuma do maksimuma. U slučaju malog broja ispitanika u skupini (N=2 ili 3) rezultati su prikazani medijanom i rasponom od najmanje do najveće vrijednosti.

Ispitivanje statistički značajne razlike među skupinama s kategoričkim podacima načinjeno je χ^2 testom. Ako su neke skupine imale manje od 5 ispitanika, ispitivanje statistički značajne razlike provedeno je Fisherovim egzaktnim testom.

χ^2 testom ispitana je i Hardy-Weinbergova ravnoteža kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika između očekivanih (teorijskih) i dobivenih frekvencija genotipova. Ako razlika ne postoji, odnosno dobivena P vrijednost je veća od 0,05, raspodjela polimorfizama u ispitivanoj skupini je u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

Zbog malog broja ispitanika po skupinama ($N < 30$) razlike među skupinama za kvantitativne podatke ispitane su neparametrijskim testovima bez obzira na normalnost razdiobe podataka. Mann-Whitneyev test korišten je za ispitivanje razlika između dvije skupine, dok je Kruskal-Wallisov test korišten za ispitivanje razlika između tri ili više ispitivanih skupina. Za usporedbu ponavljanih rezultata 6 odnosno 12 mjeseci nakon terapije korišten je Wilcoxonov parni test, dok je za usporedbu 3 parna mjerenja korišten Friedmanov test.

Regresijska analiza napravljena je kako bi se otkrili mogući čimbenici koji mogu predvidjeti neuspjelu remisiju kod pacijenata ili loš odgovor na terapiju biološkim lijekovima (zbog preniske koncentracije lijeka ili razvoja protutijela). Regresijska analiza napravljena je u dva stupnja; prvo su univarijatnom regresijskom analizom ispitane statistički značajne varijable za predviđanje ishoda (odgovarajući odgovor na terapiju biološkim lijekovima, remisija bolesti, razvoj protutijela na infliksimab ili adalimumab). Za procjenu rizika od nastanka aktivne bolesti ili neučinkovitosti terapije upotrijebljen je dominantan model genotipova rs361525 i rs1800629, (GG vs. GA + AA). Nakon univarijatne, statistički značajni prediktori uključeni su u multivarijatnu regresijsku analizu. Uključene varijable opisane su omjerom izgleda (engl. *Odds Ratio*, OR) te površinom ispod krivulje (engl. *Area Under Curve*) uz odgovarajuće 95 %-tni intervale pouzdanosti (engl. *Confidence Interval*, CI) i P vrijednosti.

Razina statističke značajnosti za sve testove postavljena je na 0,05, a dobivene P vrijednosti manje od razine značajnosti smatrane su statistički značajnima.

Statistička obrada načinjena je u statističkom programu MedCalc v11.5.1.0 (Mariakerke, Belgija).

4 REZULTATI

4.1 Demografski podaci ispitanika

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 112 bolesnika na terapiji antagonistima TNF- α , infliksimabom i adalimumabom, od čega 66 s upalnim bolestima crijeva (46 s Crohnovom bolešću i 20 s ulceroznim kolitisom) i 46 s autoimunim reumatskim bolestima (24 s reumatoidnim artritismom, 13 s ankilozantnim spondilitisom i 8 sa psorijaznim artritismom). Većina bolesnika (65,2 %) je bila na terapiji infliksimabom.

Bolesnici s autoimunim reumatoidnim bolestima bili su statistički značajno stariji od bolesnika s upalnim bolestima crijeva ($P < 0,001$ za žene i $P = 0,002$ za muškarce). U skupini bolesnika s upalnim bolestima crijeva bilo je više muškaraca ($N=37$, udio 0,56) u odnosu na skupinu s autoimunim reumatoidnim bolestima ($N=15$, udio 0,33), uz P vrijednost 0,024.

Prosječno trajanje bolesti prije uvođenja biološke terapije bilo je dulje za bolesnike s autoimunim reumatoidnim bolestima (preko 7 godina) u odnosu na bolesnike s upalnim bolestima crijeva (oko 4 godine).

Osnovne demografske karakteristike ispitanika te podaci o trajanju bolesti, vrsti lijeka i dozi lijeka, razvoju protutijela te postizanju remisije prikazani su u tablici (Tablica 10).

U obje skupine više je bolesnika bilo na terapiji infliksimabom, nego adalimumabom, bez statistički značajne razlike među skupinama s autoimunim reumatoidnim bolestima i upalnim bolestima crijeva ($P=0,550$). Veći broj bolesnika na terapiji infliksimabom je razvio protutijela na lijek ($N=18$) u odnosu na bolesnike na terapiji adalimumabom ($N=5$), uz veći udio u bolesnika s autoimunim reumatoidnim artritismom u odnosu na bolesnike s upalnim bolestima crijeva ($P=0,010$).

Remisija je postignuta kod 62,5 % bolesnika, bez statistički značajnih razlika ovisno o bolesti za bolesnike na terapiji infliksimabom ($P = 0,806$) i adalimumabom ($P = 0,098$).

Tablica 10. Demografske karakteristike ispitanika.

Parametar	Upalne bolesti crijeva (N=66)	Autoimune reumatoidne bolesti (N=46)	P
Spol (N, udio)			
Žene	29 (0,44)	31 (0,67)	0,024[#]
Muškarci	37 (0,56)	15 (0,33)	
Dob (godine, raspon)			
Žene	32 (19-63)	58 (20-78)	<0,001[†]
Muškarci	31 (18-62)	41 (26-65)	0,002[†]
Trajanje bolesti prije uvođenja biološke terapije (godine)			
	4 (2-8)	7,5 (3-12)	0,015[†]
Lijek (N, udio)			
Infliksimumab	45 (0,68)	28 (0,61)	0,550 [#]
Adalimumab	21 (0,32)	18 (0,39)	
Doza lijeka (mg)			
Infliksimumab	400 (300-400)	280 (200-380)	<0,001[†]
Adalimumab	40 (40-40)	40 (40-40)	0,688 [†]
Razvoj protutijela (N, udio)			
Infliksimumab	6 (0,13)	12 (0,43)	0,010[#]
Adalimumab	3 (0,14)	2 (0,11)	1,000 [#]
Vrijeme do razvoja protutijela (mjeseci)			
Infliksimumab	17 (8-32)	8 (5-23)	0,153 [†]
Adalimumab	9 (7-94)*	4 (2-6)*	0,083 [†]
Postignuta remisija (N, udio)			
Infliksimumab	29 (0,64)	17 (0,61)	0,806 [#]
Adalimumab	10 (0,48)	14 (0,78)	0,098 [#]

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (za kvantitativne podatke) ili N (broj) i udio (za kategoričke podatke). Dob je prikazana kao medijan i raspon. *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. Za izračun razlika između dviju skupina bolesti (upalne bolesti crijeva i autoimune reumatoidne bolesti) korišteni su testovi: [#]χ-kvadrat test; [†]Mann-Whitney test. Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano.

4.2 Koncentracije biokemijskih parametara

4.2.1 Koncentracije C reaktivnog proteina, lijekova infliksimab i adalimumab te protutijela na te lijekove u svih bolesnika, podijeljeno prema vrsti bolesti

Koncentracije izmjerenih biokemijskih parametara CRP-a, infliksimaba i adalimumaba te protutijela na te lijekove kod svih bolesnika i prema vrsti bolesti prikazane su u tablici (Tablica 11).

Statistički značajno viša koncentracija CRP nakon 6 mjeseci praćenja izmjerena je u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima u odnosu na bolesnike s upalnim bolestima crijeva ($P = 0,040$). Koncentracija infliksimaba bila je značajno viša u bolesnika s upalnim bolestima crijeva ($P = 0,002$ i $<0,001$, nakon 6 i 12 mjeseci praćenja). Protutijela na infliksimab bila su viša u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima nego u bolesnika s upalnim bolestima crijeva ($P = 0,002$). Koncentracije adalimumaba i protutijela na adalimumab nisu se statistički razlikovale među skupinama bolesti (Tablica 11).

Tablica 11. Koncentracije CRP, infliksimaba i adalimumaba te protutijela na te lijekove u bolesnika s upalnim bolestima crijeva u odnosu na bolesnike s autoimunim reumatoidnim bolestima.

Biokemijski parametar (mjerna jedinica)	Upalne bolesti crijeva; N	Autoimune reumatoidne bolesti; N	P [#]
CRP prije terapije (mg/L), N=92	6,3 (2,4-32,7); N=56	11,4 (5,1-23,2); N=36	0,692
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=103	2,3 (0,7-6,2); N=57	4,1 (1,4-8,9); N=46	0,040
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=102	2,6 (1,1-6,9); N=60	5,1 (1,0-10,9); N=42	0,426
IFX nakon 6 mjeseci terapije ($\mu\text{g/mL}$), N=54	2,6 (1,3-5,1); N=28	0,7 (0,03-1,7); N=26	0,002
IFX nakon 12 mjeseci terapije ($\mu\text{g/mL}$), N=66	4,6 (2,2-9,5); N=40	0,7 (0,0-2,5); N=26	<0,001
Protutijela na IFX (ng/mL), N=73	0,0 (0,0-0,8); N=45	1,3 (0,1-45,9); N=28	0,002

Biokemijski parametar (mjerna jedinica)	Upalne bolesti crijeva; N	Autoimune reumatoidne bolesti; N	P[#]
ADM nakon 6 mjeseci terapije (µg/mL), N=21	6,6 (2,1-10,0); N=13	4,0 (1,3-5,5); N=8	0,246
ADM nakon 12 mjeseci terapije (µg/mL), N=22	8,2 (1,5-10,1); N=9	6,1 (4,8-8,5); N=13	0,841
Protutijela na ADM (ng/mL), N=39	0,0 (0,0-0,7); N=21	0,1 (0,0-0,5); N=18	0,343

ADM, adalimumab; CRP, C reaktivni protein; IFX, infliksimab; N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Mann-Whitney test je korišten za izračun razlika između dviju skupina bolesti (upalne bolesti crijeva i autoimune reumatoidne bolesti). Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano.

Koncentracije CRP-a izmjerene 6 i 12 mjeseci nakon početka terapije statistički se značajno razlikuju u odnosu na koncentracije izmjerene na početku terapije kod upalnih bolesti crijeva (P <0,001) i kod autoimunih reumatoidnih bolesti (P = 0,005) (Tablica 12).

Tablica 12. Razlike u koncentracijama CRP-a na početku terapije, nakon 6 i 12 mjeseci terapije ovisno o vrsti bolesti.

Vrsta bolesti	CRP₀ (mg/L); N	CRP₆ (mg/L); N	CRP₁₂ (mg/L); N	P[#]
Upalne bolesti crijeva	6,3 (2,4-32,7); N=56	2,3 (0,7-6,2); N=57	2,6 (1,1-6,9); N=60	<0,001
Autoimune reumatoidne bolesti	11,4 (5,1-23,2); N=36	4,1 (1,4-8,9); N=46	5,1 (1,0-10,9); N=42	0,005

CRP₀, koncentracija CRP prije početka terapije; CRP₆, koncentracija CRP nakon 6 mjeseci terapije; CRP₁₂, koncentracija CRP nakon 12 mjeseci terapije. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Kruskal-Wallis test je korišten za izračun razlika u koncentracijama na početku terapije te 6 i 12 mjeseci nakon terapije. Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano. *Post-hoc* testom prema Conoveru utvrđene su statistički značajne razlike koncentracija CRP₆ i CRP₁₂ u odnosu na koncentraciju prije početka terapije CRP₀.

Čak 45 % bolesnika s upalnim bolestima crijeva te 25 % bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima imalo je koncentracije CRP-a unutar referentnog intervala (<5 mg/L) prije početka

terapije biološkim lijekovima. Nakon 6 odnosno 12 mjeseci terapije trećina (ili više) bolesnika s upalnim bolestima crijeva i autoimunim reumatoidnim bolestima imali su povišene koncentracije CRP-a (Tablica 13).

Tablica 13. Udio bolesnika s koncentracijom CRP-a >5 mg/L u upalnim bolestima crijeva i autoimunim reumatoidnim bolestima.

CRP >5 mg/L, N_{ukupno}	Upalne bolesti crijeva (N₀=56, N₆=57, N₁₂=60) (N, udio)	Autoimune reumatoidne bolesti (N₀=36, N₆=46, N₁₂=42) (N, udio)	P[#]
Prije terapije, N ₀ =92	31 (0,55)	27 (0,75)	0,092
Nakon 6 mjeseci terapije, N ₆ =103	17 (0,30)	18 (0,39)	0,434
Nakon 12 mjeseci terapije, N ₁₂ =102	20 (0,33)	22 (0,52)	0,086

N₀, ukupan broj prije početka terapije; N₆, ukupan broj nakon 6 mjeseci terapije; N₁₂, ukupan broj nakon 12 mjeseci terapije. [#]χ²-kvadrat test je korišten za izračun razlika između dviju skupina bolesti (upalne bolesti crijeva i autoimune reumatoidne bolesti).

Kod upalnih bolesti crijeva koncentracija infliksimaba izmjerena 12 mjeseci nakon početka terapije bila je statistički značajno viša od koncentracije izmjerene nakon 6 mjeseci (P=0,043), dok se koncentracije kod autoimunih reumatoidnih bolesti nisu razlikovale. Koncentracije adalimumaba 6 i 12 mjeseci nakon terapije nisu se statistički značajno razlikovale kod upalnih bolesti crijeva ni kod autoimunih reumatoidnih bolesti (Tablica 14).

Tablica 14. Razlike u koncentracijama infliksimaba i adalimumaba nakon 6 i 12 mjeseci terapije ovisno o vrsti bolesti.

Vrsta bolesti	IFX ₆ (µg/mL), N	IFX ₁₂ (µg/mL); N	P [#]
Upalne bolesti crijeva	2,6 (1,3-5,1); N=28	4,6 (2,2-9,5); N=40	0,043
Autoimune reumatoidne bolesti	0,7 (0,03-1,7); N=26	0,7 (0,0-2,5); N=26	0,790
	ADM ₆ (µg/mL)	ADM ₁₂ (µg/mL)	P [#]
Upalne bolesti crijeva	6,6 (2,1-10,0); N=13	6,1 (1,0-9,6); N=9	1,000
Autoimune reumatoidne bolesti	4,0 (1,3-5,5); N=8	6,1 (4,8-8,5); N=13	0,128

ADM₆, koncentracija adalimumaba nakon 6 mjeseci terapije; ADM₁₂, koncentracija adalimumaba nakon 12 mjeseci terapije; IFX₆, koncentracija infliksimaba nakon 6 mjeseci terapije; IFX₁₂, koncentracija infliksimaba nakon 12 mjeseci terapije; N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Mann-Whitney test je korišten za izračun razlike u koncentracijama nakon 6 i 12 mjeseci terapije. Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano.

4.2.2 Koncentracije fekalnog kalprotektina u bolesnika s upalnim bolestima crijeva

Koncentracija fekalnog kalprotektina u bolesnika s upalnim bolestima crijeva nije se razlikovala nakon 12 mjeseci terapije u odnosu na koncentraciju nakon 6 mjeseci terapije (P = 0,620) (Tablica 15).

Tablica 15. Razlike u koncentracijama fekalnog kalprotektina nakon 6 i 12 mjeseci terapije u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Parametar (mjerna jedinica)	Nakon 6 mjeseci, N ₆ =25	Nakon 12 mjeseci, N ₁₂ =31	P [#]
Fekalni kalprotektin (mg/kg)	82 (20 – 1285)	181 (35 – 861)	0,620

N₆, broj ispitanika nakon 6 mjeseci terapije; N₁₂, broj ispitanika nakon 12 mjeseci terapije. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Mann-Whitney test je korišten za izračun razlike u koncentracijama nakon 6 i 12 mjeseci terapije.

4.2.3 Koncentracije vitamina D u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima

U bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima koncentracija vitamina D mjerena je prije terapije te nakon 3 i 9 mjeseci (Tablica 16). Nije utvrđena statistički značajna razlika u izmjerenim koncentracijama vitamina D.

Tablica 16. Razlike u koncentracijama vitamina D na početku terapije te nakon 6 i 12 mjeseci u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Parametar (mjerna jedinica)	Na početku terapije, N ₀ =25	Nakon 6 mjeseci, N ₆ =15	Nakon 12 mjeseci, N ₁₂ =19	P [#]
Vitamin D (nmol/L)	46 (36 – 60)	55 (44 – 63)	65 (41 – 79)	0,237

N₀, broj ispitanika na početku terapije; N₆, broj ispitanika nakon 6 mjeseci terapije; N₁₂, broj ispitanika nakon 12 mjeseci terapije. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Kruskal-Wallis test je korišten za izračun razlike u koncentracijama na početku terapije te nakon 6 i 12 mjeseci terapije.

4.2.4 Koncentracije lijekova i protutijela na lijekove prema postignutoj remisiji bolesti

Ukupno je remisiju postiglo 70 ispitanika (62,5 %), bez statistički značajne razlike u odnosu na skupinu bolesti (P=0,488) (Tablica 10). Statistički značajna razlika za postignutu remisiju nije primijećena ni u odnosu na vrstu lijeka (P=0,959) ili na spol (P=0,696) (Tablica 17).

Tablica 17. Remisija bolesti u odnosu na spol i vrstu lijeka.

Parametar, N	Remisija (N, udio)	Bez remisije (N, udio)	P [#]
Muškarci, N=52	34 (0,65)	18 (0,35)	0,696
Žene, N=60	36 (0,60)	24 (0,40)	
Infliksimab, N=73	46 (0,63)	27 (0,37)	0,959
Adalimumab, N=39	24 (0,62)	15 (0,38)	

Rezultati su prikazani kao broj (N) i udio. [#]χ²-kvadrat test.

U bolesnika s upalnim bolestima crijeva koncentracija infliksimaba nakon 6 mjeseci terapije bila je statistički značajno viša u bolesnika koji su postigli remisiju nego u bolesnika koji nisu postigli remisiju (P=0,029). Koncentracija adalimumaba nakon 6 i 12 mjeseci nije se razlikovala u bolesnika koji su postigli remisiju i kod onih bez postignute remisije. Koncentracija protutijela na infliksimab i adalimumab bila je statistički značajno viša u bolesnika koji nisu postigli remisiju (Tablica 18).

Tablica 18. Koncentracije lijekova i protutijela na lijekove u bolesnika s upalnim bolestima crijeva s postignutom remisijom u odnosu na bolesnike koji nakon godinu dana nisu postigli remisiju.

Parametar, N	Remisija; N	Bez remisije; N	P [#]
Infliksimab nakon 6 mjeseci (µg/mL), N=28	3,7 (2,2-8,4); N=16	1,3 (0,3-3,3); N=12	0,029
Infliksimab nakon 12 mjeseci (µg/mL), N=40	5,2 (3,8-7,4); N=26	3,5 (0,04-15,6); N=14	0,461
Protutijela na infliksimab (ng/mL), N=45	0,0 (0,0-0,3); N=16	1,5 (0,0-3,1); N=29	0,029
Adalimumab nakon 6 mjeseci (µg/mL), N=13	7,0 (4,4-9,1); N=4	6,3 (1,7-11,1); N=9	0,589
Adalimumab nakon 12 mjeseci (µg/mL), N=9	8,8 (4,0-9,7); N=6	0,03 (0,01-11,3)*; N=3	0,302
Protutijela na adalimumab (ng/mL), N=21	0,0 (0,0-0,0); N=10	0,7 (0,0-5,1); N=11	0,012

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; * rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test. Statistički značajni rezultati su ispisani podebljano.

U bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama infliksimaba, adalimumaba ni protutijela na lijekove u bolesnika koji su postigli remisiju u odnosu na one koji nakon 12 mjeseci terapije nisu postigli remisiju (Tablica 19).

Tablica 19. Koncentracije lijekova i protutijela na lijekove u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima s postignutom remisijom u odnosu na bolesnike koji nakon godinu dana nisu postigli remisiju.

Parametar, N	Remisija; N	Bez remisije; N	P [#]
Infliksimab nakon 6 mjeseci (µg/mL), N=26	1,2 (0,3-1,9); N=15	0,5 (0,0-0,9); N=11	0,146
Infliksimab nakon 12 mjeseci (µg/mL), N=26	1,2 (0,1-2,5); N=17	0,0 (0,0-1,5); N=9	0,068
Protutijela na infliksimab (ng/mL), N=28	0,6 (0,0-6,3); N=17	14,9 (0,3-63,2); N=11	0,187
Adalimumab nakon 6 mjeseci (µg/mL), N=8	4,5 (3,5-7,2); N=6	0,0 (0,0-4,2)*; N=3	0,101
Adalimumab nakon 12 mjeseci (µg/mL), N=13	6,3 (5,4-8,5); N=12	0,9; N=1	NP
Protutijela na adalimumab (ng/mL), N=18	0,1 (0,0-0,3); N=14	2,4 (0,0-6,2); N=4	0,589

N, broj; NP, nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

4.2.5 Koncentracije biokemijskih parametara u bolesnika koji su razvili protutijela na IFX ili ADM tijekom terapije

Od ukupnog broja bolesnika na terapiji infliksimabom i adalimumabom, njih 23 odnosno 20,5 % je razvilo protutijela na lijekove, od čega je 18 bolesnika razvilo protutijela na infliksimab, a 5 na adalimumab (Tablica 10).

U bolesnika s upalnim bolestima crijeva koji su razvili protutijela na antagoniste TNF-α nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji CRP prije početka terapije, kao ni 6 i 12 mjeseci nakon terapije u odnosu na bolesnike koji nisu razvili protutijela nakon godinu dana terapije. Koncentracije fekalnog kalprotektina mjerene su samo kod u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. S obzirom na mali broj bolesnika s protutijelima kojima je izmjerena koncentracija fekalnog kalprotektina, skupine nije moguće statistički obraditi (Tablica 20).

Tablica 20. Koncentracije biokemijskih parametara u bolesnika s upalnim bolestima crijeva koji su razvili protutijela na lijek tijekom terapije u odnosu na bolesnike koji nisu razvili protutijela.

Parametar (mjerna jedinica), N	Negativna protutijela; N	Pozitivna protutijela; N	P [#]
CRP prije terapije (mg/L), N=56	6,3 (2,2-28,4); N=49	6,8 (3,7-115,5); N=7	0,220
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=57	2,2 (0,6-6,6); N=50	3,6 (1,3-5,2); N=7	0,827
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=60	2,4 (1,0-6,3); N=52	7,2 (2,0-12,5); N=8	0,207
Fekalni kalprotektin nakon 6 mjeseci terapije (mg/kg), N=25	81,8 (21,6-1185,3); N=23	1341,25 (20-2662)*; N=2	NP
Fekalni kalprotektin nakon 12 mjeseci terapije (mg/kg), N=31	169,5 (32,9-721,4); N=28	708,9 (48,4-1950,9)*; N=3	0,349

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

U bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima koji su razvili protutijela na antagoniste TNF- α , izmjerene su statistički značajno više koncentracije CRP-a nakon 6 (P=0,002) i 12 (P=0,019) mjeseci terapije nego u bolesnika koji nisu razvili protutijela. Tako su u bolesnika koji nisu razvili protutijela izmjerene koncentracije CRP ispod 5 mg/L, odnosno 3,3 mg/L nakon 6 mjeseci te 2,6 mg/L nakon 12 mjeseci, dok su koncentracije CRP-a u bolesnika s pozitivnim protutijelima na lijekove bile iznad referentnih vrijednosti, odnosno 11,5 mg/L nakon 6 mjeseci te 10,5 mg/L nakon 12 mjeseci terapije (Tablica 21).

Koncentracije vitamina D mjerene su samo u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima, a nisu se razlikovale u bolesnika koji su razvili protutijela u odnosu na bolesnike koji nisu razvili protutijela na lijekove.

Tablica 21. Koncentracije biokemijskih parametara u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima koji su razvili protutijela na lijek tijekom terapije u odnosu na bolesnike koji nisu razvili protutijela.

Parametar (mjerna jedinica), N	Negativna protutijela; N	Pozitivna protutijela; N	P[#]
CRP prije terapije (mg/L), N=36	10,0 (3,9-19,6); N=23	15,1 (7,2-25,1); N=13	0,221
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=46	3,3 (0,7-6,2); N=32	11,5 (3,6-21,3); N=14	0,002
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=42	2,9 (0,7-8,6); N=31	10,5 (5,5-16,2); N=11	0,019
Vitamin D prije terapije (nmol/L), N=25	46,2 (36,2-63,0); N=18	43,0 (30,3-57,1); N=7	0,717
Vitamin D nakon 3 mjeseca terapije (nmol/L), N=15	53,5 (41,5-70,5); N=12	60,0 (46,0-64,0)*; N=3	0,665
Vitamin D nakon 9 mjeseci terapije (nmol/L), N=38	48,0 (39,8-79,1); N=13	67,0 (56,0-77,0); N=6	0,793

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon, *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test. Statistički značajni rezultati su ispisani podebljano.

4.3 Povezanost genotipa polimorfizama -238 G/A i -308 G/A gena *TNF- α* s biokemijskim parametrima

4.3.1 Distribucija genotipova polimorfizama -238 G/A i -308 G/A gena *TNF- α*

Većina ispitanika uključenih u istraživanje imali su divlji tip (GG) na oba položaja, -238 (*TNF- α* -238 GG) – 96 % te i -308 (*TNF- α* -308 GG) – 78 %. Nijedan ispitanik nije imao *TNF- α* -238 AA, dok je 5 ispitanika imalo *TNF- α* -308 AA varijantu genotipa. Frekvencije genotipova i alela za oba polimorfizma i ovisno o skupinama bolesti prikazane su u tablici (Tablica 22).

Tablica 22. Distribucija varijanti genotipova i alela polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip / Alel	SVI (N=112)	Upalne bolesti crijeva (N=66)	Autoimune reumatoidne bolesti (N=46)
<i>TNF-α</i> -238 GG (N, udio)	107 (0,96)	64 (0,97)	43 (0,94)
<i>TNF-α</i> -238 GA (N, udio)	5 (0,04)	2 (0,03)	3 (0,06)
<i>TNF-α</i> -238 AA (N, udio)	/	/	/
<i>TNF-α</i> -238 G (N, udio)	219 (0,98)	130 (0,99)	89 (0,97)
<i>TNF-α</i> -238 A (N, udio)	5 (0,02)	2 (0,01)	3 (0,03)
<i>TNF-α</i> -308 GG (N, udio)	88 (0,79)	52 (0,79)	36 (0,78)
<i>TNF-α</i> -308 GA (N, udio)	19 (0,17)	11 (0,17)	8 (0,17)
<i>TNF-α</i> -308 AA (N, udio)	5 (0,05)	3 (0,04)	2 (0,04)
<i>TNF-α</i> -308 G (N, udio)	195 (0,87)	115 (0,87)	80 (0,87)
<i>TNF-α</i> -308 A (N, udio)	29 (0,13)	17 (0,13)	12 (0,13)

Rezultati su prikazani N (broj) i udio.

Raspodjele genotipova za *TNF- α* -238 i *TNF- α* -308 nisu odstupale od Hardy-Weinbergove ravnoteže te su izračunate P vrijednosti od 1,000 za *TNF- α* -238 te 0,346 za *TNF- α* -308.

4.3.2 Povezanost koncentracije lijeka (IFX i ADM) u krvi i genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A

Izmjerene koncentracije infliksimaba i adalimumaba nakon 6 i 12 mjeseci nisu se statistički značajno razlikovale u bolesnika s upalnim bolestima crijeva ni autoimunim reumatoidnim bolestima ovisno o genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A (Tablica 23, Tablica 24).

Tablica 23. Koncentracija infliksimaba i adalimumaba u krvi 6 i 12 mjeseci nakon terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Lijek, N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
Infliksimab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=28	2,6 (1,3-4,7); N=27	9,8; N=1	NP
Infliksimab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=40	4,3 (2,1-10,2); N=39	6,9; N=1	NP
Adalimumab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=13	6,6 (2,1-10,0); N=13	/	NP
Adalimumab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=9	6,1 (1,0-9,6); N=9	/	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
Infliksimab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=28	2,6 (1,3-5,3); N=22	2,8 (1,4-3,4); N=6	0,955
Infliksimab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=40	5,2 (2,5-10,2); N=34	4,1 (0,6-6,5); N=6	0,531
Adalimumab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=13	6,5 (2,1-8,5); N=8	6,7 (1,8-12,8); N=5	0,608
Adalimumab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=9	8,2 (1,0-9,6); N=8	2,0; N=1	NP

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Mann-Whitney test.

Tablica 24. Koncentracija infliksimaba i adalimumaba u krvi 6 i 12 mjeseci nakon terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima.

Lijek, N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
Infliksimab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=26	0,7 (0,02-1,5); N=23	2,0 (0,7-2,1)*; N=3	0,260
Infliksimab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=26	0,6 (0,0-2,6); N=23	0,7 (0,0-1,4)*; N=3	0,746
Adalimumab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=8	4,0 (1,3-5,5); N=8	/	NP
Adalimumab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=13	6,1 (4,8-8,5); N=13	/	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
Infliksimab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=26	0,7 (0,03-1,4); N=20	1,1 (0,1-9,2); N=6	0,503
Infliksimab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=26	0,8 (0,0-2,3); N=20	0,6 (0,0-2,6); N=6	0,951
Adalimumab nakon 6 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=8	4,3 (0,0-6,5); N=6	3,2 (2,7-3,8)*; N=2	NP
Adalimumab nakon 12 mjeseci ($\mu\text{g/mL}$), N=13	6,1 (4,0-8,6); N=11	6,5 (5,5-7,5)*; N=2	NP

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

4.3.3 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s pojavom protutijela na infliksimab i adalimumab

Nisu zabilježene statistički značajne razlike u raspodjeli bolesnika s pozitivnim protutijelima na antagoniste *TNF- α* ovisno o genotipovima ili alelima polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A (Tablica 25).

Tablica 25. Pojava protutijela na lijekove ovisno o različitim genotipovima i alelima polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip / Alel	Negativna protutijela (N=89)	Pozitivna protutijela (N=23)	P
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=107	86	21	
<i>TNF-α</i> -238 GA, N=5	3	2	0,272 [#]
<i>TNF-α</i> -238 AA, N=0	0	0	
<i>TNF-α</i> -238 G, N=219	175	44	
<i>TNF-α</i> -238 A, N=5	3	2	0,273 [#]
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=88	69	19	
<i>TNF-α</i> -308 GA, N=19	15	4	0,508 [†]
<i>TNF-α</i> -308 AA, N=5	5	0	
<i>TNF-α</i> -308 G; N=195	153	42	
<i>TNF-α</i> -308 A, N=24	20	4	0,791 [#]

N, broj. Rezultati su izraženi kao broj. [#]Fisherov egzakti test, [†] χ -kvadrat test.

Nije pronađena statistički značajna razlika u pojavi protutijela na lijekove ovisno o genotipu polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A. Raspodjela genotipova *TNF- α* -238 i -308 nije bila statistički značajno različita ni u bolesnika s upalnim bolestima crijeva niti kod onih s autoimunim reumatoidnim bolestima kao niti u bolesnika koji su primali različite lijekove (Tablica 26, Tablica 27).

Tablica 26. Raspodjela bolesnika koji su razvili protutijela na infliksimab i adalimumab u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A, prema vrsti bolesti.

Vrsta bolesti, N	Protutijela	<i>TNF-α</i> -238 GG, N=107	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=5	P [#]
Upalne crijevne bolesti, N=66	Negativna	55	2	1,000
	Pozitivna	9	0	
Autoimune reumatoidne bolesti, N=46	Negativna	31	1	0,216
	Pozitivna	12	2	
		<i>TNF-α</i> -308 GG, N=88	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=24	
Upalne crijevne bolesti, N=66	Negativna	45	12	1,000
	Pozitivna	7	2	
Autoimune reumatoidne bolesti, N=46	Negativna	24	8	0,699
	Pozitivna	12	2	

N, broj. Rezultati su izraženi kao broj. [#]Fisherov egzakti test.

Tablica 27. Raspodjela bolesnika koji su razvili protutijela na infliksimab i adalimumab u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A, prema vrsti lijeka.

Lijek, N	Protutijela	<i>TNF-α</i> -238 GG, N=107	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=5	P [#]
Infliksimab, N=73	Negativna	52	3	0,591
	Pozitivna	16	2	
Adalimumab, N=39	Negativna	34	0	NP
	Pozitivna	5	0	
		<i>TNF-α</i> -308 GG, N=88	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=24	
Infliksimab, N=73	Negativna	44	11	1,000
	Pozitivna	15	3	
Adalimumab, N=39	Negativna	25	9	1,000
	Pozitivna	4	1	

N, broj; NP, nije primjenjivo. Rezultati su izraženi kao broj. [#]Fisherov egzakti test.

4.3.4 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom protutijela na lijek (anti-IFX i anti-ADM) u krvi

Izmjerene koncentracije protutijela na lijekove infliksimab i adalimumab nisu se razlikovale ovisno o genotipovima *TNF- α* -238 i -308 ni u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (Tablica 28) niti u onih s autoimunim reumatoidnim bolestima (Tablica 29).

Tablica 28. Koncentracija protutijela na lijekove u krvi u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Genotip, N	Koncentracija protutijela na lijek (ng/mL), N=66	P [#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=64	0,00 (0,00-0,76)	NP
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=2	0,08 (0,00-0,15)*	
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=52	0,00 (0,00-0,72)	0,553
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=14	0,02 (0,00-1,75)	

N, broj; NP, nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. # Mann-Whitney test.

Tablica 29. Koncentracija protutijela na lijekove u krvi u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima.

Genotip, N	Koncentracija protutijela na lijek (ng/mL), N=46	P [#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=43	0,23 (0,00-3,79)	0,097
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=3	15,3 (0,34-125)*	
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=36	0,34 (0,04-6,16)	0,468
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=10	0,27 (0,00-0,75)	

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. # Mann-Whitney test.

Nisu nađene ni statistički značajne razlike u koncentraciji protutijela na infliksimab (Tablica 30) i adalimumab (Tablica 31) u odnosu na genotipove.

Tablica 30. Koncentracija protutijela na infliksimab u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip, N	Koncentracija protutijela na IFX (ng/mL), N=73	P[#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=66	0,20 (0,00-2,19)	0,361
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=5	0,34 (0,11-42,73)	
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=59	0,15 (0,00-2,60)	0,405
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=14	0,30 (0,03-1,79)	

IFX, infliksimab; N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#] Mann-Whitney test.

Tablica 31. Koncentracija protutijela na adalimumab u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip, N	Koncentracija protutijela na ADM (ng/mL), N=39	P[#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=39	0,00 (0,00-0,54)	NP
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=0	/	
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=29	0,08 (0,00-0,60)	0,142
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=10	0,00 (0,00-0,00)	

ADM, adalimumab; N, broj; NP, nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#] Mann-Whitney test.

4.3.5 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom C-reaktivnog proteina u serumu

Koncentracije CRP-a izmjerene na početku terapije te 6 i 12 mjeseci nakon terapije antagonistima *TNF- α* nisu se razlikovale ovisno o genotipu polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika s upalnim bolestima crijeva (Tablica 32) niti u onih s autoimunim reumatoidnim bolestima (Tablica 33).

Tablica 32. Koncentracija CRP-a u serumu prije početka terapije te nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika s upalnim bolestima crijeva.

Parametar	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
CRP prije terapije (mg/L), N=56	5,9 (2,3-27,7); N=54	49,8 (45,8-53,7)*; N=2	NP
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=57	2,5 (0,7-6,3); N=56	0,9; N=1	NP
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=60	2,8 (1,4-7,2); N=58	0,6 (0,4-0,7)*; N=2	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
CRP prije terapije (mg/L), N=56	7,0 (2,9-41,4)	3,5 (1,5-9,8)	0,103
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=57	2,1 (0,6-6,7)	2,6 (0,8-2,9)	0,948
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=60	2,4 (0,8-8,3)	2,7 (1,7-4,9)	0,719

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

Tablica 33. Koncentracija CRP-a u serumu prije početka terapije te nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima.

Parametar	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
CRP prije terapije (mg/L), N=36	11,8 (5,3-24,3); N=31	7,5 (4,5-15,1)*; N=3	0,607
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=46	4,3 (1,4-10,9); N=43	3,2 (0,7-4,0)*; N=3	0,317
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=42	5,1 (1,1-11,4); N=39	1,0 (0,6-5,2)*; N=3	0,213
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
CRP prije terapije (mg/L), N=36	10,4 (4,3-23,4); N=31	15,1 (11,5-25,5); N=5	0,243
CRP nakon 6 mjeseci terapije (mg/L), N=46	4,2 (1,9-11,5); N=36	3,5 (0,7-8,8); N=10	0,424
CRP nakon 12 mjeseci terapije (mg/L), N=42	5,2 (1,1-10,1); N=32	1,7 (1,0-13,2); N=10	0,745

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

Koncentracije CRP-a izmjerene na početku terapije te 6 i 12 mjeseci nakon terapije infliksimabom nisu se razlikovale ovisno o genotipu polimorfizma *TNF- α* -308 G/A, a statistički značajno viša koncentracija CRP-a uočena je samo nakon 12 mjeseci terapije u bolesnika s genotipom GG polimorfizma *TNF- α* -238 G/A (P=0,022) (Tablica 34).

U bolesnika na terapiji adalimumabom nisu pronađene razlike u koncentracijama CRP-a na početku terapije kao niti nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A (Tablica 35).

Tablica 34. Koncentracija CRP-a u serumu prije početka terapije te nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika na terapiji infliksimabom.

Koncentracija CRP-a (mg/L), N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
Prije terapije, N=65	8,15 (2,5-29,1); N=60	15,1 (6,8-47,8); N=5	0,295
Nakon 6 mjeseci terapije, N=67	2,9 (1,3-8,1); N=63	2,1 (0,8-3,6); N=4	0,296
Nakon 12 mjeseci terapije, N=71	3,6 (1,2-8,7); N=66	0,7 (0,6-2,1); N=5	0,022
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
Prije terapije, N=65	8,4 (3,1-30,7); N=52	13,4 (2,5-24,6); N=13	0,915
Nakon 6 mjeseci terapije, N=67	3,6 (1,3-8,0); N=53	2,8 (1,1-5,7); N=14	0,455
Nakon 12 mjeseci terapije, N=71	3,1 (1,0-7,2); N=57	3,0 (1,0-10,5); N=14	0,977

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Mann-Whitney test. Statistički značajni rezultati su ispisani podebljano.

Tablica 35. Koncentracija CRP-a u serumu prije početka terapije te nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika na terapiji adalimumabom.

Koncentracija CRP-a (mg/L), N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
Prije terapije, N=27	7,7 (3,4-16,0); N=27	/	NP
Nakon 6 mjeseci terapije, N=36	3,2 (0,5-7,5); N=36	/	NP
Nakon 12 mjeseci terapije, N=31	3,3 (1,0-10,9); N=31	/	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
Prije terapije, N=27	10,7 (3,6-20,3); N=22	3,5 (1,5-5,6); N=5	0,061
Nakon 6 mjeseci terapije, N=36	3,9 (0,5-7,8); N=26	2,6 (0,6-3,8); N=10	0,750
Nakon 12 mjeseci terapije, N=31	5,0 (0,8-10,9); N=22	1,8 (1,36-6,8); N=8	0,679

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Mann-Whitney test.

U bolesnika s *TNF- α* genotipovima GG, GA -238 i GG -308 koncentracija CRP-a na početku terapije bila je statistički značajno viša u odnosu na koncentracije izmjerene nakon 6 i 12 mjeseci. U bolesnika s *TNF- α* -308 genotipom GA ili AA, početna koncentracija CRP-a nije se razlikovala od koncentracija izmjerenih nakon 6 ili 12 mjeseci (Tablica 36).

Tablica 36. Razlike u koncentracijama CRP-a na početku terapije, nakon 6 i 12 mjeseci terapije ovisno o genotipu polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip, N=82	CRP prije početka (mg/L)	CRP nakon 6 mjeseci (mg/L)	CRP nakon 12 mjeseci (mg/L)	P [#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=78	7,6 (2,6-24,7)	3,6 (1,4-8,1)	4,1 (1,5-9,3)	<0,001
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=4	11,3 (6,0-34,4)	2,1 (0,8-3,6)	0,9 (0,7-3,1)	0,007
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=64	9,7 (3,4-27,1)	3,9 (1,3-8,1)	5,0 (1,1-8,9)	<0,001
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=18	5,5 (2,1-16,0)	2,8 (1,2-5,7)	3,2 (1,4-10,5)	0,086

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Friedmanov parni test je korišten za praćenje razlike u koncentracijama CRP-a na početku terapije te 6 i 12 mjeseci nakon terapije kod istih bolesnika. Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano, koncentracije nakon 6 i 12 mjeseci razlikuju se u odnosu na koncentraciju prije početka terapije.

4.3.6 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom fekalnog kalprotektina

U bolesnika s upalnim bolestima crijeva statistički značajna razlika u koncentraciji fekalnog kalprotektina u ovisnosti o genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A nije uočena kod različitih vrsta lijekova (Tablica 37, Tablica 38).

Tablica 37. Koncentracija fekalnog kalprotektina nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika na terapiji infliksimabom.

Fekalni kalprotektin (mg/kg), N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N	P [#]
Nakon 6 mjeseci, N=17	81,8 (24,4-994,8); N=17	/	NP
Nakon 12 mjeseci, N=23	180,5 (40,6-777,3); N=21	37,0 (32,8-41,1)*; N=2	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	
Nakon 6 mjeseci, N=17	85,9 (31,0-1185,3); N=15	20,0 (20,0-20,0)*; N=2	NP
Nakon 12 mjeseci, N=23	158,4 (41,6-664,4); N=19	100,3 (20,0-1390,9); N=4	0,465

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

Tablica 38. Koncentracija fekalnog kalprotektina nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A u bolesnika na terapiji adalimumabom.

Fekalni kalprotektin (mg/kg), N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
Nakon 6 mjeseci, N=8	428,8 (20,0-5358,7); N=8	/	NP
Nakon 12 mjeseci, N=8	413,5 (40,7-989,2); N=8	/	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG, N=36	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=10	
Nakon 6 mjeseci, N=8	428,8 (20,0-4939,3); N=6	3704,4 (20,0-7388,7)*; N=2	NP
Nakon 12 mjeseci, N=8	48,4 (30,7-518,0); N=5	1066,4 (440,2-2597,0)*; N=3	0,053

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Mann-Whitney test.

Koncentracije fekalnog kalprotektina nisu se razlikovale nakon 6 i 12 mjeseci terapije ovisno o genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A (Tablica 39).

Tablica 39. Razlika u koncentracijama fKal nakon 6 i 12 mjeseci terapije ovisno o genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip, N=17	fKal nakon 6 mjeseci (mg/kg)	fKal nakon 12 mjeseci (mg/kg)	P [#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=17	309,1 (29,3-1835,9)	256,3 (40,7-929,7)	0,083
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=0	/	/	NP
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=14	604,3 (81,8-1560,4)	328,3 (48,4-912,0)	0,135
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=3	20 (20-7388,7)*	20 (20-2597,0)*	NP

fKal, fekalni kalprotektin; N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti. [#]Wilcoxonov parni test.

4.3.7 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s koncentracijom vitamina D u serumu

U bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima koncentracija vitamina D izmjerena je na početku terapije te 3 i 9 mjeseci nakon terapije. Nisu nađene razlike ovisno o genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A. Razlika nije primijećena ni ovisno o različitim lijekovima. Nijedan ispitanik nije imao genotip GA ili AA polimorfizma *TNF- α* -238 (Tablica 40).

Tablica 40. Koncentracija vitamina D na početku te 3 i 9 mjeseci nakon terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A i podijeljeno prema vrsti lijeka.

Koncentracija vitamina D (nmol/L)			
Lijek, vrijeme uzorkovanja, N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P [#]
Prije početka, N=25	46,0 (36,2-60,0); N=25	/	NP
Infliximab, N=17	46,0 (39,0-60,9); N=17	/	NP
Adalimumab, N=8	42,3 (35,6-56,5); N=8	/	NP
Nakon 3 mjeseca, N=15	55,0 (43,8-63,3); N=15	/	NP
Infliximab, N=10	57,5 (49,0-64,0); N=10	/	NP
Adalimumab, N=5	46,0 (37,5-60,5); N=5	/	NP
Nakon 9 mjeseci, N=19	65,0 (40,8-78,5); N=19	/	NP
Infliximab, N=13	65,0 (42,3-77,5); N=13	/	NP
Adalimumab, N=6	58,9 (28,0-86,0); N=6	/	NP
	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	P [#]
Prije početka, N=25	43,0 (36,2-57,0); N=21	55,5 (35,0-71,0); N=4	0,505
Infliximab, N=17	44,5 (40,0-66,5); N=14	52,0 (18,0-59,0)*; N=3	0,900
Adalimumab, N=8	38,2 (35,3-49,1); N=7	83,0; N=1	NP
Nakon 3 mjeseca, N=15	55,0 (41,5-76,0); N=11	53,5 (47,5-57,5); N=4	0,744
Infliximab, N=10	61,0 (50,5-76,0); N=7	55,0 (43,0-60,0)*; N=3	0,362
Adalimumab, N=5	43,0 (35,0-66,0); N=4	52,0; N=1	NP
Nakon 9 mjeseci, N=19	74,0 (44,8-79,3); N=15	41,5 (34,0-54,0); N=4	0,110
Infliximab, N=13	72,5 (48,0-79,0); N=10	43,0 (40,0-65,0)*; N=3	0,237
Adalimumab, N=6	74,0 (36,0-89,0); N=5	28,0; N=1	NP

N, broj; NP, nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti; #Mann-Whitney test.

Nije pronađena razlika u koncentracijama vitamina D kada se kod istih ispitanika pratila u tri mjerne točke, na početku terapije, nakon 3 i 9 mjeseci ovisno o genotipu ispitivanih polimorfizama (Tablica 41).

Tablica 41. Razlika u koncentracijama vitamina D na početku terapije te nakon 6 i 12 mjeseci u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima ovisno o genotipu polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip, N=14	Vitamin D prije početka (nmol/L)	Vitamin D nakon 3 mjeseca (nmol/L)	Vitamin D nakon 9 mjeseci (nmol/L)	P[#]
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=14	51,0 (42,0-77,0)	53,5 (43,0-64,0)	69,5 (40,0-98,0)	0,936
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=0	/	/	/	/
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=10	48,0 (42,0-77,0)	55,0 (40,0-80,0)	76,5 (48,0-78,4)	0,914
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=4	55,5 (35,0-71,0)	53,5 (47,5-57,5)	41,5 (34,0-54,0)	0,824

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. [#]Friedmanov parni test je korišten za praćenje razlike u koncentracijama vitamina D na početku terapije te 3 i 9 mjeseci nakon terapije kod istih bolesnika.

4.4 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s kliničkim odgovorom na terapiju

4.4.1 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s remisijom bolesti

Nije utvrđena razlika u broju bolesnika koji su postigli remisiju ovisno o različitim genotipovima, kao ni alelima polimorfizama *TNF- α* -238 G/A ni -308 G/A (Tablica 42).

Tablica 42. Postignuta remisija ovisno o genotipovima i alelima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip / Alel, N=112	Remisija (N)	Bez remisije (N)	P [#]
<i>TNF-α</i> -238 GG	65	42	0,155
<i>TNF-α</i> -238 GA	5	0	
<i>TNF-α</i> -238 G	135	84	0,160
<i>TNF-α</i> -238 A	5	0	
<i>TNF-α</i> -308 GG	55	33	0,992†
<i>TNF-α</i> -308 GA	12	7	
<i>TNF-α</i> -308 AA	3	2	
<i>TNF-α</i> -308 G	122	73	1,000
<i>TNF-α</i> -308 A	18	11	

N, broj. [#]Fisherov egzakti test, † χ^2 -kvadrat test

4.4.2 Povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s kliničkim odgovorom na terapiju u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima

Za procjenu kliničkog odgovora u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima mjereni su parametri DAS28, BASDAI (za ankilozantni spondilitis) i VAS. Nije pronađena razlika u vrijednostima parametara u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A (Tablica 43).

U ispitanika s genotipom GG na oba položaja (*TNF- α* -238 i -308) vrijednosti DAS28-CRP, BASDAI i VAS parametara bili su statistički značajno niže 6 i 12 mjeseci nakon terapije od vrijednosti izmjerenih na početku terapije. Bolesnicima s ankilozantnim spondilitisom, koji su nositelji genotipa GA *TNF- α* -308, nakon 6 i 12 mjeseci terapije statistički se značajno smanjio BASDAI indeks u odnosu na vrijednosti na početku terapije biološkim lijekovima.

U bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima koji su nositelji *TNF- α* -238 GA genotipa, nije došlo do statistički značajnog poboljšanja nijednog kliničkog parametra u odnosu na stanje prije terapije (Tablica 44).

Tablica 43. Klinički odgovor u parametrima DAS28-CRP, BASDAI i VAS prije početka te nakon 6 i 12 mjeseci terapije u odnosu na genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Klinički parametar, N	<i>TNF-α</i> -238 GG; N	<i>TNF-α</i> -238 GA/AA; N	P#
DAS28 prije početka, N=24	6,1 (4,5-6,3); N=22	5,0 (3,9-6,1)*; N=2	NP
DAS28 nakon 6 mjeseci, N=30	3,6 (2,0-4,3); N=28	2,3 (1,0-3,5)*; N=2	NP
DAS28 nakon 12 mjeseci, N=26	3,8 (2,8-4,8); N=26	3,8 (1,6-6,1)*; N=2	NP
BASDAI prije početka, N=16	5,9 (3,3-6,7); N=14	7,4 (7,1-7,7)*; N=2	NP
BASDAI nakon 6 mjeseci, N=17	3,1 (1,4-4,1); N=15	5,0 (2,5-7,4)*; N=2	NP
BASDAI nakon 12 mjeseci, N=15	3,3 (1,6-4,7); N=13	3,0 (0,9-5,0)*; N=2	NP
VAS prije početka, N=32	7 (6-8); N=29	7 (6-7)*; N=3	0,974
VAS nakon 6 mjeseci, N=30	4 (2-6); N=27	1 (1-8)*; N=3	0,579
VAS nakon 12 mjeseci, N=31	3 (2-5); N=28	3 (1-6)*; N=3	0,788

Klinički parametar, N	<i>TNF-α</i> -308 GG; N	<i>TNF-α</i> -308 GA/AA; N	P[#]
DAS28 prije početka, N=24	6,2 (4,5-6,4); N=18	5,4 (4,2-6,1); N=6	0,230
DAS28 nakon 6 mjeseci, N=30	3,6 (2,6-4,3); N=21	3,5 (2,0-4,3); N=9	0,910
DAS28 nakon 12 mjeseci, N=26	3,7 (3,0-5,0); N=18	3,9 (2,1-5,3); N=8	0,956
BASDAI prije početka, N=16	6,2 (3,8-7,6); N=13	6,2 (0,6-6,5)*; N=3	0,420
BASDAI nakon 6 mjeseci, N=17	3,1 (1,6-4,6); N=14	3,3 (0,2-3,9)*; N=3	0,571
BASDAI nakon 12 mjeseci, N=15	3,3 (1,6-4,8); N=12	3,4 (0,9-6,0)*; N=3	0,718
VAS prije početka, N=32	7 (6-8); N=27	6 (6-9); N=5	0,635
VAS nakon 6 mjeseci, N=30	3,5 (2-6); N=25	4 (2,5-6); N=5	0,635
VAS nakon 12 mjeseci, N=31	3 (2-6); N=25	3 (1-5); N=6	0,669

N, broj; NP nije primjenjivo. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon; *rezultati su prikazani kao medijan i raspon od najmanje do najveće vrijednosti; [#]Mann-Whitney test.

Tablica 44. Razlika u vrijednostima parametara za kliničku procjenu bolesti u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima na početku terapije, nakon 6 i 12 mjeseci terapije ovisno o genotipu polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip, N	Prije početka	Nakon 6 mjeseci	Nakon 12 mjeseci	P
	DAS28			
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=16	5,9 (4,3-6,3)	3,8 (3,3-4,3)	3,8 (3,1-4,4)	0,004
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=2	4,9 (3,9-6,1)	2,2 (1,0-3,5)	3,8 (1,6-6,1)	0,071
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=12	6,1 (4,2-6,4)	3,6 (3,1-4,2)	3,5 (2,8-4,2)	<0,001
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=6	5,4 (4,2-6,1)	4,0 (3,5-5,2)	4,2 (3,8-6,1)	0,964
BASDAI				
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=12	6,2 (3,9-7,2)	3,2 (0,8-4,1)	3,3 (1,6-4,6)	<0,001
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=2	7,4 (7,1-7,7)	5,0 (2,5-7,4)	3,0 (0,9-5,0)	0,250
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=11	6,7 (4,7-7,7)	3,1 (1,6-5,0)	3,3 (1,5-4,8)	<0,001
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=3	6,2 (2,0-6,4)	3,3 (1,0-3,8)	3,4 (1,5-5,4)	0,049
VAS				
<i>TNF-α</i> -238 GG, N=19	7 (6-8)	4 (2-6)	3 (3-5)	<0,001
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA, N=3	7 (6-7)	1 (1-6)	3 (1,5-5)	0,367
<i>TNF-α</i> -308 GG, N=17	7 (6-8)	3,5 (2-5)	3 (3-5)	<0,001
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA, N=5	6 (6-8,5)	4 (2,5-6)	3 (2,5-5,5)	0,001

N, broj. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. #Friedmanov parni test je korišten za praćenje razlike u vrijednostima kliničkih ocjena na početku terapije te 6 i 12 mjeseci nakon terapije kod istih bolesnika. Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$) prikazane su podebljano, vrijednosti nakon 6 i 12 mjeseci razlikuju se u odnosu na vrijednosti prije početka terapije.

U sklopu preliminarnog istraživanja uspoređeni su biokemijski parametri (CRP i IFX) te klinički parametri (broj bolnih i otečenih zglobova) u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima u odnosu na koncentraciju vitamina D na početku terapije te 9 mjeseci nakon terapije. U bolesnika s koncentracijom vitamina D na početku terapije ispod 50 nmol/L, (bolesnici s nedostatkom vitamina D) pokazan je statistički značajno veći pad kliničkih parametara DAS28CRP i VAS u odnosu na bolesnike s koncentracijom vitamina D preko 50 nmol/L (Tablica 45).

Tablica 45. Usporedba biokemijskih i kliničkih parametara na početku i nakon 9 mjeseci terapije u skupinama bolesnika s koncentracijom vitamina D ispod i iznad preporučene koncentracije vitamina D (≥ 50 nmol/L) u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima.

	Vitamin D <50 nmol/L, N=13			Vitamin D ≥ 50 nmol/L, N=10		
	Na početku terapije	Nakon 9 mjeseci	P#	Na početku terapije	Nakon 9 mjeseci	P#
CRP (mg/L)	4,0 (3,2-5,8)	5,4 (2,4-19,5)	0,068	3,4 (0,9-8,6)	3,4 (0,8-18,6)	0,625
IFX ($\mu\text{g/mL}$)	20,26 (16,79-26,65)	0,61 (0,00-2,11)	<0,001	18,30 (13,72-25,00)	0,59 (0,04-1,37)	0,004
DAS28	6,07 (5,36-6,24)	3,42 (3,32-4,58)	0,020	5,95 (4,46-6,47)	3,95 (3,40-4,71)	0,055
VAS	7 (6-7,5)	4 (2,5-6)	0,006	6 (5-7)	4,5 (3-7)	0,156

CRP, C reaktivni protein; DAS28, ocjena aktivnosti bolesti (engl. *Disease Activity Score*); IFX, infliksimab; N, broj; VAS, vizualna analogna skala. Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. #Mann-Whitney test. Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$) prikazane su podebljano.

Raspodjela genotipova polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A nije se statistički značajno razlikovala između bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima kojima je prije početka terapije utvrđen nedostatak vitamina D (koncentracija <50 nmol/L) i bolesnika koji su imali koncentraciju vitamina D iznad 50 nmol/L (Tablica 46).

Tablica 46. Raspodjela bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima deficijentnih na vitamin D ovisno o genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Genotip	Vitamin D <50 nmol/l	Vitamin D ≥ 50 nmol/l	P#
<i>TNF-α</i> -238 GG	14	11	NP
<i>TNF-α</i> -238 GA/AA	/	/	/
<i>TNF-α</i> -308 GG	13	8	0,288
<i>TNF-α</i> -308 GA/AA	1	3	

N, broj; NP nije primjenjivo. #Fisherov egzaktni test.

4.5 Multivarijatna regresijska analiza

U prvom koraku načinjena je univarijatna regresijska analiza kako bi se ustanovili čimbenici koji bi mogli predvidjeti učinkovitost terapije antagonistima TNF- α , odnosno održavanje terapijske koncentracije lijeka u krvi, pojavu protutijela na lijek i remisiju bolesti izraženu koncentracijom CRP-a i kliničkim ocjenama. Nakon univarijatne regresijske analize, načinjena je multivarijatna u koju su uključeni statistički značajni prediktori, s P vrijednostima $<0,05$.

Ovisno o kliničkom parametru koji je definiran kao konačan ishod, napravljeni su modeli za predviđanje snižene koncentracije antagonista TNF- α (Tablica 47), pojave protutijela na lijek (Tablica 48) i remisije bolesti (Tablica 49).

4.5.1 Regresijski modeli za predviđanje kliničkih ishoda

Univarijatnom analizom kao statistički značajni prediktori za predviđanje terapijskih koncentracija lijeka pokazali su se muški spol i dijagnoza reumatoidnog artritisa odnosno svih reumatoidnih bolesti. Prema rezultatima, ispitanici muškog spola imaju više izgleda postići terapijske koncentracije lijeka nakon 12 mjeseci terapije. Bolesnici s reumatoidnim bolestima, posebice s reumatoidnim artritisom imaju manje izgleda da će postići terapijske koncentracije bioloških lijekova. Za razliku od RA, bolesnici s ulceroznim kolitisom imaju preko 4 puta veći izgled postići prihvatljivu terapijsku koncentraciju lijekova.

Multiplom logističkom regresijskom analizom jedino se dijagnoza reumatoidnog artritisa izlučila kao prediktor terapijskih koncentracija IFX i ADM [OR (95 % CI) = 0,20 (0,05-0,83), P=0,026. Vrijednost omjera izgleda manja od 1 znači da bolesnici s reumatoidnim artritisom imaju statistički značajno manje izgleda postići terapijske koncentracije bioloških lijekova infliksimaba i adalimumaba. Ostale varijable izgubile su statističku značajnost i ne mogu se smatrati prediktorima za predviđanje postizanja terapijske koncentracije lijeka nakon 12 mjeseci terapije. Uključenjem navedene varijable moguće je opisati čak 67,9 % slučajeva, uz površinu ispod krivulje od AUC=0,735 (95 % CI 0,644-0,814) (Tablica 47).

Statistički značajni prediktori za izradu regresijskog modela za predviđanje pojave protutijela na infliksimab ili adalimumab dobiveni univarijatom regresijskom analizom su bili spol, dob, autoimune reumatoidne bolesti, posebice reumatoidni artritis te koncentracije CRP-a izmjerene nakon 6 i 12 mjeseci. Muški spol statistički značajno smanjuje izgled za pojavom protutijela s omjerom 0,25 (95 % CI 0,08-0,73). Od ostalih navedenih parametara koji statistički značajno povećavaju izgled za pojavom protutijela, dijagnoza reumatoidnog artritisa povećava izgled za pojavom protutijela na lijekove preko 5 puta uz OR 5,36 i 95 % CI 1,96-14,68. Uvrštavanjem svih vrijednosti u multivarijatom regresijsku analizu, gubi se statistička značajnost parametara (Tablica 48).

Univarijatom regresijskom analizom za predviđanje remisije bolesti kao jedini statistički značajan parametar pokazala se koncentracija CRP-a nakon 6 i 12 mjeseci uz niske OR. Ostali parametri nisu bili statistički značajni te nisu pridonosili regresijskom modelu za predviđanje remisije bolesti (Tablica 49). Uvrštavanjem parametara u multivarijatom regresijsku analizu, izgubila se statistička značajnost parametara.

Tablica 47. Regresijski model za predviđanje terapijskih koncentracija lijeka nakon 12 mjeseci terapije ($\geq 3 \mu\text{g/mL}$ za IFX i $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ za ADM).

Parametri	Univarijatna regresijska analiza			Multivarijatna regresijska analiza		
	OR (95 % CI)	P [#]	AUC (95 % CI)	OR (95 % CI)	P [†]	AUC (95 % CI)
Spol, M	2,47 (1,15-5,31)	0,021	0,610 (0,514-0,701)	2,28 (0,95-5,51)	0,066	
Dob	0,98 (0,96-1,00)	0,094	0,590 (0,493-0,682)	1,02 (0,98-1,06)	0,298	
Dijagnoza: RA	0,16 (0,05-0,46)	0,001	0,641 (0,545-0,729)	0,20 (0,05-0,83)	0,026	
AS	1,01 (0,32-3,22)	0,983	0,501 (0,405-0,597)	/	/	
PsA	1,09 (0,28-4,30)	0,901	0,503 (0,407-0,599)	/	/	
CD	1,42 (0,66-3,04)	0,365	0,542 (0,446-0,637)	/	/	
UC	4,36 (1,35-14,05)	0,014	0,595 (0,498-0,687)	2,80 (0,77-10,26)	0,120	
Skupina bolesti, reumatoidne	0,31 (0,14-0,69)	0,004	0,637 (0,541-0,726)	0,70 (0,21-2,33)	0,562	
Trajanje bolesti do početka terapije	0,98 (0,93-1,03)	0,363	0,597 (0,500-0,688)	/	/	
CRP prije početka	1,01 (1,00- 1,03)	0,174	0,518 (0,411-0,623)	/	/	0,735
CRP nakon 6 mjeseci	0,98 (0,95- 1,01)	0,172	0,680 (0,581-0,768)	/	/	(0,644-0,814)
CRP nakon 12 mjeseci	0,96 (0,92-1,00)	0,077	0,671 (0,571-0,761)	/	/	
fKAL nakon 6 mjeseci	1,00 (1,00-1,01)	0,320	0,580 (0,368-0,773)	/	/	
fKAL nakon 12 mjeseci	1,00 (1,00-1,00)	0,465	0,577 (0,388-0,752)	/	/	
Vitamin D prije početka	1,00 (0,96-1,03)	0,944	0,519 (0,313-0,722)	/	/	
Vitamin D nakon 3 mjeseca	1,00 (0,95-1,02)	0,928	0,611 (0,333-0,844)	/	/	
Vitamin D nakon 9 mjeseci	1,01 (0,98-1,05)	0,446	0,622 (0,375-0,830)	/	/	
TNF-α -238 GA	0,56 (0,09-3,51)	0,539	0,512 (0,416-0,608)	0,52 (0,07-3,90)	0,525	
TNF-α -308 GA/AA	0,67 (0,27-1,67)	0,392	0,533 (0,437-0,628)	0,58 (0,21-1,61)	0,300	

95 % CI, 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*) AS, ankilozantni spondilitis; AUC, površina ispod krivulje (engl. *area under curve*); CRP, C reaktivni protein; CD, Crohnova bolest; fKal, fekalni kalprotektin, M, muški spol; OR, omjer izgleda (engl. *odds ratio*); PsA, psorijazni artritis; RA, reumatoidni artritis; UC, ulcerozni kolitis. [#]Univarijatna logistička regresija; [†]multivarijatna logistička regresija. Statistički značajne P vrijednosti ($P < 0,05$) prikazane su podebljano.

Tablica 48. Regresijski model za predviđanje pojave protutijela na lijek.

Parametri	Univarijatna regresijska analiza			Multivarijatna regresijska analiza		
	OR (95 % CI)	P [#]	AUC (95 % CI)	OR (95 % CI)	P [†]	AUC (95 % CI)
Spol, M	0,25 (0,08-0,73)	0,011	0,655 (0,560-0,743)	0,51 (0,13-1,98)	0,334	
Dob	1,03 (1,00-1,06)	0,040	0,635 (0,539-0,724)	1,00 (0,96-1,06)	0,824	
Dijagnoza: RA	5,36 (1,96-14,68)	0,001	0,666 (0,571-0,752)	4,93 (0,74-32,77)	0,099	
AS	0,68 (0,14-3,28)	0,627	0,518 (0,422-0,614)	/	/	
PsA	0,46 (0,05-3,88)	0,476	0,523 (0,427-0,618)	/	/	
CD	0,72 (0,28-1,86)	0,493	0,540 (0,443-0,634)	/	/	
UC	0,17 (0,02-1,32)	0,090	0,585 (0,488-0,677)	/	/	
Skupina bolesti, ARD	2,77 (1,08-7,11)	0,034	0,625 (0,528-0,714)	0,63 (0,10-3,82)	0,615	
Trajanje bolesti do početka terapije	1,01 (0,95-1,06)	0,832	0,559 (0,462-0,653)	/	/	
CRP prije početka	1,01 (1,00-1,03)	0,167	0,615 (0,507-0,714)	/	/	
CRP nakon 6 mjeseci	1,03 (1,00-1,06)	0,025	0,706 (0,608-0,792)	1,01 (0,96-1,07)	0,682	0,761
CRP nakon 6 mjeseci ≥5 mg/L	2,66 (1,00-7,08)	0,050	0,616 (0,515-0,710)	0,60 (0,09-4,17)	0,602	(0,661-0,843)
CRP nakon 12 mjeseci	1,06 (1,01-1,11)	0,018	0,701 (0,602-0,787)	1,04 (0,96-1,26)	0,308	
CRP nakon 12 mjeseci ≥5 mg/L	4,03 (1,39-11,73)	0,010	0,667 (0,567-0,758)	2,64 (0,46-15,05)	0,274	
fKAL nakon 6 mjeseci	1,00 (1,00-1,00)	0,859	0,500 (0,295-0,705)	/	/	
fKAL nakon 12 mjeseci	1,00 (1,00-1,00)	0,907	0,667 (0,475-0,825)	/	/	
Vitamin D prije početka	0,98 (0,94-1,03)	0,472	0,548 (0,338-0,746)	/	/	
Vitamin D nakon 3 mjeseca	1,00 (0,94-1,06)	0,871	0,583 (0,308-0,825)	/	/	
Vitamin D nakon 9 mjeseci	1,01 (0,97-1,05)	0,671	0,538 (0,299-0,765)	/	/	
TNF-α -238 GA	2,73 (0,43-17,39)	0,288	0,527 (0,430-0,622)	10,38 (0,90-119,78)	0,061	
TNF-α -308 GA/AA	0,73 (0,22-2,38)	0,598	0,525 (0,429-0,621)	0,91 (0,21-3,90)	0,894	

95 % CI, 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*); ARD, autoimune reumatoidne bolesti; AS, ankilozantni spondilitis; AUC, površina ispod krivulje (engl. *area under curve*); CRP, C reaktivni protein; CD, Crohnova bolest; fKAL, fekalni kalprotektin, M, muški spol; OR, omjer izgleda (engl. *odds ratio*); PsA, psorijazni artritis; RA, reumatoidni artritis; UC, ulcerozni kolitis. [#]Univarijatna logistička regresija; [†]multivarijatna logistička regresija. Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano.

Tablica 49. Regresijski model za predviđanje remisije bolesti.

Parametri	Univarijatna regresijska analiza			Multivarijatna regresijska analiza		
	OR (95 % CI)	P [#]	AUC (95 % CI)	OR (95 % CI)	P [†]	AUC (95 % CI)
Spol, M	1,26 (0,58-2,72)	0,557	0,529 (0,432-0,624)	0,89 (0,35-2,27)	0,813	
Dob	1,00 (0,98-1,03)	0,812	0,529 (0,433-0,624)	/	/	
Dijagnoza: RA	0,64 (0,26-1,60)	0,343	0,538 (0,441-0,633)	/	/	
AS	3,73 (0,78-17,73)	0,098	0,555 (0,458-0,649)	/	/	
PsA	2,22 (0,44-11,24)	0,334	0,526 (0,430-0,621)	/	/	
CD	1,04 (0,48-2,27)	0,921	0,505 (0,409-0,601)	/	/	
UC	0,53 (0,20-1,42)	0,207	0,548 (0,451-0,642)	/	/	
Skupina bolesti, reumatoidne	1,43 (0,65-3,15)	0,373	0,543 (0,446-0,637)	/	/	
Trajanje bolesti do početka terapije	0,99 (0,94-1,03)	0,520	0,545 (0,448-0,640)	/	/	
CRP prije početka	1,00 (0,99-1,01)	0,938	0,476 (0,370-0,582)	/	/	
CRP nakon 6 mjeseci	0,96 (0,92-0,99)	0,023	0,679 (0,580-0,768)	1,00 (0,95-1,05)	0,991	0,731
CRP \geq 5 mg/L nakon 6 mjeseci	0,29 (0,12-0,68)	0,005	0,639 (0,539-0,732)	0,73 (0,18-2,91)	0,660	(0,629-0,818)
CRP nakon 12 mjeseci	0,90 (0,84-0,96)	0,001	0,729 (0,632-0,812)	0,89 (0,81-0,99)	0,029	
CRP \geq 5 mg/L nakon 12 mjeseci	0,33 (0,14-0,76)	0,008	0,633 (0,532-0,726)	1,65 (0,39-6,93)	0,496	
fKAL nakon 6 mjeseci	1,00 (1,00-1,00)	0,095	0,792 (0,584-0,927)	/	/	
fKAL nakon 12 mjeseci	1,00 (1,00-1,00)	0,745	0,756 (0,570-0,892)	/	/	
Vitamin D prije početka	0,99 (0,95-1,02)	0,463	0,596 (0,383-0,786)	/	/	
Vitamin D nakon 3 mjeseca	0,99 (0,94-1,04)	0,640	0,536 (0,268-0,789)	/	/	
Vitamin D nakon 9 mjeseci	0,98 (0,95-1,02)	0,375	0,633 (0,385-0,838)	/	/	
TNF- α -238 GA	/ (0,00-0,00)	0,995	0,536 (0,439-0,630)	/ (0,00-0,00)	0,993	
TNF- α -308 GA/AA	1,00 (0,39-2,54)	1,000	0,500 (0,404-0,596)	0,91 (0,31-2,70)	0,861	

95 % CI, 95 % interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*) AS, ankilozantni spondilitis; AUC, površina ispod krivulje (engl. *area under curve*); CRP, C reaktivni protein; CD, Crohnova bolest; fKAL, fekalni kalprotektin, M, muški spol; OR, omjer izgleda (engl. *odds ratio*); PsA, psorijazni artritis; RA, reumatoidni artritis; UC, ulcerozni kolitis. [#]Univarijatna logistička regresija; [†]multivarijatna logistička regresija. Statistički značajne P vrijednosti (P<0,05) prikazane su podebljano.

5 RASPRAVA

U ovom radu ispitana je povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s odgovorom na terapiju i učinkom liječenja antagonistima *TNF- α* , infliksimabom i adalimumabom kod 112 bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima i upalnim bolestima crijeva.

Utvrđeno je da je više od 60 % ispitivanih bolesnika na terapiji antagonistima *TNF- α* postiglo remisiju bolesti što je, u odnosu na prethodna istraživanja, veći postotak bolesnika s remisijom. U velikoj meta-analizi provedenoj na istraživanjima objavljenim od 2012. do 2019. godine u bolesnika s upalnim bolestima crijeva nakon godinu dana terapije antagonistima *TNF- α* utvrđena je remisija u 49 % bolesnika s Crohnovom bolešću i 44 % s ulceroznim kolitisom (100). Britansko društvo za registar bioloških lijekova u reumatologiji (engl. *British Societe for Rheumatology Biologics Registru for Rheumatoid Arthritis*, BSRBR-RA) u razdoblju od 2001. do 2013. godine provelo je istraživanje o učestalosti remisije kod otprilike 14000 bolesnika na terapiji biološkim lijekovima s autoimunim reumatoidnim bolestima. Za razliku od upalnih bolesti crijeva, postotak bolesnika s reumatoidnim artritismom koji su postigli remisiju, iznosio je do 30 % (101). Navedeno istraživanje provedeno je tijekom dva razdoblja, između 2001. i 2010. godine te od 2010. do 2013. godine, te je u drugom razdoblju uočen statistički značajan porast udjela bolesnika s remisijom i sniženom aktivnošću bolesti. Opisano istraživanje provedeno je prije gotovo 10 godina, pa se može pretpostaviti da je udio bolesnika na terapiji biološkim lijekovima koji uspijevaju postići remisiju bolesti tijekom godina dodatno rastao. Povećanje udjela bolesnika u remisiji unatrag nekoliko godina može se tumačiti boljim algoritmima za liječenje te ranijim uvođenjem biološke terapije odnosno antagonista *TNF- α* . To je mogući razlog relativno visokog udjela ispitanika koji su postigli remisiju u našem istraživanju.

Kao odgovor na terapiju infliksimabom i adalimumabom praćene su koncentracije ovih lijekova u krvi, protutijela na lijekove te upalnih pokazatelja CRP-a i fekalnog kalprotektina. Osim biokemijskih, praćeni su i klinički pokazatelji autoimunih reumatoidnih bolesti i upalnih bolesti crijeva.

Protutijela na biološke lijekove najčešće su usmjerena na hipervarijabilnu regiju imunoglobulina, odnosno na regiju koja određuje komplementarnost (engl. *Complementarity Determining Region*, CDR). Protutijela na lijekove u preko 90 % slučajeva su neutralizirajuća

što znači da sprječavaju vezanje lijeka (anti-TNF α) na ciljne molekule što direktno utječe na djelovanje lijeka. Iz navedenog razloga etanercept je najmanje imunogeničan lijek od svih bioloških lijekova jer je to dimerni fuzijski protein vezan za Fc regiju humanog IgG1, čime se izbjegava prisutnost imunogenične CDR (102). Razvoj protutijela na lijek može dovesti do smanjene terapijske učinkovitosti lijeka ili do pojačanog rizika od nuspojava lijeka, koje se najčešće očituju kao reakcije hiperosjetljivosti na lijek. Osim neutralizirajućih protutijela koja se vežu na CDR regiju, mogu se razviti i protutijela koja nisu neutralizirajuća već stvaraju imunosne komplekse te mijenjaju bioraspodjelu lijeka odnosno rezultiraju povećanim uklanjanjem iz organizma što dovodi do smanjene koncentracije lijeka u krvi (103). Od ukupnog broja ispitanika uključenih u naše istraživanje ukupno je 24 % bolesnika na terapiji infliksimabom razvilo protutijela, 13 % s upalnim bolestima crijeva te čak 43 % s autoimunim reumatoidnim bolestima. Od bolesnika na terapiji adalimumabom ukupno je njih 13 % razvilo protutijela na lijek (14 % s upalnim bolestima crijeva i 11 % s autoimunim reumatoidnim bolestima). Dobiveni rezultati slažu se s prethodno objavljenom meta-analizom u kojoj je iz rezultata čak 68 istraživanja vidljiv sličan postotak bolesnika s protutijelima. Prema rezultatima Thomasa i suradnika 25,3 % bolesnika na terapiji infliksimabom i 14,1 % bolesnika na terapiji adalimumabom je razvilo protutijela na lijek (83).

Određivanje koncentracije protutijela na lijekove u serumu može biti ograničeno visokim koncentracijama lijeka zbog čega se stvaraju imunosni kompleksi između lijeka i protutijela na lijek. U tom slučaju visoke koncentracije lijeka interferiraju točnom određivanju koncentracije protutijela te je moguće da su izmjerene koncentracije protutijela lažno snižene u odnosu na stvarne koncentracije (104).

Koncentracija CRP-a je već nakon 6 mjeseci terapije antagonistima TNF- α značajno bila značajno niže u svih bolesnika na terapiji. CRP je jedan od ključnih biljega sistemske upale kod reumatoidnog artritisa (105). U ovom istraživanju u većine bolesnika s postignutom remisijom koncentracije CRP-a prije početka terapije bile su blago povišene, između 8 i 32 mg/L, dok su nakon 6-12 mjeseci terapije koncentracije pale ispod 5 mg/L. Brojni čimbenici mogu utjecati na koncentraciju CRP-a, kao primjerice, genotip polimorfizama gena *CRP*, udio masnog tkiva, koncentracije hormona u organizmu, kvaliteta prehrane te stres (106, 107). Unatoč tome, određivanje koncentracije CRP-a ključno je za praćenje aktivnosti bolesti te se nalazi u većini ocjena koji služe za izračun aktivnosti ili remisije bolesti (108).

Povišena koncentracija CRP-a može upućivati i na akutnu ili kroničnu upalu u gastrointestinalnom traktu. Kod aktivne Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa mogu se uočiti koncentracije CRP-a veće od 20 mg/L ili čak 40 mg/L. Terapijom imunosupresivnim lijekovima se te koncentracije mogu sniziti unutar referentnog raspona (109). CRP kao biokemijski biljeg upale može biti ograničene osjetljivosti u Crohnovoj bolesti te dio bolesnika može imati i normalne koncentracije. Rezultati istraživanja Florina i suradnika pokazali su niske koncentracije CRP-a u 10 % bolesnika (110). U njihovom istraživanju kod većine bolesnika s niskim koncentracijama CRP-a bolest je zahvatila tanko crijevo, dok je manje bolesnika s niskim koncentracijama imalo zahvaćeno debelo crijevo. U našem istraživanju gotovo 40 % bolesnika prije početka terapije nije imalo povišene koncentracije CRP-a. Velika razlika u postotku bolesnika s niskim CRP-om može se objasniti dužim trajanjem bolesti (prosječno 12 godina) u bolesnika u istraživanju Florina i suradnika u odnosu na naše istraživanje (4 godine).

Osim nižih koncentracija CRP-a, u bolesnika na biološkoj terapiji infliksimabom, adalimumabom, vedolizumabom ili golimumabom koji su postigli remisiju upalne bolesti crijeva, primijećena je statistički i klinički značajno niža koncentracija fekalnog kalprotektina u odnosu na bolesnike koji nisu postigli remisiju. Fekalni kalprotektin je biljeg aktivnosti upalnih bolesti crijeva, za koji su brojna istraživanja pokazala da je dobar pokazatelj cijeljenja mukozne sluznice u bolesnika na terapiji antagonistima TNF- α (111, 112). U nedavno objavljenom preglednom članku, Gisbert i Chaparro su opisali i objedinili brojne čimbenike koji bi mogli predvidjeti primarni odgovor na terapiju anti-TNF lijekovima te vedolizumabom i ustekinumabom. Od čimbenika koji mogu biti prediktori učinkovitijeg odgovora na terapiju infliksimabom i adalimumabom naveli su mlađu dob bolesnika, zahvaćenost debelog crijeva, kraće trajanje bolesti, muški spol i neke polimorfizme. Za razliku od navedenih prediktora, niže koncentracije fekalnog kalprotektina pokazale su se u manjoj mjeri korisne za predviđanje odgovora na terapiju antagonistima TNF- α (113). S obzirom na dobivene rezultate u našem istraživanju, koncentracije fekalnog kalprotektina ne mogu se smatrati koristan biokemijski pokazatelj za predviđanje odgovora na terapiju.

U posljednjih je nekoliko godina pokazano da je vitamin D jedan od modulatora imunskog odgovora. Vitamin D inhibira sintezu citokina TNF- α , IL-2 i interferon γ (114). S obzirom na ulogu vitamina D, pretpostavka je da će bolesnici s višim koncentracijama vitamina D bolje odgovarati na terapiju jer vitamin D suprimira stvaranje citokina. Tako su Kim i suradnici

pokazali da vitamin D suprimira stvaranje IL-17 te poboljšava odgovor na terapiju antagonistima interleukina (115). Reich i suradnici su, suprotno tome pokazali da koncentracije vitamina D niže od preporučenih (75 nmol/L) imaju bolji klinički odgovor na terapiju antagonistima TNF- α (116). U našem istraživanju preporučena koncentracija vitamina D od 50 nmol/L preuzeta je iz preporuka Instituta za medicinu (engl. *Institute of Medicine*, IOM) (117) zbog nižih vrijednosti u našoj ispitivanoj populaciji (neobjavljeni podaci). U multicentričnom istraživanju koje je obuhvatilo 13 europskih država i 625 bolesnika s reumatoidnim artritismom te 275 kontrolnih ispitanika, pokazane su statistički niže koncentracije vitamina D u bolesnika ($43,9 \pm 24,5$ nmol/L) u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika gdje su izmjerene koncentracije $47,4 \pm 23,7$ nmol/L. Kod više od 60 % bolesnika s RA izmjerene su vrlo niske koncentracije vitamina D (<10 ili 20 ng/mL) (118). Suprotno tom istraživanju, u našem prethodno objavljenom istraživanju, pokazali smo da su bolesnici autoimunim reumatoidnim bolestima i sniženim koncentracijama vitamina D (<50 nmol/mL) imali bolji klinički odgovor na terapiju odnosno kliničke su ocjene (DAS28 i VAS) koji opisuju aktivnost bolesti bile manje (119). U različitim istraživanjima o povezanosti vitamina D s ishodima liječenja, bilo autoimunih reumatoidnih bolesti (120, 121) ili upalnih bolesti crijeva (122), dobiveni su kontradiktorni rezultati. Kako je u općoj populaciji koncentracija vitamina D ispod preporučenih od 75 nmol/L ili čak ispod 50 nmol/L prema preporukama IOM i Endokrinološkog društva (117, 123) te još uvijek nije potpuno jasno je li manjak vitamina D povezan s nastankom i razvojem bolesti ili obrnuto ili je pak snižena koncentracija vitamina D u krvi posljedica tih bolesti (124, 125), vitamin D se ne može smatrati korisnim biljekom za praćenje aktivnosti bolesti

Mjerenje koncentracije lijeka i protutijela na lijek korisno je pratiti već nakon završetka početne faze liječenja, odnosno nakon 12-14 tjedana primjene terapije jer bolesnici na terapiji biološkim lijekovima koji već tada imaju niže koncentracije lijeka od preporučenih terapijskih intervala kasnije tijekom liječenja imaju veći rizik od razvoja protutijela na lijek odnosno smanjenog kliničkog odgovora na terapiju (126).

U našem istraživanju medijan koncentracije infliksimaba i adalimumaba nakon 6 ili 12 mjeseci terapije bio je unutar ili malo ispod terapijskog raspona za bolesnike koji su postigli remisiju, dok je u bolesnika bez postignute remisije koncentracija IFX i ADM bila statistički značajno niža, što je posebice bilo vidljivo u bolesnika s upalnim bolestima crijeva. Uz to, u bolesnika bez remisije koncentracije protutijela na lijekove bile su više nego u bolesnika koji su postigli remisiju. Prema novijim smjernicama, koncentracija infliksimaba >8 μ g/mL preporučuje se kao

ciljna vrijednost za postizanje održive histolološke remisije kod upalnih bolesti crijeva (127). U istraživanju Vande Casteele i suradnika koje je provedeno na preko 480 bolesnika s Crohnovom bolešću već je i pri koncentraciji IFX $>2,79 \mu\text{g/mL}$ primijećena remisija bolesti koja je praćena mjerenjem koncentracije CRP-a (128). Slične koncentracije infliksimaba u bolesnika koji su postigli remisiju izmjerene su i u našem istraživanju. U preglednom članku objavljenom godinu kasnije od prethodno navedenog istraživanja, Papamichael i suradnici sakupili su rezultate 25 originalnih istraživanja od čega čak 9 randomiziranih kliničkih ispitivanja s najvećom snagom dokaza na preko 2000 bolesnika. Klinička remisija bolesti pokazana je već kod koncentracija infliksimaba većih od $1,4 \mu\text{g/mL}$ u bolesnika s Crohnovom bolesti odnosno $1,7 \mu\text{g/mL}$ za bolesnike s ulceroznim kolitisom. Koncentracije adalimumaba potrebne za postizanje kliničke remisije bolesti bile su nešto više te su za bolesnike s ulceroznim kolitisom iznosile najmanje $4,58 \mu\text{g/mL}$, odnosno u bolesnika s Crohnovom bolešću $5,85 \mu\text{g/mL}$ (129). Koncentracije ovih lijekova povezane s kliničkom remisijom bolesti u našem istraživanju odgovaraju koncentracijama dobivenim opisanim randomiziranim kliničkim ispitivanjima. Tako su u našem istraživanju u su bolesnika s upalnim bolestima crijeva koji su postigli remisiju bolesti izmjerene koncentracije infliksimaba od $3,7 \mu\text{g/mL}$ nakon 6 mjeseci i $5,2 \mu\text{g/mL}$ nakon 12 mjeseci terapije. Koncentracije adalimumaba u bolesnika s upalnim bolestima crijeva u remisiji također su slijedile prethodna istraživanja te je izmjerena koncentracija bila $7,0$ i $8,8 \mu\text{g/mL}$ nakon 6, odnosno 12 mjeseci terapije.

Za razliku od upalnih bolesti crijeva, u istraživanju objavljenom 2018. godine u bolesnika s reumatoidnim artritismom, tek su koncentracije infliksimaba veće od $4,7 \mu\text{g/mL}$ izmjerene nakon 14 tjedana terapije, upućivale na umjereno dobar do dobar odgovor na terapiju. Lošiji odgovor na terapiju, bez postizanja remisije autori su primijetili u bolesnika s koncentracijama ispod $0,5 \mu\text{g/mL}$ nakon godinu dana terapije (130). Koncentracije niže od $0,5 \mu\text{g/mL}$ odgovaraju koncentracijama izmjerenim u bolesnika uključenih u naše istraživanje. U bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima na terapiji adalimumabom koji su postigli remisiju izmjerene koncentracije lijeka u našem istraživanju bile su niže od onih u prethodnim istraživanjima te su iznosile $4,5 \mu\text{g/mL}$ nakon 6 mjeseci te $6,3$ nakon 12 mjeseci terapije. Unatoč neslaganju s literaturnim podacima, koncentracije adalimumaba izmjerene u našem istraživanju i dalje su bile unutar preporučenog terapijskog raspona ($4-8 \mu\text{g/mL}$) (131).

U našem istraživanju u preko 20 % ispitanika utvrđen je razvoj protutijela na ADM i IFX, s tim da je učestalost pojave protutijela gotovo dva puta veća u bolesnika na terapiji IFX nego ADM.

Razvoj protutijela povezan je sa sekundarnim nedostatkom odgovora na terapiju, a javlja se u čak do 30 % bolesnika na terapiji antagonistima TNF- α . Prema literaturnim podacima pojava protutijela na lijekove javlja se najčešće u razdoblju od 22 do 54 tjedna nakon početka terapije (132). U kohortnom retrospektivnom istraživanju Quistrebert i suradnika provedenom na 366 bolesnika s reumatoidnim artritismom koje je obuhvatilo područje Švedske, Francuske i Nizozemske utvrđena je viša pojavnost protutijela u bolesnika na terapiji ADM (19,2 %) nego u našem istraživanju gdje je 13,2 % bolesnika na terapiji ADM razvilo protutijela (133). Razlika u postotku bolesnika koji su razvili protutijela vidljiva je i u bolesnika na terapiji infliksimabom, pa je tako u našem istraživanju 24,3 % bolesnika na terapiji IFX razvilo protutijela dok je u navedenom europskom istraživanju veći udio (29 %) bolesnika razvio protutijela unutar 18 mjeseci od početka terapije. U prethodno opisanom istraživanju udio bolesnika s pozitivnim protutijelima rastao je s trajanjem terapije (133). Tako, primjerice, Quistrebert i suradnici nisu zabilježili razvoj protutijela na IFX nakon 3 i 6 mjeseci terapije, ali je nakon 12 mjeseci postotak bolesnika s pozitivnim protutijelima na IFX porastao na 34 %, a nakon 18 mjeseci 66 % (133). U naše istraživanje uključeni su bolesnici kojima je prije početka terapije biološkim lijekovima bolest trajala oko 5 godina, a Quistrebert i suradnici su u svom istraživanju pokazali da je dulje trajanje bolesti prije početka terapije jedan od rizičnih čimbenika za nastanak protutijela.

Rezultati genotipizacije na našem uzorku ispitanika pokazali su sličnu distribuciju G i A alela polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A kao u Europi. Tako je primjerice, u naših bolesnika pronađena učestalost A alela od 4 % za rs361525 (*TNF- α* -238 G/A) i 13 % za rs1800629 (*TNF- α* -308 G/A) dok je u europskoj populaciji učestalost A alela *TNF- α* -238 G/A nešto veća i iznosi 6 %, a udio A alela za *TNF- α* -308 G/A je identičan kao u ovom istraživanju (134).

Dosadašnja istraživanja imaju kontradiktorne rezultate o povezanosti genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s podložnošću bolesti i učinkom terapije kod autoimunih reumatoidnih i upalnih bolesti crijeva. Chen i suradnici objavili su meta-analizu u kojoj su uključena 43 znanstvena rada (135). U navedenoj meta-analizi u 8 istraživanja o povezanosti genotipa polimorfizma *TNF- α* -238 G/A i reumatoidnog artritisa uključeno je ukupno 1386 bolesnika i 1535 kontrolnih ispitanika, dok je u 19 istraživanja o povezanosti genotipa polimorfizma *TNF- α* -308 G/A i autoimunih reumatoidnih bolesti bilo uključeno ukupno 3503 bolesnika s RA i oko 4000 kontrolnih ispitanika s područja Europe, Azije i Latinske Amerike. Pokazana je veća pojavnost reumatoidnog artritisa kod nositelja A alela polimorfizma *TNF- α* -308 G/A, dok je utvrđeno da genotip GA ili alel A polimorfizma *TNF- α* -238 G/A djeluje

protektivno i smanjuje podložnost reumatoidnom artritisu. U radu koji su proveli Li i suradnici, istraživana je pojavnost reumatoidnog artritisa u kineskoj pokrajini Hunan (136). Na 112 bolesnika s RA i 129 zdravih dobrovoljnih davatelja krvi, autori su pokazali da osobe s genotipom GG *TNF- α* -308 G/A imaju veći rizik od reumatoidnog artritisa, odnosno da A alel polimorfizma *TNF- α* -308 G/A kao i muški spol djeluju protektivno odnosno umanjuju rizik od nastanka RA. Dodatno su pokazali statistički značajno višu koncentraciju *TNF- α* u krvi kod žena nego kod muškaraca, ali bez razlika u koncentraciji u odnosu na genotip polimorfizma *TNF- α* -308 G/A. Koncentracija *TNF- α* ne ovisi o genotipu polimorfizama gena *TNF- α* odnosno u rezultati prethodno objavljenih istraživanja su kontradiktorni. Primjerice, u preglednom članku El Tahana i suradnika sažeti su rezultati prethodnih istraživanja s razlikama u ekspresiji gena *TNF- α* ovisno o vrsti bolesti (60). Tako je pokazano da je genotip AA polimorfizma -238 G/A povezan s nižim koncentracijama *TNF- α* u bolesnika sa psorijazom (137), dok je u bolesnika s multiplom sklerozom genotip GG povezani s višim koncentracijama *TNF- α* (138), a u bolesnika s RA nema povezanosti genotipa polimorfizama s koncentracijom (139). Kako koncentracija *TNF- α* ovisi i o vrsti i aktivnosti bolesti, u našem istraživanju nismo mjerili koncentraciju *TNF- α* jer su uključeni bolesnici s različitim bolestima te s različitim simptomima i aktivnostima bolesti. U drugom istraživanju provedenom u Švedskoj na 154 bolesnika s reumatoidnim artritisom i 324 kontrolnih ispitanika pokazano je da nositelji genotipa GG polimorfizma *TNF- α* -308 G/A imaju veći rizik od nastanka RA, ali nositelji genotipa GA polimorfizma *TNF- α* -308 G/A češće imaju težu kliničku sliku reumatoidnog artritisa (140).

Istraživanje povezanosti preko 50 različitih mutacija s nastankom ankilozantnog spondilitisa provedeno u danskoj populaciji na 709 bolesnika s AS i 795 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi dokazalo je smanjen rizik od nastanka ankilozantnog spondilitisa s genotipovima GA ili AA polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i *TNF- α* -308 G/A. Kod mutacija ispitivanih na drugim genima, polimorfne varijante gena većinom uopće nisu bile povezane s povećanim rizikom od nastanka AS ili su bile povezane s većim rizikom nastanka ankilozantnog spondilitisa, a nisu djelovale protektivno kao u slučaju polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i *TNF- α* -308 G/A (141).

Kao i u prethodno navedenim istraživanjima, u istraživanjima o povezanosti psorijaznog artritisa s genotipovima polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A rezultati su kontradiktorni. U istraživanju provedenom na području Venezuele koje je obuhvatilo oko 50 bolesnika s psorijaznim artritisom i isto toliko kontrolnih ispitanika pokazana je povezanost A alela i GA

genotipa polimorfizma *TNF- α* -238 G/A sa smanjenim rizikom od razvoja psorijaznog artritisa (142). U velikoj meta-analizi koja je obuhvatila čak 26 znanstvena članka i otprilike 2000 kontrolnih ispitanika te oko 3000 bolesnika sa psorijaznim artritisom, pronađena je povezanost genotipova AA i GA polimorfizma *TNF- α* -308 G/A sa smanjenim rizikom od nastanka bolesti dok su genotipovi AA i GA polimorfizma *TNF- α* -238 G/A bili povezani s povećanim rizikom od nastanka psorijaznog artritisa (143). Razlike u rezultatima objavljenih istraživanja o podložnosti bolesti ovisno o navedenim polimorfizmima mogu se povezati s različitim etničkim skupinama na kojima su istraživanja provedena, različitim geografskim područjima u kojima su provedena ili su ispitana na premalom broju bolesnika.

Kao i kod autoimunih reumatoidnih bolesti, povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s povećanim ili smanjenim rizikom za razvoj upalnih bolesti crijeva razlikuje se ovisno o istraživanjima. Rezultati meta-analize u koju je bilo uključeno 87 znanstvenih istraživanja, nisu dokazali veći rizik od nastanka Crohnove bolesti kod ispitanika s genotipom GA ili AA polimorfizma *TNF- α* -308 (144). U istraživanju koje su proveli Cao i suradnici na 110 bolesnika s ulceroznim kolitisom te oko 300 zdravih ispitanika, pripadnika kineske etničke populacije pokazana je statistički značajna povezanost A alela polimorfizma *TNF- α* -308 G/A s povećanim rizikom za razvoj ulceroznog kolitisa, dok se udio ostalih genotipova drugih polimorfizama (*TNF- α* -1031 T/C, -863 C/A, -857 T/C) nije statistički značajno razlikovao u bolesnika s UC i u zdravih ispitanika (145). Zanimljivo, u navedenom istraživanju, nijedan ispitanik nije imao ni genotip GA niti AA polimorfizma *TNF- α* -238 G/A što se slaže s našim istraživanjem u kojem također nije pronađen nijedan bolesnik s genotipom AA ili GA na tom položaju. U novijem istraživanju koje je obuhvatilo 50 bolesnika i 25 zdravih ispitanika, Al-Taei je pokazao povezanost genotipa GA polimorfizma *TNF- α* -308 G/A s povećanim rizikom od nastanka upalnih bolesti crijeva (146). Osim s nastankom upalnih bolesti crijeva, u prije objavljenim istraživanjima, pokazana je povezanost A alela polimorfizma *TNF- α* -308 G/A s kliničkom prezentacijom bolesti odnosno jačom upalom i progresijom bolesti u bolesnika s ulceroznim kolitisom (147).

Dosadašnji rezultati istraživanja upućuju na povezanost genotipova polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s nastankom bolesti te primarni ili sekundarni nedostatak odgovora na terapiju antagonistima *TNF- α* . Odgovor na terapiju može se, između ostalog, procjenjivati primarnom koncentracijom lijeka u krvi, nakon minimalno 14 tjedana od početka uzimanja terapije odnosno nakon faze indukcije i postizanja terapijske koncentracije lijeka u krvi. U ovom

istraživanju, koncentracija lijeka kod većine bolesnika je određena u fazi održavanja terapije, nakon 6 i 12 mjeseci od početka terapije, a u istom razdoblju određena je i koncentracija protutijela na lijekove. U bolesnika uključenih u ovo istraživanje protutijela su se razvila u prosjeku nakon 9 mjeseci, s tim da su se u bolesnika na terapiji adalimumabom pojavila nešto ranije, već nakon prosječno 7 mjeseci. U bolesnika koji su razvili protutijela, koncentracija lijeka bila je nemjerljivo niska što odgovara i prijašnjim istraživanjima (148).

U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji lijekova ovisno o genotipu polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A. Dosadašnji radovi nisu istraživali povezanost koncentracije antagonista *TNF- α* s genotipovima polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

Polimorfizmi u promotorskoj regiji mogu biti povezani i s kliničkim odgovorom na terapiju kao i s težinom kliničke slike. U preglednom su članku Prieto-Pérez i suradnici opisali različite rezultate dobivene u prethodnim istraživanjima o povezanosti genotipova polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s odgovorom na terapiju antagonistima *TNF- α* u bolesnika sa psorijazom i nekim autoimunim bolestima. Tako je, primjerice, pronađena povezanost A alela polimorfizma *TNF- α* -238 G/A i boljeg odgovora na terapiju infliksimabom u bolesnika s reumatoidnim artritismom, dok nije zabilježena statistički značajna povezanost s polimorfizmom *TNF- α* -308 G/A (149). U drugom istraživanju provedenom na manjem broju bolesnika s RA pokazan je bolji odgovor na terapiju, odnosno veće smanjenje DAS28 nakon 24 tjedna terapije infliksimabom u bolesnika s genotipom GG polimorfizma *TNF- α* -308 G/A u odnosu na bolesnike s genotipovima AA ili GA (150). U velikom farmakogenetičkom istraživanju provedenom na 150 bolesnika s reumatoidnim artritismom rezultati su pokazali da nijedan od polimorfizam *TNF- α* -238 G/A, -308 G/A ni -857 C/T nije samostalno povezan s boljim ili lošijim odgovorom na terapiju adalimumabom. Međutim, kombinacija genotipova *TNF- α* -238 GG, -308 GG i -857 CC kod čak 40 % bolesnika pokazala je statistički značajnu povezanost s poboljšanjem ACR (engl. *American College of Rheumatology*) kriterija za 50 % u bolesnika s RA nakon 12 tjedana terapije adalimumabom (151).

Nažalost, ni nakon brojnih provedenih istraživanja, još uvijek ne postoji jednoznačan dokaz o genotipu pojedinog polimorfizma nekog gena koji bi mogao sa sigurnošću predvidjeti koja osoba će na koji način odgovoriti na biološku terapiju. Najčešća ograničenja većine istraživanja su, primjerice, premali broj uključenih ispitanika, koji umanjuje snagu istraživanja,

heterogenost ispitanika prema trajanju bolesti, kliničkim simptomima i aktivnosti bolesti prilikom uključanja u istraživanje, uzimanje dodatnih lijekova osim onih uključenih u istraživanje te nemogućnost ispitivanja svih genskih varijanti (152).

Osim u bolesnika s reumatoidnim autoimunim bolestima, slična povezanost ispitivanih polimorfizama i s učinkom terapije, pronađena je i u bolesnika s Crohnovom bolešću (149). U meta-analizi objavljenoj 2015. godine autori su obradili podatke iz 10 velikih istraživanja o povezanosti pojedinih genotipova polimorfizama *TNF- α* -238 G/A, -308 G/A i -857 C/T s odgovorom na biološku terapiju u bolesnika s ankilozantnim spondilitisom, psorijazom i Crohnovom bolešću. Analizom je obuhvaćeno gotovo 900 bolesnika, a u čak 7 istraživanja ispitivani su bolesnici s Crohnovom bolešću. Zaključeno je da bolesnici s divljim genotipovima, odnosno genotipovima GG *TNF- α* -238 G/A i *TNF- α* -308 G/A te genotipom CC *TNF- α* -857 C/T imaju bolji klinički odgovor na terapiju u odnosu na ispitanike s drugačijim genotipovima navedenih polimorfizama gena *TNF- α* (153).

U našem istraživanju nije pronađena povezanost koncentracije lijeka niti s jednim genotipom polimorfizama *TNF- α* -238 G/A ili -308 G/A te je moguće da neki polimorfizmi na drugim položajima u promotorskoj regiji gena *TNF- α* kao i drugi geni utječu na niže koncentracije lijekova ili pojavu protutijela. Dodatno, razvoj protutijela na lijek ne mora biti trajan, pa je veoma važno i u kojem trenutku je uzorkovan serum za određivanje protutijela. Tako su, primjerice, u istraživanju bolesnika s RA na terapiji adalimumabom tijekom 3 godine praćenja u skoro 50 % bolesnika pronađena protutijela na lijek, dok je u njih čak 30 % prisutnost protutijela bila prolazna (154). U novijem istraživanju Reinholda i suradnika objavljenom 2021. godine, provedenom na 104 bolesnika s upalnim bolestima crijeva ispitivana je povezanost koncentracije adalimumaba, infliksimaba i protutijela na lijekove s kliničkom slikom u bolesnika (155). Kako do sada ne postoje opće prihvaćene smjernice kada je potrebno određivati koncentraciju lijeka ili protutijela na lijek, autori su u navedenom istraživanju pratili najčešće razloge mjerenja. Tako su koncentracije infliksimaba, adalimumaba i protutijela na te lijekove najčešće mjerene zbog pogoršanja bolesti, pojave nuspojava lijekova, porasta koncentracije CRP-a i fekalnog kalprotektina, povećane endoskopske aktivnosti bolesti, sumnje na razvoj protutijela ili prethodno otkrivene prisutnosti protutijela na lijekove te potrebe za povećanjem doze ili učestalosti terapije. U navedenom istraživanju pokazana je prisutnost protutijela većinom u bolesnika s niskom koncentracijom lijeka što odgovara i našim rezultatima. U studiji Reinholda i suradnika pokazano je i da koncentracija lijeka ne odgovara

kliničkoj slici bolesnika na terapiji, pa autori preporučuju praćenje koncentracije lijeka te određivanje prisutnosti protutijela samo kao potvrdu učinkovitosti terapije odnosno kao pomoć u odluci o promjeni doze ili vrste terapije ako nema kliničkog poboljšanja bolesnika na terapiji (155).

Osjetljivost CRP-a u bolesnika s Crohnovom bolešću vrlo je niska, što znači da i do 30 % bolesnika s aktivnom bolešću može imati normalne koncentracije CRP-a u krvi. Iz navedenog razloga, kao bolji marker aktivne upale odnosno remisije bolesti pokazao se fekalni kalprotektin (156). U istraživanju provedenom na 90 bolesnika s teškim oblikom ulceroznog kolitisa, viša koncentracija fekalnog kalprotektina upućivala je na potrebu za operativnim zahvatom (157).

U dosadašnjim istraživanjima nije ispitivana povezanost koncentracije fekalnog kalprotektina s genotipom polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A. U našem istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u koncentraciji fekalnog kalprotektina ovisno o različitim genotipovima polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

U istraživanju na 121 bolesniku s Crohnovom bolešću, pokazana je povezanost genotipova GA i AA *TNF- α* -308 G/A s lošijim kliničkim odgovorom na terapiju, a autori su pronašli i da odgovor na terapiju osim o genotipu ovisi i o podtipu Crohnove bolesti (158). U bolesnika s upalnim bolestima crijeva odgovor na anti-TNF terapiju može se povezati i s drugim polimorfizmima gena koji sudjeluju u regulaciji upalnih procesa u organizmu, kao što su geni koji kodiraju za NF- κ B, IL-1, *TNF- α* i IL-18 (159).

Objektivni pokazatelji kliničkog stanja autoimunih reumatoidnih bolesti i odgovora na terapiju su kliničke ocjene kojima se procjenjuje zahvaćenost te broj bolnih i natečenih zglobova, a koji, zajedno s koncentracijom CRP-a ulaze u DAS28 zbroj (160). U velikoj meta-analizi provedenoj na 692 bolesnika s reumatoidnim artritismom A alel *TNF- α* -308 pokazao se kao prediktor lošijeg odgovora na terapiju antagonistima *TNF- α* , infliksimabom, adalimumabom i etanerceptom (161). U kohortnom istraživanju Maxwella i suradnika na više od 1000 ispitanika na terapiji etanerceptom i oko 450 ispitanika na terapiji infliksimabom, pokazana je povezanost genotipa AA polimorfizma *TNF- α* -308 G/A sa slabijim kliničkim odgovorom praćenim DAS28 ocjenom u odnosu na genotip GG, ali samo u bolesnika na terapiji etanerceptom. U bolesnika na terapiji infliksimabom ista povezanost s nije dokazana (162). Rezultati navedenog istraživanja slažu se s našim rezultatima gdje u bolesnika na terapiji infliksimabom i

adalimumabom također nije pronađena povezanost između remisije i nekog od genotipova polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i *TNF- α* -308 G/A.

U našem je istraživanju pronađen značajni pad vrijednosti DAS28, BASDAI i VAS ocjena tijekom praćenja bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima nakon 6 i 12 mjeseci u odnosu na početne vrijednosti. Poboljšanje kliničke slike mjereno DAS28 ocjenom vidljivo je samo u bolesnika s genotipom GG polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i *TNF- α* -308 G/A s tim da su vrijednosti pale za više od 1,2 u odnosu na početne vrijednosti što se prema preporukama Hrvatskog reumatološkog društva Hrvatskog liječničkog zbora za primjenu bioloških lijekova kod reumatoidnog artritisa odraslih bolesnika (163) smatra kliničkim poboljšanjem odnosno remisijom bolesti. BASDAI i VAS ocjene nakon 6 i 12 mjeseci terapije biološkim lijekovima su također bile značajno manje u bolesnika s genotipom GG na položajima *TNF- α* -238 i *TNF- α* -308, ali i s genotipovima GA ili AA na položaju *TNF- α* -308, dok u bolesnika s genotipovima GA ili AA na položaju *TNF- α* -238 nije zabilježeno poboljšanje nijedne kliničke ocjene. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima u prethodno objavljenim istraživanjima. Gheita i suradnici istraživali su povezanost kliničkih ocjena DAS28 i koncentracije *TNF- α* s genotipovima polimorfizma *TNF- α* -308 G/A na preko 40 bolesnika s RA i 30 kontrola. U njihovom istraživanju bolesnici s genotipom GA na položaju *TNF- α* -308 nisu pokazali statistički značajno poboljšanje DAS28, a koncentracija *TNF- α* ostala je povišena za razliku od bolesnika s genotipom GG na položaju *TNF- α* -308 koji su imali kliničko poboljšanje (164). U meta-analizi iz 2009. godine koja je obuhvatila 9 istraživanja s ukupno nešto manje od 700 bolesnika s RA, pokazan je bolji odgovor u bolesnika nositelja genotipa GG na položaju *TNF- α* -308 sa statistički značajnom razlikom u DAS28 ocjeni u odnosu na bolesnike nositelje alela A na položaju *TNF- α* -308 (165).

Unatoč napretku liječenja i pozitivnim ishodom liječenja antagonistima *TNF- α* u većini bolesnika, još uvijek velik postotak bolesnika na terapiji ne odgovara željenim kliničkim ishodima ili se kod nekih bolesnika s vremenom klinički odgovor izgubi. Nažalost, ne postoji jedinstven klinički test ili kombinacija testova koji bi mogli predvidjeti tijek liječenja i odgovor na terapiju. Trenutno se u brojnim bolestima, pa tako i u ispitivanim u ovom istraživanju, upalnim bolestima crijeva i autoimunom reumatoidnim bolestima, traže modeli za predviđanje načina i učinka liječenja kao i eventualnog odabira lijeka, a sve u cilju optimizacije liječenja, ali i smanjenja troškova liječenja zbog neuspješnih terapija. Osim toga, traže se i modeli za predviđanje eventualnog relapsa bolesti nakon operativnih ili manje invazivnih oblika liječenja

(166). Bolesnici s autoimunim bolestima i bolestima posredovanim imunskim odgovorom, ne reagiraju jednako na terapiju ili kombinaciju različitih terapija što može ovisiti o brojnim okolišnim, ali i genetičkim čimbenicima.

U istraživanjima je pokazana povezanost mlađe dobi na početku uzimanja terapije s boljim odgovorom na terapiju u bolesnika s upalnim bolestima crijeva, ali u drugim istraživanjima povezanost nije pronađena. Kontradiktorni su također, rezultati vezani uz povezanost spola, indeksa tjelesne mase i pušenja s učinkovitošću terapije (167). Zbog rezultata koji se razlikuju od istraživanja do istraživanja, još uvijek se traže najbolji modeli te varijable kojima bi se mogli predvidjeti učinci liječenja autoimunih, ali i drugih bolesti.

U ovom istraživanju univarijatom regresijskom analizom pokazano je da muški spol ima veći izgled za postizanje terapijskih koncentracija lijekova. Dijagnoza reumatoidnog artritisa odnosno bolesnici s autoimunim reumatoidnim bolestima, s druge strane, imaju manji izgled za postizanjem terapijskih koncentracija odnosno tijekom liječenja neće imati koncentraciju veću od 3 µg/mL za IFX ili veću od 4 µg/mL za ADM u serumu. Suprotno tome, bolesnici s dijagnozom ulceroznog kolitisa imaju veći izgled postići terapijske vrijednosti lijeka tijekom liječenja biološkim lijekovima infliksimabom ili adalimumabom. U multivarijatom regresijskoj analizi u koju smo uključili navedene statističke značajne čimbenike zajedno s genotipovima polimorfizama *TNF-α* -238 G/A i -308 G/A, statistički značajan rezultat zadržava samo dijagnoza RA koja i dalje ima manji izgled za postizanjem terapijskih koncentracija lijekova. U regresijskom modelu za predviđanje pojave protutijela, u univarijatom regresijskoj analizi, ponovno je spol imao statistički značajan rezultat. U ovom modelu bolesnici muškog spola imaju manji izgled razviti protutijela na lijek od žena. Osim toga, dijagnoza RA, ali i dob te koncentracije više od 5 mg/L CRP izmjerene nakon 6 i 12 mjeseci terapije povećavaju izgled za razvoj protutijela. Uključivanjem svih navedenih čimbenika, zajedno s genotipovima polimorfizama *TNF-α* -238 G/A i -308 G/A, u multivarijatom regresijski model, svi navedeni čimbenici gube statističku značajnost.

Koncentracija CRP-a viša od 5 mg/L 6 i 12 mjeseci nakon terapije antagonistima *TNF-α* ima manji izgled za remisiju bolesti. Kao i prethodni čimbenici, uključeni u multivarijatom regresijsku analizu, koncentracija CRP-a >5 mg/mL gubi statističku značajnost, dok koncentracija CRP-a nakon 12 mjeseci koja, ako je viša, ima manji izgled za remisijom bolesti.

Brojni su geni i polimorfizmi ispitivani u cjelogenomskim asocijacijskim studijama (engl. *Genome-Wide Association Studies*, GWAS), ali još uvijek nije pronađen jedinstveni gen ili kombinacija čimbenika koji bi zadovoljili kriterije dobrog prognostičkog indikatora za odgovor na terapiju antagonistima TNF- α u bolesnika s upalnim bolestima crijeva ili autoimunim reumatoidnim bolestima (167).

6 ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitana je povezanost genotipa polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A s odgovorom na terapiju i učinkom liječenja antagonistima *TNF- α* , infliksimabom i adalimumabom kod 112 bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima i upalnim bolestima crijeva. Dobiveni rezultati pokazuju da:

- 1) Genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A ne utječe na koncentraciju antagonista *TNF- α* , infliksimaba i adalimumaba.
- 2) Genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A ne utječe na koncentraciju ni pojavu protutijela na infliksimab i adalimumab.
- 3) Genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A ne utječe na koncentraciju fekalnog kalprotektina.
- 4) Genotip polimorfizama *TNF- α* -308 G/A utječe na koncentraciju C reaktivnog proteina.
- 5) Genotip GG polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A utječe na kliničku ocjenu aktivnosti bolesti izraženu DAS28 ocjenom u bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima.
- 6) Genotip polimorfizama *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A ne utječe na remisiju bolesti crijeva i autoimunih reumatoidnih bolesti.
- 7) Genotipizacija na položajima *TNF- α* -238 i -308 prije uvođenja terapije biološkim lijekovima ne pridonosi procjeni kliničkih ishoda liječenja, učinkovitosti terapije praćeno mjerenjem koncentracije lijeka, pojave protutijela na lijek kao ni postizanja kliničke remisije upalnih bolesti crijeva ni autoimunih reumatoidnih bolesti.

Zaključno, ovim istraživanjem nije pronađena povezanost kliničke i biokemijske remisije u bolesnika na terapiji antagonistima *TNF- α* ovisno genotipu polimorfizmima *TNF- α* -238 G/A i -308 G/A.

7 POPIS LITERATURE

1. Adapa D, Sai YRKM, Anand SY, Mehaboobi S, Aramalla ER. A Brief Review on Immune Mediated Diseases. *J Clin Cell Immunol*. 2011:S11
2. Lee KH, Ahn BS, Cha D, Jang WW, Choi E, Park S, et al. Understanding the immunopathogenesis of autoimmune diseases by animal studies using gene therapy: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2020;102469.
3. Shi G, Zhang J, Zhang Z, Zhang X. Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013:728574.
4. Rojas M, Restrepo-Jiménez P, Monsalve DM, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramírez-Santana C, et al. Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2018;95:100-23.
5. Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015;278(4):369-95.
6. Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *Int. J. Celiac Dis*. 2015;3(4):151-5.
7. Bojke L, Spackman E, Hinde S, Helliwell P. Capturing all of the costs in NICE appraisals: the impact of inflammatory rheumatic diseases on productivity. *Rheumatology*. 2012;51(2):210–5.
8. Ogdie A, Weiss P. The Epidemiology of Psoriatic Arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015;41(4):545-68.
9. Zhu W, He X, Cheng K, Zhang L, Chen D, Wang X, Qiu G, Cao X, Weng X. Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone Res*. 2019;7:22.
10. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 2012;142(1):46-54.e42.
11. Bogdanos DP, Smyk DS, Rigopoulou EI, Mytilinaiou MG, Heneghan MA, Selmi C, Gershwin ME. Twin studies in autoimmune disease: genetics, gender and environment. *J Autoimmun*. 2012;38(2-3):J156-69.
12. Su MA, Anderson MS. Monogenic autoimmune diseases: insights into self-tolerance. *Pediatr Res*. 2009;65(5 Pt 2):20R-25R.
13. Jeong DC. Monogenic Autoimmune Diseases. *J Rheum Dis*. 2018;25:213-20.

14. Ermann J, Fathman CG. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat Immunol.* 2001;2(9):759-61.
15. Ceccarelli F, Agmon-Levin N, Perricone C. Genetic Factors of Autoimmune Diseases. *J Immunol Res.* 2016;2016:3476023.
16. Marson A, Housley WJ, Hafler DA. Genetic basis of autoimmunity. *J Clin Invest.* 2015;125(6):2234-41.
17. Gregersen PK, Olsson LM. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:363-91.
18. Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis.* 2019;78(4):446-53.
19. Dupuis ML, Pagano MT, Pierdominici M, Ortona E. The role of vitamin D in autoimmune diseases: could sex make the difference? *Biol Sex Differ.* 2021;12(1):12.
20. Samanta S. Vitamin D and immunomodulation in the skin: a useful affirmative nexus. *Explor Immunol.* 2021;1:90-111.
21. Gubatan J, Moss AC. Vitamin D in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology.* 2018;34(4):217-25.
22. Guan Q. A Comprehensive Review and Update on the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *J Immunol Res.* 2019;2019:7247238.
23. Richard ML, Sokol H. The gut mycobiota: insights into analysis, environmental interactions and role in gastrointestinal diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019;16(6):331-45.
24. Ince MN, Elliott DE. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am.* 2007;87(3):681-96.
25. Ngo B, Farrell CP, Barr M, Wolov K, Bailey R, Mullin JM, Thornton JJ. Tumor necrosis factor blockade for treatment of inflammatory bowel disease: efficacy and safety. *Curr Mol Pharmacol.* 2010;3(3):145-52.
26. Gibson PR. Increased gut permeability in Crohn's disease: is TNF the link? *Gut.* 2004;53:1724-5
27. Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2012;24:12-51.
28. Ng SC, Shi HY, Hamidi N, Underwood FE, Tang W, Benchimol EI, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a

- systematic review of population-based studies. *Lancet*. 2017;390(10114):2769-78.
Erratum in: *Lancet*. 2020;396(10256):e56.
29. Freeman K, Ryan R, Parsons N, Taylor-Phillips S, Willis BH, Clarke A. The incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in UK primary care: a retrospective cohort study of the IQVIA Medical Research Database. *BMC Gastroenterol*. 2021;21(1):139.
 30. Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, Fried M, Geary R, Goh KL, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Inflammatory Bowel Disease: Update August 2015. *J Clin Gastroenterol*. 2016;50(10):803-18.
 31. Okobi OE, Udoete IO, Fasehun OO, Okobi T, Evbayekha EO, Ekabua JJ, et al. A Review of Four Practice Guidelines of Inflammatory Bowel Disease. *Cureus*. 2021;13(8):e16859.
 32. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria, *Rheumatology*. 2012;51(suppl_6):vi5–vi9.
 33. El-Gabalawy H, Guenther LC, Bernstein CN. Epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases: incidence, prevalence, natural history, and comorbidities. *J Rheumatol Suppl*. 2010;85:2-10.
 34. Veale DJ, Fearon U. The pathogenesis of psoriatic arthritis. *Lancet*. 2018;391(10136):2273-84.
 35. Kempster SL, Kaser A. $\alpha 4\beta 7$ integrin: beyond T cell trafficking. *Gut*. 2014;63(9):1377-9.
 36. Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, Hendy PA, Smith PJ, Limdi JK et al; IBD guidelines eDelphi consensus group, Gaya DR, Iqbal TH, Taylor SA, Smith M, Brookes M, Hansen R, Hawthorne AB. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2019;68(Suppl 3):s1-s106.
 37. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment, *J Crohns Colitis*. 2020;14(1):4-22.
 38. Ye BD, Yang SK, Shin SJ, Lee KM, Jang BI, Cheon JH. Guidelines for the Management of Crohn's Disease. *Korean J Gastroenterol*. 2012;59(2):141.
 39. Amiot A, Bouguen G, Bonnaud G, Bouhnik Y, Hagege H, Peyrin-Biroulet L; French National Consensus Clinical guidelines for the management of IBD study group.

- Clinical guidelines for the management of inflammatory bowel disease: Update of a French national consensus. *Dig Liver Dis.* 2021;53(1):35-43.
40. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6):685-99.
 41. van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Baraliakos X, Van den Bosch F, Sepriano A, et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):978-91.
 42. Gossec L, Baraliakos X, Kerschbaumer A, de Wit M, McInnes I, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* 2020;79(6):700-12.
 43. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK. Biologics: target-specific treatment of systemic and cutaneous autoimmune diseases. *Indian J Dermatol.* 2009;54(2):100-9.
 44. Papamichael K, Vogelzang EH, Lambert J, Wolbink G, Cheifetz AS. Therapeutic drug monitoring with biologic agents in immune mediated inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(8):837-48.
 45. Buhrmann C, Shayan P, Aggarwal BB, Shakibaei M. Evidence that TNF- β (lymphotoxin α) can activate the inflammatory environment in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(6):R202.
 46. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(7):1215-28.
 47. Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87-103.
 48. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(3):163-72.
 49. Sethi JK, Hotamisligil GS. Metabolic Messengers: tumour necrosis factor. *Nat Metab.* 2021;3(10):1302-12.
 50. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):244-79.

51. Cessak G, Kuzawińska O, Burda A, Lis K, Wojnar M, Mirowska-Guzel D, Bałkowiec-Iskra E. TNF inhibitors - Mechanisms of action, approved and off-label indications. *Pharmacol Rep.* 2014;66(5):836-44.
52. Perše M, Unkovič A. The Role of TNF in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Biological Therapy for Inflammatory Bowel Disease*. Ed. Leal RF, Torriani T. London: IntechOpen; 2020.
53. Falvo JV, Tsytsykova AV, Goldfeld AE. Transcriptional control of the TNF gene. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11:27-60.
54. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(3):163-72.
55. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011;74(6):522-47.
56. Mira JP, Cariou A, Grall F, Delclaux C, Losser MR, Heshmati F, et al. Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA.* 1999;282(6):561-8.
57. Huizinga TWJ, Westendorp RGJ, Bollen ELEM, Keijsers V, Brinkman BMN, Langermans JAM, et al. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997;72:149-53.
58. Higuchi T, Seki N, Kamizono S, Yamada A, Kimura A, Kato H, Itoh K. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. *Tissue Antigens.* 1998;51:605-12.
59. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF-alpha production in psoriasis patients carrying the TNF-alpha 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1180-3.
60. El-Tahan RR, Ghoneim AM, El-Mashad N. TNF- α gene polymorphisms and expression. *Springerplus.* 2016;5(1):1508.
61. Mosaad YM, Abdelsalam A, El-Bassiony SR. Association of tumour necrosis factor-alpha -308 G/A promoter polymorphism with susceptibility and disease profile of rheumatoid arthritis. *Int J Immunogenet.* 2011;38(5):427-33.
62. Hadinedoushan H, Noorbakhsh P, Soleymani-Salehabadi H. Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphism and Association With Its Serum Level in Iranian Population with Rheumatoid Arthritis. *Arch Rheumatol.* 2016;31(4):306-13.

63. Li C, Wang G, Gao Y, Liu L, Gao T. TNF-alpha gene promoter -238G>A and -308G>A polymorphisms alter risk of psoriasis vulgaris: a meta-analysis. *J Invest Dermatol.* 2007;127:1886-92.
64. Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, et al. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics.* 2002;53(12):1020-7.
65. Barber GE, Yajnik V, Khalili H, Giallourakis C, Garber J, Xavier R, Ananthakrishnan AN. Genetic Markers Predict Primary Non-Response and Durable Response To Anti-TNF Biologic Therapies in Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol.* 2016;111(12):1816-22.
66. Qidwai T, Khan F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* 2011;74(6):522-47.
67. Lacruz-Guzmán D, Torres-Moreno D, Pedrero F, Romero-Cara P, García-Tercero I, Trujillo-Santos J, Conesa-Zamora P. Influence of polymorphisms and TNF and IL1 β serum concentration on the infliximab response in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69(3):431-8.
68. Bek S, Bojesen AB, Nielsen JV, Sode J, Bank S, Vogel U, Andersen V. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(5):403-11.
69. Song GG, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Association between TNF- α (-308 A/G, -238 A/G, -857 C/T) polymorphisms and responsiveness to TNF- α blockers in spondyloarthritis, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2015;16(12):1427-37.
70. Pallio G, Mannino F, Irrera N, Eid AH, Squadrito F, Bitto A. Polymorphisms Involved in Response to Biological Agents Used in Rheumatoid Arthritis. *Biomolecules.* 2020;10(9):1203.
71. Lis K, Kuzawińska O, Bałkowiec-Iskra E. Tumor necrosis factor inhibitors - state of knowledge. *Arch Med Sci.* 2014;10(6):1175-85.
72. Anderson PJ. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical implications of their different immunogenicity profiles. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;34(5 Suppl1):19-22.

73. Billmeier U, Dieterich W, Neurath MF, Atreya R. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2016;22(42):9300-13.
74. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008;117(2):244-79.
75. Reinhold I, Blümel S, Schreiner J, Boyman O, Bögeholz J, Cheetham M, et al. Clinical Relevance of Anti-TNF Antibody Trough Levels and Anti-Drug Antibodies in Treating Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm Intest Dis.* 2021;6(1):38-47.
76. Silva-Ferreira F, Afonso J, Pinto-Lopes P, Magro F. A Systematic Review on Infliximab and Adalimumab Drug Monitoring: Levels, Clinical Outcomes and Assays. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(9):2289-301.
77. Ternant D, Ducourau E, Fuzibet P, Vignault C, Watier H, Lequerré T, et al. Pharmacokinetics and concentration-effect relationship of adalimumab in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 2015;79(2):286-97.
78. Gerriets V, Bansal P, Goyal A, Khaddour K. Tumor Necrosis Factor Inhibitors. 2021. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. PMID: 29494032. Datum pristupa: 16. veljače 2022.
79. HALMED. Izvješće o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj u 2020. godini. <https://halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/>. Datum pristupa: 15. studenog 2021.
80. van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2013;9(3):164-72.
81. Atiqi S, Hooijberg F, Loeff FC, Rispens T, Wolbink GJ. Immunogenicity of TNF-Inhibitors. *Front Immunol.* 2020;11:312.
82. Kalden JR, Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(12):707-18.
83. Thomas SS, Borazan N, Barroso N, Duan L, Taroumian S, Kretzmann et al. Comparative Immunogenicity of TNF Inhibitors: Impact on Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Autoimmune Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs.* 2015;29(4):241-58.

84. Schabert VF, Watson C, Joseph GJ, Iversen P, Burudpakdee C, Harrison DJ. Costs of tumor necrosis factor blockers per treated patient using real-world drug data in a managed care population. *J Manag Care Pharm.* 2013;19(8):621-30.
85. Lawton J, Achit H, Pouillon L, Boschetti E, Demore B, Matton T, et al. Cost-of-illness of inflammatory bowel disease patients treated with anti-tumour necrosis factor: A French large single-centre experience. *United European Gastroenterol J.* 2019;7(7):908-13.
86. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T, et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J Crohns Colitis.* 2020;14(1):4-22.
87. Maaser C, Sturm A, Vavricka SR, Kucharzik T, Fiorino G, Annese V, et al; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR]. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. *J Crohns Colitis.* 2019;13(2):144-64.
88. Sturm A, Maaser C, Calabrese E, Annese V, Fiorino G, Kucharzik T, et al.; European Crohn's and Colitis Organisation [ECCO] and the European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology [ESGAR]. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. *J Crohns Colitis.* 2019;13(3):273-84.
89. Bykerk VP, Massarotti EM. The new ACR/EULAR remission criteria: rationale for developing new criteria for remission. *Rheumatology (Oxford).* 2012;51(Suppl 6):vi16-20.
90. Mitrović J, Morović-Vergles J, Martinović Kaliterna D, Anić B, Babić-Naglić Đ, Grazio S, et al. Prijedlog preporuka Hrvatskoga reumatološkog društva za liječenje bolesnika s reumatoidnim artritismom biološkim i ciljanim sintetskim lijekovima, 2017 *Reumatizam* 2017;64(2):65-70.
91. Grazio S, Novak S, Laktašić-Žerjavić N, Anić B, Babić-Naglić Đ, Grubišić F et al. Prijedlog preporuka Hrvatskoga reumatološkog društva za liječenje odraslih bolesnika s aksijalnim spondiloartritismom i psorijatičnim artritismom biološkim lijekovima i ciljanim sintetskim molekulama, 2017. *Reumatizam* 2017;64(2):71–87

92. Vucelić B, Čuković-Čavka S, Banić M, Bilić A, Borzan V, Duvnjak M i sur. Hrvatski konsenzus o liječenju upalnih bolesti crijeva biološkom terapijom. *Acta Med. Croat.* 2013;67(2):75-86.
93. Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay JO, et al. ECCO. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis.* 2017;11(1):3-25.
94. Torres J, Bonovas S, Doherty G, Kucharzik T, Gisbert JP, Raine T et al. ECCO Guidelines on Therapeutics in Crohn's Disease: Medical Treatment. *J Crohns Colitis.* 2020;14(1):4-22.
95. van der Heijde D, Ramiro S, Landewé R, Baraliakos X, Van den Bosch F, Sepriano A, et al. 2016 update of the ASAS-EULAR management recommendations for axial spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):978-91.
96. Bobek D, Žagar I, Kovač Durmiš K, Perić P, Čurković B, Babić-Naglić Đ. Ocjena aktivnosti ankilozantnog spondilitisa primjenom BASDAI i ASDAS instrumenta. *Reumatizam* 2012;59(1):5-10.
97. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol.* 1994;21(12):2286-91.
98. Farkas DH, Drevon AM, Kiechle FL, DiCarlo RG, Heath EM, Crisan D. Specimen stability for DNA-based diagnostic testing. *Diagn Mol Pathol.* 1996;5(4):227-35. Erratum in: *Diagn Mol Pathol* 1997;6(3):178.
99. Carracedo A, Sánchez-Diz P. Forensic DNA-typing technologies: a review. *Methods Mol Biol.* 2005;297:1-12.
100. Alipour O, Gualti A, Shao L, Zhang B. Systematic review and meta-analysis: real-world data rates of deep remission with anti-TNF α in inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):312.
101. Hamann PDH, Pauling JD, McHugh N, Shaddick G, Hyrich K; BSRBR-RA Contributors Group. Predictors, demographics and frequency of sustained remission and low disease activity in anti-tumour necrosis factor-treated rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford).* 2019;58(12):2162-9.
102. Garcês S, Demengeot J. The Immunogenicity of Biologic Therapies. *Curr Probl Dermatol.* 2018;53:37-48.

103. Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, et al: Development of antidrug antibodies against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA* 2011;305:1460-8.
104. Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, Wolbink GJ, Killestein J, de Groot ER, et al: Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *J Immunol Methods*. 2011;372:196-203.
105. Pope JE, Choy EH. C-reactive protein and implications in rheumatoid arthritis and associated comorbidities. *Semin Arthritis Rheum*. 2021;51(1):219-29.
106. Plant D, Ibrahim I, Lunt M, Eyre S, Flynn E, Hyrich KL, et al. Correlation of C-reactive protein haplotypes with serum C-reactive protein level and response to anti-tumor necrosis factor therapy in UK rheumatoid arthritis patients: results from the Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate cohort. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(5):R214.
107. Giles JT, Bartlett SJ, Andersen R, Thompson R, Fontaine KR, Bathon JM. Association of body fat with C-reactive protein in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2008;58(9):2632-41.
108. Greenmyer JR, Stacy JM, Sahmoun AE, Beal JR, Diri E. DAS28-CRP Cutoffs for High Disease Activity and Remission Are Lower Than DAS28-ESR in Rheumatoid Arthritis. *ACR Open Rheumatol*. 2020;2(9):507-11.
109. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(5):661-5.
110. Florin TH, Paterson EW, Fowler EV, Radford-Smith GL. Clinically active Crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41(3):306-11.
111. Bertani L, Blandizzi C, Mumolo MG, Ceccarelli L, Albano E, Tapete G, et al. Fecal Calprotectin Predicts Mucosal Healing in Patients With Ulcerative Colitis Treated With Biological Therapies: A Prospective Study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2020;11(5):e00174.
112. Pauwels RWM, van der Woude CJ, Erler NS, de Vries AC. Fecal calprotectin is an early predictor of endoscopic response and histologic remission after the start of vedolizumab in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2020;13:1756284820979765.

113. Gisbert JP, Chaparro M. Predictors of Primary Response to Biologic Treatment [Anti-TNF, Vedolizumab, and Ustekinumab] in Patients With Inflammatory Bowel Disease: From Basic Science to Clinical Practice. *J Crohns Colitis*. 2020;14(5):694-709.
114. Aslam MM, John P, Bhatti A, Jahangir S, Kamboh MI. Vitamin D as a Principal Factor in Mediating Rheumatoid Arthritis-Derived Immune Response. *Biomed Res Int*. 2019;2019:3494937.
115. Kim H, Baek S, Hong SM, Lee J, Jung SM, Lee J, et al. 1,25-dihydroxy Vitamin D3 and Interleukin-6 Blockade Synergistically Regulate Rheumatoid Arthritis by Suppressing Interleukin-17 Production and Osteoclastogenesis. *J Korean Med Sci*. 2020;35(6):e40.
116. Reich KM, Fedorak RN, Madsen K, Kroeker KI. Role of Vitamin D in Infliximab-induced Remission in Adult Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(1):92-9.
117. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(1):53–8.
118. Vojinovic J, Tincani A, Sulli A, Soldano S, Andreoli L, Dall'Ara F, et al. European multicentre pilot survey to assess vitamin D status in rheumatoid arthritis patients and early development of a new Patient Reported Outcome questionnaire (D-PRO). *Autoimmun Rev*. 2017;16(5):548-54.
119. Miler M, Nikolac Gabaj N, Grazio S, Vahtarić A, Vrtarić A, Grubišić F, Skala Kavanagh H, Doko Vajdić I, Vrkić N. Lower concentration of vitamin D is associated with lower DAS28 and VAS-pain scores in patients with inflammatory rheumatic diseases treated with infliximab: a pilot study. *Rheumatol Int*. 2020;40(9):1455-61.
120. Meena N, Singh Chawla SP, Garg R, Batta A, Kaur S. Assessment of Vitamin D in Rheumatoid Arthritis and Its Correlation with Disease Activity. *J Nat Sci Biol Med*. 2018;9(1):54-8.
121. de la Torre Lossa P, Moreno Álvarez M, González Guzmán MC, López Martínez R, Ríos Acosta C. La vitamina D no es útil como biomarcador para la actividad de la enfermedad en artritis reumatoide. *Reumatol Clin*. 2020;16:110-5.
122. Nielsen OH, Hansen TI, Gubatan JM, Jensen KB, Rejnmark L. Managing vitamin D deficiency in inflammatory bowel disease. *Frontline Gastroenterol*. 2019;10(4):394-400.

123. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al.; Endocrine Society. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911-30.
124. Nikolac Gabaj N, Unic A, Miler M, Pavicic T, Culej J, Bolanca I, et al. In sickness and in health: pivotal role of vitamin D. *Biochem Med (Zagreb).* 2020;30(2):020501.
125. Ananthkrishnan AN. Vitamin D and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2016;12(8):513-5.
126. Ding NS, Hart A, De Cruz P. Systematic review: predicting and optimising response to anti-TNF therapy in Crohn's disease - algorithm for practical management. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(1):30-51.
127. Wilson A, Choi B, Sey M, Ponich T, Beaton M, Kim RB. High infliximab trough concentrations are associated with sustained histologic remission in inflammatory bowel disease: a prospective cohort study. *BMC Gastroenterol.* 2021;21(1):77.
128. Vande Casteele N, Khanna R, Levesque BG, Stitt L, Zou GY, Singh S, et al. The relationship between infliximab concentrations, antibodies to infliximab and disease activity in Crohn's disease. *Gut.* 2015;64(10):1539-45.
129. Papamichael K, Cheifetz AS. Use of anti-TNF drug levels to optimise patient management. *Frontline Gastroenterol.* 2016;7(4):289-300.
130. Siljehult F, Ärlestig L, Eriksson C, Rantapää-Dahlqvist S. Concentrations of infliximab and anti-drug antibodies in relation to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2018;47(5):345-50.
131. Eng GP, Bouchelouche P, Bartels EM, Bliddal H, Bendtzen K, Stoltenberg M. Anti-Drug Antibodies, Drug Levels, Interleukin-6 and Soluble TNF Receptors in Rheumatoid Arthritis Patients during the First 6 Months of Treatment with Adalimumab or Infliximab: A Descriptive Cohort Study. *PLoS One.* 2016;11(9):e0162316.
132. Balsa A, Sanmarti R, Rosas J, Martin V, Cabez A, Gómez S, Montoro M. Drug immunogenicity in patients with inflammatory arthritis and secondary failure to tumour necrosis factor inhibitor therapies: the REASON study. *Rheumatology (Oxford).* 2018;57(4):688-93.
133. Quistrebert J, Hässler S, Bachelet D, Mbogning C, Musters A, Tak PP, et al. Incidence and risk factors for adalimumab and infliximab anti-drug antibodies in rheumatoid

- arthritis: A European retrospective multicohort analysis. *Semin Arthritis Rheum.* 2019;48(6):967-75.
134. Podaci s <https://www.ensembl.org/>, datum pristupa: 18. veljače 2022.
 135. Chen L, Huang Z, Liao Y, Yang B, Zhang J. Association between tumor necrosis factor polymorphisms and rheumatoid arthritis as well as systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Braz J Med Biol Res.* 2019;52(3):e7927.
 136. Li F, Xie X, Chen J, Gao J, Lu F. Association of TNF- α gene polymorphisms with the risk of rheumatoid arthritis in Han Chinese population from Hunan. *J Cent South Univ.* 2015;40(9):945-54.
 137. Kaluza W, Reuss E, Grossmann S, Hug R, Schopf RE, Galle PR, et al. Different transcriptional activity and in vitro TNF- α production in psoriasis patients carrying the TNF- α 238A promoter polymorphism. *J Invest Dermatol.* 2000;114:1180–3.
 138. Huizinga TWJ, Westendorp RGJ, Bollen ELEM, Keijsers V, Brinkman BMN, Langermans JAM, et al. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different groups of patients. *J Neuroimmunol.* 1997;72:149-53.
 139. Mousa AK, Ghoneim AM, Noha B, Ahmed E. TNF- α genetic polymorphisms and its expression in Egyptian rheumatoid arthritis patients. *Am J Life Sci.* 2014;2:234-40.
 140. Cvetkovic JT, Wallberg-Jonsson S, Stegmayr B, Rantapaa-Dahlqvist S, Lefvert AK. Susceptibility for and clinical manifestations of rheumatoid arthritis are associated with polymorphisms of the TNF-alpha, IL-1beta, and IL-1Ra genes. *J Rheumatol.* 2002;29:212-9.
 141. Sode J, Bank S, Vogel U, Andersen PS, Sørensen SB, Bojesen AB, et al. Genetically determined high activities of the TNF-alpha, IL23/IL17, and NFkB pathways were associated with increased risk of ankylosing spondylitis. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):165.
 142. Herrera F, Gutiérrez L, Salazar Alcalá E, Balbas O, Fernández Mestre M Role of TNF-Alpha and IL10 genes in the development and clinical manifestations of psoriatic arthritis. *Rev Colomb Reumatol.* 2018;25(1):9-15.
 143. Zhu J, Qu H, Chen X, Wang H, Li J. Single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region alter the risk of psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis: a meta-analysis. *PLoS One.* 2013;8(5):e64376.
 144. Mao YQ, Dong SQ, Gao M. Association between TNF- α rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):15811-21.

145. Cao Q, Zhu Q, Wu ML, Hu WL, Gao M, Si JM. Genetic susceptibility to ulcerative colitis in the Chinese Han ethnic population: association with TNF polymorphisms. *Chin Med J (Engl)*. 2006;119(14):1198-203.
146. Al-Taei OMS. Genetic Association between tumor necrosis factor (TNF-alpha and TNF-beta) gene polymorphisms and inflammatory bowel disease. *Journal of Physics: Conference Series*. 2020;1664:012130.
147. Bulatova IA, Tretyakova YI, Shchekotova AP, Shchekotov VV, Krivtsov AV, Nasibullina NI. The influence of tumor necrosis factor alpha and polymorphism of its gene (rs1800629) on the severity and progression of chronic hepatitis and ulcerative colitis. *Eksp Klin Gastroenterol*. 2016;(3):9-14. [Russian].
148. Chen DY, Chen YM, Tsai WC, Tseng JC, Chen YH, Hsieh CW, et al. Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(3):e16.
149. Prieto-Pérez R, Cabaleiro T, Daudén E, Abad-Santos F. Gene polymorphisms that can predict response to anti-TNF therapy in patients with psoriasis and related autoimmune diseases. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(4):297-305.
150. Seitz M, Wirthmüller U, Möller B, Villiger PM. The -308 tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism predicts therapeutic response to TNF alpha-blockers in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis patients. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(1):93-6.
151. Miceli-Richard C, Comets E, Verstuyft C, Tamouza R, Loiseau P, Ravaud P, et al. A single tumour necrosis factor haplotype influences the response to adalimumab in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008;67(4):478-84.
152. Ingegnoli F, Favalli EG, Meroni PL. Does polymorphism of genes coding for pro-inflammatory mediators predict the clinical response to TNF alpha blocking agents? A review analysis of the literature. *Autoimmun Rev*. 2011;10(8):460-3.
153. Song GG, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Lee YH. Association between TNF- α (-308 A/G, -238 A/G, -857 C/T) polymorphisms and responsiveness to TNF- α blockers in spondyloarthropathy, psoriasis and Crohn's disease: a meta-analysis. *Pharmacogenomics* 2015;16(12):1427-37.
154. van Schouwenburg PA, Krieckaert CL, Rispens T, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. Long-term measurement of anti-adalimumab using pH-shift-anti-idiotypic antigen

- binding test shows predictive value and transient antibody formation. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(10):1680-6.
155. Reinhold I, Blümel S, Schreiner J, Boyman O, Bögeholz J, Cheetham M, et al. Clinical Relevance of Anti-TNF Antibody Trough Levels and Anti-Drug Antibodies in Treating Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflamm Intest Dis.* 2021;6(1):38-47.
 156. Kopylov U, Seidman E. Predicting durable response or resistance to antitumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol.* 2016;9(4):513-26.
 157. Ho GT, Lee HM, Brydon G, Ting T, Hare N, Drummond H, et al. Fecal calprotectin predicts the clinical course of acute severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(3):673-8.
 158. Netz U, Carter JV, Eichenberger MR, Dryden GW, Pan J, Rai SN, Galandiuk S. Genetic polymorphisms predict response to anti-tumor necrosis factor treatment in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2017;23(27):4958-67.
 159. Bank S, Julsgaard M, Abed OK, Burisch J, Broder Brodersen J, Pedersen NK, et al. Polymorphisms in the NFkB, TNF-alpha, IL-1beta, and IL-18 pathways are associated with response to anti-TNF therapy in Danish patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(7):890-903.
 160. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheum Dis Clin North Am.* 2009;35(4):745-57, vii-viii.
 161. O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(3):161-7.
 162. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL; Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, Barton A, Worthington J, et al. Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet.* 2008;17(22):3532-8.
 163. Babić-Naglić Đ, Anić B, Čikeš N, Novak S, Grazio S, Morović-Vergles J, i dr. Prijedlog Hrvatskog reumatološkog društva HLZ-a za liječenje reumatoidnog artritisa odraslih bolesnika biološkim lijekovima, 2013. *Reumatizam.* 2013;60(1):47-51.

164. Gheita TA, Azkalany GS, Gaber W, Mohey A. Clinical significance of serum TNF α and -308 G/A promoter polymorphism in rheumatoid arthritis. *Egypt Rheumatol.* 2015;37(2):49–54.
165. O'Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P. TNF-alpha-308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-alpha blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2009;9(3):161-7.
166. Pauwels RWM, van der Woude CJ, Nieboer D, Steyerberg EW, Casanova MJ, Gisbert JP, et al. Prediction of Relapse After Anti-Tumor Necrosis Factor Cessation in Crohn's Disease: Individual Participant Data Meta-analysis of 1317 Patients From 14 Studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2021;S1542-3565(21)00347-5.
167. Atreya R, Neurath MF, Siegmund B. Personalizing Treatment in IBD: Hype or Reality in 2020? Can We Predict Response to Anti-TNF? *Front Med (Lausanne).* 2020;7:517.

8 POPIS KRATICA

Kratika	Značenje
1,25(OH)₂D	1,25-dihidroksi-vitamin D
5-ASA	5-aminosalicilna kiselina (engl. <i>5-aminosalicylic acid</i>)
6-MP	6-merkaptopurin
ADM	adalimumab
AIH	autoimuni hepatitis
Anti-TNF	protutijela na faktor nekroze tumora
AITD	autoimuna bolest štitnjače
ARF	akutna reumatska groznica
AS	ankilozantni spondilitis
At	protutijela
AZA	azatioprin
BASDAI	indeks aktivnosti ankilozantnog spondilitisa (engl. <i>Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index</i>)
BASFI	funkcionalni indeks za ankilozantni spondilitis (engl. <i>Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index</i>)
BBZ	broj uključenih bolnih zglobova
bDMARD	biološki DMARD lijekovi
BOZ	broj otečenih zglobova
CD	Crohnova bolest (engl. <i>Crohn's disease</i>)
CMIA	kemiluminiscentna imunokemijska metoda s mikročesticama (engl. <i>Chemiluminescent Microparticle immunoassay</i>)
CRP	C reaktivni protein
csDMARD	konvencionalni sintetski lijekovi koji modificiraju tijek bolesti (engl. <i>conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drugs</i>)
DAS28	skor za vrednovanje aktivnosti bolesti (engl. <i>disease activity score</i>)

Kratica	Značenje
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ECCO	Europska organizacija za Crohnovu bolest i kolitis (engl. <i>European Crohn's and Colitis Organisation</i>)
ELISA	enzimska imunokemijska metoda (engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
ESGAR	Europsko društvo za gastrointestinalnu i abdominalnu radiologiju (engl. <i>European Society of Gastrointestinal and Abdominal Radiology</i>)
Fab	varijabilna regija specifična za antigen (engl. <i>fragment binding antigen</i>)
Fc	konstantna regija (engl. <i>fragment constant</i>)
fKal	fekalni kalprotektin
GD	Gravesova bolest
GWAS	Cjelogenomske asocijacijske studije (engl. <i>Genome-Wide Association Studies</i>)
HLA	sustav humanog leukocitnog antigena (engl. <i>Human Leukocyte Antigens</i>)
IBD	upalne bolesti crijeva (engl. <i>inflammatory bowel diseases</i>)
IFX	infliksimab
IL	interleukin
JAK	<i>Janus</i> kinaza
K₃EDTA	etilendiamin tetraoctena kiselina (engl. <i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>)
LT-α	limfotoksin α
LT-β	limfotoksin β
MHC	glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
MS	multipla skleroza
MTX	metotreksat
PBC	primarna bilijarna ciroza
PEG	Polietilenglikol

Kratica	Značenje
PRR	receptori koji prepoznaju molekulske strukture (engl. <i>Pattern-Recognition Receptors</i>)
PsA	psorijazni artritis
RA	reumatoidni artritis
SLE	sistemska eritematozni lupus
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. single nucleotide polymorphism)
SS	Sjögrenov sindrom
sTNF-α	topljivi TNF- α (engl. soluble TNF- α)
T1D	šećerna bolest tipa 1.
TLR	<i>toll-like</i> receptor
tmTNF-α	transmembranski TNF- α (engl. <i>transmembrane TNF-α</i>)
TNFR1	receptor TNF- α tipa 1
TNFR2	receptor TNF- α tipa 2
TNF-α	faktor nekroze tumora α (engl. <i>tumor necrosis factor α</i>)
UC	ulcerozni kolitis (engl. <i>ulcerative colitis</i>)

9 ŽIVOTOPIS I POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

ŽIVOTOPIS

Marijana Miler (djevojački Žirović) rođena je u Sisku 12. studenoga 1980. godine. Osnovnu i srednju školu završila je u Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1999. godine. U sklopu programa razmjene studenata (CEEPUS, HR-0044-02/03) 2003. godine boravila je na Sveučilištu u Ljubljani gdje je izradila diplomski rad. Godine 2004. diplomirala je stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Pripravnički staž odradila je u Kliničkom zavodu za kemiju, KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu, gdje je 2005. godine zaposlena kao znanstveni novak na projektu "Molekularno biokemijski poremećaji u akutnih, kroničnih i degenerativnih bolesti". Nakon specijalističkog staža (od 2007. do 2010.), u svibnju 2010. položila je specijalistički ispit te stekla zvanje specijalista medicinske biokemije. Od pripravničkog staža do danas radi u Kliničkom zavodu za kemiju, KBC Sestre milosrdnice.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara (HKMB) i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (HDMBLM). Od 2006. do 2017. godine aktivno je sudjelovala u radu časopisa *Biochemia Medica*, kao izvršni te kasnije pomoćni urednik časopisa, a trenutno je član Uredničkog odbora. Od 2012. do 2017. bila je predsjednica Povjerenstva za edukaciju HDMBLM

Aktivno je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova kao autor sažetaka, predavač, član te predsjednica organizacijskog odbora.

Autor je i koautor 34 znanstvena članka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents i Web of Science Core Collection, 6 poglavlja u knjigama ili priručnicima, te više od 40 kongresnih sažetaka. Održala je 15 pozvanih predavanja na stranim i domaćim skupovima.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

Radovi u znanstvenim časopisima:

1. Nikolac Gabaj N, Miler M*, Vrtaric A, Celap I, Bocan M, Filipi P, Radisic Biljak V, Simundic AM, Supak Smolcic V, Kocijancic M. Comparison of three different protocols for obtaining hemolysis. *Clin Chem Lab Med* 2022;60(5)
2. Lamot M, Miler M, Nikolac Gabaj N, Lamot L, Milošević M, Harjaček M, Abdović S. Serum calprotectin is a valid biomarker in distinction of bacterial urinary tract infection from viral respiratory illness in children under three years of age. *Front Pediat* 10:768260.
3. Miler M, Nikolac Gabaj N, Čelap I, Grazio S, Tomašić V, Bišćanin A, Mitrović J, Đerek L, Morović-Vergles J, Vrkić N, Štefanović M. Association of polymorphisms in promoter region of TNF- α -238 and -308 with clinical outcomes in patients with immune-mediated inflammatory diseases on anti-TNF therapy. *Rheumatol Int.* 2021;41(12):2195-03.
4. Lamot L, Miler M, Vukojevic R, Vidovic M, Lamot M, Trutin I, Nikolac Gabaj N, Harjacek M. The increased levels of faecal calprotectin in children with active enthesitis related arthritis and MRI signs of sacroiliitis: the results of a single centre cross-sectional exploratory study in juvenile idiopathic arthritis patients. *Front Med* 2021;8:650619.
5. Tešija Kuna A, Hanžek M, Vukasović I, Nikolac Gabaj N, Vidranski V, Čelap I, Miler M, Stančin N, Šimac B, Živković M, Žarak M, Kmet M, Jovanović M, Tadinac S, Šupraha Goreta S, Periša J, Šamija I, Štefanović M. Comparison of diagnostic accuracy for eight SARS-CoV-2 serological assays. *Biochem Med (Zagreb)* 2021;31(1):010708.
6. Miler M, Nikolac Gabaj N, Grazio S, Vahtarić A, Vrtarić A, Grubišić F, Skala Kavanagh H, Doko Vajdić I, Vrkić N. Lower concentration of vitamin D is associated with lower DAS28 and VAS-pain scores in patients with inflammatory rheumatic diseases treated with infliximab: a pilot study. *Rheumatol Int* 2020;40(9):1455-61.
7. Nikolac Gabaj N, Unic A, Miler M, Pavicic T, Culej J, Bolanca I, Herman Mahecic D, Milevoj Kopicinovic L, Vrtaric A. In sickness and in health: pivotal role of vitamin D. *Biochem Med (Zagreb)* 2020;30(2):020501.
8. Milevoj Kopicinovic L, Brcic M, Vrtaric A, Unic A, Bozovic M, Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J. Long-term stability of clinically relevant chemistry analytes in pleural and peritoneal fluid. *Biochem Med (Zagreb)* 2020;30(2):020701.
9. Nikolac Gabaj N, Miler M, Unic A, Milevoj Kopicinovic L, Vrtaric A, Culej J. Ascorbic acid in urine still compromises urinalysis results. *Ann Clin Biochem.* 2020;57(1):64-68.

10. Miler M, Nikolac Gabaj N, Culej J, Unic A, Vrtaric A, Milevoj Kopcinovic L. Integrity of serum samples is changed by modified centrifugation conditions. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(12):1882-7.
11. Unic A, Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J, Lisac A, Horvat A, Vrkic N. Ascorbic acid- A black hole of urine chemistry screening. *J Clin Lab Anal* 2018;32(5):e22390
12. Rimac V, Lopic I, Kules K, Rogic D, Miler M. Implementation of the autovalidation algorithm for clinical chemistry tests in the laboratory information system. *Lab Med.* 2018;49(3):284-291.
13. Tesija Kuna A, Dukic K, Nikolac N, Miler M, Vukasovic I, Langer S, Simundic AM, Vrkic N. Comparison of enzymatic assay for HbA1c measurement (Abbott Architect) with capillary electrophoresis (Sebia Minicap Flex Piercing Analyser). *Lab Med* 2018;49(3):231-238
14. Simundic AM, Filipi P, Vrtaric A, Miler M, Nikolac Gabaj N, Kocsis A, Avram S, Gligorovic Barhanovic N, Bulo A, Cadamuro J, van Dongen-Lases E, Eker P, Vital-E-Silva A, Homsak E, Ibarz M, Labudovic D, Nybo M, Pivovarníková H, Shmidt I, Siodmiak J, Sumarac Z, Vitkus D. Patient's knowledge and awareness about the effect of the over-the-counter (OTC) drugs and dietary supplements on laboratory test results: a survey in 18 European countries. *Clin Chem Lab Med.* 2018;57(2):183-94.
15. Bunjevac A, Nikolac Gabaj N, Miler M, Horvat A. Preanalytics of urine sediment examination: effect of relative centrifugal force, tube type, volume of sample and supernatant removal. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(1):010707.
16. Nikolac Gabaj N, Miler M, Vrtaric A, Hemar M, Filipi P, Kocijancic M, Supek Smolcic V, Celap I, Simundic AM. Precision, accuracy, cross reactivity and comparability of serum indices measurement on Abbott Architect c8000, Beckman Coulter AU5800 and Roche Cobas 6000 c501 clinical chemistry analyzers. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(5):776-88.
17. Miler M, Nikolac Gabaj N, Dukic L, Simundic AM. Key performance indicators to measure improvement after implementation of total laboratory automation Abbott Accelerator a3600. *J Med Syst* 2018;42(2):28.
18. Luksic AH, Nikolac Gabaj N, Miler M, Dukic L, Bakliza A, Simundic AM. Visual assessment of hemolysis affects patient safety. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(4):574-81.
19. Gabaj Nikolac N, Miler M, Mihic R. I index is not an accurate indicator of ictericia in conjugated hyperbilirubinemia. *Clin Chim Acta* 2017;473:32-34

20. Miler M, Nikolac N. Patient safety is not compromised by excluding microscopic examination of negative urine dipstick. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(1):77-83
21. Miler M, Nikolac N, Segulja D, Kackov Maslac S, Celap I, Altabas K, Sefer S, Simundic AM. Is peritoneal dialysis causing a measurable burden of inflammatory and endothelial injury on top of metabolic syndrome? *J Endocrinol Invest* 2017;40(2):163–8.
22. Nikolac N, Celap I, Filipi P, Hemar M, Kocijancic M, Miler M, Simundic AM, Supak Smolcic V, Vrtaric A. Croatian laboratories have a good knowledge of the proper detection and management of hemolyzed, icteric and lipemic samples. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(3):419-25.
23. Topic E, Nikolac N, Panteghini M, Theodorsson E, Salvagno GL, Miler M, Simundic AM, Infusino I, Nordin G, Westgard S. How to assess the quality of your analytical method? *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(11):1707-18.
24. Dukic K, Zoric M, Pozaic P, Starcic J, Culjak M, Saracevic A, Miler M. How compliant are technicians with universal safety measures in medical laboratories in Croatia? – a pilot study. *Biochem Med* 2015;25(3):386-92.
25. Simundic AM, Kackov S, Miler M, Fraser CG, Petersen PH. Terms and symbols used in studies on biological variation: the need for harmonization. *Clin Chem* 2015;61(2):438-9.
26. Miler M, Simundic AM. Low level of adherence to instructions for 24-hour urine collection among hospital outpatients. *Biochem Med* 2013;23(3):316-20.
27. Celap I, Simundic AM, Nikolac N, Miler M, Zec I, Altabas K, Sefer S. Visfatin is not associated with inflammatory markers in patients on hemodialysis. *Clin Lab* 2013;56(11-12): 1253-9.
28. Caridi G, Dagnino M, Simundic AM, Miler M, Stancic V, Campagnoli M, Galliano M, Minchiotti L. Albumin Benkovac (c.1175 A>G; p.Glu392Gly): a novel genetic variant of human serum albumin. *Translational Research*, 2010;155:118-9.
29. Tesija Kuna A, Grazio S, Miler M, Vukasovic I, Peric P, Vrkic N. Antibodies targeting mutated citrullinated vimentin in patients with psoriatic arthritis. *Clin Rheumatol.* 2010;29(5):487-93.
30. Tesija Kuna A, Lamot L, Miler M, Harjacek M, Simundic AM, Vrkic N. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and antibodies to cyclic citrullinated peptides in juvenile idiopathic arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(12):1525-30.

31. Simundic AM, Nikolac N, Miler M, Cipak A, Topic E. Efficiency of test report delivery to the requesting physician in an outpatient setting: an observational study. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(9):1063-6.
32. Miler M, Simundic AM, Stefanovic M, Ferenc-Ruzic D, Kvaternik M, Topic E, Vrkić N. A model for results comparison on two different biochemistry analyzers in laboratory accredited according to the ISO 15189. *Biochem Med* 2009;19(3): 287-93.
33. Simundic AM, Miler M, Nikolac N, Topic E, Carzavec D, Milanovic B, Stancic V. Bisalbuminemia in a male Croatian patient with sarcoidosis. *Biochem Med* 2009;19(1):95-100.
34. Kozar J, Šimundić AM, Nikolac N, Žirović M, Topić E. Accu Chek Compact Plus blood glucometer evaluation. *Biochem Med* 2008;18(3):361-7.
35. Tešija Kuna A, Žirović M. Antibodies to citrullinated proteins/peptides in rheumatoid arthritis: what have we learned so far? *Biochem Med* 2008;18(3):275-90.
36. Žirović M, Tešija Kuna A, Nikolac N, Štefanović M, Topić E, Žaja-Franulović O, Jurčić Z. Severe cholestasis in a newborn with PiZZ alpha-1-antitrypsin genotype – A case report. *Biochem Med* 2007;17:242-6.

Kongresni sažeci:

1. Milevoj Kopčinović L, Nikolac Gabaj N, Miler M, Unić A, Vrtarić A, Božović M, Štefanović M. Anti-RBDS1 IgG response to COVID-19 vaccines in individuals with no prior infection. *Clin Chem Lab Med* 2021;59(S1):S614
2. Lamot M, Miler M, Gabaj NN, et al. Serum calprotectin is a novel predictor of bacterial urinary tract infection in a febrile child. *Archives of Disease in Childhood* 2021;106:A15.
3. Lamot L, Kovacevic A, Miler M, Nikolac Gabaj N, Vidović M, Harjaček M. Cross-sectional study of fecal calprotectin in children with various forms of arthritis and non-inflammatory musculoskeletal disorders: a single centre experience. *Pediatric Rheumatology* 2020;18(Suppl 2):P212
4. Nikolac Gabaj N, Miler M, Vrtaric A, Culej J, Bozovic M, Topic A, Milevoj Kopcinovic L. Urine test strip ascorbic acid interference: A risk analysis. *Clin Chim Acta* 2019;493(Suppl 1):s521
5. Nikolac Gabaj N, Miler M, Culej J, Milevoj Kopcinovic L, Unic A, Vrtaric A, Topic A. Is sample type associated with high hemolysis index? *Clin Chim Acta* 2019;493(Suppl 1):s683
6. Vrtaric A, Nikolac Gabaj N, Miler M, Bozovic M, Culej J, Milevoj Kopcinovic L, Topic A. Age, gender and seasonal differences of vitamin D concentrations. *Clin Chim Acta* 2019;493(Suppl 1):s631
7. Bozovic M, Milevoj Kopcinovic L, Culej J, Vrtaric A, Topic A, Miler M, Nikolac Gabaj N. Capillary blood sampling for POCT analysis: left vs. Right hand. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(4):eA62
8. Milevoj Kopčinović L, Brčić M, Vrtarić A, Culej J, Božović M, Topić A, Miler M, Nikolac Gabaj, N. Preanalytical stability of clinically relevant chemistry analytes in serous fluids. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(4):eA42-eA43.
9. Lamot L, Oletić L, Vidović M, Lamot M, Miler M, Nikolac Gabaj N, Harjaček M. Cross-sectional study of serum calprotectin levels in non-systemic juvenile idiopathic arthritis patients and children with acute inflammatory disease. *Pediatr Rheumatol* 2018;16:52
10. Vrtaric A, Bozovic M, Herceg I, Miler M, Culej J, Nikolac Gabaj N. Control sample analytes stability at room temperature in the light and in the dark. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(Suppl 1):S101-2.

11. Božović M, Vrtarić A, Miler M, Culej J, Nikolac Gabaj N. Preanalytical factors in parathyroid hormone measurement. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(Suppl 1):S88-9.
12. Miler M, Nikolac Gabaj N, Vrtarić A, Culej J, Božović M, Vrkić N. Shorter centrifugation time could compromise sample quality. *Biochem Med (Zagreb)* 2018;28(Suppl 1):S93-4
13. Miler M, Nikolac N, Čelap I, Filipi P, Hemar M, Kocijančić M, Šimundić AM, Šupak Smolčić V, Vrtarić A. Cross-reactivity of serum indices on Abbott Architect c8000, Roche Cobas 6000 and Beckman Coulter AU5800 analyzers: HIL interference project of the Working group for the preanalytical phase, Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(4):eA20
14. Unic A, Nikolac N, Miler M, Horvat A, Vrkić N. Ascorbic acid interference on the performance of iChem Velocity and Combur10Test®M urine chemistry strips. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(4):eA53
15. Unic A, Lisac A, Horvat A, Miler M, Nikolac N, Vrkić N. Urine chemistry analysis – comparability and accuracy of IChem Velocity and Combur10Test®M test strips. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:S301
16. Njegovan M, Tešija Kuna A, Vukasović I, Topić A, Miler M, Š Vrbanec, I Pleše. Verification of Bühlmann faecal Calprotectin test (fCAL TURBO TEST) on Abbott Architect c8000 analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:S267
17. Miler M, Nikolac N, Vrkić N. Substantial savings of the laboratory budget are possible with reducing of frequent unnecessary immunoglobulin retesting. *J Med Biochem* 2016;35(2):212.
18. Nikolac N, Miler M, Brenčić T, Zec I. Racionalizacija laboratorijskih troškova promjenom vrste uzorka: ionizirani kalcij u serumu. Simpozij LOKUS 2016., Knjiga sažetaka, 2016., str. 26
19. Miler M, Božović M, Nikolac N. Pregled sedimenta mokraće - analizom rizika do optimizacije laboratorijskog procesa. Simpozij LOKUS 2016., Knjiga sažetaka, 2016., str. 23
20. Miler M, Nikolac N, Lukšić AH, Bakliža A, Dukić L, Šimundić AM. Procjena rizika od neautomatiziranog postupanja s hemolitičnim uzorcima na sigurnost pacijenta/Risk assessment for manual handling of hemolyzed samples on patient safety. *Biochem Med* 2015;25(Suppl 1):S125-6.

21. Vrtarić A, Nikolac N, Miler M, Šimundić AM. Analitička verifikacija Combur 10 Test® M traka i urinskog analizatora Cobas u 411/Analytical verification of Combur 10 Test® M strips and urine analyzer Cobas u 411. *Biochem Med* 2015;25(Suppl 1):S100-1.
22. Filipi P, Doželenčić M, Zec I, Miler M, Nikolac N, Šimundić AM. Verifikacija metode za određivanje humanog korionskog gonadotropina na analizatoru Cobas e411/Verification of the method for determining human chorionic gonadotropin on Cobas e411 analyzer. *Biochem Med* 2015;25(Suppl 1):S101-2.
23. Dukic L, Saracevic A, Miler M, Nikolac N, Simundic AM. Increased frequency of duplicate errors for LD IFCC method on Abbott Architect in Li-heparin plasma relative to serum samples. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(Special Suppl): pp.S971.
24. Filipi P, Vrtaric A, Miler M, Nikolac N, Simundic AM. Are patients well informed about the influence of OTC drugs, food supplements and preanalytical factors on laboratory tests results? *Clin Chem Lab Med* 2015;53(Special Suppl): pp.S101.
25. Nikolac N, Miler M, Šimundić AM. Indeks hemolize – predanalitički indikator kvalitete Simpozij LOKUS 2015., Knjiga sažetaka, 2015., str. 11
26. Miler M. Indikatori učinkovitosti. Čime izmjeriti napredak? Kako pronaći i postaviti kriterije prihvatljivosti projekta? Možemo li prepoznati uspješan projekt? Simpozij LOKUS 2015., Knjiga sažetaka, 2015., str. 4
27. Hemar M, Miler M, Nikolac N, Filipi P, Vrtarić A, Šimundić AM. Verifikacija indeksa hemolize, ikterije i lipemije (HIL) na analizatoru Architect c8000. Simpozij LOKUS 2015., Knjiga sažetaka, 2015., str. 54
28. Miler M, Simundic AM. Are patients well informed about proper collection of 24-hour urine sample? *Biochem Med* 2013;23(1):A43
29. Čelap I, Šimundić AM, Nikolac N, Miler M, Altabas K, Šefer S. Visfatin is not associated with inflammatory markers in patients on hemodialysis. *Biochem Med* 2012;22(3):A188
30. Miler M, Segulja D, Nikolac N, Celap I, Kackov S, Simundic AM. Markers of the obesity and inflammation in patients with metabolic syndrome and on dialysis. *Biochem Med* 2012;22(3):A189
31. Ozanic Bulic S, Tesija Kuna A, Kotrulja L, Vucic M, Miler M, Vrkic N. Discoid lupus erythematosus overlapping with toxic epidermal necrolysis: a case report. 7th international congress on autoimmunity - CD abstracts / Shoenfeld Y (ed). - Geneve: Kenes International, 2010

32. Grazio S, Tesija Kuna A, Miler M, Grubisic F, Vukasovic I, Vrkic N, Peric P, Nemcic T, Matijevic V, Punda M, Skala H, Kern I, Matic A, Kusic Z. Negative finding of antibodies targeting modified citrullinated vimentin in patients with psoriatic arthritis: a cross sectional study. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27:720
33. Miler M, Simundic AM, Stefanovic M, Ferenec-Ruzic D, Kvaternik M, Topic E, Vrkic N. How to provide comparability of results from two analytical systems? *Biochem Med* 2009;19(Suppl 1):105
34. Miler M, Tesija Kuna A, Žaja Franulovic O, Vrkic N. Antibodies against deamidated gliadin as a novel serologic marker for celiac disease. From pathogenesis to therapy of autoimmune diseases. *Autoantigens, Autoantibodies, Autoimmunity* 2009;6:480.
35. Margetic S, Tesija Kuna A, Miler M, Topic E, Vrkic N, Vucic M, Mazul B. Clinical evaluation of procalcitonin in septic patients. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(Suppl 1):S254
36. Simundic AM, Nikolac N, Miler M, Cipak A, Topic A. Outpatient laboratory test report delivery success rate: indicator of the quality of patient care. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(Suppl 1):S52
37. Tesija-Kuna A, Miler M, Grazio S, Grubisic F, Vukasovic I, Peric P. Antibodies targeting modified citrullinated vimentin in patients with psoriatic arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(Suppl 1):S117
38. Lamot L, Tesija Kuna A, Zirovic M, Simundic AM, Topic E, Harjacek M. The role of antibodies to mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) in juvenile idiopathic arthritis patients. *Pediatric rheumatology* 2008;6(Suppl I):P69
39. Zirovic M, Tesija Kuna A, Nikolac N, Stefanovic M, Topic E, Jurcic Z, Zaja Franulovic O. Unconjugated hyperbilirubinemia in anorexia nervosa is caused by uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphism. *Clin Chem Lab Med* 2007;45, Special Supplemment, p. S339
40. Tesija Kuna A, Zirovic M, Topic E, Zaja Franulovic O, Jurcic Z. Frequencies of positive celiac disease serologic test results in at-risk groups of patients in Croatia. *Clin Chem Lab Med* 2007;45, Special Supplemment, p. S295
41. Tesija Kuna A, Zirovic M, Stefanovic M, Nikolac N, Topic E, Jurcic Z, Zaja-Franulovic O. UGT1A1 gene promoter polymorphism: a new genetic risk factor for autoimmune hepatitis? *Autoimmunity Reviews: Abstracts of 5th International Congress on Autoimmunity* p. 371

42. Tešija-Kuna A, Žirović M, Topić E, Grazio S, Jajić Z, Perić P, Stipić-Marković A. Dijagnostička točnost antitijela na mutirani citrunilirani vimentin (anti-MCV) za reumatoidni artritis/Diagnostic accuracy of antibodies against mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) for rheumatoid arthritis. *Biochem Med* 2006;16(Suppl 1):S199-200
43. Žirović M, Tešija Kuna A, Štefanović M, Nikolac N, Topić E, Žaja-Franulović O, Jurčić Z. Intrahepatična kolestaza povezana s deficitom alfa-1-antitripsina u novorođenčeta: prikaz slučaja/Intrahepatic cholestasis associated with alpha-1-antitrypsin deficiency in newborn: case report. *Biochem Med* 2006;16(Suppl 1):S100-1
44. Nikolac N, Žirović M, Štefanović M, Topić E. FV, FII, MTHFR and PAI-1 polymorphisms in patients with deep venous thrombosis. The fourth European-American School in Forensic Genetics and Mayo Clinic Course in Advanced Molecular and Cellular Medicine. Schanfield M, Primorac D, Vuk-Pavlović S. ur. Final program and abstracts, Exto produkcija, Zagreb, 2005:141.

Poglavlje u knjizi:

Culej J, Miler M. Znoj. U: Nora Nikolac Gabaj, ur. Ekstravaskularni uzorci u laboratorijskoj medicini. Zagreb: Medicinska naklada, 2019. p: 114-8.

Radovi u priručnicima:

1. Miler, M. Kompletni pregled mokraće: optimizacija procesa u laboratoriju. U: Nikolac N., ur. Nove spoznaje o starim pretragama, Medicinska naklada, Zagreb, 2017. p. 37-44.
2. Miler M. Verifikacija epruveta. U: Šimundić AM., ur. Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada, Medicinska naklada, Zagreb, 2013. p. 33-40.
3. Miler M. Osobitosti laboratorijskog uzorka kod novorođenčadi. U: Nikolac N. ur. Uloga laboratorija u pre-, peri- i neonatalnoj skrbi, Medicinska naklada, Zagreb, 2012. p 41-8.
4. Miler M. Serum – plazma? Prednosti i nedostaci. u: Šimundić AM., ur. Predanalitička faza laboratorijskog rada, Medicinska naklada, Zagreb, 2012. p 27-34.
5. Miler M. Tipovi podataka i raspodjela. U: Šimundić AM., ur. Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi, Medicinska naklada, Zagreb, 2008. P 1-13.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA TNF- α S UČINKOVITOŠĆU TERAPIJE ANTAGONISTIMA TNF- α INFLIKSIMABOM I ADALIMUMABOM I BRZINOM RAZVOJA PROTUTIJELA NA TE LIJEKOVE

MARIJANA MILER

Antagonisti faktora nekroze tumora α (engl. *Tumor Necrosis Factor*, TNF- α) učinkoviti su u liječenju autoimunih reumatoidnih i upalnih bolesti crijeva, ali se čak u 30 % bolesnika ne postiže remisija bolesti. Cilj istraživanja bio je ispitati postoji li razlika u kliničkom i biokemijskom odgovoru na terapiju anti-TNF- α protutijelima ovisno o polimorfizmima gena *TNF- α* na položajima -238 G/A (rs361525) i -308 G/A (rs1800629).

U istraživanje je bilo uključeno 112 bolesnika od čega 66 s upalnim bolestima crijeva te 46 bolesnika s autoimunim reumatoidnim bolestima. Na terapiji infliksimabom (IFX) bilo je ukupno je 73 bolesnika, a 39 na terapiji adalimumabom (ADM). Bolesnici su praćeni 6 do 12 mjeseci od početka biološke terapije. Svim je bolesnicima određena koncentracija C reaktivnog proteina (CRP), lijekova IFX i ADM i protutijela na te lijekove kao i genotip polimorfizama rs361525 i rs1800629 gena *TNF- α* . Bolesnicima s upalnim bolestima crijeva određena je i koncentracija fekalnog kalprotektina (fKal), dok je onima s autoimunim reumatoidnim bolestima klinički odgovor praćen ocjenama aktivnosti reumatoidnih bolesti.

Ni koncentracije IFX i ADM kao ni pojavnost i koncentracije protutijela na studirane lijekove nisu se razlikovale ovisno o genotipovima polimorfizama rs361525 i rs1800629 gena *TNF- α* . Koncentracija CRP nakon 12 mjeseci terapije bila je viša u bolesnika s genotipom GG nego u onih s genotipom GA na položaju -238 gena *TNF- α* , dok nije bilo razlike u koncentraciji CRP kod različitih genotipova na položaju -308 gena *TNF- α* . Koncentracija fKal nije se razlikovala ovisno o genotipu polimorfizama rs361525 i rs1800629 gena *TNF- α* . Remisija je postignuta kod 63 % bolesnika, neovisno o genotipu studiranih polimorfizama. Bolesnici s autoimunim reumatoidnim bolestima genotipa GG u oba ispitivana polimorfizma imali su statistički značajno bolji odgovor na terapiju u odnosu na bolesnike s genotipom GA ili AA. Univarijatnom regresijskom analizom pokazano je da je postizanje terapijske koncentracije IFX i ADM izglednije kod muškaraca, a pojava protutijela na lijekove manje izgledna. U bolesnika s RA izglednija je pojava protutijela na lijekove, a manje izgledno je postizanje terapijske koncentracije lijekova, dok kod ostalih bolesti univarijatnom regresijskom analizom nisu dobiveni statistički značajni omjeri izgleda. Remisiju bolesti može predvidjeti koncentracija CRP 6 i 12 mjeseci nakon terapije, dok se klinički odgovor na terapiju ne može predvidjeti ne temelju genotipa studiranih polimorfizama.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 124 stranice, 13 slika, 49 tablica i 167 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: adalimumab, infliksimab, polimorfizmi gena *TNF- α* , protutijela na adalimumab i infliksimab, autoimune reumatoidne bolesti, upalne bolesti crijeva, C reaktivni protein, fekalni kalprotektin

Mentori: izv. prof. dr. sc. Nada Vrkić
doc. dr. sc. Nora Nikolac Gabaj

Povjerenstvo: prof. dr. sc. Jerka Dumić
prof. dr. sc. Lidija Bach-Rojecky
nasl. doc. dr. sc. Mario Štefanović

Rad je prihvaćen: 18. svibnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

ASSOCIATION BETWEEN TNF- α GENE POLYMORPHISM AND EFFICIENCY OF THERAPY WITH THE TNF- α ANTAGONISTS INFLIXIMAB AND ADALIMUMAB AND DEVELOPMENT OF ANTIBODIES TO THOSE DRUGS

MARIJANA MILER

Tumor necrosis factor α (TNF- α) inhibitors are effective in the treatment of autoimmune rheumatoid disease (ARD) and inflammatory bowel diseases (IBD), but almost 30 % of patients do not achieve remission of the disease.

Objectives of the study were to examine the association of genotypes of -238 G/A (rs361525) and -308 G/A (rs1800629) polymorphisms in *TNF- α* gene with the clinical and biochemical response to the therapy.

The study included 112 patients, of which 66 with IBD and 46 patients with ARD. There was a total of 73 patients on infliximab (IFX) therapy and 39 on adalimumab (ADM) therapy. Patients were followed for 6 to 12 months from the start of biologic therapy. All patients were tested for reactive protein C (CRP), IFX and ADM, and antibodies to these drugs, as well as the genotype polymorphisms rs361525 and rs1800629 of the *TNF- α* gene. Patients with IBD were also tested for fecal calprotectin (fCal) levels, while those with ARD had a clinical response followed by assessments of rheumatoid disease activity. Concentrations of IFX and ADM after at least 6 months of therapy did not differ depending on genotypes *TNF- α* gene polymorphisms -238 G/A and -308 G/A. The incidence of antibody development, as well as the concentration of anti-drug antibodies, did not differ depending on tested polymorphisms. After 12 months of therapy, CRP concentration was higher in patients with GG than in patients with GA genotype in the -238 position of the *TNF- α* gene. fCal concentration did not differ depending on the studied polymorphisms. Remission was achieved in 63 % of patients, with no difference depending on the genotypes. Patients with ARD carrying the GG genotypes in both positions, -238 and -308, had a significantly better response to the therapy compared to patients with GA or AA genotypes. The univariate logistic regression analysis has shown that males are more likely to achieve therapeutic levels of IFX and ADM and less likely to develop antibodies to drugs. The studied polymorphisms were not factors that can predict the clinical response to the therapy.

Genotyping of polymorphisms -238 G/A and -308 G/A in the *TNF- α* gene before the introduction of IFX and ADM therapy does not contribute to the prediction of clinical outcomes monitored by blood concentration of drugs and antibodies to the drugs, or clinical remission of IBD or ARD.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis contains 124 pages, 13 figures, 49 tables and 167 references. The original is in the Croatian language.

Keywords: adalimumab, infliximab, polymorphisms in TNF- α gene, antibodies to adalimumab and infliximab, autoimmune rheumatoid diseases, inflammatory bowel disease, C reactive protein, fecal calprotectin

Supervisors: Associate professor Nada Vrkić, PhD
Assistant professor Nora Nikolac Gabaj, PhD

Reviewers: Professor Jerka Dumić, PhD
Professor Lidija Bach-Rojecky, PhD
Titular Assist Professor Mario Štefanović, PhD

Paper accepted: May 18th, 2022