

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Медицински факултет - Скопје

Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со  
токсикологија



**ОДРЕДУВАЊЕ НА ЕНЗИМСКА АКТИВНОСТ НА  
ТИОПУРИН МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА И КОНЦЕНТРАЦИЈА  
НА 6-ТИОГВАНИН И 6-МЕТИЛ МЕРКАПТОПУРИН КАЈ  
ПАЦИЕНТИ СО ВОСПАЛИТЕЛНИ ЦРЕВНИ  
ЗАБОЛУВАЊА ТРЕТИРАНИ СО АЗАТИОПРИН**

**- докторска дисертација -**

**Ас. д-р Кристина Б. Павловска**

**Ментор**

**Проф. д-р Маја Сланинка Мицеска**

**Коментор**

**Проф. д-р Петранка Мишевска**

**Скопје, 2015**

## **Изјава од авторот**

---

*Јас, Кристина Б. Павловска, изјавувам дека сум автор на докторската теза под наслов „Одредување на ензимска активност на тиопурин метилтрансфераза и концентрација на 6-тиогванин и 6-метил меркаптопурин кај пациенти со воспалителни цревни заболувања третирани со азатиоприн“, изработена под менторство на проф. д-р Маја Сланинка Мицеска и коментор проф. д-р Петранка Мишевска. Користената литература во трудот е означена со соодветни референци и библиографија. Свесна сум дека секој вид плагијат може да влијае врз оценката на овој труд и звањето произлезено со неговата одбрана.*

*Скопје, 2015 година*

*Кристина Б. Павловска*

## БЛАГОДАРНОСТ

Неизмерно се заблагодарувам на мојот ментор **проф. д-р Маја Сланинка-Мицеска** за вербата во мене и безрезервната поддршка при остварувањето на мојата замисла.

Посебна благодарност на мојот коментор **проф. д-р Петранка Мишевска**, која од самиот почеток учествуваше во одредувањето на темата за докторската теза. Благодарение на мојата професорка, јас ја засакав гастроентерохепатологијата. Проф. Мишевска, ви благодарам за сите корисни совети, насоки и размислувања. Вашето знаење, однос и љубов кон пациентите ќе ми останат како пример што значи да се биде добар доктор.

Посебна благодарност до **проф. д-р Људмила Ефремовска** за несебичната помош, за големото знаење и разбирање, за корисните совети и искреното пријателство во текот на мојата работа.

Голема благодарност на рецензентите на овој труд, **проф. д-р Мирко Крстевски, проф. д-р Сузана Трајковиќ-Јолевска, проф. д-р Трајан Балканов и проф. д-р Димче Зафиров**, за корисните совети во текот на мојата работа.

Искрено се заблагодарувам на колегите од Клиниката за гастроентерохепатологија, **д-р Владимир Андреевски** и **д-р Владимир Аврамовски**, на колегијалноста и соработката при собирањето на материјалот.

Учеството на **проф. д-р Весна Велиќ-Стефановска** во контролата на статистичките резултати придонесе овој труд да добие вистинска научна тежина.

Благодарност до **доц. д-р Јасмина Тониќ-Рибарска** чија професионална помош придонесе за реализирањето на овој труд.

***На мојата единствена мајка***

## АПСТРАКТ

**Наслов:** Одредување на ензимска активност на тиопурин метилтрансфераза и концентрација на 6-тиогванин и 6-метил меркаптопурин кај пациенти со воспалителни цревни заболувања третирани со азатиоприн

**Автор:** Кристина Павловска

**Институција:** Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Медицински факултет, Скопје

**Цели:** Тиопурин метилтрансфераза (ТРМТ) ензимот е најчесто истражуван и вообичаено рутински одредуван во клиничката пракса кај пациентите со воспалителни цревни заболувања (ВЦЗ) кои се на терапија со азатиоприн (AZA). Со следење на концентрацијата на активните метаболити на AZA, 6-тиогванин нуклеотид (6-TGN) и 6-метил меркаптопурин (6-MMP), тиопуринскиот третман може да се прилагоди и индивидуализира, како и да се минимизираат неговите несакани дејства.

**Материјал и методи:** Во оваа студија беа вклучени 63 пациенти со ВЦЗ [45 со Кронова болест (КБ); 18 со улцерозен колитис (УК)], и тоа: испитаници кај кои постоеше индикација за воведување на AZA терапија, испитаници кои веќе беа поставени на AZA терапија како и испитаници кои претходно биле поставени на терапија со AZA, но заради некоја причина престанале да ја примаат. Одредувањето на ТРМТ ензимот беше со ELISA метод, според кој пациентите беа поделени во три подгрупи: пациенти со ниска активност (<5,0 U/ml Ег), пациенти со средна активност (5,0-13,7 U/ml Ег) и пациенти со нормална или висока активност на ензимот (>13,8 U/ml Ег). Секоја од гореспоменатите подгрупи беше анализирана во однос на: концентрацијата на создадени метаболити, 6-TGN и 6-MMP (само кај пациентите кои во моментот примаат AZA, одредувани со high performance liquid chromatography); терапевтскиот одговор и пријавените несакани дејства.

**Резултати:** Просечната вредност на ТРМТ ензимот во целиот примерок изнесуваше 18,49 U/mL Ег ± 8,27 U/mL Ег (мин. 1,9 U/mL Ег, макс. 35,8 U/mL Ег). 69,84% од пациентите беа со нормална или висока ТРМТ активност, 25,4% со средна ензимска активност, додека 4,76% беа со ниска

ензимска активност. Кај пациентите кај кои беше регистрирано несакано дејство, за  $p < 0,05$  имаше сигнификантно пониска просечна вредност на активноста на ТРМТ ензимот споредено со оние кај кои не беше регистрирано несакано дејство (13,96 U/mL  $E_r \pm 8,69$  U/mL  $E_r$  v.s. 18,43 U/mL  $E_r \pm 7,22$  U/mL  $E_r$ ). Најголем процент од пациентите со несакани дејства беа од групата со ниска активност на ТРМТ ензимот, потоа следуваа пациентите со средна активност на ТРМТ ензимот, а најмал процент од пациентите беа со нормална или висока активност на ТРМТ ензимот (50% v.s. 18,38% v.s. 15,38%) ( $p > 0,05$ ). Најголем процент од пациентите кои постигнаа ремисија беа со нормална или висока активност на ТРМТ ензимот (65,38%) ( $p > 0,05$ ).

Просечната вредност на концентрацијата на 6-TGN беше 437,46 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r \pm 198,82$  pmol/8x10<sup>8</sup> (мин. 64,8 pmol/8x10<sup>8</sup>, макс. 905,5 pmol/8x10<sup>8</sup>). Со зголемување на активноста на ТРМТ се забележа намалување на концентрацијата на 6-TGN ( $R = -0,3632$ ). Најголем процент од пациентите (18,75%) со несакани дејства беа со висока концентрација на 6-TGN, а по нив следуваа групата на терапевска концентрација (14,29% од пациентите). Ниеден од пациентите кои според вредностите на 6-TGN припаѓаше на суптотераписка концентрација не пријави несакано дејство. Со зголемување на концентрацијата на 6-TGN, несигнификантно се забележа зголемување на веројатноста за ремисија ( $R = 0,0819$ ).

Просечната вредност на концентрацијата на 6-MMP беше 6497,87 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r \pm 7462,02$  pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$  (мин. 283,3 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$  и макс. 31324,4 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$ ). Со зголемување на активноста на ТРМТ несигнификантно се забележа зголемување на концентрацијата на 6-MMP ( $R = 0,3431$ ).

Пациентите кај кои имаше несакано дејство имаа повисока просечна вредност на концентрацијата на 6-MMP во споредба со оние кои немаа несакани дејства (7592,92 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r \pm 7534,19$  pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$  v.s. 6295,08 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r \pm 7575,19$  pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$ ) ( $p > 0,05$ ). Кај 50% од пациентите во групата со несакани дејства просечната вредност на концентрацијата на 6-MMP беше над 5877 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$ , во споредба со групата каде немаше несакани ефекти и каде вредноста беше над 2891 pmol/8x10<sup>8</sup>  $E_r$  кај 50% од пациентите.

**Заклучок:** Заболениите со ВЦЗ кои имаат ниска ТРМТ ензимска активност се изложени на зголемен ризик од развој на несакано дејство по примена на терапија со азатиоприн. Речиси идентична корист од примената на AZA покажаа групите со средна, односно нормална или висока ТРМТ активност (54,55% v.s 65,38%). Најголем процент од пациентите со несакани дејства се со висока концентрација на AZA - метаболитите и тоа, 6-TGN >400 pmol/8x10<sup>8</sup> Eг и 6-MMP >5700 pmol/8x10<sup>8</sup> Eг.

**Клучни зборови:** воспалителни цревни заболувања, азатиоприн, 6-тиогванин нуклеотид, 6-метилмеркаптопурин

## ABSTRACT

**Title:** Assessment of thiopurine methyltransferase enzyme activity and concentration of 6-thioguanine nucleotide and 6-methyl mercaptopurine in inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine

**Author:** Kristina Pavlovska

**Institution:** Department of preclinical and clinical pharmacology and toxicology, Medical faculty, Skopje

**Objectives:** Thiopurine methyltransferase (TPMT) is the most frequently analyzed enzyme, and usually routinely assessed in clinical practice in patients with inflammatory bowel disease (IBD) receiving azathioprine (AZA) therapy. By monitoring the concentration of active metabolites of AZA, 6-thioguanine-nucleotide (6-TGN) and 6-Methylmercaptopurine (6-MMP), the thiopurine treatment can be adjusted and personalized, and its adverse events minimized.

**Material and Methods:** This study included a total of 63 patients with IBD (45 with Crohn's disease (CD) and 18 with ulcerative colitis (UC): patients that had indication for treatment with AZA, patients treated with AZA at the moment of this study and patients that had used AZA in the past, but due to some reason they had stopped. TPMT assessment was done using the ELISA method, according to which patients were divided into three subgroups: patients with low enzyme activity (<5.0 U/ml Er), patients with intermediate enzyme activity (5.0-13.7 U/ml Er) and patients with normal or high enzyme activity (>13.8 U/ml Er). Each of these groups was then analyzed according to the concentration of the metabolites, 6-TGN and 6-MMP (only in patients currently receiving AZA, determined with high performance liquid chromatography); therapeutic response, and the adverse events (AEs).

**Results:** The mean value of TPMT enzyme in all patients was 18.49 U/mL Er  $\pm$  8.27 U/mL Er (min. 1.9 U/mL Er, max. 35.8 U/mL Er). 69.84% of patients had normal or high TPMT activity, 25.4% intermediate, while 4.76% had low enzyme activity. In patients who had AEs, a significantly lower mean value of TPMT enzyme was assessed in comparison with patients without AEs (13.96 U/mL Er  $\pm$  8.69 U/mL Er v.s. 18.43 U/mL Er  $\pm$  7.22 U/mL Er) ( $p < 0.05$ ). Most of the patients with AEs belonged to the group with low TPMT enzyme activity, followed by the group with intermediate activity and normal or high TPMT enzyme activity (50% v.s. 18.38% v.s.



15.38%, respectively) ( $p > 0.05$ ). The majority of patients who achieved remission belonged to the group with normal or high TPMT enzyme activity (65.38%) ( $p > 0.05$ ). The mean value of 6-TGN concentration was  $437.46 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 198.82 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  (min.  $64.8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ , max.  $905.5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ). As the TPMT activity was increasing, the concentration of 6-TGN was decreasing ( $R = -0.3632$ ). The largest percentage of patients with observed AEs had high 6-TGN concentration (18.75%), followed by the therapeutic group (14.29%). None of the patients who belonged to the sub-dosed group had AEs. As the concentration of 6-TGN was increasing, the remission rate was increasing, too ( $R = 0.0819$ ).

The mean value of 6-MMP was  $6497.87 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7462.02 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  (min.  $283.3 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ , max.  $31324.4 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ). As the TPMT activity was increasing, the concentration of 6-MMP was increasing, too ( $R = 0.3431$ ).

Patients with AEs had higher mean value of 6-MMP when compared to those who were without AEs ( $7592.92 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7534.19 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  v.s.  $6295.08 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7575.19 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ) ( $p > 0.05$ ). In 50% of patients in the group with AEs the mean value of 6-MMP concentration was  $>5877 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ , in comparison with the group without AEs, where it was  $>2891 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  in 50% of them.

**Conclusion:** Patients with IBD who have low TPMT enzyme activity are at an increased risk of developing AE after azathioprine treatment. Both, patients with intermediate and those with normal or high TPMT enzyme activity are more likely to achieve remission when using AZA (54.55% v.s. 65.38%). Most of the patients with AEs belonged to the group with high AZA metabolites levels, 6-TGN concentration  $>400 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  and 6-MMP  $>5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ .

**Keywords:** inflammatory bowel disease, azathioprine, 6-thioguanine nucleotide, 6-methyl mercaptopurine

## СОДРЖИНА

<b>1. ВОВЕД</b> .....	13
1.1. Инциденција и преваленцијата.....	15
1.2. Фактори на ризик за ВЗЦ.....	15
1.3. Клиничка слика и дијагноза.....	16
1.4. Екстраинтестинални манифестации.....	19
1.5. Терапија.....	20
<b>2. МОТИВ</b> .....	25
<b>3. ЦЕЛИ НА ИСТРАЖУВАЊЕТО</b> .....	26
<b>4. ОЧЕКУВАНИ РЕЗУЛТАТИ</b> .....	27
<b>5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ</b> .....	28
<b>5.1. Дизајн на студијата</b> .....	29
<b>5.2. Протокол на работа</b> .....	31
5.2.1. Клинички испитувања.....	32
5.2.2. Испитување на активноста на ТРМТ ензимот.....	32
5.2.3. Испитување на концентрација на 6-TGN и 6-MMP.....	32
5.2.4. Испитување на активноста на болеста.....	40
5.2.5. Следење на биохемиски параметри.....	40
5.2.6. Следење на несакани дејства.....	40
<b>6. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА</b> .....	41
<b>7. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	42
<b>7.1. Демографски карактеристики на пациентите</b> .....	43

## **7.2. Карактеристики на историја на болеста кај пациентите**

.....	47
7.2.1. Дескриптивна анализа на пациентите според почеток на болеста.....	47
7.2.2. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на болеста.....	48
7.2.3. Дескриптивна анализа на пациентите според локализацијата на болеста.....	50
7.2.4. Дескриптивна анализа на пациентите според оперативен третман.....	52
7.2.5. Дескриптивна анализа на пациентите според терапевски третман (претходен и сегашен).....	54
7.2.6. Дескриптивна анализа на пациентите според третманот со AZA.....	57
7.2.6. 1. Користење AZA.....	57
7.2.6. 2. Времетраење на терапија со AZA.....	59
7.2.6. 3. Причини за предвремено прекинување на терапијата со AZA.....	60
7.2.6. 4. Несакано дејство од примена на AZA.....	63
<b>7.3. Анализа на пациентите според анамнестички податоци за клиничка состојба.....</b>	<b>66</b>
<b>7.4. Анализа на пациентите според активноста на болеста по терапија со AZA.....</b>	<b>74</b>
<b>7.5. Анализа на пациентите според екстраинтестинални манифестации.....</b>	<b>77</b>
<b>7.6. Анализа на пациентите според биохемиски параметри.....</b>	<b>91</b>
<b>7.7. Истражувачки аспекти.....</b>	<b>112</b>
7.7.1. Доза на AZA при земање на крв.....	112

7.7.2. Алфа амилаза во серум по воведување на терапија со AZA.....	115
7.7.3. TPMT ензим.....	118
7.7.3.1. Вредности на TPMT ензимот според пол.....	118
7.7.3.2. Вредности на TPMT ензимот според клинички тип на болеста.....	120
7.7.3.3. Вредности на TPMT ензимот според пол при Кронова болест..	122
7.7.3.4. Вредности на TPMT ензимот според пол при улцерозен колитис.....	123
7.7.3.5. Вредности на TPMT ензимот според видови третман со AZA ..	125.
7.7.3.6. Активност на TPMT ензимот според несакани дејства.....	127
7.7.4. 6-TGN метаболит .....	131
7.7.4.1. Концентрација на 6-TGN според AZA.....	131
7.7.4.2. Концентрација на 6-TGN и активност на TPMT ензимот.....	133
7.7.4.3. Концентрација на 6-TGN според несакани дејства.....	134
7.7.4.4. Концентрација на 6-TGN и активност на болеста.....	136
7.7.5. 6-MMP метаболит.....	137
7.7.5.1. Концентрација на 6-MMP според AZA.....	137
7.7.5.2. Концентрација на 6-MMP и активноста на TPMT ензимот....	138
7.7.5.3. Концентрација на 6-MMP според несакани дејства.....	140
7.7.6. Доза на AZA, користење AZA и несакани ефекти.....	141
<b>8. ДИСКУСИЈА.....</b>	<b>145</b>
8.1. Демографски карактеристики.....	147
8.2. Екстраинтестинални манифестации (ЕИМ) кај заболени од ВЦЗ и употреба на AZA.....	150
8.3. Азатиоприн- несакани дејства, прекин на терапијата, терапевтски исход.....	151
8.4. Активност на TPMT ензимот кај заболени од ВЦЗ.....	155

8.5. Влијание на активноста на TPMT ензимот врз појавата на несакано дејство од примената на AZA.....	156
8.6. Влијание на активноста на TPMT ензимот врз терапевтскиот одговор кај заболениите со ВЦЗ.....	157
8.7. Улогата на 6-TGN метаболитот во развојот на несаканите дејства и терапевтскиот одговор кај заболениите од ВЦЗ третирани со азатиоприн.....	158
8.8. Влијанието на 6-MMP метаболитот врз развојот на несаканите дејства кај заболениите од ВЦЗ третирани со азатиоприн.....	162
<b>9. ЗАКЛУЧОЦИ.....</b>	<b>164</b>
<b>10. БИБЛИОГРАФИЈА.....</b>	<b>167</b>
<b>11. ПРИЛОЗИ.....</b>	<b>181</b>
<b>12. ЛИСТА НА СКРАТЕНИЦИ.....</b>	<b>187</b>

**ВОВЕД**

## 1. ВОВЕД

Воспалителните цревни заболувања (ВЦЗ), во литературата на англиски јазик “Inflammatory Bowel Disease” (со општо прифатена кратенка IBD), претставуваат група на заболувања со непозната етиологија, хроничен тек и чести релапси. Во оваа група спаѓаат Кроновата болест (КБ), улцерозниот колитис (УК) и недетерминираниите ВЦЗ.

Се нарекуваат болести на развиениот свет, на индустријализираните земји или едноставно урбани болести (40).

КБ за првпат е откриена од страна на германскиот хирург Wilhelm Fabry во 1623 година, а подоцна опишана од американскиот лекар Burril B. Crohn, по кого е и наречена. УК за првпат е опишан од британскиот лекар Sir Samuel Wilms во 1859 година.

ВЦЗ имаат големо влијание врз социјалниот, економскиот и здравствениот квалитет на живот, како на пациентите така и на нивните фамилии (28,93,136).

Европската федерација на Кронова болест и улцерозен колитис (EFCCA) претставува организација со 27 европски земји членки, чијашто главна цел е да изврши влијание на владите во Европа да го подобрат здравствениот систем и квалитетот на грижата кај заболениите од ВЦЗ, што најдобро би се постигнало преку заедничка соработка помеѓу пациентите и здравствените работници. Од особена важност е владите на земјите да препознаат дека најголемите трошоци за заболениите од ВЦЗ не потекнуваат од терапијата и деновите поминати во болница, туку од намалената продуктивност на овие заболени кога работната способност им е намалена. Цената која би се издвоила за нова терапија би била еднаква како за зголемување на вработеноста и намалување на трошоците за социјална нега (59).

## 1.1. Инциденција и преваленција

Голем број студии кои ја следат инциденцијата на ВЦЗ покажуваат нејзино зголемување не само во Северна Европа (КБ:  $7,0/10^5$ ; УК:  $11,8/10^5$ ), туку и во јужните делови на континентот (КБ:  $3,9/10^5$ ; УК:  $8,7/10^5$ ) (72,115,117). Во класичните описи, тоа е болест на поразвиениот север и запад, со таканаречен северно-јужен градиент (72,115).

Истовремено, извештаите кои доаѓаат од земјите од Африка, Јужна Америка ( $2,2/10^5$ ) и Азија ( $1,0/10^5$ ) покажуваат дека, иако инциденцијата и преваленцијата на ВЦЗ кај нив е сè уште ниска во споредба со Европа и Северна Америка (КБ:  $3,1-14,6/10^5$ ; УК:  $6,0-14,3/10^5$ ), сепак забрзано се зголемува (1,49,58,62,72,73,74,110,112,114,119,124).

Во литературата што ни беше достапна за македонската популација до сега, инциденцијата на ВЦЗ бележи пораст во периодот од 2003-2007 год., споредено со податоците до 2002 год. (КБ:  $0,48/10^5$ , УК:  $0,76/10^5$ ), и тоа пораст на инциденцијата на УК ( $2,63/10^5$ ) и отсуство на скок на инциденцијата кај КБ ( $0,85/10^5$ ) (131,133).

Овие епидемиолошки резултати се неопходни за контрола и лекување на пациентите со ВЦЗ како и за планирање на адекватен здравствен систем.

## 1.2. Фактори на ризик за ВЗЦ

ВЦЗ се јавуваат како резултат на интеракција помеѓу генетските фактори и факторите од околината, доведувајќи до абнормален имун одговор на интестиналната мукоза кон интралуминалните антигени (3,11,13).

Како што коменсалните микроорганизми влијаат врз созревањето и функционирањето на имуниот систем во периодот на ембрионалниот развој, така и нивното нарушување може да има влијание врз имунолошкиот систем



во детството и по него. Промените на гастроинтестиналните микроорганизми може да бидат поврзани со модерната исхрана и со седечкиот начин на живот (112).

ВЦЗ честопати се јавуваат по некоја гастроинтестинална инфекција, па кај овие пациенти најчесто постојат повисоки концентрации на мукозни бактерии во споредба со здравата популација (8).

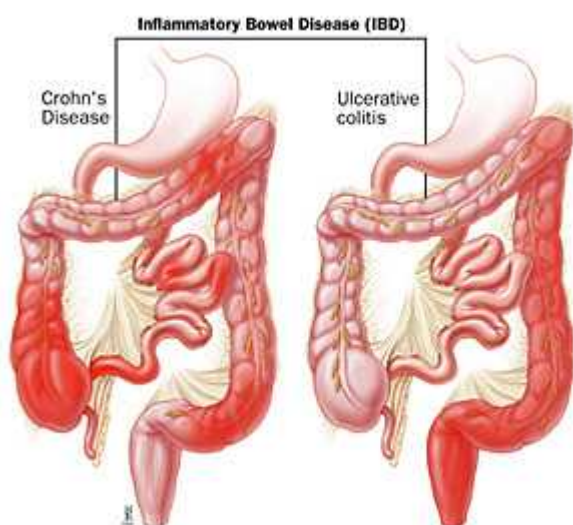
Најновите теории наведуваат дека причина за појава на ВЦЗ е нарушен мукозен одговор на сè уште доволно непознат микроорганизам, којшто се јавува во нормален интестинален систем кај генетски погоден организам (95).

### 1.3. Клиничка слика и дијагноза

Не постои патогномонична особина ниту карактеристика или симптом за КБ или УК. Поради големиот број неспецифични особини, дијагнозата за класичен УК или КБ се базира врз спектар од клиничко-патолошки особини (15,75,103,116,135).

#### 1. Локализација на патолошката промена кај КБ и УК:

- на слика 1 со потемна црвена боја е даден приказ на најчестата локализација на патолошкиот процес кај КБ и УК



Слика 1. КБ и УК

(Преземено од: [http://www.hopkinsmedicine.org/Press\\_releases/2003/12\\_19\\_03c.html](http://www.hopkinsmedicine.org/Press_releases/2003/12_19_03c.html))

Клиничката слика се манифестира со интестинални и екстраинтестинални симптоми. Од интестиналните најчести се:

- за **Кроновата болест**: дијареа, абдоминална болка, температура, намалување на телесната тежина;
- за **улцерозниот колитис**: црвено ректално крвавење, ургентност за дефекација, водени дијареи, висока фреквентност на дефекација, мал волумен на испразнета содржина, тенезми, зголемена секреција на мукус со столицата и појава на абдоминална тегоба (133).

Во следните табели се прикажани разликите кои постојат помеѓу заболениите од КБ и УК.

## 2. Клинички карактеристики на КБ и УК

Наод	КБ	УК
<b>Крвави испразноци</b>	Ретко	често
<b>Абдоминална болка</b>	често	често
<b>Зафаќање на ректум</b>	ретко	секогаш
<b>Проксимално ширење</b>	дисконтинуирано	континуирано
<b>Зафаќање на колон</b>	деснострано	левострано
<b>Зафаќање на терминален илеум</b>	често	Нема

3. *Компликации*

<b>Наод</b>	<b>КБ</b>	<b>УК</b>
<b>Фистули, апсцеси</b>	Често	ретко
<b>Перианална болест</b>	Често	ретко
<b>Токсичен мегаколон</b>	Ретко	често

4. *Ендоскопски и хистолошки наод*

<b>Наод</b>	<b>КБ</b>	<b>УК</b>
<b>Афтозни промени</b>	Често	ретко
<b>Надолжни улкуси</b>	Често	ретко
<b>Инфламација</b>	трансмурална	мукозна
<b>Грануломи</b>	Присутни	нема

5. *Рендгенолошки наод*

<b>Наод</b>	<b>КБ</b>	<b>УК</b>
<b>Контрастна снимка</b>	асиметрични промени	симетрични промени
<b>Сегментни промени</b>	секогаш, т.н. „лезија на прескок”	нема, промените се во континуитет

## 1.4. Екстраинтестинални манифестации

Екстраинтестиналните манифестации може да им претходат на цревните симптоми, може да се јават истовремено со цревните симптоми или да се јават како компликација по долгогодишен тек на болеста. На слика 2 се прикажани најчестите компликации кај овие болни (104,134,135).

### **Зглобни манифестации**

Периферен артритис  
 Анкилозирачки спондилитис  
 Сакроилиитис  
 Остеомалација/остеопороза  
 Калциум и витамин Д малапсорпција при КБ,  
 Употреба на кортикостероиди  
 Еритема нодозум  
 Пиодерма гангренозум  
 Слезнички лезии

### **Кожни манифестации**

### **Очни манифестации**

Иритис  
 Увеитис  
 Еписклеритис

### **Хепатобилијарни манифестации**

Склерозантен холангитис  
 Стеатоза на црн дроб  
 Холелитијаза (кај КБ)

### **Бубрежни манифестации**

Калциумоксалатни камења кај КБ  
 Хидронефроза (од уретерална опструкција кај КБ)



**Слика 2: Екстраинтестинални манифестации**

(Преземено од : [http://www.health-writings.com/fistulizing-crohn-disease\\_4281/](http://www.health-writings.com/fistulizing-crohn-disease_4281/))

## 1.5. Терапија

Најчесто применувани лекови во третманот и превенцијата на ВЦЗ се аминсалицилатите, кои со своето анти-инфламаторно дејство се ефикасни во третманот на акутната фаза од болеста. За одржување на фазата на ремисија се користат кај УК. Кортикостероидите се ефикасни во третманот на средните до тешки форми на ВЦЗ, но не и за одржување на ремисијата. Современиот пристап во лекувањето на резистентните форми на КБ препорачува употреба на имуносупресиви во комбинација со инфликсимаб, моноклонално анти-TNF-alpha антителио (6,29).

Кај пациентите со КБ кои имаат фистула, препорачана е терапија со антибиотици, имуносупресиви или инфликсимаб, како и хируршки третман (7,9,17,64,98,111).

Улогата на имуниот систем во развојот на ВЦЗ доведува до употреба на имуномодулаторна терапија онаму каде постои кортикостероидна зависност или резистентност, подолго времетраење на акутната фаза од болеста и фистули (126).

Имуномодулаторната терапија како поевтина терапевска опција во однос на биолошката терапија е широко прифатена како од страна на лекарите, така и од страна на пациентите.

Прва линија на имуномодулатори кои се користат во терапијата на ВЦЗ се азатиоприн (AZA) и меркаптопурин, со докажана ефикасност во индукција на фазата на ремисија кај пациентите со КБ, како и нејзино одржување кај заболените со КБ и УК (108,115,126).

Кај повеќе од 60% од заболените со КБ е забележана употреба на AZA во некој период од заболувањето (115). При администрација на AZA, вообичаено паралелно се даваат и кортикостероиди, кој понатаму се намалуваат, додека дозата на AZA се зголемува се до постигнување на терапевтскиот ефект (6,29).

AZA и неговиот метаболит 6-меркаптопурин (6-MP) претставуваат пурински аналози коишто доведуваат до инхибиција во процесот на биосинтеза и вградување на пуринските нуклеотиди во клетките за време на митозата (35,88,113,117).

По орална администрација, AZA се апсорбира како пролек којшто брзо се трансформира во 6-MP во еритроцитите и ткивата, преку реакцијата со глутатион. Полуживотот во плазма на 6-MP е многу краток, од еден до два часа. Метаболизмот на 6-MP вклучува три конкурентивни патишта (35):

1. 6-MP со помош на хипоксантин-гванин-фосфорибозил трансфераза преминува во тиоинозинска киселина, а потоа во 6-тиогванин нуклеотид (6-TGN), којшто се смета дека е главната компонента одговорна за имуносупресивното дејство на AZA.
2. Тиопурин-С-метил трансфераза (TPMT) го трансформира 6-MP во метил дериват, 6-метил меркаптопурин (6-MMP), делумно одговорен за токсичното дејство (хепатична токсичност). Цитоплазматската активност на TPMT е генетски детерминирана.
3. Ензимот ксантин-оксидаза (ХО) го трансформира 6-MP во 6-тиоурична киселина (неактивен метаболит) којшто се елиминира преку бубрезите и може да биде инхибиран од алопуринол.

Препорачана дневна доза на AZA според препораките од земјите од Западна Европа и Американската гастроентеролошка асоцијација е 2-3 mg/kg/тт, додека Европската организација на КБ и УК (ЕССО) препорачува 1,5-2,5 mg/kg/тт (67).

Активните метаболити на AZA поседуваат проапоптотични својства, особено за CD 4<sup>+</sup> лимфоцити (1). 6-TGN како активен метаболит се вградува во ДНК преку врзување со Ras-1 рецепторите и на тој начин доведува до апоптоза на пролиферативните клетки и инхибиција на T-клеточна активација (115).

Најчесто истражуван ензим и вообичаено рутински одредуван во клиничката пракса кај пациентите кои примаат AZA е тиопурин метилтрансфераза (TPMT). Вродените варијации во активноста на TPMT се особено важни во одредувањето на индивидуалните разлики помеѓу пациентите, како во однос на терапевтските, така и во однос на токсичните ефекти од употребата на AZA (2,4).

Според препораките на Британската асоцијација на гастроентерохепатолози, преку одредување на активноста на TPMT ензимот, би можело да се открие 1 од 300 пациенти кој би имал дефицит на овој ензим (79).

Американската федерална агенција за лекови препорачува одредување на TPMT ензимот пред започнување на терапија со тиопурини (122). Во Европа, одредувањето на активноста на TPMT пред започнување на тиопуринската терапија се воведува како рутинска пракса (55,100,101).

Вродените варијации во активноста на TPMT влијаат врз создавањето на активните 6-TGN метаболити по администрација на AZA или 6-MP (126).

Активноста на TPMT поседува тримодална дистрибуција во општата популација, и тоа: ниска активност ( $<5,0$  U/ml Er) со 0,3% застапеност; средна активност (5,0-13,7 U/ml Er) со 11,1% застапеност и нормална или висока активност ( $>13,8$  U/ml Er) со 88,6% застапеност во општата популација (2).

Заболените кои имаат средна TPMT ензимска активност би имале најголема терапевтска корист од администрацијата на AZA/6-MP (34).

Висока TPMT ензимска активност создава ниски вредности на 6-TGN метаболити, а со тоа и послаб терапевтски одговор на стандардни дози од AZA. Од друга страна, ниска активност на TPMT ензимот доведува до создавање на повисока концентрација на 6-TGN метаболити, подобар терапевтски одговор, но и до појава на миелосупресија (16,126).

Од друга страна, повисока концентрација на 6-TGN метаболити ( $235-450 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ) е поврзана со подобрување на активноста на болеста, а со тоа и поголема терапевтска ефикасност (30,38).

Вредности на 6-TGN метаболити поголеми од  $450 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  се поврзуваат со зголемен ризик од појава на несакани дејства (миелотоксичност и нодуларна регенеративна хиперплазија на хепар), без зголемување на ефикасноста (52).

Според *Pierre-Nicolas d'Halluin* (35),  $6\text{-TGN} > 235 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ , два месеца по започнување на терапија со AZA е значајно поврзан со ремисија кај 70% од заболените со КБ.

Кај пациентите кај кои постои доминатна метилација и прекумерно создавање на 6-MMP, концентрацијата на 6-TGN е ниска. Оваа состојба може да се надмине со намалување на дозата на AZA за 50-70% и додавање на алопуринол (50-100 mg/дн) во терапијата кај овие заболени. Кај секој заболен постои индивидуална варијација во трите компетитивни патишта. Дозирањето на AZA според телесната тежина не е доволно, бидејќи голем дел од заболените може да бидат предозирани или хиподозирани (115).

Активноста на TPMT може да биде инхибирана при коадминистрација на препарати на 5-аминосалицилна киселина, ацетилсалицилна киселина или фуросемид заедно со AZA. Исто така, коадминистрација на AZA и инфликсимаб доведува до значајно зголемување на концентрацијата на 6-TGN и леукопенија, 1-3 недели од првата инфузија со anti-TNF alpha препаратот (67).

Покачени концентрации на 6-MMP ( $>5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ) се поврзани со појава на хепатотоксичност (16,34).

Со следење на концентрацијата на 6-TGN може да се прилагоди и индивидуализира тиопуриинскиот третман, како и да се минимизираат неговите несакани дејства (11,34,).



Мерењето на концентрацијата на 6-TGN е успешна алатка за откривање на заболени кои не реагираат позитивно на терапијата, кои се субоптимално дозирани и кај кои постои преодминантна метилација. Исто така, 6-TGN концентрацијата може да предвиди дозно-зависна токсичност, со која несаканите ефекти би се избегнале (30,34,115).

Американската гастроентеролошка асоцијација и Европското здружение на КБ и УК препорачуваат мерење на концентрација на 6-TGN кај пациентите кои не реагираат на тиопуринска терапија (115).

Следењето на концентрацијата на метаболитите на AZA може да биде корисно за откривање на пациенти кои не реагираат на специфичната терапија, како и за идентификување на алтернативни стратемиски третмани (83).

Метаболитите може да се проверуваат рутински по неколку недели од започнувањето на терапијата за да се модифицира дозата или пак по три месеци, кога се очекува целосна тераписка ефикасност, а истата недостига (34).

Според *Gearry RB и сор.* (2005), кај заболениите од ВЦЗ кои остануваат во акутна фаза и покрај континуираната AZA терапија, најкорисно е определување на тиопуринските метаболити по 6 месеци од започнувањето на терапијата (45).

Националниот центар за следење на пациентите со ВЦЗ во Р. Македонија се наоѓа на Универзитетската клиника за гастроентерохепатологија при Медицинскиот факултет во Скопје. До сега, кај пациентите кои имаат потреба од воведување на имуномодулаторна терапија не е одредувана активноста на TPMT ензимот, ниту пак концентрацијата на активните метаболити во текот на третманот со AZA.

## **2. МОТИВ**

До сега, сè уште не е познато дали мерењето на активноста на ТРМТ ензимот или создадените метаболити долгорочно го подобруваат клиничкиот исход кај заболените од ВЦЗ кои се на континуирана терапија со AZA, како во однос на ефикасноста, така и во однос на безбедноста. Какво ќе биде влијанието на следењето на активноста на ТРМТ ензимот, односно метаболитите врз понатамошните терапевтски одлуки кај овие заболени, беше основен мотив за ова истражување.

### **3. ЦЕЛИ НА ТРУДОТ**

1. Да се одреди активноста на TPMT ензимот кај заболените од ВЦЗ кај кои постоеше индикација за воведување на терапија со AZA
2. Да се одреди активноста на TPMT ензимот кај заболените од ВЦЗ кои веќе примаа AZA
3. Да се одреди активноста на TPMT ензимот кај заболените од ВЦЗ кои примале AZA во минатото, но заради некоја причина престанале
3. Да се одреди концентрацијата на 6-TGN и 6-MMP (метаболити на AZA) кај заболени од ВЦЗ кои беа поставени на терапија со AZA
4. Врз база на добиените резултати за активноста на TPMT ензимот и концентрацијата на 6-TGN и 6-MMP да се селектираат пациентите со ВЦЗ кои би имале најголема корист од AZA терапија
5. Да се направи корелација помеѓу нивото на концентрациите на 6-TGN и 6-MMP во однос на евентуалните несакани дејства кои би можеле да се појават во текот на истражувањето.

## 4. ОЧЕКУВАНИ РЕЗУЛТАТИ

1. Се очекува заболениите кои имаат средна TPMT ензимска активност да имаат најголема терапевтска корист од администрација на AZA/6-MP.
2. Се очекува повисоката концентрација на 6-TGN метаболити да биде поврзана со намалување на активноста на болеста, а со тоа и поголема терапевтска ефикасност.
3. Методот кој се користи за определување на ензимската активност на TPMT да се воведи како рутинска постапка кај сите заболени од ВЦЗ пред да се примени терапија со AZA.
4. Се очекува резултатите од ова истражување да помогнат за поадекватно, индивидуално дозирање на терапевтската доза од AZA кај овие заболени.
5. Се очекува резултатите од ова истражување да помогнат во подобрувањето на квалитетот на живот кај овие заболени.

## **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ**

## 5. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

### 5.1. Дизајн на студијата

Истражувањето претставува отворена, аналитичко-проспективна клиничка студија спроведена во период од една година (2014/2015). Во истражувањето е опфатен примерок од испитаници кои се дефинирани како пациенти со ВЦЗ, и тоа: испитаници кај кои постоеше индикација за воведување на AZA терапија, испитаници кои веќе беа поставени на AZA терапија како и испитаници кои претходно биле поставени на терапија со AZA, но заради некоја причина престанале истата да ја примаат. Дозирањето на AZA беше индивидуално во зависност од одговорот на терапијата и толеранцијата на пациентот, и тоа: 1 mg/kg на ден во тек на 6 - 8 недели; а по потреба дозата се намалуваше на 0,5 mg/kg на ден или зголемуваше до максимум 5 mg/kg на ден, а потоа 1 - 3 mg/kg на ден за одржување на ремисија (132).

Истражувањето беше организирано и спроведено на следните локации: Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија при Медицински факултет-Скопје, Супспецијалистичката амбуланта за воспалителни цревни заболувања на Универзитетската клиника за гастроентерохепатологија (при Медицинскиот факултет во Скопје) и Фармацевтскиот факултет во Скопје.

#### 5.1.1. *Инклузиони критериуми за вклучување во студијата беа:*

- Испитаници со Кронова болест или улцерозен колитис кај кои постоеше индикација за воведување на терапија со AZA;
- Испитаници со Кронова болест или улцерозен колитис кои беа на терапија со AZA;
- Испитаници со Кронова болест или улцерозен колитис кои примале AZA претходно, но заради некоја причина ја прекинале;
- Испитаници од двата пола.

### **5.1.2. Критериуми за исклучување од студијата беа:**

- Неисполнување на еден од критериумите за вклучување;
- Испитаникот во кое и да е време доброволно го прекинал учеството во испитувањето;
- Испитаници кои примаат алопуринол.

НАПОМЕНА: критериумите за исклучување од студијата се идентични за двете испитувани групи.

### **5.1.3. Критериум за поделба по групи**

**Во однос на клиничкиот тип на болеста**, заболените со ВЦЗ беа поделени во 2 групи испитаници, и тоа:

- **Група А** - испитаници со Кронова болест (КБ)
- **Група Б** - испитаници со улцерозен колитис (УК)

Дијагнозата на различните клинички типови беше направена според стандардни клинички испитувања (18,19,130,135).

**Според активноста на ТРМТ ензимот**, секоја од испитуваните групи пациенти беше поделена во три подгрупи, и тоа (85):

- **Група 1** - заболени со ниска активност ( $<5,0$  U/ml Er)
- **Група 2** - заболени со средна активност (5,0-13,7 U/ml Er)
- **Група 3** - заболени со висока активност ( $>13,8$  U/ml Er)

Секоја од гореспоменатите подгрупи беше анализирана во однос на: 1) концентрацијата на создадени метаболити (6-TGN и 6-MMP); 2) терапевтскиот одговор, проценет преку Индексот за активност на КБ и Индексот за активност на УК; 3) лабораториски параметри и 4) пријавени несакани дејства.

#### **5.1.4. Етички аспект**

Испитувањето беше изведено во согласност со начелата на Хелсиншката декларација (Declaration of Helsinki; Hong Kong Amendment - September 1989). Од секој пациент, откако јасно и детално му беа предочени сите постапки во истражувањето, беше побарана писмена согласност за доброволно учество во истражувањето (прилог 5).

#### **5.2. Протокол на работа**

Кај секој пациент, со претходно дијагностицирана болест, беше спроведен следниот протокол на работа:

1. Во Супспецијалистичката амбуланта за воспалителни цревни заболувања на Клиниката за гастроентерохепатологија беа земени податоци за испитаникот по пат на анамнеза и беа пополнети потребните прашалници;
2. Беше извршен стандарден клинички преглед на пациентот;
3. Заради одредување на активноста на ТРМТ ензимот, од сите вклучени испитаници беше земен примерок од крв; при оваа посета кај испитаниците беше земена и крв за испитување на биохемиски параметри од интерес за болеста.
4. Кај пациентите кои во периодот на ова истражување најмалку 3 месеци беа поставени на терапија со AZA, дополнително беше земен примерок за одредување на концентрациите на 6-TGN и 6-MMP.

Во текот на ова истражување беа спроведени следните активности: а) анамнеза и клинички статус; б) испитување на активноста на ТРМТ ензимот; в) испитување на концентрацијата на 6-TGN и 6-MMP; г) испитување на активноста на болеста; д) одредување на биохемиски параметри и ѓ) следење на несакани дејства.



### **5.2. 1. Клинички испитувања**

Клиничките испитувања опфаќаа собирање на општи податоци (име и презиме, датум на земање на податоците, телесна тежина, сите лекови кои ги зема пациентот во моментот, претходна употреба на AZA, или причина за нејзино прекинување, локација на болеста (со евентуална хируршка ресекција) и медицински податоци од испитаникот (клинички преглед) (Прилог 1).

### **5.2. 2. Испитување на активноста на TPMT ензимот**

Одредувањето на активноста на TPMT ензимот во плазмата беше изведена со ELISA техника (16). За таа цел, беше земена крв во количина од 3-5 ml, со EDTA или хепарин како антикоагуланс. Во рок од 30 мин. по земањето, таа беше центрифугирана на 1000 x g, 15 мин. Потоа, плазмата беше издвоена и замрзната на -20 или -80°C сè до започнување на постапката за изведување на методот. За изведување на методот беше следено упатството од производителот "HumanThiopurineMethyltransferase (TPMT) ELISA Kit, My BioSource, USA (Прилог 2).

### **5.2. 3. Испитување на концентрација на 6-TGN и 6-MMP**

За да може метаболитите да постигнат steady-state концентрации во еритроцитите, потребни се најмалку 2 недели од почетокот на терапијата со AZA. По овој период, нивото на метаболитите во еритроцитите останува стабилно и постои мала дневна варијабилност помеѓу минималната и максималната концентрација, па затоа тие може да се мерат во кое било време (70).

Во ова истражување, нивото на метаболитите беше одредено по најмалку 3 месеци од почетокот на терапијата, бидејќи тоа е периодот потребен за да се постигне тераписки ефект (34). За таа цел, кај пациентите кои го исполнуваа овој критериум беше земена крв за мерење на концентрацијата на 6-TGN и 6-MMP во еритроцитите. Во продолжение е прикажан методот за определување на концентрациите на овие метаболити.

### **Потребни супстанции, реагенси и материјали**

- 6-метил мерпкаптопурин (6-MMP), стандардна супстанција, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA;
- 6-тиогванин (6-TGN), стандардна супстанција, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA;
- дитиотреитол (DTT), стандардна супстанција, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA;
- метанол, HPLC чистота, Merck, Darmstadt, Germany;
- фосфатен пуфер- pH 3.5, HPLC чистота, Merck, Darmstadt, Germany;
- перхлорна киселина, HPLC чистота, Merck, Darmstadt, Germany;
- HCl, HPLC чистота, Merck, Darmstadt, Germany;
- вода, HPLC чистота, TKA\_LAB, Niederelbert, Germany;
- Zorbax Eclipse XDB C18 колона, 150 x 4.5mm, 5  $\mu$ m (Agilent Technologies);
- еритроцити добиени од плазма од здрави доброволци (плазма без лек, за валидација на методот), и еритроцити добиени од плазма од пациенти кои се на терапија со азатиоприн.

### **Хроматографски услови**

Следните хроматографски услови беа исполнети:

**Апаратура:** Agilent 1100 HPLC систем, опремен со вакуум дегазер (G1322A Degasser), кватерна пумпа (G1311A QuantPump), автоматски инјектор (G1313A), термостат за колона (G1316A COLCOM), детектор (G1315B DAD), и ChemStation LC 3D софтвер за обработка на податоците.

Разделувањето на анализите беше изведено на Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,5 mm, 5  $\mu$ m (Agilent Technologies) колона со градиентно елуирање на температура од 25°C. Како мобилна фаза беше користена смеса составена од метанол и 0,02 М фосфатен пуфер со pH 3,5 во однос 5:95 (V/V) со линеарен градиент до 15:85 (V/V) за време од 12 минути и проток од 1,2 ml/min.

Волуменот на инјектирање беше 100  $\mu\text{l}$ , детекцијата беше изведена на бранова должина од 341 nm за 6-TGN и на 304 nm за 6-MMP.

### **Земање примероци**

За изведување на овој метод, полната крв беше земена од здрави доброволци и од пациенти со воспалителни цревни заболувања кои беа најмалку 3 месеци на терапија со азатиоприн. Бидејќи како биолошки матрикс се користеа само еритроцитите, полната крв што се добиваше од пациентите подлежеше на неколку чекори на подготовка.

Примероците од крв (5 ml) се собираа во епрувети кои содржеа хепарин и се центрифугираа на температура од 4°C. За да се одделат еритроцитите од полната крв, таа се центрифугираше на температура од 4°C, при што еритроцитите се исталожуваа на дното, а супернатантот богат со тромбоцити како и горниот слој од клетки (леукоцити и тромбоцити) што се наоѓаше над исталожените еритроцити се отстрануваше. Концентрацијата на еритроцитите во секој од епендорфите беше нормализирана на  $4 \times 10^9$  еритроцити. Вака подготвените примероци се чуваа на температура од -80°C.

### **Подготовка на примероците за анализа**

Од полната крв се изолираа еритроцитите со постапката спомената претходно. Од нив беше земено 500  $\mu\text{l}$ ; тие беа ставени во епендорф во кој претходно имаше 5 mg од внатрешниот стандард DTT, потоа се додаваше 50  $\mu\text{l}$  перхлорна киселина за депротеинизација. Вака подготвените примероци се центрифугираа на центрифуга со 3000 rpm, 15 минути на 4°C за да настане дериватизација. Потоа супернатантот односно киселиот екстракт беше одделен и се загреваше 45 минути на температура од 100°C при што дојде до хидролиза на тиопуринските нуклеотиди во слободни бази. Вака подготвените примероци после ладење беа спремни за пуштање на HPLC колоната.

### **Параметри за валидација на биоаналитичкиот метод**

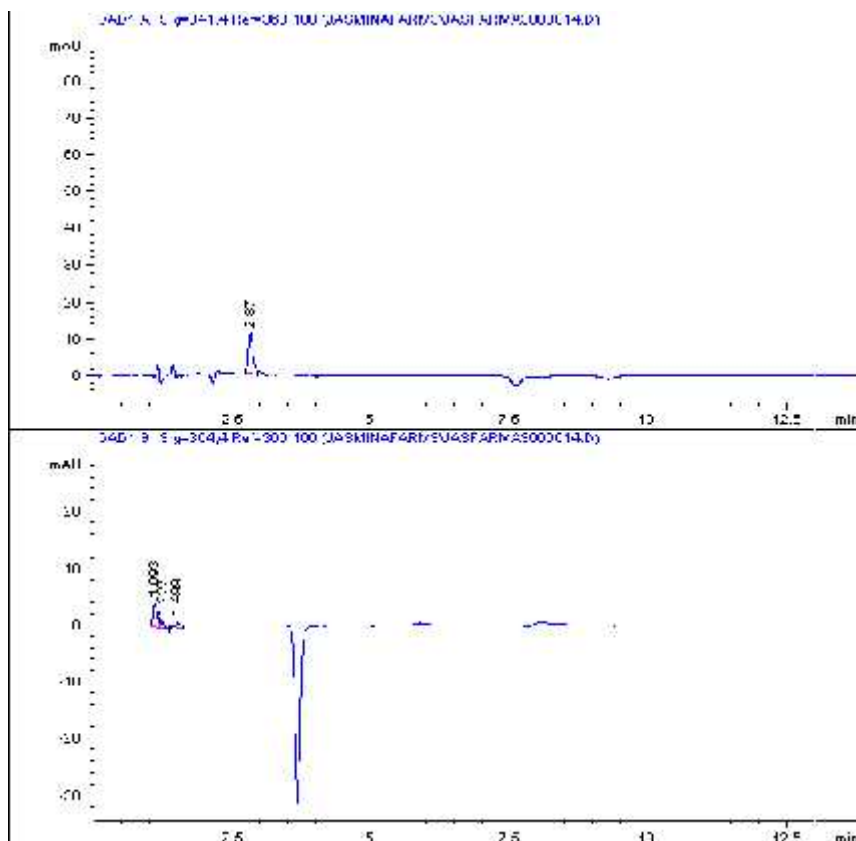
Комплетна валидација треба да се спроведе за секој биоаналитички метод, било да е нов или заснован на литературни податоци. Валидацијата на овој метод е спроведена во согласност со барањата на Водичот за валидација на

биоаналитички методи на Европската агенција за лекови (ЕМА, 2011), според параметрите: селективност, линеарност, точност и прецизност, принос на екстракција (recovery) и стабилност (51).

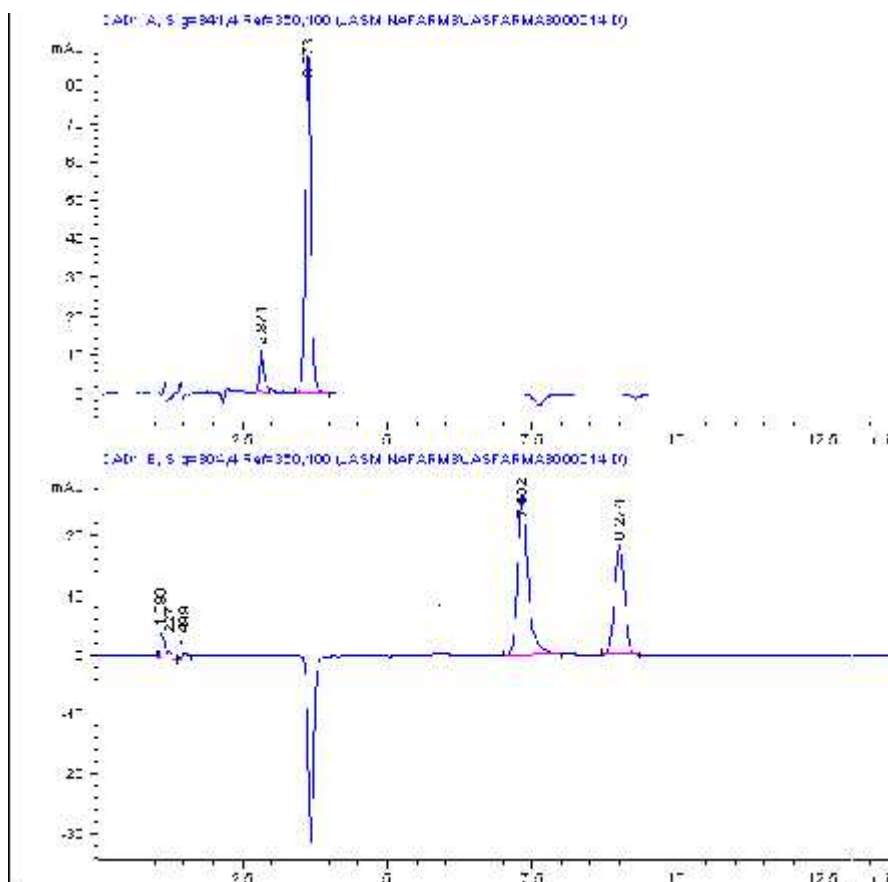
Валидацијата на биоаналитичкиот метод е задолжителен чекор во проценка на способноста на развиениот метод да обезбеди точни и сигурни резултати за негова рутинска примена (105).

### **Селективност**

Селективноста на методот беше испитана на 6 различни примероци од еритроцити добиени од здрави доброволци и еритроцити обогатени со 6-TGN и 6-MMP. Хроматограмите добиени по апликација на наведените примероци од еритроцити се прикажани на слика 3а и слика 3б.



Слика 3а . Хроматограм од еритроцити од здрави доброволци



Слика 3б. Хроматограми од еритроцити од здрави доброволци обогатени со  $600 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  6-TGN,  $1500 \text{ pmol}/8 \cdot 10^8$  6-MMP и  $5 \text{ mg}$  DTT, после постапка за подготовка на примерокот.

Прикажаните хроматограми покажуваат дека со примена на предложените хроматографски услови беше постигнато целосно разделување на сите три компоненти за време пократко од 12 минути. Добиените ретенциони времиња за 6-TGN, 6-MMP и DTT се 3,67 минути, 7,60 минути и 9,27 минути. Од хроматограмите се гледа дека нема дополнителни пикови од ендогените компоненти на еритроцитите што би интерферирале со аналитите. Овие резултати потврдуваат дека предложениот биоаналитички метод е селективен и специфичен, и може да се применува за определување на 6-TGN и 6-MMP во еритроцити.

### **Линеарност**

Калибрационите криви за 6-TGN и 6-MMP беа подготвени од шест калибрациони стандарди во концентрациски опсег од 50 – 3000 pmol/8\*10<sup>8</sup> за 6-TGN и од 0,3 – 24 pmol/8\*10<sup>8</sup> за 6-MMP.

Регресионата равенка за 6-TGN е  $y = 0,3942x + 1,3055$ , со коефициент на детерминација  $r^2 = 0,9996$ , а за 6-MMP е  $y = 0,2376x - 1,44$  и коефициент на детерминација  $r^2 = 0,9989$ .

Добиените резултати за коефициентите на детерминација укажуваа на линеарна зависност помеѓу односот на површините на пиковите на испитуваните аналити и концентрацијата на соодветните аналити во дефинираниот концентрациски опсег за 6-TGN и 6-MMP.

### **Точност и прецизност**

Within-run точноста се движеше од 94,2% до 101,3% за 6-TGN и од 93,3% до 96,0% за 6-MMP, додека within-run прецизноста за 6-TGN и 6-MMP беше во границите од 1,6% до 8,2% и 3,8% до 9,1%, соодветно.

Between-run точноста и прецизноста за 6-TGN се движеше од 93,6% до 99,1% и од 2,8% до 7,2%, соодветно. Вредностите за between-run точноста и прецизноста за 6-MMP беа во границите од 93,6% - 103,9% и 1,9% - 11,2%, соодветно.

Сите резултати од испитуваните примероци беа во пропишаните граници (точноста:  $\pm 15\%$  од номиналната вредност за QC примероци и  $\pm 20\%$  од номиналната вредност за LLOQ; прецизност: вредноста за CV треба да биде во граници од  $\pm 15\%$  за QC примероците и  $\pm 20\%$  за LLOQ), со што се потврдени точноста и прецизноста на методот.

### **Принос на екстракција (recovery)**

Добиените вредности за приносот на екстракција се движеа во границите од 88,2% - 89,6% за 6-TGN и 84,8% - 86,3% за 6-MMP, и тие укажуваат на добар принос на екстракција за метаболитите, што значи дека постапката за подготовка на примероците е соодветна за примена во определување на терапевтските концентрации на метаболитите на азатиоприн во еритроцити добиени од пациенти кои се на терапија со азатиоприн.

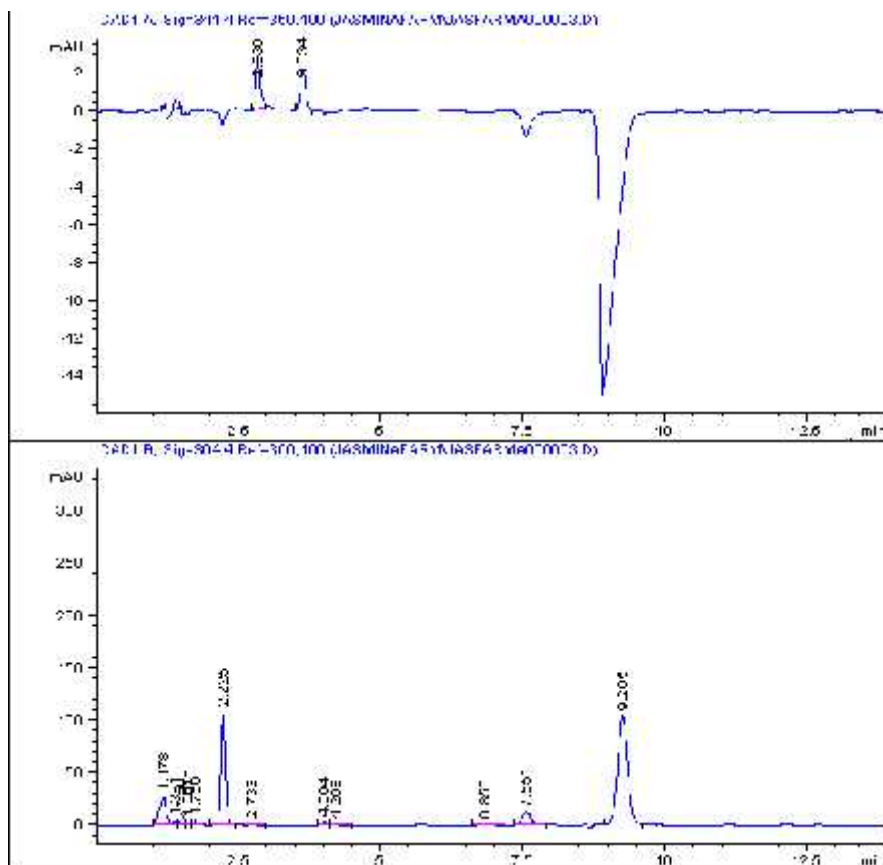
### **Стабилност**

Добиените резултати од испитувањата за стабилност изведени преку евалуација на стабилноста на примероците од еритроцити при различни услови на чување укажуваат дека примероците се стабилни под сите опишани услови на чување во испитуваниот период, како и за време на анализата. Според тоа, не се очекуваше појава на проблеми поврзани со стабилноста во текот на рутинската анализа на примероците од еритроцитите.

### **Анализа на примероците од еритроци добиени од пациенти на терапија со азатиоприн**

Предложениот метод е применет за определување на 6-TGN и 6-MMP во примероци од еритроцити добиени од плазма од пациенти со ВЦЗ кои се на терапија со азатиоприн во дози од 25 mg – 200 mg во зависност од тежината на пациентот.

На слика 4 е прикажан хроматограм добиен по апликација на еритроцити од пациент на терапија со азатиоприн. Со интерполација на соодветните калибрациони криви добиени се следните концентрации: 124,0 pmol/8\*10<sup>8</sup> 6-TGN и 2891,0 pmol/8\*10<sup>8</sup> 6-MMP.



Слика 4. Хроматограм од еритроцити од пациент на терапија со азатиоприн, после постапка за подготовка на примерокот

### **Поделба на пациентите според концентрациите на метаболитите**

Добиените вредности за 6-TGN концентрациите беа категоризирани во три групи, и тоа (115):

1. суптерапевтски (<math> < 200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}</math>)
2. терапевтски (200-400 pmol/8x10<sup>8</sup> Er)
3. високи (>400 pmol/8x10<sup>8</sup> Er)

Концентрациите на 6ММР не се поврзуваат со клиничката ефикасност, туку корелираат со хепатотоксичноста. Затоа, вредностите на 6-ММР >5700 pmol/8x10<sup>8</sup> Er се сметаа како критериум за токсичност (71).



#### **5.2.4. Испитување на активноста на болеста**

Кај испитаниците со КБ активноста на болеста беше одредувана врз основа на Индексот за активност на Кроновата болест (Crohn Disease Activity Index, CDAI). Локализацијата и текот на КБ беше степенувана според Виенската класификација за Кронова болест од 1998 година (44).

Заради пресметување на CDAI на пациентите им беше даден прашалник посебно дизајниран за оваа намена (Прилог 3). Според големината на вредноста на овој индекс испитаниците со КБ беа класифицирани на следниот начин: Група 1 - CDAI < 150 испитаници во ремисија; Група 2 - CDAI 150-400 умерен степен и Група 3 - CDAI >400 тежок степен.

Кај пациентите со УК активноста на болеста беше проценувана врз основа на Индексот за проценка на активноста на улцерозен колитис (Ulcerative colitis activity index, UCAI) (Прилог 4) врз чијашто основа (121) пациентите беа поделени на: а) пациенти со UCAI<5 = во ремисија и б) пациенти со UCAI>5 = акутна фаза.

#### **5.2.5. Следење на биохемиските параметри**

Кај сите пациенти со ВЦЗ беше земена крв за рутински хематолошки испитувања и за одредување на протеински статус, хепатални ензими и алфа-амилаза во серум.

#### **5.2.6. Следење на несакани дејства**

Пациентите кои во моментот на ова истражување примаа AZA беа следени за евентуална појава на несакани дејства. Исто така, кај заболените кои во минатото примале AZA, од медицинската историја беше земен податокот за присуство на несакано дејство.

## 6. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА

За обработка на податоците добиени при истражувањето изработена е посебна база на податоци, а статистичката обработка е направена со користење на соодветни статистички програми (Statistica for Windows 7,0 и SPSS 17,0).

Анализата на атрибутивните (квалитативни) серии е направена преку одредување на коефициент на односи, пропорции и стапки, со нивно прикажување како апсолутни и релативни броеви. Нумеричките (квантитативни) серии се анализирани со употреба на мерките на централна тенденција (просек, медијана, минимални вредности, максимални вредности, интерактивни рангови), како и со мерки на дисперзија (стандардна девијација, стандардна грешка).

Pearson Chi square test за хомогеност, Yates corrected, Fischer exact test и Fisher-Freeman-Halton exact test беа користени за утврдување на разликата меѓу одредени атрибутивни дихотомни белези во две и повеќе групи на испитаници. Spearman-овиот коефициент на ранг корелација е употребуван за утврдување на асоцијацијата помеѓу нехомогените нумерички статистички серии. За тестирање на значајноста на разликата меѓу одредени анализирани параметри беа користени, во зависност од видот и дистрибуцијата на податоците, параметарски Student-ов t-тест (за два независни примерока) и ANOVA (за повеќе независни примероци) како и непараметарски тестови за независни примероци (Mann Whitney U тест и Kruskal-Wallis ANOVA тест).

За утврдување на статистичката значајност се користеше ниво на сигнификантност од  $p \leq 0,05$ . Резултатите се прикажани табеларно и графички.

## **РЕЗУЛТАТИ**

## 7. РЕЗУЛТАТИ

Истражувањето претставува едногодишна проспективна аналитичка клиничка студија организирана при УКИМ во Скопје и тоа на Институт за претклиничка и клиничка фармакологија со токсикологија, Супспецијалистичката амбуланта за воспалителни цревни заболувања на Универзитетската клиника за гастроентерохепатологија и Фармацевтскиот факултет во Скопје. Согласно поставените инклузии и ексклузии критериуми за учество во истражувањето, опфатен е случаен примерок на испитаници (random sampling) со дијагноза за воспалителни цревни заболувања (ВЦЗ). Во однос на клиничкиот тип на болеста, опфатени се испитаници со Кронова болест (КБ) и испитаници со улцерозен колитис (УК).

### 7.1. Демографски карактеристики на пациентите

Со истражувањето се опфатени вкупно 63 пациенти со воспалителни цревни заболувања од кои 45 (71,23%) со Кронова болест и 18 (28,57%) со улцерозен колитис (табела 1). Анализата на демографските карактеристики на пациентите се однесува на нивниот пол и возраст.

#### 7.1.1. Дескриптивна анализа на пациентите според пол

Од вкупно 63 испитаници, 34 (53,97%) се од машки и 29 (46,03%) се од женски пол со однос помеѓу половите од 1,17:1. Помеѓу пациентите со Кронова болест т.е. улцерозен колитис, 26 (57,78%) v.s. 8 (44,44%) се машки и 19 (42,22%) v.s. 10 (55,56%) се женски со однос помеѓу половите од 1,37:1 v.s. 0,8:1 (табела 1). Анализата не покажа статистички сигнификантна разлика помеѓу двата клинички типа на болеста во однос на полот на испитаниците ( $p > 0,05$ ) (Pearson Chi-square=0,9201, df=1,  $p=0,3375$ ) (табела 1).

**Табела 1. Дескриптивна анализа на пациентите според пол и клинички тип на болеста**

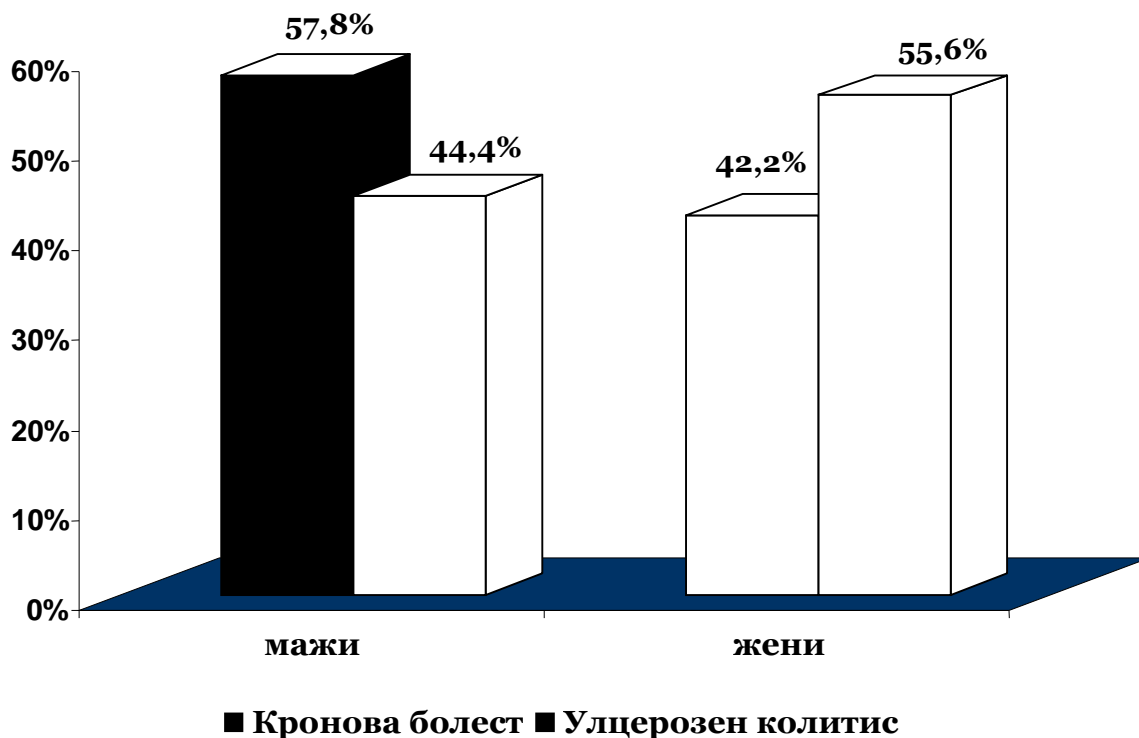
Клинички тип на болеста		Пол		Вкупно
		машки	Женски	
Кронова болест	Број	26	19	45
	%	57,78%	42,22%	
Улцерозен колитис	Број	8	10	18
	%	44,44%	55,56%	
Вкупно	Број	34	29	63
	%	53,97%	46,03%	100%

Pearson Chi-square=0,920081, df=1, p=0,337456

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Дескриптивната анализа на пациентите според пол и клинички тип на болеста е претставена во табела 1 и на графикон 1.

**Графикон 1. Дескриптивна анализа на пациентите според пол и клинички тип на болеста**



### 7.1.2. Дескриптивна анализа на пациентите според возраст

Просечната возраст на испитаниците во примерокот изнесува  $40,84 \pm 12,26$  години со минимална возраст од 15 и максимална возраст од 66 години. Педесет посто од испитаниците во целиот примерок се постари од 40 години (табела 2).

**Табела 2. Дескриптивна анализа на пациентите според возраст и клинички тип на болеста**

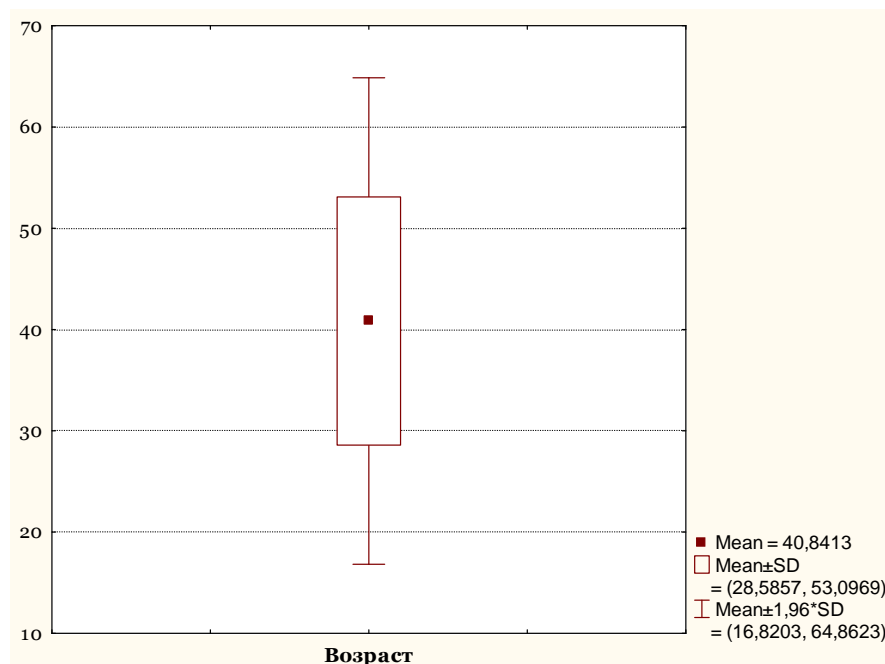
Клинички тип на болеста	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
Кронова болест	45	41,84	11,82	42	15	62
Улцерозен колитис	18	38,33	13,31	34,5	24	66
<b>Вкупно</b>	<b>63</b>	<b>40,84</b>	<b>12,26</b>	<b>40</b>	<b>15</b>	<b>66</b>

t-test for independent samples=25,6 df=124 p=0,0001\*

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на пациентите според возраст е даден на графикон 2.

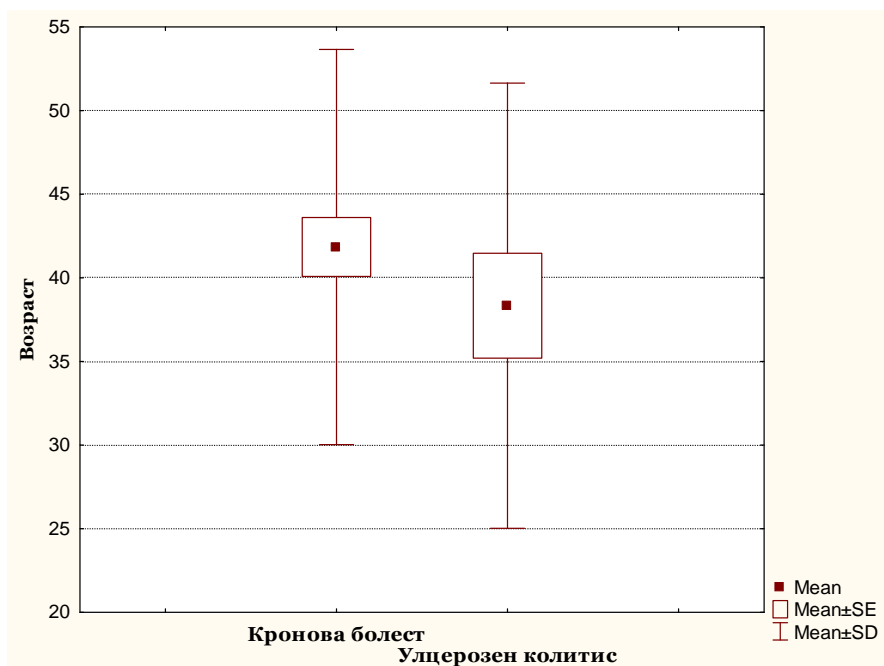
**Графикон 2. Дескриптивна анализа на пациентите според возраст**



Просечната возраст на пациентите со Кророва болест изнесува  $41,84 \pm 11,82$  години со минимална возраст од 15 и максимална возраст од 62 години. Согласно анализата на медијана, 50% од пациентите со овој клинички тип на болеста се на возраст над 42 години (табела 2 и графикон 3).

Во групата пациенти со улцерозен колитис, просечната возраст изнесува  $38,33 \pm 13,31$  години, со минималната возраст од 24 години и максимална возраст од 66 години. Педесет посто од пациентите во групата со улцерозен колитис се постари од 34,5 години (табела 2 и графикон 3). Тестираната разлика помеѓу двете групи (Кророва болест и улцерозен колитис) во однос на возраста на пациентите, е статистички сигнификантна за  $p < 0,05$  (t-test for independent samples= $25,6$   $df=124$   $p=0,0001$ ) во прилог на повисока просечна возраст кај пациентите во групата со Кророва болест (табела 2 и графикон 3).

**Графикон 3. Дескриптивна анализа на пациентите според возраст и клинички тип на болеста**



Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на пациентите според возраста и типот на болеста е даден на графикон 3.

## 7.2. Карактеристики на историја на болеста кај пациентите

Анализата на карактеристиките на пациентите според историјата на болеста се однесува на: а) почеток на болеста; б) времетраење на болеста; в) локација на болеста; г) оперативен третман (хируршка ресекција); д) тераписки третман (претходен и сегашен) и е) третман со AZA (употреба, времетраење, причина за прекин, несакани ефекти итн.).

### 7.2.1. Дескриптивна анализа на пациентите според почеток на болеста

Испитаниците од примерокот се анализирани во однос на возраста кога започнала болеста при што се поделени во две групи, и тоа: а)  $\leq 40$  години и б)  $> 40$  години (табела 3 и графикон 4).

**Табела 3. Дескриптивна анализа на пациентите според почеток и клинички тип на болеста**

Клинички тип на болеста		Возраст на почеток на болеста		Вкупно
		$\leq 40$ години	$> 40$ години	
Кронова болест	Број	37	8	45
	%	82,22%	17,78%	
Улцерозен колитис	Број	15	3	18
	%	83,33%	16,67%	
Вкупно	Број	52	11	63
	%	82,54%	17,46%	100%

Fishers exact two-tailed test:  $p=1,0000$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Од табелата 3 се гледа дека 52 (82,54%) од сите пациенти во истражувањето изјавиле дека нивната болест започнала пред четириесеттата година од животот. Во групата пациенти со Кронова болест т.е. улцерозен колитис, пред четириесеттата година од животот болеста започнала кај 82,11% односно кај 83,54% од испитаниците со улцерозен колитис. Нема статистички сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) помеѓу двете групи со различен клинички тип на болеста во однос на нејзиниот почетокот (Fishers exact two-tailed test:  $p=1,0000$ ).



**Графикон 4. Дескриптивна анализа на пациентите според почеток и клинички тип на болеста**



### 7.2.2. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на болеста

Во однос на изјавата за времетраење на болеста, испитаниците се поделени во три групи, и тоа: а) под 5 години; б) помеѓу 5 и 10 години и в) над 10 години (табела 4).

**Табела 4. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење и клинички тип на болеста**

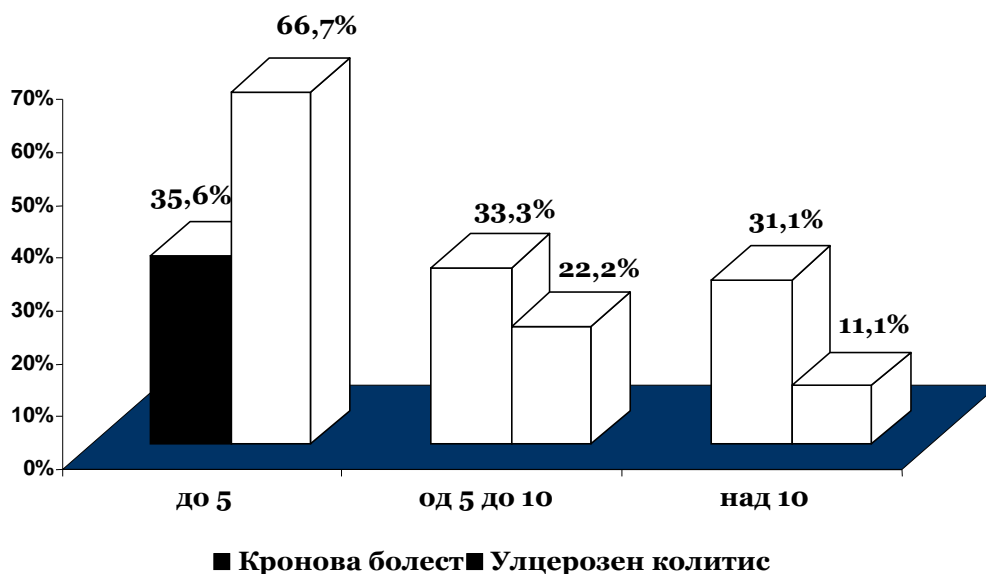
Времетраење на болеста (години)		Клинички тип на болеста		Вкупно
		Кронова болест	Улцерозен колитис	
< 5	Број	16	12	28
	%	35,56%	66,67%	44,44%
5 - 10	Број	15	4	19
	%	33,33%	22,22%	30,16%
> 10	Број	14	2	16
	%	31,11%	11,11%	25,40%
Вкупно	Број	45	18	63
	%	71,43%	28,57%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,0813$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Од вкупниот број пациенти во примерокот на истражувањето, најголемиот дел и тоа 28 (44,44%) изјавиле дека болеста ја имаат помалку од 5 години; по нив следеа 19 (30,16%) пациенти каде должината на времетраењето на болеста е помеѓу 5 и 10 години и 16 (25,40%) со времетраење на болеста над 10 години. Анализата во однос на времетраењето на болеста кај двата клинички типа (Кронова болест и улцерозен колитис) покажа дека кај најголем дел од пациентите од двете групи, и тоа 16 (35,56%) v.s. 12 (66,67%), болеста трае помалку од 5 години, по што следеа 15 (33,33%) v.s. 4 (22,22%) пациенти со времетраење на болеста од 5 до 10 години и 14 (31,11%) v.s. 2 (11,11%) со времетраење на болеста над 10 години. Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу двата клинички типа на воспалување на цревата во однос на времетраењето на болеста (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,0813$ ) (табела 4).

**Графикон 5. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење и клинички тип на болеста**



Графичкиот приказ на дескрипцијата на пациентите според времетраење на болеста и нејзиниот клинички тип е даден на графикон 5.

### 7.2.3. Дескриптивна анализа на пациентите според локализација на болеста

Според локализацијата на болеста, испитаниците со Кронова болест се поделени во четири групи, и тоа: а) терминален илеум; б) колон; в) илеоколон и г) горен дел на дигестивна туба (табела 5). Анализата покажа дека кај најголемиот дел од испитаниците во оваа група - 23 (51,1%) болеста е лоцирана на ниво на терминалниот илеум, по што следат 21 (46,67%) испитаници со локација на болеста на ниво на илеоколон и само 1 (2,22%) со локација на ниво на колон. Локација на болеста во горен дел на дигестивна туба нема ниту еден од испитаниците во истражувањето.

**Табела 5. Дескриптивна анализа според локација на Кронова болест**

Локација на болеста		Вкупно
Терминален илеум	Број	23
	%	51,1%
Колон	Број	1
	%	2,22%
Илеоколон	Број	21
	%	46,67%
Горен дел на дигестивна туба	Број	0
	%	0%
Вкупно	Број	45
	%	100%

Поделба согласно локализацијата на болеста е направена и кај испитаниците со улцерозен колитис при што тие се групирани во четири групи, и тоа: а) проктитис; б) проктосигмоидитис; в) левостран колитис и г) панколитис (табела 6). Од вкупниот број испитаници со улцерозен колитис, најголемиот дел и тоа 12 (66,67%) имаат панколитис, по што следат 4 (22,22%) пациенти со левостран колитис. Само по еден пациент од оваа група 1 (5,56%) има проктосигмоидитис и проктит. Табеларниот приказ на дескриптивната

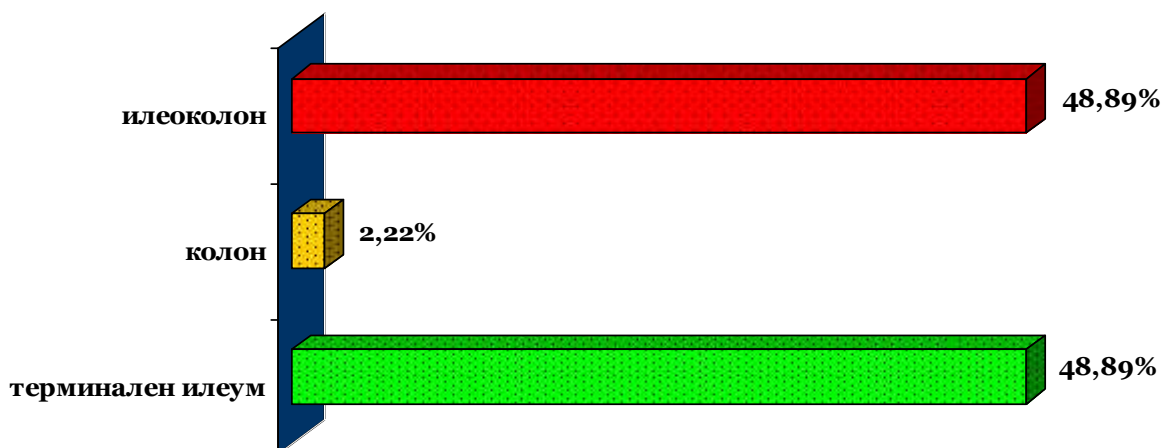
анализа според локализацијата на болеста кај пациентите со улцерозен колитис е даден на табела 6.

**Табела 6. Дескриптивна анализа според локација на улцерозен колитис**

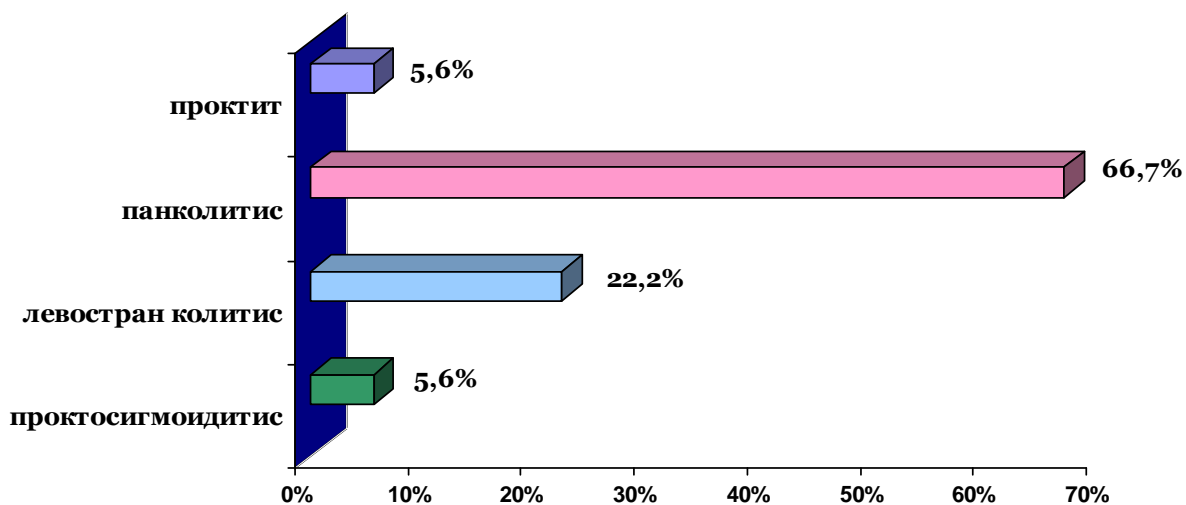
Локација на болеста		Вкупно
Проктитис	Број	1
	%	5,56%
Проктосигмоидитис	Број	1
	%	5,56%
Левостран колитис	Број	4
	%	22,22%
Панколитис	Број	12
	%	66,67%
Вкупно	Број	18
	%	100%

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на локализацијата на Кроновата болест и улцерозниот колитис е даден на графикон 6 и графикон 7.

**Графикон 6. Дескриптивна анализа според локализација на Кронова болест**



**Графикон 7. Дескриптивна анализа според локализација на улцерозен колитис**



#### 7.2.4. Дескриптивна анализа на пациентите според оперативен третман

Во рамките на истражувањето, пациентите беа прашани за претходен оперативен третман (хируршка интервенција) на воспалителното цревно заболување и согласно добиениот одговор се поделени во две групи (табела 7).

**Табела 7. Дескриптивна анализа на пациентите според оперативен третман и клинички тип на болеста**

Клинички тип на Болеста		Оперативен третман		Вкупно
		да	не	
Кронова болест	Број	20	25	45
	%	44,44%	55,56%	
Улцерозен колитис	Број	0	18	18
	%	0%	100%	
Вкупно	Број	20	43	63
	%	31,75%	68,25%	100%

Yates corrected=9,97; p=0,001

\*сигнификантно за p<0,05

Оперативна интервенција поради примарното заболување имале вкупно 20 (31,75%) од сите испитаници во примерокот (табела 7). Без операција биле 25 (55,56%) од пациентите во групата со Кророва болест и 18 (100%) од пациентите со улцерозен колитис. За  $p < 0,05$  постои сигнификантна разлика помеѓу пациентите со Кророва болест и оние со улцерозен колитис во однос на спроведениот оперативен третман (Yates corrected=9,97;  $p=0,001$ ) во прилог на поголем број хируршки интервенции кај пациентите со Кророва болест.

Графичкиот приказ на дескриптивната анализа на пациентите според оперативниот третман и клиничкиот тип на болеста е даден на графикон 8.

**Графикон 8. Дескриптивна анализа на пациентите според оперативен третман и клинички тип на болеста**



### 7.2.5. Дескриптивна анализа на пациентите според тераписки третман (претходен и сегашен)

Испитаниците во примерокот се анализирани во однос на претходен и сегашен тераписки третман при што се поделени во шест групи, и тоа: а) азатиоприн (AZA); б) AZA + 5 ASA (5 аminosалицилна киселина препарати); в) 5 ASA (5 аminosалицилна киселина препарати); г) кортикостероиди + 5 ASA (5 аminosалицилна киселина препарати); д) AZA + кортикостероиди + 5 ASA (5 аminosалицилна киселина препарати) и е) само кортикостероиди (табела 8 и графикон 9).

**Табела 8. Дескриптивна анализа на пациентите според претходен третман и клинички тип на болеста**

Претходен третман		Клинички тип на болеста		Вкупно
		Кронова болест	Улцерозен колитис	
AZA	Број	/	/	/
	%	/	/	/
AZA+5 ASA	Број	/	/	/
	%	/	/	/
5 ASA	Број	5	2	7
	%	13,89%	14,29%	14%
кортикостероиди+5 ASA	Број	16	7	23
	%	44,44%	50%	46%
AZA+кортикостероид и+ 5 ASA	Број	6	2	8
	%	16,67%	14,29%	16%
кортикостероиди	Број	9	3	12
	%	25%	21,43%	24%
Вкупно	Број	36	14	50
	%	72%	28%	100%

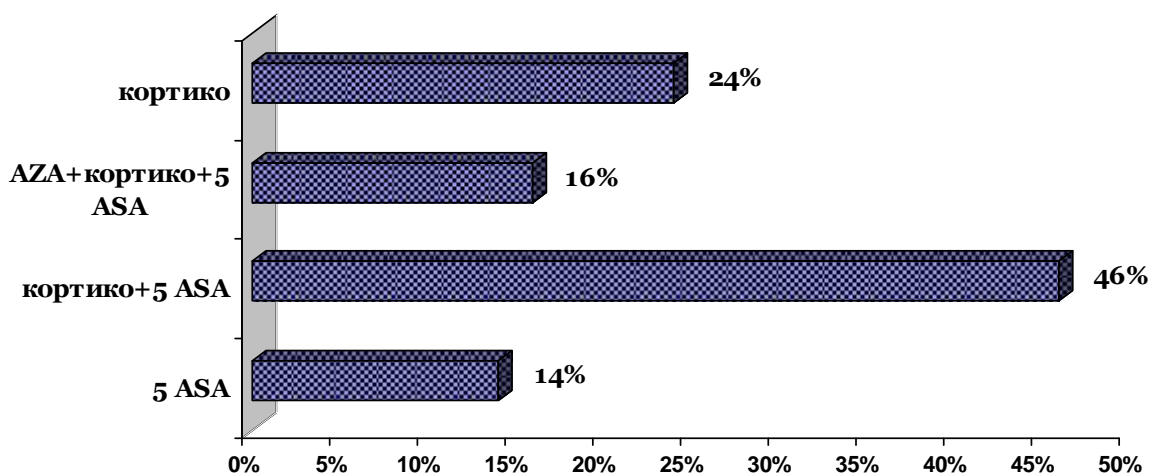
Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,9999$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Анализата покажа дека ниеден од пациентите од двете групи како **претходна терапија** не примал AZA и AZA + 5 ASA (табела 8). Вкупно 7 (14%) испитаници изјавиле дека како претходна терапија примале 5 ASA и тоа 5 (13,89%) од оние со Кронова болест и 2 (14,29%) од оние со улцерозен колитис. Комбинација од кортикостероиди+5 ASA примале вкупно 23 (46%) од

испитаниците и тоа 16 (44,44%) од групата со Кронова болест и 7 (50%) од групата со улцерозен колитис. Комбинација од AZA+кортикостероиди+5 ASA примале 8 (16%) од испитаниците во примерокот и тоа 6 (16,67%) од групата со Кронова болест и 2 (14,29%) од оние со улцерозен колитис. Само кортикостероиди примале 12 (24%) од сите испитаници, и тоа 9 (25%) од оние со Кронова болест и 3 (21,43%) од оние со улцерозен колитис. Анализата не укажа на сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) помеѓу двете групи со различен клинички тип на воспалување на цревата во однос на претходниот третман (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,9999$ ).

**Графикон 9. Дескриптивна анализа на пациентите според претходен третман и клинички тип на болеста**



Анализата покажа дека најголемиот дел од пациентите како **сегашна терапија** примаат AZA+5 ASA и тоа 20 (32,26%), 18 (29,03%) пациенти примаат AZA како единечна терапија, 11 (17,74%) кортикостероиди+5 ASA и 9 (14,52%) 5 ASA. Подеднаков број, и тоа по 2 (3,23%) примале AZA+кортикостероиди+5 ASA, односно само кортикостероиди. Табеларниот и графичкиот приказ на дескриптивната анализа на пациентите според сегашниот третман е дадена на табела 9 и графикон 10.

Во групата пациенти со Кронова болест најголемиот дел и тоа 17 (38,64%) примале AZA како единечна терапија, 11 (25%) биле третирани со AZA+5 ASA, 8 (18,18%) со кортикостероиди+5 ASA и 5 (11,36%) третирани само со 5 ASA (табела 9). Во оваа група најмалубројни се пациентите кои изјавиле дека се



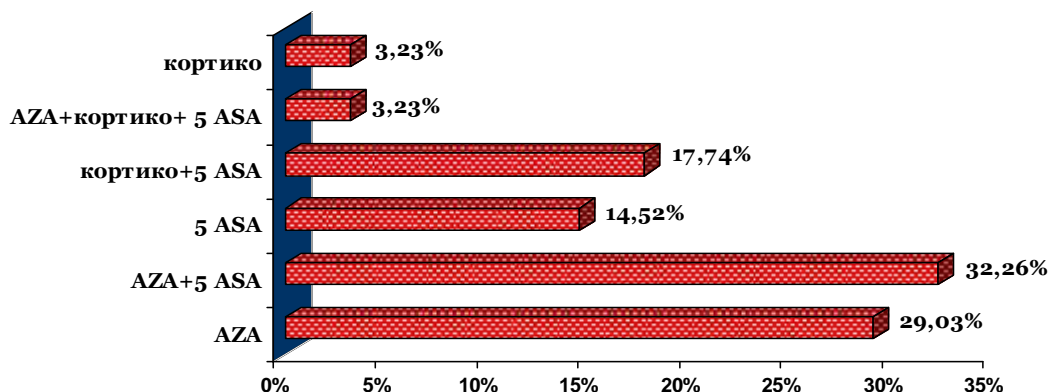
третираны со кортикостероиды 2 (4,55%) и 1 (2,27%) со AZA+кортикостероиды+5 ASA.

**Табела 9. Дескриптивна анализа на пациентите според сегашен третман и клинички тип на болеста**

Сегашен третман		Клинички тип на болеста		Вкупно
		Кронова болест	Улцерозен колитис	
AZA	Број	17	1	18
	%	38,64%	5,56%	29,03%
AZA+5 ASA	Број	11	9	20
	%	25%	50%	32,26%
5 ASA	Број	5	4	9
	%	11,36%	22,22%	14,52%
кортикостероиды +5 ASA	Број	8	3	11
	%	18,18%	16,67%	17,74%
AZA+кортикостероиды + 5 ASA	Број	1	1	2
	%	2,27%	5,56%	3,23%
кортикостероиды	Број	2	0	2
	%	4,55%	0%	3,23%
Вкупно	Број	44	18	62
	%	70,97%	29,03%	100%

Меѓу пациентите со улцерозен колитис нема ниту еден кој изјавил дека е третиран само со кортикостероиды (табела 9). Најмногубројни, 9 (50%), се пациентите третираны со AZA+5 ASA, потоа следуваат 4 (22,22%) третираны со 5 ASA и 3 (16,67%) третираны со кортикостероиды+5 ASA. Подеднаков број, и тоа по 1 (5,56%) примале AZA, односно AZA+кортикостероиды+5 ASA.

**Графикон 10. Дескриптивна анализа на пациентите според сегашен третман**



### 7.2.6. Дескриптивна анализа на пациентите според третманот со AZA

Испитаниците во примерокот се анализирани во однос на третманот со AZA при што се анализирани нивните изјави во однос на повеќе аспекти во врска со овој препарат, и тоа: употреба, времетраење, причина за прекин, несакани ефекти итн.

#### 7.2.6. 1. Користење AZA

Од вкупниот број пациенти во истражувањето, 39 (61,99%), изјавиле дека „сега користат“ AZA, 16 (25,40%) „не користат“ AZA и 8 (12,70%) „порано користеле“ AZA. И во двете групи пациенти, со Кронова болест и улцерозен колитис, најмногубројни се пациентите кои користат AZA и тоа 29 (64,44%) v.s. 10 (55,55%), по што следат оние кои не користат AZA и тоа 10 (22,22%) v.s. 6 (33,33%). Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу двете групи пациенти со различен клинички тип на воспалување на цревата во однос на користењето на AZA (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,7178$ ).

**Табела 10. Дескриптивна анализа на пациентите според користење AZA и клинички тип на болеста**

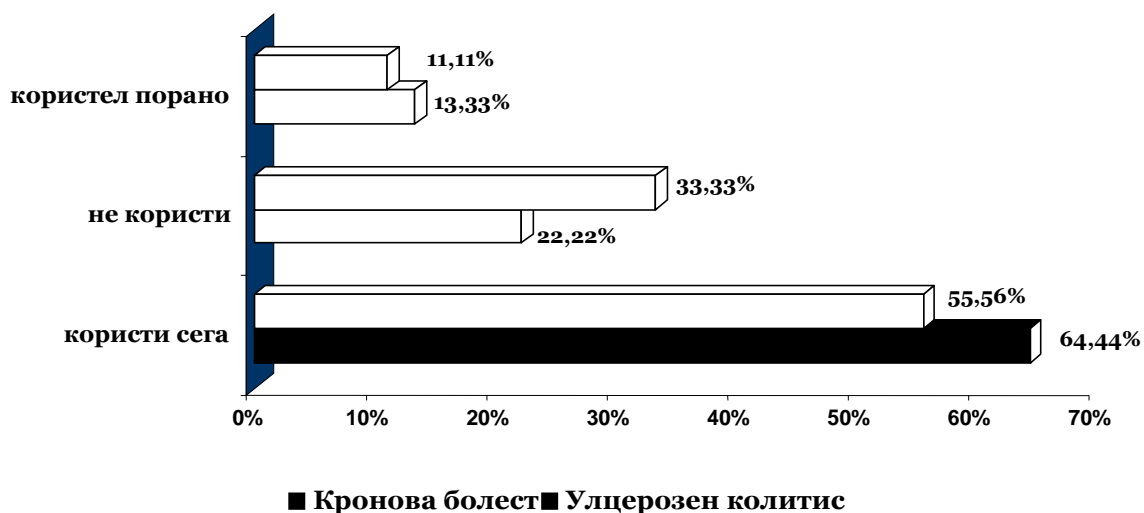
Користење AZA		Клинички тип на болеста		Вкупно
		Кронова болест	Улцерозен колитис	
Користи сега	Број	29	10	39
	%	64,44%	55,56%	61,90%
Не користи	Број	10	6	16
	%	22,22%	33,33%	25,40%
Користел порано	Број	6	2	8
	%	13,33%	11,11%	12,70%
Вкупно	Број	45	18	63
	%	71,43%	28,57%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,7178$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Табеларниот и графичкиот приказ на дескриптивната анализа на пациентите според користењето на AZA и клиничкиот тип на болеста е даден во табела 10 и на графикон 11.

**Графикон 11. Дескриптивна анализа на пациентите според користење AZA и клинички тип на болеста**



### 7.2.6.2. Времетраење на терапија со AZA

Кај пациентите кои дале изјава дека во моментот примаат терапија со AZA како и оние кои изјавиле дека порано користеле AZA, анализирано е времетраењето на терапијата со AZA при што е направена поделба во четири групи, и тоа: а) < 3 месеци; б) 3 - 12 месеци; в) 13 - 24 месеци и г) > 24 месеци. Најголемиот дел од пациентите во групата која сега користи AZA, и тоа 18 (46,15%) изјавиле дека користат AZA од 3 до 12 месеци. По нив следат 10 (25,64%) пациенти кои користат AZA од 13 до 24 месеци и 9 (23,08%) кои користат AZA над 24 месеци (табела 11 и графикон 12). Најмалубројни во оваа група се пациентите кои користат AZA помалку од 3 месеци, 2 (5,13%). Во групата пациенти кои порано користеле AZA, најмногубројни и тоа 3 (37,50%) се оние кои користеле AZA од 3 до 12 месеци, проследено со подеднаков број и тоа по 2 (25%) на оние кои го користеле овој препарат консеквентно помалку од 3 месеци и над 24 месеци. Најмалубројни во оваа група се пациентите кои користеле AZA од 13 - 24 месеци. Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу двете групи во однос на времетраење на користењето на AZA (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,3333$ ).

**Табела 11. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на користење AZA**

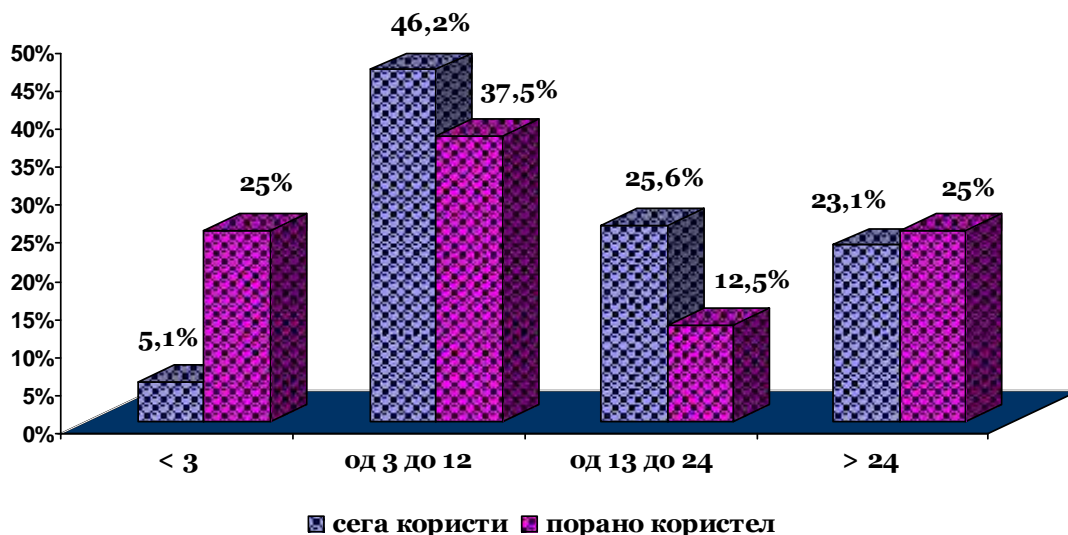
Времетраење на терапија со AZA во месеци		Користење AZA		Вкупно
		Користи сега	Користел порано	
< 3	Број	2	2	4
	%	5,13%	25%	
3 - 12	Број	18	3	21
	%	46,15%	37,50%	
13 - 24	Број	10	1	11
	%	25,64%	12,50%	
> 24	Број	9	2	11
	%	23,08%	25%	
Вкупно	Број	39	8	47
	%	82,98%	17,02%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,3333$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Табеларниот и графичкиот приказ на дескриптивна анализа на примерокот според времетраење на користење AZA е даден во табела 11 и на графикон 12.

**Графикон 12. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на користење AZA**



### 7.2.6.3. Причини за предвремено прекинување на терапијата со AZA

На пациентите од примерокот кои предходно користеле AZA како и на оние кои во периодот на истражувањето ја прекинале терапијата со AZA дадена им е можност да ги посочат причините за предвременото прекинување на третманот.

Табела 12. Дескриптивна анализа на причини за прекин на терапија со AZA

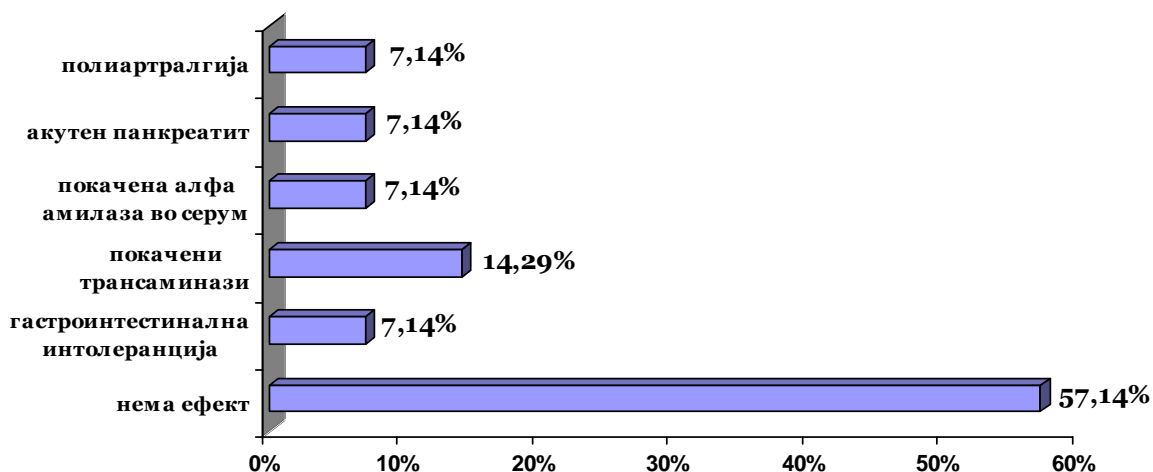
Причини за прекин на терапија со AZA		Користење AZA		Вкупно
		Користи сега	Користел порано	
Нема ефект	Број	3	5	8
	%	50%	62,50%	57,14%
Гастроинтестинална интолеранција	Број	1	0	1
	%	16,67%	0%	7,14%
Покачени трансминази	Број	1	1	2
	%	16,67%	12,50%	14,29%
Покачена алфа-амилаза во серум	Број	0	1	1
	%	0%	12,50%	7,14%
Акутен панкреатит	Број	0	1	1
	%	0%	12,50%	7,14%
Самоиницијативно прекинување	Број	/	/	/
	%	/	/	/
Полиартралгија	Број	0	1	1
	%	0%	16,67%	7,14%
Вкупно	Број	6	8	14
	%	42,86%	57,14%	100%

Анализата на причините за прекинување на терапијата со AZA опфаќа вкупно 14 пациенти, од кои 8 се пациенти кои порано биле третирани со AZA и 6 се пациенти кои во периодот на истражувањето пиеле AZA, но прекинале со земањето на оваа терапија (табела 12).

Како најчеста причина за прекинување на третманот кај пациентите кои за време на истражувањето биле третирани со AZA е посочено „немањето ефект“ и тоа кај 3 (50%), проследено со „гастроинтестинална интолеранција“ и „покачени трансминази“ подеднакво кај по 1 (16,67%) од испитаниците. Ниеден од пациентите во оваа група како причина за прекинување на AZA не посочил „покачена алфа-амилаза во серум“, „акутен панкреатит“ и/или и „полиартралгија“ (табела 12 и графикон 13).

И во групата пациенти кои порано користеле AZA најчеста споменувана причина за прекин била „немање ефект“ и тоа кај 5 (62,50%) од испитаниците, по што следуваат „покачени трансаминази“, „покачена алфа-амилаза во серум“, „акутен панкреатит“ и „полиартралгија“, секоја причина кај по 1 (12,50%) од пациентите. Ниеден од пациентите во оваа група како причина за прекинување на AZA не посочил „гастроинтестинална манифестација“, „полиалтралгија“ и/или „акутен панкреатит“. Ниеден од испитаниците во двете испитувани групи, како причина за прекинување на терапијата со AZA, не посочил „самоиницијативно прекинување“ (табела 12 и графикон 13).

**Графикон 13. Дескриптивна анализа на причини за прекин на AZA**



#### 7.2.6.4. Несакано дејство од примена на AZA

Несаканото дејство од примената на AZA е анализирано кај пациентите од примерокот кои претходно користеле AZA како и кај оние кои за време на истражувањето изјавиле дека користат AZA.

**Табела 13. Дескриптивна анализа на несакани дејства од AZA**

Несакани дејства од примена на AZA		Користење AZA		Вкупно
		Користи сега	Користел порано	
Леукоцитопенија	Број	1	0	1
	%	16,67%	0%	11,11%
Слузнички лезии	Број	1	0	1
	%	16,67%	0%	11,11%
Покачени трансаминази	Број	1	1	2
	%	16,67%	33,33%	22,22%
Покачена алфа-амилаза во серум	Број	2	1	3
	%	33,33%	33,33%	33,33%
Акутен панкреатит	Број	0	1	1
	%	0%	33,33%	11,11%
Оток на долни екстремитети	Број	1	0	1
	%	16,67%	0%	11,11%
Полиартралгија	Број	1	1	2
	%	16,67%	0%	22,22%

Од вкупниот број испитаници кои примале AZA, 9 пациенти пријавиле несакани дејства од терапијата од кои 7 пациенти пријавиле по едно несакано дејство, а 2 пријавиле по две несакани дејства (табела 13). Најчесто пријавено несакано дејство е покачена алфа-амилаза во серум кај 3 (33,33%) од пациентите, проследено со покачени трансаминази кај 2 (22,22%) и сите останати кај по 1 (11,11%) од пациентите (табела 13). Од вкупно 39 пациенти кои сега користат AZA, несакано дејство пријавиле 6 (15,38%), додека од вкупно 8 пациенти кои порано користеле AZA несакано дејство пријавиле 3 (37,5%). И во двете групи, има по еден пациент кој пријавил по две несакани дејства. За



$p \leq 0,05$ , постои сигнификантна разлика помеѓу групата која користи AZA сега и онаа која користела порано (Fisher exact two-tailed test=0,0501) во прилог на помалку несакани дејства во групата која сега користи AZA.

Анализата во однос на времетраењето на користење AZA и видот на пријавени несакани дејства укажа дека во групата пациенти со времетраење на терапија со AZA помалку од 3 месеци пријавени се 2 несакани дејства, и тоа: покачена алфа-амилаза во серум и акутен панкреатит. Во групата со времетраење на терапија со AZA од 3 до 12 месеци посочени се 2 несакани дејства, и тоа: покачени трансминази и полиартралгија. Во групата со времетраење на терапија со AZA над 12 месеци посочени се 4 несакани дејства, и тоа: леукоцитопенија, слuzнички лезии (афтозен стоматитис), покачени трансминази, покачена алфа-амилаза во серум и оток на долни екстремитети. Дескриптивната анализа според посочените несакани дејства и времетраење на терапијата со AZA е прикажана во табела 14.

**Табела 14. Дескриптивна анализа според вид на посочени несакани дејства и времетраење на терапија со AZA**

Времетраење на терапија со AZA во месеци	Несакани дејства од примена на AZA
< 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ покачена алфа-амилаза во серум</li> <li>▪ акутен панкреатитис</li> </ul>
3 - 12	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ покачени трансминази</li> <li>▪ полиартралгија</li> </ul>
> 12	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ леукоцитопенија</li> <li>▪ слuzнички лезии</li> <li>▪ покачени трансминази</li> <li>▪ покачена алфа-амилаза во серум</li> <li>▪ оток на долни екстремитети</li> </ul>

Во врска со појавата на несакани дејства од примената на AZA, спроведена е дополнителна анализа на нивното пријавување/непријавување, кај целиот примерок на пациенти кои користеле AZA (претходно и за време на истражувањето), во однос на времетраењето на терапијата со AZA (табела 15). Анализата покажа дека за  $p < 0,05$  постои статистички сигнификантна разлика помеѓу групите со различно времетраење на терапијата со AZA и

пријавување/непријавување на несакано дејство (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,0193$ ). Анализата покажа сигнификантна разлика, за  $p<0,05$ , помеѓу групата со времетраење на терапија под 3 месеци и онаа од 3 до 12 месеци во прилог на повеќе пријавени несакани дејства кај оние под 3 месеци (Fishers exact two-tailed test:  $p=0,0162$ ). Сигнификантна разлика во пријавување/непријавување на несакано дејство од примената на AZA, за  $p<0,05$ , е согледано и помеѓу групата која е на терапија под 3 месеци и онаа на терапија повеќе од 12 месеци (Fishers exact two-tailed test:  $p=0,0468$ ) во прилог на оние кои примале терапија под 3 месеци. Нема сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) во пријавување/непријавување на несакано дејство од примената на AZA помеѓу групите со времетраење на терапијата од 3 до 12 месеци и над 12 месеци (Fishers exact two-tailed test:  $p=0,664$ ).

**Табела 15. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на користење AZA и пријавување на несакано дејство**

Времетраење на терапија со AZA во месеци		Пријавување на несакано дејство		Вкупно
		Да	Не	
< 3	Број	3	1	4
	%	6,38%	2,13%	8,51%
3 - 12	Број	2	19	21
	%	4,26%	40,42%	44,68%
> 12	Број	4	18	22
	%	8,51%	38,30%	46,81%
Вкупно	Број	9	38	47
	%	19,15%	80,85%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,0193^*$

Fishers exact two-tailed test:  $p=0,0162^*$

Fishers exact two-tailed test:  $p=0,0468^*$

Fishers exact two-tailed test:  $p=0,664$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

< 3/ 3-12 месеци

< 3/ > 12 месеци

3-12 месеци/ > 12 месеци

Дескриптивната анализа на пациентите според пријавени/непријавени несакани дејства и времетраење на терапија со AZA е прикажана во табела 15.

### 7.3. Анализа на пациентите според анамнестички податоци за клиничка состојба

#### 7.3.1. Карактеристики на столицата

Испитаниците се анализирани во однос на анамнестичките податоци добиени за нивната клиничка состојба, и тоа во однос на: а) број на столици дневно; б) слуз во столица; в) конзистенција на столица; г) крв во столица.

**Табела 16. Анализа на пациентите според користење AZA и селектирани варијабли за карактеристики на столицата**

Варијабла	Користење AZA			p	
	Сега користи	Не користи	Вкупно		
<b>Број на столици дневно</b>					
1 – 2	Број	15	5	20	Fisher Freeman-Halton exact test: p=0,6054
	%	46,88%	35,71%	43,48%	
3 – 6	Број	14	6	20	
	%	43,74%	42,86%	43,48%	
> 6	Број	3	3	6	
	%	9,38%	21,43%	13,04%	
Вкупно	Број	32	14	46	
	%	69,57%	30,43%	100%	
<b>Слуз во столица</b>					
Да	Број	5	7	12	Pearson Chi-square: 5,968, df=1, p=,01457*
	%	15,63%	50%	26,09%	
Не	Број	27	7	34	
	%	84,37%	50%	73,91%	
Вкупно	Број	32	14	46	
	%	69,57%	30,43%	100%	
<b>Конзистенција</b>					
Тврда	Број	12	5	17	Fisher Freeman-Halton exact test: p=0,4054
	%	37,50%	35,71%	36,96%	
Мека	Број	16	5	21	
	%	50%	35,71%	45,65%	
Течна	Број	4	4	8	
	%	12,50%	28,58%	17,39%	
Вкупно	Број	32	14	46	
	%	69,57%	30,43%	100%	
<b>Крв во столица</b>					
Да	Број	3	7	10	Fishers exact two-tailed test: p=0,0046*
	%	9,38%	50%	21,74%	
Не	Број	29	7	36	
	%	90,62%	50%	78,26%	
Вкупно	Број	32	14	46	
	%	69,57%	30,43%	100%	

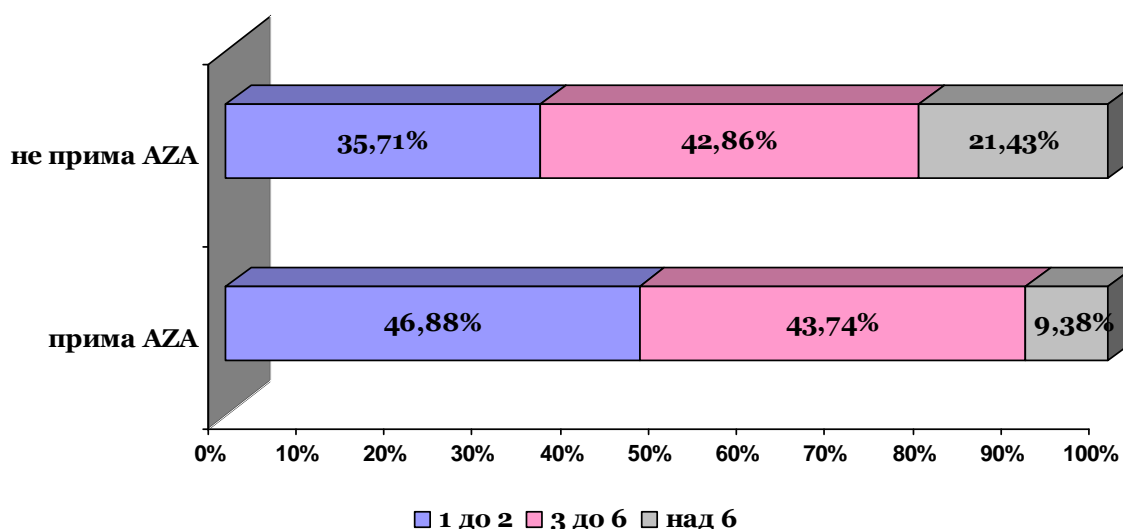
\*сигнификантно за  $p < 0,05$

\*\* сигнификантно за  $p < 0,01$

### 7.3.1.1. Број на столица дневно

Како што се гледа од табелата 16, во групата пациенти кои сега користат AZA најголемиот дел, и тоа 15 (46,88%) имаат 1-2 столица дневно, по што следат 14 (43,74%) пациенти кои имаат 3-6 столица дневно, и 3 (9,38%) со повеќе од 6 столица дневно. Во групата пациенти кои не користат AZA најголемиот дел 5 (42,86%) имаат од 3-6 столица дневно, по што следат 5 (35,71%) пациенти со 1-2 столица, и 3 (21,43%) со над 6 столица дневно (табела 16). Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу групата пациенти кои користат и оние кои не користат AZA во однос на бројот на столица дневно (Fisher Freeman-Halton exact test:  $p = 0,6054$ ).

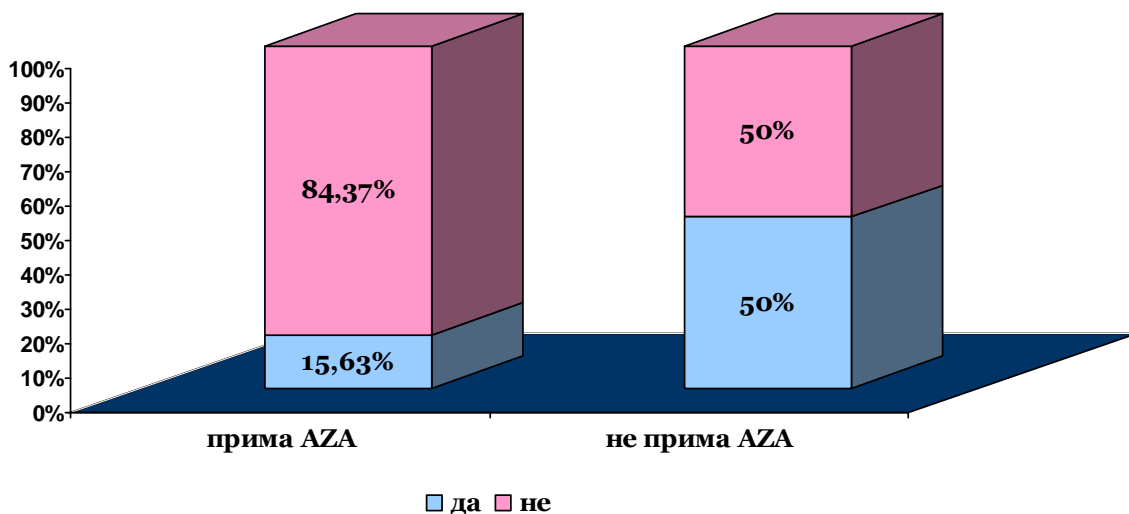
Графикон 14. Анализа според користење AZA и број на столица дневно



### 7.3.1.2. Служ во столица

Анализата според има/нема служ во столица покажа дека во групата пациенти кои користат AZA служ во столица имале само 5 (15,63%), споредено со пациентите кои не користат AZA каде служ во столица имале 7 (50%). За  $p < 0,05$  постои статистички сигнификантна разлика помеѓу двете групи пациенти во однос на имањето служ во столица (Pearson Chi-square: 5,968,  $df = 1$ ,  $p = 0,1457$ ), и тоа во прилог на помалку случаи со служ во групата пациенти кои користат AZA. Анализата на пациентите според користење AZA и имање/немање служ во столица е дадена во табела 16 и на графикон 15.

**Графикон 15. Анализа според користење AZA и слуз во столица**

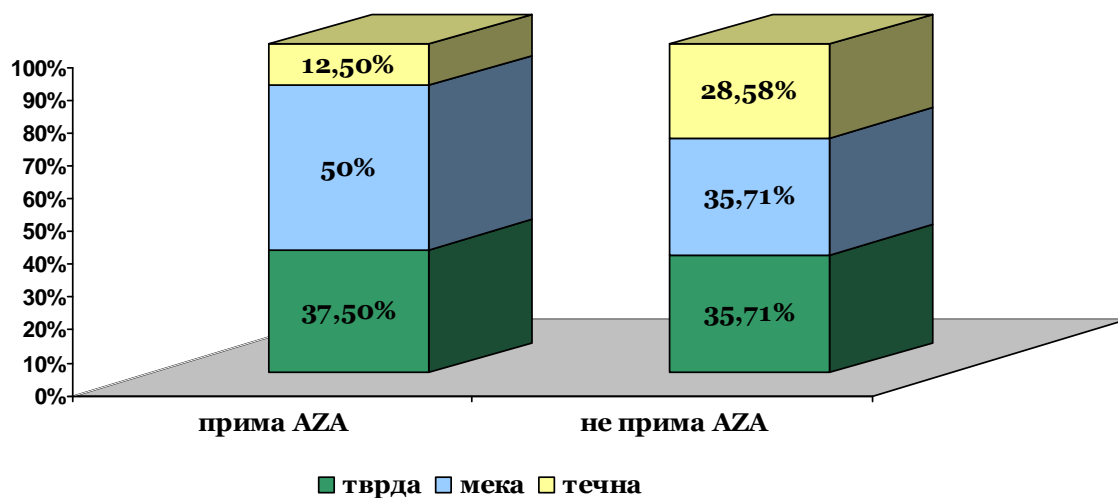


### 7.3.1.3. Конзистенција на столицата

Анализата во однос на конзистенцијата на столицата укажа дека испитаниците кои користат AZA во најголем дел, 16 (50%), имаат столица со мека конзистенција, по што следат 12 (37,5%) пациенти каде столицата има тврда конзистенција и само 4 (12,50%) со течна конзистенција. Кај пациентите кои не користат AZA бројот на пациенти кај кои столицата има тврда односно мека конзистенција е подеднаков и изнесува по 5 (35,71%) односно 4 (28,58%) пациенти кои имаат столица со течна конзистенција. Нема сигнификантна разлика,  $p > 0,05$ , помеѓу групата пациенти кои користат и оние кои не користат AZA во однос на конзистенцијата на столицата (Fisher Freeman-Halton exact test:  $p = 0,4054$ ).

Дескриптивната анализа на испитаниците кои користат AZA и конзистенцијата на столицата е прикажана во табела 16 и на графикон 16.

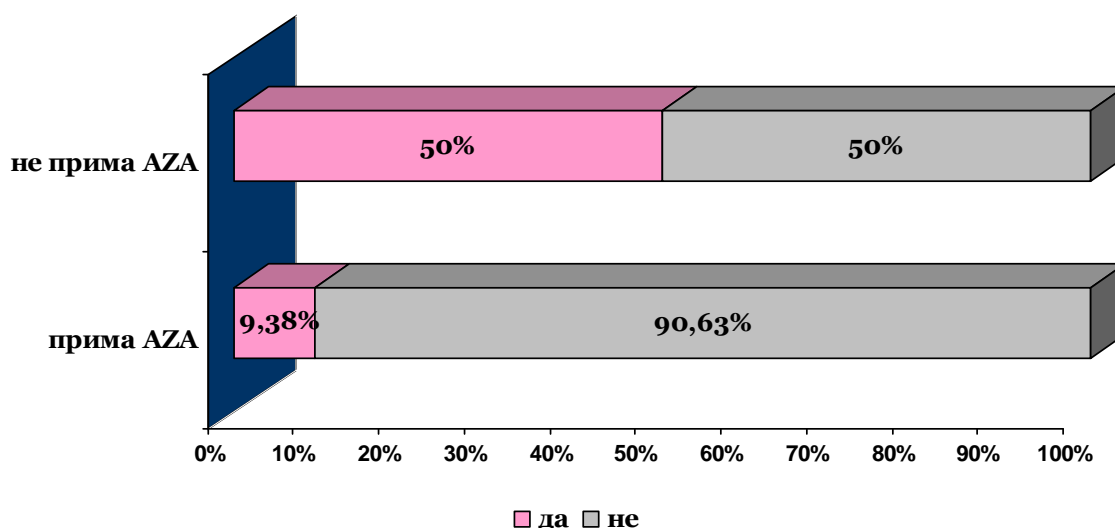
**Графикон 16. Анализа според користење AZA и конзистенција на столица**



#### 7.3.1.4. Крв во столица

Во однос на има/нема крв во столица, анализата покажа дека во групата пациенти кои примаат AZA крв во столица имале само 3 (9,38%) во споредба со групата пациенти кои не примаат AZA каде крв во столица има кај 7 (50%) од испитаниците.

**Графикон 17. Анализа според користење AZA и крв во столица**



Постои статистички сигнификантна разлика, за  $p < 0,05$ , помеѓу двете групи пациенти во однос на има/нема крв во столица (Fishers exact two-tailed test:  $p = 0,0046$ ), и тоа во прилог на помалку случаи со крв во столица во групата

пациенти кои користат AZA. Анализата на пациентите според користење AZA и има/нема крв во столица е дадена во табела 16 и на графикон 17.

### 7.3.2. Абдоминални симптоми и наод

Анализата на пациентите според користењето на AZA и селектираните варијабли во однос на абдоминалните симптоми и наод е прикажана во табела 17. Како варијабли за ова се анализирани: а) присуство на тenezми; б) абдоминална болка; в) абдоминална маса и г) субјективно чувство.

**Табела 17. Анализа на пациентите според користење AZA и селектирани варијабли за абдоминални симптоми и наод**

Варијабла	Користење AZA			P	
	Сега користи	Не користи	Вкупно		
<b>Тenezми</b>					
да	Број	4	4	8	Fishers exact two-tailed test: p=0,0115*
	%	12,50%	40%	19,05%	
не	Број	28	6	34	
	%	87,50%	60%	80,95%	
Вкупно	Број	32	10	42	
	%	76,19%	23,81%	100%	
<b>Абдоминална болка</b>					
средна	Број	29	9	38	Fishers exact two-tailed test: p=0,2771
	%	93,55%	81,82%	90,48%	
умерена	Број	2	2	4	
	%	6,45%	18,18%	9,52%	
Вкупно	Број	31	11	42	
	%	73,81%	26,19%	100%	
<b>Абдоминална маса</b>					
нема	Број	23	8	31	/
	%	74,19	25,81%	100%	
<b>Субјективно чувство</b>					
добра	Број	19	6	25	Fishers exact two-tailed test: p=0,0541*
	%	79,17%	50%	69,44%	
слаба	Број	5	6	11	
	%	20,83%	50%	30,56%	
Вкупно	Број	24	12	36	
	%	66,67%	33,33%	100%	

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

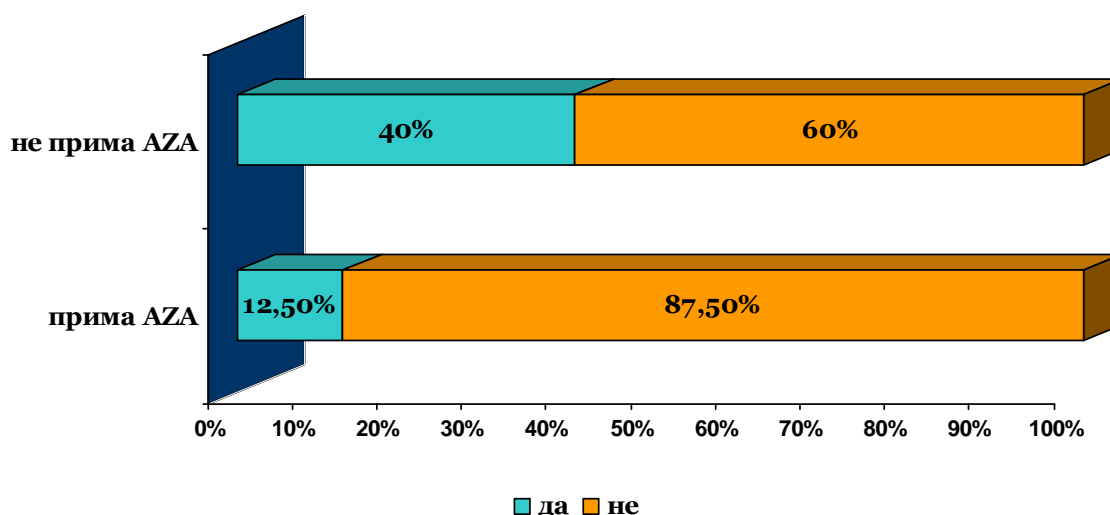
\*\* сигнификантно за  $p < 0,01$

Во однос на абдоминалната маса (нема/сомнителна/сигурна), анализата покажа дека кај сите пациенти, 31 (100%), независно дали користат или не користат AZA, согледано е отсуство на абдоминална маса, односно нема абдоминална маса.

### 7.3.2.1. Тенезми

Анализата во однос на има/нема тенезми укажа дека само 4 (12,50%) од испитаниците кои примаат AZA изјавиле дека имаат тенезми споредено со 4 (40%) од пациентите со тенезми во групата која не прима AZA. За  $p < 0,05$ , постои сигнификантна разлика помеѓу двете групи пациенти во однос на постоењето на тенезми (Fishers exact two-tailed test:  $p = 0,0115$ ), и тоа во прилог на помалку случаи со тенезми во групата пациенти кои користат AZA. Анализата на пациентите според користењето на AZA и има/нема тенезми е дадена во табела 17 и на графикон 18.

Графикон 18. Анализа според користење AZA и присуство на тенезми

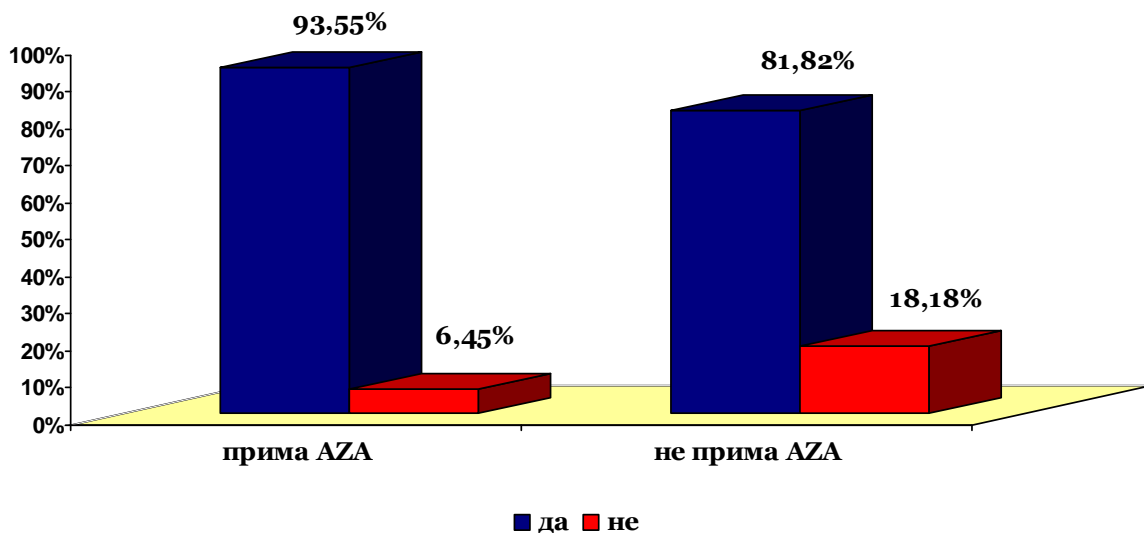




### 7.3.2.2. Абдоминална болка

Во однос на анализата на интензитетот на абдоминалната болка, анализата покажа дека и во двете групи најголемиот дел од пациентите и тоа 29 (93,55%) во групата пациенти кои примаат AZA и 9 (81,82%) во групата пациенти кои не примаат AZA абдоминалната болка е средна по интензитет. Изјава за слаба абдоминална болка дале 2 (6,45%) од испитаниците кои примаат AZA и 2 (18,18%) од оние кои не примаат AZA. Ниеден од испитаниците и во двете групи не изјавил дека абдоминалната болка му е „тешка“. Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу двете групи во однос на интензитетот на абдоминалната болка (Fishers exact two-tailed test:  $p = 0,2771$ ).

Графикон 19. Анализа според користење AZA и абдоминална болка



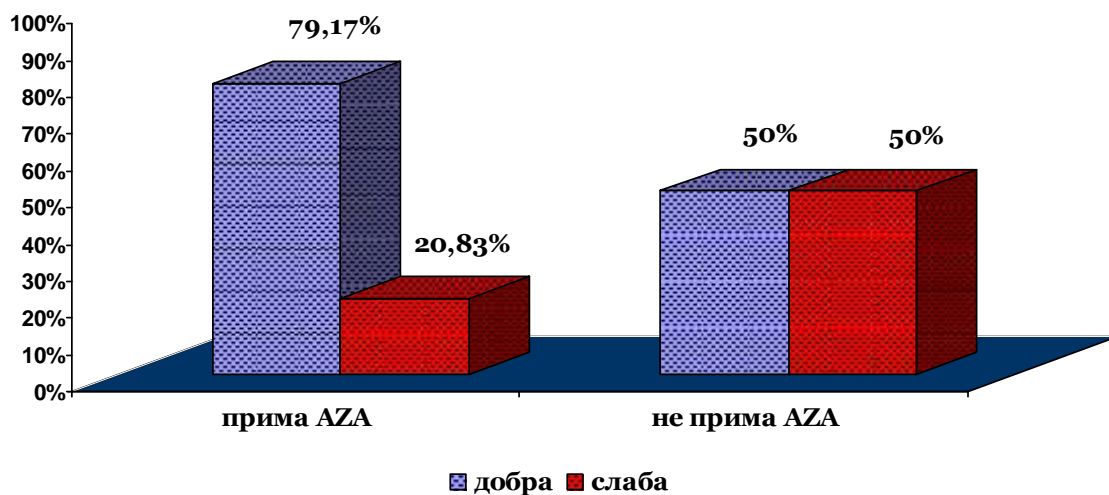
Анализата е табеларно и графички прикажана во табела 17 и на графикон 19.

### 7.3.2.3. Субјективно чувство

За анализата на субјективното чувство, на испитаниците во примерокот дадена им е можност да селектираат дали тоа е добро, слабо или лошо (табела 17 и графикон 20). Ниеден од испитаниците од двете групи не изјавил дека субјективното чувство му е лошо. Од пациентите кои примаат AZA, 19 (79,17%)

изјавиле дека субјективното чувство им е добро, додека 5 (20,83%) изјавиле дека тоа е слабо. Во групата пациенти кои не користат AZA, по 6 (50%) пациенти изјавиле дека субјективното чувство им е добро, односно слабо. За  $p < 0,05$ , постои сигнификантна разлика помеѓу двете групи во однос на субјективното чувство (Fishers exact two-tailed test:  $p = 0,0541$ ), и тоа во прилог на подобра субјективно чувство во групата пациенти кои користат AZA. Овие податоци се графички прикажани на графикон 20.

**Графикон 20. Анализа според користење AZA и субјективно чувство**



#### 7.4. Анализа на пациентите според активноста на болеста по терапија со AZA

Анализата на испитаниците според активноста на болеста по терапија со AZA опфати вкупно 39 пациенти кои во моментот на истражувањето користеле AZA. Пред почетокот на терапијата со AZA сите овие пациенти биле во акутна фаза на болеста.

**Табела 18. Дескриптивна анализа на пациентите според активност на болест по терапија со AZA и клинички тип на болеста**

Клинички тип на болеста		Активност на болест		Вкупно
		Акутна	Ремисија	
Кронова болест	Број	12	17	29
	%	41,38%	58,62%	
Улцерозен колитис	Број	4	6	10
	%	40%	60%	
Вкупно	Број	16	23	39
	%	41,03%	58,97%	100%

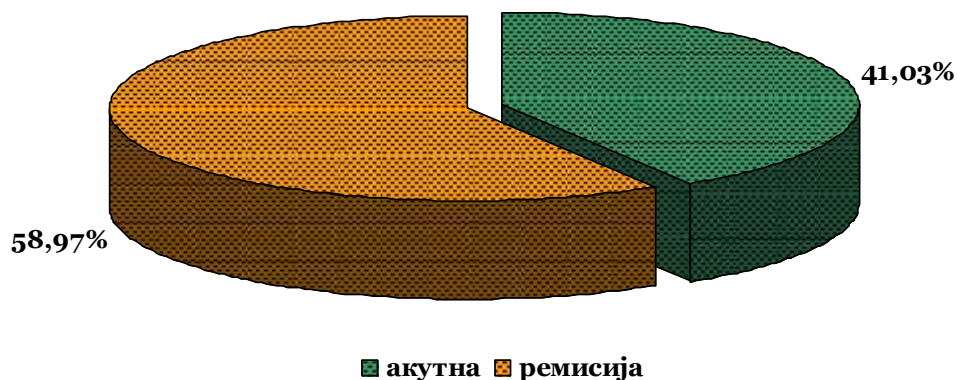
Fishers exact two-tailed test:  $p=0,9999$

**\*сигнификантно за  $p<0,05$**

Како што е прикажано на табелата 18, од вкупно 39 пациенти третирани со AZA кај 23 (58,97%) е утврдена ремисија на болеста, а кај преостанатите 16 (41,03%) болеста останала во акутна фаза. Анализата на активноста на болеста по терапија со AZA и клиничкиот тип на болеста покажа дека од 29 пациенти во акутна фаза на Кронова болест, по терапијата со AZA, во ремисија влегле 17 (58,62%). Од вкупно 10 пациенти во акутна фаза на улцерозен колитис, по терапија со AZA, ремисија е утврдена кај 6 (60%). Нема сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) помеѓу двата клинички типа на болеста во однос на активноста на болеста по терапија со AZA (Fishers exact two-tailed test:  $p=0,9999$ ).

Сите останати пациенти во истражувањето, и тоа 16-те пациенти кои никогаш не користеле AZA и 8-те пациенти кои порано користеле AZA, биле во акутна фаза на болеста. Графичкиот приказ на анализата на примерокот според активноста на болеста по терапија со AZA е даден на графикон 21.

**Графикон 21. Дескриптивна анализа на пациентите според активност на болеста по терапија со AZA**



Во рамките на истражувањето направена е дополнителна анализа на активноста на болеста по терапија со AZA во однос на времетраењето на терапијата (табела 19). Кај ниеден од пациентите кои биле на терапија помалку од 3 месеци не е утврдена ремисија на болеста. Ремисија е утврдена кај 12 (66,67%) од пациентите кои биле третирани со AZA во период од 3 до 12 месеци и кај 11 (57,89%) од пациентите кои примале AZA над 12 месеци. Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу групите со различно времетраење на терапијата со AZA во однос на активноста на болеста (Fisher Freeman-Halton exact test:  $p = 0,234$ ).

**Табела 19. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на користење AZA и активност на болест**

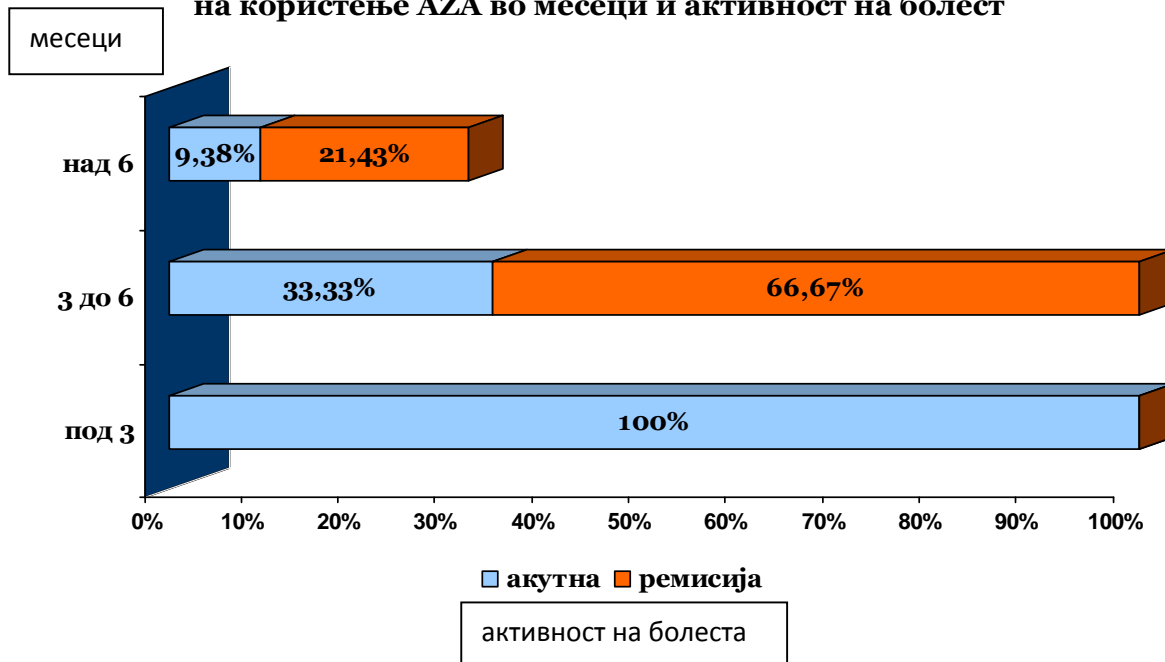
Времетраење на терапија со AZA во месеци		Активност на болест		Вкупно
		Акутна	ремисија	
< 3	Број	2	0	2
	%	100%	0%	
3 - 12	Број	6	12	18
	%	33,33%	66,67%	
> 12	Број	8	11	19
	%	42,11%	57,89%	
Вкупно	Број	16	23	39
	%	41,03%	58,97%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,234$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Анализата според активноста на болеста по терапија со AZA и времетраење на терапијата е графички прикажана на графикон 22.

**Графикон 22. Дескриптивна анализа на пациентите според времетраење на користење AZA во месеци и активност на болест**



Активноста на болеста (акутна или ремисија) е анализирана и во однос на тоа дали пациентите биле третирани со AZA или AZA+5 ASA. Како што е прикажано во табела 20, од пациентите кои биле третирани само со AZA, ремисија на болеста е согледана кај 5 (50%), додека кај пациентите кои биле третирани со AZA+5 ASA ремисија е постигната кај 13 (65%). Нема статистички сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу пациентите третирани со двата третмана и активноста на болеста (Pearson Chi-square=0,8744, df=1,  $p=0,3497$ ).

**Табела 20. Дескриптивна анализа на пациентите според користење AZA и AZA+5 ASA и активност на болест**

Третман		Активност на болест		Вкупно
		Акутна	Ремисија	
AZA	Број	9	9	18
	%	50%	50%	
AZA+5 ASA	Број	7	13	20
	%	35%	65%	
Вкупно	Број	16	22	38
	%	42,11%	57,89%	100%

Pearson Chi-square=0,874432, df=1, p=0,349734

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

## 7.5. Анализа на пациентите според екстраинтестинални манифестации

Во рамките на истражувањето анализирани се изјавите на испитаниците за постоење на екстраинтестинални манифестации како: а) зглобни манифестации (артрит/артралгија и Бехтерева болест ; б) лезии на слузницата (афтозен стоматитис); в) перианална фистула; г) кожни лезии (еритема нодозум и пиодерма гангренозум); д) други фистули; ё) црнодробни и билијарни промени (стеатоза и холелитијаза) и е) очни промени (иритис, увеитис, еписклеритис).

### 7.5.1. Промени во зглобовите

Анализата на присуство/отсуство на промени во зглобовите (артрит/артралгија и Бехтерева болест) како екстраинтестинална манифестација кај испитаниците во однос на користењето на AZA е прикажана во табела 21 и на графикон 23.

**Табела 21. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на промени во зглобовите**

Користење AZA		Промени во зглобовите		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	11	28	39
	%	28,21%	71,79%	
не користи	Број	5	11	16
	%	31,25%	68,75%	
користел порано	Број	5	3	8
	%	62,50%	37,50%	
Вкупно	Број	21	42	63
	%	33,33%	66,67%	100%

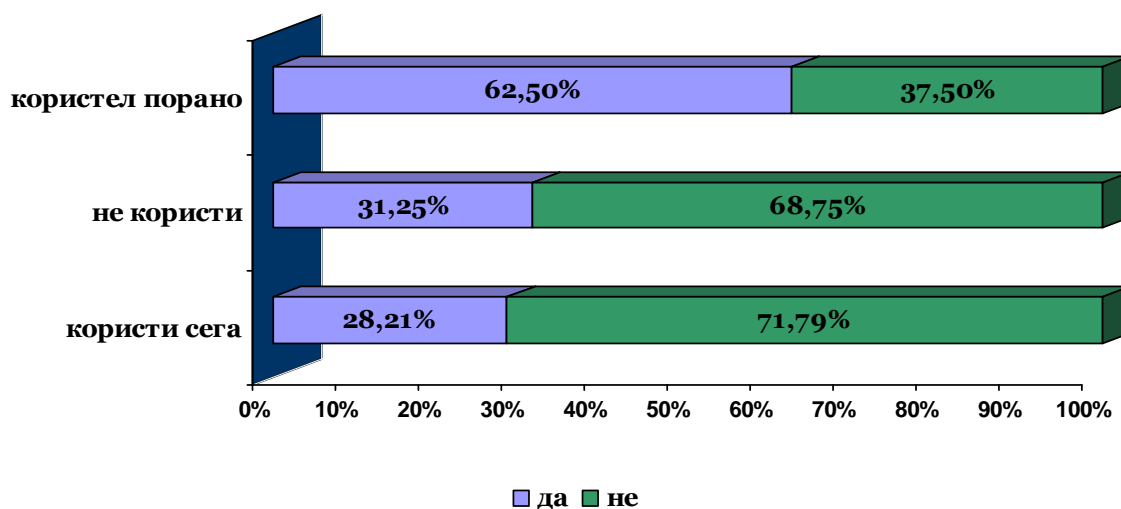
Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,1889$

користи/не користи/користел порано

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Вкупно 21 (33,33%) испитаник во примерокот изјавиле дека имаат промени во зглобовите. Артрит/артралгија имале 11 (28,21%) пациенти кои користат AZA, 5 (31,25%) испитаници кои не користат AZA и 5 (62,50%) пациенти кои порано користеле AZA. Нема сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) во појавата на артрит помеѓу групите со разлика во користењето на AZA (Fisher Freeman-Halton exact test:  $p=0,1889$ ).

**Графикон 23. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на промени во зглобовите**



Анализата за присуство на Бехтерева болест покажа дека само 1 (1,59%) испитаник од целиот примерок пациенти, кој припаѓа на групата која користи AZA ја имал оваа дијагноза. Испитаникот кој изјавил дека има Бехтерева болест, истовремено дал изјава дека има и артрит/артралгија.

Направена е дополнителна анализа на пациентите кои изјавиле дека имаат промени во зглобовите со цел согледување на честотата на нивното јавување на седум посочени локации (табела 22). Најчеста локација на промени во зглобовите е на рацете, и тоа кај 12 (57,14%) пациенти, по што следуваат 8 (38,09%) со промени на коленото, 4 (19,05%) на колкот, 3 (14,29%) на 'рбетот, 2 (9,52%) рамото и по 1 (4,76%) на вратот и скокалниот зглоб.

**Табела 22. Дескриптивна анализа според локација на промени во зглобовите**

Локација на промените во зглобовите		Вкупно
колк	Број	4
	%	19,05%
'рбет	Број	3
	%	14,29%
раце	Број	12
	%	57,14%
колена	Број	8
	%	38,09%
врат	Број	1
	%	4,76%
скокален зглоб	Број	1
	%	4,76%
рамо	Број	2
	%	9,52%



### 7.5.2. Лезии на слузницата (афтозен стоматитис)

Анализата на испитаниците во примерокот во однос на тоа дали има/нема лезии на слузницата (афтозен стоматитис) и користењето на AZA е прикажана во табела 23 и на графикон 24. Само 2 (3,17%) испитаници изјавиле дека имаат лезии на слузницата (афтозен стоматитис), а тие беа од групата пациенти кои примаат AZA.

Ниеден од пациентите во испитуваниот примерок кои не користеле или порано користеле AZA не изјавиле дека имат лезии на слузницата (афтозен стоматитис).

**Табела 23. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на лезии на слузницата (афтозен стоматитис)**

Користење AZA		Лезии на слузницата (афтозен стоматитис)		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	2	37	39
	%	5,13%	94,87%	
не користи	Број	0	16	16
	%	0%	100%	
користел порано	Број	0	8	8
	%	0%	100%	
Вкупно	Број	2	61	63
	%	3,17%	96,83%	100%

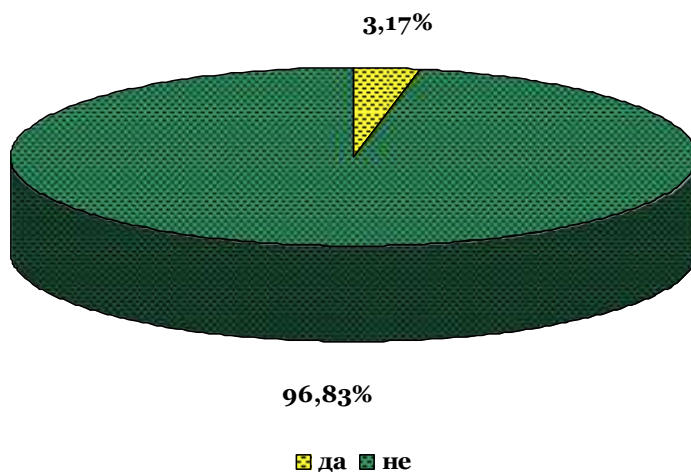
Fishers exact two-tailed test:  $p=0,5207$

користи /не користи /користел порано

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Нема сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) помеѓу користење/некористење AZA и појава на лезии на слузницата (афтозен стоматитис) (Fishers exact two-tailed test:  $p=0,5207$ ).

**Графикон 24. Дескриптивна анализа на примерокот според лезии на слузницата**



### 7.5.3. Перианална фистула

Анализата во однос на користење AZA и постоење/непостоење на перианална фистула е прикажана во табела 24 и на графикон 25. Од вкупниот број испитаници, перианална фистула има само кај 12 (19,05%), и тоа кај 10 (25,04%) од групата пациенти кои користат AZA и 2 (25%) од групата пациенти кои порано користеле AZA (сите примале AZA над три месеци).

**Табела 24. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на перианална фистула**

Користење на AZA		Перианална фистула		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	10	29	39
	%	25,64%	74,36%	
не користи	Број	0	16	16
	%	0%	100%	
користел порано	Број	2	6	8
	%	25%	75%	
Вкупно	Број	12	51	63
	%	19,05%	80,95%	100%

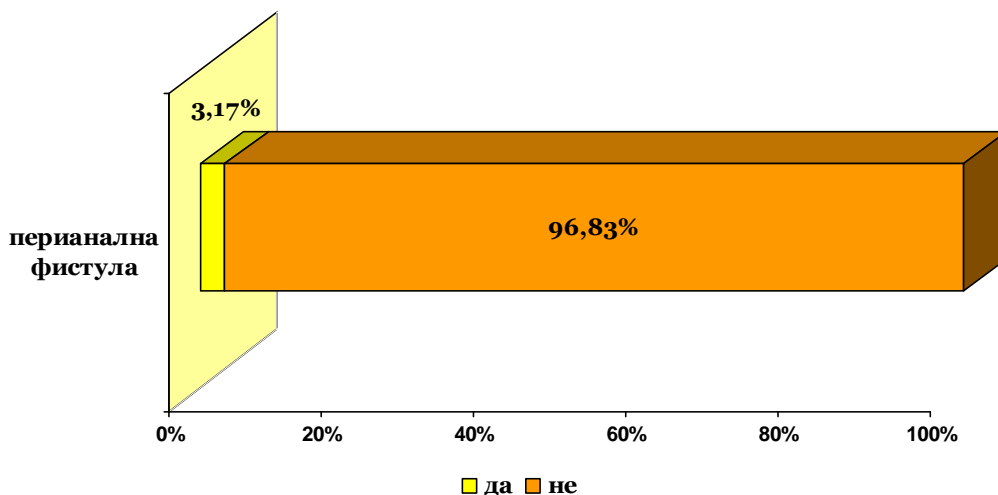
Fishers exact two-tailed test:  $p=0,11$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

користи / не користи / користел порано

Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу користење/некористење AZA и појава на перианална фистула (Fishers exact two-tailed test:  $p = 0,11$ ).

**Графикон 25. Анализа на примерокот според појава на перианална фистула**



#### 7.5.4. Кожни лезии

Направена е анализа во однос на користење AZA и постоење/непостоење на кожни лезии (еритема нодозум и пиодерма гангренозум), табела 25 и графикон 26. Појава на кожни лезии пријавиле само 4 (6,35%) испитаници од целиот примерок. Два (5,13%) пациенти кои користат AZA, 1 (6,25%) пациент кои не користи AZA и 1 (6,25%) пациент кои порано користел AZA изјавиле дека имаат кожни лезии. Нема сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) помеѓу користење/некористење AZA и појава на кожни лезии (Fisher Freeman-Halton exact test:  $p = 0,754$ ).

**Табела 25. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на кожни лезии**

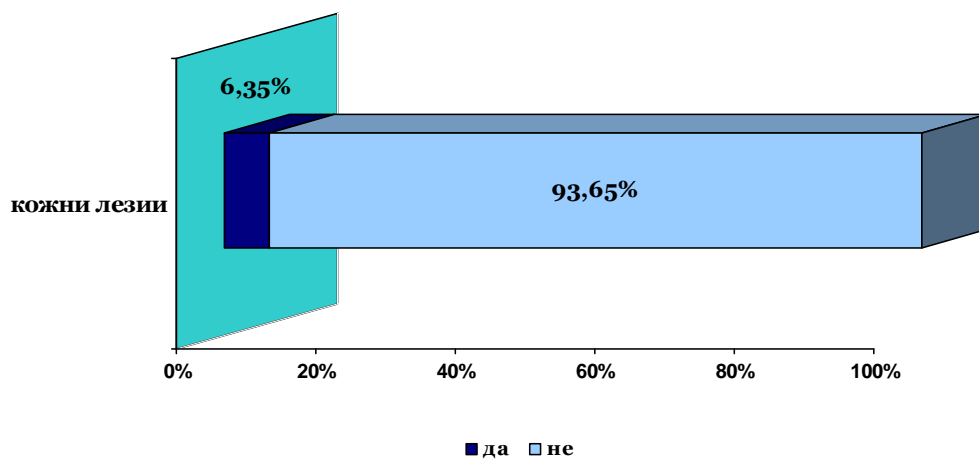
Користење AZA		Кожни лезии		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	2	37	39
	%	5,13%	94,87%	
не користи	Број	1	15	16
	%	6,25%	93,75%	
користел порано	Број	1	7	8
	%	12,50%	87,50%	
Вкупно	Број	4	59	63
	%	6,35%	93,65%	100,00%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,7545$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Анализата за присуство/отсуство на пиодерма гангренозум кај пациентите кои имат кожни лезии покажа дека во целиот примерок пациенти само 1 (1,59%) имал ваква екстраинтестинална манифестација. Овој пациент ù припаѓа на групата која сега користи AZA.

**Графикон 26. Анализа на примерокот според појава на кожни лезии**



### 7.5.5. Други фистули

Анализата на присуство/отсуство на други фистули како екстраинтестинална манифестација кај испитаниците во примерокот во однос на користењето на AZA е прикажана во табела 26 и на графикон 27.

**Табела 26. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на други фистули**

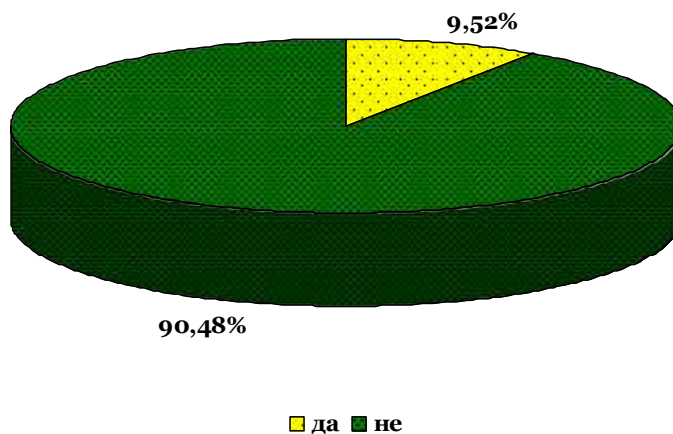
Користење AZA		Други фистули		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	4	35	39
	%	10,26%	89,74%	
не користи	Број	1	15	16
	%	6,25%	93,75%	
користел порано	Број	1	7	8
	%	12,50%	87,50%	
Вкупно	Број	6	57	63
	%	9,52%	90,48%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,9999$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Само 6 (9,52%) испитаници изјавиле дека имаат други фистули, и тоа 4 (10,26%) пациенти кои користат AZA, 1 (6,25%) пациент кој не користи AZA и 1 (12,50%) пациент кој порано користел AZA. Нема сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) во појавата на други фистули помеѓу групите со разлика во користењето на AZA (Fisher Freeman-Halton exact test:  $p=0,9999$ ).

**Графикон 27. Анализа на примерокот според појава на други фистули**



Направена е дополнителна анализа на пациентите кои изјавиле дека имаат други фистули за согледување на честотата на јавување (табела 27). Најчеста е ентерокутана фистула на преден абдоминален сид и илео-илеална фистула застапени кај по 2 (33,33%) од пациентите. Ректовагинална фистула, ентерокутана фистула на колк и вагинална фистула се застапени кај по 1 (16,67%) од пациентите.

**Табела 27. Дескриптивна анализа според локација на други фистули**

Локација на други фистули		Вкупно
Ректовагинална фистула	<b>Број</b>	1
	<b>%</b>	16,67%
Ентерокутана фистула на преден абдоминален сид	<b>Број</b>	2
	<b>%</b>	33,33%
Ентерокутана фистула на колк	<b>Број</b>	1
	<b>%</b>	16,67%
Илео-илеална фистула	<b>Број</b>	2
	<b>%</b>	33,33%
Вагинална фистула	<b>Број</b>	1
	<b>%</b>	16,67%

### 7.5.6. Црнодробни и билијарни промени

Како што е прикажано во табелата 28, анализата за присуство/отсуство на црнодробни и билијарни промени (холелитијаза и стеатоза) покажа дека кај сите пациенти само 2 (3,17%) имале ваква екстраинтестинална манифестација. По еден од овие пациенти припаѓа на групата која сега, односно порано користела AZA.

**Табела 28. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на црнодробни и билијарни промени**

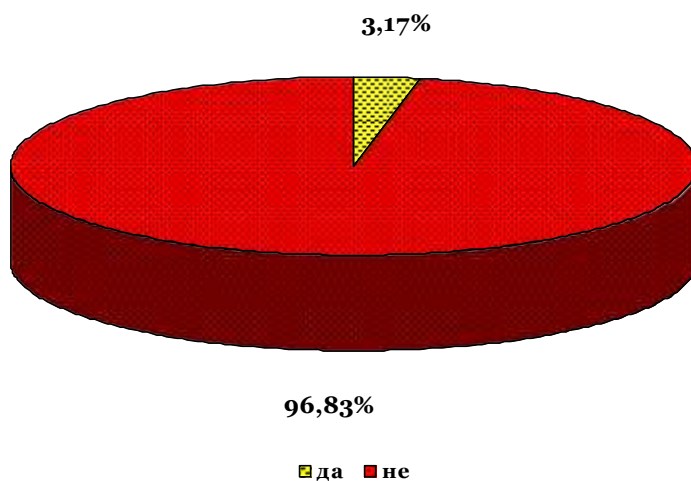
Користење AZA		Црнодробни и билијарни промени		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	1	38	39
	%	2,56%	97,44%	
не користи	Број	0	16	16
	%	0%	100%	
користел порано	Број	1	7	8
	%	12,50%	87,50%	
Вкупно	Број	2	61	63
	%	3,17%	96,83%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,3011$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Графичкиот приказ на анализата на примерокот во однос на присуство/отсуство на црнодробни и билијарни промени е даден на графикон 28.

**Графикон 28. Анализа според појава на црнодробни и билијарни промени**



Нема сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) во појавата на црнодробни и билијарни промени помеѓу групите во однос на користењето на AZA (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,3011$ ). Поединечната анализа за присуство/отсуство на холелитијаза т.е. на стеатоза покажа дека во целиот примерок, 1 (2,56%) испитаник имал стеатоза и тој ù припаѓа на групата која сега користи AZA, и 1 (2,56%) има холелитијаза и тој ù припаѓа на групата која порано користела AZA.

### 7.5.7. Промени на очите

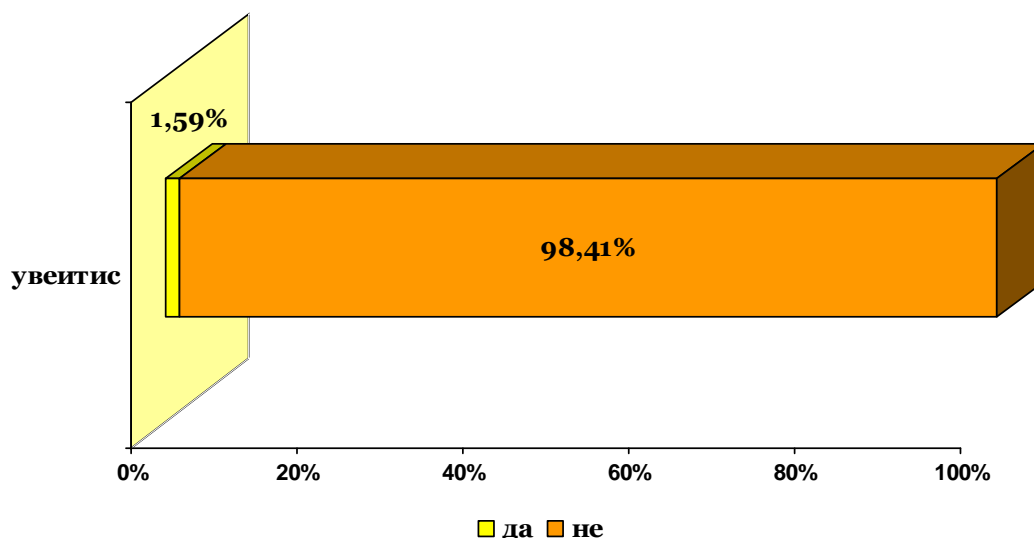
Анализата за присуство/отсуство на промени на очите (иритис, увеитис, еписклеритис) покажа дека само 1 (1,59%) испитаник од целиот примерок пациенти, кој ù припаѓа на групата која користи AZA, имал увеитис како екстраинтестинална манифестација (табела 29).

**Табела 29. Дескриптивна анализа на примерокот по користење AZA и појава на промени на очите**

Користење AZA		Увеитис		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	1	38	39
	%	2,56%	97,44%	
не користи	Број	0	16	16
	%	0%	100%	
користел порано	Број	0	8	8
	%	0%	100%	
Вкупно	Број	1	62	63
	%	1,59%	98,41%	100%

Графичкиот приказ на анализата на примерокот во однос на присуство/отсуство на увеитис е даден на графикон 29.

**Графикон 29. Анализа според појава на промени на очите**





### 7.5.8. Сумирана анализа на појава на екстраинтестинални манифестации и користење AZA

Сумирана анализа на појава на екстраинтестинални манифестации и користење AZA е прикажано во табелата 30.

**Табела 30. Дескриптивна анализа на пациентите по користење AZA и појава на екстраинтестинални манифестации**

Користење AZA		Екстраинтестинални манифестации		Вкупно
		да	не	
сега користи	Број	20	19	39
	%	51,28%	48,72%	
не користи	Број	6	10	16
	%	37,50%	62,50%	
користел порано	Број	6	2	8
	%	75%	25%	
Вкупно	Број	32	31	63
	%	50,79%	49,21%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,2194$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Како што се гледа од табелата 30, анализата за присуство/отсуство на екстраинтестинални манифестации според користењето на AZA покажа дека најголем број екстраинтестинални манифестации има во групата која порано користела AZA и тоа 6 (75%), по што следи групата која сега користи AZA со 20 (51,28%) испитаници кои пријавиле такви манифестации, а најмалку пријавени екстраинтестинални манифестации и тоа 6 (37,50%) има во групата која не користи AZA. Дополнителната анализа не покажа сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) меѓу групите со различно користење AZA и појава на екстраинтестинални манифестации (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,2194$ )

**Табела 31. Број на екстраинтестинални манифестации по пациент според користење AZA**

Користење AZA	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медиана (Median)
<b>сега користи</b>	1,95	20	1,09	1	4	1
<b>не не користи</b>	1,67	6	0,52	1	2	2
<b>користел порано</b>	2,33	6	1,63	1	5	2

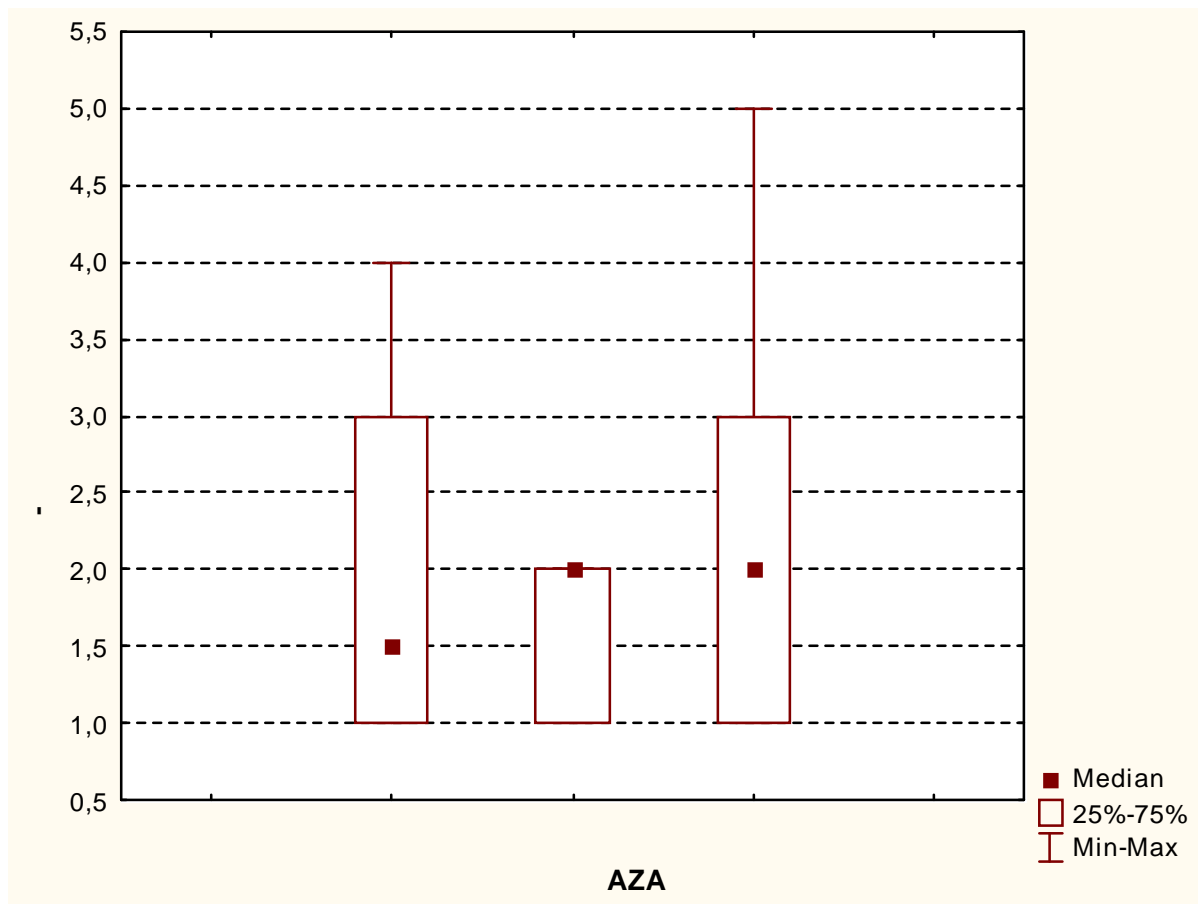
Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=0,2834$ ,  $p=0,8679$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Трите групи според користењето на AZA се анализирани во однос на просечниот број пријавени екстраинтестинални манифестации по испитаник (табела 31). Анализата покажа дека најголем просечен број пријавени екстраинтестинални манифестации по испитаник, и тоа  $2,33 \pm 1,63$ , има во групата која порано користела AZA, со минимум едно и максимум 5 несакани дејства по испитаник. Просечен број екстраинтестинални манифестации од  $1,95 \pm 1,09$  има во групата која сега користи AZA, со минимум едно и максимум 4 екстраинтестинални манифестации по испитаник. Најмалку или со просечен број екстраинтестинални манифестации од  $1,67 \pm 0,52$  по испитаник има во групата која не користи AZA, со минимум едно и максимум две екстраинтестинални манифестации. Анализата на медијаната покажа дека 50% од испитаниците во трите групи имаат над 1 v.s. 2 v.s. 2 екстраинтестинални манифестации по испитаник. Тестираната разлика на просечниот број екстраинтестинални манифестации по испитаник не покажа сигнификантна разлика ( $p>0,05$ ) меѓу трите групи (Kruskal-Wallis ANOVA test:  $H=0,2834$ ,  $p=0,8679$ ).

Графичкиот приказ на бројот на екстраинтестинални манифестации по испитаник според користењето на AZA е даден на графикон 30.

**Графикон 30. Број на екстраинтестинални манифестации по испитаник според користење AZA**



## 7.6. Анализа на пациентите според биохемиски параметри

Кај сите испитаници беше земена крв за одредување на рутински хематолошки испитувања, протеински статус, хепатални ензими и алфа-амилаза во серум.

### 7.6.1. Седиментација (SE)

Просечната SE на целиот примерок испитаници изнесува  $29,26 \text{ mm/h} \pm 30,08 \text{ mm/h}$  со минимална вредност од  $3 \text{ mm/h}$  и максимална вредност од  $120 \text{ mm/h}$ , како и просечна вредност кај 50% од испитаниците над  $20 \text{ mm/h}$  (табела 32 и графикон 31). Просечната SE на пациентите кои користат AZA изнесува  $31,59 \text{ mm/h} \pm 32,23 \text{ mm/h}$ , со минимална вредност од  $3 \text{ mm/h}$  и максимална возраст од  $120 \text{ mm/h}$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група SE е над  $20 \text{ mm/h}$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на SE изнесува  $17,33 \text{ mm/h} \pm 10,02 \text{ mm/h}$ , со минималната вредност од  $7 \text{ mm/h}$  и максимална вредност од  $27 \text{ mm/h}$ . Кај 50% од пациентите во оваа група SE е над  $18 \text{ mm/h}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на SE во двете групи е несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=0,503$ ;  $p=0,6149$ ).

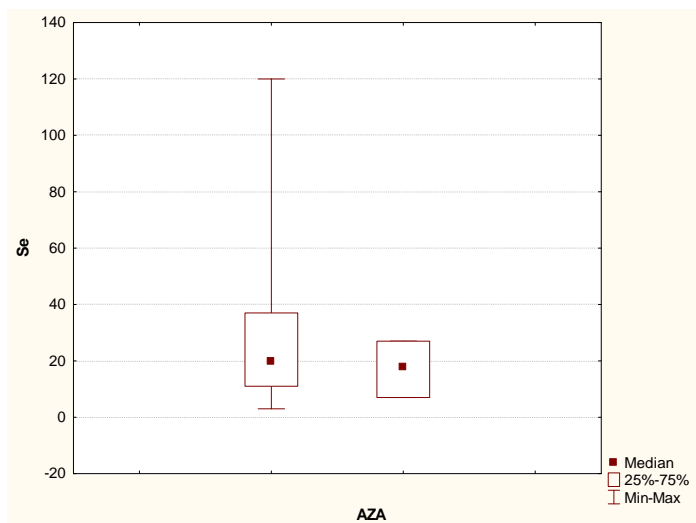
**Табела 32. Анализа на пациентите според користење AZA и SE**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	16	31,50	32,23	20	3	120
не користи AZA	3	17,33	10,02	18	7	27
<b>Вкупно</b>	<b>19</b>	<b>29,26</b>	<b>30,08</b>	<b>20</b>	<b>3</b>	<b>120</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=0,503$   $p=0,6149$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

**Графикон 31. Анализа на пациентите според користење AZA и SE**



### 7.6.2. Хемоглобин (Hb)

Во целиот примерок испитаници просечната вредност на Hb изнесува  $128,38 \text{ gr/dl} \pm 18,65 \text{ gr/dl}$ , со минимална вредност од  $88 \text{ gr/dl}$  и максимална вредност од  $169 \text{ gr/dl}$ , како и просечна вредност над  $128 \text{ gr/dl}$  кај 50% од испитаниците (табела 33 и графикон 32). Просечниот Hb на пациентите кои користат AZA изнесува  $128,6 \text{ gr/dl} \pm 20,78 \text{ gr/dl}$ , со минимална вредност од  $88 \text{ gr/dl}$  и максимална вредност од  $169 \text{ gr/dl}$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група Hb изнесува над  $130 \text{ gr/dl}$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на Hb изнесува  $127,83 \text{ gr/dl} \pm 12,57 \text{ gr/dl}$ , со минималната вредност од  $108 \text{ gr/dl}$  и максимална вредност од  $146 \text{ gr/dl}$ . Кај 50% од пациентите во оваа група Hb е над  $125 \text{ gr/dl}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на Hb во двете групи е несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (t-test for independent samples = 0,1189 df=4 p=0,9059).

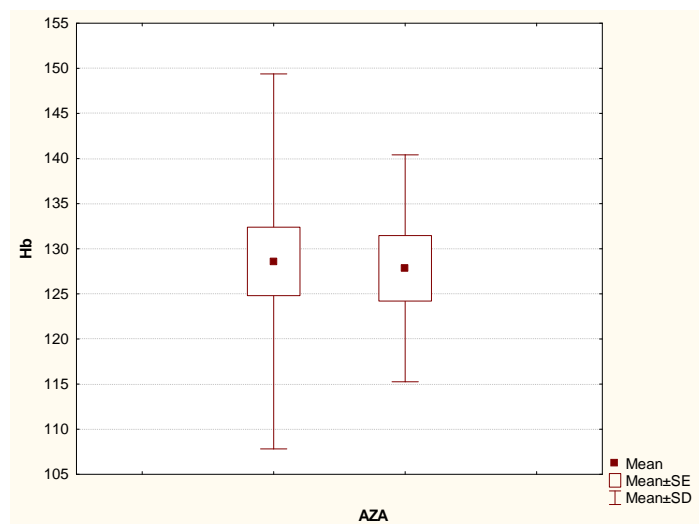
Табела 33. Анализа на пациентите според користење AZA и Hb

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	30	128,60	20,78	130	88	169
не користи AZA	12	127,83	12,57	125	108	146
Вкупно	42	128,38	18,65	128	88	169

t-test for independent samples=0,1189 df=40 p=0,9059

\*сигнификантно за  $p < 0,05$ 

Графикон 32. Анализа на пациентите според користење AZA и Hb



### 7.6.3. Еритроцити (Er)

Просечната вредност на Er кај сите испитаници изнесува  $4,48 \cdot 10^{12}/L \pm 0,6110^{12}/L$ , со минимална вредност од  $2,8 \cdot 10^{12}/L$  и максимална вредност од  $6,5 \cdot 10^{12}/L$ , како и просечна вредност кај 50% од испитаниците над  $4,4 \cdot 10^{12}/L$  (табела 34 и графикон 33). Просечната вредност на Er на пациентите кои користат AZA изнесува  $4,41 \cdot 10^{12}/L \pm 0,58 \cdot 10^{12}/L$ , со минимална вредност од  $2,8 \cdot 10^{12}/L$  и максимална вредност од  $5,6 \cdot 10^{12}/L$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Er е над  $4,4 \cdot 10^{12}/L$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на Er изнесува  $4,68 \cdot 10^{12}/L \pm 0,69 \cdot 10^{12}/L$ , со минималната вредност од  $3,7 \cdot 10^{12}/L$  и максимална вредност од  $6,5 \cdot 10^{12}/L$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Er е над  $4,6$

$10^{12}/L$ . Тестираната разлика на просечните вредности на Ег во двете групи е неситнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -1,0804$ ;  $p = 0,2799$ ).

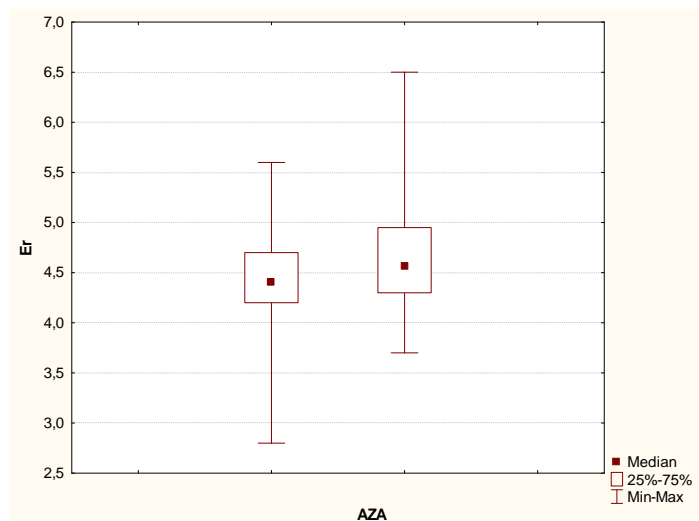
**Табела 34. Анализа на пациентите според користење AZA и Ег**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	32	4,41	0,58	4,4	2,8	5,6
не користи AZA	12	4,68	0,69	4,6	3,7	6,5
Вкупно	44	4,48	0,61	4,4	2,8	6,5

Mann-Whitney U Test  $Z = -1,0804$   $p = 0,2799$

\*ситнификантно за  $p < 0,05$

**Графикон 33. Анализа на пациентите според користење AZA и Ег**



#### 7.6.4. Хематокрит (Ht)

Во примерокот испитаници просечната вредност на Ht изнесува  $0,38 L/L \pm 0,05 L/L$ , со минимална вредност од  $0,26 L/L$  и максимална вредност од  $0,49 L/L$ , како и просечна вредност над  $0,39 L/L$  кај 50% од испитаниците (табела 35 и графикон 34). Просечниот Ht на пациентите кои користат AZA изнесува  $0,38 L/L \pm 0,05 L/L$ , со минимална вредност од  $0,26 L/L$  и максимална вредност од  $0,49 L/L$ . Кај 50% од пациентите во оваа група Ht изнесува над  $0,39 L/L$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на Ht изнесува  $0,39 L/L \pm 0,04 L/L$ , со минималната вредност од  $0,33 L/L$  и максимална

вредност од 0,44 L/L. Кај 50% од пациентите во оваа група Ht е над 0,39 L/L. Тестираната разлика на просечните вредности на Ht во двете групи не е сигнификантна ( $p > 0,05$ ) (t-test for independent samples = -1,268 df=42  $p = 0,2117$ ).

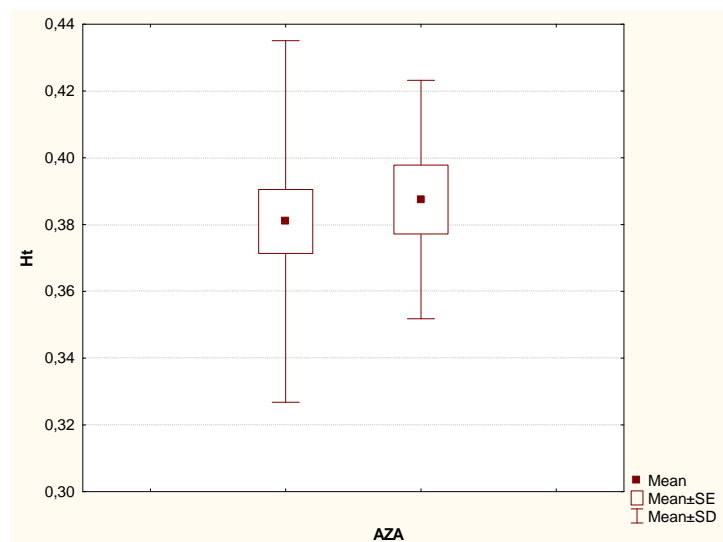
**Табела 35. Анализа на пациентите според користење AZA и Ht**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	32	0,38	0,05	0,39	0,26	0,49
не користи AZA	12	0,39	0,04	0,39	0,33	0,44
Вкупно	44	0,38	0,05	0,39	0,26	0,49

t-test for independent samples = -1,2681 df=42  $p = 0,2117$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

**Графикон 34. Анализа на пациентите според користење AZA и Ht**



### 7.6.5. Леукоцити (Le)

Просечната вредност на Le кај сите испитаници изнесува  $7,55 \cdot 10^9/L \pm 2,92 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од 2,5 и максимална вредност од  $14,5 \cdot 10^9/L$ , како и просечна вредност над  $6,8 \cdot 10^9/L$  кај 50% од испитаниците (табела 36 и графикон 35).



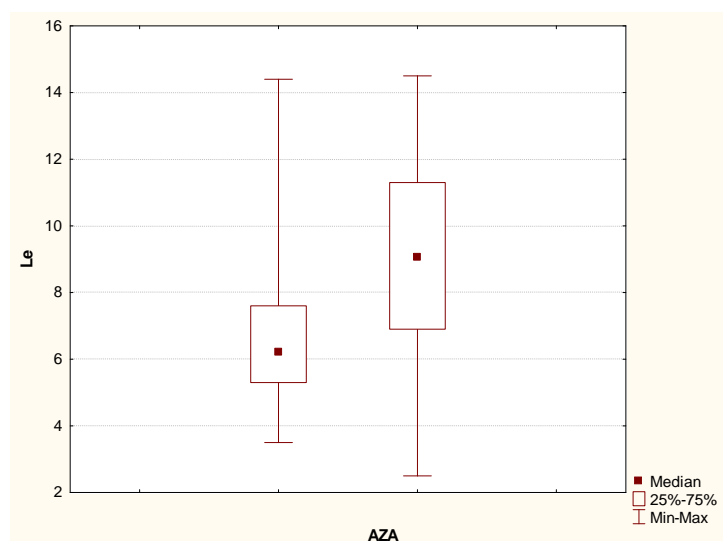
Табела 36. Анализа на пациентите според користење AZA и Le

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	32	6,97	2,61	6,2	3,5	14,4
не користи AZA	12	9,07	3,26	9,1	2,5	14,5
Вкупно	44	7,55	2,92	6,8	2,5	14,5

Mann-Whitney U Test  $Z=-2,4112$   $p=0,0159^*$ \*сигнификантно за  $p<0,05$ 

Просечната вредност на Le на пациентите кои користат AZA изнесува  $6,97 \cdot 10^9/L \pm 2,61 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $3,5 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $14,4 \cdot 10^9/L$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Le е над  $6,2 \cdot 10^9/L$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на Le изнесува  $9,07 \cdot 10^9/L \pm 3,26 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $2,5 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $14,5 \cdot 10^9/L$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Le е над  $9,1 \cdot 10^9/L$ . Тестираната разлика на просечните вредности на Le во двете групи е сигнификантна ( $p<0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=-2,4112$   $p=0,0159$ ), што оди во прилог на повисоки вредности во групата пациенти кои не користат AZA.

Графикон 35. Анализа на пациентите според користење AZA и Le



### 7.6.6. Лимфоцити (Ly)

Просечната вредност на Ly во примерокот изнесува  $0,36 \cdot 10^9/L \pm 0,67 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $0,1 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $4,6 \cdot 10^9/L$ , како и просечна вредност над  $0,26 \cdot 10^9/L$  кај 50% од испитаниците (табела 37 и графикон 36).

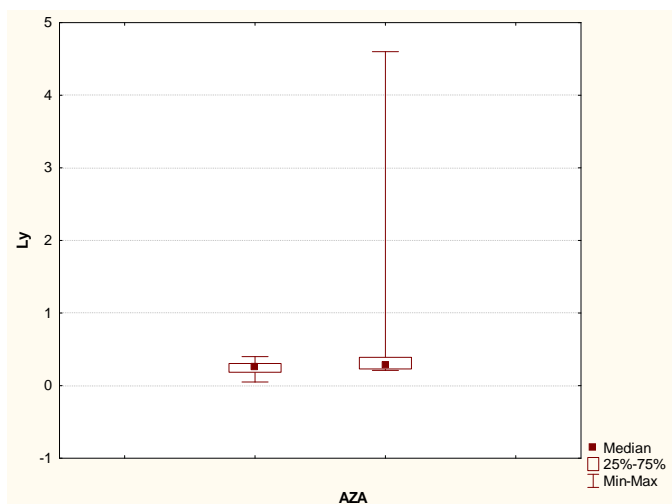
**Табела 37. Анализа на пациентите според користење AZA и Ly**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	32	0,25	0,09	0,26	0,1	0,4
не користи AZA	11	0,68	1,30	0,28	0,2	4,6
<b>Вкупно</b>	<b>43</b>	<b>0,36</b>	<b>0,67</b>	<b>0,26</b>	<b>0,1</b>	<b>4,6</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-1,5866$   $p=0,1126$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Просечната вредност на Ly на пациентите кои користат AZA изнесува  $0,25 \cdot 10^9/L \pm 0,09 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $0,1 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $0,4 \cdot 10^9/L$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Ly е над  $0,26 \cdot 10^9/L$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на Ly изнесува  $0,68 \cdot 10^9/L \pm 1,30 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $0,2 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $4,6 \cdot 10^9/L$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Ly е над  $0,28 \cdot 10^9/L$ . Тестираната разлика на просечните вредности на Ly во двете групи е несигнификантна ( $p>0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=-1,587$ ;  $p=0,1126$ ).

**Графикон 36. Анализа на пациентите според користење AZA и Ly****7.6.7. Неутрофили (Ne)**

Анализата покажа дека во примерокот испитаници просечната вредност на Ne изнесува  $0,67 \cdot 10^9/L \pm 0,09 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $0,51 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $0,92 \cdot 10^9/L$ , како и просечна вредност над  $0,67$  кај 50% од испитаниците (табела 38 и графикон 37).

**Табела 38. Анализа на пациентите според користење AZA и Ne**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	32	0,68	0,09	0,68	0,51	0,92
не користи AZA	11	0,64	0,06	0,66	0,56	0,72
<b>Вкупно</b>	<b>43</b>	<b>0,67</b>	<b>0,09</b>	<b>0,67</b>	<b>0,51</b>	<b>0,92</b>

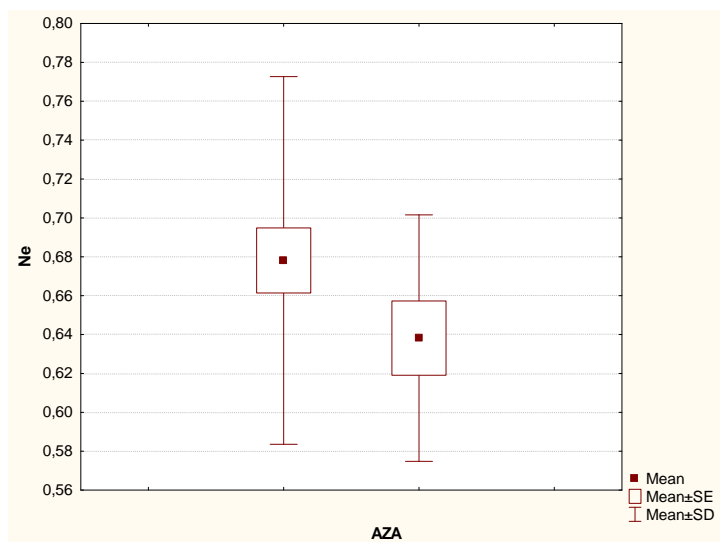
t-test for independent samples=1,299 df=41 p=0,2011

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Просечните вредности на Ne на пациентите кои користат AZA изнесува  $0,67 \cdot 10^9/L \pm 0,09 \cdot 10^9/L$ , со минимална вредност од  $0,51 \cdot 10^9/L$  и максимална вредност од  $0,92 \cdot 10^9/L$ . Кај 50% од пациентите во оваа група Ne изнесува над  $0,68 \cdot 10^9/L$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на Ne изнесува  $0,64 \cdot 10^9/L \pm 0,06 \cdot 10^9/L$ , со минималната вредност од  $0,56 \cdot 10^9/L$  и

максимална вредност од  $0,72 \cdot 10^9/L$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на Ne е над  $0,66 \cdot 10^9/L$ . Тестираната разлика на просечните вредности на Ne во двете групи не е статистички сигнификантна ( $p > 0,05$ ) (t-test for independent samples  $t=1,299$   $df=41$   $p=0,2011$ ).

**Графикон 37. Анализа на пациентите според користење AZA и Ne**



### 7.6.8. Вкупни протеини

Просечната вредност на вкупните протеини кај испитаниците изнесува  $72,69 \text{ g/L} \pm 7,16 \text{ g/L}$ , со минимална вредност од  $47 \text{ g/L}$  и максимална вредност од  $86 \text{ g/L}$ , како и просечна вредност над  $73 \text{ g/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 39 и графикон 38).

**Табела 39. Анализа според користење AZA и вкупни протеини**

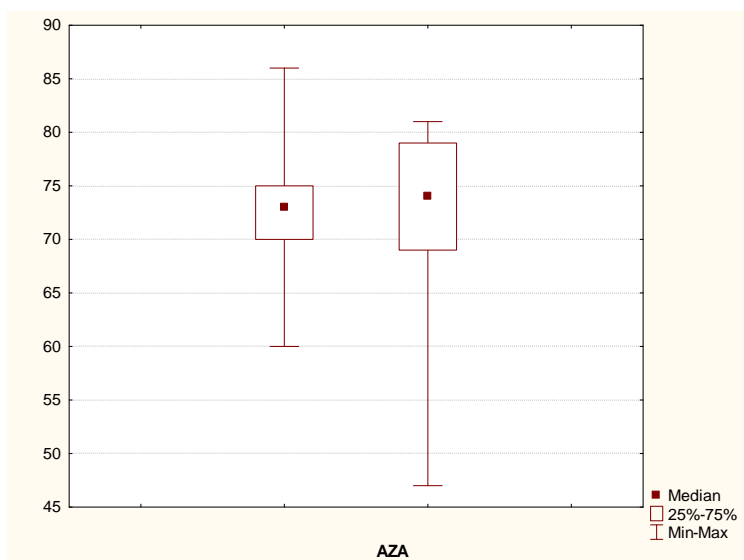
Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	26	73,04	5,70	73	60	86
не користи AZA	10	71,80	10,39	74	47	81
<b>Вкупно</b>	<b>36</b>	<b>72,69</b>	<b>7,16</b>	<b>73</b>	<b>47</b>	<b>86</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-0,1589$ ;  $p=0,8737$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Просечната вредност на вкупните протеини на пациентите кои користат AZA изнесува  $73,04 \text{ g/L} \pm 5,70 \text{ g/L}$ , со минимална вредност од  $60 \text{ g/L}$  и максимална вредност од  $86 \text{ g/L}$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на вкупните протеини е над  $73 \text{ g/L}$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на вкупните протеини изнесува  $71,80 \text{ g/L} \pm 10,39 \text{ g/L}$ , со минималната вредност од  $47 \text{ g/L}$  и максимална вредност од  $81 \text{ g/L}$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на вкупните протеини е над  $73 \text{ g/L}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на вкупните протеини во двете групи е статистички несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -0,1589$ ;  $p = 0,8737$ ).

**Графикон 38. Анализа според користење AZA и вкупно протеини**



### 7.6.9. Албумини

Просечната вредност на албумините во целиот примерок изнесува  $43,4 \text{ g/L} \pm 4,7 \text{ g/L}$ , со минимална вредност од  $32 \text{ g/L}$  и максимална вредност од  $50 \text{ g/L}$ , како и просечна вредност над  $43,5 \text{ g/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 40). Просечната вредност на албумините на пациентите кои користат AZA изнесува  $43,1 \text{ g/L} \pm 4,3 \text{ g/L}$ , со минимална вредност од  $32 \text{ g/L}$  и максимална вредност од  $50 \text{ g/L}$ . Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на албумините е над  $43,5 \text{ g/L}$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на албумините изнесува  $44 \text{ g/L} \pm 6 \text{ g/L}$ , со

минималната вредност од 32 g/L и максимална вредност од 49 g/L. Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на албумините е над 47 g/L. Тестираната разлика на албумините во двете групи е статистички несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -1,271$   $p = 0,2036$ ).

**Табела 40. Анализа според користење AZA и албумини**

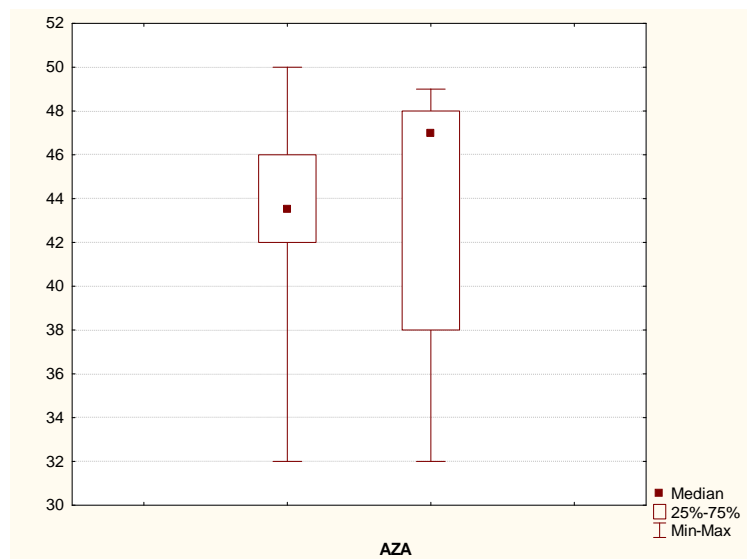
Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	26	43,1	4,3	43,5	32	50
не користи AZA	10	44,0	6,0	47	32	49
<b>Вкупно</b>	<b>36</b>	<b>43,4</b>	<b>4,7</b>	<b>44,5</b>	<b>32</b>	<b>50</b>

Mann-Whitney U Test  $Z = -1,2715$   $p = 0,2036$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Графичкиот приказ на анализата според користење AZA и вредностите на албумини е претставен на графикон 39.

**Графикон 39. Анализа според користење AZA и албумини**



### 7.6.10. Железо (Fe)

Просечната вредност на Fe во примерокот изнесува  $10,92 \mu\text{mol/L} \pm 6,54 \mu\text{mol/L}$ , со минимална вредност од  $2 \mu\text{mol/L}$  и максимална вредност од  $30,9 \mu\text{mol/L}$ , како и просечна вредност над  $9,6 \mu\text{mol/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 41 и графикон 40).

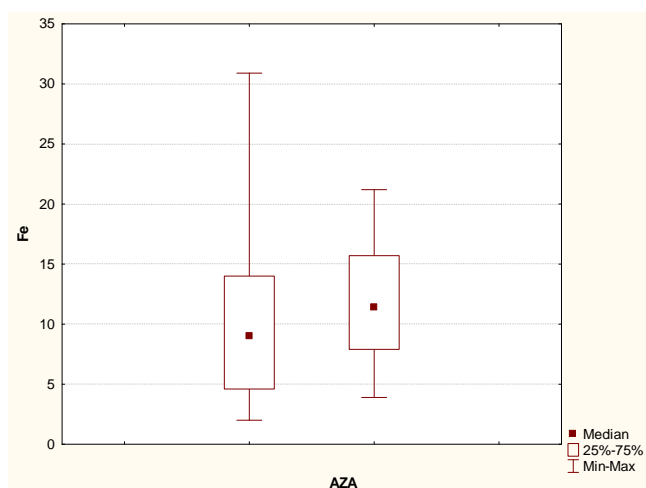
**Табела 41. Анализа според користење AZA и Fe**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	19	10,39	7,12	9	2	30,9
не користи AZA	12	11,75	5,69	11,4	3,9	21,2
<b>Вкупно</b>	<b>31</b>	<b>10,92</b>	<b>6,54</b>	<b>9,6</b>	<b>2</b>	<b>30,9</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-0,8922$   $p=0,3723$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Просечната вредност на Fe на пациентите кои користат AZA изнесува  $10,39 \mu\text{mol/L} \pm 7,12 \mu\text{mol/L}$ , со минимална вредност од  $2 \mu\text{mol/L}$  и максимална вредност од  $30,9 \mu\text{mol/L}$ . Според анализата на медијана, кај 50% од овие пациенти вредноста на Fe е над  $9 \mu\text{mol/L}$ . Кај пациентите кои не користат AZA, просечната вредност на Fe изнесува  $11,75 \mu\text{mol/L} \pm 5,69 \mu\text{mol/L}$ , со минималната вредност од  $3,9 \mu\text{mol/L}$  и максимална вредност од  $21,2 \mu\text{mol/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на Fe е над  $11,4 \mu\text{mol/L}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на Fe во двете групи е статистички несигнификантна ( $p>0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=-0,8922$   $p=0,3723$ ).

**Графикон 40. Анализа според користење AZA и Fe****7.6.11. Среден волумен на еритроцити (MCV)**

Просечната вредност на MCV во примерокот изнесува  $85,70 \text{ fL} \pm 10,74 \text{ fL}$ , со минимална вредност од  $61 \text{ fL}$  и максимална вредност од  $106 \text{ fL}$ , како и просечна вредност над  $87 \text{ fL}$  кај 50% од испитаниците (табела 42 и графикон 41).

**Табела 42. Анализа според користење AZA и MCV**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	31	85,96	10,31	87	68	106
не користи AZA	11	84,96	12,37	87	61	102
<b>Вкупно</b>	<b>42</b>	<b>85,70</b>	<b>10,74</b>	<b>87</b>	<b>61</b>	<b>106</b>

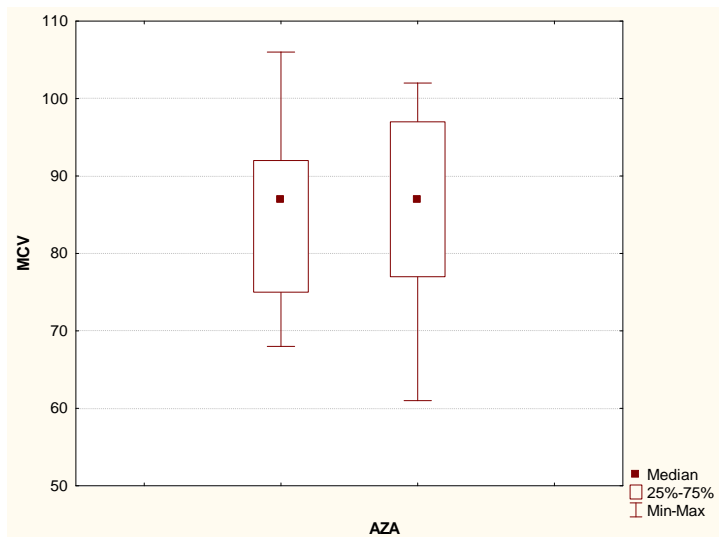
Mann-Whitney U Test  $Z=0,1287$   $p=0,8976$ \*сигнификантно за  $p<0,05$ 

Просечната вредност на MCV кај пациентите кои користат AZA изнесува  $85,96 \text{ fL} \pm 10,31 \text{ fL}$ , со минимална вредност од  $68 \text{ fL}$  и максимална од  $106 \text{ fL}$ . Во групата пациенти кои не користат AZA, просечната вредност на MCV изнесува  $84,96 \text{ fL} \pm 12,37 \text{ fL}$ , со минимална вредност од  $61 \text{ fL}$  и максимална вредност од  $102 \text{ fL}$ . Кај 50% од пациентите и во двете групи вредноста на MCV е над  $87 \text{ fL}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на MCV во двете групи е



статистички несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = 0,1287$   $p = 0,8976$ ).

**Графикон 41. Анализа според користење AZA и MCV**



### 7.6.12. Алкална фосфатаза (AF)

Просечната вредност на AF во примерокот изнесува  $94,99 \text{ U/L} \pm 35,25 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $50 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $211 \text{ U/L}$ , како и просечна вредност над  $91 \text{ U/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 43 и графикон 42).

**Табела 43. Анализа според користење AZA и AF**

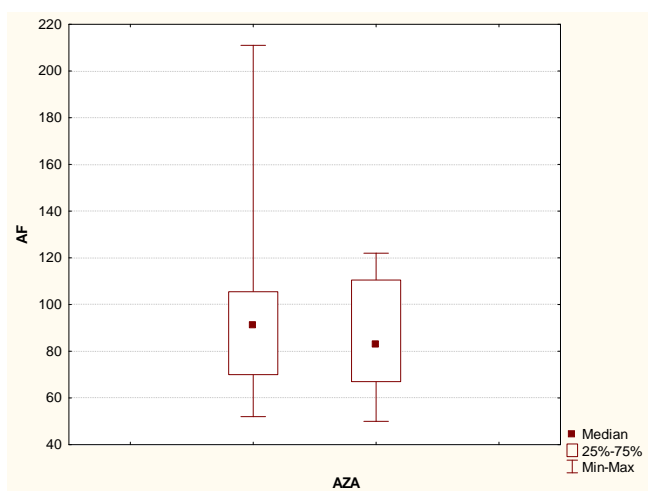
Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	28	97,37	37,56	91	52	211
не користи AZA	8	86,62	25,84	83	50	122
<b>Вкупно</b>	<b>36</b>	<b>94,99</b>	<b>35,25</b>	<b>91</b>	<b>50</b>	<b>211</b>

Mann-Whitney U Test  $Z = 0,5327$   $p = 0,5942$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Просечната вредност на AF кај испитаниците кои користат AZA изнесува  $97,37 \text{ U/L} \pm 35,56 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $52 \text{ U/L}$  и максимална од  $211 \text{ U/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на AF е над  $91 \text{ U/L}$ . Кај испитаниците кои не користат AZA, просечната вредност на AF изнесува  $86,62 \text{ U/L} \pm 25,84 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $50 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $122 \text{ U/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на AF е над  $83 \text{ U/L}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на AF во двете групи е статистички несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=0,5327$   $p=0,5942$ ).

**Графикон 42. Анализа според користење AZA и AF**



### 7.6.13. Аспартат аминотрансфераза (AST, GOT)

Просечната вредност на AST во целиот примерок изнесува  $20,36 \text{ U/L} \pm 9,32 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $3 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $54 \text{ U/L}$ , како и просечна вредност над  $19 \text{ U/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 44 и графикон 43).

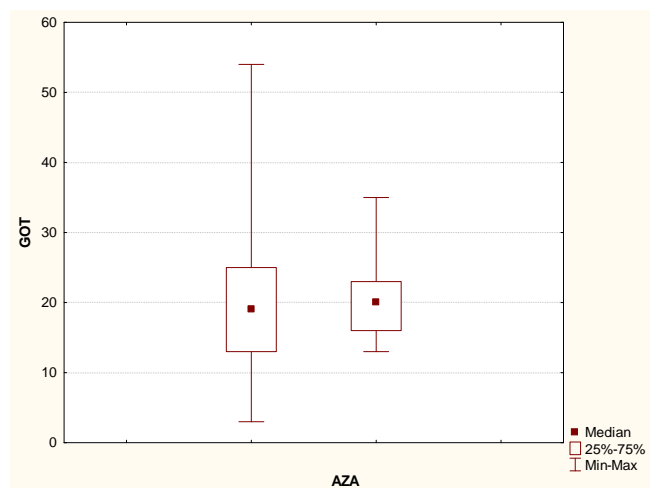
Табела 44. Анализа според користење AZA и AST

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	31	20,48	10,32	19	3	54
не користи AZA	11	20,00	6,03	20	13	35
Вкупно	42	20,36	9,32	19	3	54

Mann-Whitney U Test  $Z=-0,3289$   $p=0,7422$ \*сигнификантно за  $p<0,05$ 

Просечната вредност на AST на пациентите кои користат AZA изнесува 20,48 U/L  $\pm$  10,32 U/L, со минимална вредност од 3 U/L и максимална од 54 U/L. Кај 50% од овие пациенти вредноста на AST е над 19 U/L. Кај пациентите кои не користат AZA, просечната вредност на AST изнесува 20 U/L  $\pm$  6,03 U/L, со минимална вредност од 13 U/L и максимална вредност од 35 U/L. Кај 50% од овие пациенти вредноста на AST е над 20 U/L. Тестираната разлика на просечните вредности на AST во двете групи е статистички несигнификантна ( $p>0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=-0,3289$   $p=0,7422$ ).

Графикон 43. Анализа според користење AZA и AST



### 7.6.14. Аланин аминотрансфераза (ALT, GTP)

Просечната вредност на ALT во целиот примерок изнесува  $19,62 \text{ U/L} \pm 12,96 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $6 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $71 \text{ U/L}$ , како и просечна вредност над  $15 \text{ U/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 45 и графикон 44).

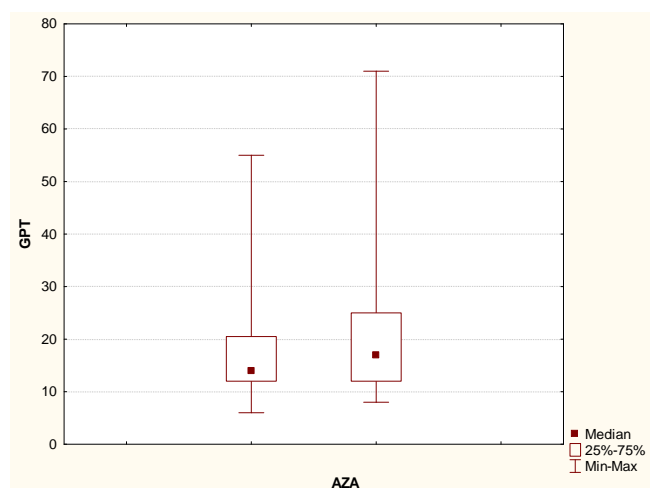
**Табела 45. Анализа според користење AZA и ALT**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	30	18,82	11,09	14	6	55
не користи AZA	11	21,82	17,57	17	8	71
<b>Вкупно</b>	<b>41</b>	<b>19,62</b>	<b>12,96</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	<b>71</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-0,3825$   $p=0,7021$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Просечната вредност на ALT на пациентите кои користат AZA изнесува  $18,82 \text{ U/L} \pm 11,09 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $6 \text{ U/L}$  и максимална од  $55 \text{ U/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на ALT е над  $14 \text{ U/L}$ . Кај пациентите кои не користат AZA, просечната вредност на ALT изнесува  $21,82 \text{ U/L} \pm 17,57 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $8 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $71 \text{ U/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на ALT е над  $17 \text{ U/L}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на ALT во двете групи е статистички несигнификантна ( $p>0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=-0,3825$   $p=0,7021$ ).

**Графикон 44. Анализа според користење AZA и ALT****7.6.15. Ц-реактивен протеин (CRP)**

Просечната вредност на CRP во целиот примерок изнесува  $11,32 \text{ mg/L} \pm 13,51 \text{ mg/L}$ , со минимална вредност од  $0,7 \text{ mg/L}$  и максимална вредност од  $53,2 \text{ mg/L}$ , како и просечна вредност над  $8,2 \text{ mg/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 46 и графикон 45).

**Табела 46. Анализа според користење AZA и CRP**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	24	11,11	13,47	8,1	0,7	53,2
не користи AZA	10	11,82	14,31	8,5	1,3	50,5
<b>Вкупно</b>	<b>34</b>	<b>11,32</b>	<b>13,51</b>	<b>8,2</b>	<b>0,7</b>	<b>53,2</b>

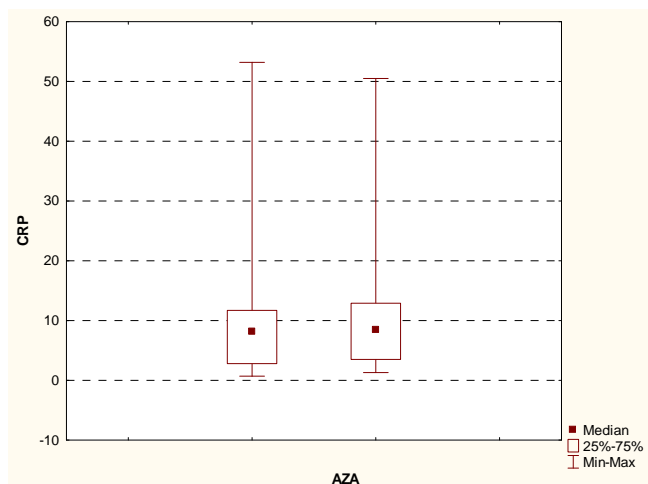
Mann-Whitney U Test  $Z=-0,2268$   $p=0,8206$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Просечната вредност на CRP на пациентите кои користат AZA изнесува  $11,11 \text{ mg/L} \pm 13,47 \text{ mg/L}$ , со минимална вредност од  $0,7 \text{ mg/L}$  и максимална вредност од  $53,2 \text{ mg/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на CRP е над  $8,1 \text{ mg/L}$ . Кај пациентите кои не користат AZA, просечната вредност на CRP изнесува  $11,82 \text{ mg/L} \pm 14,31 \text{ mg/L}$ , со минимална вредност од  $1,3 \text{ mg/L}$  и максимална вредност од  $50,5 \text{ mg/L}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на CRP

е над 8,5 mg/L. Тестираната разлика на просечните вредности на CRP во двете групи е статистички несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -0,2268$   $p = 0,8206$ ).

**Графикон 45. Анализа според користење AZA и CRP**



### 7.6.16. Уреа

Во целиот примерок просечната вредност на уреата изнесува 7,76 mmol/L  $\pm$  10,53 mmol/L, со минимална вредност од 1,6 mmol/L и максимална вредност од 46 mmol/L, како и просечна вредност над 4,1 mmol/L кај 50% од испитаниците (табела 47 и графикон 46).

**Табела 47. Анализа според користење AZA и уреа**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	18	7,97	11,66	4,0	1,6	46,0
не користи AZA	5	6,98	5,54	5,7	2,6	16,6
<b>Вкупно</b>	<b>23</b>	<b>7,76</b>	<b>10,53</b>	<b>4,1</b>	<b>1,6</b>	<b>46</b>

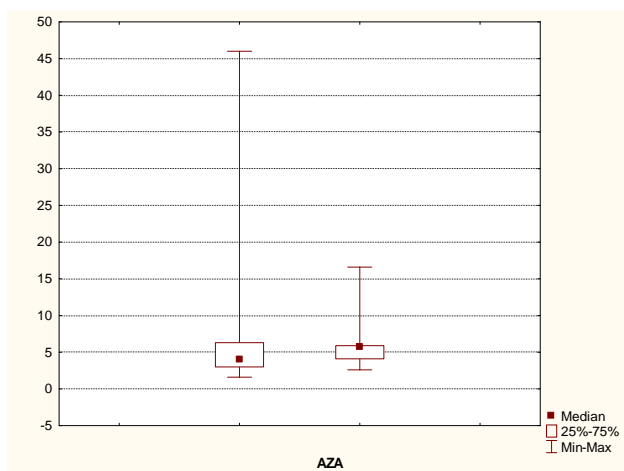
Mann-Whitney U Test  $Z = -0,6708$   $p = 0,5023$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Кај пациентите кои користат AZA, просечната вредност на уреата изнесува 7,97 mmol/L  $\pm$  11,66 mmol/L, со минимална вредност од 1,6 mmol/L и

максимална вредност од 46 mmol/L. Кај 50% од овие пациенти вредноста на уреата е над 4 mmol/L. Кај пациентите кои не користат AZA просечната вредност на уреата изнесува  $6,98 \text{ mmol/L} \pm 5,54 \text{ mmol/L}$ , со минимална вредност од 2,6 mmol/L и максимална вредност од 16,6 mmol/L. Кај 50% од овие пациенти вредноста на уреата е над 5,7 mmol/L. Тестираната разлика на просечните вредности на уреата во двете групи е несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -0,6708$   $p = 0,5023$ ).

**Графикон 46. Анализа според користење AZA и уреа**



### 7.6.17. Креатинин

Просечната вредност на креатининот во целиот примерок изнесува  $66,21 \text{ mmol/L} \pm 24,86 \text{ mmol/L}$ , со минимална вредност од 6,2 mmol/L и максимална вредност од 104 mmol/L, како и просечна вредност над 70,4 mmol/L кај 50% од испитаниците (табела 48 и графикон 47).

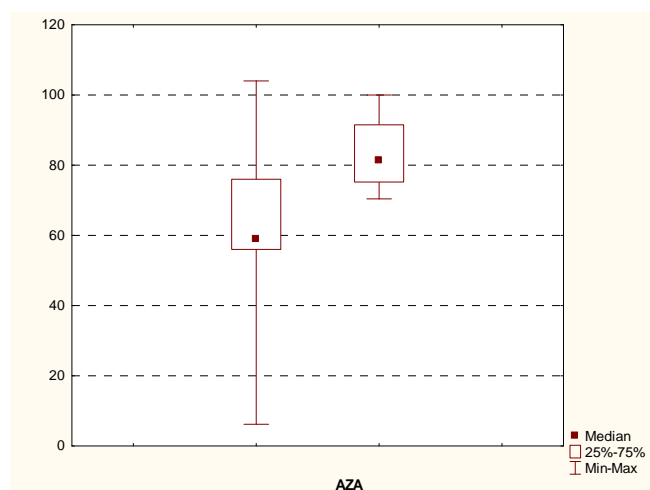
**Табела 48. Анализа според користење AZA и креатинин**

Користење AZA	Број	Просек (Mean)	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Медијана (Median)	Минимум (Min)	Максимум (Max)
користи AZA	17	62,18	25,56	59,0	6,2	104
не користи AZA	4	83,35	12,33	81,5	70,4	100
<b>Вкупно</b>	<b>21</b>	<b>66,21</b>	<b>24,86</b>	<b>70,4</b>	<b>6,2</b>	<b>104</b>

Mann-Whitney U Test Z=-1,7465 p=0,0807

\*сигнификантно за p&lt;0,05

Просечната вредност на креатининот на пациентите кои користат AZA изнесува 62,18 mmol/L  $\pm$  25,56 mmol/L, со минимална вредност од 6,2 mmol/L и максимална од 104 mmol/L. Кај 50% од овие пациенти вредноста на креатининот е над 59 mmol/L. Кај пациентите кои не користат AZA просечната вредност на креатининот изнесува 83,35 mmol/L  $\pm$  12,33 mmol/L, со минималната вредност од 70,4 mmol/L и максимална вредност од 100 mmol/L. Кај 50% од овие пациенти вредноста на креатининот е над 81,5 mmol/L. Тестираната разлика на просечните вредности на креатинин во двете групи е несигнификантна (p>0,05) (Mann-Whitney U Test Z=-1,7465 p=0,0807).

**Графикон 47. Анализа според користење AZA и креатинин**



## 7.7. Истражувачки аспекти

Во рамките на овој дел од истражувањето направена е анализа на повеќе аспекти, и тоа: а) доза на AZA во mg во моментот на земање крв; б) алфа-амилаза во серум по воведување на терапија со AZA; в) испитување на активноста на TPMT ензимот и г) испитување на концентрацијата на 6-TGN и 6-MMP.

### 7.7.1. Доза на AZA при земање крв

Кај испитаниците кои примале AZA за време на ова истражување направена е анализа на дозата на лекот во тој момент (табела 49 и графикон 48).

**Табела 49. Анализа на примерокот по доза на AZA при земање крв и време на користење**

Користење AZA (месеци)	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
3 - 12	128,95	19	40,19	50	200	125
над 12	165,79	19	31,41	100	200	175
<b>Вкупно</b>	147,37	38	40,18	50	200	150

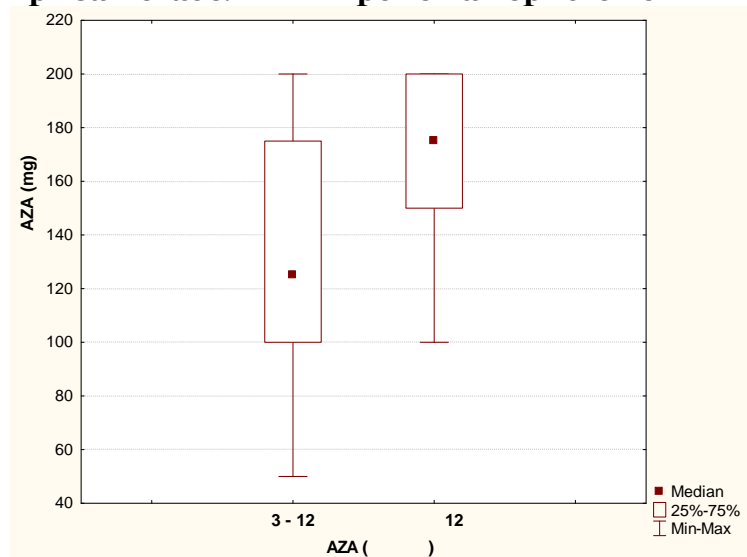
Mann-Whitney U Test  $Z=-2,7151$   $p=0,0066^*$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Просечната доза на AZA во mg кај испитаниците кои го исполнуваа критериумот изнесува  $147,37 \pm 40,18$ mg, со минимална вредност од 50 mg и максимална вредност од 200 mg, со просечна вредност над 150 mg кај 50% од испитаниците. Просечната доза на AZA кај пациентите кои користат AZA од 3 до 12 месеци изнесува  $128,95 \text{ mg} \pm 40,19 \text{ mg}$ , со минимална вредност од 50 mg и максимална вредност од 200 mg. Според анализата на медијана, кај 50% од пациентите во оваа група дозата на AZA е над 125 mg. Во групата пациенти кои користат AZA над 12 месеци просечната доза изнесува  $165,79 \text{ mg} \pm 31,41 \text{ mg}$ , со минимална вредност од 100 mg и максимална вредност од 200 mg. Кај 50% од пациентите во оваа група дозата на AZA е над 175 mg. Тестираната разлика на

просечните вредности на дозата на AZA кај испитаниците во двете групи е статистички сигнификантна (за  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -2,7151$   $p = 0,0066$ ), што оди во прилог на повисоката доза кај пациентите кои користат AZA подолго време.

**Графикон 48. Анализа на примерокот по доза на AZA во момент на земање крв за метаболити и време на користење**



Дозата на AZA во моментот на земање крв за испитување на концентрацијата на метаболитите кај испитаниците во однос на клиничкиот тип на болеста (Кронова болест и улцерозен колитис) е дадена во табела 50.

**Табела 50. Анализа на примерокот по доза на AZA во момент на земање на крв и клинички тип на болеста**

Клинички тип на болеста	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
Кронова болест	146,55	29	36,43	100	200	150
Улцеративен колитис	150,00	9	53,03	50	200	175
<b>Вкупно</b>	<b>147,37</b>	<b>38</b>	<b>40,18</b>	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>150</b>

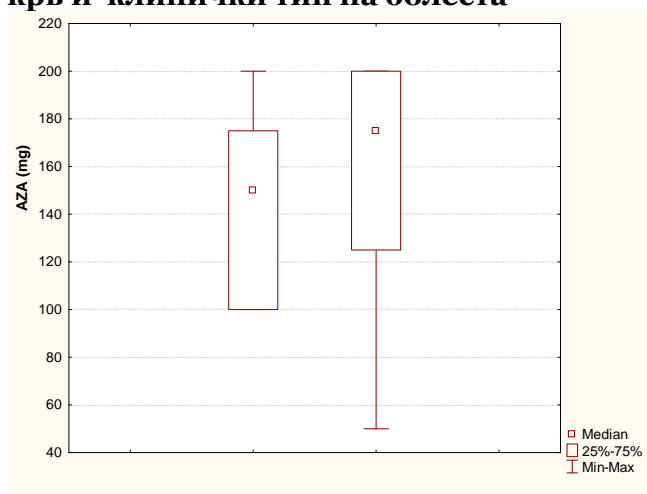
Mann-Whitney U Test  $Z = -0,515$   $p = 0,6065$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Анализата покажа дека просекот на дозата на AZA кај пациентите со Кроновата болест изнесува  $146,55 \text{ mg} \pm 36,41 \text{ mg}$ , со минимална вредност 100 mg и максимална вредност 200 mg, како и кај 50% од пациентите со доза на

AZA над 150 mg. Во групата со улцерозен колитис просекот на дозата на AZA изнесува  $150 \text{ mg} \pm 40,18 \text{ mg}$ , со минимална односно максимална доза 50 mg и 200 mg, соодветно. Кај 50% од пациентите со улцерозен колитис дозата на AZA е поголема од 175 mg. Тестираната разлика на просечните вредности на дозата на AZA кај испитаниците во двете групи е несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -0,515$   $p = 0,6065$ ). Графичкиот приказ на анализата на примерокот по доза на AZA во моментот на земање крв и клинички тип на болеста е прикажан на графикон 49.

**Графикон 49. Анализа на примерокот по доза на AZA во момент на земање крв и клинички тип на болеста**



Дозата на AZA во однос на полот на пациентите е дадена во табела 51. Анализата покажа дека просекот на дозата на AZA кај мажите изнесува  $160,71 \text{ mg} \pm 37,56 \text{ mg}$ , со минимална доза од 100 mg и максимална од 200 mg. 50% од пациентите од машки пол имаат доза на AZA над 175 mg. Во однос на женскиот пол, просечната доза на AZA изнесува  $130,71 \text{ mg} \pm 40,18 \text{ mg}$ , со минимална доза од 50 mg и максимална од 200 mg. Тестираната разлика на просечните вредности на дозата на AZA помеѓу двата пола е статистички сигнификантна (за  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -2,1872$   $p = 0,0287$ ), што оди во прилог на повисоката доза кај пациентите од машки пол.

**Табела 51. Анализа на примерокот по доза на AZA во момент на земање крв и пол на пациентот**

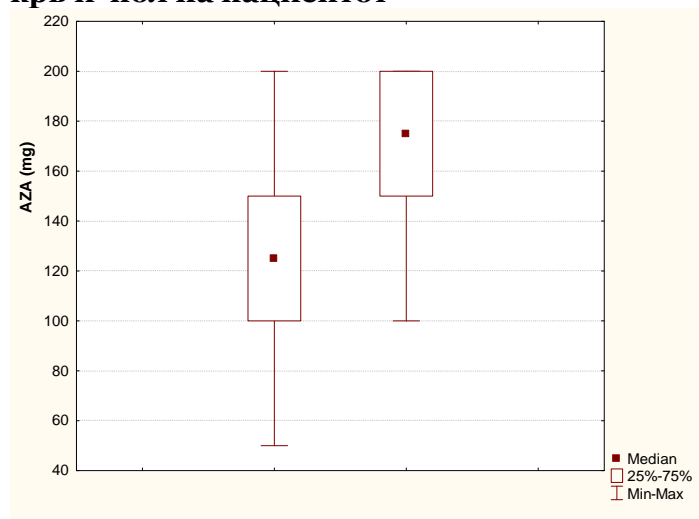
Пол	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
мажи	160,71	21	37,56	100	200	175
жени	130,88	17	38,05	50	200	125
<b>Вкупно</b>	<b>147,37</b>	<b>38</b>	<b>40,18</b>	<b>50</b>	<b>200</b>	<b>150</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-2,1872$   $p=0,0287^*$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Табеларниот и графичкиот приказ на анализата на примерокот по доза на AZA и полот на пациентите е прикажан во табела 51 и на графикон 50.

**Графикон 50. Анализа на примерокот по доза на AZA во момент на земање крв и пол на пациентот**



### 7.7.2. Алфа-амилаза во серум по воведување на терапија со AZA

Просечната вредност на алфа-амилазата во серум кај испитаниците кои го исполнуваа критериумот изнесува  $70,25 \text{ U/L} \pm 30,03 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $21 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $200 \text{ U/L}$ , со просечна вредност над  $148 \text{ U/L}$  кај 50% од испитаниците (табела 52 и графикон 51).

**Табела 52. Анализа на алфа-амилаза во серум според време на користење AZA**

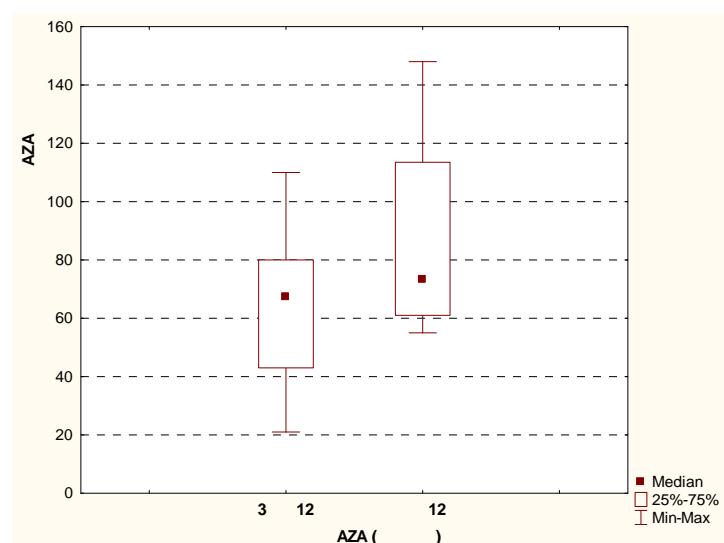
Користење AZA (месеци)	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
3 - 12	63,58	12	27,58	21	110	67,5
над 12	85,75	16	29,00	55	148	73,5
<b>Вкупно</b>	<b>76,25</b>	<b>28</b>	<b>30,03</b>	<b>21</b>	<b>148</b>	<b>70,5</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-1,3927$   $p=0,1637$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Просечната концентрација на алфа-амилаза во серум кај пациентите кои користат AZA од 3 до 12 месеци изнесува  $63,58 \text{ U/L} \pm 27,58 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $21 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $110 \text{ U/L}$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на алфа-амилаза во серум е над  $67,5 \text{ U/L}$ . Во групата пациенти кои користат AZA над 12 месеци просечната вредност на алфа-амилаза во серум изнесува  $85,75 \text{ U/L} \pm 9 \text{ U/L}$ , со минимална вредност од  $55 \text{ U/L}$  и максимална вредност од  $148 \text{ U/L}$ . Кај 50% од пациентите во оваа група вредноста на алфа-амилаза во серум е над  $73,5 \text{ U/L}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на алфа-амилаза во серум во двете групи нема статистичка сигнификантност ( $p>0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=-1,3927$   $p=0,1637$ ).

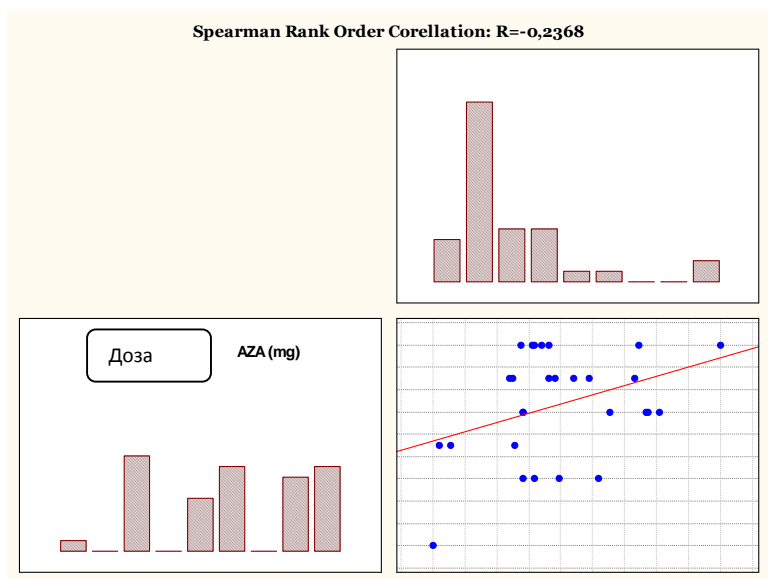
**Графикон 51. Анализа на алфа-амилаза во серум според време на користење AZA**



Дополнителната тестирана разлика на просечните вредности на алфа-амилаза во серум во однос на клиничкиот тип на болеста (Кронова болест и улцерозен колитис) не покажа статистичка сигнификантност ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=1,0607$   $p=0,2888$ ). За  $p > 0,05$ , статистичка сигнификантност не е согледана ниту при тестираната разлика на просечните вредности на алфа-амилаза во серум во однос на полот на пациентите (Mann-Whitney U Test  $Z=-0,9209$   $p=0,3571$ ).

Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу дозата на AZA во mg и вредноста на алфа-амилаза во серум покажа постоење на линеарна слаба позитивна директна корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,2368$ ), несигнификантна за  $p > 0,05$ . Со зголемувањето на дозата на AZA се зголемува и вредноста на алфа-амилазата во серум (графикон 52).

**Графикон 52. Непараметарска корелација помеѓу дозата на AZA и вредноста на алфа-амилаза во серум**



### 7.7.3. ТРМТ ензим

Во рамките на истражувањето е одредувана вредноста на ТРМТ ензимот за секој испитаник и таа е анализирана во однос на повеќе параметри.

#### 7.7.3.1. Вредности на ТРМТ ензимот според пол

Просечната вредност на ТРМТ ензимот во целиот примерок изнесува 18,49 U/mL  $\pm$  8,27 U/mL  $\pm$  r, со минимална вредност од 1,9 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 35,8 U/mL  $\pm$  r. Кај 50% од пациентите во примерокот вредноста на ТРМТ ензимот е над 19,1 U/mL  $\pm$  r. Просечната вредност на ТРМТ ензимот кај пациентите од машки пол изнесува 15,82 U/mL  $\pm$  8,47 U/mL  $\pm$  r, со минималната вредност од 1,9 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 34,8 U/mL  $\pm$  r. Кај 50% од мажите вредноста на ТРМТ ензимот е над 14,9 U/mL  $\pm$  r. Кај пациентите од женски пол просечната вредност на ТРМТ ензимот изнесува 21,62 U/mL  $\pm$  6,94 U/mL  $\pm$  r, со минималната вредност од 6,7 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 35,8 U/mL  $\pm$  r. Кај 50% од жените вредноста на ТРМТ ензимот е над 20,8 U/mL  $\pm$  r. Тестираната разлика на просечните вредности на ТРМТ ензимот во двете групи е статистичка сигнификантна (за  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=2,9235$   $p=0,0035$ ), што оди во прилог на повисоките вредности на овој ензим кај пациентите од женски пол.

**Табела 53. Анализа на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот и пол**

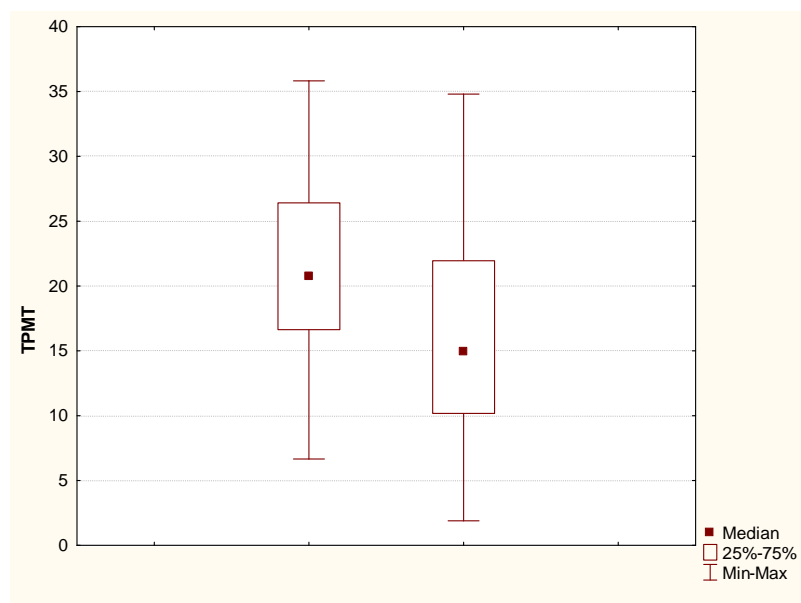
Пол	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
мажи	15,82	34	8,47	1,9	34,8	14,9
жени	21,62	29	6,94	6,7	35,8	20,8
<b>Вкупно</b>	18,49	63	8,27	1,9	35,8	19,1

Mann-Whitney U Test  $Z=2,9235$   $p=0,0035^*$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Табеларниот и графичкиот приказ на вредноста на ТРМТ ензимот и полот на пациентите е даден во табела 53 и на графикон 53.

**Графикон 53. Анализа на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот и пол**



Направена е дополнителна анализа на целиот примерок според вредностите на ТРМТ ензимот по групи и пол на пациентите. Како што е прикажано во табелата 53а, согледано е дека во Група 1 - заболени со ниска активност (<5,0 U/ml Ег) има најмалку или вкупно 3 (4,76%) пациенти, од кои сите се од машки пол. Во Група 2 - заболени со средна активност (5,0-13,7 U/ml Ег) има вкупно 16 (25,4%) пациенти, од кои 13 (81,25%) се мажи, а 3 (18,75%) се жени. Во Група 3 - заболени со нормална или висока активност (>13,8 U/ml Ег) има најмногу или вкупно 44 (69,84%) пациенти, од кои 18 (40,91%) се мажи, а 26 (59,09%) се жени.

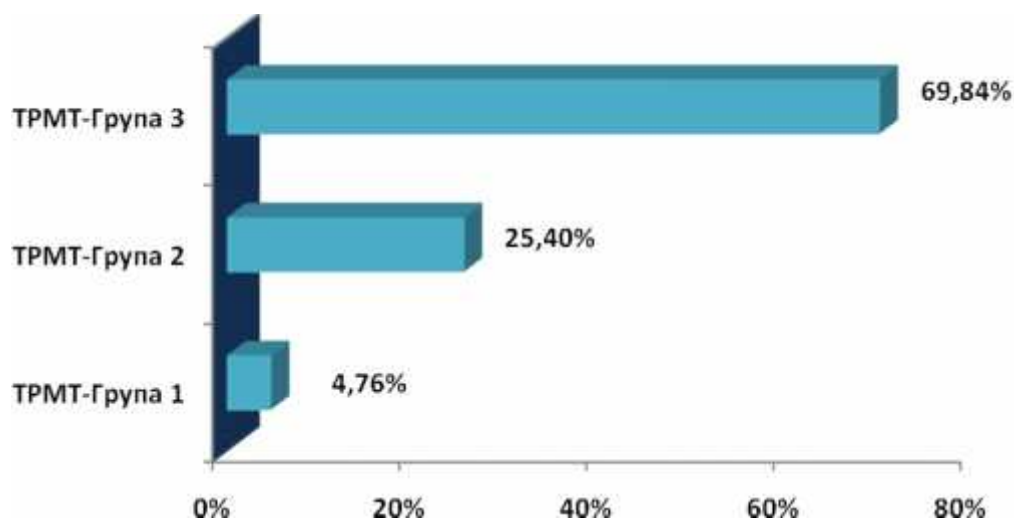
**Табела 53а. Анализа на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот по групи и пол**

Активност на ТРМТ ензимот по групи		Пол		Вкупно
		мажи	жени	
Група 1 ниска	Број	3	0	3
	%	100%	0%	4,76%
Група 2 средна	Број	13	3	16
	%	81,25%	18,75%	25,40%
Група 3 нормална-висока	Број	18	26	44
	%	40,91%	59,09%	69,84%
Вкупно	Број	34	29	63
	%	53,97%	46,03%	100%



Графичкиот приказ на анализата на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот по групи е даден на графикон 53а.

**Графикон 53а. Анализа на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот по групи**



### 7.7.3.2. Вредности на ТРМТ ензимот според клинички тип на болеста

Вредноста на ТРМТ ензимот е анализирана и во однос на клиничкиот тип на болеста (Кронова болест и улцерозен колитис) и тие се претставени во табела 54. Анализата покажа дека вредноста на ТРМТ ензимот кај пациентите со Кронова болест изнесува  $19,46 \text{ U/mL}$   $\pm 8,06 \text{ U/mL}$ , со минимална вредност од  $3,72 \text{ U/mL}$  и максимална вредност од  $35,8 \text{ U/mL}$ , како и кај 50% од пациентите со вредност на ТРМТ ензимот над  $19,4 \text{ U/mL}$ . Во групата со улцерозен колитис, просекот на вредноста на ТРМТ ензимот изнесува  $16,09 \text{ U/mL}$   $\pm 8,52 \text{ U/mL}$ , со минимална односно максимална вредност од  $1,89 \text{ U/mL}$  и  $29 \text{ U/mL}$ . Кај 50% од пациентите со улцерозен колитис вредноста на ТРМТ ензимот е поголема од  $14,5 \text{ U/mL}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на ТРМТ ензимот во двете групи е незначителна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=1,3151$   $p=0,1881$ ).

**Табела 54. Анализа на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот и клинички тип на болеста**

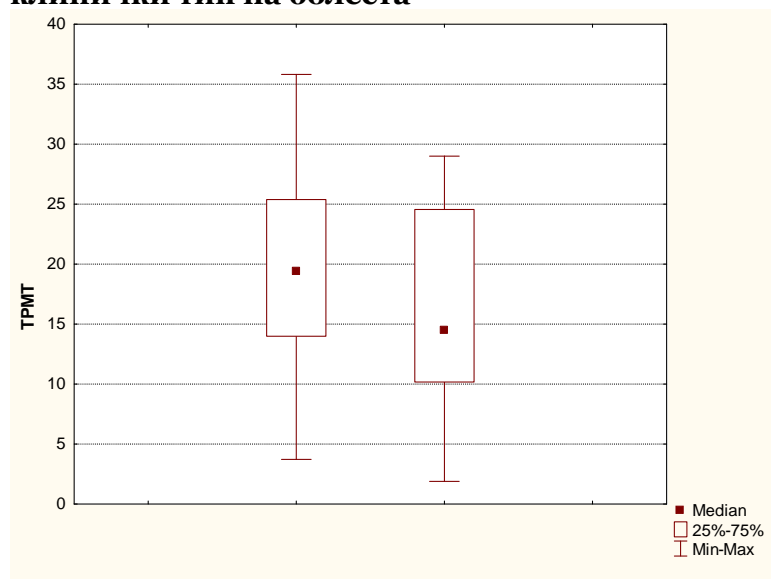
Клинички тип на болеста	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
Кронова болест	19,46	45	8,06	3,72	35,8	19,4
Улцеративен колитис	16,09	18	8,52	1,89	29,0	14,5
<b>Вкупно</b>	<b>18,49</b>	<b>63</b>	<b>8,27</b>	<b>1,89</b>	<b>35,8</b>	<b>19,1</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=1,3151$   $p=0,1881$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

Графичкиот приказ на анализата на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот и клинички тип на болеста е прикажан на графикон 54.

**Графикон 54. Анализа на примерокот според вредности на ТРМТ ензимот и клинички тип на болеста**



### 7.7.3.3. Вредности на ТРМТ ензимот според пол при Кронова болест

Во групата пациенти со Кронова болест просечната вредност на ТРМТ ензимот кај пациентите од машки пол изнесува 16,86 U/mL  $\pm$  8,16 U/mL  $\pm$  r, со минимална вредност од 3,72 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 15,9 U/mL  $\pm$  r. Кај 50% од мажите вредноста на ТРМТ ензимот е над 15,9 U/mL  $\pm$  r. Кај пациентите од женски пол просечната вредност на ТРМТ ензимот изнесува 23 U/mL  $\pm$  6,58 U/mL  $\pm$  r, со минимална вредност од 11,58 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 35,8 U/mL  $\pm$  r. Кај 50% од жените вредноста на ТРМТ ензимот е над 21,9 U/mL  $\pm$  r. Тестираната разлика на просечните вредности на ТРМТ ензимот во двете групи е статистичка сигнификантна (за  $p < 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=2,7116$   $p=0,0067$ ), што оди во прилог на повисоките вредности на овој ензим кај пациентите од женски пол.

**Табела 55. Вредности на ТРМТ ензимот според пол при Кронова болест**

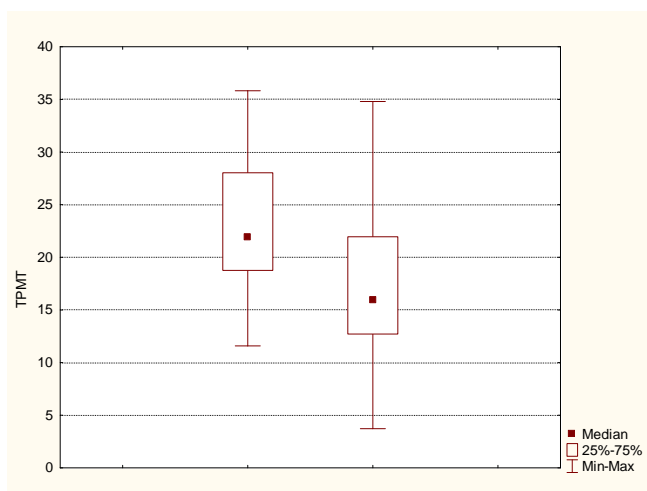
Пол	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
мажи	16,86	26	8,16	3,72	34,8	15,9
жени	23,00	19	6,58	11,58	35,8	21,9
<b>Вкупно</b>	19,46	45	8,06	3,72	35,8	19,4

Mann-Whitney U Test  $Z=2,7116$   $p=0,0067$ \*

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Графичкиот приказ на анализата во групата со Кронова болест според вредностите на ТРМТ ензимот и полот е прикажан во табела 55 и на графикон 55.

**Графикон 55. Вредности на ТРМТ ензимот според пол при Крнова болест**



#### **7.7.3.4. Вредности на ТРМТ ензимот според пол при улцерозен колитис**

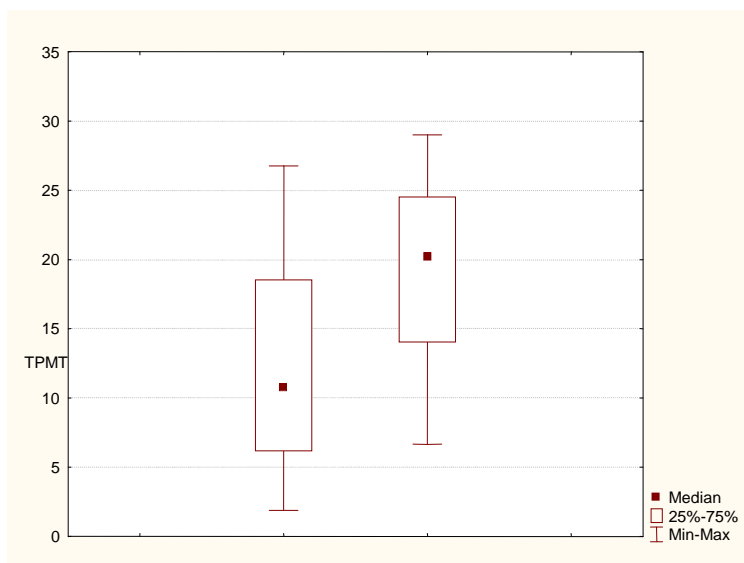
Во групата пациенти со улцерозен колитис просечната вредност на ТРМТ ензимот кај пациентите од машки пол изнесува  $12,44 \text{ U/mL}$   $\pm 9,12 \text{ U/mL}$   $\text{r}$ , со минимална вредност од  $1,8 \text{ U/mL}$   $\text{r}$  и максимална вредност од  $26,8 \text{ U/mL}$   $\text{r}$ . Кај 50% од мажите вредноста на ТРМТ ензимот е над  $10,7 \text{ U/mL}$   $\text{r}$ . Кај пациентите од женски пол просечната вредност на ТРМТ ензимот изнесува  $19,01 \text{ U/mL}$   $\text{r} \pm 7,16 \text{ U/mL}$   $\text{r}$ , со минимална вредност од  $6,7 \text{ U/mL}$   $\text{r}$  и максимална вредност од  $29 \text{ U/mL}$   $\text{r}$ . Кај 50% од жените вредноста на ТРМТ ензимот е над  $20,2 \text{ U/mL}$   $\text{r}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на ТРМТ ензимот во двете групи не е статистички сигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -1,7771$   $p = 0,0756$ ).

**Табела 56. Вредности на ТРМТ ензимот според пол при улцерозен колитис**

Пол	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
мажи	12,44	8	9,12	1,8	26,8	10,7
жени	19,01	10	7,16	6,7	29,0	20,2
<b>Вкупно</b>	<b>16,09</b>	<b>18</b>	<b>8,52</b>	<b>1,9</b>	<b>29,0</b>	<b>14,5</b>

Mann-Whitney U Test  $Z=-1,7771$   $p=0,0756$ \*сигнификантно за  $p<0,05$ 

Графичкиот приказ на анализата во групата со Кронува болест според вредностите на ТРМТ ензимот и полот е прикажан во табела 56 и на графикон 56.

**Графикон 56. Вредности на ТРМТ ензимот според пол при улцерозен колитис**

### 7.7.3.5. Вредности на TPMT ензимот според видови третман со AZA

Вредностите на TPMT ензимот се анализирани во однос на две терапевски опции на кои се подложени испитаниците кои примаат AZA (табела 57 и графикон 57).

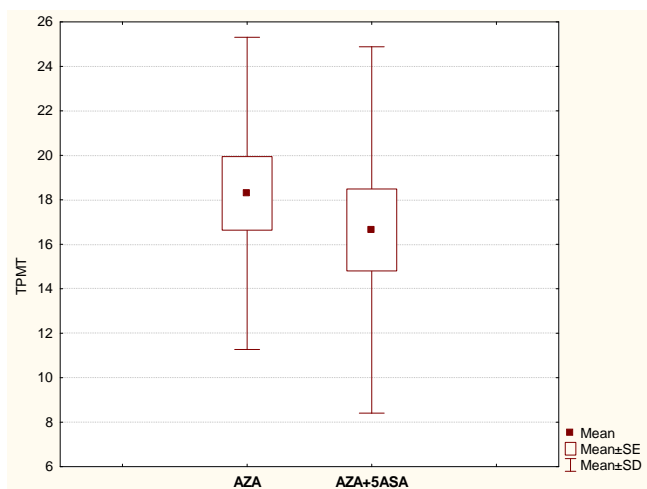
**Табела 57. Вредности на TPMT ензимот според видови третман со AZA**

Сегашен третман	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Q75
AZA	18,29	18	7,02	6,19	35,82	23,01
AZA + 5 ASA	16,64	20	8,24	3,72	31,79	21,35

t-test for independent samples=0,659 df=36 p=0,5143

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Просечната вредност на TPMT ензимот во групата пациенти третирани само со AZA изнесува 18,29 U/mL  $\pm$  7,02 U/mL  $\pm$  r, со минимална вредност од 6,19 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 35,82 U/mL  $\pm$  r. Кај 65% од овие пациенти вредноста на TPMT ензимот е над 23,01 U/mL  $\pm$  r. Кај пациентите третирани со AZA+ 5ASA просечната вредност на TPMT ензимот изнесува 16,64 U/mL  $\pm$  8,24 U/mL  $\pm$  r, со минимална вредност од 3,72 U/mL  $\pm$  r и максимална вредност од 31,75 U/mL  $\pm$  r. Кај 75% од пациентите во оваа група вредноста на TPMT ензимот е над 21,35 U/mL  $\pm$  r. За  $p > 0,05$ , просечните вредности на TPMT ензимот се несигнификантно повисоки во групата третирана само со AZA во споредба со групата третирана со AZA+5ASA (t-test for independent samples=0,659 df=36 p=0,5143) (табела 57 и графикон 57).

**Графикон 57. Вредности на TPMT ензимот според видови третман со AZA**

Направена е дополнителна анализа на активноста на TPMT ензимот при што пациентите се поделени во три подгрупи и тоа: а) **Група 1** - заболени со ниска активност (<5,0 U/ml Er); б) **Група 2** - заболени со средна активност (5,0-13,7 U/ml Er) и в) **Група 3** - заболени со нормална или висока активност (>13,8 U/ml Er). Анализата на активноста на TPMT ензимот по групи и видови третман со AZA покажа дека во Групата 1 (ниска активност на TPMT ензимот) ниеден пациент не е третиран со AZA, по што следува Групата 2 (средна активност на TPMT ензимот) каде 5 (45,45%) од пациентите се третирани со AZA, во Група 3 (висока активност на TPMT ензимот) најголем процент или 13 (52%) се третирани со AZA. За  $p > 0,05$ , нема сигнификантна разлика меѓу активноста на TPMT ензимот по групи и видови третман со AZA (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,632$ ). Табеларниот приказ на анализата на активноста на TPMT ензимот по групи во однос на сегашен третман е даден во табела 58.

**Табела 58. Активност на TPMT ензимот по групи според видови третман со AZA**

Активност на TPMT ензимот по групи		Сегашен третман		Вкупно
		AZA	AZA + 5 ASA	
Група 1	Број	0	2	2
	%	0%	100%	
Група 2	Број	5	6	11
	%	45,45%	54,55%	
Група 3	Број	13	12	25
	%	52%	48%	
Вкупно	Број	18	20	38
	%	47,37%	52,63%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,632$

\*сигнификантно за  $p<0,05$

### 7.7.3.6. Активност на TPMT ензимот според несакани дејства

Анализата на активноста на TPMT ензимот во однос на појавата на несакани дејства при терапија со AZA покажа дека кај пациентите кај кои е регистрирано несакано дејство, за  $p<0,05$ , има сигнификантно пониска просечна вредност на активноста на TPMT ензимот во споредба со оние кај кои не е регистрирано несакано дејство, и тоа  $13,96 \text{ U/mL} \pm 8,69 \text{ U/mL}$   $r$  v.s.  $18,43 \text{ U/mL} \pm 7,22 \text{ U/mL}$   $r$  (t-test for independent samples=12,9146 df=76  $p=0,0001$ ). Кај 50% од пациентите во групата со несакани ефекти просечната вредност на активноста на TPMT ензимот е над  $15,82 \text{ U/mL}$   $r$ , споредено со групата каде нема несакани ефекти и каде тој е над  $16,52 \text{ U/mL}$   $r$  кај 50% од пациентите. Табеларниот приказ на анализата на активноста на TPMT ензимот според несакано дејство е даден во табела 59.



**Табела 59. Активност на ТРМТ ензимот според несакано дејство**

Несакано дејство	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
да	13,96	7	8,96	3,72	24,56	15,82
не	18,43	32	7,22	5,26	35,82	16,52

t-test for independent samples=12,9146 df=76 p=0,0001 \*

\*сигнификантно за p&lt;0,05

Направена е дополнителна анализа на активноста на ТРМТ ензимот при што пациентите се поделени во три подгрупи и тоа: а) **Група 1** - заболени со ниска активност (<5,0 U/ml Er); б) **Група 2** - заболени со средна активност (5,0-13,7 U/ml Er) и в) **Група 3** - заболени со нормална или висока активност (>13,8 U/ml Er). Анализата на активноста на ТРМТ ензимот по групи и појавата на несакани дејства, за p>0,05, покажа несигнификантно најголем процент пациенти со несакани дејства во Групата 1 (ниска активност на ТРМТ ензимот), по што следува Групата 2 (средна активност на ТРМТ ензимот), и најмал во Групата 3 (висока активност на ТРМТ ензимот), и тоа 50% v.s. 18,38% v.s. 15,38% (Fisher-Freeman-Halton exact test: p=0,4397). Табеларниот приказ на анализата на активноста на ТРМТ ензимот по групи во однос на несакано дејство е даден во табела 60.

**Табела 60. Активност на ТРМТ ензимот по групи според несакано дејство**

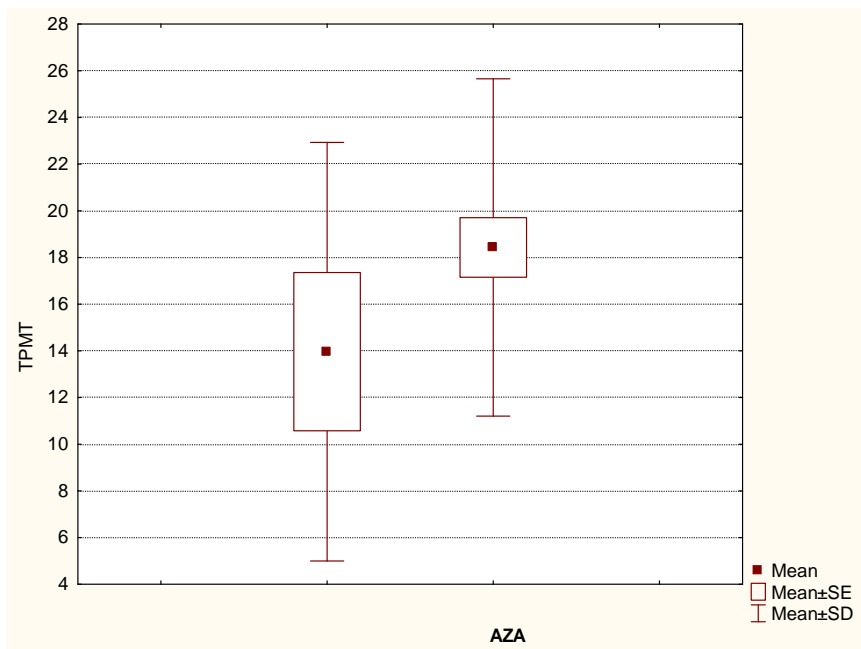
Активност на ТРМТ ензимот по групи		Несакано дејство		Вкупно
		да	не	
<b>Група 1</b> ниска	Број	1	1	2
	%	50%	50%	
<b>Група 2</b> средна	Број	2	9	11
	%	18,18%	81,82%	
<b>Група 3</b> нормална-висока	Број	4	22	26
	%	15,38%	84,62%	
<b>Вкупно</b>	Број	7	32	39
	%	17,95%	82,05%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test: p=0,4397

\*сигнификантно за p&lt;0,05

Графичкиот приказ на анализата на активноста на ТРМТ ензимот според изјава за постоење т.е. непостоење на несакано дејство е даден на графикон 58.

**Графикон 58. Активност на ТРМТ ензимот според несакано дејство**



Како што се гледа од табелата 60а, анализата на активноста на ТРМТ ензимот по групи и активноста на болеста (акутна, ремисија), за  $p > 0,05$ , покажа несигнификантно најмал процент пациенти во ремисија во Групата 1 (ниска активност на ТРМТ ензимот), по што следува Групата 2 (средна активност на ТРМТ ензимот), а најголем во Групата 3 (висока активност на ТРМТ ензимот), и тоа 0% v.s. 54,55% v.s. 65,38% (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,2373$ ). Табеларниот приказ на анализата на активноста на ТРМТ ензимот по групи во однос на активноста на болеста е даден во табела 60а.

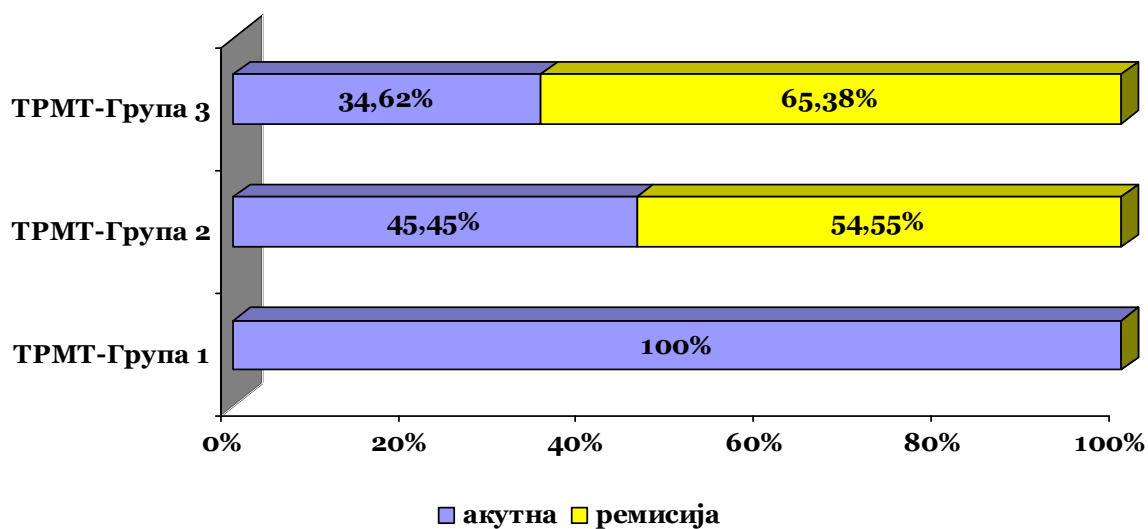
Табела 60а. ТРМТ ензимот по групи според активност на болеста

Активност на ТРМТ ензимот по групи		Активност на болеста		Вкупно
		акутна	ремисија	
Група 1 ниска	Број	2	0	2
	%	100%	0%	
Група 2 средна	Број	5	6	11
	%	45,45%	54,55%	
Група 3 нормална-висока	Број	9	17	26
	%	34,62%	65,38%	
Вкупно	Број	16	23	39
	%	41,03%	58,97%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,2373$ \*сигнификантно за  $p<0,05$ 

Графичкиот приказ на анализата на активноста на ТРМТ ензимот по групи според активност на болеста е даден на графикон 58а.

Графикон 58а. ТРМТ ензимот по групи според активност на болеста



#### 7.7.4. 6-TGN метаболит

Кај испитаниците кои повеќе од 3 месеци се под терапија со AZA одредувана е концентрацијата на 6-TGN метаболитот за секој испитаник и таа е анализирана во однос на повеќе параметри.

##### 7.7.4.1. Концентрација на 6-TGN според AZA

Просечната вредност на концентрацијата на метаболитот 6-TGN во моментот на земање крв изнесува  $437,46 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Eg} \pm 198,82 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  со минимална вредност од  $64,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  и максимална вредност од  $905,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Кај 50% од пациентите во примерокот вредноста на 6-TGN е над  $399,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Просечната вредност на 6-TGN кај пациентите кои користат AZA од 3 до 12 месеци изнесува  $460,06 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 206,61 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ , со минималната вредност од  $64,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  и максимална вредност од  $905,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на метаболитот 6-TGN е над  $427,9 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Кај пациентите кои користат AZA над 12 месеци просечната вредност на 6-TGN изнесува  $404,42 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 189,99 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ , со минималната вредност од  $205,1 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  и максимална вредност од  $746,4 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на 6-TGN метаболитот е над  $361,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Тестираната разлика на просечните вредности на 6-TGN во двете групи е статистичка несигнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z=0,9401$   $p=0,3472$ ).

**Табела 61. Концентрација на 6-TGN според време на користење AZA**

Користење AZA (месеци)	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
<b>3 - 12</b>	460,06	19	206,61	64,8	905,5	427,9
<b>над 12</b>	404,42	13	189,99	205,1	746,1	361,5
<b>Вкупно</b>	437,46	32	198,82	64,8	905,5	399,8

Mann-Whitney U Test  $Z=0,9401$   $p=0,3472$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Направена е дополнителна анализа на концентрацијата на 6-TGN метаболитот при што пациентите се поделени во три подгрупи и тоа: а) **Група 1** - суптотерапевтски ( $<200 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Eg}$ ); б) **Група 2** - терапевтски ( $200-400 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Eg}$ ) и в) **Група 3** - високи ( $>400 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Eg}$ ).

Анализата на концентрацијата на 6-TGN метаболитот по групи и користењето на AZA во месеци покажа дека во групата која користи AZA од 3-12 месеци најмногубројни, 11 (57,89%), се пациентите со висока концентрација на 6-TGN, по што следуваат 6 (31,58%) со терапевтска концентрација и 2 (10,53%) со суптотерапевтска концентрација на 6-TGN. Во групата која користи AZA над 12 месеци, најмногубројни, 8 (61,54%), се пациентите со терапевтска доза на 6-TGN, по што следуваат 5 (38,46%) со висока доза на 6-TGN. Во оваа група нема ниту еден пациент со суптотерапевтска доза на 6-TGN. За  $p > 0,05$ , нема сигнификантна разлика помеѓу групите со различно времетраење на користење AZA и концентрацијата на 6-TGN метаболитот по групи (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,2709$ ). Табеларниот приказ на анализата на концентрацијата на 6-TGN по групи во однос на времетраење на користење на AZA е даден во табела 62.

**Табела 62. Концентрација на 6-TGN по групи и време на користење AZA**

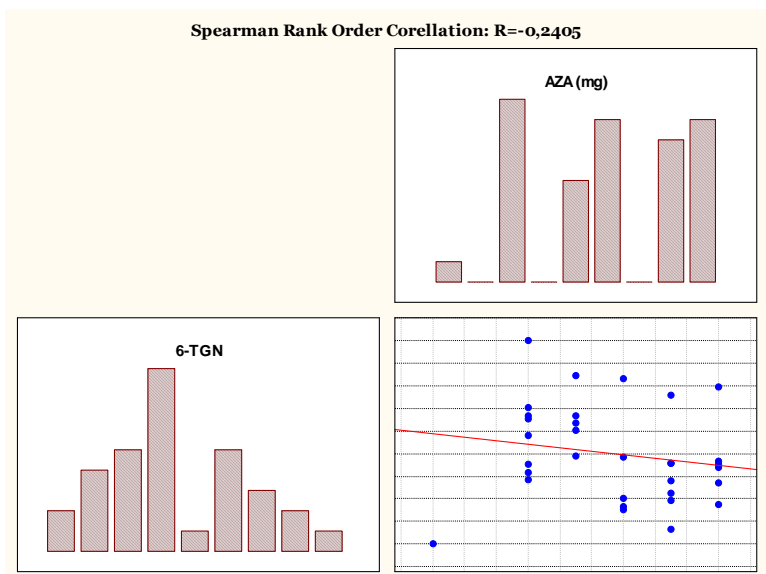
Концентрација на 6-TGN по групи		Користење AZA (месеци)		Вкупно
		3 - 12	над 12	
Група 1 суптотерапевтска	Број	2	0	2
	%	10,53%	0%	
Група 2 терапевтска	Број	6	8	14
	%	31,58%	61,54%	
Група 3 висока	Број	11	5	16
	%	57,89%	38,46%	
Вкупно	Број	19	13	32
	%	59,38%	40,63%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,2709$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу дозата на AZA и концентрацијата на 6-TGN покажа постоење на линеарна индиректна слаба корелација (Spearman Rank Order Correlation:  $R = -0,2405$ ). Со зголемувањето на дозата на AZA се намалува концентрацијата на 6-TGN (графикон 59).

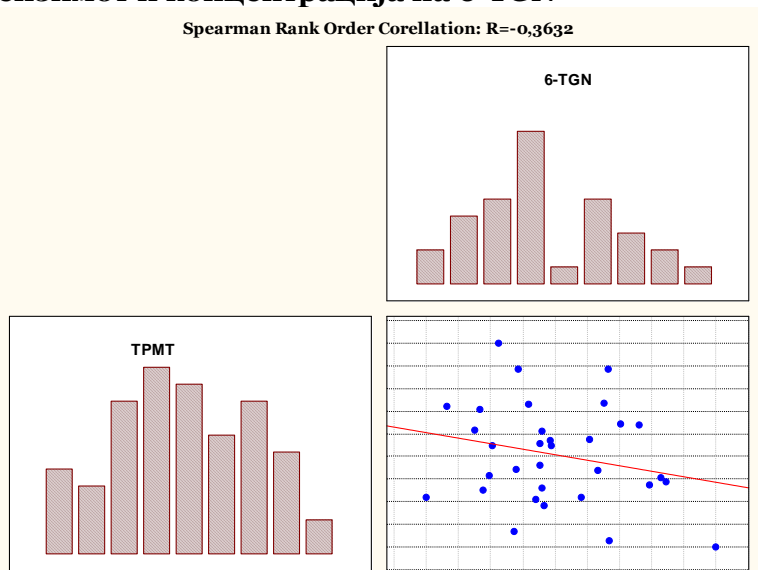
**Графикон 59. Непараметарска корелација помеѓу дозата на AZA и вредноста на 6-TGN**



#### 7.7.4.2. Концентрација на 6-TGN и активност на TPMT ензимот

Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу активноста на TPMT ензимот и концентрацијата на 6-TGN покажа постоење на линеарна индиректна умерена корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R = -0,3632$ ). Со зголемувањето на активноста на TPMT несигнификантно се намалува концентрацијата на 6-TGN (графикон 60).

**Графикон 60. Непараметарска корелација помеѓу активноста на TPMT ензимот и концентрација на 6-TGN**



**Табела 63. Концентрација на 6-TGN и активност на TPMT ензимот по групи**

Активност на TPMT ензимот по групи		Концентрација на 6-TGN по групи			Вкупно
		Група 1 суптераписка	Група 2 тераписка	Група 3 висока	
Група 1 ниска	Број	0	0	2	2
	%	0%	0%	100%	
Група 2 средна	Број	1	4	3	8
	%	12,50%	50%	37,50%	
Група 3 нормална-висока	Број	1	10	11	22
	%	4,55%	45,45%	50%	
Вкупно	Број	2	14	16	32
	%	6,25%	43,75%	50,00%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p=0,2709$ 

Група 2 TPMT /Група 3 TPMT

\*сигнификантно за  $p<0,05$ **7.7.4.3. Концентрација на 6-TGN според несакани дејства**

Анализата на концентрацијата на 6-TGN во однос на појавата на несакани дејства при терапија со AZA покажа дека кај пациентите кај кои е регистрирано несакано дејство има несигнификантно повисока просечна вредност на концентрацијата на 6-TGN ( $p>0,05$ ) во споредба со оние кај кои не е регистрирано несакано дејство, и тоа  $487,54 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 185,57 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  v.s.  $429,11 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 203,39 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  (t-test for independent samples = -0,5467 df=30  $p=0,5893$ ). Кај 50% од пациентите во групата со несакани ефекти просечната вредност на концентрацијата на 6-TGN е над  $562,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  споредено со групата каде нема несакани ефекти и каде тој е над  $399,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  кај 50% од пациентите.

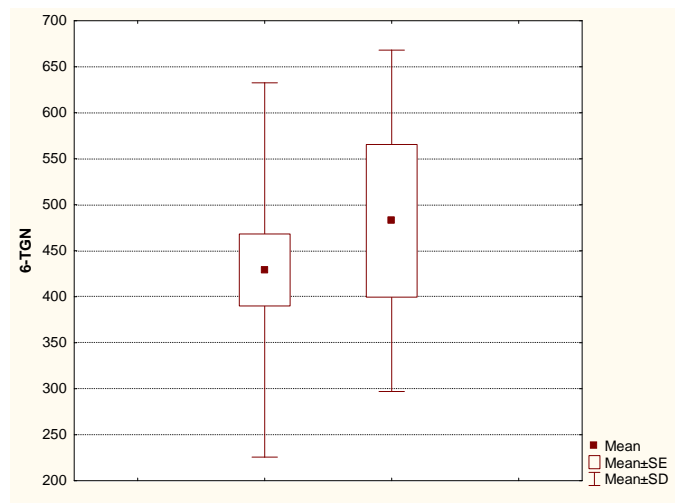
**Табела 64. Активност на 6-TGN според несакани дејства**

Несакано дејство	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
да	482,54	5	185,57	254,6	681,3	562,8
не	429,11	27	203,39	64,8	905,5	399,5

t-test for independent samples = -0,5467 df=30  $p=0,5893$ \*сигнификантно за  $p<0,05$

Табеларниот и графичкиот приказ на концентрацијата на 6-TGN во однос на појавата на несакани дејства е даден во табела 64 и на графикон 61.

**Графикон 61. Активност на 6-TGN според несакани дејства**



Направена е дополнителна анализа на вредностите на 6-TGN метаболитот при што пациентите се поделени во три подгрупи и тоа: а) **Група 1** - суптотерапевтски (<200 pmol/8x10<sup>8</sup> Ег); б) **Група 2** - терапевтски (200-400 pmol/8x10<sup>8</sup> Ег) и в) **Група 3** - високи (>400 pmol/8x10<sup>8</sup> Ег). Табеларниот приказ на анализата на активноста на TPMT ензимот по групи во однос на несакано дејство е даден во табела 65.

**Табела 65. Активност на 6-TGN по групи според несакано дејство**

Концентрација на 6-TGN по групи		Несакано дејство		Вкупно
		да	не	
<b>Група 1</b> суптотерапевтска	<b>Број</b>	0	2	2
	<b>%</b>	0,00%	100%	
<b>Група 2</b> терапевтска	<b>Број</b>	2	12	14
	<b>%</b>	14,29%	85,71%	
<b>Група 3</b> висока	<b>Број</b>	3	13	16
	<b>%</b>	18,75%	81,25%	
<b>Вкупно</b>	<b>Број</b>	5	27	32
	<b>%</b>	15,63%	84,38%	100%

Fisher-Freeman-Halton exact test: p=0,9999

\*сигнификантно за p<0,05

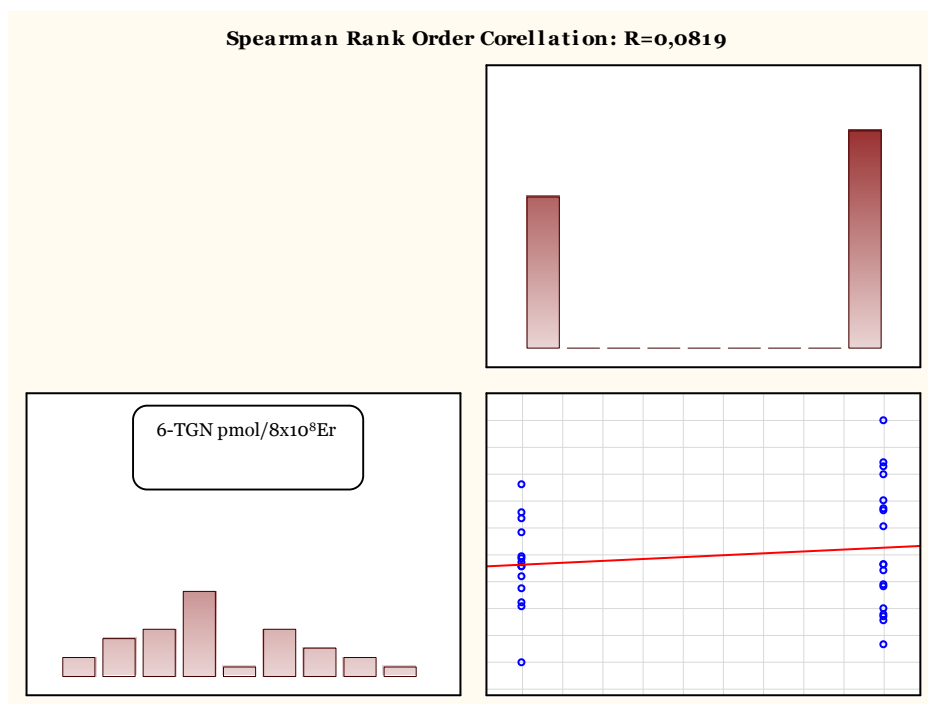


Анализата на вредностите на 6-TGN по групи и појавата на несакани дејства, за  $p > 0,05$ , покажа несигнификантно (Fisher-Freeman-Halton exact test:  $p = 0,9999$ ) најголем процент пациенти со несакани дејства во Групата 3 (висока концентрација на 6-TGN) и тоа кај 3 (18,75%), по што следува Групата 2 (тераписка концентрација) со 2 (14,29%) пациента. Ниеден од пациентите кои според вредностите на 6-TGN припаѓа на Групата 1 (суптераписка концентрација) не пријавил несакано дејство. Во Групата 3, кај сите пациенти кај кои има појава на несакани дејства, вредноста на на 6-TGN метаболитот е над  $450 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ .

#### 7.7.4.4. Концентрација на 6-TGN и активност на болеста

Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу активноста на болеста (акутна фаза/ремисија) и концентрацијата на 6-TGN покажа постоење на линеарна директна незначајна корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R = 0,0819$ ). Со зголемувањето на концентрацијата на 6-TGN несигнификантно се зголемува веројатноста за ремисија (графикон 62).

**Графикон 62. Непараметарска корелација помеѓу концентрацијата на 6-TGN и активноста на болеста**



### 7.7.5. 6-MMP метаболит

Кај испитаниците кои повеќе од 3 месеци се под терапија со AZA одредувана е концентрацијата на 6-MMP за секој испитаник и таа е анализирана во однос на повеќе параметри.

#### 7.7.5.1. Концентрација на 6-MMP според AZA

Просечната вредност на концентрацијата на метаболитот 6-MMP во моментот на земање на крв изнесува  $6497,87 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er} \pm 7462,02 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ , со минимална вредност од  $283,3 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$  и максимална вредност од  $31324,4 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ . Кај 50% од пациентите во примерокот вредноста на 6-MMP е над  $3213 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ .

Просечната вредност на 6-MMP кај пациентите кои користат AZA од 3 до 12 месеци изнесува  $5204,72 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er} \pm 5894,91 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ , со минимална вредност од  $283,3 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$  и максимална вредност од  $19865,1 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ . Кај 50% од овие пациенти вредноста на метаболитот 6-MMP е над  $2891 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ . Кај пациентите кои користат AZA над 12 месеци просечната вредност на 6-MMP изнесува  $8387,86 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er} \pm 9230,51 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ , со минимална вредност од  $681,6 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$  и максимална вредност од  $3132,4 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$  (табела 66). Кај 50% од овие пациенти вредноста на 6-MMP метаболитот е над  $3535 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{Er}$ . Тестираната разлика на просечните вредности на 6-MMP во двете групи е статистичка неситнификантна ( $p > 0,05$ ) (Mann-Whitney U Test  $Z = -1,247$   $p = 0,2124$ ).

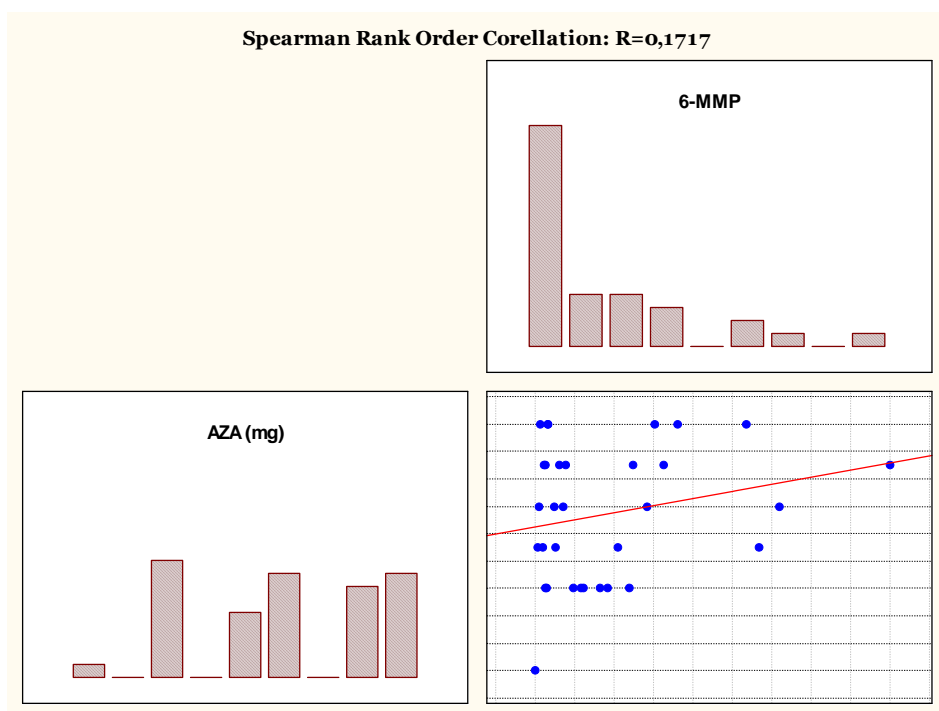
**Табела 66. Концентрација на 6-MMP според времето на користење AZA**

Користење AZA (месеци)	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
3 - 12	5204,72	19	5894,91	283,3	19865,10	2891
над 12	8387,86	13	9230,51	681,6	31324,40	3535
<b>Вкупно</b>	6497,87	32	7462,02	283,3	31324,40	3213

Mann-Whitney U Test  $Z = -1,247$   $p = 0,2124$

\*ситнификантно за  $p < 0,05$

**Графикон 63. Непараметарска корелација помеѓу дозата на AZA и концентрацијата на 6-MMP**

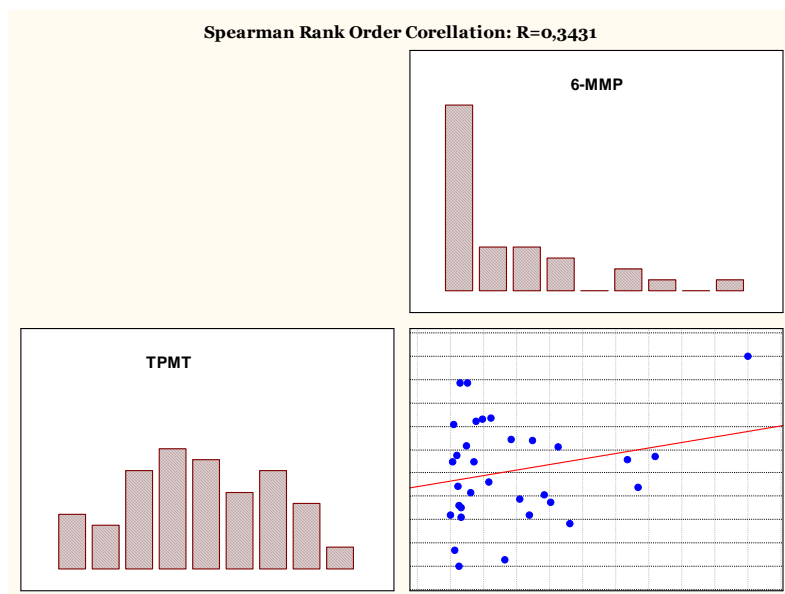


Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу дозата на AZA во моментот на земање крв и концентрацијата на 6-MMP покажа постоење на незначајна линеарна позитивна директна корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,1717$ ). Со зголемувањето на дозата на AZA се зголемува концентрацијата на 6-MMP (графикон 63).

#### 7.7.5.2. Концентрација на 6-MMP и активноста на TPMT ензимот

Направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу активноста на TPMT ензимот и концентрацијата на 6-MMP покажа постоење на линеарна директна умерена корелација (Spearman Rank Order Corellation:  $R=0,3431$ ). Со зголемувањето на активноста на TPMT несигнификантно се зголемува концентрацијата на 6-MMP (графикон 64).

**Графикон 64. Непараметарска корелација помеѓу активноста на ТРМТ и концентрацијата на 6-ММР**



Евентуалната поврзаност помеѓу високите вредности на 6-ММР метаболитот (посебно на оние >5700 pmol/8x10<sup>8</sup> Ег) со високата активност на ТРМТ ензимот е прикажана во табелата 67.

**Табела 67. Активноста на ТРМТ ензимот по групи и концентрацијата на 6-ММР над 5700**

Активноста на ТРМТ ензимот по групи		Концентрација на 6-ММР над 5700 pmol/8x10 <sup>8</sup> Ег		Вкупно
		да	Не	
Група 1 ниска	Број	/	/	/
	%	/	/	/
Група 2 средна	Број	3	8	11
	%	27,27%	72,73%	
Група 3 нормална-висока	Број	9	14	23
	%	39,13%	60,87%	
Вкупно	Број	12	22	34
	%	35,29%	64,71%	100%

Fishers exact two-tailed test: p=0,7049

Група 2/Група 3

\*сигнификантно за p<0,05

Направена е анализа на активноста на ТРМТ по групи и идентификација на случаите со концентрацијата на 6-ММП  $>5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ . Согледано е дека од вкупно 12 пациенти кај кои биле најдени вакви вредности, 9 (39,13%) се од Групата 3 која опфаќа нормална - висока активност на ТРМТ ензимот, а 3 (27,27%) се од Групата 2 која опфаќа средна активност на ТРМТ ензимот. Во Група 1 нема ниту еден пациент со концентрација на 6-ММП  $>5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ . Анализата покажа дека помеѓу Групата 2 и Групата 3 не постои статистички сигнификантна разлика ( $p > 0,05$ ) во однос на концентрацијата на 6-ММП  $>5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  (Fishers exact two-tailed test:  $p = 0,7049$ ).

### 7.7.5.3. Концентрација на 6-ММП според несакани дејства

Анализата на концентрацијата на 6-ММП метаболитот во однос на појавата на несакани дејства при терапија со AZA покажа дека кај пациентите кај кои е регистрирано несакано дејство има несигнификантно повисока просечна вредност на концентрацијата на 6-ММП ( $p > 0,05$ ) во споредба со оние кај кои не е регистрирано несакано дејство, и тоа  $7592,92 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7534,19 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  v.s.  $6295,08 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7575,19 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  (t-test for independent samples = -0,3522 df=30  $p = 0,7272$ ). Кај 50% од пациентите во групата со несакани ефекти просечната вредност на концентрацијата на 6-ММП е над  $5877 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  во споредба со групата каде нема несакани ефекти и каде тој е над  $2891 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  кај 50% од пациентите.

**Табела 68. Активност на 6-ММП според несакани дејства**

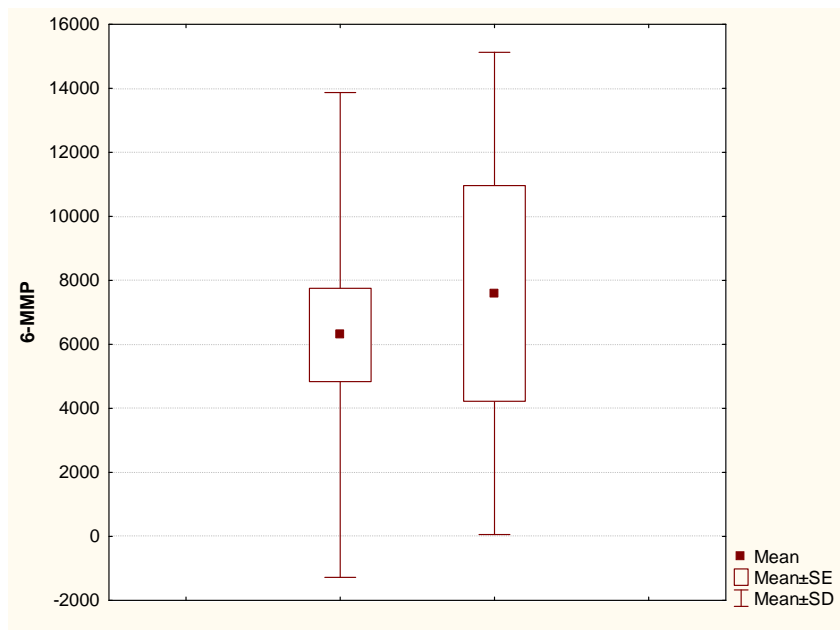
Несакано дејство	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
да	7592,92	5	7534,19	681,6	19865,1	5877
не	6295,08	27	7575,19	283,3	31324,4	2891

t-test for independent samples = -0,3522 df=30  $p = 0,7272$

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Табеларниот и графичкиот приказ на концентрацијата на 6-ММП во однос на појавата на несакани дејства е даден во табела 68 и на графикон 65.

**Графикон 65. Активност на 6-ММР според присуство/отсуство на несакани дејства**



### 7.7.6. Доза на AZA, користење AZA и несакани ефекти

За согледување на евентуалната разлика направена е споредбена анализа на дозата на AZA кај пациентите кои порано ја користеле оваа терапија и ја прекинале и оние кои сега ја користат терапијата (табела 69).

**Табела 69. Доза на AZA**

Користење AZA	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
Користи сега	164,7	39	27,3	100	200	175
Користел порано	50	8	18,9	25	75	50

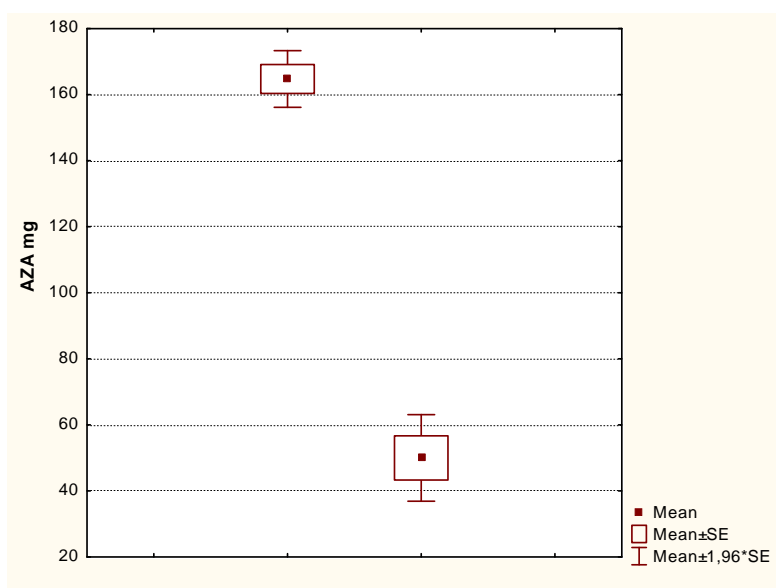
t-test for independent samples=11,282 df=45 p=0,0001\*

\*сигнификантно за p<0,05

Согледано е дека кај пациентите кои сега користат AZA просечната вредност на дозата изнесува 164,7 ± 27,3, со минимум доза од 100 mg и максимум доза од 200 mg. Кај 50% од пациентите во оваа група дозата на AZA

изнесувала над 200 mg. Во групата која порано користелеа AZA и ја прекинала терапијата, просечната вредност на дозата изнесувала  $50 \pm 18,9$ , со минимална доза од 25 mg и максимална доза од 75 mg. Кај 50% од пациентите во оваа група дозата на AZA изнесувала над 75 mg. За  $p < 0,05$ , постои сигнификантна разлика помеѓу двете групи во однос на просечните вредности на дозата на AZA (t-test for independent samples=11,282; df=45  $p=0,0001$ ) во прилог на поголемата доза на лекот во групата пациенти кои сега примаат AZA. Графичкиот приказ според дозата на AZA и користење AZA е даден на графикон 66.

**Графикон 66. Доза на AZA според користење AZA**



Кај пациентите кои користат AZA направена е поделба на групи според појавата на несакани ефекти и анализирана е евентуалната разлика во дозата на AZA (табела 70). Согледано е дека во групата пациенти со несакани ефекти, т.е. кај оние без несакани ефекти просечната доза на AZA изнесува  $146,6 \text{ mg} \pm 30,4 \text{ mg}$  v.s.  $168 \text{ mg} \pm 25,4 \text{ mg}$ , со минимум доза од 125 mg v.s. 100 mg и максимум од 200 mg v.s. 200 mg. За  $p < 0,05$ , постои сигнификантна разлика помеѓу двете групи во однос на просечните вредности на дозата на AZA (t-test for independent samples=2,0363 df=45  $p=0,0489$ ), што оди во прилог на поголемата доза на лекот во групата пациенти кај кои не се евидентирани несакани ефекти.

**Табела 70. Доза на AZA според несакани ефекти - пациенти кои сега користат AZA**

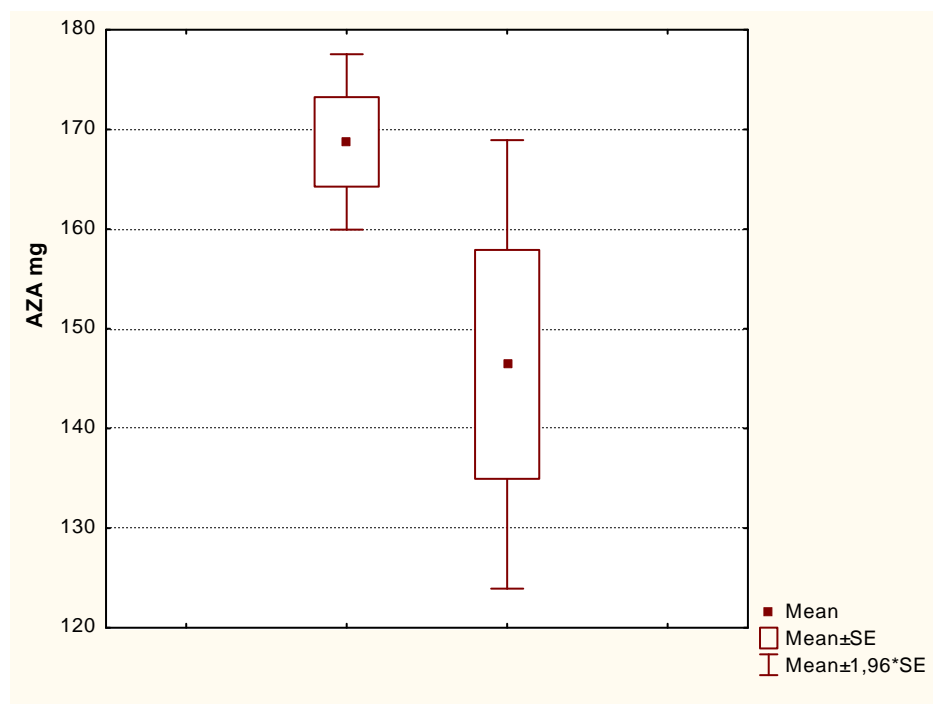
Несакани ефекти	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
да	146,4	7	30,4	125	200	146,4
не	168,7	32	25,4	100	200	168,7

t-test for independent samples=2,0363 df=45 p=0,0489\*

\*сигнификантно за  $p < 0,05$

Графичкиот приказ според несакани ефекти од дозата на AZA е даден на графикон 67.

**Графикон 67. Доза на AZA според несакани ефекти - пациенти кои сега користат AZA**



Кај пациентите кои прекинале со користење AZA направена е поделба на групи според појавата на несакани ефекти и анализирана е евентуалната разлика во дозата на AZA (табела 71). Во групата пациенти со несакани ефекти, т.е. без несакани ефекти, просечната доза на AZA изнесува  $25,0 \text{ mg} \pm 0,0 \text{ mg}$  v.s.  $53,4 \text{ mg} \pm 17,2 \text{ mg}$ , со минимум доза од 25 mg и во двете групи и максимум доза



од 25 mg v.s. 75 mg. И во оваа група кај пациентите кај кои се евидентирани несакани ефекти дозата на AZA е пониска.

**Табела 71. Доза на AZA според несакани ефекти - пациенти кои прекинале да користат AZA**

Несакани ефекти	Просек (Mean)	Број	Стандардна девијација (Std.Dev.)	Минимум (Min)	Максимум (Max)	Медијана (Median)
да	25,0	1	0	25	25	25
не	53,4	7	17,2	25	75	50

## **ДИСКУСИЈА**

## 8. ДИСКУСИЈА

Крајната цел во третманот на пациентите со ВЦЗ е постигнување на целосна контрола на болеста, запирање на прогресијата, како и промена на нејзиниот природен тек. Базирано на овие цели, клучниот терапевтски исход се состои од контрола на клиничките симптоми којашто вклучува ремисија без употреба на кортикостероиди, биолошка ремисија (нормализирање на воспалителните биомаркери, како што е CRP) и мукозна, односно ендоскопска ремисија (36,87).

Кај овие пациенти покрај аминосалицилатите, кортикостероидите претставуваат главна потпора во третманот при егзацербација на болеста. Но, една третина од пациентите кои примаат кортикостероиди за индукција на ремисија стануваат стероидно-зависни во временски период од 1 година. Долготрајната изложеност на системските кортикостероиди се поврзува со зголемен ризик од развој на опасни и потенцијално животозагрозувачки компликации (стероиден дијабет, хиперосмоларна состојба, хипокалемија, остеопороза, патолошки фрактури, аритмија, хипертензија итн.) (89). Затоа, вообичаено овие кортикостероиди брзо се заменуваат со терапија за одржување која вклучува употреба на тиопурински деривати- AZA или 6-меркаптопурин (6-MP) (99).

Терапевтската улога на тиопурините е честопати дискутирана, пред сè заради токсичноста и терапевтскиот неуспех. Во клиничката пракса, 25% од пациентите може да не реагираат на AZA или 6-MP, 30% може да доживеат релапс за време на третманот, додека кај 15-30% може да се појави некое несакано дејство (2).

Од особена важност е следењето на терапевтскиот лек како водич за донесување натамошни клинички одлуки. Терапевтското мониторирање помага во правилно дозирање на лекот или пак во донесување одлука за промена на терапијата (36).

Следењето на метаболитите на азатиоприн во комбинација со одредување на активноста на TPMT ензимот може да го предвидат клиничкиот одговор кај пациентите со ВЦЗ, а со тоа и да се индивидуализира терапевтскиот третман (99,117).

Во ова истражување кај сите вклучени пациенти со ВЦЗ беше одредена активноста на TPMT ензимот. Кај пациентите кои во моментот на оваа студија примаа AZA беа одредувани и концентрациите на активните метаболити од овој лек (6-TGN и 6-MMP).

Добиените вредности за активноста на TPMT ензимот и концентрациите на 6-TGN и 6-MMP се најважното почетно орудие за истражување на терапевтската ефикасност и токсичност од примената на азатиоприн кај пациентите со ВЦЗ.

Лабораториските параметри во комбинација со клиничкиот статус и концентрациите на активните метаболити, 6-TGN и 6-MMP, придонесуваат за попрецизна проценка на терапевтскиот исход и токсичност кај заболените со ВЦЗ поставени на терапија со AZA.

Истражувачкиот примерок на оваа студија вклучи 63 испитаници.

### **8.1. Демографски карактеристики**

Податоците од светската литература покажуваат дека ВЦЗ може да се јават кај луѓе на сите возрасти, но вообичаено започнуваат пред 30-тата година од животот, со пик на инциденцијата помеѓу 20 и 40 години, и со можност за втор пик помеѓу 50 и 70 години за УК (60).

Во ова истражување, според Виенската класификација, кај 82,11% од заболените со КБ дијагнозата е поставена пред 40-тата година од животот и патолошката промена е локализирана на терминалниот илеум. Овие резултати се во согласност со податоците од други изведени студии до кои дошле *Abdul-Baki* (1), *Capristo* (22), *Florin* (42), *Hass* (53), *Jerome* (61) и *Santana* (110).

Кај 83,54% од пациентите со УК, дијагнозата е поставена пред 40-тата година, што оди во прилог на податоците од литературата добиени од *Homayoun* (58) и *Wiercinka-Drapalo* (125).

Во однос на локализацијата на патолошката промена кај заболениите од УК, кај 66,67% од пациентите е дијагностициран панколитис, по што следуваа 22,22% од пациентите со левостран колитис, 5,56% со проктосигмоидитис и 5,56% со проктит. Голем број студии ги обработуваат податоците за локализацијата на патолошката промена кај заболениите од УК. Некои од нив ги потврдуваат резултатите од нашето истражување, како што се оние спроведени од *Abdul-Baki* (1), *Capristo* (23), *Denapiene* (32), *Rerknimitr* (103), но некои се спротивставени, како оние на *Mijac* (91) и *Wiercinka-Drapalo* (124).

AZA како терапевтска опција се користи кај потешките форми на ВЦЗ, па затоа во оваа студија најголем процент на заболени со УК имаат локализација на патолошката промена на целото дебело црево (панколитис).

Резултатите од оваа студија покажаа дека дистрибуцијата на машките и женските испитаници несигнификантно се разликува кај заболениите со КБ и УК. За слична полова дистрибуција зборуваат и други истражувачи (1,22,23,32). Во литературата постојат и студии кои прикажуваат доминација на женскиот пол кај КБ, односно машкиот пол кај УК (*Santana*, 111) и обратна ситуација, кога мажите повеќе заболуваат од КБ, односно жените од УК (124,127).

Помеѓу 70% и 90% од пациентите со КБ во текот на животот имаат потреба од хируршка интервенција, како резултат на компликации од стриктури, интраабдоминални и перианални фистули, интестинална перфорација, интраабдоминални апсцеси, неуспешна медикаментозна терапија или малигнитет (84). 39% од овие заболени имаат потреба за повторна операција. Во рамките на ова истражување, кај 44,44% од заболениите со КБ е евидентирана оперативна интервенција. Просечната возраст на пациентите со КБ во оваа студија беше 41,84 год  $\pm$  11,82 год, со најмала возраст од 15 год. и максимална возраст од 62 години. Според анализата на медијана, 50% од пациентите со овој клинички тип на болеста беа на возраст од 42 години. Кај

најголемиот дел од заболените (35,56%), болеста беше со времетраење од помалку од 5 год. Анализирајќи ја возраста и времетраењето на болеста во години може да се заклучи дека кај еден дел од заболените би можело да се јави потреба од хируршка интервенција во натамошниот тек од животот.

Околу 80% од заболените со УК имаат интермитентна активност на болеста, додека кај 20% од нив ќе се јави потреба за хируршка интервенција (123). Кај заболените од УК кои беа вклучени во оваа студија, не беше евидентиран ниту еден случај со хируршка интервенција заради примарното заболување. Просечната возраст на заболените со УК беше 38,33год ± 13,31 год., со минимална возраст од 24 год. и максимална возраст од 66 год. 50% од заболените се помлади од 34,5 години. Кај 66,67% од заболените патолошкиот процес беше локализиран по должината на целото дебело црево (панколитис).

Возраста на заболените од УК и проксималната локализација на патолошкиот процес за време на поставување на дијагнозата се поврзуваат со потешок тек на болеста (123). Хируршката интервенција има важна улога во третманот на УК заради можноста од неуспех на медикаментозниот третман, појава на компликации при долготраечка болест и евентуална малигнизација (57).

Во оваа студија кај 11,11% од заболените со УК болеста беше со времетраење подолго од 10 години. Кај заболените од УК кај кои постои панколитис, што трае повеќе од 10 години, се изложени на поголем ризик од појава на рак на дебелото црево, за што треба да се води сметка (41).

## 8.2. Екстраинтестинални манифестации (ЕИМ) кај заболени од ВЦЗ и употреба на AZA

Според податоците од литературата, ЕИМ се јавуваат кај 25–40% од заболениите со ВЦЗ (5,10). 25% од заболениите со ВЦЗ имаат повеќе од една ЕИМ. Развојот на една ЕИМ го зголемува ризикот за појава на друга (82).

Тоа беше потврдено и со резултатите добиени во оваа студија. Така, најчести ЕИМ кај заболениите од ВЦЗ во оваа студија беа зглобните промени со 33,33% застапеност, потоа перианална фистула со 19,05%, кожни лезии со 6,35% застапеност, слузнички лезии со 3,17% застапеност, други фистули со 9,52% застапеност, црнодробни и билијарни промени со 3,17% застапеност и промени на очите со 1,59% застапеност.

Во оваа студија најголем процент пријавени ЕИМ имаше кај заболениите со ВЦЗ кои порано биле на терапија со AZA (75%), по што следуваше групата заболени која сега користи AZA (51,28%), и најмалку пријавени ЕИМ (37,50%) беа во групата која не користи AZA ( $p > 0,05$ ).

Заболениите со ВЦЗ исто така беа анализирани во однос на просечниот број пријавени ЕИМ по испитаник и употребата на AZA. Анализата покажа дека најголем просечен број пријавени ЕИМ по испитаник, и тоа  $2,33 \pm 1,63$ , има во групата која порано користела AZA, со минимум едно и максимум 5 ЕИМ по испитаник. Просечен број ЕИМ од  $1,95 \pm 1,09$  имаше во групата која сега користи AZA, со минимум едно и максимум 4 екстраинтестинални манифестации по лице. Најмалку или со просечен број ЕИМ од  $1,67 \pm 0,52$  по испитаник имаше во групата која не користи AZA, со минимум едно и максимум две ЕИМ.

ЕИМ имаат големо влијание врз квалитетот на животот кај заболениите од ВЦЗ и потреба од специфична терапија во зависност од зафатениот орган. Овие манифестации може да се појават пред и по поставувањето на дијагнозата на ВЦЗ. Најчесто се афектирани зглобовите, кожата или очите, но може да зафатат и други органи како што се црниот дроб, белите дробови или панкреасот. Определени ЕИМ, како што се периферниот артритис, афтите во устата, еписклеритис или еритема нодозум честопати се појавуваат за време на

акутната фаза од воспалението и вообичаено се повлекуваат по употреба на медикаментозна терапија за цревното заболување. За други ЕИМ, како што се увеитис, анкилозирачки спондилитис, пиодерма гангренозум и примарен склерозирачки холангитис, поврзаноста со активноста на болеста е нејасна (31,120).

Во праксата, лекарите кои се грижат за заболените од КБ и УК секојдневно се соочуваат со нов клинички предизвик како резултат од зголемената појава на ЕИМ (31). Токму поради тоа, за подобрување на здравствената состојба кај овие заболени потребна е навремена дијагноза и соодветен третман на ЕИМ, коишто понекогаш во однос на интестиналната патологија се многу подраматични.

### **8.3. Азатиоприн - несакани дејства, прекин на терапијата, терапевтски исход**

Кај 19,1% од заболените кои беа на терапија со AZA во моментот на ова истражување (N=39) и заболените кои порано пиеле AZA (N=8) беше регистрирано несакано дејство. До слични резултати доаѓаат и *Magro* (23%), и *Saibeni* (27,4 %) (87,106).

Податоците од литературата покажуваат дека кај заболените со ВЦЗ кои се поставени на терапија со тиопурини, се јавува супресија на коскената срцевина кај 2-5% од случаите, со леукопенија кај 2-4% од заболените третирани со AZA или 6-MP (66,87,90).

Добиените резултати од оваа студија покажаа дека бројот на леукоцитите кај заболените со ВЦЗ третирани со AZA се пониски во споредба со заболените кои не примаат AZA ( $6,97 \cdot 10^9/L \pm 2,61 \cdot 10^9/L$  v.s.  $9,07 \cdot 10^9/L \pm 3,26 \cdot 10^9/L$ ,  $p < 0,05$ ).

Панкреатитис се јавува кај околу 4% од заболените третирани со тиопурини, вообичаено во првите недели од третманот (20,24). Хепатотоксичноста се поврзува со употребата на AZA и концентрација на 6-MP  $> 5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Et}$  (37).



Податоците од литературата посочуваат дека најчесто пријавено несакано дејство од употребата на AZA е гастроинтестиналната интолеранција (11%), потоа следи леукопенијата со 7,7%, тешка форма на леукопенија со 3%, променети хепатални ензими со 6,9%, вирусни промени со 4,6%, додека 3% од заболените развиваат некој тип на промени на кожата (118,125).

Во студијата на *Glazier* (49), кај 11,2% од заболените со ВЦЗ се јавило несакано дејство по употреба на AZA, и тоа кај 3,8% нарушување на хепаталните ензими, пневмонија кај 3,1%, панкреатитис кај 2,5%, наузеа кај 2,1%, главоболка кај 2,8%, треска кај 1,4%, алопеција кај 1% и промени на кожата кај 0,7%.

Во прилог на овие сознанија се и податоците од нашата студија, со надополнување дека несаканите дејства беа почести кај заболените со ВЦЗ на почетокот на третманот со AZA. Најголем дел од пријавените несакани дејства кај овие заболени се појавија во првите три месеци од започнување на терапијата со AZA ( $p < 0,05$ ).

Интолеранцијата кон AZA се појавува на пониски почетни дози, по што лекот или се исклучува или доколку постои можност, дозата се намалува (4).

Така, кога беа анализирани податоците од оваа студија, беше најдено дека дозата на AZA кај заболените кои сега ја користат ( $N=39$ ) е поголема во однос на дозата која заболените порано ја користеле, но ја прекинале терапијата ( $N=8$ ) ( $164,7 \text{ mg} \pm 27,3 \text{ mg}$  v.s  $50 \text{ mg} \pm 18,9 \text{ mg}$  ( $p < 0,05$ ). Понатаму, резултатите покажаа разлика помеѓу истите групи во однос на просечните вредности на дозата на AZA ( $p < 0,05$ ), во прилог на поголемата доза на лекот во групата пациенти кај кои не се евидентирани несакани ефекти ( $146,6 \text{ mg} \pm 30,4 \text{ mg}$  v.s.  $168 \text{ mg} \pm 25,4 \text{ mg}$ ).

Како надополнување на овие резултати, кај заболените со ВЦЗ кои во моментот на ова истражување беа на терапија со AZA ( $N=39$ ), со зголемување на дозата се зголемуваше и вредноста на алфа-амилаза во серум ( $R=0,2368$ ).

Според *Sanborn и сор.* (107), неалергиската токсичност од тиопурините зависи од дозата и може да корелира со аспектите на метаболизмот на азатиоприн.

И покрај можноста од појава на несакани дејства, во студијата на *Fraser и сор.* (43) докажана е безбедноста и ефикасноста на AZA во третманот на ВЦЗ.

Долгорочниот исход од третманот со тиопурините кај заболените од ВЦЗ во реалниот живот до сега е обработуван во неколку опсервациони студии. Процентот на заболени кои постигнале ремисија по употреба на тиопурините е евидентирана во студиите на *Saibeni* (46,6%), *Chebli* (68-81%), *Fraser* (45% КБ, 58% УК), *Glazier* (62%), *Jharap* (40%), *Korelitz* (68%), *O'Brien* (70%) и *Colombel* (30 %) (106,25,43,50,63,71,94,29,).

Во студијата на *Magro и сор.* (87) 33% од пациентите кои примале AZA, како резултат од кортикостероидна зависност биле во клиничка ремисија на крајот на следењето. Притоа, средното време за почеток на терапијата со AZA или инфликсимаб од моментот на поставување на дијагнозата било многу долго (средно 2 години), и тоа дефинитивно според овие автори може да има влијание на исходот на AZA врз заболените од КБ и на некој начин да влијае на неефикасниот терапевтски пристап.

Во оваа студија не беше анализиран временскиот период поминат од поставувањето на дијагнозата и започнување на терапијата со AZA, што од своја страна може да има влијание врз постигнатиот терапевтски ефект проценет преку CDAI и UCAI.

Од вкупно 39 заболени со ВЦЗ кои користеа AZA најмалку 3 месеци, 58,97% постигнаа ремисија (58,62% со КБ, 60% со УК). Во однос на клиничките симптоми, заболените кои користеа AZA во моментот на ова истражување имаа статистички значајно помалку појава на слуз и крв во столицата како и тenezми во однос на заболените кои не примаа AZA ( $p < 0,05$ ). Подобро субјективно чувство беше забележано во групата пациенти кои користат AZA во моментот на ова истражување во однос на заболените кои не користеа AZA ( $p < 0,05$ ).

Податоците од литературата ја потврдуваат ефикасноста на AZA во постигнување ремисија без употреба на кортикостероиди и намалување на хоспитализациите (14,43,56,68,77,89,97,108).

Заболените со УК, кои редовно ја примаат препишаната терапија со AZA, имаат 5 пати помал ризик за релапс на болеста, а со тоа остануваат во ремисија подолг временски период. Симптоматската контрола на болеста и подобрениот

квалитет на живот доведуваат до намалување на ризикот за развој на колоректален карцином (47).

Голем број студии ја обработуваат темата за безбедноста на AZA по долготрајна континуирана терапија. Се поставува прашањето, колку долго трае ефикасноста? Во студиите на *Lemann* (77), *Mantzaris* (89) и *Fraser* (43), докажана е ефикасноста и безбедноста на AZA кај пациенти со КБ кои ја примале оваа терапија континуирано повеќе од 3,5, односно 4 и 5 години.

Во ретроспективната студија на *Holtmann u sor.* (56), докажано е дека AZA ја задржува ефикасноста и по 4 години, го подобрува квалитетот на животот кај пациентите кои имаат релапс одвреме навреме и може да ја намали потребата од дополнителна употреба на кортикостероиди за одржување на ремисијата. Овие автори препорачуваат да се размислува за прекин на азатиоприн кај пациенти кои се во комплетна ремисија во период подолг од 4 години и кои немаат потреба од стероиди.

Според *Kim u sor.* (68), прекилот на терапијата со 6-меркаптопурин, додека КБ е во ремисија, доведува до поголем ризик за развој на акутна фаза од заболувањето, додека континуираната употреба на 6-меркаптопурин ја намалува можноста за појава на релапс.

Спротивно на овие резултати е мислењето на *Bouhnik u sor.* (14), кои заклучуваат дека по 4 години употреба на овие лекови поминати во ремисија, ризикот за повторно активирање на болеста е идентичен без разлика дали терапијата е континуирана или прекината.

Дефинирањето на оптималното времетраење на третманот со AZA е особено важно, бидејќи пролонгираната употреба на AZA може да предизвика одложена токсичност на коскената срцевина, црниот дроб, инфекции и малигнитет (89).

Резултатите од оваа студија не покажаа значајни разлики во однос на времетраењето на терапијата со AZA (помеѓу 3-12 месеци и >12 месеци) и бројот на пријавени несакани дејства (4,26% v.s. 8,51%), односно времетраењето на терапијата со AZA (помеѓу 3-12 месеци и >12 месеци) и постигнатата ремисија (66,67% v.s. 57,89%).

Некои од причините за овие спротивставени мислења можат да бидат: ретроспективната природа на повеќето од студиите како и употребата на различните стандардизирани индекси во проценката на активноста на болеста кои ги вклучуваат клиничките, ендоскопските или хистолошките податоци.

#### **8.4. Активност на TPMT ензимот кај заболени од ВЦЗ**

Во согласност со резултатите од некои други истражувања (2,4,85,125), и во оваа студија најголемиот број од заболениите со ВЦЗ (69,84%) имаа нормална или висока активност на TPMT ензимот ( $>13,8$  U/ml Er), 25,4% имаа средна активност (5,0-13,7 U/ml Er), додека најмалку (4,76%) имаа ниска активност на овој ензим ( $<5,0$  U/ml Er). Со тоа тримодалната дистрибуција во општата популација е докажана и во оваа студија.

Кај 50% од заболениите со ВЦЗ активноста на TPMT ензимот беше над 19,1 U/mL Er. Просечната вредност беше помеѓу 18,49 U/mL Er  $\pm$  8,27 U/mL Er. Заболениите од женски пол имаа повисоки вредности за активноста на TPMT ензимот во споредба со машките (21,62 U/mL Er  $\pm$  6,94 U/mL Er v.s 15,82 U/mL Er  $\pm$  8,47 U/mL Er,  $p>0,05$ ). Не беше најдена статистичка значајност помеѓу заболениите со КБ и УК во однос на активноста на TPMT ензимот (19,46 U/mL Er  $\pm$  8,06 U/mL Er v.s. 16,09 U/mL Er  $\pm$  8,52 U/mL Er,  $p>0,05$ ). Во однос на половата дистрибуција на активноста на TPMT ензимот, резултатите од претходно изведените студии покажуваат различни податоци (65,69,78).

Фенотипската проценка на активноста на TPMT ензимот покажува интересничка варијабилност. Етничката припадност, клиничкиот тип на болеста, моменталниот медикаментозен третман и кинетиката на еритроцитите со можноста за трансфузија на крв мора да бидат земени предвид кога станува збор за интерпретација на активноста на TPMT ензимот (79).

Во студијата на *Campbell u sor.* (21) не е најдена статистичка разлика во дистрибуцијата на активноста на TPMT кај пациентите кои примале само AZA, односно AZA + 5 ASA. Ова се потврди и со нашите резултатите, каде заболениите со ВЦЗ кои беа третирани само со AZA имаа повисоки вредности за активноста на TPMT ензимот ( $p>0,5$ ), во споредба со заболениите кај кои покрај AZA беше

ординирано истовремено и препарат на 5-ASA (18,29 U/mL  $E_r \pm 7,02$  U/mL  $E_r$  v.s. 16,64 U/mL RBCs  $\pm 8,24$  U/mL RBCs).

Заболените со ВЦЗ, кај кои покрај AZA во терапијата се додава и 5 ASA, се изложени на зголемен ризик за развој на леукопенија. Можноста за реакција помеѓу двата препарата е регистрирана при истовремена терапија со меркаптопурин и олсалазин. Оваа појава се поврзува со инхибиција на TPMT ензимот (86).

Во студијата на *Lowry и сор.* (85) заболениите со ВЦЗ, кои покрај AZA истовремено биле подложени на терапија со месалазин, сулфасалазин или олсалазин, забележани се значајно пониски вредности на бројот на леукоцитите во споредба со заболениите кај кои не биле ординирани аминосалицилати.

Во оваа студија не беа анализирани заболениите со ВЦЗ кои примаа само AZA (N=18), односно AZA+ 5-ASA (N=20) во однос на појавата на несаканите дејства, од една страна, и лабораториските параметри, од друга страна.

### **8.5. Влијание на активноста на TPMT ензимот врз појавата на несакано дејство од примената на AZA**

Одредувањето на активноста на TPMT ензимот пред воведување на тиопуринска терапија доведува до подобрување на симптомите на заболениите од ВЦЗ, преку зголемување на ефикасноста и намалување на можноста за појава на токсичност (128).

Во студите на *Lennard* (81) и *Mowat* (92) се потенцира значењето на активноста на TPMT во предвидувањето на несакани дејства, а помалку во долгорочната терапевска контрола.

Недостаток на TPMT ензимот е најважната и најчеста причина за развој на миелотоксичност кај заболениите кои примаат AZA (55). Во оваа студија, заболениите кај кои беше регистрирано несакано дејство имаа сигнификантно пониска просечна вредност на активноста на TPMT ензимот (за  $p < 0,05$ ) во споредба со оние кај кои не беше регистрирано несакано дејство (13,96 U/mL  $E_r$

$\pm 8,69 \text{ U/mL Er}$  v.s  $18,43 \text{ U/mL Er} \pm 7,22 \text{ U/mL Er}$  ). Најголем процент заболени со несакани дејства беа со ниска активност на ТРМТ (50%). Овие резултати се потврдени и во студијата на *Gisbert u cop.* (48), ( $16,6 \text{ U/mL Er} \pm 3 \text{ U/mL Er}$  v.s.  $19,1 \text{ U/mL Er} \pm 4 \text{ U/mL Er}$ ,  $p < 0,001$ ).

Нормална или висока ТРМТ ензимска активност не ја исклучува можноста за појава на миелотоксичност (26,102).

Сè додека не се постави јасна граница помеѓу употребата на АЗА и појавата на несакано дејство, клиничарите треба да продолжат со правење редовни лабораториски контроли кај сите заболени заради можната појава на доцна миелотоксичност.

### **8.6. Влијание на активноста на ТРМТ ензимот врз терапевтскиот одговор кај заболениите со ВЦЗ**

Во согласност со претходно изведените студии (16,126), резултатите од нашата студија покажаа дека 65,38% од заболениите со ВЦЗ кои постигнале ремисија имаа нормална или висока активност на ТРМТ ензимот, додека 54,55% имаа средна активност. Ниту еден од заболениите со ниска ТРМТ ензимска активност не постигнал ремисија ( $p > 0,05$ ).

Мерењето на активноста на ТРМТ ензимот го намалува времето потребно за постигнување на терапевтскиот одговор, којшто би се добил преку стандардна администрација на дозата (техника “start slow-go slow”) (42). Истовремено би се намалило времетраењето на користење на кортикостероидите. Со тоа кај пациентите кај кои постои нормална или висока ТРМТ активност би се започнало со давање повисока почетна доза на АЗА, односно кај оние кај кои постои ниска ТРМТ активност би се започнало со пониска почетна дневна доза на АЗА и постепено истата би се титрирала до постигнување на терапевтскиот ефект (25). Во САД препорачани се повисоки дневни дози на АЗА, па на тој начин тие влијаат врз фенотипските варијации на активноста на ТРМТ ензимот со зголемување на процентот на заболени кои би постигнале ремисија (21).

Според *Campbell u sor.* (21), во случаите кога кај заболените со ВЦЗ се применува ниска доза на AZA, < 2mg/kg тт, од особено значење е одредувањето на активноста на TPMT. Во тој случај, заболените со ниска активност на TPMT, имаат поголем ризик за развој на акутната фаза, односно тешко ќе ја одржуваат ремисијата.

Фенотиписките варијации на активноста на TPMT ензимот треба да бидат земени предвид кај секој заболен индивидуално при одлучување за големината на дозата на AZA.

Потенцијалната интеракција помеѓу AZA со 5 ASA е клинички релевантна и бара понатамошни истражувања, бидејќи многу пациенти со ВЦЗ се на двојна терапија. Некои автори сугерираат 5 ASA како инхибитор на TPMT ензимот да се користи со цел да влијае врз метаболизмот на AZA во насока на постигнување терапевтски одговор кај резистентни пациенти (117).

Во оваа студија, дозирањето на заболените беше индивидуално, според телесната тежина и толеранцијата. Можеби мерењето на активноста на TPMT ензимот пред започнување на терапијата со AZA ќе покажеше кои пациенти би имале потреба од поголема почетна доза за постигнување на терапевтскиот ефект за пократок временски период, односно кои од заболените имаат потреба од помала почетна доза за избегнување на појавата на несакани дејства.

### **8.7. Улогата на 6-TGN метаболитот во развојот на несаканите дејства и терапевтскиот одговор кај заболените од ВЦЗ третирани со азатиоприн**

Следењето на метаболитите на азатиоприн во комбинација со одредување на активноста на TPMT може да го предвиди клиничкиот одговор кај пациентите со ВЦЗ (99). Азатиоприн има бавно дејство, со средно време за постигнување на терапевтскиот одговор од 3 месеци. Долгото време потребно за постигнување на терапевтскиот одговор се смета дека е во корелација со акумулацијата на 6-TGN и постигнувањето на steady-state состојба (99).

Кај возрасни заболени од КБ, средното време за постигнување на steady-state на 6-TGN метаболитот е 5 недели (54).

Во оваа студија, кај заболените со ВЦЗ кои повеќе од 3 месеци беа на терапија со AZA, беше одредена концентрацијата на 6-TGN метаболитот и таа беше анализирана во однос на повеќе параметри.

Просечната вредност на концентрацијата на 6-TGN метаболитот во моментот на земање крв кај заболените беше  $437,46 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ E} \pm 198,82 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ . Кај заболените со ВЦЗ не беше најдена статистичка значајност ( $p > 0,05$ ) помеѓу концентрацијата на 6-TGN и времетраењето на користење AZA од 3-12 месеци и повеќе од 12 месеци ( $460,06 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 206,61 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  v.s.  $404,42 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 189,99 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ) (76).

Не беше најдена ниту статистичка значајност помеѓу дозата на AZA и концентрацијата на 6-TGN ( $p > 0,05$ ). Податоците во литературата за оваа поврзаност се контрадикторни. *Pozler* (99), *Zhang* (129) и *Gearry* (46) во своите истражувања ги потврдуваат нашите резултати, но во студијата на *Lee и сор.* (76) најдена е позитивна корелација помеѓу дозата на AZA и концентрацијата на 6-TGN ( $p < 0,0001$ ).

Некои фактори може да влијаат врз забрзување на фармакокинетиката на 6-TGN и 6-MMP, како на пример, промени во апсорпцијата на азатиоприн, или интеракции со други лекови (месалазин, балсалазид, сулфасалазин доведуваат до зголемување на 6-TGN концентрацијата во еритроцитите) (27,86).

Во оваа студија не беше анализирано влијанието на дозата на AZA врз концентрацијата на 6-TGN во однос на тоа дали заболените примаат само AZA, односно AZA + 5-ASA.

Исто така, и недостигот на стандардизација на методите за одредување на концентрацијата на 6-TGN метаболитот може да биде една од причините за овие контрадикторни резултати.



Според *Lennard* (80) постои поврзаност помеѓу активноста на TPMT ензимот и концентрацијата на 6-TGN, како и помеѓу концентрацијата на 6-TGN и клиничкиот одговор, односно појавата на миелотоксичност.

Исто така, *Campbell u sor.* (21) наоѓаат статистички значајна пониска просечна активност на TPMT ензимот кај заболениите кои ја прекинале терапијата со AZA како резултат од неутропенија, во споредба со заболениите кои ја прекинале терапијата заради некое друго несакано дејство.

Висока концентрација на 6-TGN се поврзува со зголемена појава на леукопенија, лимфопенија и употреба на месалазин (76).

Значајна негативна корелација е најдена помеѓу бројот на леукоцитите и концентрацијата на 6-TGN ( $p < 0,002$ ) и во студијата на *Ohtsuka u sor.* (96).

И во оваа студија направената анализа покажа дека со зголемување на активноста на TPMT доаѓа до намалување на концентрацијата на 6-TGN ( $p > 0,05$ ). Висока TPMT еритроцитна активност одговара на ниска steady state 6-TGN концентрација, и обратно (12,39,129).

Заболениите кај кои постои дефицит на TPMT ензимот се изложени на зголемен ризик од развој на тешка форма на миелосупресија, додека кај оние со многу висока активност на TPMT ензимот, како резултат на хиперметилацијата, потешко се постигнува ремисија (109).

Заболениите кај кои беше регистрирано несакано дејство имаа повисока просечна вредност на концентрацијата на 6-TGN, споредено со оние кај кои не беше регистрирано несакано дејство ( $487,54 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 185,57 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  v.s.  $429,11 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \pm 203,39 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ ) ( $p > 0,05$ ). Кај 50% од пациентите во групата со несакани ефекти просечната вредност на концентрацијата на 6-TGN беше над  $562,8 \text{ pmol}/8 \times 10^8$  во споредба со групата каде немаше несакани ефекти и каде тој кај 50% од пациентите беше над  $399,5 \text{ pmol}/8 \times 10^8$ .

Најголем процент од пациентите со несакани дејства беа од групата со висока концентрација на 6-TGN (18,75%), а потоа следуваше групата со терапевска концентрација (14,29%). Ниту еден од пациентите кои според вредностите на 6-TGN припаѓаше на супотераписката група немаше несакано дејство.

Во студијата на *Lee u sor.* (76), појавата на леукопенија ( $p = 0,025$ ) и лимфопенија ( $p = 0,045$ ) се поврзуваат со високи концентрации на 6-TGN.

Терапевтско таргет ниво од 6-TGN помеѓу  $250-500\text{pmol}/8 \times 10^8$  RBC (терапевтска група) се поврзува со повисока преваленција на ремисија кај заболени од КБ (33). И во нашата студија направената анализа на меѓусебната зависност помеѓу активноста на болеста и концентрацијата на 6-TGN метаболитот покажа постоење на линеарна директна незначајна корелација; со зголемување на концентрацијата на 6-TGN несигнификантно се зголемуваше веројатноста за ремисија.

Во својата студија *Wright u sor.* (126) го користат CDAI и Walmsley индексот за проценка на активноста на болеста, при што заклучуваат дека ниска 6-TGN концентрација е поврзана со акутната фаза од заболувањето.

Во оваа студија активноста на болеста беше проценувана преку користење на CDAI и UCAI. Но, клиничката активност на болеста (симптомите) може да се проценува и преку инструменти како што се: Harvey-Bradshaw индекс, IBDQ индекс и Perianal disease activity index. Ендоскопската активност може да се проценува преку Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) и Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) и Rutgeerts score (постоперативен). Овие инструменти ја рефлектираат активноста на болеста во определено време, но не го мерат кумулативното оштетување на цревата, а со самото тоа не можат да го отсликаат прогресивниот тек на болеста (59).

Иако сите овие инструменти се валидирани за одредување на активноста на болеста, потребни се понатамошни истражувања за определување на правиот модел за проценка на активноста на болеста пред тој да биде воведен

како рутинска постапка во клиничката праска. На тој начин би се очекувало добиените резултати за активноста на болеста, односно постигнувањето на терапевтскиот ефект во однос на концентрациите на 6-TGN метаболитот да бидат значајни.

### **8.8. Влијанието на 6-MMP метаболитот врз развојот на несаканите дејства кај заболените од ВЦЗ третирани со азатиоприн**

Просечната вредност на 6-MMP кај пациентите кои користат AZA од 3 до 12 месеци беше пониска во однос на пациентите кои користат AZA над 12 месеци ( $5204,72 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 5894,91 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  v.s.  $8387,86 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 9230,51 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ) ( $p > 0,05$ ).

6-MMP концентрациите се повисоки кај пациентите кои, покрај AZA, истовремено примаат и 5-ASA (117). Во ова истражување беа анализирани концентрациите на 6-MMP кај заболените со ВЦЗ заедно, без разлика дали некој од заболените истовремено примал AZA и 5-ASA.

Според *Bloomfeld u sor.* (12) со зголемување на активноста на TPMT ензимот се зголемува и концентрацијата на 6-MMP ( $p > 0,05$ ). Иако несигнификантен, овој податок беше потврден и во оваа студија.

Повисоки просечни концентрации на 6-MMP се најдени кај заболените со покачени хепатални ензими во однос на оние кои имаат нормални ензими ( $12751 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  v.s.  $6627 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ,  $p = 0,004$ ). Но и заболените без покачени концентрации на 6-MMP може да развијат хепатотоксичност (45).

Во оваа студија пациентите кај кои беше регистрирано несакано дејство имаа повисока просечна вредност на концентрацијата на 6-MMP ( $p > 0,05$ ) во споредба со оние кај кои не беше регистрирано несакано дејство ( $7592,92 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7534,19 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  v.s.  $6295,08 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er} \pm 7575,19 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ ). Кај 50% од пациентите во групата со несакани ефекти просечната вредност на концентрацијата на 6-MMP беше над  $5877 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  во споредба со групата каде немаше несакани ефекти и каде тој кај 50% од пациентите беше над  $2891 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$ .

Заболениите кај кои постои концентрација на 6-MMP  $>5700 \text{ pmol}/8 \times 10^8 \text{ Er}$  може да имаат корист од терапијата со AZA доколку кај нив се намали дозата за 50-70%, придружено со внимателно следење на хематолошките параметри и метаболитите (67).

Акумулацијата на 6-MMP може да има важна улога во патогенезата на развојот на хепаталната токсичност. Заболениите со висока активност на TPMT ензимот потенцијално може да создадат хепатотоксични нивоа на 6-MMP. Повисоки дози на 6-MMP доведуваат до нивна акумулација и предизвикуваат нарушување на хепаталните ензими, кои доколку се намали дозата на AZA ќе се нормализираат за брзо време (37).

Иако оваа студија беше изведена во еден центар, кој всушност е и референтен центар за заболениите со ВЦЗ во Р. Македонија, веруваме дека ефикасноста и безбедноста на AZA е потврдена.

Во оваа студија беа вклучени релативно мал број пациенти. Но, во Македонија инциденцијата и преваленцијата на ВЦЗ е сè уште ниска во споредба со земјите од западна Европа и Америка. Со тоа и бројот на заболени кои се третирани со AZA е секако помал во однос на овие земји. Можноста за вклучување на поголем број пациенти со ВЦЗ третирани со AZA во овие земји е далеку поголема.

Методот за определување на активноста на TPMT ензимот, како и оној за определување на концентрациите на активните метаболити (6-TGN и 6-MMP) за првпат беа поставени и изведени во Р. Македонија.

## **ЗАКЛУЧОЦИ**

## 9. ЗАКЛУЧОЦИ

Од добиените резултати во ова истражување изведени се следните заклучоци:

1. Во Република Македонија кај заболените од ВЦЗ постои тримодална дистрибуција на активноста на тиопурин метилтрансфераза ензимот, и тоа: најголемиот дел од заболените (69,84%) имаат нормална или висока активност на TPMT ензимот ( $>13,8$  U/ml Er), 25,4% имаат средна активност (5,0-13,7U/ml Er), додека најмалку (4,76%) имаат ниска активност на овој ензим ( $<5,0$  U/ml Er).
2. Речиси идентична корист од примената на AZA покажаа групите со средна, односно нормална или висока TPMT активност.
3. Разбирањето на улогата на тиопурин метилтрансфераза ензимот во целокупниот метаболизам на тиопурините и механизмот на делување е критично за оптимизација и индивидуализација на терапијата кај заболените од ВЦЗ.
4. Според добиените резултати, предложениот бианалитички метод за следење на терапевските концентрации (TDM) на 6-TGN и 6-MMP во еритроцити добиени од плазма од пациенти кои се на терапија со азатиоприн е соодветен.
5. Со следење на концентрацијата на 6-TGN метаболитот ќе се овозможи тиопуринската терапија да биде оптимизирана и индивидуализирана, водењето на третманот да биде ефективен, а со тоа и да се постигне подобар терапевтски исход.

6. Потребни се натамошни проспективни студии за јасно да се одреди дали активноста на тиопурин метилтрансфераза ензимот е независен предиктор на ефикасноста на лекот, или концентрацијата на 6-TGN метаболитот останува значаен фактор во одредување на тиопуринскиот одговор.
  
7. Резултатите од оваа студија треба да бидат поттик за лекарите одредувањето на активноста на ТРМТ ензимот да го воведат како рутински метод кај сите заболени пред тие да бидат подложени на терапија со тиопурини.

## **БИБЛИОГРАФИЈА**



## 10. БИБЛИОГРАФИЈА

1. Abdul-Baki H, ElHajj I, El-Zahabi L MN et al. Clinical epidemiology of Inflammatory bowel disease in Lebanon. *Inflamm Bowel Dis.* 2007; 13: 475-80.
2. Al Hadithy AF, de Boer NK, Derijks LJ, Escher JC, Mulder CJ, Brouwers JR. Thiopurines in inflammatory bowel disease: pharmacogenetics, therapeutic drug monitoring and clinical recommendations. *Dig Liver Dis.* 2005; 37:282-97.
3. Alkim C, Balci M, Alkim H et al. The importance of peripheral immune cells in inflammatory bowel disease. *Turk J Gastroenterol.* 2007; 18(2):82-8.
4. Ansari A, Hassan C, Duley J, Marinaki A, Shobowale-Bakre EM, Seed P, et al. Thiopurine methyltransferase activity and the use of azathioprine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16:1743-50.
5. Ardizzone S, Sarzi Puttini P, Cassinotti A, Bianchi Porro G. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis.* 2008; 40 Suppl 2:S253-9.
6. Arul T, Nilesh L. Advanced Therapy for Inflammatory Bowel disease: A Guide for the Primary Care Physician. *J Am Board Fam Med.* 2014; 27(3): 411-20.
7. Bar-Meir S. Mild to moderate Crohn's disease: still room for step-up therapies? *Dig Dis.* 2009; 27(3):347-50.
8. Baumgart D, Carding S. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet.* 2007; 369:1627-40.
9. Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008. Jan 23;(1):CD006893.

10. Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Yu N. The prevalence of extraintestinal diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96:1116–22.
11. Bing XIA, Crusius JBA, Meuwissen SGM, Pena AS. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects and immunogenetic studies. *W J G.* 1998; 4(5):446-58.
12. Bloomfeld R, Bickston S, Levine M, Carroll. Thiopurine Methyltransferase Activity is correlated with Azathioprine Metabolite Levels in Patients with Inflammatory bowel disease in *Clinical Gastroenterology Practise. J Applied Res.* 2006; 6(4):282-87.
13. Blumberg RS, Strober W. Prospects for Research in inflammatory bowel disease. *Am Med Assoc.* 2001; 285:643-7.
14. Bouhnik Y, Lemann M, Mary JY, Scemama G, Scemama G, Tai R, et al. Long-term follow-up of patients with Crohn's disease treated with azathioprine or 6-mercaptopurine. *Lancet.* 1996; 347:215-9.
15. Bousvaros A, Antonioli DA, Colletti RB, et al. Differentiating ulcerative colitis from crohn disease in children and young adults: report of a working group of the north American society for pediatric Gastroenterology, Hepatology and nutrition and the crohn's and the colitis foundation of America. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007; 44(5):653-74.
16. Bradford K, Shih DQ. Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(37):4166-73.
17. Brookes MJ, Green JR. Maintenance of remission in Crohn's disease: current and emerging therapeutic options. *Drugs.* 2004; 64(10):1069-89.
18. Bruining DH, Loftus EV. Current and future diagnostic approaches: from serologies to imaging. *Curr Gastroenterol Rep.* 2007; 9: 489-96.
19. Bruining DH, Loftus EV. Evolving diagnostic strategies for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2006; 8: 478-85.
20. Burton I, Korelitz, Daniel H. Present. 6-Mercaptopurine/Azathioprine remains an important contributor in managing Crohn's disease. *J Crohns Colitis.* 2014; 8:735-8.
21. Campbell S, Kingstone K, Ghosh S. Relevance of thiopurine methyltransferase activity in inflammatory bowel disease patients

- maintained on low dose azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16:389-98.
22. Capristo E, Addolorato G, Mingrone G, Greco AV, Gasbarrini G. Effect of disease localization on the anthropometric and metabolic features of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93(12):2411-9.
  23. Capristo E, Mingrone G, Addolorato G, Greco AV, Gasbarrini G. Metabolic features of inflammatory bowel disease in a remission phase of the disease activity. *J Inter Med.* 1998; 243:339-47.
  24. Chaparro M, Ordas I, Cabre E, et al. Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: long-term follow up study of 3931 patients. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19(7):1404-10.
  25. Chebli JM, Gaburri PD, De Souza AF, Pinto AL, Chebli LA, Felga GE, et al. Long-term results with azathioprine therapy in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease: open-label prospective study. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 22(2):268-74.
  26. Chocair PR, Duley JA, Simmonds HA, Cameron JS. The importance of thiopurine methyltransferase activity for the use of azathioprine in transplant recipients. *Transplant.* 1992; 53:1051-6.
  27. Cohen R. Forecast for using metabolite measurements in the dosing of azathioprine or 6-mercaptopurine for IBD patients: "Partly cloudy". *Gastroenterol* 2002; 122:2082-84.
  28. Cohen RD. The quality of life in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; 16:1603-9.
  29. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2010; 362(15):1383-95.
  30. Cuffari C, Hunt S, Bayless T. Utilisation of erythrocyte 6-thioguanine metabolite levels to optimize azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gut.* 2011; 48:642-6.
  31. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2005; 11(46):7227-36.

32. Denapiene G, Barakauskine A, Ugianskis E, et al. Inflammatory bowel disease at Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, 2004-2008. *Acta Med Lituanica*. 2008; 15(3):145-9.
33. Derijks LJJ, Gilissen LPL, Hooymans PM, Hommes DW. Review article: thiopurines in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 24:715-29.
34. Deshpande AR, Abreu MT. Optimizing therapy with 6-mercaptopurine and azathioprine: to measure or not to measure? *Ther Adv Gastroenterol*. 2010; 3(5):275-9.
35. D'Halluin PN, Tribut O, Branger B, et al. RBC 6-TGN and hematological parameters in patients with Crohn's disease treated by azathioprine. *Gastroenterol Clin Biol*. 2005; 29:1264-9.
36. D'Haens GR, Sartor RB, Silverberg MS, Petersson J, Rutgeerts P. Future directions in inflammatory bowel disease management. *J Crohns Colitis*. 2014; 8:726-34.
37. Dubinsky M. Azathioprine, 6-Mercaptopurine in Inflammatory bowel disease: Pharmacology, Efficacy, and Safety. *Clinical Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2:731-43.
38. Dubinsky MC, Lamothe S, Yang HY, Targan SR, Sinnett D, Theoret Y, et al. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol*. 2000;118:705-13.
39. Dubinsky MC, Yang H, Hassard PV, Seidman EG, Kam LY, Abreu MT, et al. 6-MP metabolite profiles provide a biochemical explanation for 6-MP resistance in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterol*. 2002; 122:904-15.
40. Economou M, Zambeli E, Michopoulos S. Incidence and prevalence of Crohn's disease and its etiological influences. *Ann Gastroenterol*. 2009; 22(3):158-67.
41. Farmer RG, Easley KA, Rankin GB. Clinical patterns, natural history and progression of ulcerative colitis – a long term follow-up of 1116 patients. *Dig Dis Sci*. 1993; 38:1137-41.
42. Florin T, Paterson E, Fowler E, Radford-Smith G. Clinically active crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. *Scand J Gastroenterol*. 2006; 41:306-11.

43. Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease; a 30 year review. *Gut*. 2002; 50:485-9.
44. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's Disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis*. 2000; 6(1):8-15.
45. Gearry RB, Barclay ML. Azathioprine and 6-mercaptopurine pharmacogenetics and metabolite monitoring in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005; 20:1149-57.
46. Gearry RB, Barclay ML, Roberts RL, Harraway J, Zhang M, Pike LS, George PM, Florkowski CM. Thiopurine methyltransferase and 6-thioguanine nucleotide measurement: early experience of use in clinical practice. *Inter Med J*. 2005; 35(10):580-5.
47. Ghosh S. The challenges of medication non-adherence in ulcerative colitis: Practical suggestions to help patients. *J Crohns Colitis* 2008; 2:97-8.
48. Gisbert LG, Nino P, Rodrigo L, Cara C, Guijarro LG. Thiopurinemethyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow up study of 394 patients. *Am J Gastroenterol*. 2006; 101:2769-76.
49. Gismera CS, Sicilia Aladren SB. Inflammatory bowel disease: A disease(s) of modern times? Is incidence still increasing?. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(36):5491-8.
50. Glazier KD, Palance AL, Griffel LH, Das KM. The ten-year single-center experience with 6-mercaptopurine in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39(1):21-6.
51. Guideline on Bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 21 July 2011 EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2\*\* Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf) [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about\\_us/general/general\\_content\\_000094.jsp](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000094.jsp)

52. Haines ML, Ajlouni Y, Irving PM, Sparrow MP, et al. Clinical Usefulness of Therapeutic Drug Monitoring of Thiopurines in Patients with Inadequately Controlled Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:1301-7.
53. Hass DJ, Brensinger CM, Lewis JD, Lichtenstein GR. The impact of increased body mass index on the clinical course of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4(4):482-8.
54. Hindorf U, Lindqvist M, Peterson C, Soderkvist P, Strom M, Hjortswang H, et al. Pharmacogenetics during standardised initiation of thiopurine treatment in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2006; 55:1423-31.
55. Holme SA, Duley JA, Sanderson J, Routledge PA, Anstey AV. Erythrocyte thiopurine methyltransferase assessment prior to azathioprine use in the UK. *Q J Med.* 2002; 95:439-44.
56. Holtmann MH, Krummenauer F, Claas C, Kremeyer K, Lorenz D, Rainer O, et al. Long-term effectiveness of azathioprine in IBD beyond 4 years: a European multicenter study in 1176 patients. *Dig Dis Sci.* 2006; 51:1516-24.
57. Holzheimer RG, Mannick JA, editors. Munich: Zuckschwerdt; 2001. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented.*
58. Homayoun V, Merat S, Momtahn S, Olfati G, Sadreddin Kazzazi A, Tabrizian T, Rashtak S, Kaleghnejad R, Khademi H, Malekzadeh F, Nasser-Moghaddam S, Malekzadeh F. Epidemiologic characteristics of 500 patients with inflammatory bowel disease in Iran studied from 2004 through 2007. *Arch Iranian Med.* 2009; 12(5): 454-60.
59. Hommes D, Colombel JF, Emery P, Greco M, Sandborn WJ. Changing Crohn's disease management: Need for new goals and indices to prevent disability and improve quality of life. *J Crohns Colitis.* 2012; 6:5224-34.
60. Inflammatory Bowel Disease (IBD). Merck Manual Professional. Available from:  
<http://www.merck.com/mmpe/sec02/cho18/cho18a.html#CBBDCBAD>.
61. Jerome F, Al-Jaouni R, Wiroth JB, Hebuterne X, Schneider SM. Nutritional deficiencies in patients with Crohn's disease in remission. *Inflamm Bowel Dis.* 2006; 12:185-91.

62. Jess T. Prognosis of Inflammatory bowel disease across time and countries. *Dan Med Bull.* 2008; 55:103-20.
63. Jharap B, Seinen ML, de Boer NK, van Ginkel JR, Linskens RK, Kneppelhout JC, et al. Thiopurine therapy in inflammatory bowel disease patients: analyses of two 8-year intercept cohorts. *Inflamm Bowel Dis.* 2010; 16(9):1541-9.
64. Juillerat P, Pittet V, Vader JP, Burnand B, et al. Infliximab for Crohn's disease in the Swiss IBD cohort study: clinical management and appropriateness. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 22(11): 1352-7.
65. Karas-Kuzelicki N, Milek M, Mlinaric-Rascan I. MTHFR and TYMS genotypes influence TPMT activity and its differential modulation in males and females. *Clin Biochem.* 2010; 43:37-42.
66. Kim M, Lee S, Choe Y. Monitoring of Thiopurine Metabolites in Korean Pediatric Patients with Inflammatory bowel disease. *Yonsei Med J.* 2014; 55(5):1289-96.
67. Kim MJ, Choe YH. Monitoring and Safety of Azathioprine Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013; 16(2):65-70.
68. Kim PS, Zlatanic J, Korelitz BI, Gleim GW. Optimum duration of treatment with 6-mercaptopurine for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1999; 94(11):3245-7.
69. Klemetsdal B, Wist E, Aarbakke J. Gender difference in red blood cell thiopurine methyltransferase activity. *Scand J Clin Lab Invest.* 1993; 53:749-9.
70. Kontorinis N, Agarwal K, Gondolesi G, Fiel Isabel M, et al. Diagnosis of 6-Mercaptopurine Hepatotoxicity Post Liver Transplantation Utilizing Metabolite Assays. *Am J Transplant.* 2004; 4(9):1539-42.
71. Korelitz BI, Adler DJ, Mendelsohn RA, Sacknoff AL. Long-term experience with 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.* 1993; 88(8):1198-205.
72. Ladas SD, Mallas E, Giorgitis K, Karamanolis G, Trigonis D, Markadas A, Sipsa V, Raptis SA. Incidence of ulcerative colitis in Central Greece: a prospective study. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(12):1785-7.

73. Lakatos LP, Fischer S. Is the epidemiology of inflammatory bowel disease changing in Eastern Europe? *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41:870-2.
74. Lakatos LP. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel disease: Up or down? *World J Gastroenterol.* 2006; 12(38):6102-8.
75. Lakatos P, Kiss L. Is the disease course predictable in inflammatory bowel disease?. *W J Gastroenterol.* 2010; 16(21):2591-9.
76. Lee MN, Kang B, Choi SY, Kim MJ et al. Relationship between azathioprine dosage, 6-thioguanine nucleotide levels, and therapeutic response in pediatric patients with IBD treated with azathioprine. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21(5):1054-62.
77. Lemann M, Mary JY, Colombel JF, Duclos B, Soule JC, Lerebours E, et al. Groupe D'Etude therapeutique des affections inflammatoires du tube Digestif. A randomized, double-blind, controlled withdrawal trial in Crohn's disease patients in long-term remission on azathioprine. *Gastroenterol.* 2005; 128:1812-8.
78. Lennard L, Cartwright CS, Wade R, Richards SM, Vora A. Thiopurine methyltransferase genotype-phenotype discordance and thiopurine metabolite formulation in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 76:125-36.
79. Lennard L. Implementing of TPMT testing. *Br J Clin Pharmacol.* 2013; 77:704-14.
80. Lennard L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992; 43:329-39.
81. Lennard L. TPMT in the treatment of Crohn's disease with azathioprine. *Gut.* 2002; 51:143-46.
82. Levine JS, Burakoff R. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (NY).* 2011; 7(4):235-41.
83. Lewis JD. The Utility of Biomarkers in the Diagnosis and Therapy of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol.* 2011; 140:1817-26.
84. Lewis RT, Maron DJ. Efficacy and Complications of surgery for Crohn's Disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2010;6(9):587-96.



85. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ, Lipsky JJ, Sandborn WJ. Measurement of thiopurinemethyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2001;49:665-70.
86. Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, et al. Leukopenia resulting from a drug interaction between azathioprine or 6-mercaptopurine and mesalamine, sulphasalazine, or balsalazide. *Gut*. 2001; 49:656-64.
87. Magro F, Santos-Antunes J, Vilas-Boas F, Rodrigues-Pinto E, Coelho R, Ribeiro OS, Lopes S, Macedo G. Crohn's disease outcome in patients under azathioprine: A tertiary referral center experience. *J Crohns Colitis*. 2014; 8:617-25.
88. Maltzman J, Koretzky G. Azathioprine :old drug, new actions. *J Clin Invest*. 2003; 111:1122-24.
89. Mantzaris GJ, Roussos A, Christidou A, Koilakou S, Kalantzis CN, Petraki K, Sfakianakis M, Karagiannidis A, Polyzou P. The long-term efficacy of azathioprine doses not wane after years of continuous treatment in patients with steroid-dependent luminal Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2007; 1:28-34.
90. McLean L, Cross R. Adverse events in IBD: to stop or continue immune suppressant and biologic treatment. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 8(3):223-40.
91. Mijac D, Jankovic G, Jorga J, Krstic M. Nutritional status of patients with active inflammatory bowel disease: Prevalence of malnutrition and methods for routine nutritional status. *Eur J Int Med*. 2010; 21:315-19.
92. Mowat C, Cole A, Windsor A, Ahmad T, Arnott I, Driscoll R, Mitton S, Orchard T, Rutter M, Younge L, Lees C, Ho G, Satsangi J, Bloom S. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*. 2011; 60:571-607.
93. Norman K, Kirchner H, Lochs H, Pirlich M. Malnutrition affects quality of life in gastroenterology patients. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(21): 3380-5.
94. O'Brien JJ, Bayless TM, Bayless JA. Use of azathioprine or 6-mercaptopurine in the treatment of Crohn's disease. *Gastroenterol*. 1991; 101(1):39-46.

95. Ohkisa T, Nomura T, Sato N. The role of bacterial infection in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inter Med.* 2004; 43(7):534-9.
96. Ohtsuka Y, Arai K, Aoyagi Y, Fujii T, Yamakawa Y, Ohtani K, Ikuse T, Baba Y, Inage E, Kudo T, Suzuki R et al. Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 25(10):1623-30.
97. Pearson DC, May GR, Fick GH, Sutherland LR. Azathioprine and 6-mercaptopurine in Crohn's disease. a meta-analysis. *Ann Intern Med.* 1995; 123(2):132-42.
98. Pedersen N, Duricova D, Lenicek M, et al. Infliximab dependency is related to decreased surgical rates in adult Crohn's disease patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010; 22(10):1196-203.
99. Pozler O, Chladek J, Maly J, Hroch M, Dedek P, Beranek M, Krasnicanova P. Steady-state of azathioprine during initiation treatment of pediatric inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis.* 2010; 4:623-8.
100. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Pui C-H, Stein CM, Carillo M, Evans WE, Klein TE. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89:387-91.
101. Relling MV, Gardner EE, Sandborn WJ, Schmiegelow K, Pui C-H, Yee SW, Stein CM, Carillo M, Evans WE, Hicks JK, Schwab M, Klein TE. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for thiopurine methyltransferase genotype and thiopurine dosing: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013; 93:324-5.
102. Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, et al. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Nat Cancer Instit.* 1999; 91:2001-8.
103. Rerknimitr R, Chalapipat O, Kongham P et al. Clinical characteristics of inflammatory bowel disease in Thailand: A 16 years review. *J Med Assoc Thai.* 2005; 88 (Suppl 4): S129-33.
104. Rodriguez-Reyna TS, Martinez-Reyes C, Yamamoto-Furusho JK. Rheumatic manifestations of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(44): 5517-25.

105. Rozet E, Marini RD, Ziemons E, Boulanger B, Hubert P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55(4):848-58.
106. Saibeni S, Virgilio T, D'Inca R, Spina L, Bortoli A, Paccagnella M, et al. The use of thiopurines for the treatment of inflammatory bowel diseases in clinical practice. *Dig Liver Dis.* 2008; 40(10):814-20.
107. Sanborn WJ. Azathioprine: State of the art in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 1998; 33:92-9.
108. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modiglianni R, Pantera S. Azathioprine or 6-mercaptopurine for induction of remission of Crohn's disease. *Cochrane Database System Rev.* 2, CDO00545.
109. Sanderson J, Ansari A, Marinaki T, Duley J. Thiopurine methyltransferase: should it be measured before commencing thiopurine drug therapy? *Ann Clin Biochem.* 2004; 41(Pt 4):294-302.
110. Santana GO, Lyra GL, Santana TC, Dos Reis LB, et al. Crohn's disease in one mixed – race population in Brazil. *World J Gastroenterol.* 2007; 13(33):4489-92.
111. Seibold F. Does conservative therapy of chronic inflammatory bowel disease still play a role? *Swiss Surg.* 2003; 9(3):127-30.
112. Shanahan F, Bernstein CN. The evolving epidemiology of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol.* 2009; 25:301-5.
113. Sharma S, Mehndiratta S, Yadav S, Singh M, Bedi PM, Nepali K. Purine Analogues as Kinase Inhibitors: A Review. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2015; 10(3):308-41.
114. Shivanada S, Lennard-Jones J, Logan R, Sear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut.* 1996; 39: 690-7.
115. Smith M, Blacker P, Patel C, Marinaki A, et al. The impact of introducing thioguanine nucleotide monitoring into an inflammatory bowel disease clinic. *Int J Clin Pract.* 2013; 67(2):161-9.
116. Stange E, Travis S, Vermiere S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definition and diagnosis.

- For the European Crohn's and Colitis organization (ECCO). *Gut*. 2006; 55 (Suppl 1):1-15.
117. Stevens T, Achkar JP, Easley E, Brzezinski A, Lashner B. Azathioprine formulation optimizes metabolite profile in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 20:601-6.
  118. Tanis AA. Azathioprine in inflammatory bowel disease, a safe alternative? *Mediators of Inflamm*. 1998; 7:141-4.
  119. Trallori G, Palli D, Saieva C, Bardazzi G, Bonanomi AG, d'Albasio G, Galli M, Vannozzi G, Milla M, Tarantino O, Renai F, Messori A, Amorosi A, Pacini F, Morettini A. A population –based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15years (1978-92). *Scand J Gastroenterol*. 1996; 31(9):892-9.
  120. Vavricka SR, Schoepfer A, Scharl M, Lakatos PL, Navarini A, Rogler G. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21(8):1982–92.
  121. Walmsley R, Ayres R, Pounder R, Allan R. A simple clinical colitis activity index. *Gut*. 1998; 43(1):29–32.
  122. Wang L, Weinshilboum R. Thiopurines S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene*. 2006; 25:1629-38.
  123. Waterman M, Knight J, Dinani A, Xu W, Stempak JM, Croitoru K, Nguyen GC, Cohen Z, McLeod RS, Greenberg GR, Steinhart AH, Silverberg MS. Predictors of Outcome in Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21(9):2097-105.
  124. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Flisiak R, Prokopowicz D. Epidemiological characteristics of inflammatory bowel disease in North-Eastern Poland. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(17):2630-3.
  125. Winter JW, Gaffney D, Shapiro D, Spooner RJ, Marinakis AM, Sanderson JD. Assessment of thiopurinomethyltransferase enzyme activity is superior to genotype in predicting myelosuppression following azathioprine therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007; 25:1069-77.

126. Wright S, D.S Sanders, et al. Clinical significance of azathioprine active metabolite concentrations in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004; 53:1123-28.
127. Yakut M, Ustun Y, Kabacam G, Soykan I. Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Int Med*. 2010; 21:320-3.
128. Yarur AJ, Abreu MT, Deshpande AR, Kerman DH, Sussman DA. Therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(13):3475-84.
129. Zhang B, Xu X, Zeng X, Li D. Correlation of Thiopurine Methyltransferase Activity and 6- Thioguanine Nucleotide Concentration in Han Chinese Patients treated with Azathioprine 25 to 100mg: A 1-Year Single-Center, Prospective study. *Cur Ther Research*. 2006; 67(4):270-82.
130. Zisman T, Rubin DT. Novel diagnostic and prognostic modalities in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2009; 38(4):729-52.
131. Дерибан Ѓ, Андреевски В, Нојков Б, Трајков Д, Старделова К, Мишевски Ј, Стојковски З, Даниловски Д, Крстевски М, Мишевска П. Епидемиологија на Кроновата болест во Р. Македонија 2003-2007. *Макед Мед Преглед*. 2009; 62:13-8.
132. Министерство за здравство на Р. Македонија, Биро за лекови. Регистар на лекови на Р.Македонија. Скопје: Академски печат; 2013.
133. Мишевска П, Крстевски М. Клиничка и епидемиолошка студија на воспалителните цревни заболувања - Кронова болест и улцерохеморагичен колитис во Р. Македонија. 2003. Скопје: Министерство за образование на Р.М.
134. Мишевска П. Екстраинтестинални манифестации кај воспалителните цревни заболувања. *Vox Medici*. 2010;69: 123-5.
135. Мишевска П. Воспалителни цревни заболувања. Во: Серафимовски В, уредник. *Интерна медицина*. Скопје: Македонска ризница; 2003.657-66.
136. Павловска К. Компаративна студија за нутритивниот статус кај пациенти со воспалителни цревни заболувања [магистериум]. Универзитет „Св.Кирил и Методиј“; 2011.

## 11. ПРИЛОЗИ

### ПРИЛОГ 1

#### Медицински картон за следење на лабораториски и клинички параметри

Р. број-----

Име и презиме----- Адреса-----

Телефон-----

Возраст	
Дијагноза: УК (1), КБ (2)	
Висина (см)	
Актуелна тежина	
Se	
Hb	
Hr	
Ht	
Le	
Ly	
Ne	
Total protein	
Albumin	
Fe	
MCV	
AF	
AST	
ALT	
CRP	
уреа	
креатинин	
Алфа амилаза во серум	
Почеток на болеста (дијагноза) во години	

Локализација на патолошката промена	
Број на столици дневно 0-2 (1) 3-6 (1) >6(2)	
Конзистенција Тврда (1) мека (2) течна (3)	
Слуз во столица ДА (1) НЕ (2)	
Крв во столица ДА (1) НЕ (2)	
Тенезми ДА (1) НЕ (2)	
Абдоминална болка Нема (0) сомнителна (1) сигурна(1)	
Абдоминална маса Нема (0) сомнителна (1) сигурна(1)	
Субјективно чувство Добро (0) слабо (1) лошо (2)	
Опериран ДА (1) НЕ (2)	

**ПРИЛОГ 2**

Упатство за употреба на ELISA кит.

"HumanThiopurineMethyltransferase (TPMT) ELISA Kit, My BioSource, USA



# Human Thiopurine Methyltransferase(TPMT) ELISA Kit

Catalog No. MBS701331

(96 T)

- This immunoassay kit allows for the in vitro quantitative determination of **human TPMT** concentrations in **serum, plasma**.
- **Expiration date** six months from the date of manufacture
- **FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.**

## **PRINCIPLE OF THE ASSAY**

The microtiter plate provided in this kit has been pre-coated with an antibody specific to TPMT. Standards or samples are then added to the appropriate microtiter plate wells with a biotin-conjugated antibody preparation specific for TPMT and Avidin conjugated to Horseradish Peroxidase (HRP) is added to each microplate well and incubated. Then a TMB (3,3',5,5' tetramethyl-benzidine) substrate solution is added to each well. Only those wells that contain TPMT, biotin-conjugated antibody and enzyme-conjugated Avidin will exhibit a change in color. The enzyme-substrate reaction is terminated by the addition of a sulphuric acid solution and the color change is measured spectrophotometrically at a wavelength of 450 nm  $\pm$  2 nm. The concentration of TPMT in the samples is then determined by comparing the O.D. of the samples to the standard curve.

## **DETECTION RANGE**

1.56 mIU/ml-100 mIU/ml. The standard curve concentrations used for the ELISA's were 100 mIU/ml, 50 mIU/ml, 25 mIU/ml, 12.5 mIU/ml, 6.25 mIU/ml, 3.12 mIU/ml, 1.56 mIU/ml.

## **SPECIFICITY**

This assay recognizes human TPMT. No significant cross-reactivity or interference was observed.

## **SENSITIVITY**

The minimum detectable dose of human TPMT is typically less than 0.4 mIU/ml.

The sensitivity of this assay, or Lower Limit of Detection (LLD) was defined as the lowest protein concentration that could be differentiated from zero.

## **MATERIALS PROVIDED**

<b>Reagent</b>	<b>Quantity</b>
Assay plate	1
Standard	2
Sample Diluent	1 x 20 ml
Biotin-antibody Diluent	1 x 10 ml
HRP-avidin Diluent	1 x 10 ml
Biotin-antibody	1 x 120µl
HRP-avidin	1 x 120µl
Wash Buffer	1 x 20 ml (25×concentrate)
TMB Substrate	1 x 10 ml
Stop Solution	1 x 10 ml

## STORAGE

1. Unopened test kits should be stored at 2-8°C upon receipt and the microtiter plate should be kept in a sealed bag. The test kit may be used throughout the expiration date of the kit, provided it is stored as prescribed above. Refer to the package label for the expiration date.
2. Opened test plate should be stored at 2-8°C in the aluminum foil bag with desiccants to minimize exposure to damp air. The kits will remain stable until the expiring date shown, provided it is stored as prescribed above.
3. A microtiter plate reader with a bandwidth of 10 nm or less and an optical density range of 0-3 OD or greater at 450nm wavelength is acceptable for use in absorbance measurement.

## REAGENT PREPARATION

*Bring all reagents to room temperature before use.*

1. **Wash Buffer** If crystals have formed in the concentrate, warm up to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Dilute 20 ml of Wash Buffer Concentrate into deionized or distilled water to prepare 500 ml of Wash Buffer.

2. **Standard** Centrifuge the standard vial at 6000-10000rpm for 30s. Reconstitute the **Standard** with 1.0 ml of **Sample Diluent**. This reconstitution produces a stock solution of 100 mIU/ml. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making serial dilutions. The undiluted standard serves as the high standard (100 mIU/ml). The **Sample Diluent** serves as the zero standard (0 mIU/ml). Prepare fresh for each assay. Use within 4 hours and discard after use.
3. **Biotin-antibody** Centrifuge the vial before opening. Dilute to the working concentration using **Biotin-antibody Diluent**(1:100), respectively.
4. **HRP-avidin** Centrifuge the vial before opening. Dilute to the working concentration using **HRP-avidin Diluent**(1:100), respectively.

***Precaution: The Stop Solution provided with this kit is an acid solution. Wear eye, hand, face, and clothing protection when using this material.***

## **OTHER SUPPLIES REQUIRED**

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.

- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- An incubator which can provide stable incubation conditions up to  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ .

## **SAMPLE COLLECTION AND STORAGE**

- **Serum** Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes before centrifugation for 15 minutes at 1000 g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifuge the sample again after thawing before the assay. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
- **Plasma** Collect plasma using citrate, EDTA, or heparin as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Centrifuge the sample again after thawing before the assay. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

***Note: Grossly hemolyzed samples are not suitable for use in this assay.***

## ASSAY PROCEDURE

*Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all samples, standards, and controls be assayed in duplicate. All the reagents should be added directly to the liquid level in the well. The pipette should avoid contacting the inner wall of the well.*

1. Recommend to dilute the serum or plasma samples with Sample Diluent(1:400) before test. The suggested 400-fold dilution can be achieved by adding 10 $\mu$ l sample to 190 $\mu$ l of Sample Diluent. Complete the 400-fold dilution by adding 10 $\mu$ l of this solution to 190 $\mu$ l of Sample Diluent. The recommended dilution factor is for reference only. The optimal dilution factor should be determined by users according to their particular experiments.
2. Add 100 $\mu$ l of Standard, Blank, or Sample per well. Cover with the adhesive strip. Incubate for 2 hours at 37°C.
3. Remove the liquid of each well, don't wash.
4. Add 100 $\mu$ l of **Biotin-antibody** working solution to each well. Incubate for 1 hour at 37°C. **Biotin-antibody** working solution may appear cloudy. Warm up to room temperature and mix gently until solution appears uniform.

5. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of three washes. Wash: Fill each well with Wash Buffer (200µl) and let it stand for 2 minutes, then remove the liquid by flicking the plate over a sink. The remaining drops are removed by patting the plate on a paper towel. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance.
6. Add 100µl of **HRP-avidin** working solution to each well. Cover the microtiter plate with a new adhesive strip. Incubate for 1 hour at 37°C.
7. Repeat the aspiration and wash five times as step 4.
8. Add 90µl of **TMB Substrate** to each well. Incubate for 10-30 minutes at 37°C. Keeping the plate away from drafts and other temperature fluctuations in the dark.
9. Add 50µl of **Stop Solution** to each well when the first four wells containing the highest concentration of standards develop obvious blue color. If color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm.



## **CALCULATION OF RESULTS**

*Using the professional soft "Curve Exert 1.3" to make a standard curve is recommended, which can be downloaded from our web.*

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density. Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve-fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the x-axis against the concentration on the y-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the TPMT concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data. If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

## **LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- It is important that the Standard Diluent selected for the standard curve be consistent with the samples being assayed.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with the appropriate Standard Diluent and repeat the assay.
- Any variation in Standard Diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- This assay is designed to eliminate interference by soluble receptors, binding proteins, and other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

## **TECHNICAL HINTS**

- Centrifuge vials before opening to collect contents.
- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.

- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of wash buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Substrate Solution should remain colorless or light blue until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless or light blue to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.

### ПРИЛОГ 3 Индекс за проценка на активност на Кронова болест

Почитувани,

Ве молиме внимателно прочитајте ги прашањата, а потоа пополнете ги празните места. Оваа листа треба да ја пополнувате секој ден, во текот на една седмица (од понеделник до недела). Доколку имате нејасни прашања, Ве молиме јавете се на 3147 115 или на email: kristinar81@yahoo.it

Име и презиме: -----Датум:-----

Дали имате течна или мека столица во текот на неделата?

Доколку немате напишете **НЕ**, доколку имате на секое празно место подолу напишете со бројка колку пати во текот на денот:

понеделник: вторник: среда: четврток петок: сабота: недела:

-----

Дали чувствувате болка во стомакот. Следете секој ден како сте и запишете подолу.

-доколку **немате болка**, означете: **0**

-доколку **имате лесна болка**, означете: **1**

-доколку **имате умерена болка**, означете: **2**

-доколку **имате силна болка**, означете: **3**

понеделник: вторник: среда: четврток петок: сабота: недела:

-----

Како се чувствувате?

-ако се чувствувате **добро**, означете **0**

-ако се чувствувате **слабо**, означете **1**

-ако се чувствувате **многу слабо**, означете **2**

-ако се чувствувате **лошо**, означете **3**

понеделник: вторник: среда: четврток петок: сабота: недела:

-----

**ПРИЛОГ 4****СИСТЕМ ЗА БОДИРАЊЕ ЗА ЕДНОСТАВНИОТ КЛИНИЧКИ ИНДЕКС НА АКТИВНОСТ КАЈ УЛЦЕРОЗНИОТ КОЛИТИС****Бодирање на симптоми****ЧЕСТОТА НА СТОЛИЦИ (ВО ТЕКОТ НА ДЕНОТ)**

1-3	0
4-9	1
7-9	2
> 9	3

**ЧЕСТОТА НА СТОЛИЦИ (ВО ТЕКОТ НА НОЌТА)**

1-2	1
4-6	2

**ЛАЖНИ НАГОНИ ЗА ДЕФЕКАЦИЈА**

нагли	1
неодложни	2
инконтиненција	3

**КРВ ВО СТОЛИЦА**

во трагови	1
понекогаш чиста крв	2
вообичаено крв	3

**СУБЈЕКТИВНО ЧУВСТВО**

многу добро	0
малку послабо	1
лошо	2
многу лошо	3
ужасно	4

**ЕКСТРАКОЛОНСКИ МАНИФЕСТ  
ПО 1 БОД ПО МАНИФЕСТАЦИЈА**

**ПРИЛОГ 5****СОГЛАСНОСТ**

Јас, -----

изјавувам дека сум согласен доброволно да учествувам во ова истражување заради научноистражувачки цели. Добиените резултати во секое време можам да побарам да бидат исклучени од студијата и уништени. Информиран/а сум дека резултатите од истражувањето нема да бидат употребени во други цели. Од истражувањето можам да се откажам во секое време.

**Потпис**

-----

## 9. ЛИСТА НА СКРАТЕНИЦИ

Воспалителни цревни заболувања.....	ВЦЗ
Кронова болест.....	КБ
Улцерозен колитис.....	УК
Индекс за активност на Кронова болест.....	СДАИ
Индекс за активност на улцерозен колитис.....	УСАИ
Тиопурин метилтрансфераза ензим.....	ТРМТ
Азатиоприн.....	AZA
6-Меркаптопурин.....	6-MP
6-Тиогванин нуклеотид.....	6-TGN
6-Метил меркаптопурин.....	6-MMP
Екстраинтестинални манифестации.....	ЕИМ