

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KOREN

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KOREN

ANALIZA POJAVNOSTI NEŽELENIH UČINKOV
INFLIKSIMABA NA KOŽI BOLNIKOV S KRONIČNO
VNETNO BOLEZNIJO ČREVESJA

**THE ANALYSIS OF SIDE EFFECTS OF INFLIXIMAB
THERAPY ON SKIN OF PATIENTS SUFFERING FROM
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2018

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani, v Ambulanti za kronično vnetno črevesno bolezen pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm., in somentorice doc. dr. Nade Kecelj Leskovec, dr. med.

Meritve koncentracij infliksimaba so bile opravljene v Biokemičnem in hematološkem laboratoriju v Bolnišnici dr. Petra Držaja.

ZAHVALA

*Če želimo doseči velike stvari,
ne smemo le delovati,
ampak tudi sanjati,
ne le načrtovati,
ampak tudi verjeti ...
(Anatole France)*

V naslednjih vrsticah se želim zahvaliti vsem, ki so tekom študija skupaj z mano verjeli v moje načrte, sanje in doseganje velikih stvari.

Zahvaljujem se članom Ambulante za kronično vnetno črevesno bolezen na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo, ki so omogočili izvedbo raziskovalnega projekta: predstojniku prof. dr. Borutu Štabucu, prof. dr. Ivanu Ferkolju, dr. Nataši Smrekar, dr. Gregorju Novaku, dr. Tini Kurent, dr. Matic Koželju, dr. Juriju Hanžlu, Carmen Bobnar Sekulič in Tadeji Polanc. Hvala mentorju, izr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm., in somentorjema asist. dr. Davidu Drobnetu, dr med., ter doc. dr. Nadi Kecelj Leskovec, dr. med., za vse strokovne nasvete, usmerjanje skozi proces raziskovanja in kritičnega razmišljanja ter spodbudo in motivacijo. Hvala tudi staršem in sestrama za vso podporo, ki so mi jo nudili, ko so se zdele sanje neuresničljive in cilji nedosegljivi.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo z delovnim naslovom *Analiza pojavnosti neželenih učinkov infliksimaba na koži bolnikov s kronično vnetno boleznijo črevesja* samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Nade Kecelj Leskovec, dr. med., ter delovnim mentorstvom asist. dr. Davida Drobneteta, dr. med.

Podpis:

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Anamarija Zega, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

Ljubljana, 2018

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	II
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
KAZALO PRILOG.....	III
SEZNAM OKRAJŠAV.....	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT.....	VII
1 UVOD.....	1
1.1 Kronična vnetna črevesna bolezen.....	1
1.2 Crohnova bolezen.....	2
1.3 Ulcerozni kolitis.....	3
1.4 Zdravljenje KVČB.....	4
1.5 Biološka zdravila.....	5
1.5.1 Razlika med biološkimi in klasičnimi zdravili.....	5
1.5.2 Delitev bioloških zdravil.....	5
1.5.3 Biološko podobna zdravila.....	6
1.6 Dejavnik tumorske nekroze α	7
1.7 Infliksimab.....	7
1.7.1 Imunogenost in drugi neželeni učinki infliksimaba.....	8
2 NAMEN DELA.....	11
3 MATERIALI IN METODE.....	12
3.1 Biološki vzorci in preiskovana populacija.....	12
3.2 Določanje koncentracije infliksimaba v serumskih vzorcih.....	13
3.2.1 Princip metode.....	13
3.2.2 Postopek izvedbe testa.....	15
3.3 Statistična analiza.....	16
4 REZULTATI.....	18
4.1 Demografski podatki.....	18
4.2 Lokalizacija in trajanje kožnih sprememb.....	19
4.3 Serumske koncentracije infliksimaba.....	21
4.4 Serumske koncentracije infliksimaba in pojav kožnih sprememb.....	22
4.5 Prejeti odmerki infliksimaba in pojav kožnih sprememb.....	23
4.6 Fenotipska klasifikacija kožnih sprememb.....	24
4.7 Fenotipska klasifikacija kožnih sprememb in serumske koncentracije infliksimaba.....	27
4.8 Fenotipska klasifikacija kožnih sprememb in odmerki infliksimaba.....	31

4.9	Vpliv kožnih sprememb na kakovost življenja bolnikov	34
5	RAZPRAVA.....	36
5.1	Pojav kožnih sprememb v odvisnosti od koncentracije in odmerka infliksimaba.....	37
5.2	Kakovost življenja bolnikov s kožnimi spremembami	38
6	SKLEP.....	40
7	LITERATURA	41
	PRILOGE.....	i

KAZALO SLIK

Slika 1:	Primerjava videzov črevesnih sten zdrave osebe in bolnikov z ulceroznim kolitisom in Crohnovo boleznijo.....	1
Slika 2:	Vrste ulceroznega kolitisa glede na razširjenost črevesnega vnetja	4
Slika 3:	Shematski prikaz zgradbe infliksimaba.....	8
Slika 4:	Kvartilni diagram izmerjenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih s kožnimi spremembami in tistih brez njih	22
Slika 5:	Kvartilni diagram uporabljenih odmerkov infliksimaba pri bolnikih s kožnimi spremembami in tistih brez njih.....	24
Slika 6:	Grafični prikaz deležev posameznih kožnih sprememb pri bolnikih, skladno z njihovo fenotipsko klasifikacijo	25
Slika 7:	Psoriza	25
Slika 8:	Psoriaziformni ekcem.....	26
Slika 9:	Ekcem.....	26
Slika 10:	Kseroza.....	26
Slika 11:	Drugo	27
Slika 12:	Kvartilni diagram izmerjenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb, v primerjavi s kontrolno skupino	28
Slika 13:	Kvartilni diagram uporabljenih odmerkov infliksimaba pri bolnikih s posameznimi fenotipi kožnih sprememb in pri tistih brez njih	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Opredelitev Crohnove bolezni po Montrealski klasifikaciji.....	3
Preglednica II: Reagenti in ostali material, uporabljeni za izvedbo testa ApDia IFX ELISA	13
Preglednica III: Demografski podatki bolnikov, pridobljeni s pomočjo anketnega vprašalnika	18
Preglednica IV: Lokalizacija kožnih sprememb	19
Preglednica V: Trajanje kožnih sprememb.....	20
Preglednica VI: Terapija kožnih sprememb	20
Preglednica VII: Statistični podatki za majhne, srednje in velike vrednosti koncentracij infliksimaba, izmerjenih v serumskih vzorcih bolnikov.....	21
Preglednica VIII: Opisni statistični podatki o apliciranih odmerkih	23
Preglednica IX: Število in deleži kožnih sprememb, glede na njihovo fenotipsko klasifikacijo.....	24
Preglednica X: Statistični parametri izmerjenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb.	28
Preglednica XI: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaza«.	29
Preglednica XII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaziformni ekcem«.	29
Preglednica XIII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »ekcem«.	29
Preglednica XIV: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »kseroza«.	30
Preglednica XV: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za feenotip »drugo«.	30
Preglednica XVI: Statistični parametri uporabljenih odmerkov infliksimaba pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb	31
Preglednica XVII: RezultatMann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaza«.	32
Preglednica XVIII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaziformni ekcem«.	32
Preglednica XIX: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »ekcem«.	33
Preglednica XX: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »kseroza«.	33
Preglednica XXI: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »drugo«.	33
Preglednica XXII: Ocene kvalitete življenja bolnikov s kožnimi spremembami	34

KAZALO PRILOG

Priloga 1: Diagnoze bolnikov, ki so razvili kožne spremembe	i
Priloga 2: Identifikacijsko število, spol, koncentracija in % odmerka infliksimaba.....	iii

SEZNAM OKRAJŠAV

ELISA	encimskoimunski test (ang. enzyme – linked immunosorbent assay)
IFX	infliksimab
IQR	interkvartilni razpon
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
NF – κ B	jedrni transkripcijski dejavnik kapa B
sTNF- α	topna oblika TNF- α
TACE	encim, ki odcepi s TNF- α iz prekuzorske oblike tmTNF- α
tmTNF- α	membranska oblika TNF- α
TNFR1	receptor 1 za vezavo TNF- α
TNFR2	receptor 2 za vezavo TNF- α
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze α

POVZETEK

Kronična vnetna črevesna bolezen je bolezen prebavil z akutnimi zagoni. Patofiziološki mehanizmi in vzroki za njen pojav še niso povsem razjasnjeni, med poglavitnimi sprožilnimi dejavniki pa omenjajo imunsko neravnovesje, genetsko predispozicijo in sestavo črevesne flore obolelih posameznikov. Kronična vnetna črevesna bolezen se najpogosteje pojavlja v dveh oblikah, in sicer kot ulcerozni kolitis ali Crohnova bolezen. Trenutno je še neozdravljiva, v zadnjih letih pa predstavljajo veliko pridobitev biološka zdravila, s katerimi dosegamo večjo uspešnost pri zdravljenju. Z zdravili poskušamo doseči trajno remisijo bolezni in zmanjšati število hospitalizacij, kar vodi v boljšo kakovost življenja bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo. Pri približno 20 % bolnikov pri zdravljenju hude oblike kronične vnetne črevesne bolezni uporabljamo zdravilo infliksimab, ki je himerno monoklonsko protitelo, sestavljeno iz mišjega in človeškega dela. Poznamo dva mehanizma delovanja infliksimaba. Veže se na dejavnik tumorske nekroze alfa (TNF- α) ali pa na receptorje za TNF- α na imunskih celicah in tako nevtralizira oziroma prepreči njegovo delovanje. Bolniki lahko proti infliksimabu razvijejo protitelesa, ki nato izzovejo neželene učinke, med katerimi se pogosto pojavljajo tudi spremembe na koži. Na osnovi teh dejstev smo se v okviru našega dela osredotočili na morebiten vpliv odmerka in koncentracije infliksimaba v krvi na pojav kožnih sprememb pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo, saj lahko s povečevanjem odmerka in skrajšanjem intervala med posameznimi odmerki pogosto optimiziramo zdravljenje.

V raziskavo smo, po njihovem predhodnem pristanku, vključili 171 bolnikov, ki se z infliksimabom zdravijo v Ambulanti za kronično vnetno črevesno bolezen Kliničnega oddelka za gastroenterologijo na Univerzitetnem kliničnem centru (UKC) Ljubljana. Potrebne podatke smo pridobili s pomočjo anketnega vprašalnika in iz bolnišnične dokumentacije. Koncentracije infliksimaba v serumu smo določali z metodo ELISA. Kožne spremembe smo fotografirali in na osnovi fotodokumentacije postavili okvirne diagnoze, ki smo jih nato fenotipsko klasificirali. Izračunali smo stopnje povezanosti (korelacije) med serumskimi koncentracijami in odmerki infliksimaba pri bolnikih s kožnimi spremembami ter pri tistih brez njih. Poleg tega smo statistično primerjali serumske koncentracije in odmerke infliksimaba med bolniki s kožnimi lezijami in tistimi brez, za kar smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyev U test s 5-odstotno stopnjo tveganja.

Kožne spremembe je razvilo 23,4 % bolnikov, ki se zdravijo z infliksimabom. Statistično značilnih razlik v koncentraciji zdravila v krvi med tistimi s kožnimi spremembami in tistimi brez njih nismo ugotovili ($p = 0,389$). Enako velja tudi za uporabljene odmerke infliksimaba ($p = 0,741$). Za vsak posamezen fenotip kožne spremembe smo preverjali tudi, ali obstaja povezava med njegovo pojavnostjo in uporabljenim odmerkom infliksimaba ter doseženo koncentracijo zdravila v krvi. Pri vseh prisotnih fenotipih kožnih sprememb (psoriaza, psoriaziformni ekcem, ekcem, kseroza, drugo) so bile vrednosti $p \geq 0,05$, kar pomeni, da nismo zaznali statistično značilnih razlik.

Pri bolnikih, ki so razvili kožne spremembe, smo ocenjevali tudi vpliv kožnih manifestacij na kakovost njihovega življenja. Na osnovi prejetih anketnih odgovorov smo ugotovili, da kožne spremembe ne vplivajo na kakovost življenja.

Ključne besede: biološka zdravila, infliksimab, kakovost življenja, kronična vnetna črevesna bolezen, neželeni učinki

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease (IBD) is a disease of a gastrointestinal tract with periods of acute exacerbation and remissions. Pathophysiological mechanisms and the cause of the disease are yet unknown. Immunological misbalance, genetic predisposition and the composition of the intestinal flora may be just one of them. IBD consists out of two forms: ulcerative colitis and Crohn's disease. At the moment we still do not know how to cure people with inflammatory bowel disease but in the last few years a lot of biological medicines (biopharmaceuticals) were presented which has opened new possibilities for treatment of many serious chronic diseases. With biopharmaceuticals we try to achieve the phase of remission, reduce the number of days spent in hospital and improve the quality of life of people with inflammatory bowel disease.

The most used biopharmaceutical is infliximab which is a chimeric monoclonal antibody and it is used in almost 20 % of all the patients with IBD and consists of murine and human part. Infliximab works in two ways – it can bind to a tumor necrosis factor alpha (TNF – α) and neutralizes his activity or it can bind on a tumor necrosis factor receptors on immune cells. Side effects that occur are mostly because of the formation of antibodies against the components of the medicine. Often the side effects include the formation of skin lesions which is a reason why we decided to concentrate on a possible connection between infliximab concentration and dose of infliximab on a formation of skin disease in patients with inflammatory bowel disease. Increasing the dose and shortening intervals between the applications is a common way to optimize the treatment.

171 patients with inflammatory bowel disease who are treated with infliximab has given us a signed consent for cooperation in our research which took place in the Department of Gastroenterology in the University Medical Centre Ljubljana. Patient's data were collected with the questionnaire and patient's hospital data. The infliximab concentration in blood was determinate with ELISA method.

All skin lesions were photographed and based on the pictures we tried to determinate a framework diagnosis. Then we calculated and compared the correlation between the serum concentration and the dosage of infliximab among patients with and without skin lesions. Non parametric Mann – Whitney U Test with 5 % confidence interval was used.

Skin lesions appeared in 23,4 % of all the observed patients whose main therapy is infliximab. Statistically significant differences in concentration of the medicine among patients with and without skin lesions was not detected ($p = 0,389$). Statistically significant differences in the dosage of infliximab among patients with and without skin lesions was not detected either ($p = 0,741$).

Moreover, we calculated the correlation between the concentration and the dosage of the medicine among patients with skin lesions for each phenotype of the skin lesion. There were 5 phenotypes of skin lesions: psoriasis, psoriasphic eczema, eczema, xerose and the group we called other. All statistically significant differences were higher than 0,05 ($p \geq 0,05$) which means that the concentration and dosage of infliximab does not impact the skin lesions.

The quality of life was observed in patients who developed skin lesions. According to their answers we conclude that skin lesions do not have an impact on ones everyday life.

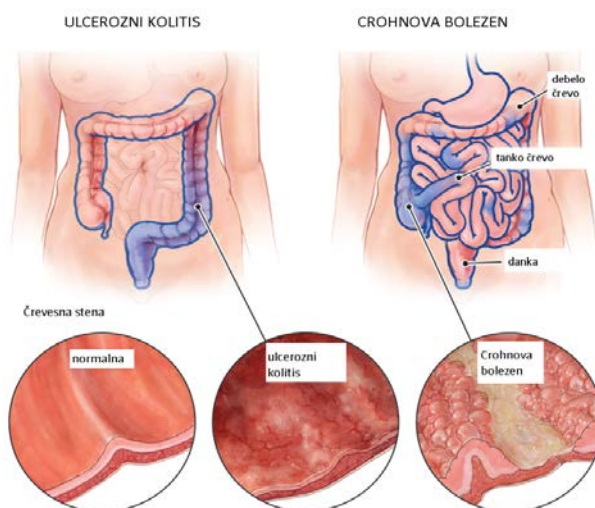
Key words: biological medicine, inflammatory bowel disease, infliximab, quality of life, side effect

1 UVOD

1.1 Kronična vnetna črevesna bolezen

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je bolezen prebavnega trakta, za katero so značilna nepredvidljiva obdobja akutnih zagonov in remisij (1). Njeni patofiziološki mehanizmi še vedno niso povsem razjasnjeni, prav tako pa ostaja neznan vzrok za pojav bolezni. Raziskovalci si niso enotni glede sprožilnih dejavnikov bolezni. Največkrat omenjajo imunsko neravnovesje, genetske predispozicije in sestavo črevesne flore obolelih posameznikov (1, 2, 3, 4). Glede na to, da je KVČB pogosteje prisotna v razvitejših državah in urbanih okoljih, kot razloge za njen pojav omenjajo tudi okoljske dejavnike in življenjski slog (3). Bolezen se najpogosteje pojavlja med 20. in 40. letom starosti, 25 % posameznikov zboli pred 20. letom starosti, 5 % pa pred 5. letom starosti (3, 5).

Najpogostejši obliki KVČB sta ulcerozni kolitis in Crohnova bolezen. Takrat ko ulceroznega kolitisa in Crohnove bolezni ni mogoče ločiti med seboj (10–15 % primerov), govorimo o indeterminantnem kolitisu (6). Diagnozo KVČB oziroma specifično vrsto bolezni postavimo s pomočjo klinične slike, endoskopskih preiskav in histološkim pregledom črevesne sluznice bolnika (Slika 1) (7).



Slika 1: Primerjava videzov črevesnih sten zdrave osebe in bolnikov z ulceroznim kolitisom in Crohnovo boleznijo; prirejeno po (13).

KVČB je trenutno neozdravljiva bolezen, pri čemer pa lahko z uporabo določenih zdravil dosežemo različno trajajoča obdobja remisij. Med pozitivne rezultate zdravljenja štejemo obvladovanje vnetnih procesov v črevesni sluznici, zmanjšano število akutnih zapletov ter manj hospitalizacij in kirurških posegov (3, 8).

V zadnjih letih se ozaveščenost javnosti o bolezni povečuje, opazen pa je tudi napredek pri razumevanju patofiziologije KVČB, kar vodi v razvoj novih in učinkovitejših terapij, ki izboljšujejo kakovost življenja pacientov in podaljšujejo obdobja remisij. To pa je poglaviti cilj obvladovanja bolezni (9).

1.2 Crohnova bolezen

Crohnova bolezen je oblika KVČB, ki lahko prizadene katerikoli del prebavne cevi, od ustne votline do zadnjika, najpogosteje pa distalni in proksimalni del kolona (2, 10). Glavni simptomi bolezni so driska, bolečine v trebuhu in izguba telesne mase, kar lahko vodi v podhranjenost, pri mlajših otrocih pa lahko pride tudi do zaostanka v rasti. Pojavlja se lahko tudi rahlo povišana telesna temperatura (2, 10, 11). V laboratorijskih izvidih krvnih preiskav odstopajo vrednosti hitrosti sedimentacije eritrocitov, ki je pospešena, ter števila levkocitov in nivojev C-reaktivnega proteina (CRP), ki so oboji povišani. Sluznica debelega črevesa, ki si jo natančno ogledajo med kolonoskopijo, je bleda, grbasta in večinoma brez znakov obilne krvavitve. Zapletov bolezni je več. Največkrat se pojavijo zunajčrevesne manifestacije, npr. prizadetost sklepov, kože in oči, ter okvare jeter in žolčnih poti (7). Zaradi poškodbe sluznice prebavil in slabe absorpcije hranil se pri številnih bolnikih pojavi anemija, zaradi uporabe kortikosteroidov in zmanjšane absorpcije vitaminov in mineralov pa lahko pride tudi do pojava osteoporoze (6).

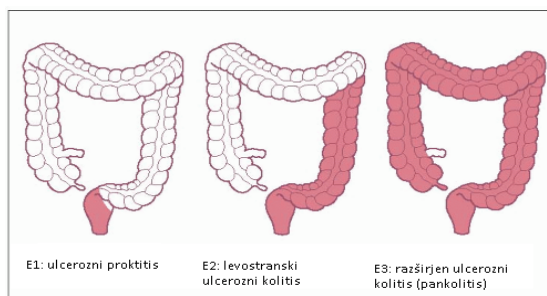
Vnetni procesi se lahko iz prebavil razširijo na okoljna tkiva. Najpogosteje se pojavijo fistule med črevesom in sečnim mehurjem ali vagino, ko pa je vnetje omejeno samo na črevesno steno in se razširi v ognojek, govorimo o abscesu (7, 11). Zaplet Crohnove bolezni lahko predstavljajo tudi stenoze oziroma zožitve lumna črevesja, ki lahko v skrajnih primerih povzročijo črevesne zapore ali razpoke oziroma perforacije črevesja (7). Taka stanja lahko razrešijo samo operativno, včasih pa tudi endoskopsko z dilatacijami prizadetih segmentov. Na osnovi Montrealske klasifikacije opredelimo klinične značilnosti Crohnove bolezni glede na lokalizacijo, leto diagnosticiranja in obliko bolezni (preglednica I) (6, 12).

Preglednica I: Opredelitev Crohnove bolezni po Montrealski klasifikaciji.

Starost ob postavitvi diagnoze	A1 – pod šestnajstimi leti A2 – med sedemnajstim in štiridesetim letom A3 – nad štiridesetim letom
Lokalizacija bolezni	L1 – terminalni ileum L2 – kolon L3 – ileum in kolon L4 – zgornja prebavna cev
Oblika bolezni	B1 – nepenetrantna, nestenozantna B2 – stenozantna B3 – penetrantna

1.3 Ulcerozni kolitis

Ulcerozni kolitis prizadene le sluznico debelega črevesa. Kaže se s pogostimi krvavimi driskami in prisotnostjo sluzi na blatu, bolnikov trebuh je napet in občutljiv na pritisk, velikokrat pa so prisotni tudi lažni dražljaji k odvajanju blata, krčevite bolečine, povišana telesna temperatura in hujšanje (7, 10, 11). Za natančno postavitev diagnoze je treba opraviti kolonoskopijo in histološki pregled biopsijskih vzorcev sluznice. Pri kolonoskopiji so na sluznici debelega črevesa vidne hiperemične krvaveče spremembe s pogostimi razjedami. Hujši zapleti ulceroznega kolitisa lahko vodijo v perforacijo črevesja, hudo anemijo in podhranjenost (2, 7). Bolezen razdelimo glede na razširjenost vnetja v tri skupine: ulcerozni proktitis, levostranski ulcerozni kolitis in razširjeni ulcerozni kolitis (Slika 2) (12).



Slika 2: Vrste ulceroznega kolitisa glede na razširjenost črevesnega vnetja; prirejeno po (14).

1.4 Zdravljenje KVČB

Glavni cilji, ki jih želimo doseči pri zdravljenju bolnikov s KVČB, so: ohranjanje oziroma vzdrževanje funkcije črevesja, izboljšanje kakovosti življenja ter ohranjanje stanja v klinični, laboratorijski in endoskopski remisiji čim daljše obdobje, brez uporabe kortikosteroidov (15). Slednji so sicer učinkovite protivnetne učinkovine, a imajo številne neželene učinke, kot so prikritje okužb, levkocitoza, preobčutljivostne reakcije, motena toleranca na glukozo, psihične motnje (nespečnost, spremembe razpoloženja), slabše celjenje ran, srčno popuščanje in pljučna embolija (16).

Način zdravljenja pri Crohnovi bolezni izbiramo glede na aktivnost bolezni in njeno lokalizacijo, pri ulceroznem kolitisu pa glede na razširjenosti bolezni (17). Zdravljenje lahko poteka:

- Stopenjsko (step – up): bolnika začnemo zdraviti z blažjimi protivnetnimi zdravili (mesalazin), ob njihovi neučinkovitosti pa jim sledijo kortikosteroidi, imunosupresivi in biološka zdravila. Ta oblika zdravljenja je manj učinkovita, pri čemer bolezen lahko napreduje, s tem pa narašča tudi verjetnost za kirurške posege (18).
- Z agresivnejšim pristopom (top – down): uporabljamo ga pri bolnikih s slabšo napovedjo poteka bolezni. V tem primeru se zdravljenje začne z biološkimi zdravili. S tem dosežemo večjo učinkovitost in uspešnost, zato se zmanjša število hospitalizacij in operacij (17).
- S popolno enteralno prehrano: pri otrocih s Crohnovo boleznijo ob terapiji z zdravili (5).

1.5 Biološka zdravila

V zadnjih tridesetih letih področja medicine, farmacije in biotehnologije bliskovito napredujejo. Eno od pomembnejših pridobitev na teh področjih predstavljajo biološka zdravila. Zakon o zdravilih (ZZdr-2) opredeljuje biološko zdravilo kot »Zdravilo, ki kot učinkovino vsebuje biološko snov ali snov, pridobljeno s postopkom, ki vključuje biološke sisteme. Biološka snov je tista, ki je pridobljena iz ali z uporabo biološkega vira in ki za določitev kakovosti potrebuje kombinacijo fizikalno-kemijskega in biološkega preizkušanja, skupaj s postopkom proizvodnje in nadzorom nad njim« (19). Med biološka zdravila torej v širšem pomenu besede štejemo vse tiste terapevtske pripravke, ki vsebujejo učinkovine biološkega izvora, v ožjem pa v to skupino uvrščamo zdravila, pridobljena z biotehnološkimi postopki (20).

1.5.1 Razlika med biološkimi in klasičnimi zdravili

Biološka zdravila se od klasičnih zdravil v grobem razlikujejo glede na: zgradbo, molekulsko maso, proces proizvodnje ter potencialno imunogenost. Po sestavi so biološka zdravila heterogene proteinske molekule ali nukleinske kisline z molekulsko maso, večjo od 1 kDa, in s kompleksno tridimenzionalno zgradbo. Zaradi beljakovinske strukture so občutljiva na visoke temperature, svetlobo in encimsko aktivnost, medtem ko so klasične kemične učinkovine stabilnejše. Poleg tega so kemične učinkovine pacientu zaradi peroralnega vnosa prijaznejše za uživanje, večino bioloških zdravil pa moramo aplicirati parenteralno, bodisi intravensko, subkutano ali intramuskularno. Glede na to, da je sinteza kemičnih učinkovin manj kompleksna od sinteze bioloških učinkovin, to vpliva tudi na končne količine proizvedenega zdravila. Biološka zdravila proizvajajo s pomočjo živih organizmov, npr. bakterij, gliv, rastlin ali živalskih celic, zato je njihov izplen manjši kot v primeru sinteze kemičnih učinkovin (21, 22, 23).

1.5.2 Delitev bioloških zdravil

Biološka zdravila oziroma učinkovine delimo na pet skupin. V prvo uvrščamo tista, ki so pridobljena z izolacijo, bodisi iz mikroorganizmov, rastlin, živali ali človeka. V to skupino spadajo hormoni, npr. inzulini živalskega izvora, antibiotiki, pridobljeni s fermentacijo, kri in krvni derivati ter običajna cepiva.

V drugo skupino uvrščamo sintezna biološka zdravila. Predstavniki te skupine so različni peptidi (antidiuretični hormon vazopresin, oksitocin, somatostatin, levprorelin, kalcitonin). Čeprav jih pridobivamo sintezno, jih zaradi njihove peptidne narave, fizikalno-kemičnih ter terapevtskih lastnosti uvrščamo med biološka zdravila.

V skupino genskih učinkovin uvrščamo terapevtske gene, ki jih vnašamo v somatske celice s pomočjo virusnih ali nevirusnih vektorjev ter tako nadomestimo okvarjen gen, ki je odgovoren za določeno bolezensko stanje.

Najštevilčnejšo skupino predstavljajo rekombinantna biološka zdravila, med katera prištevamo rekombinantne proteine, rekombinantna cepiva in rekombinantna monoklonska protitelesa.

Zadnjo, peto skupino tvorijo monoklonska protitelesa, pridobljena s hibridomsko tehnologijo (24, 25).

1.5.3 Biološko podobna zdravila

Potek patentnih pravic in visoke cene originalnih oziroma inovativnih bioloških zdravil so povzročili razvoj biološko podobnih zdravil (ang. biosimilars). Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) definira biološko podobno zdravilo kot »Zdravilo, ki je podobno inovativnemu zdravilu po kvaliteti, varnosti in učinkovitosti« (26). Učinkovitost biološko podobnih zdravil je tako primerljiva z originalnim biološkim zdravilom (20). V Sloveniji poleg zdravila Remicade, ki je originalno biološko zdravilo, uporabljamo še biološko podobni zdravili Remsima in Inflectra.

Izraza »generik« na področju bioloških zdravil ne uporabljamo. Generična učinkovina je po definiciji namreč strukturno enaka referenčni, v procesu izdelave bioloških učinkovin pa to ni mogoče, saj z uporabljenimi postopki proizvodnje ni mogoče izdelati popolnoma enake učinkovine. Razlike v strukturi posamezne biološke učinkovine nastajajo zaradi načina njenega pridobivanja, ki temelji na uporabi živih produkcijskih organizmov, lahko pa so tudi posledica drugačnih bioloških postopkov (24, 27). Da bi zagotovili čim večjo varnost in učinkovitost zdravil, so biološko podobna zdravila, v primerjavi z generiki, podvržena kompleksnejšim in natančnejšim razvojnim in regulatornim ocenam. Tovrstna biološka zdravila lahko pridejo na trg šele po tem, ko proizvajalec dokaže, da ni razlik v varnosti, učinkovitosti, kakovosti in imunogenosti v primerjavi z originalnim zdravilom

(28). V ta namen izvede klinično raziskavo, v kateri sodeluje manjše število bolnikov v primerjavi s kliničnimi raziskavami, opravljenimi z originalnimi biološkimi zdravili (20).

1.6 Dejavnik tumorske nekroze α

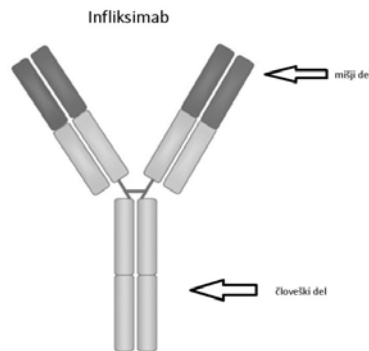
Terapija KVČB je bila pred leti omejena zgolj na uporabo aminosalicilatov, tiopurinov in kortikosteroidov, ki so namenjeni zgolj simptomatskemu zdravljenju (29). Raziskovalci so se začeli nato vse bolj poglobljati v hipotezo, da je KVČB povezana s pretirano aktivnostjo imunskega sistema, in pričeli iskati nove tarče in pristope k zdravljenju bolezni (15).

Pri imunopatogenezi KVČB igra poglobljeno vlogo dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α). V normalnih okoliščinah je prisoten v majhnih koncentracijah in varuje organizem oziroma omogoča njegovo boljšo obrambo pred okužbami, velikih koncentracijah pa povzroča pretirane vnetne reakcije, katerih posledice so poškodbe organov (30). TNF- α se iz celic sprošča v topni obliki (sTNF- α), in sicer tako, da ga encim TACE (ang. TNF- α converting enzyme) odcepi z membransko vezanega prekursorja (tmTNF- α) (30, 31). Liganda sTNF in tmTNF se vežeta na dva receptorja, in sicer TNFR1 in TNFR2. Prvi je izražen na vseh celicah, razen na eritrocitih, TNFR2 pa se nahaja le na endotelijskih in hematopoetskih celicah. Po vezavi liganda (TNF) na receptor se sprožijo znotrajcelične signalne poti, ki aktivirajo jedrni transkripcijski dejavnik kapa B (NF- κ B), ta pa nato aktivira vnetne gene, ki sodelujejo pri nastanku in vzdrževanju vnetja črevesja (30).

TNF- α izločajo imunske in neimunske celice, npr. makrofagi, limfociti T, mastociti, granulociti, naravne celice ubijalke, fibroblasti in keratinociti (30, 32). Pri bolnikih s Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom so koncentracije TNF- α v intestinalni mukozi večje kot pri zdravih ljudeh (30).

1.7 Infliksimab

Infliksimab je himerno človeško – mišje protitelo, ki je v 25 % sestavljeno iz variabilnega mišjega (Fab) dela in v 75 % iz konstantnega človeškega (Fc γ 1) dela (slika 3). Z veliko afiniteto se veže tako na topno kot tudi na membransko obliko TNF- α , s čimer nevtralizira njegovo aktivnost. Preprečuje vezavo TNF- α na receptorje TNFR1 in TNFR2, s čimer prekine aktivacijo provnetnih signalov, ki imajo ključno vlogo pri nastanku in poteku KVČB. Hkrati povzroča tudi s komplementom posredovano lizo celic, ki proizvajajo TNF- α (33, 34).



Slika 3: Shematski prikaz zgradbe infliksimaba; prirejeno po (35).

Z infliksimabom zdravimo bolnike, ki se ne odzivajo na klasično zdravljenje ali pa le-to pri njih izzove hujše neželene učinke (15, 36). Ker vsebuje 25 % mišjih proteinov, obstaja večja možnost za njegovo imunogenost, posledica česar so lahko neželene reakcije in/ali zmanjšanje učinkovitosti zdravila, zato priporočajo sočasno preventivno uživanje imunosupresivov. Tuberkulozo, hepatitis B in okužbo z virusom človeške imunske pomanjkljivosti (HIV) moramo pri bolniku pred uvedbo infliksimaba izključiti, prav tako pa je potrebna pozornost pri morebitnem cepljenju z živimi cepivi (npr. proti rumeni mrzlici). Če tovrstno cepljenje izvedemo, ga je treba opraviti tri do štiri tedne pred začetkom zdravljenja z biološkimi zdravili (15, 37).

Infliksimab apliciramo intravensko, v odmerku 5 mg/kg telesne mase, in sicer v tednih 0, 2 in 6. Nato sledijo vzdrževalni odmerki na vsakih osem tednov (10). Pri nekaterih bolnikih se lahko učinkovitost zdravila zmanjša. V tem primeru odmerek povečamo na 10 mg/kg telesne mase ali pa zmanjšamo časovni interval med aplikacijami. Najkrajši interval med dvema aplikacijama so štiri tedni (15). Skozi leta prejemanja terapije naj bi 40 % bolnikov izgubilo odzivnost na učinkovine, ki so zaviralci TNF- α , 17 – 21 % pa jih razvije protitelesa proti mišjemu delu infliksimaba, kar ima za posledico neželene učinke (36, 38).

1.7.1 Imunogenost in drugi neželeni učinki infliksimaba

Poglavitna razlika med biološkimi in klasičnimi sintezniimi zdravili je v njihovi imunogenosti. Ob vstopu v organizem lahko proteini izzovejo imunski odziv, medtem ko so molekule sinteznih zdravil večinoma premajhne, da bi jih imunski sistem neposredno prepoznal kot tujke (21). Zaradi značilnosti beljakovinske strukture se po vnosu biološkega zdravila v organizem lahko izpostavijo hidrofobne aminokisliline, ki so sicer skrite v notranjosti proteina, imunski sistem pa tako spremenjeno učinkovino hitro prepozna, kar

vodi v nastanek specifičnih protiteles (21, 24, 27). Nastala protitelesa seveda vplivajo na učinkovitost biološke učinkovine, saj zmanjšajo njeno delovanje, v najslabšem primeru pa ga lahko celo izničijo (27, 39). Protitelesa se razvijejo pri 10 – 20 % bolnikov, ki prejemajo biološko terapijo z zaviralci TNF- α . Pri teh osebah obstaja kar trikrat večja verjetnost, da bo biološko zdravilo izgubilo zdravilni učinek, v primerjavi s tistimi, pri katerih se protitelesa ne razvijejo (39).

Dejavnike, ki vplivajo na imunogenost bioloških zdravil razdelimo v tri skupine:

- tiste, ki so povezani z učinkovino: narava proteina, uporabljeni ekspresijski sistemi, pogoji med izdelavo, prisotnost nečistot, prisotnost pomožnih snovi, transport in shranjevanje;
- tiste, ki so povezani s prejemnikom: genetika in bolezensko stanje;
- tiste, ki so povezani z zdravljenjem: sočasna uporaba imunomodulatorjev (azatioprin) in metotreksata, odmerki in pogostnost aplikacij (39, 40, 41).

Biološka zdravila so zaradi neposrednih učinkov na tarčne molekule učinkovita predvsem pri zdravljenju različnih vnetnih bolezni in tumorjev, izzovejo pa lahko tudi različne neželene učinke, ki jih v grobem razdelimo v dve skupini:

- a) Tip A – neželeni učinki, odvisni od farmakološke aktivnosti zdravila, ki jih lahko predvidimo. V to skupino uvrščamo monoklonska protitelesa, ki jih uporabljamo za lajšanje težav pri kroničnih vnetnih stanjih in so usmerjena proti dejavniku tumorske nekroze α (TNF- α). Zmanjšanje koncentracije TNF- α lahko vodi v pojav oportunističnih okužb, predvsem v razvoj tuberkuloze.
- b) Tip B – neželeni učinki, ki niso odvisni od farmakološke aktivnosti zdravila in jih ne moremo predvideti (npr. preobčutljivostna reakcija). V to skupino sodi npr. monoklonsko protitelo trastuzumab, katerega tarča so receptorji HER2 (ang. human epidermal growth factor receptor 2), izraženi na celicah raka dojk, a se lahko veže tudi na celice srčne mišice in povzroča kardiotoksične učinke (24).

Leta 2006 je Pichler neželene učinke bioloških zdravil razdelil glede na njihove strukture in mehanizme delovanja, in sicer ne glede na klinične simptome, ki jih lahko izzovejo:

- a) Tip α : neželeni učinki so povezani s sistemsko aplikacijo citokinov v razmeroma velikih odmerkih oziroma koncentracijah (mialgija, artralgijska bolečina, povišana telesna temperatura);
- b) Tip β : neželeni učinki so povezani s preobčutljivostjo (lokalna in generalizirana urtikarija, lokalni dermatitis, eritem, izguba produktivnosti);
- c) Tip γ : velika skupina neželenih učinkov, ki imajo imunske značilnosti, ki jih ne moremo razložiti le s prisotnostjo velikih koncentracij citokinov ali z mehanizmi značilnih preobčutljivostnih reakcij (trombocitopenija, hemolitična anemija, nefropatija IgA, dermatitis, vaskulitis, bolezen ščitnice, psoriaza, vitiligo, tuberkuloza in druga granulomatozna vnetja, akutna fibroza, sistemska skleroza, pancitopenija, atopijski dermatitis);
- d) Tip δ : neželeni učinki terapevtskih protiteles, ki naj bi delovala izključno na tarčne antigene, izražene na tumorskih celicah, a reagirajo tudi z normalnimi, zdravimi somatskimi celicami;
- e) Tip ϵ : neželeni učinki bioloških zdravil v obliki simptomov, ki niso neposredno povezani z imunskim sistemom in se kažejo v različnih oblikah, npr. nevrološki simptomi, izguba sluha, depresija, distonija, nemirne noge, srčna insuficienca (22, 23, 36).

2 NAMEN DELA

V gastroenterologiji uporabljamo biološka zdravila za zdravljenje hudih oblik KVČB. Z njimi dosegamo večjo učinkovitost in uspešnost zdravljenja, zaradi potencialne imunogenosti pa lahko povzročijo tudi neželene učinke. Pri njihovi uporabi se pogosto pojavijo ekcemi, psoriaza, vaskulitisi ter različne kožne okužbe, primanjkuje pa raziskav, ki bi proučile vplive odmerkov in serumskih koncentracij posameznih bioloških zdravil v krvi na pojav omenjenih kožnih sprememb.

Namen diplomskega dela je ugotoviti pogostost kožnih sprememb v presečni raziskavi bolnikov, ki se zdravijo z infliksimabom v Ambulanti za kronično vnetno črevesno bolezen na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Preveriti nameravamo dve hipotezi:

1. Pri bolnikih z velikimi koncentracijami infliksimaba v krvi se pogosteje pojavljajo neželeni učinki, ki se izražajo na koži.
2. Bolniki, ki prejemajo velike odmerke infliksimaba, imajo pogostejše neželene učinke, ki se izražajo na koži.

Diplomsko delo predstavlja del obsežnejšega projekta Fakultete za farmacijo, Kliničnega oddelka za gastroenterologijo in Dermatovenerološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.

Komisija za medicinsko etiko je na seji 17. oktobra 2017 ocenila, da je raziskava etično sprejemljiva in podala soglasje za njeno izvedbo (št. 0120-567/2017/4).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Biološki vzorci in preiskovana populacija

V raziskavo smo vključili polnoletne bolnike, ki se zdravijo z infliksimabom v Ambulanti za kronično vnetno črevesno bolezen na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo UKC Ljubljana. Ti so, po predhodni seznanitvi, pred raziskavo podpisali Izjavo o soglasju za prostovoljno sodelovanje v preiskavi. Če so bile pri njih opazne kožne spremembe, smo jih z njihovim dovoljenjem fotografirali, pri čemer smo pazili, da jih po fotografijah ni bilo mogoče identificirati. Na osnovi fotografij so zdravniki postavili diagnoze in bolnike razdelili v pet različnih skupin glede na fenotipe njihovih kožnih manifestacij: psoriaza, psoriaziformni ekcem, ekcem, kseroza in drugo. Diagnoze so navedene v Prilogi 1.

Bolnikom so, tik pred aplikacijo infliksimaba, ob vstavitvi kanile odvzeli vzorec krvi za redne preiskave in ugotovitev serumske koncentracije infliksimaba z metodo ApDia IFX ELISA. Ugotovljene vrednosti so zajemali iz elektronskih kartonov v raziskavi sodelujočih bolnikov in so navedene v Prilogi 2.

Za zbiranje podatkov smo kot raziskovalni instrument uporabili tudi anketni vprašalnik. Z njim smo v prvem delu zajemali demografske podatke (spol, leto rojstva, starost ob postavitvi diagnoze), podatke o fenotipu bolezni (Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis, neopredeljeni kolitis), podatke o zdravljenju z infliksimabom (leto začetka prejemanja infliksimaba, trenutna uporaba zdravila, odmerek, trajanje zdravljenja).

V drugem delu ankete smo se osredotočili samo na tiste bolnike, ki so imeli prisotne kožne spremembe. Zanimala nas je družinska anamneza, trajanje kožnih sprememb, njihova razširjenost in lokacija ter terapija. Poleg tega smo ocenjevali tudi vpliv kožnih sprememb na kakovost življenja bolnikov. Trditve, navedene v anketi, smo priredili na osnovi dveh uveljavljenih vprašalnikov: vprašalnika za oceno vpliva kronične urtikarije na kakovost življenja bolnikov in dermatološkega indeksa kakovosti življenja (43, 44). Ugotavljali smo, kako kožne spremembe vplivajo na bolnikovo delo in aktivnosti, njegov položaj v družbi, samopodobo, spanec, spolnost, koncentracijo, prehrano, izbiro oblačil in kozmetičnih izdelkov.

Zbiranje podatkov je trajalo osem tednov, od januarja do marca 2018.


3.2 Določanje koncentracije infliksimaba v serumskih vzorcih

3.2.1 Princip metode

S posredno imunsko metodo, imenovano encimska imunoabsorpcijska preiskava ali ELISA (ang. enzyme – linked immuno sorbent assay) zaznavamo protitelesa, proteine in glikoproteine v bioloških vzorcih (45). Mikrotitrne plošče, katerih vdolbinice so prekrivane s TNF- α , inkubiramo s kalibratorji, kontrolami in razredčenimi serumskimi vzorci bolnikov. Med inkubacijo se infliksimab iz seruma bolnikov specifično veže na TNF- α . Nevezane serumske proteine odstranimo s postopkom spiranja, tako da v vsaki vdolbinici mikrotitrne plošče ostane kompleks antigen-protitelo, ki ga zaznamo po dodatku sekundarnih, za infliksimab specifičnih monoklonskih protiteles, označenih s peroksidazo, in kromogene raztopine, ki vsebuje tetrametilbenzidin in vodikov peroksid (H₂O₂). Po inkubaciji se razvije modra barva, njena intenziteta pa je sorazmerna količini imunskega kompleksa v posamezni vdolbinici mikrotitrne plošče. Encimsko reakcijo zaustavimo z dodajanjem 0-5-molarne žveplove(VI) kisline (H₂SO₄), nato pa z uporabo spektrofotometričnega čitalca mikrotitrskih plošč izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm. Aparat poda koncentracije infliksimaba v serumskih vzorcih glede na umeritveno krivuljo, izdelano s pomočjo standarda infliksimaba.

V preglednici II podajamo reagente in materiale, ki se uporabljajo za izvedbo testa ApDia IFX ELISA.

Preglednica II: Reagenti in ostali material, uporabljeni za izvedbo testa ApDia IFX ELISA (Advanced Practical Diagnostics bvba, Belgija).

Komponente	Ime + simbol
1 mikrotitrna plošča (96 vdolbinic), vdolbinice, prevlečene s TNF- α .	Prevlečene vdolbinice 

<p>6 vial po 1300 µL, pripravljenih za uporabo.</p> <p>Vsaka viala vsebuje kalibratorsko raztopino: CAL0: 0 ng/mL; CAL5: 5 ng/mL; CAL10: 10 ng/mL; CAL20: 20 ng/mL; CAL60: 60 ng/mL; CAL120: 120 ng/mL.</p> <p>Viale vsebujejo 0,09 % NaN₃.</p>	<p>Kalibrator</p> <p>CALN</p>
<p>1 viala, 1300 µL, pripravljena za uporabo.</p> <p>Pozitivna kontrola za IFX; viala vsebuje 30 ng/mL IFX.</p> <p>Viale vsebujejo 0,09 % NaN₃.</p>	<p>Pozitivna kontrola 1</p> <p>CTL1</p>
<p>1 viala, 1300 µL, pripravljena za uporabo.</p> <p>Pozitivna kontrola za IFX, viala vsebuje 70 ng/mL IFX.</p> <p>Viale vsebujejo 0,09 % NaN₃.</p>	<p>Pozitivna kontrola 2</p> <p>CTL2</p>
<p>1 steklenica, 100 mL, pripravljena za uporabo.</p> <p>Razredčevalni pufer.</p> <p>Vsebuje 0,09 % NaN₃.</p>	<p>Razredčevalec vzorca</p> <p>DILSAM</p>
<p>1 steklenica, 12 mL, pripravljena za uporabo.</p> <p>Vsebuje specifična monoklonska protitelesa proti infliksimabu, označena s peroksidazo.</p>	<p>Konjugat</p> <p>CONJ</p>
<p>1 viala, 12 mL, pripravljena za uporabo.</p> <p>Vsebuje raztopino substrata (H₂O₂) in kromogena (tetrametilbenzidin).</p>	<p>Raztopina kromogena</p> <p>CHROM</p>

1 steklenica, 50 mL, 20-krat koncentriran detergent v fosfatnem puftru.	Raztopina za spiranje WASH 20x
1 steklenica, 6 mL, pripravljena za uporabo. Vsebuje 0.5 M H ₂ SO ₄ .	Raztopina za prekinitev reakcije STOP
2 pokrovčka za mikrotitrne plošče.	

3.2.2 Postopek izvedbe testa

1. V vdolbinice mikrotitrne plošče odpipetiramo po 100 µl kalibratorjev, kontrol in razredčenih vzorcev.
2. Pokrite mikrotitrne plošče inkubiramo 60 min ± 2 min na 37 °C (± 2°C).
3. S previdnim izsesavanjem izpraznimo vsebine vdolbinic na mikrotitrski plošči ter nato vanje dodamo po 350–400 µl pripravljene raztopine za spiranje. Pri tem se izogibamo prelivanju tekočine iz ene vdolbinice v drugo. Postopek spiranja ponovimo še dvakrat, torej skupno vdolbinice izperemo trikrat. Vsebino nato v čim večji meri odsesamo iz vdolbinic, ostanek tekočine pa odstranimo z rahlim obračanjem mikrotitrne plošče na vpojen papir. Pomanjkljiv postopek spiranja lahko negativno vpliva na rezultate testa.
4. Dodamo 100 µl raztopine konjugata z označenimi sekundarnimi protitelesi proti infliksimabu in pokrite mikrotitrne plošče inkubiramo 30 min ± 2 min na 37 °C (± 2 °C).
5. Ponovimo postopek izpiranja, ki je naveden v točki 3.
6. V vsako vdolbinico dodamo po 100 µl raztopine kromogena.
7. Mikrotitrsko ploščo inkubiramo 10 min ± 1 min na 37 °C (± 2 °C), zaščiteno pred svetlobo.
8. V vsako vdolbinico dodamo po 50 µl raztopine za prekinitev reakcije (H₂SO₄).
9. Absorbanco pri 450 nm izmerimo znotraj 30 min po dodatku H₂SO₄ (46).

3.3 Statistična analiza

Za obdelavo statističnih podatkov smo uporabljali program IBM SPSS®, verzija 22 (IBM Analytics, ZDA). Bolnike smo razdelili v dve skupini. V prvo smo uvrstili tiste brez kožnih sprememb, v drugo pa tiste s kožnimi spremembami. Izmerjene koncentracije infliksimaba smo rangirali v skupine z majhnimi ($\leq 3,0 \mu\text{g/mL}$), srednjimi ($3,0 - 7,0 \mu\text{g/mL}$) in velikimi ($\geq 7,0 \mu\text{g/mL}$) vrednostmi. Zaradi lažje statistične obdelave smo tistim bolnikom, ki so imeli koncentracije $\leq 0,3 \mu\text{g/mL}$, dodelili vrednost 0,3, tistim s koncentracijami $\geq 12,0 \mu\text{g/mL}$ pa vrednost 12,0. Odstotke odmerkov smo preračunali s pomočjo standardizirane formule 5 mg/kg telesne mase/8 tednov (spodaj).

Primer izračuna pri bolniku s telesno maso 78 kg, ki prejema odmerek 600 mg infliksimaba vsakih 5 tednov:

Standardizirani odmerek $5 \text{ mg/1 kg/8 tednov} = 100 \%$

Količnik standardizirane formule = 0,625

$$x(\%) = \frac{600 \text{ mg}}{78 \text{ kg} * 5 \text{ tednov} * 0,625} * 100$$

Rezultat izračuna je 246,15 %, kar pomeni, da omenjeni bolnik prejema 246,15 % standardiziranega odmerka.

Korelacijo med koncentracijo in odmerkom ter pojavom kožnih sprememb smo prikazali grafično, v obliki kvartilnih diagramov. Za primerjave skupin smo uporabljali neparametrične statistične teste. Statistične razlike med skupinami smo ugotavljali s pomočjo Mann-Whitneyevega U testa in vrednosti X^2 (hi kvadrat). Za potrditev ali zavrnitev hipotez smo uporabljali stopnjo značilnosti oziroma vrednosti p. Pri izračunani stopnji značilnosti $p \geq 0,05$ smo zavrnili alternativne hipoteze in sprejeli ničelne hipoteze.

Kožne spremembe smo glede na njihove fenotipe razdelili v pet skupin in prav tako uporabili Mann-Whitneyev U test, da bi dokazali morebitno statistično značilno korelacijo med posameznimi fenotipi in uporabljenimi odmerki oziroma izmerjenimi serumskimi koncentracijami infliksimaba.

Kakovost življenja smo, na osnovi odgovorov na anketni vprašalnik, ocenjevali le pri tistih bolnikih, ki so razvili kožne spremembe.

Da bi lažje določili izrazitejše vplive posameznih parametrov na kakovost življenja, smo kot mejno določili povprečno vrednost 2,5. Tako smo za izbrane trditve, pri katerih je bila izračunana povprečna vrednost ocen $> 2,5$, upoštevali, da imajo, v povezavi z nastalimi kožnimi spremembami, pomemben vpliv na kakovost življenja posameznega bolnika.

4 REZULTATI

4.1 Demografski podatki

Demografski podatki o bolnikih, fenotipih kožnih sprememb in terapiji z biološkimi zdravili, so prikazani v preglednici III.

Preglednica III: Demografski podatki bolnikov, pridobljeni s pomočjo anketnega vprašalnika.

Opazovani bolniki (N = 171)		Bolniki brez kožnih sprememb (N = 131)	Bolniki s kožnimi spremembami (N = 40)
Spol	Moški	71 (41,52 %)	24 (14,04 %)
	Ženske	60 (35,08 %)	16 (9,36 %)
Fenotip bolezní	Crohnova bolezen	74 (43,27 %)	29 (16,96 %)
	Ulcerozni kolitis	52 (30,41 %)	11 (6,43 %)
	Neopredeljeni kolitis	5 (2,92 %)	/
Terapija na dan opazovanja	Infliksimab (Remicade)	17 (9,94 %)	7 (4,09 %)
	Infliksimab (Remsima)	114 (66,66 %)	32 (18,71 %)
	Drugo	/	1 (0,58 %)

4.2 Lokalizacija in trajanje kožnih sprememb

Pri bolnikih, ki so razvili kožne spremembe, smo z anketnim vprašalnikom ugotavljali najpogostejša mesta njihovega pojavljanja, čas trajanja in način oziroma vrsto zdravljenja. Podatki so predstavljeni v preglednicah IV, V in VI.

Preglednica IV: Lokalizacija kožnih sprememb.

Lokalizacija kožnih sprememb	Število bolnikov	Delež bolnikov
Trup	2	5 %
Zgornje okončine	7	17,5 %
Spodnje okončine	10	25 %
Glava	5	12,5 %
Glava in trup	2	5 %
Glava in zgornje okončine	1	2,5 %
Glava in spodnje okončine	1	2,5 %
Zgornje in spodnje okončine	4	10 %
Trup in spodnje okončine	1	2,5 %
Trup, zgornje okončine, spodnje okončine	1	2,5 %
Glava, zgornje okončine, spodnje okončine	1	2,5 %
Glava, trup, zgornje okončine	1	2,5 %
Glava, trup, zgornje okončine, spodnje okončine	4	10 %

Preglednica V: Trajanje kožnih sprememb.

Trajanje	Število bolnikov	Delež bolnikov
En teden	1	2,5 %
En mesec	10	25 %
Pol leta	7	17,5 %
Več kot pol leta	21	52,5 %
Ni podatka	1	2,5%

Preglednica VI: Terapija kožnih sprememb.

	Število bolnikov	Delež bolnikov
Negovalno mazilo	11	27,5 %
Lokalni kortikosteroidi	9	22,5 %
Sistemske kortikosteroidi	1	2,5 %
Drugo	6	15 %
Brez terapije	16	40 %
<i>Pri enem pacientu ni bilo podatka o terapiji</i>		

4.3 Serumske koncentracije infliksimaba

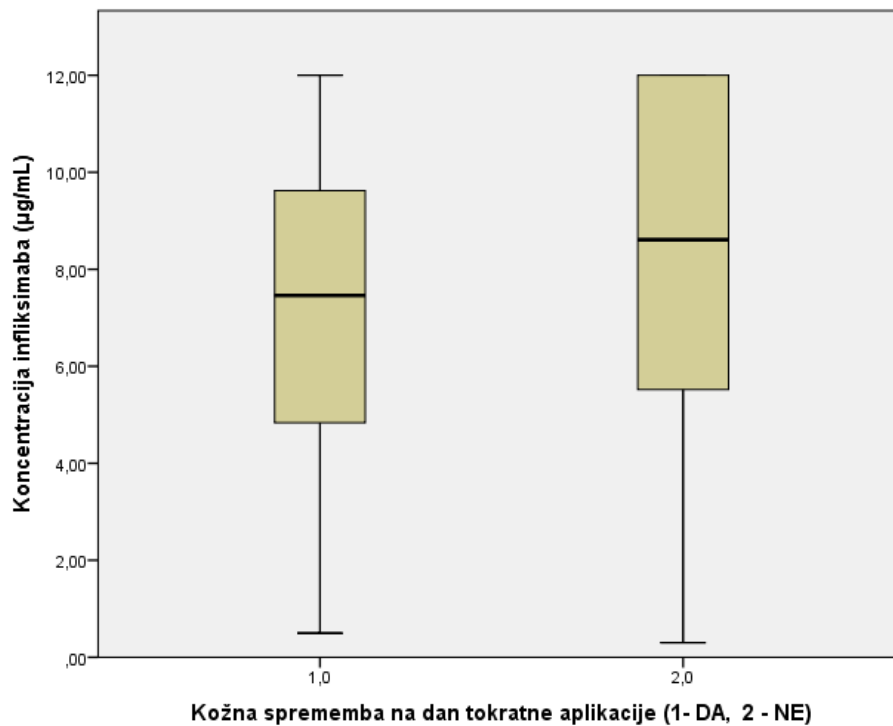
Rangirane vrednosti ugotovljenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih, ki se zdravijo v Ambulanti za kronično vnetno črevesno bolezen, ter izračunani statistični podatki so predstavljeni v preglednici VII.

Preglednica VII: Statistični podatki za majhne, srednje in velike vrednosti koncentracij infliksimaba, izmerjenih v serumskih vzorcih bolnikov.

	Koncentracija infliksimaba ($\mu\text{g/mL}$)		
	Majhna ($\leq 3,0$)	Srednja ($3,0 - 7,0$)	Velika ($\geq 7,0$)
Število vzorcev	18	51	102
Delež vzorcev	10,53 %	29,82 %	59,65 %
Aritmetična sredina	1,81	5,29	10,58
Standardna deviacija	0,89	5,56	1,75
Standardna napaka	0,21	0,15	0,17
Mediana	1,92	5,56	12,00
Minimum	0,3	3,02	7,11
Maksimum	2,89	6,92	12,00
IQR	1,15 – 2,65	4,41 – 6,16	8,85 – 12,00

4.4 Serumske koncentracije infliksimaba in pojav kožnih sprememb

S kvartilnim diagramom smo grafično predstavili razpršenost izmerjenih koncentracij infliksimaba v serumskih vzorcih bolnikov s kožnimi spremembami, v primerjavi s tistimi brez kožnih sprememb. Prikazani so: srednji vrednosti (mediani) ter interkvartilna razpona (IQR) koncentracij (slika 4).



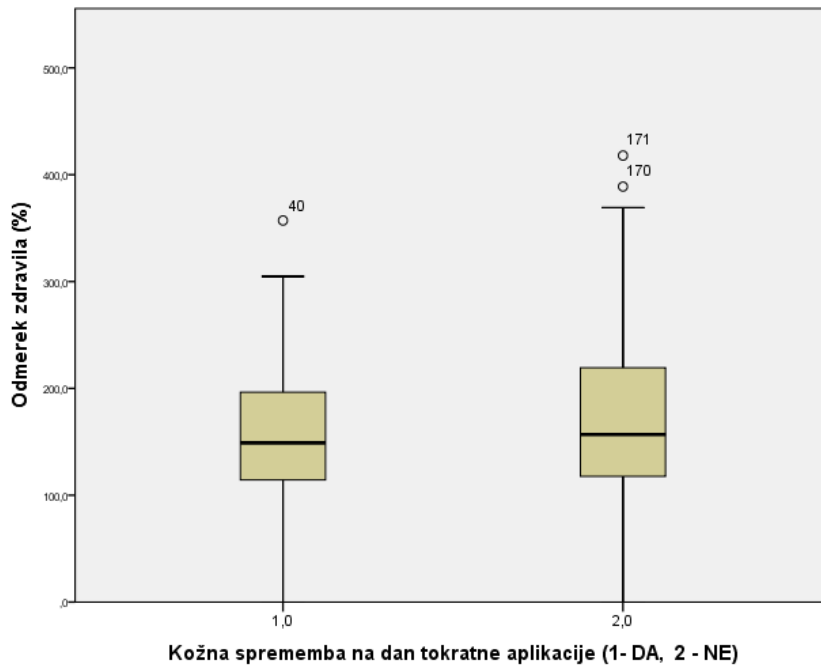
Slika 4: Kvartilni diagram ugotovljenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih s kožnimi spremembami (N = 40) in tistih brez njih (N = 131).

4.5 Prejeti odmerki infliksimaba in pojav kožnih sprememb

Izračunani statistični parametri, vezani na vrednosti odmerkov infliksimaba, ki so jih prejeli bolniki s kožnimi spremembami, v primerjavi s tistimi brez njih, so opisani v preglednici VIII. V obliki kvartilnega diagrama smo grafično prikazali razpršenost omenjenih podatkov, njihovi srednji vrednosti (mediani), IQR ter izstopajoče vrednosti v obeh primerjanih skupinah bolnikov (slika 5).

Preglednica VIII: Opisni statistični podatki o apliciranih odmerkih.

	Kožna sprememba na dan aplikacije infliksimaba	
	Da	Ne
Število vzorcev	40	131
Delež vzorcev	23,39 %	76,61 %
Aritmetična sredina	158,55	175,81
Standardna deviacija	67,08	74,38
Standardna napaka	10,61	6,50
Mediana	149,29	156,86
Minimum	0	0
Maksimum	357,14	417,91
IQR	114,29 – 198,19	117,65 – 219,61



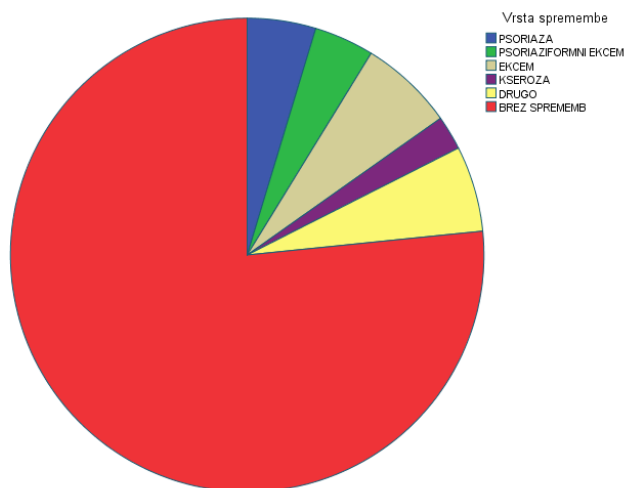
Slika 5: Kvartilni diagram uporabljenih odmerkov infliksimaba pri bolnikih s kožnimi spremembami (N = 40) in tistih brez njih (N = 131).

4.6 Fenotipska klasifikacija kožnih sprememb

Število in deleži prisotnih, fenotipsko klasificiranih kožnih sprememb, so opisani v preglednici IX ter grafično predstavljeni na sliki 6.

Preglednica IX: Število in deleži kožnih sprememb glede na njihovo fenotipsko klasifikacijo.

Vrsta kožne spremembe					
	Psoriaza	Psoriaziformni ekcem	Ekcem	Kseroza	Drugo
Število bolnikov	8	7	11	4	10
Delež kožne spremembe	20 %	17,5 %	27,5 %	10 %	25 %



Slika 6: Grafični prikaz deležev (%) posameznih kožnih sprememb pri bolnikih (N = 40) glede na njihovo fenotipsko klasifikacijo.

Slike od 7 do 11 prikazujejo fotografije primerov posameznih vrst kožnih sprememb (glede na njihovo fenotipsko klasifikacijo), ki smo jih dokumentirali pri bolnikih.



Slika 7: Psoriaza



Slika 8: Psoriaziformni ekcem



Slika 9: Ekcem



Slika 10: Kseroza



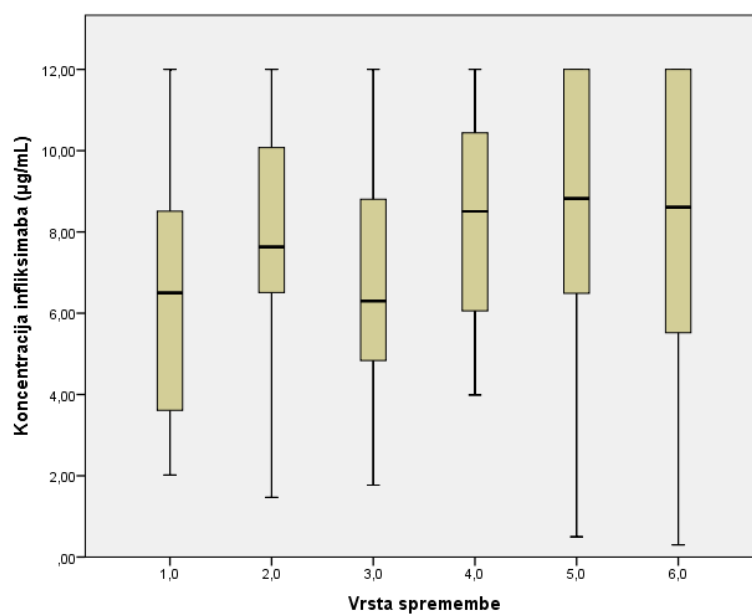
Slika 11: Drugo

4.7 Fenotipska klasifikacija kožnih sprememb in serumske koncentracije infliksimaba

Statistični parametri serumskih koncentracij infliksimaba, ugotovljenih pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb, so navedeni v preglednici X. S kvartilnim diagramom smo grafično prikazali razpršenost ugotovljenih koncentracij, srednje vrednosti (mediane) ter vrednosti IQR (slika 12). Rezultati Mann-Whitneyevega U testa za vsak posamezen fenotip opaženih kožnih sprememb, v primerjavi s kontrolno skupino, pa so predstavljeni v preglednicah XI, XII, XIII, XIV in XV.

Preglednica X: Statistični parametri ugotovljenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb (N = 40).

	Psoriaza	Psoriaziformni ekcem	Ekcem	Kseroza	Drugo
Aritmetična sredina	6,41	7,75	6,66	8,25	8,10
Standardna deviacija	3,32	3,62	3,13	3,30	3,86
Standardna napaka	1,17	1,37	0,94	1,65	1,22
Mediana	6,50	7,63	6,30	8,51	8,83
Minimum	2,02	1,47	1,77	3,99	0,50
Maksimum	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
IQR	3,51–8,81	6,41–12,00	4,04–9,49	5,03–11,22	5,69–12,00



Slika 12: Kvartilni diagram ugotovljenih serumskih koncentracij infliksimaba pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb, v primerjavi s kontrolno skupino (1 – psoriaza, 2 – psoriaziformni ekcem, 3 – ekcem, 4 – kseroza, 5 – drugo, 6 – bolniki brez kožnih sprememb).

Preglednica XI: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaza«.

	Psoriaza	Kontrolna skupina
Število vzorcev	8	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	6,50	8,61
Mann-Whitney U (p)	0,136	

Preglednica XII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaziformni ekcem«.

	Psoriaziformni ekcem	Kontrolna skupina
Število vzorcev	7	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	7,63	8,61
Mann-Whitney U (p)	0,747	

Preglednica XIII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »ekcem«.

	Ekcem	Kontrolna skupina
Število vzorcev	11	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	6,30	8,61
Mann-Whitney U (p)	0,120	

Preglednica XIV: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »kseroza«.

	Kseroza	Kontrolna skupina
Število vzorcev	4	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	8,51	8,61
Mann-Whitney U (p)	0,931	

Preglednica XV: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »drugo«.

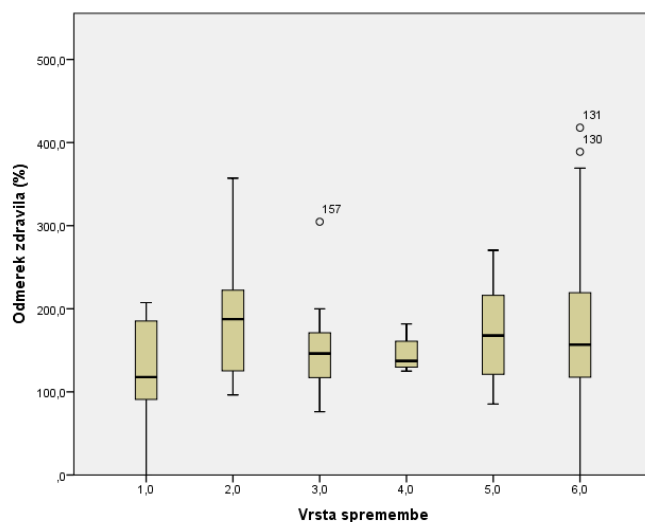
	Drugo	Kontrolna skupina
Število vzorcev	10	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	8,8250	8,6100
Mann-Whitney U (p)	0,951	

4.8 Fenotipska klasifikacija kožnih sprememb in odmerki infliksimaba

Statistični parametri uporabljenih vrednosti odmerkov pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb so predstavljeni v preglednici XVI. S kvartilnim diagramom smo prikazali razpršenost podatkov, srednje vrednosti (mediane), izstopajoče vrednosti ter IQR uporabljenih odmerkov infliksimaba (slika 13). Rezultati Mann-Whitneyevega U testa za posamezen fenotip opaženih kožnih sprememb, v primerjavi s kontrolno skupino, pa so navedeni v preglednicah XVII, XVIII, XIX, XX in XXI.

Preglednica XVI: Statistični parametri uporabljenih odmerkov infliksimaba pri bolnikih z različnimi fenotipi kožnih sprememb (N = 40).

	Psoriaza	Psoriaziformni ekcem	Ekcem	Kseroza	Drugo
Aritmetična sredina	124,40	190,92	153,49	145,32	174,08
Standardna deviacija	68,28	90,25	61,15	25,11	62,05
Standardna napaka	24,14	34,11	18,44	12,55	19,62
Mediana	117,75	187,50	146,12	137,23	167,82
Minimum	0	96,39	76,19	125,00	85,33
Maksimum	207,41	357,14	304,76	181,82	270,42
IQR	83,90 – 189,02	96,77 – 228,57	117,29 – 173,91	127,36 – 171,36	117,57 – 226,09



Slika 13: Kvartilni diagram uporabljenih odmerkov infliksimaba pri bolnikih s posameznimi fenotipi kožnih sprememb in pri tistih brez njih (1 – psoriza, 2 – psoriaziformni ekcem, 3 – ekcem, 4 – kseroza, 5 – drugo, 6 – bolniki brez kožnih sprememb).

Preglednica XVII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriza«.

	Psoriza	Kontrolna skupina
Število vzorcev	8	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	117,748	156,862
Mann-Whitney U (p)	0,083	

Preglednica XVIII: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »psoriaziformni ekcem«.

	Psoriaziformni ekcem	Kontrolna skupina
Število vzorcev	7	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	187,500	156,862
Mann-Whitney U (p)	0,764	

Preglednica XIX: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »ekcem«.

	Ekcem	Kontrolna skupina
Število vzorcev	11	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	146,118	156,862
Mann-Whitney U (p)	0,366	

Preglednica XX: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »kseroza«.

	Kseroza	Kontrolna skupina
Število vzorcev	4	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	137,226	156,862
Mann-Whitney U (p)	0,599	

Preglednica XXI: Rezultat Mann-Whitneyevega U testa za fenotip »drugo«.

	Drugo	Kontrolna skupina
Število vzorcev	10	131
Mediana ($\mu\text{g/mL}$)	167,821	156,862
Mann-Whitney U (p)	0,914	

4.9 Vpliv kožnih sprememb na kakovost življenja bolnikov

Vpliv kožnih sprememb na kakovost življenja bolnikov smo proučevali s pomočjo ocen, ki so jih le-ti (N = 40) dodelili posameznim trditvam, navedenim v anketnem vprašalniku. Analiza rezultatov je prikazana v preglednici XXII.

Preglednica XXII: Ocene, ki so jih anketirani bolniki s kožnimi spremembami dodelili posameznim trditvam, navedenim v vprašalniku (1 – nikoli, 2 – redko, 3 – zmerno, 4 – zelo pogosto, 5 – vedno); prikazane so tudi povprečne vrednosti. Kot statistično pomembne smo določili ocene, ki so bile > 2,5. Takšni sta bili le dve, ki sta prikazani v odebeljenem tisku.

	Povprečna vrednost – skupno	Psoriaza	Psoriazi - formni ekcem	Ekcem	Kseroza	Drugo
Zaradi kožnih sprememb je moteno opravljanje rednega dela ali študiranje.	1,66	2,3	1,57	1,82	1	1,3
Kožne spremembe vplivajo na delo doma.	1,65	1,75	1,86	1,73	1,75	1,3
Zaradi kožnih sprememb je bil pacient primoran zmanjšati čas, ki ga porabi za delo doma.	1,43	1,38	1,86	1,64	1,25	1
Zaradi kožnih sprememb je bil pacient primoran zmanjšati čas, ki ga porabi za druge aktivnosti.	1,43	1,38	1,86	1,55	1,25	1,10
Zaradi kožnih sprememb se pacient ne more udeleževati pri športnih aktivnostih.	1,48	1,63	1,71	1,73	1,25	1
Zaradi kožnih sprememb se pacient ne zadržuje v javnih objektih, kot so kopališča in fitnessi.	1,63	1,88	1,29	1,91	1,50	1,40
Stresne situacije dodatno vplivajo na izražanje kožnih sprememb.	2,15	2,13	2,43	2,55	1,50	1,80

Zaradi kožnih sprememb je spanec slabši.	1,58	1,88	1,29	1,91	2	1
Zaradi kožnih sprememb ima pacient težave s koncentracijo.	1,43	1,625	1,57	1,73	1	1
Zaradi kožnih sprememb ima pacient težave s partnerjem, prijatelji in sodelavci.	1,3	1,63	1,14	1,36	1	1,20
Zaradi kožnih sprememb je pacientu v družbi neprijetno in je nesproščen.	1,7	1,88	1,86	1,55	1,5	1,70
Kožne spremembe pacientu povzročajo težave pri spolnosti.	1,43	1,63	1,29	1,73	1,5	1,00
Kožne spremembe vplivajo na pacientovo samopodobo.	2	2,63	2,14	2	1,25	1,70
Zaradi kožnih sprememb je pacient psihično obremenjen, zaskrbljen.	2,03	2,13	2	2,36	1,75	1,70
Zaradi kožnih sprememb ima pacient depresivne motnje.	1,43	1,5	1,14	1,73	1,25	1,30
Zaradi kožnih sprememb je bil pacient primoran spremeniti prehrano.	1,73	2	1,43	1,64	1,75	1,80
Zaradi kožnih sprememb je pacient omejen pri uporabi kozmetičnih izdelkov.	2,08	1,63	2	2,36	2	2,20
Zaradi kožnih sprememb ima pacient težave pri izbiri oblačil.	1,45	1,63	1,14	1,45	2	1,30

5 RAZPRAVA

Tako kot pri vseh zdravilih se lahko tudi pri bioloških pojavijo različni neželeni učinki, ki so izraženi na več organskih sistemih. Pri zdravljenju KVČB se približno 20 % pacientov zdravi z infliksimabom, katerega neželeni učinki se pogosto izražajo na koži. Pri pregledu dostopne literature o vplivu infliksimaba na pojavljanje kožnih sprememb nismo zasledili podatkov o tem, ali na pojav kožnih sprememb vplivajo njegovi odmerki in serumske koncentracije. Odmerki zdravila in posledično njegove serumske koncentracije se med zdravljenjem pogosto spreminjajo zaradi optimizacije zdravljenja.

Postavili smo dve delovni hipotezi, in sicer da imajo bolniki z višjimi serumskimi koncentracijami infliksimaba pogosteje prisotne neželene učinke, ki se izražajo na koži, ter da imajo bolniki, ki prejemajo višje odmerke infliksimaba, pogosteje prisotne neželene učinke, izražene v obliki kožnih sprememb. V okviru raziskave smo ugotovili, da povišani odmerki in serumske koncentracije infliksimaba ne vplivajo statistično značilno na pojavljanje kožnih sprememb, in sicer niti gledano v celoti niti v povezavi s posameznimi fenotipi. Naše ugotovitve so zelo pomembne za optimizacijo zdravljenja z višjimi odmerki infliksimaba. Kožne spremembe, ki so jih preiskovani bolniki razvili, so bile blage in niso bistveno vplivale na kakovosti njihovih življenj.

V raziskavi je sodelovalo 171 bolnikov, od tega 55,6 % moških in 44,4 % žensk, v starosti od 20 do 78 let. Povprečna starost ob postavitvi diagnoze je bila pri bolnikih s kožnimi spremembami $30 \pm 13,88$ let, povprečno trajanje bolezni pred uvedbo infliksimaba pa $8,38 \pm 7,72$ let. Izmed 171 vprašanih je bilo 24 (14 %) kadilcev, 78 (45,6 %) jih ni nikoli kadilo, 68 (39,8 %) je nekdanjih kadilcev, 1 (0,6 %) pa se glede kajenja ni želel izjasniti. Predhodno je biološko zdravilo prejelo 36 bolnikov (21,1 %), poleg tega pa jih je 8 (4,7 %) sočasno uživalo kortikosteroide, 7 (4,1 %) pa tiopurine.

Kožne spremembe je razvilo 40 (23,4 %) od 171 bolnikov, ki prejemajo infliksimab. Ta rezultat je pričakovan, saj so v dosedanjih raziskavah o pojavu kožnih sprememb pod vplivom infliksimaba ugotovili, da se njihovi deleži gibljejo od 20 do 30 % (42, 47). Pozitivno družinsko anamnezo psoriaze in alergijskih bolezni kože je potrdilo 5 (12,5 %) preiskovanih bolnikov. Zaskrbljujoče pa je dejstvo, da je imelo kar 21 (52,5 %) bolnikov kožno spremembo, prisotno več kot pol leta. Pri pacientih, ki se zdravijo z biološkim zdravilom, je potreben večji nadzor, o morebitnem odkritju novih neželenih učinkov pa je

potrebno dosledno obveščanje zdravstvenih delavcev v ambulantni, kjer prejemajo terapijo. Zdravljenje lahko postane neučinkovito, pri čemer prihaja do velikih finančnih izgub, saj so cene bioloških zdravil v primerjavi s klasičnimi oziroma sintezniimi mnogo višje. Zdravljenje je v določenih primerih potrebno tudi prekiniti, kar seveda poveča možnosti ponovne aktivacije bolezni, hospitalizacij in posledično poslabša kakovost življenja bolnikov.

5.1 Pojav kožnih sprememb v odvisnosti od koncentracije in odmerka infliksimaba

Ob vstavitvi kanile za aplikacijo infliksimaba smo pacientom odvzeli vzorec krvi, v katerem smo nato s testom ApDia IFX ELISA ugotovili serumske koncentracije zdravila. Izmerjene koncentracije infliksimaba smo razdelili v tri skupine: majhne ($<3 \mu\text{g/mL}$), srednje (med 3 in $7 \mu\text{g/mL}$) in velike ($>7 \mu\text{g/mL}$). Izmed 171 preiskovancev jih je imelo 59,65 % serumsko koncentracijo infliksimaba $>7 \mu\text{g/mL}$. Višja koncentracija infliksimaba naj bi zagotavljala boljši nadzor nad vnetnimi procesi, tveganje za okužbe pa naj kljub temu ne bi bilo povečano (48).

Razpršenost vrednosti serumskih koncentracij in odmerkov infliksimaba pri bolnikih, ki so razvili kožne spremembe, v primerjavi s tistimi brez njih, smo grafično prikazali v obliki kvartilnih diagramov. Izvedli smo Mann-Whitneyev U test in test X^2 (hi kvadrat). Ugotovili smo, da ni bilo nobene statistično značilne povezave med serumskimi koncentracijami zdravila in pojavom kožnih sprememb ($X^2 = 0,672$). Zato hipoteze o neodvisnosti oziroma ničelne hipoteze ne moremo zavrniti, saj je tveganje za njeno zavrnitev preveliko (71 %). Hipotezo o neodvisnosti bi sicer lahko zavrnili le v primeru, da bi bila vrednost $p < 0,05$, v našem primeru pa je bila njena vrednost 0,715.

Mediana koncentracij infliksimaba v serumskih vzorcih bolnikov brez kožnih sprememb je bila $8,6 \mu\text{g/mL}$, v tistih, ki smo jih odvzeli bolnikom s kožnimi spremembami, pa $7,46 \mu\text{g/mL}$, kar ni statistično značilno različno ($p = 0,389$). Naš rezultat se ujema z izsledki študije, ki so jo izvedli Coutzac in sodelavci in dobili podobne rezultate. Po njihovem mnenju naj serumske koncentracije infliksimaba ne bi vplivale na pojave paradoksalnih manifestacij, kot so kožne in revmatske spremembe (49).

Mediana odmerkov infliksimaba pri bolnikih brez kožnih sprememb je bila 149,00 %, pri tistih s kožnimi spremembami pa 156,86 %. Tudi ta razlika ni bila statistično značilna ($p = 0,741$).

Na bolnikih opažene kožne spremembe smo razdelili na pet fenotipov. Največji delež so predstavljali ekcemi, najmanjši pa kseroze, kar se deloma ujema z izsledki predhodnih študij, ki navajajo največje deleže ekcemov in psoriaziformnih ekcemov (42, 50). Velja omeniti dejstvo, da so zdravniki v naši raziskavi diagnoze postavili le na osnovi fotografij. Bolniki torej niso opravili zdravniških pregledov in histoloških preiskav pri dermatovenerologu, kar pa bi bilo v prihodnje, pri podobnih študijah, smiselno zagotoviti, saj bi tako zagotovili natančnejšo določitev njihovega kliničnega stanja.

Rezultati Mann-Whitneyevih U testov pri primerjanju posameznih fenotipov kožnih sprememb s kontrolno skupino, v povezavi s serumskimi koncentracijami in prejetimi odmerki infliksimaba, niso pokazali statistično značilnih razlik, saj so bile v vseh primerih vrednosti $p > 0,05$.

5.2 Kakovost življenja bolnikov s kožnimi spremembami

Pri bolnikih s prisotnimi kožnimi spremembami smo s pomočjo anketnega vprašalnika preverjali, kako le-te vplivajo na kakovost njihovega življenja. Pri trditvah, ki so jih ocenjevali z ocenami od 1 do 5, bi lahko le v primerih povprečnih vrednosti ocen $>2,5$ trdili, da tako ocenjeni parametri dejansko vplivajo na kakovost življenja anketiranih bolnikov. Naši rezultati kažejo, da kožne spremembe ne vplivajo na kakovost življenja anketiranih, saj povprečna ocena nobene od v vprašalniku navedenih trditev ni presegala mejne vrednosti 2,5. Kakovost življenja smo nato analizirali še v okviru posameznih fenotipov kožnih sprememb in ugotovili, da bolezen vpliva na samopodobo pri psoriatičnem fenotipu (povprečna vrednost ocen 2,6), stresne situacije pa dodatno vplivajo na pojavnost kožnih sprememb (povprečna vrednost ocen 2,55). V anketi so preiskovanci s kožnimi spremembami navedli, da jih posebne kozmetične izdelke uporablja 10 (25 %), pri čemer so največkrat omenjali vlažilne izdelke različnih proizvajalcev, poleg teh pa tudi mila brez parfumov ter 10-odstotno olivno olje v lipolosjonu. Alternativnega zdravljenja so se posluževali 4 (10 %) bolniki. Med odgovori so bili navedeni tudi: uporaba polhovega olja, kapljic CBD in konopljinega mazila, homeopatskih pripravkov ter obiski bioenergetikov.

Kakovost življenja lahko povežemo tudi s trajanjem oziroma časom prisotnosti kožnih sprememb. Pri 52 % bolnikov so le-te trajale več kot pol leta, glede na anketne odgovore pa niso vplivale na kakovost življenja. Očitno se bolnikom tovrstne težave ne zdijo pomembne oziroma se z njimi ne obremenjujejo pretirano. Vsekakor je zdravljenje z biološkimi zdravili v primerjavi s klasično farmakoterapijo kompleksnejše, zato je v fazi zdravljenja z njimi potrebno aktivno sodelovanje med bolniki ter zdravniki in drugimi zdravstvenimi delavci.

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo proučevali pogostost kožnih sprememb pri bolnikih, ki jih v Ambulanti za kronično vnetno črevesno bolezen na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana zdravijo z biološkim zdravilom infliksimab. Preiskovali smo vplive odmerkov in serumskih koncentracij infliksimaba na pojav kožnih sprememb. Ugotovili smo, da je kožne spremembe razvilo 40 (23,4 %) od skupno 171 preiskovancev. Naši izsledki kažejo, da:

1. Uporabljeni odmerki apliciranega zdravila ne vplivajo na izražanje kožnih sprememb.
2. Serumske koncentracije infliksimaba ne vplivajo na izražanje kožnih sprememb.
3. Serumske koncentracije in uporabljeni odmerki ne vplivajo na izražanje različnih fenotipov kožnih sprememb.
4. Pojav kožnih sprememb ne vpliva na kakovost življenja prizadetih bolnikov.

Dokazali smo, da veliki odmerki in serumske koncentracije infliksimaba ne vplivajo na izražanje kožnih sprememb, kar je izjemnega pomena za klinično delo, saj je optimizacija zdravljenja z višjimi odmerki bistvena za obvladovanje KVČB.

Kompleksnost bioloških zdravil se odraža tudi v njihovih neželenih učinkih. Tako ostajajo vzroki za nastanek kožnih manifestacij med zdravljenjem z infliksimabom še vedno neznani. V prihodnje bi bilo pri izražanju kožnih manifestacij pri bolnikih, ki se zdravijo z biološkimi zdravili, treba raziskati tudi vplive genetike. Ker se med neželenimi učinki infliksimaba razmeroma pogosto pojavlja psoriaza, bi bilo koristno raziskati polimorfizme DNA, za katere vemo, da povečujejo tveganje za njen nastanek, in sicer v povezavi s prejetjem velikih odmerkov omenjenega zdravila. Tako bi lahko ugotavljali, ali veliki odmerki infliksimaba izzovejo pojav psoriaze preferenčno pri tistih bolnikih, ki so genetsko nagnjeni k tej bolezni.

7 LITERATURA

1. Wallace KL , Zheng L, Kanazawa Y, Shih D: Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(1): 6-21.
2. De Matos B R, Garcia M P, Nogueira J B, Paiatto L N, Albuquerque C G, Souza C L, Romani Fernandes L G, Tamashiro W M, Simioni P U: Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators Inflamm* 2015:1-11.
3. Rosen M J, Dhawan A, Saeed S A: Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *JAMA Pediatr* 2015, 169(11): 1053-1060.
4. Smrekar, N., 2010. Biološka zdravila v gastroenterologiji. V: Fras Z, Poredoš P. ur. 52. Tavčarjevi dnevi, zbornik prispevkov. Ljubljana: Katedra za interno medicino, Medicinska fakulteta v Ljubljani. 63-68.
5. Martinez Gomez M J, Fernandez C M, Romeo Donlo M: Nutrición en enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutr Hosp* 2016, 33 (4):59-62.
6. Nikolaus S, Schreiber S: Diagnostic of Inflammatory Bowel Disease.. *Gastroenterology* 2007; 133(5):1670-1689.
7. Kranjc I, Pečovnik Balon B: Interna medicina, Univerza v Mariboru Visoka Zdravstvena šola, 2000: 384-386.
8. Ferkolj I: Cilji zdravljenja pri kronični vnetni črevesni bolezni. *Gastroenterolog* 2014, 18(1):39-44.
9. Dave M, Papadakis K A, Faubion W A: Immunology of Inflammatory Bowel Disease and Molecular Targets for Biologics. *Gastroenterol Clin North Am* 2014; 43(3):405-424.
10. Bloom S, Webster G: *Oxford handbook of gastroenterology and hepatology*. Oxford University Press 2006; 244-251, 618-620, 664.
11. Pernat Drobež C: Klinične značilnosti ulceroznega kolitisa in Crohnove bolezni. *Gastroenterolog* 2014; 18(1):17-22.

12. Satsangi J, Silverberg M S, Vermeire S, Colombel J-F: The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006; 55:749-753.
13. <http://townrunners.org/inflamed-intestines/724-best-ulcerative-colitis-images-on-pinterest-health-foods-inflamed-intestines/> , dostopno 13.9.2018)
14. https://www.google.si/search?q=proctitis,+left+sided+colitis+and+pancolitis&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjQ1Kmn3cPbAhVMEVAKHdQLBasQ_AUICigB&biw=1455&bih=722#imgc=RKMCPo6iaaegmM:, dostopno 24.8.2018)
15. Sobrado C W, Leal R F, Sobrado L F: Therapies for Crohn's disease: a clinical update. *Arq Gastroenterol* 2016; 55(3): 206-211.
16. Zenlea T, Peppercorn M A: Immunosuppressive therapies for inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(12): 3146-3152.
17. Jakopovič K: Zdravila za zdravljenje Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa. *Farm vestn* 2017; 68: 267-272.
18. Sandborn W J, Hanauer S, Van Assche G, Panés J, Wilson S, Petersson J, Panaccione R: Treating beyond symptoms with a view to improving patient outcomes in inflammatory bowel diseases. *J Crohn's Colitis* 2014; 8: 927-935.
19. Zakon o zdravilih, 2014, Uradni list Republike Slovenije, št. 17, str. 1895.
20. Možina M., 2010. Kako varna so biološka zdravila? V: Fras Z., Poredoš P. ur. 52. Tavčarjevi dnevi. Zbornik prispevkov. Ljubljana: Katedra za interno medicino, Medicinska fakulteta v Ljubljani. 69-76.
21. Morrow T, Hull Felcone L: Defining the difference: what makes biologics unique. *Biotechnol Healthc* 2004; 1(4): 24-26, 28-29.
22. Pichler W J: Adverse side-effects to biological agents. *Allergy* 2006; 61: 912-920.
23. Aubin F, Carbonnel F, Wendling D: The complexity of adverse side-effects to biological agents. *J Crohn's Colitis* 2013; 7: 257-262.

24. Štrukelj B., 2014. 30 let bioloških zdravil: pregled in perspektive. V: Kočever Glavač N., Zvonar A. ur. Biološka zdravila I. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani. 7-14.
25. Marc, G., 2007. Biološka zdravila-opredelitev in vloga v klinični praksi. V: Hojs, R. ur. Iz prakse za prakso. Maribor: Univerzitetni klinični center. 9-22.
26. Gabbani T, Deiana S, Annese V: CT-P13: design, development, and place in therapy. *Drug Des Devel Ther* 2017; 11: 1653-1661.
27. Štrukelj B, Kos J, Slanc P, Jevnikar Z, Lunder M, Kreft S, Kočever N, Obemajer N, Podobnik B, Gabrc Porekar V, Menart V, Cegnar M, Kristl J, Bratkovič T, Cirk M, Bavec S, Doljak B, Kristl J, Premzl A, Jeras M in Brič I, Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007:4-24, 556-558.
28. Cohen H P, Blauvelt A, Rifkin R M, Danese S, Gokhale S B, Woollett G: Switching Reference Medicines to Biosimilars: A Systematic Literature Review of Clinical Outcomes. *Drugs* 2018; 78: 463-478.
29. Lee H S, Park S-K, Park D: Novel treatments for inflammatory bowel disease. *Korean J Intern Med* 2018; 33: 20-27.
30. Tracey D, Klareskog L, Sasso E H, Salfeld J G, Tak P P: Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 2008; 117: 244-279.
31. Kalliolias G D, Ivashkiv L B: TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12(1): 49-62.
32. Sedger LM, McDermott M F: TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25: 453-472.
33. Lis K, Kuzawińska O, Bałkowiec-Iskra E: Tumor necrosis factor inhibitors – state of knowledge. *Arch Med Sci* 2014; 6: 1175-1185.

34. Corominas M, Gastaminza G, Lobera T: Hypersensitivity Reactions to Biological Drugs. *Investig Allergol Clin Immunol* 2014; 24(4): 212-225.
35. https://www.google.si/search?tbm=isch&q=+infiximab+&chips=q:infiximab,online_chips:infiximab+structure&sa=X&ved=0ahUKEwjYoK-UrMvbAhVFVywKHY6DBwgQ4lYIKCgD&biw=1455&bih=677&dpr=1.1#imgc=zAeg-yE3t0f7jM; dostopno 24.8.2018)
36. Renna S, Cottone M, Orlando A: Optimization of the treatment with immunosuppressants and biologics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(29): 9675-9690.
37. Lee S J, Kavanaugh A: Adverse reactions to biologic agents: Focus on autoimmune disease therapies. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116 (4): 900-905.
38. Moustou A E, Matekovits A, Dessinioti C, Antoniou C, Sfikakis P P, Stratigos A J: Cutaneous side effects of anti-tumor necrosis factor biologic therapy: A clinical review. *J Am Acad Dermatol* 2009; 61 (3): 486-504.
39. Moss A C, Brinks V, Carpenter J F: Review article: immunogenicity of anti-TNF biologics in IBD – the role of patient, product and prescriber factors. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 1188-1197.
40. Bratkovič T: Biološke učinkovine pri zdravljenju Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa. *Farm vestn* 2008; 59: 47-54.
41. Jullien D, Prinz J C, Nestle F O: Immunogenicity of Biotherapy Used in Psoriasis: The Science Behind the Scenes. *J Invest Dermatol* 2015; 135: 31-38.
42. Cleynen I, Billiet T, Vandecandelaere P, Vande Casteele N, Breynaert C, Ballet V, Ferrante M, Noman M, Van Assche G, Rutgeerts P, Oord J, Vermeire S: Characteristic of Skin Lesions Associated With Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Ann Intern Med* 2016;164(1):10-22.
43. <https://www.itchingforanswers.ca/docs/CU-Q2OL-Questionnaire.pdf>, dostopano 24.8.2018.

44. <http://www.bad.org.uk/shared/get-file.ashx?id=1653&itemtype=document>, dostopano 24.8.2018.
45. <https://www.immunology.org/public-information/bitesized-immunology/experimental-techniques/enzyme-linked-immunosorbent-assay>, dostopano 24.8.2018.
46. http://www.apdiagroup.com/files/ifu/710001_IFU_IFX_96T-vs05-15.pdf, dostopano 24.8.2018.
47. Hellström A E, Färkkilä M, Kolho K L: Infliximab-induced skin manifestations in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2016; 51 (5): 563-571.
48. Drobne D, Kurent T, Golob S, Švegl P, Rajar P, Terzic S, Koželj M, Novak G, Smrekar N, Plut S, Sever N, Strniša L, Hanžel J, Breclj J, Urlep D, Osredkar J, Homan M, Orel R, Štabuc B, Ferkolj I, Šmid A: Success and safety of high infliximab trough levels in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2018; 10: 1-7.
49. Coutzac c, Chapuis J, Poullenot F, Chabrun E, Capdepon M, Blanco P, Laharie D: Association Between Infliximab Trough Levels and the Occurrence of Paradoxical Manifestations in Patients with Inflammatory Bowel Disease: a Case-Control Study. *J Crohns Colitis* 2015; 9(11): 982-987.
50. Rahier J F, Buche S, Peyrin–Biroulet L, Bouhnik Y, Duclos B, Louis E, Papay P, Allez M, Cosnes J, Cortot A, Laharie D, Reimund J M, Lémann M, Delaporte E, Colombel J F: Severe Skin Lesions Cause Patients With Inflammatory Bowel Disease to Discontinue Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010; 8(12): 1048-1055.

PRILOGE

Priloga 1: Diagnoze bolnikov, ki so razvili kožne spremembe.

Identifikacijsko število	Diagnoza
512018-3	Makulopapulozni dermatitis
812018-2	Tinea pedis, zimski ekcem
1012018-2	Atopijski dermatitis, psoriza
1512018-3	Tinea pedis, dyshidrosis, pitted keratolisis
1712018-3	Zimski ekcem
1712018-5	Folikulitis
1712018-8	Psoriza, numularni ekcematoidni dermatitis
1912018-1	Nespecifični dermatitis
1912018-7	Licnih simplex schromicus
2412018-5	Reaktivne kožne spremembe ob KVČB
2412018-8	Blaga psoriza
2612018-4	Rozacea
2612018-9	Zimski ekcem ali asteatotični dermatitis
2612018-10	Blaga psoriza
2612018-11	Folikulitis pazduh

2912018-9	Seboroični dermatitis
3112018-8	Nespecifični dermatitis
222018-1	Erithema nodosum, psoriza v regresiji
522018-1	Solarni dermatitis
722018-5	Nespecifični dermatitis
722018-6	Zimski ekcem
722018-7	Navadna ali seboroična bradavica
922018-1	Psoriza dlani
922018-2	Inverzna psoriza
922018-13	Psoriza lasišča
1422018-1	Iritativni dermatitis
1422018-5	Lichen planus verrucosus
1422018-9	Psoriza
1422018-11	Papilomatozni melanocitni nevus
1422018-12	Detritivni dermatitis rok
1622018-1	Seboroični dermatitis ob nosu na obrazu, folikulitis, steroidne akne
2122018-5	Tinea pedis z idi po telesu, dermatitis herpetiformis, ekcem
2122018-6	Eksfoliativni dermatitis po dishidrozi

2322018-2	Nespecifični dermatitis
2322018-4	Rozacea
2822018-4	Nespecifični dermatitis, tinea
2822018-5	Eksfoliativni dermatitis po terapiji
232018-1	Seboroični dermatitis lasišča, angiomi in seboroične veruke
812018-8	Folikulitis
3112018-4	Asteatotični dermatitis, alopecia areata

Priloga 2: Identifikacijsko število, spol, koncentracija in % odmerka infliksimaba sodelujočih bolnikov v raziskavi.

Identifikacijsko število	Spol (1 - M, 2 - Ž)	% standardnega odmerka (5 mg/1 kg/8 tednov)	Koncentracija infliksimaba (µg/mL)
512018-1	1	235,29	>12
512018-2	1	101,27	2,64
512018-3	1	129,87	5,63
512018-4	2	242,42	>12
512018-6	1	273,50	2,81
812018-1	1	136,05	2,89

812018-2	2	150,94	8,12
812018-3	2	192,00	5,68
812018-4	1	121,90	4,62
812018-6	1	132,89	4,43
812018-7	1	152,38	3,88
812018-8	1	216,22	7,26
1012018-1	1	108,11	>12
1012018-2	2	177,78	3,82
1012018-3	2	193,70	>12
1012018-4	1	150,54	>12
1012018-5	2	171,43	11,21
1212018-1	1	282,35	>12
1212018-2	1	133,33	6,8
1212018-3	1	207,79	6,29
1212018-5	2	222,22	>12
1212018-6	2	285,71	8,01
1212018-7	1	69,93	2,11
1212018-8	1	292,68	>12

1512018-1	2	244,90	>12
1512018-2	1	222,22	>12
1512018-3	1	160,64	9,75
1512018-4	1	329,41	7,94
1512018-5	2	148,15	>12
1712018-1	1	141,18	5,69
1712018-2	1	213,33	9,11
1712018-3	1	134,45	8,13
1712018-4	1	116,28	>12
1712018-5	1	147,06	>12
1712018-6	2	228,57	>12
1712018-7	1	219,18	8,02
1712018-8	1	0	2,02
1712018-9	2	230,77	8,74
1712018-10	1	132,51	5,66
1912018-1	1	173,91	1,77
1912018-2	2	142,86	>12
1912018-3	1	272,73	>12

1912018-4	2	106,67	7,64
1912018-5	1	141,18	2,67
1912018-6	1	337,35	>12
1912018-7	1	168,42	10,37
1912018-8	1	177,78	1,81
2212018-1	2	197,04	>12
2212018-2	1	111,11	7,71
2212018-3	1	211,92	>12
2212018-4	2	369,23	11,25
2412018-1	2	161,29	5,48
2412018-2	2	177,78	5,67
2412018-4	2	123,08	8,6
2412018-5	1	96,77	8,15
2412018-6	2	213,33	5,33
2412018-7	2	109,59	>12
2412018-8	1	76,92	7,92
2412018-9	2	179,10	6,16
2412018-10	1	341,33	2,6

2412018-11	2	142,86	>12
2412018-12	2	177,78	>12
2412018-13	2	113,21	>12
2412018-14	2	123,08	10,35
2412018-15	2	83,33	>12
2612018-1	1	156,86	>12
2612018-2	2	240,00	>12
2612018-3	1	335,33	>12
2612018-4	2	202,53	>12
2612018-5	1	192,77	5,42
2612018-6	2	225,99	>12
2612018-7	2	212,12	>12
2612018-8	2	126,98	>12
2612018-9	1	140,00	>12
2612018-10	1	104,85	7,29
2612018-11	2	255,71	8,22
2612018-12	2	307,69	>12
2912018-1	1	300,00	>12

2912018-2	2	113,21	6,87
2912018-3	2	163,27	10,89
2912018-4	1	222,22	7,98
2912018-5	2	229,89	7,8
2912018-6	2	417,91	>12
2912018-7	2	280,70	>12
2912018-8	2	200,00	2,34
2912018-9	2	228,57	>12
3112018-1	1	111,11	9,12
3112018-2	1	219,61	5,89
3112018-3	2	156,86	11,26
3112018-4	2	181,82	8,88
3112018-5	1	86,49	4,19
3112018-6	1	200,00	>12
3112018-7	1	144,93	9
3112018-8	1	200,00	6,3
3112018-9	1	205,13	9,61
3112018-10	1	117,07	5,36

222018-1	2	357,14	>12
222018-2	2	219,18	>12
222018-3	1	388,89	>12
222018-4	1	125,00	>12
522018-1	2	304,76	>12
522018-2	1	328,21	>12
722018-1	2	123,08	>12
722018-2	1	120,00	6,92
722018-3	1	117,65	11,07
722018-4	1	97,56	11,55
722018-5	2	114,29	9,49
722018-6	1	125,00	3,99
722018-7	1	270,42	>12
722018-8	1	95,52	1,49
922018-1	1	192,77	5,71
922018-2	1	114,29	3,4
922018-3	1	166,67	4,77
922018-4	2	222,22	>12

922018-5	2	90,91	6,1
922018-6	2	184,62	9,39
922018-7	2	108,47	<0,5
922018-8	1	120,48	4,37
922018-9	1	259,26	>12
922018-10	1	163,27	5,89
922018-12	2	103,45	7,4
922018-13	2	207,41	>12
1222018-1	1	141,18	0,5
1222018-2	2	111,11	>12
1222018-3	2	0	0,5
1222018-4	2	121,21	>12
1222018-5	2	156,86	>12
1422018-1	2	120,00	3,09
1422018-2	2	196,72	8,73
1422018-3	1	147,47	4,87
1422018-4	1	170,67	9,45
1422018-5	1	121,21	6,49

1422018-6	1	135,92	6,51
1422018-7	1	107,53	>12
1422018-8	1	117,65	9,87
1422018-9	2	121,21	9,1
1422018-10	2	217,69	4,96
1422018-11	1	106,67	9,43
1422018-12	1	146,12	6,76
1422018-13	2	202,02	5,69
1422018-14	1	262,30	10,78
1422018-15	1	83,33	5,13
1422018-16	1	253,97	8,61
1422018-17	1	93,75	6,7
1622018-1	1	216,22	1,47
1622018-2	1	106,67	7,89
1622018-3	2	256,41	7,11
1922018-1	2	91,95	4,64
1922018-2	2	150,94	>12
1922018-3	1	73,17	5,97

1922018-4	1	102,56	9,16
2122018-1	2	210,99	6,74
2122018-2	1	169,49	>12
2122018-3	1	129,87	4,62
2122018-4	2	118,52	3,71
2122018-5	2	103,90	5,67
2122018-6	1	76,19	4,04
2322018-1	1	103,09	1,37
2322018-2	1	96,39	6,61
2322018-3	1	188,24	8,45
2322018-4	2	175,00	3,3
2322018-5	1	102,56	2,81
2822018-1	2	137,93	7,73
2822018-2	2	166,67	4,41
2822018-3	1	117,65	7,97
2822018-4	1	187,50	7,63
2822018-5	2	153,85	6,41
232018-1	2	85,33	0,5

232018-2	1	97,56	3,02
232018-1	2	114,29	4,33
232018-2	2	126,58	5,56