

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ

Д-р Ирена Димитрова Иванова

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

МЕДЕН СТАТУС – ЛАБОРАТОРНИ АСПЕКТИ И КЛИ- НИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ ПРИ НЯКОИ ПАТОЛОГИЧНИ СЪСТОЯНИЯ

Дисертационен труд за присъждане на научно-образователна степен „Доктор“,
докторска програма Клинична лаборатория

Научен ръководител: Доц. д-р Бисера Димитрова Атанасова

Научни консултанти: Чл. кор. Проф. д-р Лъчезар Трайков

Проф. д-р Розанна Скуитти

София, 2016

Дисертационният труд е написан на 147 стандартни печатни страници, онагледен с 51 таблици, 23 фигури и 2 схеми. Библиографският списък включва 165 литературни източници, от които 30 на кирилица и 135 на латиница.

Във връзка дисертационния труд са реализирани 3 публикации и 8 участия в научни форуми.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на научния съвет към Катедра по Клинична лаборатория и Клинична имунология – Медицински университет – София на 31.03.2016г. и е насочен за официална защита пред научно жури в състав:

Официални рецензенти:

Проф. д-р Камен Николаев Цачев, дмн

Проф. д-р Красимира Илиева Икономова, дм

Становища:

Доц. д-р Бисера Димитрова Атанасова, дм

Проф. д-р Иванка Димитрова Паскалева, дмн

Проф. д-р Еленка Михайлова Цветанова, дмн

Материалите по защитата са на разположение в деловодството на Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 07.06.2016г. от 11:00 ч. в Аудитория „Проф. д-р Янко Добрев“ (II хирургичен блок), „Александровска“ болница.

СЪДЪРЖАНИЕ	
I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	4
II. ВЪВЕДЕНИЕ	5
III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
A) МАТЕРИАЛИ.....	8
Б) МЕТОДИ	14
V. РЕЗУЛТАТИ	20
1. Стандартизиране на условията в преданалитичния етап при определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал.....	20
2. Валидиране на метода пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия за определяне на мед в кръвен серум и урина.....	24
3. Валидиране на метода ЕТ-ААС за определяне на мед в ликвор	26
4. Определяне границите на референтната област на мед в кръвен серум при представителна група лица от българската популация.....	27
5. Влияние на пол, възраст, географско положение, телесна маса, тютюнопушене и консумация на алкохол върху серумните нива на мед	30
6. Резултати на пациентите, включени в проучването – здрави, БУ и ХХС	34
7. Резултати от характеризирани на статуса на медта при клинично здрави лица от българската популация с разширен панел от лабораторни изследвания	34
8. Информативно съдържание на показатели за меден статус при някои патологични състояния – БУ, ХХС и БА.....	35
VI. ОБСЪЖДАНЕ	35
1. Стандартизиране на критерии от преданалитичния етап в определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал.....	36
2. Валидиране на метода пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия при определяне на мед в кръвен серум и урина	40
3. Валидиране на метода електротермична атомно-абсорбционна спектроскопия за определяне на мед в ликвор	40
4. Определяне границите на референтната област на мед в кръвен серум на репрезентативна група лица от българската популация.....	41
5. Фактори на вариация на мед в кръвта	42
6. Показатели, с които може да бъде характеризирани медния статус в организма.....	43
VII. ИЗВОДИ	60
VIII. ПРИНОСИ.....	61
IX. Публикации във връзка с дисертационния труд	62
X. Научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	62
XI. Грантове във връзка с дисертационния труд.....	62

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ААС – атомно-абсорбционна спектроскопия	A β – бета амилоид
БА – болест на Алцхаймер	Creat – креатинин
БМ – болест на Менке	CRP – С-реактивен протеин
БП – болест на Паркинсон	Ср – церулоплазмин
БУ – болест на Уилсън	iСр – концентрация на церулоплазмин
ВЛКК – Вътрелабораторен качествен контрол	eСр – оксидазна активност на церулоплазмин
ГРГ – горна референтна граница	Cu/Zn SOD – мед/цинк супероксиддисмутаза
ДРГ – долна референтна граница	ССО –цитохром-с-оксидаза
ЕТ-ААС – електротермична ААС	ССS – Copper chaperone SOD
ИТМ – индекс на телесна маса	Gs – коефициент на асиметрия
НЗОК – Национална здравноосигурителна каса	Gk – коефициент на ексцес
НСВОК – Национална система за външна оценка на качеството	HDL – липопротеини с висока плътност
НЦОЗА – Национален център за опазване на общественото здраве	IL – интерлевкини
ПКК – пълна кръвна картина	INR – International Normalized Ratio
ХХС – хроничен хепатит С	LDL – липопротеини с ниска плътност
Alb – албумин	NCC – несвързана с церулоплазмин мед
APP – амилоид прекурсорпротеин	PCR – полимеразна верижна реакция
AsAT – аспартат-аминотрансфераза	SOD – супероксид - дисмутаза
AlAT – аланин-аминотрансфераза	TBil – общ билирубин
АТР7А – АТФаза 7А	TChol – общ холестерол
АТР7В – АТФаза 7В	TG – триглицериди
	TP – общ белтък
	UPRO – протеинурия g/24h

II. ВЪВЕДЕНИЕ

Медта е микроелемент с двойствена природа. Има есенциално значение за живота, но при натрупване може да предизвика токсични прояви. Познати са генетично детерминирани състояния на медна дисхомеостаза с проява, както на дефицит (болест на Менке, БМ), така и на натрупване на мед (болест на Уилсън, БУ) в организма. Медна дисхомеостаза може да се развие и в следствие въздействието на фактори от околната среда, начин на живот, при парентерално хранене, неконтролируемо суплементиране с хранителни добавки, определен генетичен полиморфизъм или вторично при други заболявания. Рутинно и най-често в практиката при определяне на статуса на медта се изследват серумна мед, мед в 24-часова урина и концентрацията на церулоплазмин. Познаването на физиологията на медта определя необходимостта от комплексен подход при оценка на медния статус, ориентиран към пакет от изследвания, които да могат да отразят не само концентрацията на общата серумна мед и церулоплазмина, но и показатели, които могат да хвърлят светлина върху функционалната характеристика на медната обмяна при различни клинични състояния. При редица заболявания измерването на свободния пул на медта би дало по-надеждна информация за диагнозата и хода на болестта. Редица ръководства препоръчват пресмятане на „свободната“ мед чрез формулата на Walshe, но усилията на съвременната лабораторна медицина са насочени към директно определяне на несвързаната с церулоплазмина мед. Измерването на концентрацията на церулоплазмина се допълва с ензимната му активност и съотношението за неговата специфична активност като чувствителен маркер за дискретни промени в медната хомеостаза.

През последното десетилетие значението на медта и на микроелементите като цяло, търпи експанзивно развитие в ролята им за патогенезата при различни заболявания с невродегенерация като болест на Алцхаймер (БА), болест на Паркинсон (БП) и мултиплена склероза (МС). Мястото на медта във физиологията на нервната тъкан, участието ѝ в енергийните процеси и относително високото съдържание на мед в мозъка, само подкрепят смисъла на клиничното приложение на медния статус в лабораторната диагностика на невродегенеративните за-

болявания. В Националния консенсус за ранна диагностика и лечение на БА и други форми на деменция (2015) вече е заложено изследване на мед в 24-часова урина, която всъщност отразява количеството на свободния пул на медта в организма. Социално-икономическата и медицинска значимост на БА е безспорно голяма. Усилията при диагнозата на заболяването са насочени към ранна диагноза, по-голяма специфичност и въвеждане на позитивни аргументи. Приложението на ликворните биомаркери β -амилоид и тау протеин в диагностиката на заболяването е постижение в обективизиране на когнитивния дефицит. Усилията са насочени към търсене на възможности за диагноза с маркери от периферна кръв, както и показатели с предиктивно значение. Водещи учени в изследване на връзката между невродегенеративните заболявания и микроелементите предполагат съществуването на меден фенотип на БА на базата на дефекти в APOE4 генът по типа на loss of function мутации, което повишава риска от развитие на заболяването.

Индивидуално ориентираната перспектива в медицината и все нарастващото значение на епигенетичните фактори, част, от които са и микроелементите, налагат изучаването на разпределението на медта в дадена популация в зависимост от структурата на населението, пола, възрастта и други фактори на вариация, което да бъде базисното познание при търсене на съвременни методи за диагностика, прогноза и лечение при редица социално значими заболявания.

III. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Цел на настоящата работа е определяне референтни граници на мед в кръвен серум при представителна група клинично здрави лица от българската популация и проучване значението на медния статус при клинични модели с нарушена хомеостаза на медта – болест на Уилсън, хроничен хепатит С и болест на Алцхаймер.

Задачи

1. Стандартизиране на условия в преданалитичния етап при определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал.

1.1. Тестване за контаминация на пробите за анализ

1.2. Изследване стабилността на пробите при определяне на мед в серум, урина и ликвор

2. Валидиране на методите пламъкова и електротермична атомно-абсорбционна спектрофотометрия за определяне на мед в различен биологичен материал.

3. Определяне границите на референтната област за мед в кръвен серум в българската популация и проучване влиянието на факторите пол, възраст, географско положение, тютюнопушене, прием на алкохол, физическа активност и индекс на телесна маса.

4. Характеризиране на статуса на медта при клинично здрави лица от българската популация с разширен панел от лабораторни изследвания.

5. Проучване на клиничното приложение на показатели за меден статус при различни патологични състояния с нарушена хомеостаза на медта – сравнителен анализ.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

А) МАТЕРИАЛИ

1. Стандартизиране на условия в преаналитичния етап при определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал

1.1. Тестване за контаминация на пробите за анализ

1.1.1. Контаминация при серумни проби - използвани са по 10 броя от следните епруветки:

– епруветки за биохимични анализи – вакутейнери BD Vacutainer® BD SST TM II Advance (BD Serum Separator tubes) с гел сепаратор и антикоагулант, изработени от пластмаса, 5 ml, каталожен № 367955.

– специализирани епруветки за микроелементен анализ – вакутейнери BD Vacutainer® Trace Element Tubes (BD Trace Element tubes) с гел сепаратор и антикоагулант, със силиконово вътрешно покритие, изработени от пластмаса, 6 ml, каталожен № 368380.

1.1.2. Контаминация при проби урина - използвани са следните съдове изградени от полиетилен или полипропилен:

– Съдове за събиране на урина (n = 10; каталожен № 40800.1; Deltalab, Испания)

– Съдове за транспорт и съхранение на урина (n = 15; каталожен № 40980.2; Deltalab, Испания)

– Съдове за подготовка на пробата преди анализ (n = 15; BD Falcon™; каталожен № 352003)

1.2. Изследване стабилността на пробите в различен биологичен материал

1.2.1. Стабилност на пробите за мед в серум - от рутинните проби постъпили в лабораторията са подбрани общо 11 серума без данни за наличие на хемолиза, липемия и иктер. Използвани са BD Serum Separated tubes с гел сепаратор (каталожен № 367955). Всички проби са центрофугирани при $\leq 1200g$ за 10 мин. на стайна температура. Първоначалното определяне на концентрацията на мед (CT_0) е направено до 2 часа от пробовземането. За съхранение на серума са използвани епруветки с капаче тип Eppendorf. Следните условия са изследвани:

- Температурен режим: стайна температура – 15-25°C и хладилна температура – 2-8°C
- Продължителност на съхранение: една седмица (СТ₁) и две седмици (СТ₂).

1.2.2. Стабилност на пробите за мед в урина - проучена е стабилността на мед в проби от 24-часова урина при контролна група пациенти (n = 14) и при пациенти (n = 14), приемащи D-penicillamine (DPA, ДПА). Контролната група пациенти са здрави доброволци, а пациентите на терапия с ДПА са от Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД, София. Приемът на ДПА е средно 1000 mg/24h, в 2 приема дневно. Първоначалното измерване на концентрацията на мед е извършено до 2 часа след доставяне на 24-часовата урина в лабораторията (УТ₀). Следните условия за съхранение са изследвани:

- Температурен режим: стайна температура – 15-25°C и хладилна температура – 2-8°C
- Продължителност на съхранение: 2 дни (УТ₁), 3 дни (УТ₂) и 14 дни (УТ₃)

1.2.3. Стабилност на пробите за мед в ликвор - проучена е стабилността на медта при 5 проби лумбален ликвор при пациенти с увреда на междупрешленните дискове в поясния отдел от Клиника по неврохирургия към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ ЕАД, София. Стабилността е проследена само при съхранение на хладилна температура – 2-8°C. Началното измерване на мед в пробите е направено до 2 часа от доставяне на ликвора в лабораторията (ЛТ₀). Стабилността на пробите е изследвана при следната продължителност на съхранение: след 24 часа (ЛТ₁), след 48 часа (ЛТ₂) и след 1 седмица (ЛТ₃).

2. Проучване при здрави лица

2.1. За определяне на референтен обхват - границите на референтната област са изчислени от резултатите, получени от еднократно изследване на 379 клинично здрави лица от българската популация, на възраст от 12 до 95 год. (средна възраст 47 ± 14 год.), от които 172 (45.4%) мъже и 207 (54.6%) жени.

Изследваните лица са от 5 различни населени места: София (204, от които 101 мъже и 103 жени), Варна (42; 15 мъже и 27 жени), Пазарджик (50; 19 мъже и 31 жени), Раднево (52; 26 мъже и 26 жени), и Русе (31; 11 мъже и 20 жени). Групата е съставена от лица с различни професии – лабораторен персонал, пенсионери, студенти, служители, работници. Изследванията са проведени 2012-2015 г.

Изследвани лабораторни показатели: ПКК, Gluc, Creat, CRP, TP, Alb, AsAT, AlAT, TChol, TG, HDL, LDL и серумна мед.

2.2. Събиране на данни за влиянието на тютюнопушене, прием на алкохол, физическа активност и индекс на телесна маса върху серумните нива на мед чрез анкетна карта – изследвани са общо 31 лица (10 мъже и 21 жени) на средна възраст 43 ± 15 год., от София, българска популация.

Анкетната карта е изработена от колектив И. Д. Иванова и Б. Д. Атанасова, въз основа на литературни източници (Squitti R, Siotto M, Polimanti R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014;35 Suppl 2:S40-50.) и собствени съображения.

Като пушачи са включвани лица, които пушат по 10 и повече цигари на ден. Според приема на алкохол са обособени 2 групи: на редовно приемащи алкохол – всеки ден или през ден, и неупотребяващи алкохол – рядко/никога. Според физическата натовареност има група лица само с обичайни натоварвания, т.е. нетрениращи и група на трениращи, в които влизат лица с активна спортна дейност – 1-3 пъти седмично.

При всички включени лица е изследвана серумна мед.

2.3. Определяне на нови маркери, характеризиращи медния статус при лица от българската популация - групата изследвани здрави доброволци включва 41 индивида от българската популация (16 мъже и 25 жени), на средна възраст 43 ± 13 г., от гр. София.

Изследвани лабораторни показатели: ПКК, Gluc, Creat, CRP, TP, Alb, AsAT, AlAT, TChol, TG, HDL, LDL, които са направени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, ЕАД, София.

Допълнително на всички лица са изследвани: серумна мед, концентрация на церулоплазмин и активност на церулоплазмин, в Laboratory of Neurobiology, Fatebenefratelli Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия. Въз основа на направените измервания са изчислени: NCC по формулата на Walshe, % NCC, отношението Cu:Ср и специфичната активност на церулоплазмина (eCp/iCp).

Съхранението и транспортът на пробите (серум) е направено при температура -20°C .

2.4. Контролна група от италианска популация - контролната група включва 23 лица (мъже 14 и жени 9; средна възраст 65 ± 8.6 години) без данни за когнитивен дефицит.

Критерии за изключване: остър възпалителен процес, фебрилни състояния в последните 14 дни, травми на главата, прием на седативни медикаменти, преживян мозъчен инсулт, хроничен хепатит.

Изследвани лабораторни показатели: серумна мед, концентрация и оксидазна активност на церулоплазмин. Изследванията са проведени в Laboratory of Neurobiology, Fatebenefratelli Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия. Въз основа на направените измервания са изчислени: NCC по формулата на Walshe, % NCC, отношението Cu:Ср и специфичната активност на церулоплазмина (eCp/iCp).

3. Проучване информативното съдържание на лабораторни показатели, характеризиращи медния статус при различни патологични състояния с нарушена хомеостаза на медта

С оглед проучване информативното съдържание на резултатите получавани с разработените и внедрени методи при някои патологични състояния са изследвани общо 78 болни, чието разпределение по нозологични единици е представено на Табл. 1.

Таблица 1. Разпределение на пациентите по нозологични единици

Диагноза	Брой	Болнично заведение
Болест на Уилсън	29	УМБАЛ "Св. Иван Рилски" ЕАД
Хроничен хепатит С	27	УМБАЛ "Св. Иван Рилски" ЕАД
Болест на Алцхаймер	22	Fatebenefratelly Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия

Клиничната диагноза на пациентите с БУ и ХХС е поставяна в Клиника по гастроентерология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски” ЕАД, София, въз основа на национални и международно приетите критерии и класификации. Пациентите с БА са от база данни на Fatebenefratelly Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия, по проект „ Trace elements and Alzheimer’s disease – current tendencies and future perspectives”, IFCC 2015. Всички участници в изследванията са дали писмено Информирано съгласие, съгласно изискванията на Комисията по етика на научните изследвания към МУ – София. Личните данни на болните и резултатите от изследването бяха съхраняване, обработени и предоставени в съответствие със Закона за защита на личните данни и Кодекс на професионалната етика.

3.1. Болест на Уилсън – изследвани са 29 пациента (10 мъже и 19 жени; средна възраст 37 ± 12 год.). От българския етнос са 25, а 4 пациента са от турския етнос. Средната възраст на дебют на заболяването в цялата извадка е 24 ± 10 год. Всички пациенти провеждат терапия с хелиращ медикамент – ДПА (средна доза 1000 mg дневно Cyprenil). Само при 2 пациента, въпреки терапията, 24-часовата куприуреа е под $3 \mu\text{mol}/24\text{h}$.

Критерии за включване: диагноза болест на Уилсън; провеждане на хелираща терапия с ДПА.

Изследвани лабораторни показатели: ПКК, Creat, TP, Alb, AsAT, AlAT, TBil, Ср, серумна мед, серумен цинк, куприуреа, цинкуреза, протеинурия и INR. Изчислени са: NCC по формулата на Walshe и отношението Cu/Zn в серум.

3.2. Хроничен хепатит С – изследвани са 27 пациента (15 мъже и 12 жени от 34 до 67 год.; средна възраст 50.5 ± 9.7), нелекувани досега ($n = 27$) или провели неуспешно лечение с Peg-interferon-alfa 2a ($n = 7$) без изчистване на вируса.

Критерии за включване: пациенти с положителни резултати за анти-HCV антитяло и за HCV-RНК, определена чрез полимеразна верижна реакция. Без данни за цироза и хепатална енцефалопатия.

Изследвани лабораторни показатели: ПКК, Creat, TP, Alb, AsAT, AlAT, TBil, Cp, серумна мед, серумен цинк, анти-HCV антитела, HCV – РНК. Изчислени са: NCC по формулата на Walshe и отношението Cu/Zn в серум.

3.3. Болест на Алцхаймер – изследвани са 22 пациента (5 мъже и 17 жени от 64 до 85 год.; средна възраст 77 ± 5.4), италианска популация. Включените пациенти са от база данни на Fatebenefratelly Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия, с любезното съдействие на проф. Розанна Скуитти, Ръководител на AFaR Division, Fatebenefratelli Foundation.

Критерии за включване: диагноза болест на Алцхаймер, късна форма.

Изследвани лабораторни показатели: серумна мед, концентрация и оксидазна активност на церулоплазмин. Изследванията са проведени в Laboratory of Neurobiology, Fatebenefratelly Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия. Въз основа на направените измервания са изчислени: NCC по формулата на Walshe, % NCC, отношението Cu:Cp и специфичната активност на церулоплазмина (eCp/iCp).

4. Биологичен материал

4.1. Кръв - при всички пациенти кръв е взета сутрин от 07:00 до 11:00 ч, след 12-часова хранителна пауза. Венепункцията е извършена при спазване на изискванията за преданалитичния етап за вземане на кръв и при спазване условията за стерилност по време на работа. Използвани са: епруветки за изследване на пълна кръвна картина – вакутейнер с K_2EDTA ; за изследване на коагулационни показатели -вакутейнер с цитрат в съотношение 1:9 за получаване на цитратна плазма. Всички клинично-химични показатели са изследвани в серум, който е отделян при следните условия – вакутейнер с клот активатор и гел сепаратор. Кръвта е центрофугирана при $< 1200 g$ за 10 мин на стайна температура. Определянията на мед и цинк в серума на пациентите от различните градове е направено в една и съща лаборатория – Клинична лаборатория на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, София. Част от

серумите са транспортирани и съхранявани в епруветки с капаче тип Eppendorf до 48 ч. при хладилна температура.

4.2. Урина - в проучването е използвана 24-часова урина. Преди да започне събирането на всеки пациент е обяснена процедурата за правилно събиране на диурезата. Използвани са полиетиленови контейнери от 2L с минимален риск от контаминация на пробата. Консерванти не са използвани. За анализите необходимото количество урина е центрофугирано при < 1200 g за 10 мин на стайна температура.

4.3. Ликвор - изследван е лумбален ликвор. За биохимичния анализ е използвана втората или третата порция. Ликворът е съхраняван в прозрачни, стерилни съдове, за еднократна употреба с минимален риск от контаминация. При необходимост от по-продължително съхранение това е направено при температура от -70°C . Преди анализ пробите са центрофугирани при < 1200 g за 10 мин на стайна температура.

Б) МЕТОДИ

1. Модел за тестване контаминацията при анализ на урина

1.1. Екстракция – напълване на съдовете догоре с бидестилирана вода или азотна киселина и внимателно размесване чрез обръщане 50-60 пъти за по-добър контакт със стените на епруветката. Първоначалното измерване (T_0) при всички съдове е извършено веднага след напълването и размесването с екстрахиращия разтвор (вода, киселина). Последващите измервания на концентрацията на мед при различните съдове е извършено по предвидените времеви интервали и при съхранение в условия на стайна температура.

1.2. Измерване – всяка концентрация от екстрактите е измерена 6 пъти като средната стойност е автоматично пресметната от анализатора.

1.3. Определяне на сляпа (фонова) стойност – използваната бидестилирана вода е изследвана за съдържание на мед. Резултатът е приет като сляпа стойност и е взет предвид при изчисляване на всеки отделен резултат.

2. Използвани методи при хематологични и клиничко-химични показатели

2.1. Изследване на хематологични показатели

Хематологичните анализи са извършени с автоматични хематологични анализатори Sysmex KX21N (Русе и Пазарджик), Sysmex XT 2000i (Варна), Sysmex XS1000i (София и Раднево). Хемоглобинът е определен с безцианидни методи. Броят на кръвните клетки е определен чрез кондуктометричен метод. Сравнимостта на резултатите от трите анализатора е проверена с помощта на аналитичната надеждност на данните, включително и резултатите от външната оценка на качеството (ВОК) на хематологичните показатели.

2.2. Определяне на церулоплазмин в серум

Серумният церулоплазмин е определен чрез имунотурбидиметричен метод с използването на клиничко-химичен анализатор Cobas Integra 400 Plus, Roche, Германия. Методът се основава на образуване на преципитат на човешки церулоплазмин със специфичен антисерум. Границата на откриване на метода е 0.03 g/L.

Институтът за клинични и лабораторни стандарти на САЩ (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) препоръчва аналитичните характеристики на всеки метод да бъдат потвърдени експериментално чрез изследване и предоставяне на обективни доказателства. Минималните изисквания за верификация включват експериментално потвърждаване на следните ключови аналитични характеристики: аналитичен обхват (линейност), възпроизводимост, достоверност и референтен интервал.

Линейност

Използван е следният материал за калибрация: Calibrator for automated system (C.f.a.s.) PAC (Prealbumin-ASLO-Ceruloplasmin) със сериен номер 178557. Калибраторът съдържа стабилизиран човешки серум с химически добавки и добавки от биологичен произход.

– Прицелната стойност е медианата от резултатите получени в различни лаборатории при стриктно спазване стандартните изисквания на фирмата производител.

– Калибрационната крива се получава автоматично и се визуализира графично.

– Калибрационните стойности са специфични за серийния номер. При смяна на серийните номера на реактива калибрационната крива се верифицира отново.

– Линейният обхват обявен от производителя се потвърждава при изследването (0.08-1.4 g/L).

Възпроизводимост

За определяне на възпроизводимостта (precision) се изследва обратната количествена характеристика – невъзпроизводимостта, като се използват подходящи контролни материали и серуми на болни.

Използвани са лиофилизирани контролни материали в две нива: Prealbumin/Ceruloplasmin Control Set, ЛОТ № 04567021190, 164 720-01, Precinorm PC и Precipath PC.

Невъзпроизводимост в непрекъсната серия, при условия на повторяемост – използвани са контролни материали в две концентрационни зони. За всяка от тях е изследвана серия от 10 проби. Резултатите са представени на Табл. 2. Получените от нас коефициенти на вариация при определяне невъзпроизводимостта в серия са в рамките на допустимите от производителя, а също така отговарят и на критериите на Westgard за допустим коефициент на вариация в условия на повторяемост – до 5.8%.

Невъзпроизводимост във време (day-to-day) – изследван е един и същ контролен материал в две концентрационни нива в продължение на 20 работни дни. Резултатите са представени на Табл. 3.

Таблица 2. Повторяемост (repeatability) на резултатите от определяне на церулоплазмин с имунотурбидиметричен метод

Церулоплазмин g/L	Precinorm PC	Precipath PC
Обявена прицелна стойност	0.256	0.575
X	0.26	0.58
SD	0.008	0.01
CV%	3.07	1.72
CV% обявен от производителя	3.6	2.4

Таблица 3. Невъзпроизводимост във време на резултатите от определяне на церулоплазмин с имунотурбидиметричен метод

Церулоплазмин g/L	Precinorm PC	Precipath PC
Обявена прицелна стойност	0.256	0.575
X	0.26	0.58
SD	0.01	0.02
CV%	3.8	3.4
CV% обявен от производителя	3.9	2.7

Достоверност

В настоящото проучване са използвани лиофилизирани контролни материали с прицелни стойности и допустими интервали, като се определиха отклоненията на средната аритметична стойност, получена в лабораторията, от обявената от производителя стойност като мярка за недостоверността. За целта са изследвани десеткратно контролни материали в две концентрационни нива (Табл. 4). Получените от нас средни аритметични стойности попадат в допустимия интервал на използваните контролни материали.

Таблица 4. Недостоверност на резултатите от определянето на церулоплазмин в серум с имунотурбидиметричен метод

Контролен материал	Допустим интервал	x	Bias%
Precinorm PC	0.196-0.316	0.26	4
Precipath PC	0.437-0.713	0.58	1.75

Референтен интервал

Обявеният от производителя референтен обхват за церулоплазмин е 0.15-0.45 g/L. За верифициране на референтен интервал за даден метод обявен от производителя се извършва следното проучване: подбират се най-малко 20 лица с верифицирано състояние на здраве. Ако извън референтния интервал са по-малко от 2 резултата се приема, че той е верифициран и може да бъде използван. Ако повече от 3 резултата са извън референтните интервали, се препоръчва лабораторията да изработи собствени стойности.

При 54 здрави лица (мъже 19 и жени 35), на възраст 44 ± 16 год., е изследван серумен церулоплазмин. Всички получени резултати са в рамките на обяве-

ния от производителя референтен обхват. Получените от нас стойности са: средна стойност 0.25 ± 0.04 (от 0.19 до 0.38) g/L.

3. Метод за определяне на мед в серум и урина - пламъкова ААС с атомно-абсорбционен спектрофотометър “AAAnalyst 400”. Използваните работни параметри на спектрофотометъра са представени на Табл. 5.

Таблица 5. Работни параметри на ААС „ AAAnalyst 400”, използван при определянето на Cu в кръвен серум и урина

Параметър	Cu
Дължина на вълната (nm)	324.8
Процеп (nm)	0.7
Светлинен източник	HCL – 15 mA
Горивен газ	Ацетилен – 5.4 L/min
Окислителен газ	Въздух – 27.8 L/min

За построяване на калибрационна крива са използвани работни калибрационни разтвори с различни концентрации - 0.15, 0.25, 0.5, 1.0 и 1.5 mg/L, получени от основен калибрационен разтвор за определяне на мед: Atomic spectroscopy Standard, Copper, 1000 mg/L, 2% HNO₃, Perkin Elmer Pure, PE#N9300114, LOT#: 19-09CUX1. Анализаторът автоматично построява калибрационна крива, която се визуализира графично. След оценяването ѝ се престъпва към определяне на пробите. След като са центрофугирани те се разреждат с бидестилирана вода (за серум 1:3 и за урина 1:4). Разредените проби серум и урина се аспирират директно. Всяка концентрация се определя трикратно и резултатът от измерването е средната стойност.

4. Метод за определяне на мед в ликвор - ET - ААС с атомно-абсорбционен спектрофотометър “Perkin Elmer 3030”. Използваните работни параметри на спектрофотометъра са представени на Табл. 6 и Табл. 7.

Таблица 6. Работни параметри на ААС „ Perkin Elmer 3030”, използван при определянето на мед в ликвор

Параметър	Cu
Дължина на вълната (nm)	324.8
Процеп на монохроматора (nm)	0.7
Светлинен източник	HCL-15 mA
Измерване на абсорбцията	Площ на пика
Време на интеграция (s)	5
Корекция	деутериева
Обем на пробата (µl)	20
Температура на опепеляване	1100°C
Температура на атомизация	2200°C

Таблица 7. Температурни програми при ЕТ-ААС определяне на мед в гръбначно-мозъчна течност

Стъпка №	Температура t°C	Време за достигане (s)	Време за задържане (s)	Поток на аргона (ml/min)	Отчитане
1	120	15	15	300	–
2	300	10	10	300	–
3	1100	15	15	300	–
4	2200	0	3	0	Да
5	2600	1	3	300	–

Калибрационна крива се построява по метода на стандартните добавки. Използвани са работни калибрационни разтвори с различни концентрации - 2.5, 5, 10 и 15 µg/L., получени от основен калибрационен разтвор за определяне на мед: Atomic spectroscopy Standard, Copper, 1000 mg/L, 2% HNO₃, Perkin Elmer Pure, PE#N9300114, LOT#: 19-09CUX1. Използва се пиролитна графитна тръбичка. Пробите се изследват по метода на стандартната добавка.

5. Определяне на несвързана с церулоплазмина мед (NCC) - получаването на резултатите за NNC е направено по формулата на Walshe, чрез разликата между тоталната серумна мед и медта, съдържаща се в церулоплазмина:

$$NCC \mu\text{mol/L} = \text{total Cu} - [\text{Cp mg/L} \times 0.0472],$$

където умножението в скоби изразява съдържанието на мед в церулоплазмина .

6. Методи за статистически анализ

Статистическият анализ на изходните данни е извършен чрез дескриптивен анализ, тестовете за определяне нормалността на разпределението (Kolmogorov-Smirnov и Shapiro-Wilks), параметрични тестове за свързани извадки (Т-тест на Student) и несвързани извадки (unpaired Т-тест на Student); непараметрични тестове за свързани извадки (Wilcoxon) и несвързани извадки (Mann-Whitney); корелационен анализ. Използвана е програма за статистическа обработка Software package for statistical analysis (SPSS®), IBM 2009, версия 19 (2010) и Excel (v.2010). Графичните изображения са изготвени с помощта на Excel и SPSS v.19.

7. Методи, използвани за определяне на лабораторните показатели в Laboratory of Neurobiology, Fatebenefratelli Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия

7.1. Серумна мед – колориметричен метод с реактиви Randox (COPPER Cu Randox), ЛОТ№ 304381, REF CU2340, 2015-11 и стандарт на Randox Copper standart (Cu Cal) с ЛОТ№ 251 CU.

7.2. Концентрация на церулоплазмин – имунотурбидиметричен метод с реактиви Futura System group s.r.l., Италия и калибрационен материал Multicalibratore iMT, ЛОТ№ 0132, REF IMCAL01, 2016/05.

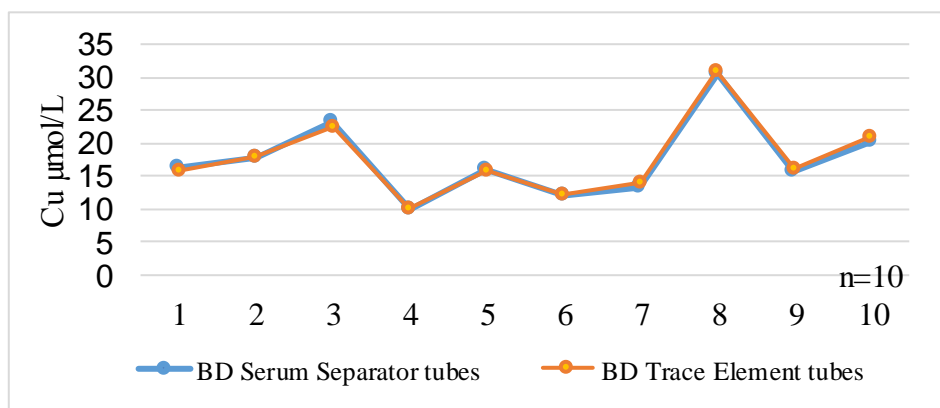
7.3. Ензимна активност на церулоплазмин – автоматичен ензимен метод с хромоген субстрат o-dianisidine, който след оксидиране под действие на холоцерулоплазмина, образува цветно жълто-кафяво съединение с максимална абсорбция при 460 nm. Всички използвани реактиви са от фирмата производител Sigma-Aldrich, USA.

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Стандартизиране на условията в преданалитичния етап при определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал

1.1. Тестване за контаминация на пробите за анализ - сравнението между двата вида епруветки установи еднакви концентрации на мед в пробите серум:

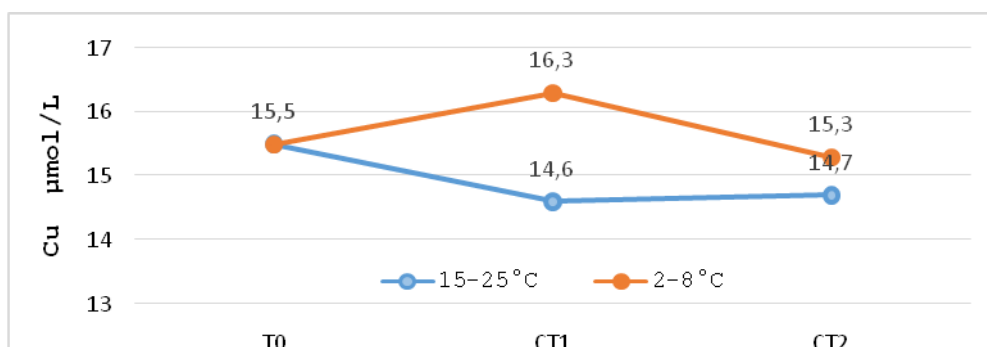
17.56 ± 6.01 μmol/L (BD Serum Separator tubes) и 17.76 ± 6.00 μmol/L (BD Trace Element tubes) (p = 0.20) (Фиг. 1).



Фигура 1. Концентрация на мед в серум на пациенти при двата вида изследвани епруветки – BD Serum Separation tubes и BD Trace Element tubes (n=10; p = 0.20)

1.2. Изследване стабилността на пробите за мед в различен биологичен материал

1.2.1. Серум (n = 11) - резултатите са представени на Табл. 8 и Фиг. 2. При престой от 7 дни (СТ₁) на температура 2-8°C съдържанието на мед в серума значимо се повишава (p = 0.006; d% = 5.2), а се понижава при съхранение на стайна температура (p = 0.018; d% = -5.8). Значимо понижена остава медта при съхранение на 15-25°C и до 2 седмици (d% = -5.2), докато при 2-8°C не е установена статистически значима разлика (p = 0.15; d% = -1.3).



Фигура 2. Стабилност на мед (Cuμmol/L) в проби от серум, n=11

Таблица 8. Резултати от анализа на данните за стабилност на мед в проби серум, n=11

	T ₀	CT ₁		CT ₂	
t°C		15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C
x ± SD	15.5 ± 3.7	14.6 ± 3.5	16.3 ± 3.7	14.7 ± 3.3	15.3 ± 3.4
Медиана	16.00	14.6	17.0	15.1	15.6
Минимум	7.5	7.0	8.3	7.0	7.5
Максимум	21.2	20.7	22.3	19.8	20.5
p-value		0.018*	0.006*	0.008*	0.15

Серумни концентрации Cu μmol/L при различни температури (15-25°C и 2-8°C) и продължителност (T₀ – начален момент; CT₁ – след 1 седмица; CT₂ – след 2 седмици) на съхранение; *наличие на значима разлика между изследваните вариабилни

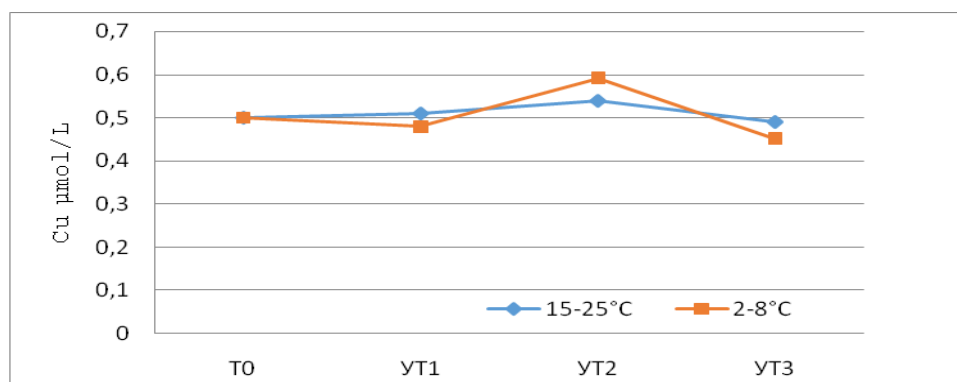
1.2.2. Урина

Контролна група урини (n = 14) (Табл. 9 и Фиг. 3.) – установи се наличие на значима разлика само при съхраняване на температури 2-8°C (p < 0.05). Средното процентно отклонение (d%) от подбраните референтни условия е по-малко при съхранение на стайна температура d% = -4 до 0, а при температура в хладилник е d% = -10 до 16.

Таблица 9. Резултати от анализа на данните за стабилност на показателя в урина при контролна група пациенти

	T ₀	UT ₁		UT ₂		UT ₃	
t°C		15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C
x ± SD	0.50 ± 0.2	0.50 ± 0.2	0.47 ± 0.2	0.48 ± 0.2	0.58 ± 0.2	0.49 ± 0.2	0.45 ± 0.2
Медиана	0.44	0.44	0.42	0.47	0.54	0.44	0.39
Минимум	0.23	0.23	0.18	0.28	0.23	0.23	0.18
Максимум	0.89	0.98	0.89	0.94	1.08	0.84	0.80
p-value		0.68	0.32	0.18	0.001*	0.75	0.02*

Концентрации Cu μmol/L при различни температури (15-25°C и 2-8°C) и продължителност (T₀ – начален момент; UT₁ – 2 дни; UT₂ – 3 дни; UT₃ – 14 дни) на съхранение; *наличие на значима разлика между изследваните условия

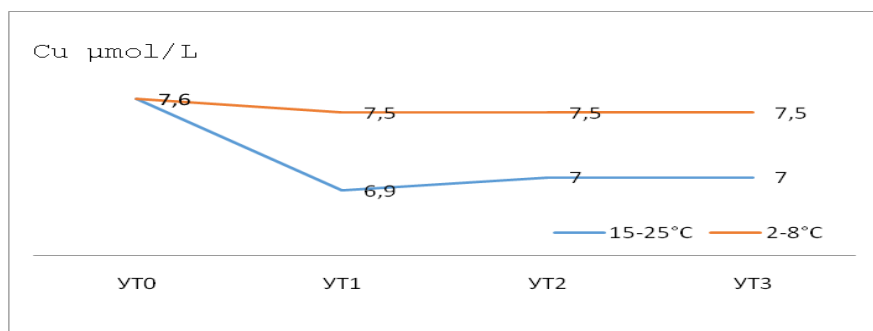
**Фигура 3.** Стабилност на мед в проби урина – контролни урини

Проби урина при пациенти след прием на ДПА ($n = 14$) (Табл. 10 и Фиг. 4). Установи се понижение на концентрациите по-изразено при съхранение на стайна температура. Тогава средното процентно отклонение на концентрациите също е поизразено ($d\% = -9.2$). При хладилна температура промените са незначителни с тенденция към понижаване $d\% = -1.8$.

Таблица 10. Резултати от анализа на данните за стабилност на показателя в урина при пациенти, приемащи ДПА

	T ₀	УТ ₁		УТ ₂		УТ ₃	
t°C		15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C
$\bar{x} \pm SE$	7.6 ± 1.2	6.9 ± 1.0	7.5 ± 1.2	7.0 ± 1.1	7.5 ± 1.2	7.0 ± 1.0	7.5 ± 1.1
Медиана	7.2	6.2	7.0	6.1	7.3	6.4	7.5
Минимум	1.6	1.5	1.3	1.5	1.5	1.7	1.5
Максимум	15.1	12.9	14.4	13.5	14.9	13.6	14.6
p-value		0.003*	0.10	0.003*	0.22	0.07	0.9

Концентрации Cu $\mu\text{mol/L}$ при различни температури (15-25°C и 2-8°C) и продължителност (T₀ – начален момент; УТ₁ – 2 дни; УТ₂ – 3 дни; УТ₃ – 14 дни) на съхранение. Резултати от измерванията на мед в урина при пациенти на терапия с ДПА; *наличие на значима разлика между изследваните условия



Фигура 4. Стабилност на мед в проби урина при пациенти след прием на ДПА

1.2.3. Ликвор (Табл. 11) - статистическият анализ на данните показва, че няма значима разлика в концентрацията на мед измервана при избраните периоди от време за съхранение ($p > 0.05$).

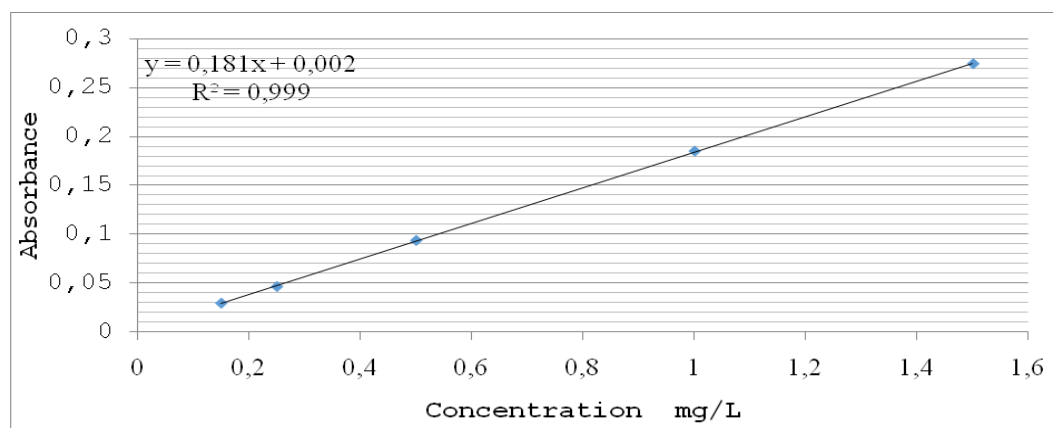
Таблица 11. Резултати от дескриптивен анализ на данните и t-тест за свързани извадки

	ЛТ ₀	ЛТ ₁	ЛТ ₂	ЛТ ₃
$\bar{x} \pm SE$	0.20 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05
Медиана	0.23	0.23	0.23	0.22
Минимум	0.065	0.073	0.068	0.068
Максимум	0.029	0.30	0.30	0.29
p-value		0.42	0.26	0.29

Представените данни са за: ЛТ₀ – базово определяне, ЛТ₁ – след 24ч., ЛТ₂ – след 48 часа, ЛТ₃ – след 7 дни

2. Валидиране на метода пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия за определяне на мед в кръвен серум и урина

Калибрационната крива на метода е представена на Фиг. 5. Зависимостта между концентрацията на медта в кръвен серум и измерената абсорбция е линейна ($r = 0.999$).



Фигура 5. Калибрационна крива за определяне на мед с директна пламъкова ААС

Аналитичната чувствителност на метода, изразена като характеристична концентрация, установена от нас е $0.026 \mu\text{mol/L}$. Границата на откриване изчислена от вариацията на сляпата проба ($Ld = X + 3SD$, $n = 20$) е $0.17 \mu\text{mol/L}$ (0.01 mg/L). Установената от нас граница на надеждно количествено определяне е $0.23 \mu\text{mol/L}$ (0.015 mg/L). Линейният обхват на метода е $0.15\text{-}1.5 \text{ mg/L}$ ($2.4\text{-}23.6 \mu\text{mol/L}$).

Невъзпроизводимостта е оценена чрез контролни материали с обявени прицелни стойности и стойности на допустимия интервал, посочени на Табл. 12.

Таблица 12. Контролни материали – прицелни стойности и допустим интервал

	Серум		Урина
	Прицелна стойност	Допустим интервал	Прицелна стойност
Ниво 1	26.6	25.3-27.9	0.48
Ниво 2	45.4	43.8-47.0	0.34

Невъзпроизводимостта на метода в непрекъснатата серия при условия на повторяемост е представено на Табл. 13.

Таблица 13. Повторяемост на резултатите от определяне на мед в серум и урина (n = 10)

Контролен материал	Серум		Урина	
	Ниво 1	Ниво 2	Ниво 1	Ниво 2
x	25.92	43.67	0.52	0.35
SD	0.27	0.88	0.03	0.017
CV%	1.1	2.01	5.76	4.85

Невъзпроизводимост на метода във време (n = 20) – по данни от ежедневно провеждан ВЛКК за минимум 20 работни дни (Табл. 14).

Таблица 14. Невъзпроизводимост във време

Контролен материал	Серум		Урина	
	Ниво 1	Ниво 2	Ниво 1	Ниво 2
x	26.07	45.02	0.61	0.41
SD	0.55	1.53	0.05	0.03
CV%	2.1	3.4	8.2	7.3

Недостоверност на метода – резултатите от оценката на недостоверността на метода са представени на Табл. 15. Концентрациите са изразени в $\mu\text{mol/L}$.

Таблица 15. Недостоверност на резултатите за определяне на мед в серум (А) и урина (Б)

(А)

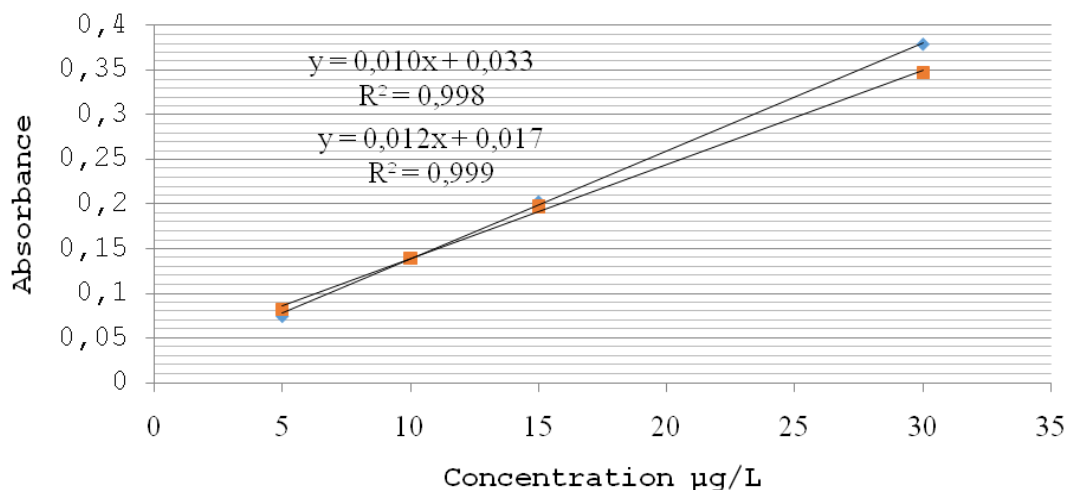
Контролен материал	Прицелна стойност	Допустим интервал	x	Bias%
Ниво 1	26.6	(25.3-27.9)	25.92	-2.6
Ниво 2	45.4	(43.8-47.0)	43.67	-3.8

(Б)

Контролен материал	Прицелни стойности	x	Bias%
Ниво 1	0.48	0.52	8.3
Ниво 2	0.34	0.35	2.94

3. Валидиране на метода ЕТ-ААС за определяне на мед в ликвор

Поради това, че ликворът е специфична и многокомпонентна матрица се налага при изследване на ликворни проби калибрацията да бъде по метода на стандартната добавка (Фиг. 6).



Фигура 6. Калибрационни криви с водни стандарти и проба ликвор

Границата на откриване, която е изчислена от вариацията на сляпата проба ($L_d = X + 3SD$, $n = 20$) е $0.005 \mu\text{mol/L}$ ($0.31 \mu\text{g/L}$). Установената от нас граница на надеждното количествено определяне е $0.007 \mu\text{mol/L}$ ($0.44 \mu\text{g/L}$). Линейният обхват на метода е $0.04\text{-}0.48 \mu\text{mol/L}$. Невъзпроизводимостта в серия е определена с помощта на петкратно отчитане на случайно подбрани проби ликвор ($n = 5$) с известна концентрация на мед. Резултатите са представени на Табл. 16.

Таблица 16. Невъзпроизводимост на метода в серия ($\mu\text{mol/L}$)

	Проба 1	Проба 2
x	0.12	0.20
SD	0.005	0.011
CV%	4.16	5.5

Невъзпроизводимост във време – ликвор от двама пациенти бе разпределен в епруветки тип Eppendorf – по 4 за всеки пациент. Те са съхранявани при температури от -40°C . Получените резултати са представени на Табл. 17.

Таблица 17. Невъзпроизводимост на метода във време ($\mu\text{mol/L}$)

	Проба 1	Проба 2
X	0.29	0.067
SD	0.02	0.004
CV%	6.06	5.97

Оценката на пропорционалната системна грешка е направена чрез метода Recovery (аналитична откриваемост, добавено/намерено). Получените резултати са представени на Табл. 18.

Таблица 18. Аналитична откриваемост, Recovery %, определено чрез 4 ликворни проби

Показател	Проба 1 $\mu\text{g/L}$	Проба 2 $\mu\text{g/L}$	Проба 3 $\mu\text{g/L}$	Проба 4 $\mu\text{g/L}$
Базова стойност	1.6	1.6	1.6	1.6
Добавена	2.5	5.0	10.0	15.0
Очаквана стойност	4.1	6.6	11.6	16.6
Намерена стойност	4.5	6.9	11.78	16.8
Recovery	109.8%	104.5%	101.6%	101.2%

4. Определяне границите на референтната област на мед в кръвен серум при представителна група лица от българската популация

4.1. Статистическа обработка - използвана е програмата REFVAL за статистическа обработка на събраните данни и определяне границите на референтната област, съобразно препоръките на IFCC/CLSI документ C28-A3 от март 2008г.

Резултатите от статистическия анализ на серумна мед при клинично здрави лица от българската популация са представени на Табл. 19.

Таблица 19. Резултати от статистически анализ на серумна мед при клинично здрави лица от българска популация

Статистически тест*	Мед		
	Мъже	Жени	Общо
Брой случаи	172	207	379
Асиметрия (Gs)	0.08	0.74	0.80
Ексцес (Gk)	-0.16	1.5	1.8
Колмогоров-Смирнов (D amx)	0.05	0.08	0.06
Cramer von Mises (W^2)	0.05	0.27	0.34
Anderson-Darling (A^2)	0.3	1.51	2.14
Anderson-Darling трансформирани данни	1.00	1.00	1.00

*Посочена е значимостта на статистическите критерии на съответните тестове при доверителна вероятност $1 - P \geq 0.95\%$

4.2. Тип на разпределение на резултатите за серумна мед в изследваната група здрави лица - оценка на хистограмите (Фиг. 7) и проверка за рязко отклоняващи се стойности; коефициенти на асиметрия (Skewnes – Gs) и ексцес (Kurtosis – Gk); показатели за измерване на централната тенденция.

Разпределението на резултатите за серумна мед в изследваната референтна група (Табл. 20)

Таблица 20. Серумна мед в изследваната представителна извадка

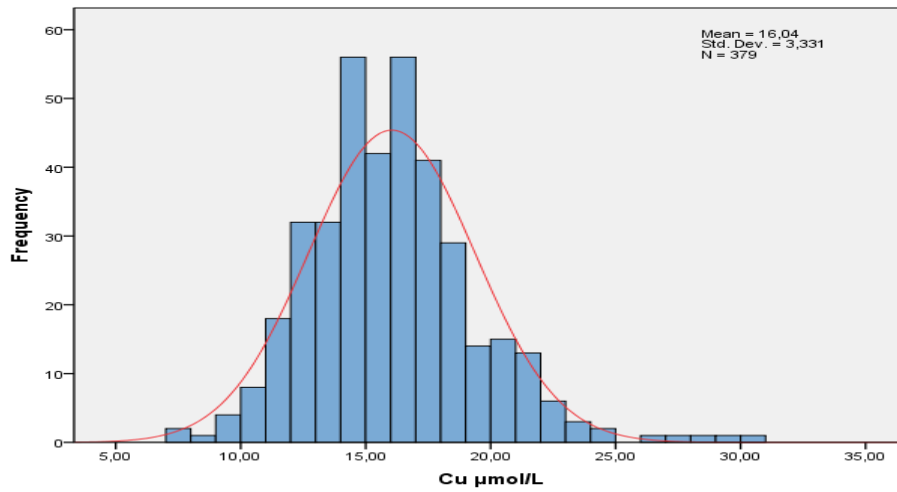
		Персентили						
$\mu\text{mol/L}$	Median	5	10	25	50	75	90	95
Serum Cu	15.89	11.3	12.05	13.87	15.89	7.89	20.41	21.85

4.3. Граници на референтната област за серумна мед в кръвен серум на лица от българската популация (Табл. 21)

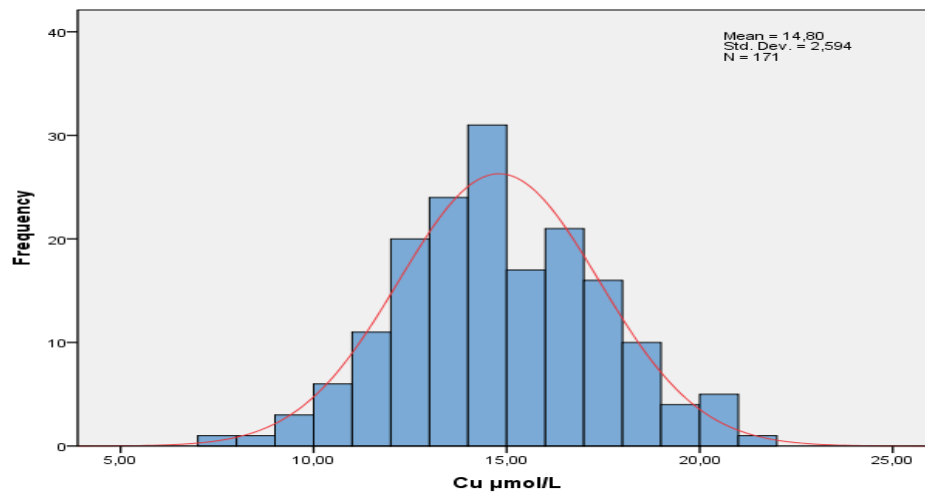
Поради това, че се установи статистически значима разлика между двата пола в серумните нива на мед, са представени референтни граници отделно за мъже, за жени и общо за мъже и жени.

Таблица 21. Граници на референтната област за серумна мед в кръвен серум

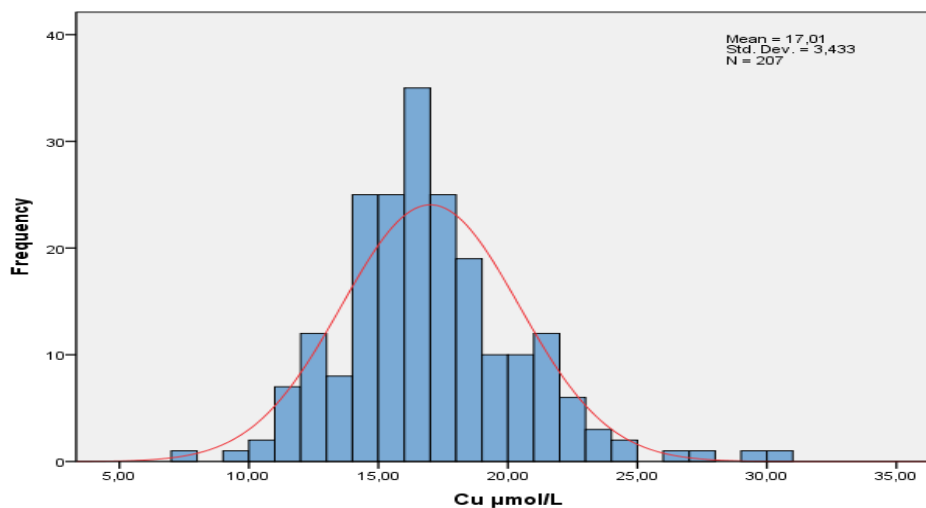
	Мед $\mu\text{mol/L}$		
	Мъже	Жени	Общо
Брой случаи	172	207	379
Ранг	7.47-28.95	7.97-30.26	7.4-30.26
Медиана	14.56	16.64	15.89
0.025 фрактил	9.89	11.06	10.33
90% ДИ	9.4-10.4	10.5-11.6	9.9-10.7
0.975 фрактил	19.95	24.87	23.65
90% ДИ	19.4-20.5	23.7-26.1	22.8-24.5



А) Обща група



Б) Мъже

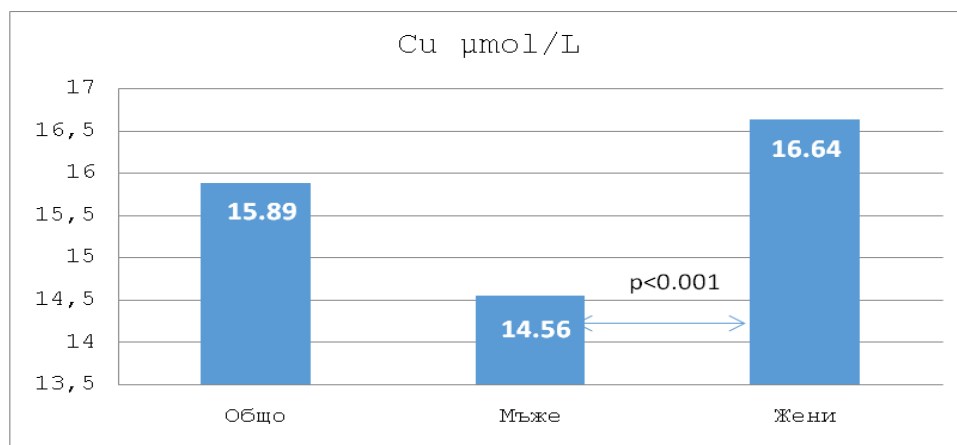


В) Жени

Фигура 7. Хистограми на разпределението на серумна мед в общата група (А) и в двата пола (мъже – Б; жени – В)

5. Влияние на пол, възраст, географско положение, телесна маса, тютюнопушене и консумация на алкохол върху серумните нива на мед

5.1. Влияние на пола - разпределението на резултатите е представено на Фиг. 8 и Табл. 22. Установени са по-ниски стойности на мед при мъжете със статистически значима разлика спрямо жените ($p < 0.001$).



Фигура 8. Разпределение на серумната мед според пола (представени са медианите на резултатите)

Таблица 22. Разпределение на резултатите за серумна мед по пол

	Cu μmol/L		
	Мъже	Жени	Общо
n	172	207	379
Средна възраст	49 ± 13	45 ± 14	47 ± 14
Средна ст.	14.88	17.00	16.04
SD	2.80	3.43	3.33
SEM	0.213	0.238	0.171
Медиана	14.56	16.64	15,89
Минимум	7.47	7.97	7.47
Максимум	28.95	30.26	30.26
IQR	13.06-15.65	14.76-18.65	13.87-17.89

5.2. Влияние на възрастта - промените на серумната мед в зависимост от възрастта са показани на Табл. 23.

Таблица 23. Възрастови промени в концентрацията на серумна мед

Възраст	n	x	SD	SE	Медиана	Мин.	Макс.
< 30	49	15.09	3.65	0.521	14.54	7.47	30.26
31-40	73	15.51	3.48	0.408	14.95	7.97	29.33
41-50	105	16.00	3.52	0.344	15.55	9.23	28.95
51-60	92	16.34	2.71	0.282	16.23	10.42	24.05
61-70	45	17.33	3.06	0.457	17.33	10.67	26.94
> 70	15	16.19	3.29	0.851	16.08	11.43	22.29
Общо	379	16.04	3.33	0.171	14.56	7.47	30.26

С възрастта серумната мед се повишава, като най-високи нива са измерени в декадата 61-70-годишна възраст, а най-ниски – при най-младите пациенти – до 30 г.в. Между отделните декади се установи статистически значима разлика в серумната мед ($p = 0.003$). Статистически са различни стойностите между групите до 30 г.в и декадата 61-70 г.в. ($p < 0.05$). Същевременно между групите 61-70 г.в. и над 70 г.в. промените са незначителни ($p > 0.05$).

От референтната група бяха подбрани индивиди от едно и също населено място, с приблизително равен брой и съответстващи си по пол и възраст. Само между тях се направи статистически анализ на данните (Табл. 24).

Таблица 24. Разпределение на резултатите за серумна мед ($\mu\text{mol/L}$) при три възрастови групи при равен n

	≤ 39 г.в.	$\geq 40-65$ г.в.	> 65 г.в.
Здрави	Млади	Средна възраст	Възрастни
N	29 (м – 14; ж – 15)	30 (м – 15; Ж – 15)	27 (м – 13; Ж – 14)
Възраст	31 ± 1.2	50 ± 1.2	71 ± 0.7
Степен на корелация*	0.183	0.369	-0.309
Cu $\mu\text{mol/L}$			
x \pm SD	13.6 ± 3.3	14.22 ± 2.3	17.48 ± 3.3
Медиана	12.8	14.6	16.6
SEM	0.6	0.42	0.64
IQR	11.3-16.7	11.9-15.6	14.9-20.8
Минимум	7.47	9.98	11.43
Максимум	20.53	19.27	23.67

*Степента на корелация е измерена чрез Spearman's coefficient

Между трите сравнявани групи се установи наличие на значима разлика ($p < 0.001$) в концентрациите на медта между индивидите над 65 г.в. с останалите две групи, като най-високи нива на мед са измерени при най-възрастното насе-

ление. Между млади и лицата на средна възраст не се установи значима разлика ($p = 1.00$).

5.3. Влияние на географското положение

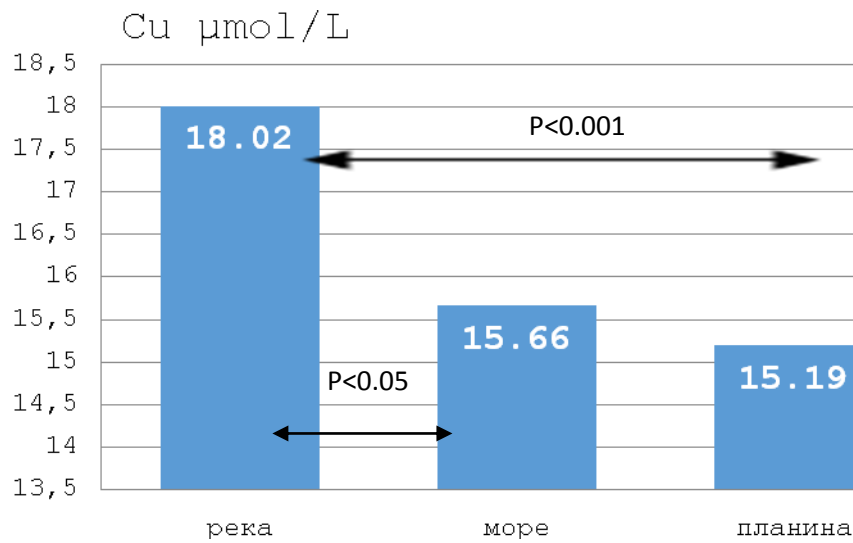
Наличие на значима разлика в серумната мед се установи ($p < 0.001$) между различните географски области включени в изследването. Данните от дескриптивния анализ на серумна мед според географската принадлежност са представени на Табл. 25.

Спрямо общата изследвана група значимо най-високи стойности за медта са измерени в областите Пазарджик и Русе ($p < 0.001$ и $p = 0.001$ съответно). В София са измерени статически значимо най-ниски стойности на серумната мед спрямо общата популация ($p = 0.002$). В зависимост от географското разположение резултатите за серумна мед са представени графично на Фиг. 9.

Таблица 25. Дескриптивен анализ на данните за серумна мед според географската принадлежност

Група	n	x	Медиана	SD	IQR	Мин.	Макс.
Пазарджик	50	18.13	17.27	3.66	15.98-19.53	12.43	29.33
Русе	31	17.85	18.09	2.98	14.95-20.10	12.94	24.05
Раднево	52	16.57	16.23	2.55	14.67-17.72	10.55	22.61
Варна	42	15.66	15.10	2.55	14.17-17.39	11.05	21.10
София	204	15.19	14.94	3.27	12.93-16.98	7.47	30.26
Общо	379	16.04	15.89	3.33	13.87-17.89	7.47	30.26

Значимо по-високи са серумните нива на медта при хората, които живеят в близост до реките (Пазарджик и Русе) в сравнение с тези, които живеят до морето (Варна) или в планински район (София). Не се установи статистически значима разлика в серумната мед между индивидите от Варна и София ($p = 0.23$).



Фигура 9. Концентрация на серумната мед според географската принадлежност

5.4. Влияние на телесната маса - не се установи значима корелация между серумната мед и ИТМ както при мъже ($r = 0.305$; $p = 0.130$), така и при жени ($r = 0.192$; $p = 0.254$).

5.5. Влияние на тютюнопушене, употреба на алкохол и физическа активност (Табл. 26).

Таблица 26. Фактори, които могат да повлияят върху серумните нива на мед

Cu μmol/L	n	$\bar{x} \pm SD$	Минимум	Максимум
Тютюнопушене				
Пушачи	13	14.94 ± 2.1	11.87	19.09
Не пушачи	18	14.44 ± 1.2	11.3	15.83
Прием на алкохол				
Рядко или никога (1-2 седмично)	14	14.72 ± 1.72	11.3	19.09
Всеки ден	17	14.09 ± 1.24	12.43	15.76
Физическа активност				
Не спортуват	22	15.0 ± 1.8	11.87	19.09
Активно спортуващи	9	13.7 ± 0.3	11.3	15.76

6. Резултати на пациентите, включени в проучването – здрави, БУ и ХХС (Табл. 27)

Таблица 27. Резултати от проведени клинично-лабораторни изследвания, характеризиращи клиничното състояние на пациентите

Параметър	Здрави	БУ	ХХС*
n	33	29	27
мъже:жени	16:17	10:19	14:13
Възраст (год.)	46 ± 12	37 ± 12	51 ± 10
Hgb g/L	148.9 ± 15.2	143.5 ± 13.5	147.5 ± 12
WBC.10 ¹² /L	6.4 ± 1.5	5.6 ± 1.7	6.7 ± 2.3
Creat μmol/L	82 ± 13	72 ± 18	79 ± 14
TP g/L	70.24 ± 3.9	71.6 ± 5.9	72.22 ± 6.7
Alb g/L	45.87 ± 3.81	46.09 ± 8.3	45.9 ± 2.5
UPRO g/24h	н.о.	0.35 ± 0.2	н.о.
AsAT/AlAT	19.6/19.7	30/34	60/78
TBil	н.о.	15 ± 7.8	14 ± 6.22
INR	н.о.	1.15 ± 0.11	н.о.
Cu μmol/24h урина	н.о.	10.95 ± 7.08	н.о.

Н.о. – конкретният показател не е определян за групата с пациенти. *При всички пациенти с ХХС е изследвана репликацията на хепатит С вируса: RNA (lg) mean ± SD = 5.564 ± 0.708

7. Резултати от характеризиране на статуса на медта при клинично здрави лица от българската популация с разширен панел от лабораторни изследвания (Табл. 28)

Таблица 28. Характеризиране на меден статус при клинично здрави лица от българската популация

Параметър	Резултати
n	41
Възраст	44 ± 13
Пол (мъже : жени)	16:25
Cu μmol/L	13.7 ± 2.72
Ср g/L (iСр)	0.276 ± 2.85
Ср IU/L (eСр)	103.4 ± 20.4
eСр/iСр IU/mg	3.72 ± 0.44
Cu:Ср	6.46 ± 0.75
NCC	0.64 ± 1.72
% NCC	2.3 ± 11.7

8. Информативно съдържание на показатели за меден статус при някои патологични състояния – БУ, ХХС и БА (Табл. 29 и Табл. 30)

Таблица 29. Сравнителна таблица с характеризиране на медния статус на пациентите

Параметър	Здрави	БУ	ХХС
n	33	29	27
Възраст	46 ± 12	37 ± 12	51 ± 10
мъже : жени	16:17	10:19	14:13
Cu $\mu\text{mol/L}$	15.3 ± 1.7	6.74 ± 4.35	17.51 ± 2.7
Zn $\mu\text{mol/L}$	13.05 ± 1.6	14.6 ± 2.7	12.5 ± 2.7
Cerulopl g/L	0.25 ± 0.03	0.13 ± 0.06	0.30 ± 0.06
Cu:Ср	7.95 ± 1.4	7.44 ± 5.3	7.06 ± 1.5
NCC	1.88 ± 2.32	3.21 ± 8.5	2.56 ± 3.22
Cu/Alb	0.33 ± 0.04	0.25 ± 0.5	0.35 ± 0.05
Zn/Alb	0.29 ± 0.08	0.48 ± 0.8	0.27 ± 0.05

Таблица 30. Сравнителна таблица с характеризиране на медния статус на пациенти с БА и контролна група лица

Параметър	Контроли	БА
n	23	22
Възраст	65 ± 8.6	77 ± 5.4
мъже : жени	14:9	5:17
Cu $\mu\text{mol/L}$	13.7 ± 1.6	18.3 ± 3.8
Ср g/L	0.27 ± 0.2	0.31 ± 0.5
Ср IU/L	103.8 ± 9.8	96.3 ± 10.7
eСр/iСр	3.9 ± 0.4	3.2 ± 0.6
NCC	0.93 ± 0.7	3.66 ± 1.7
Cu:Ср	6.7 ± 0.3	7.74 ± 0.57

При двете групи пациенти, представени на Табл. 30, стойностите за мед и церулоплазмин, в концентрация и активност, са в рамките на референтните граници. Видно е, че на фона на това стойностите на свободната фракция на медта (NCC) е в рамките на референтния интервал (до 1.6 $\mu\text{mol/L}$) при здравите контроли, докато при пациентите с БА е налице повишаване на нивата на несвързаната с церулоплазмина мед. При всички показатели между двете сравнявани групи е налице значима разлика в стойностите ($p < 0.005$).

VI. ОБСЪЖДАНЕ

Характеризирането на медната обмяна при човека изисква комплексен подход и познаване на физиологията на микроелемента, както и прецизно спазване на всички етапи в лабораторния анализ – от подаване на поръчката за лабора-

торното изследване до интерпретацията на получения резултат. Етапите извън аналитичното определяне са по-уязвими по отношение на риска от грешки. В микроелементния анализ контаминацията на пробата е кардинален проблем особено при определяне на елементи в биологичен материал с ниско съдържание. Най-често за определяне на мед се използват кръвен серум, плазма и урина. В медицинската практика мед се определя още в пълна кръв, гръбначно-мозъчна течност, мляко, пот, слюнка, биологични тъкани и амниотична течност. Методични проблеми при определянето на мед няма и методите за анализ на други биологични материали не се различават съществено от тези при серумни проби. Контролът на контаминацията, подготовката на пациента за правилно събиране/отделяне на пробата и стабилността на пробата са ключови в микроелементния анализ и могат да бъдат използвани като индикатори за контрол на качеството („quality indicators”), които са заложили като критерии в актуалния международен стандарт за акредитиране на медицински лаборатории – International Standard for medical laboratories accreditation – ISO 15189:2012. В Медицинския стандарт по Клинична лаборатория, с Наредба №1 от 31 януари 2014г. на Министерството на здравеопазването, са описани писмени процедури за подготовка на пациента за вземане/събиране на биологичната проба, специфични инструкции за транспорта и съхранението на пробите. Изследването на мед е специфична, високоспециализирана дейност, която следва да бъде предоставяна от болнични заведения с най-високо (трето) ниво на компетентност (Медицински стандарт по Клинична лаборатория).

1. Стандартизиране на критерии от преданалитичния етап в определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал

1.1. Изследване контаминацията на пробите за анализ - контролът на контаминацията при изследване на мед е най-лесен в сравнение с всички други олигоелементи поради липсата на мед в лабораторната среда. При определяне на мед съдовете за събиране на биологичния материал и за неговото съхранение са основен потенциален източник на замърсяване на пробата. При избора на вакутейнерите за

микроелементен анализ трябва да се има предвид следното: вакутейнери, които да са напълно чисти по отношение на възможността от контаминация не съществуват; вакутейнерите не подлежат на процедури по предварително промиване; значение има материалът, от който са изработени капачките на епруветките; вид на антикоагуланта; необходимо количество кръв и начина за отделяне на серума от клетките. В проведения от нас експеримент се установи, че резултатите за концентрацията на серумна мед от специализираните за микроелементен анализ епруветки BD Vacutainer Trace Elements не се различават от резултатите в кръвта получена с епруветките за биохимичен анализ BD Serum Separator Tubes. Това ни дава основание да заключим, че епруветките за общобиохимичен анализ може също така да бъдат използвани за определяне и на серумна мед. Предимство в този случай биха били по-добра икономическа ефективност, отпадане необходимостта от пресипване на серум в други съдове, по-лесно етикетирание и идентифициране на пробата за анализ и в крайна сметка минимизиране на риска от грешка в преданалитичния етап. Отчетените концентрации на мед във водни екстракти при BD Serum Separator Tubes и при BD Trace Element Tubes са съответно $0.05 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$ и $0.03 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$. Тези концентрации са $< 1\%$ от стойността на определената ДРГ за серумна мед в българската популация (общ референтен интервал: 10.33-23.65 $\mu\text{mol/L}$). В продуктивния си каталог фирмата производител, декларира съдържание на мед във водни екстракти от епруветки BD Trace Element Tubes 5 mg/L (0.07 $\mu\text{mol/L}$). Измерените от нас стойности са дори по-ниски (0.05 $\mu\text{mol/L}$). Тези факти, както и това, че измерената серумна мед от нас и от други автори, които са използвали други видове епруветки, е в сходен обхват, са доказателства за това, че контаминацията на пробата серум е оценена правилно и може да бъде контролирана. При определяне на микроелемента мед с пламъкова ААС е налице добро стандартизиране в преданалитичния етап при подготовката на пробата.

При определяне концентрацията на мед в урина е необходимо да се обърне специално внимание на подготовката на пробата за анализ и избор на метода за измерване. ET-ААС е значително по-чувствителен метод от пламъковата ААС. Това съществено усложнява проблема за контрола на контаминацията, тъй като концен-

трацията на мед в урината е много ниска (0.16-0.24 $\mu\text{mol/L}$). Чужди и български автори препоръчват всички използвани съдове при изследване на мед да бъдат грижливо предварително почиствани с 10-20% HNO_3 като изключение може да се направи за съдове използвани при определяне на мед в кръвен серум, където очакваните средни стойности са високи. Куприурезата се повишава значително при БУ или след прием на хелиращи медикаменти. Според алгоритъма за поведение при БУ от 2012 г. (European Association for the Study of Liver: EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease, 2012) един от критериите за диагноза на заболяването е куприуреза над 1.6 $\mu\text{mol/L}$. Пак според същото ръководство добър терапевтичен отговор е налице в интервала 3-8 $\mu\text{mol/24h}$. Тези по-високи очаквани стойности за съдържанието на мед в урината ни дават основание да погледнем на пламъковата ААС като на алтернативен метод с добра аналитична надеждност. Средната стойност на 14 изследвани урини при пациенти с прием на ДПА, установена от нас, е 7.65 $\mu\text{mol/L}$. При очаквана ниска долна граница за мед в урината в порядъка на 3 $\mu\text{mol/L}$, то установената от нас концентрация във водните екстракти представлява само 1.3%. Тези данни дават основанието да се направи заключението, че при изследване на мед в урина няма значителна контаминация от използваните съдове. Макар и със значително по-ниска чувствителност от ЕТ-ААС, пламъковата ААС използвана при пациенти, приемащи ДПА, може да се прилага с добро качество на резултатите.

1.2. Изследване стабилността на пробите за определяне на мед в серум, урина и ликвор

1.2.1. Стабилност в проби серум – изследвана е стабилността на мед в кръвен серум за период от 1 и от 2 седмици при два температурни режима. Данните са представени таблично (Табл. 8). Установената значима разлика е пренебрежимо малка (под 10%) и това се доказва със сравнението на средното процентно отклонение ($d\%$) на резултатите с данни за АТЕ (Табл. 31). Резултатите за средното процентно отклонение за всички изследвания условия не надвишават критерия за приемлива грешка (7.47%) базирана на аналитичната и биологичната вариация. Средното процентно отклонение при съхраняване в хладилни условия

е по-малко в сравнение с това при стайна температура. Това дава основание да препоръчаме съхранение при хладилни условия.

Таблица 31. Стабилност на мед в проби от серум

Cu $\mu\text{mol/L}$ CT ₀	ATE%	Средно процентно отклонение (d%)			
		CT ₁		CT ₂	
		25°C	4°C	25°C	4°C
15.5	7.47	-5.8	5.2	-5.3	-1.3

ATE – Allowable Total Error (приемлива обща грешка); CT₁ – 1 седмица; CT₂ – 2 седмици

1.2.2. Стабилност в проби урина - съпоставихме стабилността при контролна група урини и при такива от пациенти, които приемат ДПА. В двата случая с течение на времето концентрацията на мед в урината намалява. При някои конкретни условия се отчетоха значими разлики, които са представени на Табл. 9 и Табл. 10. Клиничната значимост на тези разлики е оценена чрез критерия за допустимата неточност въз основа на промяната в рамките на биологичната вариация (d%) (Табл. 32). При случаи, в които средното процентно отклонение (d%) надхвърли стойността на ACL, се отчита промяна в концентрациите, при които се приема, че пробата не е с добра стабилност. В настоящото проучване не се установиха стойности на процентно отклонение на средната аритметична стойност, за различните периоди на съхранение от начално измерената в УТ₀, които да надхвърлят ACL%. Абсолютната стойност на промяната в концентрацията на медта при всички тествани условия е под 1 $\mu\text{mol/L}$.

Таблица 32. Стабилност на мед в проби от 24-часова урина при контролни пациенти и на фона на ДПА

Проби урина	Cu $\mu\text{mol/L}$ УТ ₀	ACL%	Средно процентно отклонение (d%)					
			УТ ₁		УТ ₁		УТ ₁	
			25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C
Контролни	0.50	± 17	0	-6	-4	16	-2	-10
ДПА	7,66	± 11.2	-9.2	-1.8	-8.2	-1.8	-7.8	-1.7

При всички изследвани условия, средното процентно отклонение спрямо референтните условия не се различава с повече от 10%, като то е по-малко в случаите на съхранение при хладилни условия. Това дава основание да се заключи,

че стабилността на медта в проба урина е добра при всички изследвани условия, но е по-добра при съхранение в хладилни условия и на фона на ДПА.

1.2.3. Стабилност в проби ликвор – изследвана е стабилността на мед в ликвор при -20°C . Установена е незначима разлика ($p > 0.05$) между сравняваните периоди. Средното процентно отклонение ($d\%$) спрямо референтните условия (LT_0) е 5%, а в някои случаи (след 2 и 7 дни) е 0%. Експериментът за стабилност на мед в проба от гръбначно-мозъчна течност, показва добра стабилност при тестваните условия.

2. Валидиране на метода пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия при определяне на мед в кръвен серум и урина

Атомно-абсорбционният анализ е референтен метод за определянето на микроелемента мед. Калибрационната крива на метода е представен на Фиг. 5. По отношение на аналитичната надеждност на метода, той е напълно подходящ при измерване на концентрации в серум, докато при изследване на проби урина и ликвор съществува методологичния проблем за недостатъчна чувствителност (под $0.23 \mu\text{mol/L}$). Този недостатък не влиза в съображение при изследване на уринни проби на болни от БУ и приложение на ДПА, тъй като тогава се очакват повишени стойности на уринната мед поне над $1.6 \mu\text{mol}/24 \text{ ч}$.

Възпроизводимостта на метода в серия е висока. Установените от нас CV са групирани около 2% за серумните проби и 5% за пробите урина (Табл. 13), което потвърждава високата надеждност на пламъковата ААС при определяне на мед, използвана в настоящото проучване.

Получената от нас възпроизводимост във време, изразена като вариационен коефициент е между 2-4% за серумни проби и между 7-8% за пробите урина (Табл. 14).

3. Валидиране на метода електротермична атомно-абсорбционна спектроскопия за определяне на мед в ликвор

Предимство на ET-AAS пред пламъковата AAS е по-високата чувствителност на метода. Калибрацията е направена по метода на стандартната добавка. Установи се добра линейност на кривата ($R^2 = 0.999$) с линеен обхват 0.04-0.48 $\mu\text{mol/L}$, който отговаря на очакваната концентрацията на мед в ликвор в клинично здрави лица.

Възпроизводимостта на метода е висока. Установената вариация в серия е $CV\% = 4.83$, а във време – 6.01%. Изследванията проведени с ET-AAS за определяне на мед в ликвор са с добра невъзпроизводимост и достоверност. Установеният от нас Recovery % показва приемлив размер на пропорционалната системна грешка (101.2-109.8%).

4. Определяне границите на референтната област на мед в кръвен серум на репрезентативна група лица от българската популация

За последен път дефиниране на референтни граници за серумна мед при българи е направено през 1987 г.

Референтната група индивиди е подбрана според препоръките на Международната федерация по клинична лаборатория (IFCC). Методът за определяне на мед в кръвен серум е валидиран. Използван е непараметричен персентилен метод.

Анализът на получените в настоящото проучване стойности за Gs и Gk показва, че както в общата група, така и в групите по пол, разпределението на резултатите за серумната мед е с $G_s > 0$, т.е. касае се за лява, положителна асиметрия. При разпределенията с лява асиметрия разграничаването на ниски стойности, т.е. на недоимъчни състояния, става по-лесно. Подобно на нашето проучване данните за разпределението на резултатите за серумна мед при здрави българи са данните от изследването на Цачев К. от 1987г.

Установените от настоящото проучване референтни граници за серумна мед са: мъже 9.9-19.95 $\mu\text{mol/L}$ и жени 11.06-24.9 $\mu\text{mol/L}$.

Наличието на референтните стойности в близък обхват съобщени от различни автори показва, че количественото определяне на мед в кръвен серум се определя с висока аналитична надеждност.

Приемът на мед в организма става най-вече с храната и водата. Проведеното от нас проучване показва, че при 363 (95.8%) от изследваните лица от българската популация попадат в референтната област за серумна мед. Много малък е процентът на хората, които показват стойности на медта под ДРГ – 1.8%. На това основание може да се приеме, че в нашата страна приемът на мед чрез храната е адекватен.

5. Фактори на вариация на мед в кръвта

5.1. Влияние на пола - нашите данни за серумна мед показват значимо по-високи средни концентрации при жените ($17.0 \pm 3.4 \mu\text{mol/L}$), отколкото при мъжете ($14.88 \pm 2.8 \mu\text{mol/L}$).

5.2. Влияние на възрастта - изследването установи нарастване на серумната мед с възрастта със статистическа значимост между отделните декади ($p = 0.003$). Тази тенденция се установи и при двата пола, като е по-изразена при жените. Кривата от средните аритметични показва най-висока концентрация на серумна мед ($17.33 \pm 3.06 \mu\text{mol/L}$) със статистическа значимост ($p < 0.05$) във възрастовата група 61-70 години. При анализиране на данните за серумна мед при равен брой включени лица и от двата пола на възраст 40-65 г. и > 65 г., значимо ($p < 0.001$) по-високи нива на мед, се отчетоха при по-възрастните хора (Табл. 24). Този резултат представлява интерес във връзка със случаите на спорадична форма на БА с проявен полиморфизъм на АТР7В генът, при които генетично е детерминирана дисхомеостаза на медта в посока натрупване, като повишението е за сметка на свободната фракция на медта. Изясняването на ролята на медта за риска от развитие на някои невродегенеративните заболявания би имало практически клинично приложение като лесно приложима профилактика чрез прилагане на бедна на мед диета.

5.3. Влияние на географското положение - настоящото проучване е първото за България, в което е характеризирано разпределението на серумната мед в различни населени места от страната. Анализът на данните показва наличие на статистически значима разлика между отделните региони ($p < 0.001$). Установи се значимо по-висока серумна мед в лицата от градовете разположени в близост до реки (Пазарджик и Русе) и значимо по-ниски концентрации на мед в серума на индивиди от райони в близост до планина (София). Резултатите са представени на Табл. 25 и Фиг. 9.

Обяснението за тези различия могат да бъдат влиянието на редица фактори от околната среда като състав на почвите и водите, месна промишленост и замърсяване на околната среда, начин на живот и вид на диетата, надморска височина и др. Вариацията на нивата на серумната мед е мултифакторна и зависи включително и от аналитичната вариация. С цел да се намали ефекта на вариацията при измерването на отделните серии от проби, то всички резултати са статистически стандартизирани.

6. Показатели за характеризиране на медния статус

Характеризирането на медния статус в организма означава възможност за измерване на показатели, свързани с медната обмяна. Това е широко понятие, в което влиза както общата мед в кръвта, така и измерването на различни функционални форми на медта в процеса на нейния метаболизъм и разпределение в организма. В този смисъл, познавайки физиологията на елемента, е логично към общата характеристика на медния статус да бъдат включени и протеини/молекули обвързани с транспорта, съхранението и регулацията на медта. Могат да бъдат изследвани различни молекули и гени свързани с метаболизма на медта – АТР7В, АТР7А, мРНК на АТР7А, определяне с PCR методи на мРНК на IL-2, бластогенна активност на левкоцитите, генна експресия на медни металoenзими и др. Това съображение заедно с методичните възможности за прецизно

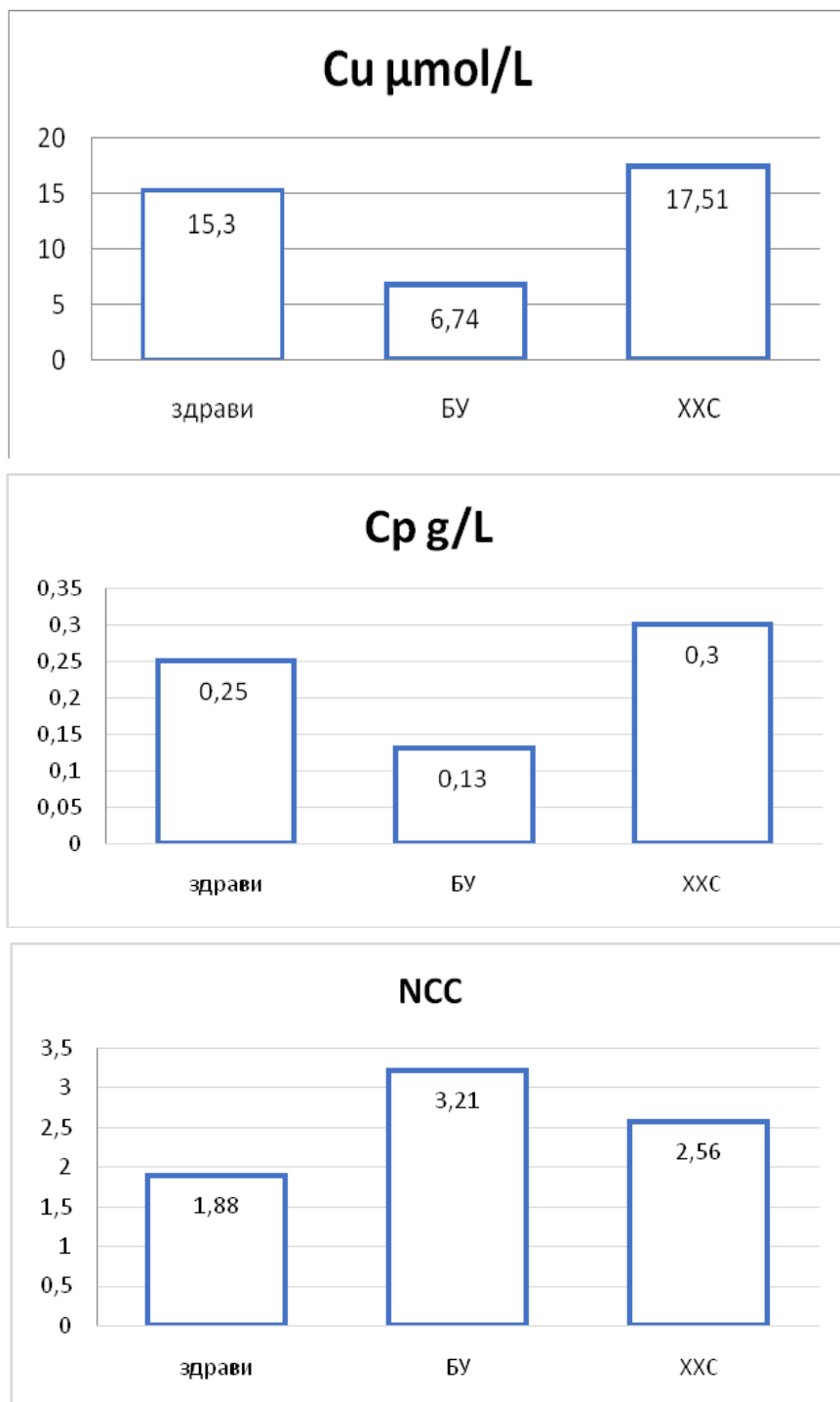
количествено определяне, което лесно и рутинно да се прилага в практиката, са двата важни пункта в съвременната лабораторна практика при характеризиране на медния статус.

Определянето на серумната мед е базисното изследване, което обаче не е достатъчно информативно за локалното разпределение на мед в организма, и се оказва, че не е достатъчно чувствителен маркер при заболявания свързани с дисхомеостаза на медта. Многото фактори, от които зависи статуса на медта в организма заедно със значението на медта в патогенезата на редица заболявания, изясняват необходимостта от комплексна оценка и от панел от маркери за тази цел.

В по-голямата си част (70-95%) медта се намира в комплекс с церулоплазмина, което е от съществено значение за обмяната на желязото, а също така и за антиоксидантната функция на системата церулоплазмин – трансферин (Ср-Tf). За функционалната активност на церулоплазмина е необходима мед в структурата му, а това означава, че изследването на активността на церулоплазмина като ензим (eCp) може да хвърли светлина върху молното съотношение елемент-белтък в структурата на церулоплазмина. Така, обобщени данни за количеството на общата серумна мед и церулоплазмина, за активността на церулоплазмина и за количеството на „свободната“ мед, биха могли да се използват като надежден панел при характеризиране на медния статус на организма. Данни от изследването на тези показатели за клинично здрави лица от българската популация са представени на Табл. 29. и Фиг. 10.

Липсата на стандартизиране на измерването на концентрацията на церулоплазмин прави на практика несравними резултатите между отделни лаборатории, а проблем е и липсата на добра специфичност на имунологичните методи за разпознаване на холо- от апоформата на церулоплазмина. Пресмятането на “свободната” фракция на мед по формулата на Wolshe често дава негативни резултати, които трудно се интерпретират и затова може да се използва, особено при състояния на дефицит на мед, отношението серумна мед/концентрация на

церулоплазмина (Cu:Ср). Това става по следната формула: [серумна мед $\mu\text{mol/L}$] $\times 0.132$ / [церулоплазмин g/L].



Фигура 10. Сравнително представяне на серумна концентрация на мед (Cu $\mu\text{mol/L}$), концентрация на церулоплазмин g/L и количество „свободна“ мед (NCC) при контролна група пациенти (зdrави), болни с БУ и лица с ХХС

Отношението Cu:Ср зависи от броя атоми мед, които са свързани с една молекула церулоплазмин. Като се изхожда от твърдението, че една молекула церулоплазмин съдържа 6-8 атома мед, то стойности на отношението Cu:Ср около този обхват могат да се приемат като физиологично обосновани. Тъй като пресмятането на съотношението има същите методични недостатъци, присъщи за изследването на церулоплазмин, то е трудно да се избере единна стойност, която да служи като отграничаваща между състоянията на запазена хомеостаза и на дисхомеостаза на медта в организма.

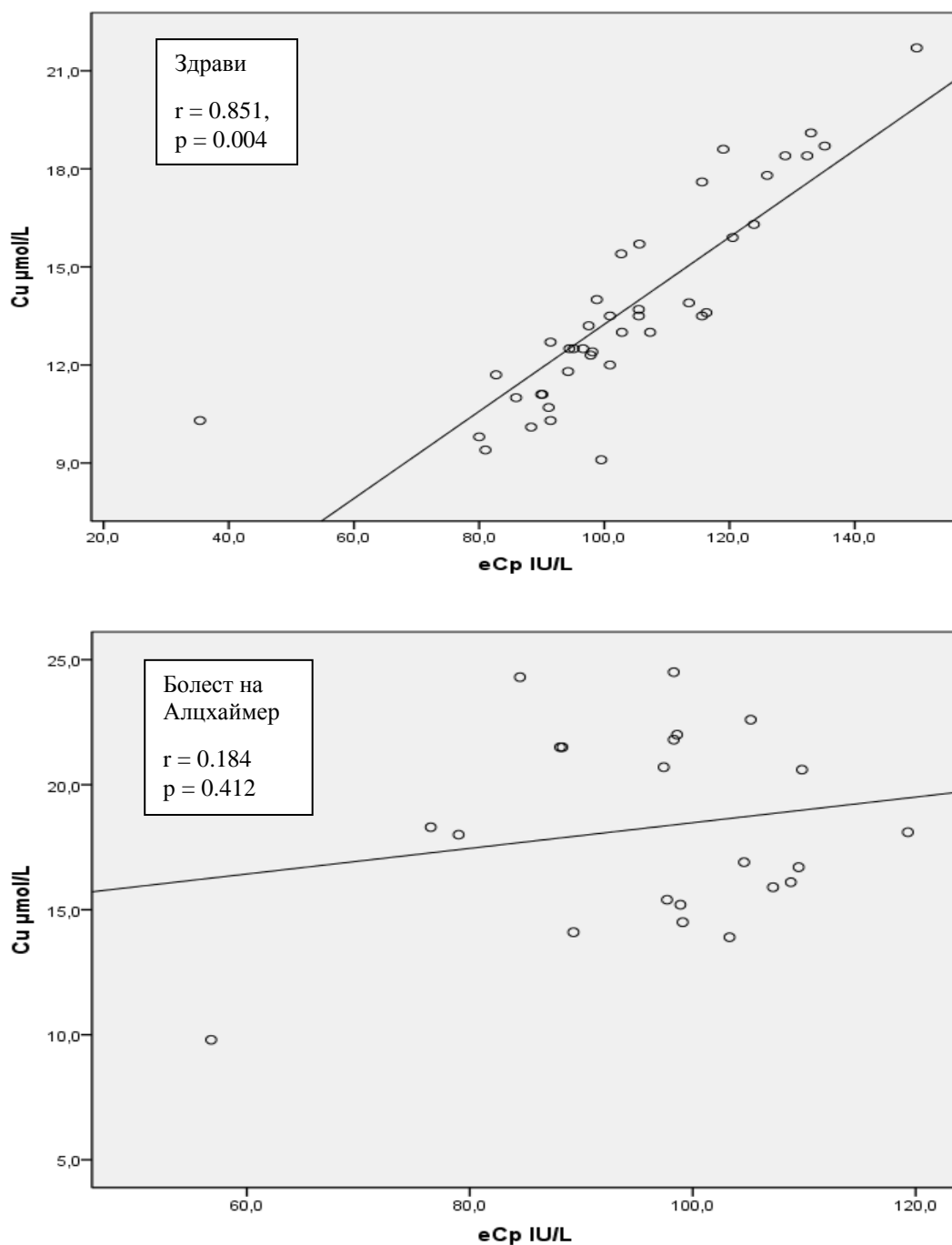
Препоръчва се всяка лаборатория да определи собствени референтни граници за серумна концентрация на церулоплазмин, което също важи и за „cut off” стойността на Cu:Ср отношението. Според данните от проведеното проучване (Табл. 28), Cu:Ср за изследваната група е 6.46 ± 0.75 . Тази стойност е близка до цитирани в литературата – 6-8 и има своето физиологично обяснение.

Съдържанието на мед в структурата на церулоплазмина се измерва най-добре чрез измерване на оксидазната активност на церулоплазмина, поради недостатъците на имунологичните методи, които вече бяха споменати. Измерената активност при изследваните лица от българската популация е 103.4 ± 20.4 IU/L, което съвпада с данни от литературата за стойностите при клинично здрави лица – 60-140 U/L.

По данните, представени на Фиг. 10 е видно, че при хора без съмнение за нарушения в хомеостазата на медта се наблюдава нормална оксидазна активност на церулоплазмина, при което нивото на свободния пул на медта (NCC) е кореспондиращо ниско – под $1.6 \mu\text{mol/L}$ [разграничаващата стойност за „свободна“ мед при диагноза на БУ]. При същата популация отношението Cu:Ср е 6.46, което потвърждава физиологичните нива на медта в свързана и “свободна” форма.

Ползата от клиничното приложение на оксидазната активност на церулоплазмина се доказва от установената висока степен на корелация е между eСр и iСр ($r = 0.832$, $p = 0.002$) от една страна, и от друга – между eСр и серумните нива на мед при здрави ($r = 0.851$, $p = 0.004$) (Фиг. 11). В подкрепа на установената в настоящо-

то проучване корелационна зависимост при здрави, са данните на Merle U et al., 2009, където коефициентът на корелация между концентрацията и ензимната активност на церулоплазмина е $r = 0.94$. Същият колектив доказва по-ниска корелационна зависимост между двата показателя ($r = 0.70$) при пациенти с БУ.

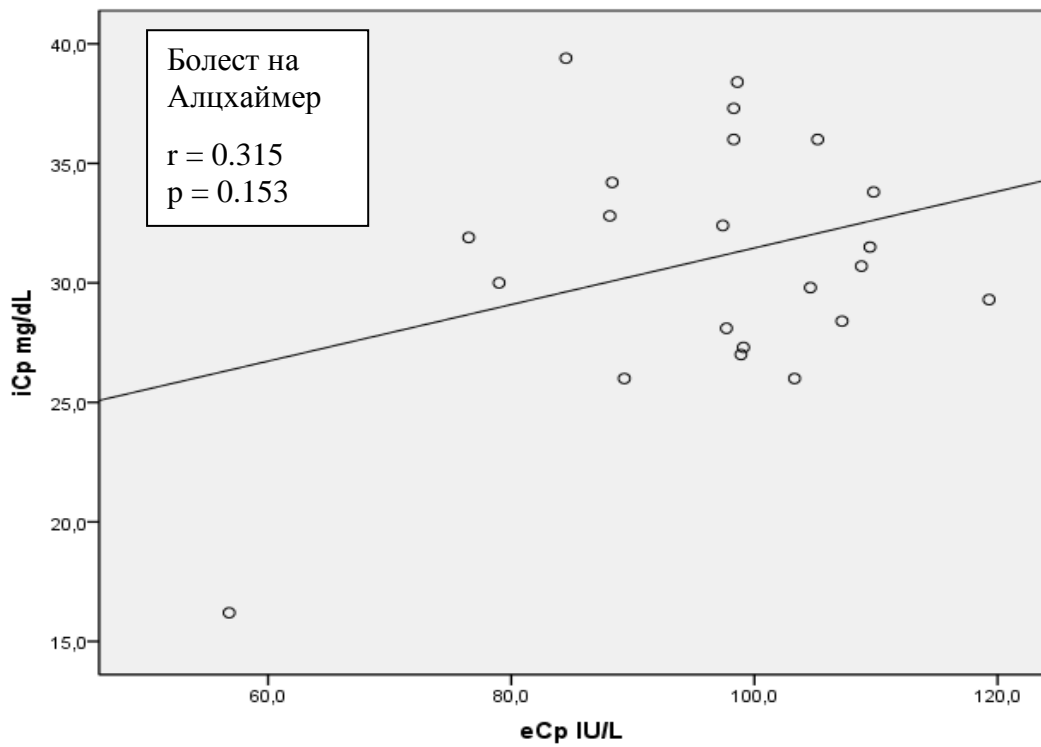
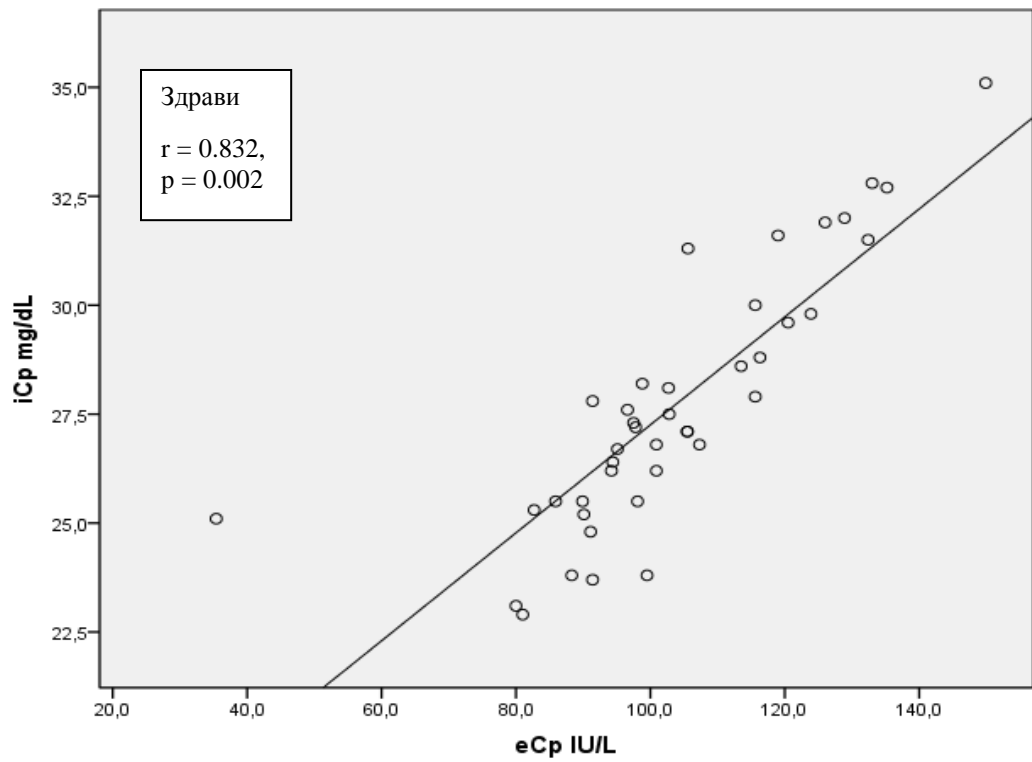


Фигура 11. Корелационна зависимост между концентрация на серумна мед и оксидазна активност на Ср при здрави и пациенти с болест на Алцхаймер

В нашето проучване при пациентите с късна форма на БА, при които се предполага наличие на дисбаланс в медната хомеостаза, за което стратифициращ показател е повишената фракция на „свободната“ мед ($NCC > 1.6 \mu\text{mol/L}$), тези корелационни зависимости са по-слаби в сравнение със здрави и са както следва: между $e\text{Ср}$ и $i\text{Ср}$ ($r = 0.315$, $p = 0.15$) и между $e\text{Ср}$ и серумните нива на мед ($r = 0.181$, $p = 0.41$). Данните са представени графично – Фиг. 11 и Фиг. 12.

Установените корелационни зависимости показват, че само измерването на серумните нива на медта при пациенти, при които се очаква нарушена медна обмяна може да бъде подвеждащо. Измерването на оксидазната активност на церулоплазмина дава яснота при клиничното тълкуване на резултатите за серумна мед и някои автори дори предлагат $e\text{Ср}$ да се използва като дискриминативен биохимичен, неинвазивен тест за диагноза при състояния с меден дисбаланс като БУ.

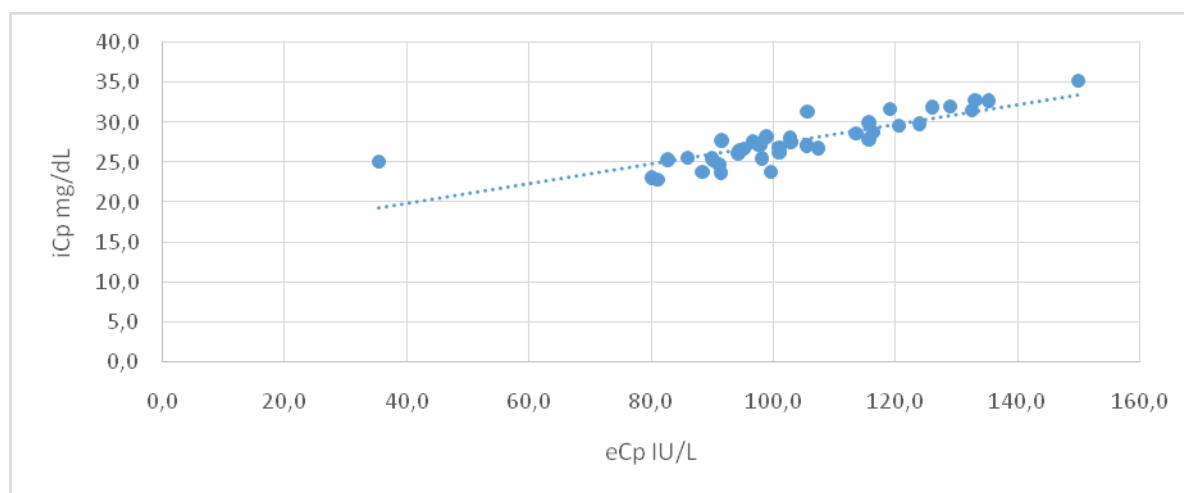
При клинично здрави лица с нарастване на концентрацията на церулоплазмина, нараства и оксидазната му активност, което е в съгласие със серумните нива на мед (Фиг. 13 – 2), които следват същата зависимост.



Фигура 12. Корелационна зависимост между концентрация на и оксидазна активност на Ср при здрави и пациенти с болест на Алцхаймер

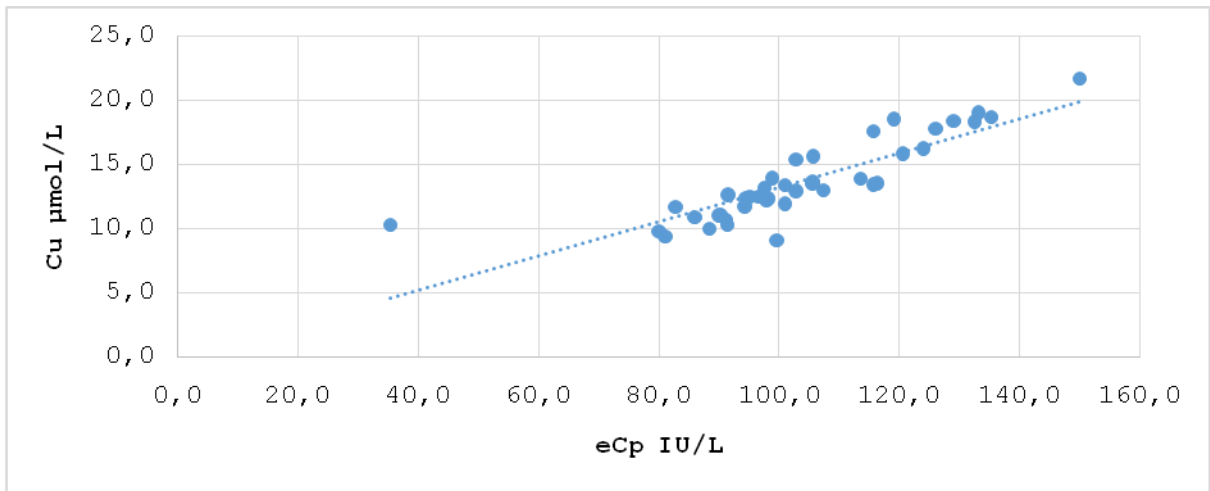
Характеризирането на медния статус с панел от няколко изследвания е поинформативно, но са необходими следващи проучвания, които да включат и състояния с нарушена медна хомеостаза.

Сравнени са стойностите за активност на церулоплазмина (eCp) на изследваната българската популация (n = 41) с тези на италианската популация (n = 23) са без статистическа разлика (p > 0.05) (Фиг. 14, Фиг. 15). В проведеното проучване това сходство бе доказано и за останалите показатели на меден статус: Cu, iCp и eCp/iCp. Данни от литературата подкрепят установената близост на средните стойности за мед в кръвта между българи и италианци. Този факт е интересен поради това, че става въпрос за две популации, които са географски изолирани една от друга и се намират под действието на различни фактори от околната среда, което предполага и разлики в медния статус. Но наред с това е известен научен факт, че българите се характеризират с най-малки генетични разстояния с румънци, италианци и македонци (Наумова Е., 2006). Може да се направи заключението, че факторите, които въздействат върху медното съдържание и разпределение в организма са комплексни: от външната среда и генетичната предиспозиция.



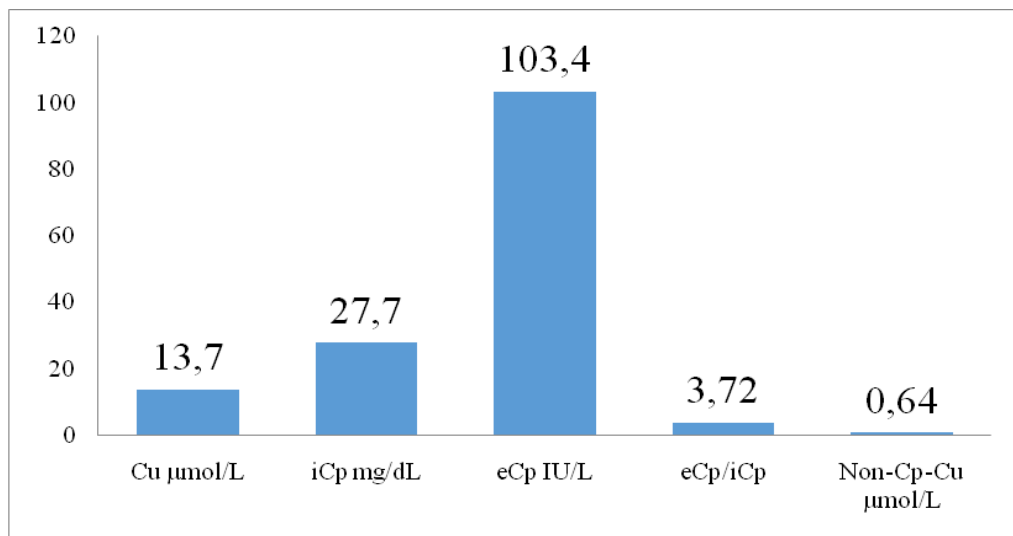
1)

Фигура 13. 1) Корелационна зависимост между ензимната активност на церулоплазмина (eCp IU/L) и неговата концентрация (iCp mg/dL) в серума на здрави пациенти

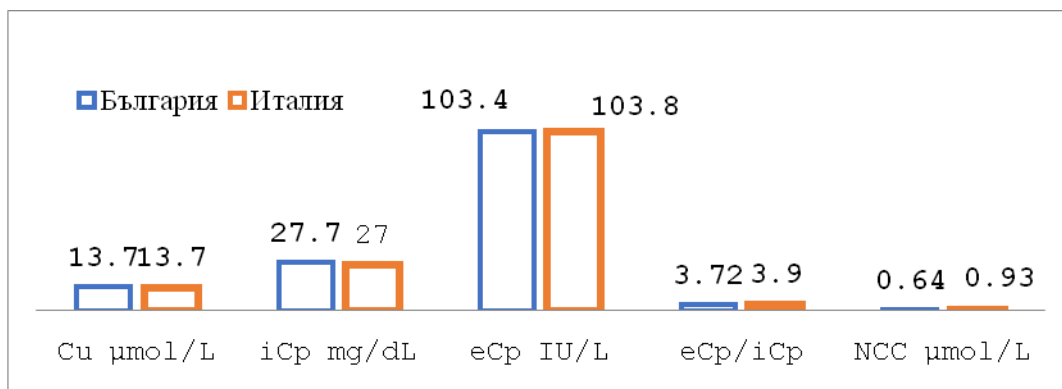


2)

Фигура 13. 2) Корелационна зависимост между ензимната активност на церулоплазмина и серумните нива на мед при клинично здрави лица



Фигура 14. Средни стойности за серумна мед ($\text{Cu } \mu\text{mol/L}$), концентрация и активност на церулоплазмин (iCp mg/dL и eCp IU/L), специфична активност (eCp/iCp IU/L) и „свободна“ мед ($\text{Non-Cp-Cu } \mu\text{mol/L}$) при клинично здрави лица от българската популация



Фигура 15. Сравнителен анализ на меден статус между българска (n = 41) и италианска (n = 23) популации, здрави контроли

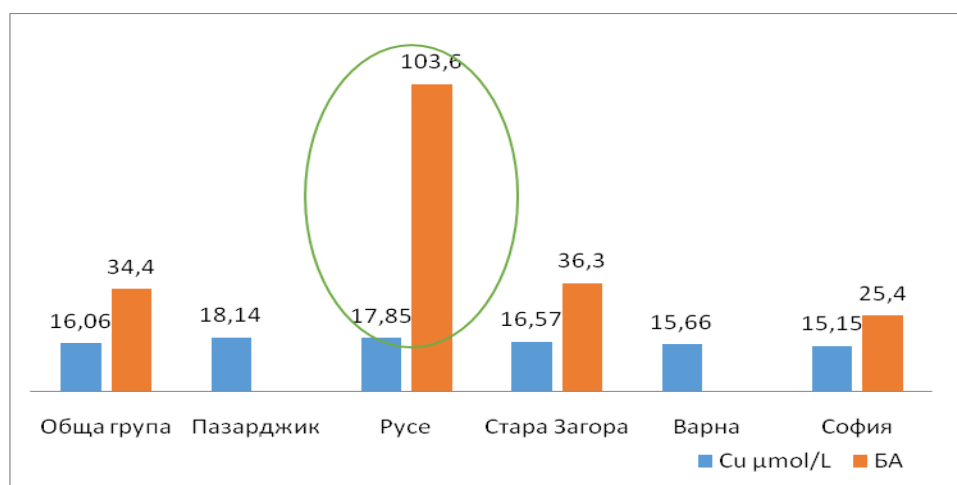
През последните години нараства броят на публикациите, свързани със значението на медния статус за невродегенеративни състояния като БА, БП и множествена склероза.

По данни от литературата при пациенти с БА не се установява промяна в концентрацията на церулоплазмина, а е установена значимо по-ниска оксидазна активност спрямо контролни пациенти. В унисон с това твърдение, най-често в литературата се съобщава за слабо, но чувствително повишение на „свободната“ мед в серум и ликвор при пациенти с БА.

Предполага се, че нивата на „свободна“ мед могат да послужат като прогностичен маркер в оценката на риска от развитие на късната форма на БА. Предполага се за съществуването на генетични варианти (при спорадичните форми на заболяването) в синтеза на церулоплазмин или за нарушено инкорпориране на медните йони в структурата на белтъка, поради които функционалната годност на церулоплазмина е понижена. В амилоидните плаки е налице концентриране на олигоеlementи (мед, цинк, желязо), а в нервната тъкан се развива състояние на меден дефицит. Поради това функцията на редица мед-зависими ензими в нервната тъкан намалява и това се приема от някои автори като есенциален момент от патогенезата на невродегенеративните заболявания.

7. Анализ на разпределението на нивата за серумна мед по региони и честота на БА по данни на Национален Център за опазване на общественото здраве (НЦОЗА) и Национална здравноосигурителна каса (НЗОК)

Данни за честотата на болните с деменция (код по МКБ 10 F00 – F003), които са под наблюдение за периода 2005-2013г. получихме от НЦОЗА, София. А данни за броя хоспитализирани с деменция (код по МКБ 10 F00 – F003) за периода 2010-2015 (юни) бяха предоставени от НЗОК.



Фигура 16. Сравнение на измерената концентрация на серумна мед и случаите с БА, които са под наблюдение, за периода 2005-2013 г. в България по области. Данните са предоставени от НЦОЗА

Според данни на НЦОЗА, там където са измерени най-високи нива на серумна мед в населените места е има най-голям брой болните с БА, които са под наблюдение (Фиг. 16). Същевременно в местата с най-ниска серумна мед (София) има най-малко болни с БА под наблюдение (25.4 души на 100 000 население).

Според данните на НЗОК (Табл. 33) за отчетения брой хоспитализирани пациенти с диагноза Деменция при болест на Алцхаймер (F00.0, F00.1, F00.2 и F00.9) в България разпределението на честотата по код от МКБ 10 изглежда както следва: най-много (1610) са случаите с диагноза Деменция при болестта на Алцхаймер с късно начало (F00.1), следвани от деменция при болестта на

Алцхаймер с ранно начало (F00.0) – 610; Деменция при болестта на Алцхаймер, неуточнена (F00.9) – 310 и Деменция при болестта на Алцхаймер, атипична или от смесен тип (F00.2) – 182.

Таблица 33. Честота на хоспитализирани пациенти с диагноза Деменция при болест на Алцхаймер (F00.0, F00.1, F00.2 и F00.9)

Диагноза – МКБ код	2010-2015 г.	Средно за 1 месец
F00.0	610	11.5
F00.1	1610	30.37
F00.2	182	3.43
F00.9	310	5.84
Общо	2712	51.16

Един от основните рискови фактори за развитие на БА е възрастта. С оглед на това да се избегнат погрешни заключения за целите на проучването са използвани актуални публикувани данни на НСИ за структурата на населението в България. Към 01.02.2011 г. населението на България възлиза на 7 364 570 души, от които 51.3% жени и 48.7% мъже. Гъстотата и възрастовото разпределение на населението по градове е представено на Табл. 34.

Таблица 34. Възрастово разпределение на населението в % в България по данни на НСИ от 2011 г.

Възрастова група	0-14 г.	15-64 г.	≥65 г.в.	Общо брой население
Населено място:				
София	12.3	72.1	15.6	1 202 761
Варна	14.2	69.8	16.0	334 870
Русе	112.0	67.7	20.3	149 642
Пазарджик	14.4	68.0	17.6	71 979
Раднево	13.6	66.9	19.5	138 272
България	13.2	68.3	18.5	7 364 570

Въз основа на данните от Табл. 25 и Табл. 34 може да се направи извода, че в населените места с най-висок процент на население над 65 г.в. (Русе, Пазарджик и Раднево) са измерени най-високи средни концентрации на серумната мед и обратно – в София, където процентът на хората над 65 г.в. е най-нисък са измерени най-ниски серумни нива на медта.

Данните от НЗОК за броя хоспитализации на пациенти с БА на 100 000 души население потвърждават данните от НЦОЗА (Табл. 35). В районите със застаряващо население броят на хоспитализираните лица с диагноза Деменция при болест на Алцхаймер е най-висок. Прави впечатление, че най-високата честота на хоспитализирани с БА (област Ст. Загора) е с нива на серумната мед близки до тези на общата популация. При интерпретиране на резултатите в контекста на хипотезата за ролята на медта при някои невродегенеративни заболявания би следвало да се подхожда с внимание и при отчитане на възрастовата характеристика на изследваната популация. Предполага се, че не се наблюдават изменения в медната хомеостаза на системно ниво, а по-скоро става въпрос за локални промени в разпределението на микроелементите в нервната тъкан.

Чрез стандартизиране на данните са изведени теоретичните стойности за броя хоспитализирани с БА, който е очакван, ако възрастовата структура на изследваните населени места съвпада със стандартната. Наблюдаваният брой хоспитализации (*) съвпада с честотата на теоретично очаквания брой (**), който не зависи от вида на структурата на населението.

Таблица 35. Сравнение на концентрациите на серумна мед и честотата на случаите с БА, които са под наблюдение за периода 2010-2015 г. в България по области. Данните са предоставени от НЗОК

	София	Русе	Пазарджик	Ст. Загора	Варна	Общо
Cu $\mu\text{mol/L}$						
	15.17	17.85	18.14	16.61	15.66	16.09
Брой хоспитализации						
	524	105	33	166	240	2 712
Брой население						
	1 202 761	149 642	71 979	138 272	334 870	7364570
*Наблюдаван брой хоспитализации на 100 000 души						
	43.57	70.17	45.85	120.05	71.67	36.82
**Теоретичен брой хоспитализации на 100 000 души						
	29.74	47.86	32.03	82.49	50.78	-
Дял на населението ≥ 65 год. в %						
	15.6	20.3	17.6	19.5	16	18.5
Брой хоспитализации на 100 000 души при > 65 г.в.						
	6.79	14.24	8.07	23.41	11.47	6.814

Фактори от външната среда като повишено съдържание на мед в почвите и водите може да увеличат вероятността за проява на БА. Brewer GJ. установява правопрпорционална връзка между епидемиологията на БА и употребата на медни ВиК инсталации. Усилията в търсенето на връзка между фактори от околната среда и честота на заболяването са възможностите за превенция и терапия на късна форма на БА чрез прилагане на диета и медикаменти понижаващи медта в организма. Таргетната група в този случай са пациенти със спорадична форма на БА, при които има генетична предиспозиция за медна дисхомеостаза. Според водещи италиански автори около 60% от пациентите с БА с късно начало са с доказано нарушение в медната обмяна.

8. Меден статус при различни клинични състояния – БУ, ХХС и БА

БУ е наследствено заболяване, което може да дебютира във всяка възраст. Без лечение, състоянието има фатален край. Изследването на медния статус е важно, както за диагностиката, така и за проследяване на ефекта от провежданото лечение. Резултатите от лабораторните изследвания на изследваните от нас пациенти са представени на Табл. 27 и Фиг. 10. Клиничната група се характеризира с понижени нива на серумна мед ($6.74 \text{ Cu } \mu\text{mol/L}$) и церулоплазмин (0.12 g/L), а повишени на „свободна“ мед ($3.21 \mu\text{mol/L}$) и куприуреа $10.95 \pm 7.08 \mu\text{mol/L}$. Въпреки понижената серумна мед БУ е заболяване с натрупване на мед. Ниски концентрации на мед и церулоплазмин могат да се установят, както при БУ, така и при дефицит на мед. И двете състояния не се срещат често. Представената в това проучване група от пациенти с БУ включва индивиди с дълготрашна терапия с хелираци медикаменти. Според водещи ръководства за диагностика и терапия на БУ е възможно нивата на серумната мед да са в рамките на нормата, та дори и повишени, което всъщност се дължи на повишението на свободната фракция на медта.

На повишени нива на „свободна“ мед се основава и предположението за съществуването на специфична форма на БА свързана с медна дисфункция. Съвременни мета-анализи демонстрират, че нивата на медта в церебро-спиналната течност не се различават значимо между контроли и пациенти с БА, но има статисти-

чески значима разлика в серумните нива, като по-висока мед е отчетена при БА. В тези случаи е водещо значението на нивата на несвързаната церулоплазмина мед. На фона на понижена тотална мед в мозъка са индикирани повишени нива на свободната фракция. Основната концепция в металохипотезата при невродегенеративните заболявания е значението на „свободната” мед за наличието на системни нарушения в медния метаболизъм с локален ефект върху мозъка.

БУ е добре известно заболяване с идентифицирана генетична етиология и се използва като модел за ефекта на медната дисхомеостаза в организма. Това, което обединява и двете заболявания, БУ и БА, е повишението на несвързаната с церулоплазмина мед в организма. Нещо повече, АТР7В генът, мутациите на който водят до БУ, се оказва във връзка и с повишен риск за развитие на БА по смисъла на идентифицирани loss-of-function варианти при пациенти с БА.

Всяко повишение на свободната фракция се свързва с токсични прояви на медта. Squitti R et al, 2006, съобщава за обратнопропорционалната зависимост между нивата на „свободната” мед и когнитивните способности, а също и за предиктивната роля на концентрацията на НСС за когнитивния спад с времето. Спекулативно е да се твърди, че БА е сенилна форма на БУ, но е вярно, че двете заболявания споделят общи патогенетични механизми.

Централно място в метаболизма на медта заема черният дроб. В него се синтезира основния белтък свързан с обмяната на медта – церулоплазмина. Съществуват различни състояния, при които количеството или функционалната активност на церулоплазмина могат да бъдат нарушени и това да доведе до меден дисбаланс. Тъй като активната форма на медта и тази, която преминава през биологичните мембрани е свободната мед (5-30%), то познаването на двете фракции на медта е от съществено значение.

В настоящото проучване освен генетично детерминираното увреждане на медната хомеостаза БУ е представена клинична група от лица с ХХС. Идеята е да се представи група, при която първичното увреждане е в черния дроб и има повишение на концентрацията на церулоплазмина като острофазов белтък. Резултатите от изследванията са представени на Табл. 27, Табл. 29 и Фиг. 10.

Изследвани са 27 пациенти с ХХС (м:ж = 14:13) на средна възраст 51 ± 10 г. без данни за анемия, със запазена функция на бъбреците и протеиносинтеза. Няма данни за хипербилирубинемия, което е важно при обсъждане на медния статус, тъй като билиярния път на екскреция е основен при отвеждането на мед от организма. Повишени са нивата на чернодробните ензими AsAT и AlAT. В сравнение със здравата група и тази с БУ (Табл. 27) групата с ХХС се различава по наличието на повишени чернодробни ензими и налична вирусна репликация.

Протеиновата синтеза и при трите групи е в рамките на нормата, като при групата на пациентите с БУ е проследена и степента на протеиновата загуба чрез урината, което се препоръчва да се прави в порядъка на поне 6 месеца, тъй като пациентите са лекувани с ДПА. Лечението с ДПА е свързано с широк спектър от странични ефекти, които могат да бъдат с ранна или късна проява. Сред най-тежките странични ефекти на терапията с ДПА са синдромът на Goodpasture, Системен лупус еритематодес и нефрозен синдром, които ако се проявят налагат прекратяване на лечението с ДПА. Нефротоксичността на препарата се проявява обикновено първо с протеинурия, като състоянието може да прогресира до нефрозен синдром като късно усложнение. Албуминът, алфа 2 макроглобулин и други по-малки молекули са носители на несвързаната с церулоплазмина мед, която при норма може да бъде и до 30% от тоталната мед в организма.

Оксидазната активност на церулоплазмина е в пряка връзка с медното съдържание на молекулата. Проучването на оксидазната активност на церулоплазмина в контролна група пациенти от българската популация показва резултати в синхрон с цитирани в литературата (Табл. 28), като резултатите косвено могат да бъдат проверени чрез познаването на физиологичната зависимост за броя места за свързване на медните атоми в молекулата на церулоплазмина – 6-8 атома мед. Последното е видно чрез резултата за съотношението Cu:Cr (Табл. 28), който за изследваната група е 6.46, т.е. между 6 и 8 атома за молекула.

При дискутираните в нашето проучване групи (зdravi, БУ и ХХС) най-често негативни резултати за НСС са получени за групата с ниски серумни нива на мед (пациенти с БУ), което е упоменато и в литературата (Twomey PJ et al,

2009). В групата със здрави пациенти само два от резултатите са с отрицателен знак. Използването на ензимна активност на церулоплазмина и съотношенията $e\text{Cp}/i\text{Cp}$ и $\text{Cu}:\text{Cp}$, са начини да се представи медения баланс чрез избягване на негативните резултати, които обичайно се получават при пресмятане на „свободната“ мед по формулата на Walshe.

Адекватното установяване на медния статус както в здраве, така и при различни нозологични единици, се оказва щекотлив въпрос, като слабите места са свързани както с методични проблеми, така и с чисто физиологичните обстоятелства за поведението на медните йони в организма и при взаимодействието им с редица протеини и молекули, които все още не са напълно проучени. Към настоящия момент медния статус се използва при диагноза и мониториране терапията на редкия генетичен дефект БУ, но все по-уверено придобива значение за диагностиката и превенцията на заболявания с епидемиологичен характер като разнообразната група от невродегенеративни заболявания. Обсъждат се възможностите за изследване на купроензими в диагностичния план при БА: изследване на SOD, хефастин или на други свързани молекули – APP. В ход са клинични проучвания за ролята на диетата с храни бедни на мед и желязо при превенцията и лечението на някои форми на БА.

VII. ИЗВОДИ

1. При определянето на мед в серум вземането на кръв в епруветки с гел сепаратор гарантира удобства и липса на контаминация, а при определяне на мед в урина на същите условия отговарят съдовете от полиетилен и полипропилен. Стабилността на мед в серумни проби е валидирана за 14 дни и е по-добра при 2-8 °C в сравнение със съхранение на стайна температура.

2. Валидирането на методите за определяне на мед с пламъкова и безпламъкова ААС показва висока аналитична надеждност за серум, урина и ликвор: при всички случаи недостоверността и невъзпроизводимостта остават в рамките под 10%.

3. Определени са съвременни референтни граници за серумна мед в българската популация и е установена статистически значимата им вариация в зависимост от пола, възрастта и географското положение.

4. При изследваната референтна група е установена високостепенна положителна корелация между активността и концентрацията на церулоплазмина, както и между активността на церулоплазмина и серумната концентрация на медта, което е важна платформа при оценка на състояния с нарушена медна хомеостаза.

5. Сравнителният анализ на медния статус при пациенти с генетично нарушена медна хомеостаза, здрави контроли и пациенти с хронични заболявания – хепатит С и болест на Алцхаймер, показва тенденция за увеличаване на концентрацията на медта в серума, паралелно увеличаване на концентрацията на церулоплазмина, но в рамките на референтния интервал. Реципрочното намаляване на активността на церулоплазмина интерпретирано в съчетание с посочената тенденция е индиректен показател за клинично значимо високи нива на свободната мед, която е в основата на патобиохимичната болестна прогресия.

VIII. ПРИНОСИ

1. Стандартизирани са условията на преданалитичния етап при изследването на мед в различни биологични матрици. Валидирани са методите за количествено определяне на мед чрез пламъкова ААС, на метода за количествено определяне на мед чрез ЕТ – ААС и е верифициран имунотурбидиметричен метод за определяне на церулоплазмин в серум.

2. За първи път в страната е проучена зависимостта на серумната мед при здрави индивиди в зависимост от географското разположение, тютюнопушене, употреба на алкохол и физическа активност.

3. За първи път при клинично здрави лица от българската популация са представени данни за характеризирани на медния статус с оксидазна и специфична активност на церулоплазмина и отношението мед/церулоплазмин.

4. Направена е съпоставка между референтните граници за серумна мед от 1987г. и 2015г. при клинично здрави лица от българската популация и е доказана необходимостта от тяхната актуализация.

5. Направена е съпоставка между измерените нивата на серумна мед по региони с броя хоспитализирани лица с болест на Алцхаймер в България и е установена правопрпорционална зависимост между тях.

6. За първи път в страната е характеризирано клиничното значение на оксидазната активност на церулоплазмина при характеризирани на медния статус при здрави и при пациенти с нарушена медна хомеостаза.

IX. Публикации във връзка с дисертационния труд

- 1) **И. Иванова**, Б. Атанасова, К. Цачев. Мед: физиологично и клинично значение. Български Медицински Журнал 2014; VIII (2); 13 – 9.
- 2) A.Kostadinova, M. Mihaylov, **I. Ivanova**, R. Robeva. Nephrotic syndrome after treatment with D-penicillamine in a patient with Wilson’s disease. Revista Romana de Medicina de laborator 2014; 22 (2): 181 – 9. IF 2014 (0.239)
- 3) **I. Ivanova**, B. Atanasova, M. Petrova, S. Dragneva, L. Vladimirova, Z. Krastev, A. Kostadinova, A. Ivanova, K. Tzatchev. Serum and urine copper – contamination and stability. Acta Medica Bulgarica 2015; XLII (2); 49 – 60.

X. Научни прояви във връзка с дисертационния труд

- 1) **И. Иванова**, Б. Атанасова, Я. Бочева, К. Цачев. Доклад на тема „Медта в здраве и болест“. Сборник с резюмета IX Национална конференция по Клинична лаборатория 2015; 25-6.
- 2) **I. Ivanova**, B. Atanasova, I. Valkov, A. Ilieva, K. Tzatchev. Serum copper and zinc in patients with chronic hepatitis C. Clin Chem Lab Med 2015; (53): Special Suppl S1235.
- 3) **I. Ivanova**, B. Atanasova, A. Ilieva, K. Tzatchev. Study of copper stability in 24-hour urine by flame atomic absorption. Clin Chem Lab Med 2015; (53): Special Suppl S 736.
- 4) **И. Иванова**, Б. Атанасова, К. Цачев. Доклад на тема „ Мед – физиологично и клинично значение, настоящи аспекти и бъдещи перспективи“. Сборник с резюмета VIII Национална конференция по клинична лаборатория 2014, 24-5.
- 5) **I. Ivanova**, B. Atanasova, A. Ilieva, K. Tzatchev. Serum copper and zinc concentrations in healthy individuals of Bulgarian population. Clin Chem Lab Med 2014; (52): Special Suppl S1707.
- 6) A. Kostadinova, M. Jordanov, **I. Ivanova**, R. Robeva. Nephrotic syndrome after treatment with D-penicillamine. Revista Romana de Medicina de laborator 2013; 21 (2/4): Suppliment S27.
- 7) **I. Ivanova**, Z. Krastev, T. Petkova, S. Dragneva. Comparison between 6-hour and 24-hour cupriuria in monitoring of therapy with D-penicillamine in patients with Wilson disease. Biochemia Medica 2013; 23 (1):A18.
- 8) И. Петкова, К. Петров, **И. Иванова**. Анализ на серумни липиди в хода на профилактични изследвания, предварително проучване. Сборник с резюмета IX Национален конгрес по Клинична лаборатория 2012; 48.

XI. Грантове във връзка с дисертационния труд

1) МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ, Медицински Факултет
ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ПРОЕКТ с ВХ. НОМЕР 45/2013 г., база УМБАЛ “Св. Иван Рилски”, Клинична лаборатория”, научен ръководител - Доц. д-р А. Иванова, дм; с тема “ Биомаркери в ликвор и серум при ранна диагноза на заболяването Болест на Алцхаймер”, Договор №59/2013г., завършил с висока оценка за постигнатите резултати.

2) IFCC, PROFESSIONAL SCIENTIFIC EXCHANGE PROGRAMME
Laboratory of Neurobiology, Fatebenefratelli Foundation, AFaR Division,
Fatebenefratelli Hospital , Roma, Italy, Proff. Rosanna Squitti, 2015
“Trace elements and Alzheimer’s disease – current tendencies and future perspectives”.