

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
Ръководител: Проф. Д-р Добрин Свиначов, дмн

Д-р Ирена Димитрова Иванова

МЕДЕН СТАТУС – ЛАБОРАТОРНИ АСПЕКТИ
И КЛИНИЧНО ПРИЛОЖЕНИЕ
ПРИ НЯКОИ ПАТОЛОГИЧНИ СЪСТОЯНИЯ

Дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор”

Научен ръководител:
Доц. д-р Бисера Атанасова, дм

София, 2016 г.

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ	5
II. ВЪВЕДЕНИЕ	7
III. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР	9
1. Характеристика на медта като елемент	9
1.1. Физиология и биохимия на медта.....	12
1.2. Есенциална роля на медта	17
2. Етапи в изследването на микроелемента мед	19
2.1. Преданалитичен етап и подготовка на пациента за изследване	20
2.2. Аналитичен етап.....	24
2.3. Следаналитичен етап	25
3. Показатели за характеризиране обмяната на медта в организма	26
4. Състояния, свързани с дисхомеостаза на медта.....	32
4.1. Състояния на дефицит на мед	32
4.2. Състояния с натрупване на мед	33
5. Ролята на медта за имунните реакции	39
6. Роля на медта за физиологията и биохимията на нервната тъкан.....	39
7. Болест на Алцхаймер.....	40
7.1. Епидемиология и етиология.....	40
7.2. Патоанатомия и патогенеза	43
7.3. Клинична картина	47
7.4. Диагноза	47
8. Обобщение на литературния обзор.....	50
IV. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	53
V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	54
A) МАТЕРИАЛИ	54
1. Стандартизиране на условия в преданалитичния етап при определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал	54
2. Проучване при здрави лица	57
3. Проучване информативното съдържание на лабораторни показатели, характеризиращи медния статус при различни патологични състояния с нарушена хомеостаза на медта	59
4. Биологичен материал.....	61

Б) МЕТОДИ.....	62
1. Модел за тестване контаминацията при анализ на урина.....	62
2. Използвани методи при хематологични и клиничко-химични показатели	63
3. Метод за определяне на мед в серум и урина	70
4. Метод за определяне на мед в ликвор.....	71
5. Определяне на несвързана с церулоплазмина мед (NCC)	73
6. Определяне на индекс на телесна маса (ИТМ)	73
7. Методи за статистически анализ	73
8. Методи, използвани за определяне на лабораторните показатели в Laboratory of Neurobiology, Fatebenefratelli Foundation, AFaR Division, Fatebenefratelli Hospital, Рим, Италия.....	75
VI. РЕЗУЛТАТИ.....	77
1. Стандартизиране на условията в преаналитичния етап при определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал	77
1.1. Тестване за контаминация на пробите за анализ	77
1.2. Изследване стабилността на пробите за мед в различен биологичен материал.....	78
2. Валидиране на метода пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия за определяне на мед в кръвен серум и урина.....	81
3. Валидиране на метода ЕТ-ААС за определяне на мед в ликвор.....	83
4. Определяне границите на референтната област на мед в кръвен серум при представителна група лица от българската популация	85
4.1. Резултати от хематологични и клиничко-химични изследвания	85
4.2. Тип на разпределение на резултатите за серумна мед в изследваната група здрави лица	87
4.3. Граници на референтната област за серумна мед в кръвен серум на лица от българската популация	89
5. Влияние на пол, възраст, географско положение, телесна маса, тютюнопушене и консумация на алкохол върху серумните нива на мед	90
5.1. Влияние на пола	90
5.2. Влияние на възрастта	92
5.3. Влияние на географското положение.....	94
5.4. Влияние на телесната маса	95
5.5. Проучване влиянието на тютюнопушене, прием на алкохол и физическа активност	95

6. Резултати от проведените клинично-лабораторни изследвания за характеризирание на клиничното състояние на пациентите, включени в проучването – здрави, БУ и ХХС	96
7. Резултати от характеризирание на статуса на медта при клинично здрави лица от българската популация с разширен панел от лабораторни изследвания.....	96
8. Информативно съдържание на показатели за меден статус при някои патологични състояния – БУ, ХХС и БА.....	96
VII. ОБСЪЖДАНЕ	98
1. Стандартизиране на критерии от преданалитичния етап в определяне концентрацията на мед в различен биологичен материал	99
1.1. Изследване контаминацията на пробите за анализ	99
1.2. Изследване стабилността на пробите за определяне на мед в серум, урина и ликвор	102
2. Валидиране на метода пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия при определяне на мед в кръвен серум и урина.....	105
3. Валидиране на метода електротермична атомно-абсорбционна спектроскопия за определяне на мед в ликвор.....	106
4. Определяне границите на референтната област на мед в кръвен серум на репрезентативна група лица от българската популация	107
5. Фактори на вариация на мед в кръвта.....	111
5.1. Влияние на пола	111
5.2. Влияние на възрастта	111
5.3. Влияние на географското положение.....	113
5.4. Влияние на телесната маса	114
5.5. Зависимост между нивата на серумна мед и липидния профил.....	114
5.6. Влияние на тютюнопушенето, консумацията на алкохол, физическа активност и продължителността и качеството на съня.....	115
6. Показатели, с които може да бъде характеризиран медния статус в организма.....	116
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).....	125
8. Меден статус при различни клинични състояния – БУ, ХХС и БА.....	129
VIII. ИЗВОДИ	133
IX. ПРИНОСИ.....	134
X. БИБЛИОГРАФИЯ	135

I. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ААС	– атомно-абсорбционна спектроскопия
БА	– болест на Алцхаймер
БМ	– болест на Menke
БП	– болест на Паркинсон
БУ	– болест на Уилсън
ВЛКК	– Вътрелaborаторен качествен контрол
ГРГ	– горна референтна граница
ДРГ	– долна референтна граница
ЕЕГ	– електроенцефалограма
ЕКГ	– електрокардиограма
ЕТ-ААС	– електротермична ААС
Ж	– женски пол
ИТМ	– индекс на телесна маса
КМБ	– кръвно мозъчна бариера
КТ	– компютърна томография
М	– мъжки пол
МРТ	– магнитно-резонансна томография
МТ	– металотионеини
НЗОК	– Национална здравноосигурителна каса
НСВОК	– Национална система за външна оценка на качеството
НЦОЗА	– Национален център за опазване на общественото здраве
ПКК	– пълна кръвна картина
ФО	– фалшиво отрицателен
ФП	– фалшиво положителен
ХХС	– хроничен хепатит С
ЦНС	– централна нервна система
Alb	– албумин
APP	– Amyloid Precursor protein, амилоид прекурсорпротеин
AsAT	– аспартат-аминотрансфераза
AlAT	– аланин-аминотрансфераза
ATOX1	– антиоксидантен протеин 1
ATP7A	– АТФаза 7А
ATP7B	– АТФаза 7В
A β	– бета амилоид
COMMD1	– Copper metabolism MURR domain
Creat	– креатинин

CRP	– C-reactive protein, C-реактивен протеин
Cr	– церулоплазмин
iCr	– концентрация на церулоплазмин
eCr	– оксидазна активност на церулоплазмин
Cu/Zn SOD	– мед/цинк супероксиддисмутаза
CCO	– cytochrome-c-oxidase, цитохром-с-оксидаза
CCS	– Copper chaperone SOD
COX 17 (11)	– Assembly factor 17 (11) for CCO
CV	– коефициент на вариация
DMT1	– Divalent Metal transporter 1 – двувалентен метален транспортер 1
Gs	– коефициент на асиметрия
Gk	– коефициент на ексцес
hCTR1	– human copper transporter1 – човешки транспортер на мед
HDL	– high density lipoprotein, липопротеини с висока плътност
HIV	– human immunodeficiency virus, човешки имунодефицитен вирус
ICP-MS	– Inductively coupled plasma mass spectrometry, индуктивно свързана плазма мас спектрометрия
IDMS	– изотопна дилуция мас-спектрометрия
IL	– интерлевкини
IFCC	– International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory medicine
LDL	– low density lipoprotein, липопротеини с ниска плътност
MMSE	– Mini Mental State Examination
NCC	– несвързана с церулоплазмин мед
OGS	– Occipital horn syndrome
PCR	– Real time polymerase chain reaction, полимеразна верижна реакция
PSN1	– пресенелин 1
PSN2	– пресенелин 2
SCO1 (2)	– Suppressor of COX 17 mutation 1 (2)
SOD	– супероксиддисмутаза
TBil	– total bilirubin, общ билирубин
TChol	– total cholesterol, общ холестерол
TG	– триглицериди
TP	– total protein, общ белтък
TSH	– Thyroid-stimulating hormone, тироидстимулиращ хормон
WHO	– World Health Organization, Световна здравна организация
XIAP	– X-linked inhibitor of apoptosis

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 мултипла 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

ние на медния статус в лабораторната диагностика на невродегенеративните заболявания. 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 АТР7В 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. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1. Характеристика на медта като елемент

Елемент, при който може да възникне недоимък по естествен или експериментален път, който недоимък изчезва след прибавянето на елемента във физиологични количества в организма, се означава като есенциален (1). Групата на есенциалните микроелементи включва желязо (Fe), мед (Cu), цинк (Zn), никел (Ni), кобалт (Co), молибден (Mo), селен (Se), хром (Cr), йод (J), флуор (F), калай (Sn), силиций (Si), ванадий (V) и арсен (As) (2, 3).

Медта е третия по представителност микроелемент в организма след цинка и желязото (4). При възрастен човек съдържанието му е около 70-150 mg (5, 6). Сравнително по-високо съдържание има в сърцето, централната нервна система и бъбреците (3). Съдържанието му в мускулите и в костите е 47-50% от общото количество на медта в организма. Около 15% е в кожата и костния мозък, 8-9% е в мозъка (1,5) и около 6% – в кръвта (7).

Съдържанието на мед в организма зависи от редица фактори: геоложки и географски фактори, състав на почвите и водите, близост до големи водни източници, особености от етническо и културно естество (геофагия), хранителни навици и традиции в приготвянето на храна и напитки, замърсяване на околната среда, възраст на менархе у жените и др. (8, 9).

Концентрацията на мед в организма показва полова и възрастова зависимост – по-високи са стойностите при жените и през декадата 20-30 години (5, 10, 11). По-високите стойности при жените се дължат вероятно на действието на женските полови хормони, специално на естрогените (4). По-високи нива на серумна мед са измерени по време на менструалното кървене, а по-ниски – по време на овулация. Причина за това би могъл да бъде стимулираният синтез на церулоплазмин под действие на естрогените (4). Нивата на серумната мед и церулоплазмин нарастват постепенно при бременност. Към края на бременността стойностите се удвояват. На това основание е възможно изследването нивата на серумната мед и на церулоплазмина да се използва като показател за плацентарната функция (2).

В течение на живота съдържанието на желязо се увеличава и у здрави възрастни хора достига 3-5 g, като при мъже средно е 3.8 g (12), а при жените средно е 2.3 g (13). По-високите нива на мед при жените в активна възраст биха могли да отразят адаптивни физиологични механизми по отношение на немалката честота на железен дефицит сред тази субпопулация (14).

Съществува голямо разнообразие в препоръчителния дневен прием на медта, особено що се отнася до подразделянето в различни групи по пол и физиологични характеристики (15). През 2004 г. The Agency for toxic substances and Diseases Registry (ATSDR) препоръчва прием от 0.01 mg/kg/d за минимално ниво на риск (minimal risk level – MRL) към натрупване или към недостиг на мед. При средно тегло около 70 kg това е около 0.7 mg (15). Препоръчителният дневен прием (Recommended Dietary Allowance – RDA) е около 0.9 mg/d (4, 16, 17). В Европа препоръчаните количества в различните държави варират в границите на 0.6-5 mg/d мед, като за мъжете са по-високи, отколкото за жените (1, 4, 7, 18, 19, 20). Според Gibson RS et al. (18), вегетарианците би трябвало да приемат по-високи дневни дози мед (2.1-3.9 mg/d), отколкото невегетарианците (1-1.5 mg/d). Препоръките на Световната здравна организация (World Health Organization, WHO) са 1.4 mg/d за около 70 kg тегло и около два пъти повече за подрастващи (18, 21). Приемът на 2-3 mg/d мед е достатъчен, за да не се развие дефицит, а при прием над 5 mg/d са възможни токсични прояви (9, 21). Широкият диапазон на вариация и недостатъчното характеризиране по групи, за препоръчвания дневен прием на мед, се дължи донякъде и на това, че няма показатели, с които да се извършва достоверна оценка на съдържанието на медта в организма.

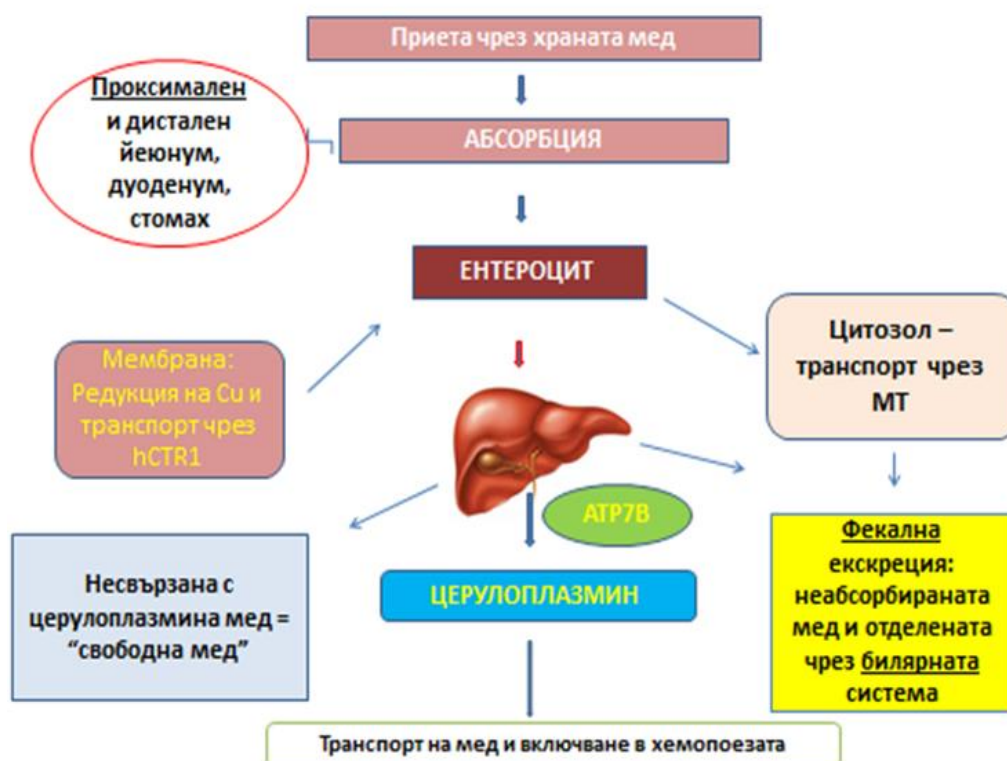
В човешкия организъм мед се приема с храната, водата и суплементиращи медикаменти с мед (8), но главно чрез храната (7, 21). Храни богати на мед са черен дроб, бъбреци, риба, стриди, бобови растения, ядки, какао и тиква (21). С най-високо съдържание на мед са слънчогледовите семки, черния дроб и пшеничните храни (9). Обратно, млякото и млечните продукти, особено кравето мляко, са бедни на мед. С по-високо съдържание на този микроелемент са водите с леко кисело рН (15).

Небалансираното хранене може да доведе до дисбаланс на мед в организма, но също така, диета с храни бедни на мед би могло да се използва като терапевтичен подход при състояния на свръхнатрупване на мед в организма. На международна конференция през 2013 г. в САЩ (The International Conference on Nutrition and the Brain, Washington DC, July 19-20, 2013) са разисквани препоръки за подходяща диета и стил на живот в контекста на превенцията на БА (17). Препоръчани са 7 конкретни насоки, като една от тях гласи, че при избор на суплементиращи медикаменти трябва да се избягват такива, които съдържат желязо и мед, тъй като тяхното повишено консумиране се свързва с когнитивни нарушения при някои индивиди (21). Shen Xiao-Li et al. установяват статистически значима корелация между състава на почвите в Китай и годишната смъртност от БА (22), като в области с високо съдържание на мед ($r = 0.449$; $p = 0.021$) и на желязо ($r = 0.537$; $p = 0.007$), смъртността е по-висока. Според същите автори шест пъти по-изразено е нарушението в когнитивните функции при индивиди, приемащи диета богата на мед и мазнини, в сравнение с такива, които приемат храна богата на мазнини, но бедна на мед. Според проучването Iowa Women's Health Study (2011 г., САЩ), приемът на суплементиращи таблетки с мед се свързва с по-висока смъртност от БА (23). Squitti R et al. съобщават за статистически по-високи стойности на свободния пул на мед в кръвта при пациенти с БА в сравнение със здрави контроли, както и че съществува отрицателна корелационна зависимост между концентрацията на мед в организма и когнитивните възможности при пациенти с БА (24). Тези данни свидетелстват за връзка между медта приета чрез храната/водата и от друга страна – когнитивните функции и хода на невродегенеративни заболявания като БА.

Поради двойствената си природа микроелементите са строго регулирани в организма и един от подлежащите на модифициране фактори е диетата (21). Основателно е да се мисли за статуса на различни микроелементи, и конкретно за медта, като за епигенетичени фактори при развитието на невродегенеративни състояния, в това число и БА (23).

1.1. Физиология и биохимия на медта

Абсорбцията на приетата с храната мед се осъществява предимно в дуоденума, в горната част на тънките черва и малка част – в стомаха (3, 5, 6, 9, 15). Според някои автори процесът продължава в дисталната част на тънките черва (5,15). Абсорбцията обхваща 50-80% от приетата с храната мед. Установено е действието на редица фактори, които повлияват скоростта на абсорбция. Такива са: пол, възраст, химически състав на храната, заболявания, които засягат чревната лигавица, прием на някои медикаменти (оралните контрацептиви) (4, 25, 26). Многообразието на тези фактори е причина за наблюдаваните значителни различия в степента на усвояване – от 12 до 71% (15, 19). Приемът на белтъци и някои пробиотици повишава абсорбцията на мед (15). Медта, желязото и цинкът взаимно се повлияват в процеса на усвояване в организма. Повишеният прием на желязо или цинк може да доведе до меден дефицит (5). Схематично физиологията на медта в организма е представена на Фиг. 1.



Фигура 1. Физиология на медта в организма: централно място в обмяната на медта в организма има черният дроб. MT – металотионеини; hCTR1 – human copper transporter 1, АТР7В – АТФаза 7В

Естествен механизъм за екскреция на медта от организма е посредством жлъчния сок. Това не само е основният път за отстраняване на ненужното количество мед от тялото, но и начина за поддържане на хомеостазата на микроелемента в тялото (27). Физиологичните механизми на регулация за поддържане на хомеостазата на медта включват контрол на приема на мед, транспорта на медните йони, степента на дуоденална абсорбция и билиарна екскреция (15).

След като бъде абсорбирана, медта през порталното кръвообръщение, в комплекс с албумин или хистидин, достига до черния дроб. Той заема централно място в медната обмяна (9). В него медта се използва за метаболитните нужди на хепатоцита, бива включвана в структурата на мед съдържащи протеини спрямо нуждите на организма, а излишното количество се екскретира чрез жлъчния сок (28). Черният дроб контролира количеството свободна мед, което да премине в системната циркулация.

Обмяната на медните йони е строго контролиран процес поради тяхната висока реактивоспособност (26, 29). В клетките е развита мрежа от различни специфични мембранни протеини за импорт и експорт и пренасящи молекули (шаперони, chaperones), които да не позволяват съществуването на повече от един свободен меден йон при физиологични условия в клетката (Табл. 1).

Следните мембранни протеини са от съществено значение за обмяната на медта и са отговорни за импорта на йоните:

– hCTR1 – в лумена на тънките черва приетата с храната мед, бива абсорбирана върху четковидната повърхност на ентероцитите, където медните йони, вече редуцирани, влизат в контакт първо с hCTR1. Те внасят Cu^{1+} в клетката по принципа на пасивния транспорт на йони (6, 15, 19, 29, 30).

– DMT1 – това е основният преносител на Fe^{2+} , но той също така може да транспортира и медни йони (29).

Таблица 1. Протеини, които свързват медта при транспорта ѝ в клетите (26, 29)

Протеин	Функция
Мембранни	
Copper transporter 1 (CTR1)	Поемане от плазмата
Copper transporter 2 (CTR2)	Ендозомна помпа
Divalent metal transporter 1 (DMT1)	Импорт на Cu^{1+} и Cu^{2+}
Група на АТФазите	Cu^{2+} импорт
Amyloid precursor protein (APP)	Поддържане на хомеостазата
Вътреклетъчни	
Протеин Menkes disease (ATP7A)	Синтез на ензими и ефлукс
Протеин Wilson disease (ATP7B)	Синтез на ензими и ефлукс
Металотионеин (MT)	Съхраняване и пренос на шаперони
Copper metabolism MURR domain (COMMD1)	Хепатален ефлукс
X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)	Хепатален ефлукс
Молекули преносители – шаперони	
Антиоксидантен протеин 1 (ATOX1)	ATP7A, ATP7B
Copper chaperone SOD (CCS)	Cu/Zn SOD
Assembly factor 17 for CCO (COX17)	ССО
Assemblyfactor 11 for CCO (COX11)	COX2 site B
Suppressor of COX17 mutation 1 (SCO1)	COX1 site A
Supressorof COX 17 mutation 2 (SCO2)	COX1 site A

Вътреклетъчните транспортери осигуряват безопасното движение на медни йони в зависимост от нуждите на клетката. Такива са:

– Металотионеини (MT) – след като навлязат в цитоплазмата на ентероцита медните йони се транспортират от MT (15). За местата на свързване в тях медта се конкурира с йоните на цинка и кадмия като MT имат по-висок афинитет за свързване към медните йони, отколкото към йоните на цинка (5). Предполага се, че MT складира в неголяма степен мед, особено когато има вътреклетъчно повишение на медта, както е при новородени, при които билиарната екскреция е все още незряла (29) или при богата на мед диета (21). Чрез този механизъм ненужното количество мед бива извеждано от организма чрез екфолиране на чревния епител (21).

– АТФази (ATPases: ATP7A и ATP7B) – за разлика от въвеждането на медните йони в клетката, извеждането им е активен транспорт, при което се използва енергия получена от хидролизата на аденозинтрифосфат (АТФ) (29). Семействата Р-тип АТФази (P-type ATPases) са транспортери, които използват енергия от

хидролизата на АТФ за активен транспорт през биологичните мембрани на различни субстанции от йони до липиди. Те имат важно значение при създаването на електрохимични градиенти, което е важно при процесите на вторичен транспорт, възбудимост, везикуларен транспорт и осмотична стабилност. Досега при човека са описани 36 Р-тип АТФази. Те имат важна функция във физиологията на нервната система като участват в регулацията на калциевата обмяна и поглъщането на микроелементите при везикуларния транспорт (31).

При мед пренасящите АТФази се наблюдава тенденция за увеличаване на броя на мед-свързващите домейни в еволюцията на видовете. Това е във връзка с необходимостта от по-доброто буфериране на медното съдържание в организма и строгата регулация на медта при еволюционно по-висшите организми (32).

АТФазите заедно с металошапероните действат синхронно в посока на строго контролиране на медния метаболизъм, така че да няма повече от един свободен меден йон в клетките (32).

АТР7В и АТР7А принадлежат към подгрупата на Р1В-тип АТФази (31). АТР7А е повсеместно разпределена в организма, с изключение на черния дроб, докато АТР7В е представен предимно в черния дроб и в мозъка. Генът за АТР7А се намира в Хq21.1 хромозомата и мутации в него са асоциирани с БМ, Occipital horns syndrome (OHS), спинална мускулна атрофия (spinal muscular atrophy) и др. В резултат от замествания и делеции в гена към днешна дата са известни повече от 500 заболявания (31). В една или друга степен при тях има проявена неврологична симптоматика. Точкови мутации в гена за АТР7В е причина за БУ, но също така през последните години много активно се работи върху хипотезата за ролята на АТР7В за етиопатогенезата на БА– полиморфизъм в АТР7В се свързва с повишение риска от развитието на болестта при част от спорадичните случаи на заболяването (31). На Табл. 2 са представени Р-тип АТФазите свързани с проява на невродегенеративни промени.

Таблица 2. Болести на АТФазите (19,31)

P-type	Ген	Субстрат	Заболяване
P1B	АТР7А	Cu ⁺	Болест на Менке, Occipital horn syndrome, спинална мускулна атрофия
P1B	АТР7В	Cu ⁺	Болест на Уилсън Вероятен генетичен рисков фактор при развитието на болест на Алцхаймер и паркинсонизъм
P2B	АТР2В3	Ca ²⁺	X-свързана спиноцеребеларна атаксия 1 с ранно начало
P5B	АТР13А2	неизвестен	Синдром на Kurfo-Rakeb
P5B	АТР13А4	неизвестен	Аутизъм

Специфични молекули преносители (шаперони) са необходими за доставянето на медни йони до специфичен таргетен протеин. Такива са : АТОХ1, ССС и Сох 17 (7) (Табл. 1).

– АТОХ 1 – ролята на АТОХ1 е да пренася медните йони до АТР7А и АТР7В транспортерите (30). Има есенциално значение за организма и при липсата му в експериментални мишки е установено настъпване на перинатална смърт (29).

– ССС1 – доставя медта до активния център на ензима мед/цинк супероксид-дисмутаза (Cu/Zn SOD) (15, 16, 30).

– Сох 17-СОХ17 е един от 30 необходими фактори за поддържане на активността на цитохром-с-оксидазата (16, 30). Този ензим от своя страна изисква не само мед, но също и цинк, магнезий, желязо и 13 полипептидни субединици. Има есенциално значение за живота на клетките (29).

Екскрецията на мед се осъществява основно чрез фецеса, където попадат ексфолираните ентероцити от гастроинтестиналния тракт, задържащи медта в комплекс с МТ, както и билиарната екскреция (21). Билиарната екскреция на медта (0.5 до 1.3 mg/d) е основният път за ендогенно елиминиране на медта от организма (15). Минимални количества (0.1-0.8 mg на цикъл) се отделят и през менструалното кръвотечение (15). Чрез урината и потта се екскретират по-малко от 3% от приема. Концентрацията на мед в урината варира значително и се повлиява от действието на адренкортикотропния хормон (9). Уринната екскреция на мед може да се използва като показател за установяване на медния статус, за диагноза на БУ и за проследяване ефекта от хелираща терапия (27).

1.2. Есенциална роля на медта

Есенциалната роля на медта е открита през 1928 г., когато Hart et al. установяват ролята на елемента в образуването и функцията на еритроцитите (1). Церулоплазминът (ферооксидаза I), проявявайки своята ферооксидазна активност (5), заедно с ферооксидаза II участва в реакция на превръщане на феройоните (Fe^{2+}) във ферийони (Fe^{3+}), които се свързват с трансферина, за да бъдат транспортирани за нуждите на хемопоезата. Церулоплазминът е меден металоензим, а това определя и същественото значение на медта за ефективното използване на желязото и за синтеза на хемоглобин. Сега вече се знае, че излизането на желязо от клетките се медира от транспортера феропортин, който е рецептор за действие на ключовия хормон на желязната хомеостаза хепсидин (33). Върху базолатералната мембрана на дуоденалните ентероцити, освен феропортин, има локализиран и още един протеин, който е мед зависим ензим – хефастин (8, 33), който е тъканен аналог на плазмения церулоплазмин. Хефастинът също притежава ферооксидазна активност. Той окислява желязото, което в кръвообращението се захваща от плазмения трансферин. Хефастинът също поддържа локализацията на експортера феропортин върху базолатералната мембрана на дуоденалните ентероцити и така активно участва в контрола на хомеостаза на желязото (34). В трансфера на желязо от майката към фетуса участие взема друг, наскоро идентифициран, мед-съдържащ протеин с ферооксидазна активност наречен циклопен (35). Това е още едно доказателство за тясното преплитане във физиологията на различните микроелементи в организма.

Медта има висока окислително-редукционна активност (29). Това прави медните йони отлични катализатори в реакции с пренос на електрони. От друга страна, медта е източник на супероксидни радикали и водороден пероксид (36). През 1934г. Haber and Weiss описват уравнението, по което редокс-активни метали като медта и желязото водят до образуването на окислителни радикали: O_2-

+ H₂O₂ → O₂ + OH· + OH⁻. Хидроксилните радикали (OH·) са първостепенни окислителни радикали, които на практика могат да реагират с всеки вид биомолекули (36).

Реакцията на Haber–Weiss показва начина, по който става образуването на окислителни радикали, които се синтезират при всички процеси протичащи в аеробни условия. При физиологични условия процесите на оксидативен стрес и антиоксидантната защита са в равновесие, но с напредването на възрастта както и в патогенезата на някои невродегенеративни заболявания настъпва дисбаланс с последващо натрупване на окислителни радикали (36, 37). Оксидативните геномни увреждания са най-честата последица от действието на окислителни радикали, получени с участието на пра-оксидантни метали по реакцията на Fenton и Haber–Weiss (37). Дори и за есенциалните микроелементи е присъща способността за разрушаване структурата на ДНК, което може да стане чрез директно свързване към молекулата или чрез нахъсване на веригата ДНК (37). Медта, подобно на желязото, проявява двойствен характер и може да предизвика токсични прояви (15).

Медта с присъщата си способност да преминава между две форми – окислена (Cu²⁺ куприйони) и редуцирана (Cu¹⁺ купройони), е есенциален кофактор на редица важни ензими известни като медни металоензими (38). Такива, освен церулоплазминът, още са: супероксид-дисмутаза (copper/zinc superoxide dismutase – Cu/Zn SOD), цитохром-с-оксидаза (cytochrome-c-oxidase), лизилоксидаза (lysyl oxidase, LOX), уриказа (uricase), тирозиназа (tyrosinase), допамин-бета-хидроксилаза (dopamine-β-hydroxylase, DBH), хефастин (Hephaestin), катехолоксидаза, бета-монооксидаза, D-галактозооксидаза, D-хексозооксидоредуктаза, индол-2.3-диоксигеназа, L-аскорбат оксидаза, нитрат редуктаза, пептидилглицин монооксидаза, флавонол-2.4-диоксигеназа, пептидилглицин хидроксилаза на монооксидазата и др. (Табл. 3).

Таблица 3. Мед-съдържащи ензими

Мед-съдържащи ензими	Функция
Церулоплазмин	Ферооксидазна активност; Транспорт на медни йони (19, 28)
Моноамино оксидаза	Отговорен за ролята на медта при процесите на пигментация и контрол на невротрансмисията
Лизил оксидаза	Значение за нормалната структура и еластичност на съединителната тъкан (колаген и еластин), която е важна за изграждане на съдовите стени и сърцето, както и при изграждането на костната структура.
Цитохром-с-оксидаза	Част от дихателната верига – значение за образуване на АТФ в клетките (19) Антиоксидантна защита
Супероксид-дисмутаза	Силно антиоксидантно действие (5, 19, 38)
Хефастин	Тъканен аналог на церулоплазмина
Тирозиназа	Необходим за синтеза на меланин в меланоцитите (19)
Допамин-бета-хидроксилаза	Участва в синтеза на норепинефрин от допамин. Допаминът, норепинефринът (норадреналин) и епинефринът (адреналин) формират класа на катехоламините (19)
Каталаза	Заедно със супероксид дисмутаза стимулират или потискат транскрипцията на различни гени, медта има важна роля в регулация на генната експресия (5)
Сулфхидрил оксидаза	Значение за структурата на кератина
Аминоксидаза	Оксидиране на първични амини
Пептидил монооксидаза	Биоактивиране на неuropeптиди

2. Етапи в изследването на микроелемента мед

Лабораторната диагностика е съвкупност от множество дейности, които са част от следните етапи: назначаване на изследването (пред-преданалитичен етап), събиране/вземане на материала за изследване (преданалитичен етап); анализ на пробата (аналитичен етап), представяне на резултата от изследването (следаналитичен етап) и интерпретация (пост-пост аналитичен етап) (**39**). Познаването на етапите от лабораторния анализ е необходимо за качеството на резултатите и за гарантиране безопасността на пациента. ISO 15189/2012 постулира необходимостта от установяване, мониториране и усъвършенстване на всички процедури и процеси включени в началните етапи от цялостния процес на изследване, а именно дейностите от пред-преданалитичния и преданалитичния етапи (**40**).

2.1. Преданалитичен етап и подготовка на пациента за изследване

Традиционно грешките в преданалитичния етап са две големи групи: свързани с идентификацията на пациента (необозначена проба, грешно обозначена проба, проба без посочено име на пациент и др.) и свързани с пробата (липемия, иктер, хемолиза, съсирване, недостатъчно количество) (40). Дейностите в преданалитичния етап в голямата си част, не подлежат на автоматизиране и стандартизиране, поради което тяхната честота остава и до днес висока – до 75% в рамките на общата лабораторна грешка (40).

2.1.1. Контрол на контаминацията

От кардинално значение при микроелементния анализ е въпросът за контаминацията на пробата (2, 9, 25). Съществува мнението, че ако не се познават в подробности материала за изследването, то е по-добре изследването да не се извършва (2). Контаминация на пробата може да стане по всяко време от вземането, транспорта и съхранението, както и при обработката на самото изследване (2). Работна група към International Federation of Clinical chemistry and Laboratory medicine (IFCC Working Group “Laboratory Errors and Patient safety”) е разработила предложения за използването на индикатори за качеството, чрез които да се осъществява непрекъснат процес на мониториране на качеството на резултатите като част от управлението на грешките и контрола на риска за безопасност на пациента (40). Голяма част от индикаторите за качество в преданалитичния етап са свързани с процесите за контрол на контаминацията на пробата и стабилност на материала за изследване – вид на пробата, вид на използвания контейнер/епруветка, количество на пробата, времетраене на транспорта и съхранението, условия за съхранение – температура (40). Според Доклад на International Union of pure and applied chemistry (IUPAC), 1995, при изследването на мед няма значителни методични проблеми или висок риск от контаминация (41).

Изследване на кръв

За определяне на мед се предпочита кръвен серум (41). При вземане на кръв използваните вакутейнери и игли могат да бъдат потенциален източник за контаминация на пробата.

Начинът на вземане на кръвта в известен смисъл, също може да бъде източник на контаминация (25). При изследване за мед в кръвен серум се предпочита използването на венозна кръв.

Иглите, които рутинно се използват при венепункция съдържат около 0.02-1.5% манган, мед, кобалт и др. Според Цачев К. иглите за еднократна употреба могат да се използват за вземане на кръв при изследване на мед и на цинк без да има необходимост от предварителна проверка за замърсяване (2).

За да се избегне системна контаминация всички използвани съдове при изследване на мед следва да бъдат проверени за чистота, дори и в случаите, когато се сменя серийния номер (25, 41). Това може да стане чрез напълване на съдовете с двойно дестилирана вода или разредена азотна киселина и измерване концентрацията на медта след престой от 48 ч. като предпочитания брой изследвани съдове е 10, но може и с 5 (2, 25).

Епруветките за кръв се състоят от следните компоненти: стена на епруветката, гумена тапа, лубрикант, антикоагулант или активатор на съсирването, гел сепаратор и сърфактант (42). Използват се пластмасови епруветки изградени от полиестери, напр. полиетилен терефталат (polyethylene terephthalate, PET), полиолефини (напр. полиетилен и полипропилен, PP), полиакрил, политетрафлуороетилен, поливинилхлорид, полиакрилонитрил и др. (42). Гумените тапи са изградени от силикон, полихлоропрен, изобутилен-изопрен и др. Тяхното движение е улеснено от лубрикант в областта на тапата, което има значение за предпазване пробата от замърсяване.

Когато се използва пълна кръв или плазма за микроелементен анализ, видът на антикоагуланта е проблемен въпрос (41). Препоръчва се, независимо какъв антикоагулант ще се предпочете, то да се направи проучване за степента на контаминация на пробата (25). Най-често използваните антикоагуланти са EDTA

(ethylenediaminetetra acetate), хепарин и цитрат (42). При работа с EDTA пробата може да бъде съхранявана за по-дълго време – над 36ч., но пък EDTA има хелиращ ефект – свързва еуропий, цинк, магнезий (42). Хепаринът се разглежда като чист от метални йони, но не позволява дълго съхраняване на пробата (25).

Сепарацият гел може да бъде изграден от следните – вискозни течности, субстанции като дибензилиден сорбитол, полидиметил-ксилосан-полиетилен оксидни полимери (42). Гелът интерферира резултати при измерване на някои лекарствени вещества (фенобарбитал, карбамазепин), МВ-фракцията на креатинфосфокиназа, тестостерон и др. Има способността да абсорбира съставки от пробата или да отделя в пробата гелни частици или силиконово олио.

Когато се използват пластмасови епруветки, то се добавят активатори на съсирването. Често използвани са inorganic silicates, ellagic acid, thrombin и thromboplastin (43). Препоръчва се при микроелементен анализ след вземането на кръвта да се изчака около 30 мин, за да се отдели добре съсирекът и след това да се извърши центрофугирането при следните условия: 1000-1200 g за 10 мин (25). В литературата няма посочени данни дали видът на активаторите на съсирването повлиява измерването на микроелементите (25, 42).

Изследване на урина

Рутинно мед се изследва в 24-часова урина (25, 27). За правилното провеждане на изследването е редно да има ясни инструкции за пациента и медицинския персонал (44). За намаляване риска от контаминация по време на събиране на урината и на измерването на медта, е необходимо да се използват подходящи лабораторни съдове. Препоръчват се съдове изработени от полиетилен, полипропилен или тефлон (2, 41, 45). Порцеланови и метални съдове не бива да се използват (25). Материалът, от който са изработени е необходимо: да не предизвиква адсорбция на компоненти от урината (отрицателна интерференция); да предпазва урината от директна светлина; да са лесни за употреба – широко гърло и капачка; градуирани за коректно измерване на количеството урина (44). Урината следва да се отделя директно с бързо последващо затваряне на капачката, за да се намали възможността от

замърсявания от въздуха или дрехите на пациента (25, 41). Съществуват препоръки за събиране на всяка порция урина в отделен контейнер (41).

2.1.2. Стабилност на пробите за анализ

Според ISO GUIDE 30 (11, 45) стабилността на пробата е възможността измерената стойност да остане в рамките на определен интервал при съхранение за определено време, при определени условия. Нестабилността може да се изрази като процентно отклонение между първоначалната измерена стойност и тази установена след известно време. При събиране, транспорт, съхранение и подготовка за анализ, пробите търпят различни химични и физични въздействия. Потенциални източници на вариация в преданалитичния етап са процеси на изпаряване, химически реакции с компоненти на лабораторната техника или стената на използваните съдове, с компоненти от атмосферата (кислород, водни пари, въглерод) (45, 46). Настъпват процеси на разграждане под действие на температура на околната среда и микробиален растеж.

Най-добрият начин за съхранение е поддържането на възможно най-ниска температура, дори в условия на съхранение в течен азот (-196С°) (45). Подкисляването на урината при микроелементния анализ, се използва като начин за намаляване на адсорбцията на елементите към стената на съда, но това от своя страна също е свързано с риск от контаминация (46). Установено е, че използването на азотна киселина не води до значима контаминация при изследване с индуктивно свързана плазма мас спектрометрия (ICP-MS) (46). Добавянето на киселина и съхранението при ниски температури към пробата урина има ефекта на потискане на микробиалния растеж. При необходимост от продължително съхраняване, няколко месеца, се препоръчва пробите урина да бъдат замразявани в пластмасови съдове, които е добре предварително да бъдат почистени с азотна киселина (45).

Кръв – при необходимост от съхранение на кръвна проба за микроелементен анализ, се препоръчват хладилни условия от 5 до -20 С° или по-ниски температури в пластмасови съдове, като продължителността на съхранението е металозависима (41).

Урина – в литературата има редица проучвания за стабилността на микроелементите в урина, но те значително се различават по отношение на условията и времетраенето за съхранение, като и методите за анализ, които са използвани (25, 41, 45, 46). По-стари публикации (25, 41) препоръчват съхранение с подкисляване на урината с азотна или солна киселина, докато по-нови (46) препоръчват съхранение без добавяне на стабилизатори или консерванти, при определен температурен режим. Проучване стабилността на 15 микроелемента в урината, в това число и на медта, при стайна температура за 3 дни, не е показало статистически значима промяна в концентрациите (41).

Направеният обзор на литературата от български автори (1, 2, 3, 47, 48, 49), както и данните от актуалния Медицински стандарт по Клинична лаборатория показваха, че информацията за преданалитичния етап при изследване на мед е оскъдна и не е осъвременявана през последните няколко години. Обяснение за това може да бъде обстоятелството, че изследването на мед е високо специализиран анализ и клиничната му приложимост е специфична и свързана повече с рядко диагностицирани заболявания като БУ. На този фон заедно с нарастващия интерес към изследването на мед в различни биологични течности при по-широк спектър от заболявания, е необходимо осъвременяване на данните за цялостния лабораторен процес на изследване на микроелемента и преосмисляне на неговото клинично приложение. Като доказателство за последното е приетият през април 2015г. Национален Консенсус за ранна диагностика и лечение на БА и други форми на деменция към Българското дружество по деменции (50), в което се препоръчва изследване на куприурезата в специализираните центрове за дементно болни.

2.2. Аналитичен етап

Атомно абсорбционната спектрофотометрия (ААС) е референтен метод за определяне на мед (3, 51). Други техники, които могат да бъдат използвани са ICP-MS, неутронно-активационен анализ и колориметрични методи. Колориметричните методи за определяне на мед се причисляват към рутинни клас А методи. При тях се измерва интензитетът на цветния комплекс между хромоген (ба-

токупреин или др.) и серумната мед (52). Дефинитивен метод е изотопна дилуция мас-спектрометрия (IDMS) (3).

Таблица 4. Методи за определяне на мед в гръбначно-мозъчна течност

ЕТ-ААС	Пламъкова ААС	ААС	ICP MS
Agarwal RP., 1982 (53)	Tsalev DL., 1983 (45)	Molina JA., 1998 (57)	Gerhardsson L., 2008 (59)
Tsalev DL., 1983 (45)		Melo MT., 2003 (58)	Gerhardsson L., 2009 (60)
Pall HS., 1987 (54)			Dusek P., 2014 (64)
Gazzanig GC., 1992 (55)			
Цачев КН., 1994 (56)			
Dusek P., 2014 (64)			

При избора на метод за определяне на мед трябва да се вземат предвид вида на биологичния материал и очакваните стойности поради различното поведение на матрицата и чувствителността на методите. Така например най-често за определяне на мед в ликвор се използват безпламъковата ААС и ICP-MS (Табл. 4). Поради това, че ААС е най-добрия метод за изследване на мед (45), а ЕТ-ААС е най-често използвана при изследване на ликвор, то в настоящото проучване определянията са направени именно с пламъкова (за серум и урина) и безпламъкова (за ликвор) ААС.

2.3. Следаналитичен етап

Част от следаналитичния етап на изследването е тълкуването на получените резултати. За да бъде ползван който и да е резултат, той трябва да бъде съпоставен с някаква стойност (47). Лабораторните резултати се съпоставят с референтни стойности. Най-често в ежедневната диагностична дейност се използват интериндивидуални референтни граници.

Поради развитие на аналитичните принципи и процедури, промяна на фактори от околната среда, вида на диетата и др. се препоръчва референтните граници да се актуализират (65). За последен път референтният обхват за серумна

мед в българската популация е определен през 1987г. (2), и е както следва: за мъже 11.1-26.2 $\mu\text{mol/L}$ и за жени 10.7-27.3 $\mu\text{mol/L}$. По литературни данни от 1999г. са посочени следните референтни интервали: мъже 12.3-22.4 и жени 13.2-24.6 $\mu\text{mol/L}$ (49).

Посочените референтни стойности, които се използват за българската популация се приближават до цитирани в литературата стойности от други страни, напр. за Испания (2002г.) – мъже 11.01-22.03 $\mu\text{mol/L}$ и жени 12.59-24.39 $\mu\text{mol/L}$ (11); за Италия (2011г.) – мъже 14.66-15.45 $\mu\text{mol/L}$ и жени 16.99-18.49 $\mu\text{mol/L}$ (66).

3. Показатели за характеризирание обмяната на медта в организма

Диагностиката на някои патологични състояния изисква да се познават добре основните аспекти на обмяната на медта, нейната физиологична роля в организма и механизмите, които контролират хомеостазата ѝ. Например, съдържанието на мед в черния дроб при новородени е толкова високо, колкото е и при болни от БУ, но без това да води до патологични прояви (27). Определянето на показатели, които адекватно отразяват статуса на медта в организма, е важно за медицинската практика. В идеалния случай, това може да стане чрез използването на пакет от показатели, който да включва количественото определяне на мед и показатели свързани с функционалната роля на медта в организма (9).

Най-често използван лабораторен показател за охарактеризиране на медния статус в организма е серумна/плазмена концентрация на медта (5, 9, 27). Самостоятелната оценка на този показател има следните недостатъци: серумните нива са по-високи от плазмените; повишение при особени физиологични състояния като бременност или с напредване на възрастта; повишение при неспецифични възпалителни състояния; хормонални въздействия (естрогени, аденокортикотропен хормон) и чувствителност на методите за анализ (1, 9, 28). На практика при измерване на концентрацията на мед в кръвта се измерва тоталната мед, но в организма по-голяма част от медта в кръвта е свързана с церулоплазмин (80-95%) (1, 4, 5, 7, 27, 28, 70, 71). Остава една по-малка част, която е биологично активната мед и тази, която е с потенциално токсично въздействие. Тя се отбелязва

като несвързана с церулоплазмина мед (non ceruloplasmin bound copper, non-Copper, NCC) или „свободна“ мед. Малки промени в количествата на несвързаната мед трудно се установяват при оценка само на количеството на общата мед в кръвта. Това се доказва и от факта, че при пациенти с БУ, където се очакват ниски нива на серумната мед, пропорционално на намалената концентрация на церулоплазмин, може да се установят нормални и дори повишени серумни медни нива, което се обяснява с повишаването на концентрацията на свободния пул на медта (NCC) (27, 28). По-значимо клинично значение би имало директното изследване на несвързаната с церулоплазмина мед, но това все още е трудно и не е рутинен подход (61). Италиански колектив съобщава за метод чрез, който се измерва нецерулоплазминовата мед директно чрез флуоресцентно отчитане (7). Методът е патентован (Ref. Patent: PCT/EP2012/072063) и е известен като C4D тест (62). Характеризира се с добра чувствителност и специфичност. Представява разликата във флуоресцентното излъчване на пробата (намаляване) преди и след добавяне на съставка с ролята на металотионенин, т.е. свързваща наличната „свободна“ мед, което намалява флуоресцентния сигнал (62).

Свободният пул медни йони се намира в лабилни комплекси с албумин, аминокиселини, пурины, ДНК, РНК, протеини, нуклеотиди, транскупреин и алфа-2-макроглобулин (7, 19, 72). Референтният обхват за NCC е 0.008-1.6 $\mu\text{mol/L}$ (19, 25, 27, 28). Повишените нива „свободна“ мед са токсични (4), защото освободените от лабилния пул медни йони свободно преминават през клетъчните мембрани, кръвно-мозъчната бариера, гломерулната мембрана и плацентата (70, 71) и също така „свободната“ мед лесно влиза в окислително-редукционни процеси по реакцията на Fenton и Haber-Weiss (7). Други методи за определяне на „свободна“ мед са:

– индиректно чрез пресмятане по формулата на Walshe, според която „свободната“ мед е разликата между тоталната серумна мед и церулоплазмина (28,72). Калкулирането на нивото на „свободната“ мед е свързано с неточност, от определянето на церулоплазмина. От една страна метода, който е използван за неговото определяне и от друга страна факторите, които влияят върху концентрацията на церулоплазмин (27). При измерване на фалшиво по-високи нива на церулоплазмин ще се

изчислят фалшиво по-ниски нива, а често и отрицателни стойности за несвързана с церулоплазмина мед, които е трудно да бъдат интерпретирани (28, 72).

– директно измерване на свободна мед в ултрафилтрат на серум или плазма. Недостатък на този метод е, че не се измерва свързаната с други протеинови молекули мед – с албумин и транскупреин (72).

Актуалните към момента препоръки (27, 28), както и най-често цитирания в литературата (7, 72) начин за получаване на резултат за „свободна” мед в серум е чрез пресмятане по формулата на Walshe. Това е използваният метод и в настоящата работа.

Церулоплазминът е протеин, който е основният носител на мед в кръвта (27). Една молекула церулоплазмин физиологично свързва около 6 атома мед. Свързаната с мед форма се означава като холоцерулазмин, а церулоплазмин, който не е натоварен с мед се отбелязва като апоцерулоплазмин. При характеризане на медния статус церулоплазминът може да бъде определян като концентрация или да бъде определена неговата оксидазна ензимна активност. При интерпретиране на резултатите трябва да се имат предвид: ефектът от действието на някои хормони (естрогените); фактът, че той е острофазов белтък; нормално е с ниски нива при новородени (9, 27); може да бъде понижен при хомозиготни носители на АТР7В мутация без да има развитие на заболяване (27).

Експериментално е доказано, че оксидазната активност на церулоплазмина не корелира добре с чернодробните нива на медта в условия на меден дефицит, тъй като ензимната активност намалява по-рано, отколкото промяната в концентрацията на медта (9). Освен това съществуват и методични затруднения в измерването на серумните нива на церулоплазмин, които повлияват клиничното тълкуване на резултата. Серумният церулоплазмин може да бъде измерван с ензимни методи, радиална имунодифузия и нефелометрично, но най-често в практиката се прилагат имунотурбидиметрични методи (27, 28).

В публикация на М. Panteghini от 2010 г. задълбочено е разгледан въпросът за стандартизирането в определянето на церулоплазмин (67). Липсата на референтен метод затруднява сравнимостта на резултатите, получени с различни ме-

тоди. На практика резултатите получени с нефелометрично измерване и тези с имунотурбидиметрично определяне са несравними. Макар и с висока корелация ($r = 0.995$) двата метода показват голяма вариация в стойностите на церулоплазмин, като значимо по-високи са резултатите получени с нефелометричен метод. Препоръчва се при тълкуване на резултатите за серумен церулоплазмин да се използват метод-зависими референтни стойности (67). В друга публикация (2013г.) на същия автор се препоръчва за коректното установяване на съдържанието на церулоплазмина да се извършва поне двукратното му определяне (61).

Измерването на церулоплазмина като ензимна активност дава информация за неговия функционален капацитет, което е по-добрият начин за диагностичното му приложение. При пациенти с хроничен хепатит С и хепатална енцефалопатия (ХЕ) в сравнение със здрави контроли и с пациенти с хроничен хепатит С без ХЕ, се оказва че като концентрация церулоплазминът не се различава между трите групи, но е налице статистически значима разлика в ензимната активност на церулоплазмина (63). При пресмятане на специфичната активност като съотношение между концентрацията на церулоплазмина и неговата ензимна активност (отношението eCp/iCp), е установено значимо понижение при пациенти с БА в сравнение с контролна група пациенти, на фона на сходни резултати за церулоплазмин. Друг показател, който не е с рутинно приложение, но се цитира в съвременната литература, е съотношението между медта и концентрация на церулоплазмина в структурата на холоцерулоплазмина, което се намира по следната формула: $Cu \mu mol/L \times 0.132/Cp g/L$ (61).

Измерването на количеството мед в урината е показател за характеризиране на медния статус, диагностичен тест при БУ, маркер за ефективността на хелираща терапия и терапия с цинкови соли (9, 27, 28). В урината медта, която се измерва представлява количеството несвързана с церулоплазмина мед, която е преминала през бъбречния филтър. Нормално стойностите ѝ са до $1.6 \mu mol/24h$ (25), а в случаи на натрупване на мед в организма това количество се повишава. Затова 24-часовата куприуреза е един от диагностичните критерии за БУ (27, 28). Измерването и интерпретирането на резултатите от куприурезата има следните

проблеми: ниските концентрации на мед в урината изискват висока чувствителност на количествения метод за измерване и ниска граница на откриване; значима междулабораторна вариация; вероятност за контаминация на пробата по време на събиране и подготовка за изследването и правилно измерване на количеството отделена урина (9, 27).

Стандартно се измерва концентрацията на медта в 24-часова урина (9, 27, 28). Усилията на научните колективи през последните години са насочени към проучване на възможността за скъсяване на времето за събиране на урина и в тази връзка има публикации, при които се търси замяната на 24-часовата куприуреза с изследване на единична порция сутрешна урина (68) или на 6-часова куприуреза при пациенти с БУ (69). Jian-She Wang et al. (68) установяват значима корелация между 24-часовата куприуреза и отношението мед/цинк в единична сутрешна порция урина при диагностициране на пациенти с БУ. Приетите препоръки за БУ определят използването на 24-часовата куприуреза като критерий за поставяне на диагнозата (27,28). В този ред на мисли би било от съществено значение да се обърне внимание на преаналитичния етап – стандартизиране на процеса за събиране на урина, вида на използваните съдове и контрол на контаминацията.

При търсене на нови маркери, които да характеризират медния статус в организма, е необходимо те да са чувствителни при гранични нива на меден дефицит, при суплементиране с мед, както и да са независими от концентрацията на серумната/плазмената мед и на церулоплазмина (16). Потенциални биомаркери са мед-зависимите ензими, молекули, пренасящи медните йони (29), маркери на костната плътност, маркери за имунната система, за глюкозния толеранс, за холестеролевия метаболизъм, както и някои генетични изследвания (16). Съвременни проучвания върху плъхове и мишки са установили, че CCS в тъканите и еритроцитите значимо и специфично се повишават при меден дефицит (15). В изобилие CCS се открива в еритроцитите и по този начин се превръща в добър маркер за медния статус (29). Според някои съвременни данни мРНК на CCS реагира при свръхнатрупване на мед в мононуклеарните клетки в периферната кръв (29). Експерименти с гризачи дават убедителни доказателства че мРНК за ATP7A както и

самия протеин АТР7А биха били приложими при определяне на медния статус в организма. Не така стои въпросът при използване на АТР7В и МТ като маркери за медния статус, а значението на АТОХ1 не е достатъчно проучено (29).

Противоречиви резултати са получени при изследване на маркери за костното изграждане и резорбция след суплементиране с мед (16). Множество маркери, отразяващи статуса на имунната система, могат да послужат като маркери и на медния статус в организма. Такива са интерлевкин 2 (IL-2), броя на неутрофилите и тяхната фагоцитна функция, фенотипизиране на лимфоцитните субпопулации, адхезионни молекули (16). IL-2 е протеин, който отговаря за комуникацията между клетките на имунната система. При меден дефицит концентрацията му спада, като този ефект е обратим при нормализиране на медния статус. IL-2 е чувствителен показател не само при тежък меден дефицит, но и при граничен дефицит. Надеждно може да бъде определен в мононуклеарни клетки от периферна кръв. Потискането на секрецията на IL-2 е вероятно поради потискане мРНК експресията на IL-2, което позволява използването на чувствителен метод като полимеразна верижна реакция (Real time polymerase chain reaction, PCR) за определяне на генната експресия да се използва за оценка на синтеза на IL-2. Потискането на фагоцитната функция на неутрофилите също е обратим процес. Някои автори предполагат съществуването на антинеутрофилни антитела при тежък меден дефицит, чиито титър може да бъде измерен (16). По-чувствителен маркер за меден дефицит са CD4+ клетките (Т-хелпери), в сравнение с цитотоксичните CD8+ лимфоцити (Т-цитотоксични клетки). Концентрацията и съотношението им биха могли да бъдат установени чрез фенотипизиране на лимфоцитите.

Изследването на лимфоцитната функция чрез множество повърхностни молекули за В- и Т-клетките, фактори за активиране като CD25 и HLA-DR, както адхезивни молекули intracellular adhesion molecule 1 (ICAM1 или CD54) и leucocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 или CD11) са други възможни показатели при определяне на медния статус. Последните два могат лесно да бъдат измерени в периферна кръв и биха дали информация за интегритета на Т-клетъчната функция (16).

Друг потенциален биомаркер за медния статус от групата на имунологичните показатели, е левкоцитната функция чрез измерване на бластогенния отговор на клетъчни култури при излагане на специфични митогени, например phyto haemagglutinin (РНА) и concanvalin A (Con A) (16).

Бластогенната активност е чувствителен маркер при прагов дефицит на мед и е обратима. Имунни биомаркери с по-малко експериментални изследвания са: други интерлевкини – IL-1, IL-4, IL-6; генна експресия на медни металоензими и на немедни-металоензими – Cu/Zn SOD, Mn-SOD, каталаза и глутатионпероксидаза. Развитието на генното направление в охарактеризирането на медния статус на организма предстои в бъдеще и вероятно ще разкрие нови детайли за специфични гени (16).

4. Състояния, свързани с дисхомеостаза на медта

Модели на състояния с дефицит или натрупване на мед в организма са две генетично детерминирани заболявания с медна дисхомеостаза: в посока на меден дефицит – БМ и в посока на свръхнатрупване на медта – БУ (21).

4.1. Състояния на дефицит на мед

Болест на Менке

Генетично детерминирано състояние на дефицит на мед е БМ. Това е рядко X-свързано заболяване, при което в резултат на мутация в АТР7А гена настъпва увреждане в преноса на мед до тъканите. В засегнатите клетки се натрупва мед, която не може да бъде изведена (19). В тънките черва дефектът се проявява с натрупване на мед в ентероцитите, при което се нарушава функцията им и абсорбцията на мед намалява. Това причинява дефицит на мед в организма и намаляване активността на купроензимите (19). В нервната тъкан е нарушен транспорта на медни йони към ликвора (21). В тънките черва и бъбреците се натрупва мед, докато мозък и останалите органи остават в недостиг. Клинично заболяването се проявява с нарушаване на нормалния растеж и развитие, намален мускулен тонус, отпуснати черти на лицето и умствено изоставане (21).

Други състояния на дефицит

Медният дефицит е рядко наблюдавано състояние (66). Освен генетично детерминирано, дефицит на мед се наблюдава при нарушена чревна абсорбция, продължително парентерално хранене, недохранване, прием на високи дози желязо (16), нефротичен синдром със загуба на белтък, ексудативна ентеропатия, болест на Паркинсон (БП) и др. (5, 15). Увеличеният прием на цинк, особено при неконтролирано суплементиране с хранителни добавки, може да доведе до меден дефицит (15). Най-честите клинични прояви на дефицита при хора са нормоцитна, хипохромна анемия (66), неутропения, костни малформации и развитие на остеопороза (5, 16). По-рядко може да се наблюдават хипопигментация, нарушен растеж, повишена податливост към инфекции, нарушена фагоцитна функция и нарушен глюкозен метаболизъм (16). Медният дефицит индиректно се проявява чрез намалена активност на мед-зависимите ензими. Възможните нарушения са представени на Табл. 5.

4.2. Състояния с натрупване на мед

Болест на Уилсън

БУ е генетично детерминирано нарушение на медната хомеостаза с натрупване на мед в организма. Описана е от Kinne Wilson през 1912 г. като “прогресивна лентикуларна дегенерация“ и представлява фамилно заболяване на нервната система, асоциирано с чернодробна цироза (28). БУ е наследствено заболяване на медната обмяна, което се предава по автозомно-доминантен път. Дължи се на точкова мутация в АТР7В гена в 13 хромозома, като до момента са описани над 500 вида мутации (27). По правило боледуват хомозиготите, които са с честота в популацията 1:30000 (73). Патогенезата на БУ се изразява в нарушено инкорпориране на медта в церулоплазмина, както и намалено отделяне на медта чрез жлъчния сок (21, 27). В резултат на това в хепатоцита се повишава вътреклетъчната концентрация на медни йони и те преминават в циркулацията, поради което се повишават серумните нива на медта, за сметка на „свободната“ мед, ко-

ето се констатира като повишена уринна екскреция на медта (19). В паренхимните органи, предимно в черен дроб, мозък, слезка и бъбреци, медта се натрупва и се проявяват токсичните ѝ ефекти.

Таблица 5. Нарушени функции на мед-зависимите ензими при състояния свързани с дефицит на мед в организма (5, 19, 27, 74)

Ензими	Нарушения при дефицит на мед
Церулоплазмин	Смущения в хемопоезата – фероахрестична анемия
Лизилоксидаза	Нарушена здравина на стените на съдовете; атеросклероза; субдурална хеморагия; дивертикули на пикочен мехур; остеопороза; фрактури; хернии
Цитохром-с-оксидаза	Развиват се миопатия и атаксия; хипотермия; мускулна хипотония; мозъчни увреждания
Супероксид дисмутаза	Намалена антиоксидантна защита Дегенеративни промени в ЦНС
Хефастин	Нарушения в обмяната на желязо; анемия
Тирозиназа	Хипопигментация
Допамин-бета-хидроксилаза	Хипотермия; хипотензия; дехидратация; сомнолентност и други свързани с нарушена хипоталамична функция прояви
Сулфхидрил оксидаза	Аномалии в окосмяването

Патогномоничен признак за заболяването са пръстените на Kayser-Fleischer в корнеята поради отлагане на мед в децималната мембрана на корнеята. Това е един от общо 6 признака за поставяне на диагнозата (21), макар че при половината от случаите с чернодробна форма на заболяването този признак може да липсва (27). Маркерите за диагноза на заболяването са от особено значение, тъй като то се характеризира с голям клиничен полиморфизъм (21). Заболяването може да дебютира във всяка възраст, но обичайно това най-често става между 5- и 35-годишна възраст (28). Най-младият пациент, описан с БУ е дете на 3 години с цироза на базата на БУ (27). През 1981 г. е описан случай на късно начало на заболяването във фамилия с 5 члена, при които е установена една и съща мутация, но клиничната манифестация при всички е различна (21). Това показва, че вероятно за проявата на дефекта от значение имат епигенетични фактори като диета и стил на живот.

Клиничните прояви на болестта варират в широк диапазон, като черният дроб е доминиращият или единствен засегнат орган при около една трета от заболяелите (27, 75). Чернодробните прояви са много разнообразни – от безсимп-

томно протичащи състояния, при които се откриват само биохимични показатели за чернодробна увреда, до изявена цироза с усложнения (27). В детската възраст водещи са чернодробните прояви, докато при възрастните индивиди доминират невропсихичните промени. При диагностициране в по-късна възраст в около една трета от засегнатите има самостоятелни невропсихични прояви (75). Първична проява на болестта може да бъде и хемолитична анемия с остро чернодробно увреждане (27). Заболяването може да започне и да протича с разнообразие от неврологични, психични или поведенчески прояви. Неврологичните изяви са много разнообразни – тремор, атаксия, дистония, дизартрия и др. (27, 28). По-рядко болестта се манифестира с нарушена бъбречна функция – при около 1% от засегнатите (76), като клинично се развива бъбречна недостатъчност с фулминантен хепатит и хемолиза (77).

Две са съвременните ръководства с препоръки за диагностиката и лечението на пациенти с БУ: European Association for the study of liver (EASL), 2012 (27) и American Association for the study of liver diseases (AASLD), 2008 (28). Според препоръките, тестове за диагноза на БУ са: биохимични изследвания за чернодробна функция, церулоплазмин, серумна мед, несвързана с церулоплазмина мед, 24-часова куприуреа, определяне на мед в чернодробния паренхим, чернодробна биопсия, генетични изследвания. Рутинните за практиката тестове са представените на Табл. 6 (27).

Клинико-лабораторните показатели, които се използват при диагнозата на БУ са всъщност маркери за характеризиране медния статус на пациентите. В съвременните препоръки се акцентира върху критичните фактори от преданалитичния и аналитичния етапи на изследване на медта, които повлияват диагностичното тълкуване на резултатите. Това са проблемите свързани със събиране на урината и контрол на контаминацията, методичните проблеми при изследването на церулоплазмина, възможността за измерване директно на NCC и разликата в клиничното тълкуване при изследването на общата серумна мед и NCC. Решаването на тези въпроси стои и днес пред специалистите, занимаващи се с физиологията на медта и състояния свързани с нарушения на медната обмяна.

Таблица 6. Рутинни тестове за диагноза на БУ – възможни причини за фалшиво положителна (ФП) или фалшиво отрицателна (ФО) диагноза (27)

Тест	БУ	ФО	ФП
Церулоплазмин	Намаление под 50% от долна референтна граница	Нормални нива при пациенти с изразен възпалителен процес на черен дроб, методологични проблеми, бременност, естрогенна терапия	Ниски нива при други състояния: малабсорбция, ацерулоплазмине- мия, хетерозиготни носители на мутация
24-часова куприуреза	> 1.6 $\mu\text{mol}/24 \text{ h}$ > 0.64 $\mu\text{mol}/24 \text{ h}$ при деца	Нормални нива при: неправилно събиране на урината; при деца без чернодробни кли- нични прояви	Повишени нива при: хепатоцелу- ларна некроза, холестаза, конта- минация на пробата
Серумни нива на „свободна” мед	> 1.6 $\mu\text{mol/l}$	Отчитане на нива до 1.6 $\mu\text{mol/l}$ при повишени нива на церуло- плазмин поради методични проблеми	
Измерване на мед в чернодробна тъкан	> 4 $\mu\text{mol/g}$ сухо вещество	Неравномерно разпределение на медта в черния дроб	

Нелекувана БУ има летален изход и веднъж след като е поставена диагнозата лечението е за цял живот. Използват се лекарства, които да увеличат екскрецията на мед от организма (хелатори) или такива, които да намалят абсорбцията на медта (медни соли). В терапевтичния план се включва и прилагането на бедна на мед диета, а като допълнителни медикаменти се използват антиоксиданти – витамин Е. Чернодробна трансплантация е приложима при случаите с остра чернодробна недостатъчност или декомпенсирана цироза на базата на БУ.

Други състояния с натрупване на мед

Състояния на свръхнатрупване на мед в организма се наблюдават при случайно поглъщане, при професионална експозиция или при експозиция от околната среда, бременност, холестаза, стимулиран синтез на церулоплазмин при възпаление, туморни заболявания, чернодробна цироза, миелоидни левкемии, хипертиреоидизъм и др. (4). Повишени нива има и при употребата на орални контрацептиви и естрогени (4, 5). Ретенция на мед в черния дроб може да се получи вторично при случаи с холестатични състояния като първична билиарна цироза.

При състояния на свръхнатрупване на мед в организма клиничните прояви се изразяват в гастроинтестинално дразнене и ерозии, анемия, хипотония, жълтеница, гърчове, кома и дори смърт (4, 9). До няколко дни, се проявяват нарушенията в чернодробната и бъбречната функции. Хроничната интоксикация с мед засяга най-вече черния дроб (4). Интоксикацията с мед може да бъде фатална, ако не се реагира адекватно и навреме (15).

Други състояния свързани с дисхомеостаза на медта в организма

Системните промени в медния метаболизъм се свързват с различни патологични състояния като диабет (5), кардио-васкуларни нарушения (21, 23), хронични вирусни хепатити (63, 78), карциноми (21) и др. Значението на медта за правилното функциониране на ензима лизилоксидаза, обяснява защо при дефицитни състояния могат да се развият съдови лезии, внезапна сърдечна смърт, и повишен риск от атеросклероза (9). Внезапната сърдечна смърт се дължи на остра сърдечна недостатъчност, която настъпва дори при леки натоваарвания и експерименти с животни са до-

казали, че състоянието е напълно предотвратимо при прием на медни съставки и нормализиране нивата на мед в организма (9). Епидемиологично проучване за корелационната зависимост между заболяемостта и смъртността от кардиоваскуларни заболявания и минералния състав на питейната вода е показало съществуването на положителна корелация със съдържанието на медта (9).

Повишени нива на серумна мед са установени при някои видове рак – рак на белия дроб, на яйчниците, на простатата, на стомаха, при някои видове левкемии (21). През последните години се обръща внимание на значението на медта като епигенетичен фактор с голямо значение върху генната експресия (21).

Серумните нива на микроелементите, особено на мед и желязо, са чувствителен маркер при диагноза на чернодробните заболявания от различен произход (78). Медта и желязото имат специфична роля в патогенезата и прогресията на вирусните хепатити. Не е напълно изяснено дали промененото съдържание на металите в кръвта е причина за чернодробна увреда при вирусните хепатити или обратното. В литературата преобладават данните за значимо по-високи нива на серумна мед и по-ниски на цинк при пациенти с хроничен хепатит С (ХХС) (78-82), макар че се срещат и противоположни данни (63, 83, 84). С прогресиране на заболяването серумната мед се повишава.

Инфекцията с вирусен хепатит С е честа причина за хронични хепатити (85). Около 3% от населението на Земята страда от ХХС (82). ХХС се развива в около 70-80% от заразените възрастни лица. От 20 до 50% от болните развиват цироза за период от около 10-20 год. (86). При ХХС има повишен риск от развитие на цироза, фиброза, стеатоза и хепатоцелуларен карцином (85), както и развитие на инсулинова резистентност и дисхормеостаза на микроелементите (82). Сигнификантното повишение на медта и на желязото се разглежда като фактор, който медира развитието на цироза и причинява пероксидация на липиди с нарушение на чернодробния паренхим (87). Някои автори разглеждат сигнификантно по-високите нива на мед при вирусните хепатити (А,В,С,Д и Е) като защитна стратегия на организма (81). Инфекцията с вирусен хепатит С освен, че индуцира състояние на оксидативен стрес (81), се характеризира и със спад в антиоксидантната защита (82).

5. Ролята на медта за имунните реакции

Микроелементите, в това число и медта, имат важна роля, както за вродения, така и за придобития имунитет (88). Медният дефицит намалява ефективността на имунните реакции. Известно е, че болните от множествена склероза страдат по-често и по-тежко от инфекции (5). Предполага се, че за това са отговорни цитокините. При меден дефицит нивата на интерлевкин 2 (IL-2) са значително понижени и вероятно това е причината, поради която Т-клетъчната пролиферация е потисната (88) предимно за сметка на CD4+ популацията (16). Неутропенията е клиничен признак на меден дефицит (5, 16, 88) и за първи път е описана още през 1960 г. Неутрофили, моноцити, базофили и еозинофили са фагоцитиращите клетки. Освен, че броят на неутрофилите е редуциран при състояния с дефицит на мед се отбелязва и намаляване на тяхната фагоцитна функция (16, 88).

6. Роля на медта за физиологията и биохимията на нервната тъкан

Медта има важно значение за нормалното развитие и функциониране на мозъка (7, 39, 89). Участва в енергийния метаболизъм на мозъчната тъкан, в антиоксидантна защита и медира процесите на невротрансмисия. В мозъка протичат интензивни процеси на активен йонен транспорт, които е необходимо да бъдат енергийно обезпечени.

За образуване на енергията под формата на АТФ в дихателните вериги на митохондриите, взема участие мед-зависимия ензим цитохром-с-оксидаза (89). При неговия дефицит се развиват разнообразни клинични симптоми, сред които и невродегенеративни прояви (90). Медта е неравномерно разпределена в мозъчната тъкан. При естествения процес на остаряване, както и при болестни промени са налице изменения в разпределението ѝ (89).

Астроцитите поддържат екстрацелуларната йонна хомеостаза, изхранването на невроните и поддържането на кръвно-мозъчната бариера (КМБ) (91). Намират се в пряк контакт както с невроните, така и с ендотелните клетки на мозъчните капиляри. По този начин те са клетките на първа линия в контакта с

различни метални йони, които преминават КМБ (91). Тази анатомична особеност е предопределена от регулаторната функция на астроцитите, за които се предполага, че са включени в патогенезата на невродегенеративни заболявания като БА и БП (92).

Физиологичната обмяна на медта в астроцитите протича по аналогичен начин както и при другите клетки. Съществуват молекули импортери на медта (CTR1 и DMT1), шаперони, които доставят медните йони до специфични бълтъци съобразно нуждите на клетката, а експортът е обезпечен чрез активен транспорт. В астроцитите е експресиран АТР7А протеинът.

При случаи на повишаване на вътреклетъчната мед молекули АТР7А се предвижват от апарата на Голджи към мембраната и към везикули за експорт на медта извън клетката. Установено е, че астроцитите имат висок капацитет да съхраняват мед интрацелуларно (91). Нарушения в медния метаболизъм в мозъка се свързват с невродегенеративни заболявания като БМ, БУ, БА, БП, и Болест на Хънтингтън. Не са описани болести свързани с мутации в протеините ангажирани с инфлукса и съхранението на медта, а са описани при случаите с дефекти в експортните системи (Табл. 7).

Таблица 7. Болести, свързани с нарушен експорт на мед (91)

Болест	Нарушение в медния метаболизъм
Болест на Менке	Дефицит на мед в мозъка
Болест на Уилсън	Натрупване на мед в мозъка
Болест на Алцхаймер	Високо съдържание на мед в сенилните плаки заедно с понижено медно съдържание в заобикалящата тъкан
Болест на Паркинсон	Понижено медно съдържание в substantia nigra
Болест Хънтингтън	Повишено медно съдържание в substantia nigra и putamen

7. Болест на Алцхаймер

7.1. Епидемиология и етиология

Болестта на Алцхаймер е най-честата форма на деменция (7, 93, 96). Описана е през 1906 г. от немския психиатър и невролог Alois Alzheimer и по-късно е

наречена на неговото име (97). Това е невродегенеративно заболяване със загуба на памет и нарушение на когнитивните функции, което има прогресиращ ход, невъзвратно протичане и в рамките на 7-10 години страдащите напълно се инвалидизират (98). Честотата на заболяването рязко се увеличава с възрастта (97), която е най-значимия рисков фактор (99, 100). При 5-10% от случаите има фамилна обремененост за заболяването (97).

В България епидемиологични проучвания за деменция до 2006 г. не са провеждани. За първи път такава е направено в УМБАЛ „Света Марина”, Варна, през периода 2006-2007 г. От всички деменции е най-висока честотата на случаите с БА (43.7%) (96). По данни на Гражданско сдружение „Алцхаймер – България”, у нас броят на хората, страдащи от БА са около 70 хил., а 60% от деменциите се дължат на БА.

Етиопатогенезата на БА е все още не напълно изяснена (94, 97, 101). Болестта е резултат от комплексното действие на генетична предиспозиция, биохимични промени и влияние на фактори от външната среда (21, 22, 37, 93, 102). В зависимост от възрастта на първата проява на заболяването са познати две форми – с ранно и с късно начало (71). БА с ранно начало (между 40 и 60 години) е с автозомно доминантно унаследяване и се дължи на мутации в единични гени – Amyloid precursor protein ген, Presenelin 1 ген (PSN1) и Presenelin 2 ген (PSN2) (71, 103). Тези гени са причина за заболяването при 90% от всички случаи на фамилна БА (103).

БА с късно начало е комплексно мултифакторно заболяване с преплитане на генетични и негенетични фактори в етиопатогенезата (21, 95, 102). Добре известни рискови фактори за развитието на болестта са възраст, носителство на APOEε4 алелът, стойности на систоличното кръвно налягане, индекс на телесната маса (ИТМ), общ холестерол, физическа активност, образование, тютюнопушене, наличие на депресия и др. (21, 93). Счита се, че заболяването е с по-висока честота при жените, вероятно поради по-голямата преживяемост (97). За възрастта 90 години рискът е 4 пъти по-висок (96). Два пъти по-висок риск да развият болестта имат афроамериканците в сравнение с индивиди от бялата

раса (97). Установената честота (52%) на АпоЕ ϵ 4 алела при български пациенти с БА дава основание да се направи заключението, че българските носители на ϵ 4 алела са свързани с по-голям риск да бъдат диагностицирани като страдащи от БА (104). По-висока болестност от деменция е намерена сред селското население (96).

Свидетели сме на експанзивно развитие на знанията за ролята на микроелементите (особено за желязо, мед, цинк и манган) във физиологията на нервната система и в развитието на невродегенеративни заболявания като БА, БП, МС и др.(95). Доказателства в тази насока има на различни нива – генетика, биохимия (95), невроизобразителни изследвания (94) и ролята на микроелементите вече не се поставя под съмнение. Необходимо е по-задълбочено да се познават физиологичните и патофизиологичните процеси в нервната тъкан, в които участват различните елементи (95) и метаболизма на амилоида и тау протеините (94).

White A et al. обобщават на кратко връзката микроелементи и невродегенеративни състояния като необходимост от „възстановяване на баланса на микроелементите при различните невродегенеративни заболявания” (95). Медният дисбаланс се разглежда като рисков (7, 102, 105), дори и като причинен фактор за заболяването (102). Учени предполагат за съществуването на дефекти в инкорпорирането на медта в церулоплазмина, което може да причини леко, но сигнификантно повишаване на „свободната“ мед в серума на болни от БА (71, 106).

Едновременното въздействие на генетична предиспозиция и фактори от околната среда (експозиция и вид на диетата) изглежда потенцират натрупване на свободни метални йони в мозъка (37). Установени са завишени нива на Fe^{2+} и Cu^{2+} в мозъка през ранна фаза на БА (37). Свободният пул медни йони може да промени нормалния метаболизъм на амилоида, което да отключи „амилоидната каскада“ (21, 71). Данните от редица клинични (102), епидемиологични (107) и мета–анализи (71, 108), дават основание да се предполага съществуването на мед-свързан фенотип при БА (7).

7.2. Патоанатомия и патогенеза

Анатомичните основи на деменциите от Алцхаймеров тип са добре проучени (109). Дегенеративните изменения засягат хемисферната кора и различни субкортикални структури. Налице са невронална загуба, наличие на амилоидни плаки и неврофибрилерни включвания. Описан е дефицит в ацетилхолиновата невротрансмисия (94).

Още от времето на Alois Alzheimer е известно наличието на екстрацелуларни сенилни плаки с ядро от амилоид, около което се намират дегенерирани аксонални окончания (89). Амилоидният протеин се нарича β -амилоид ($A\beta$) и представлява неразтворими агрегати от пептида (94). Той се получава от амилоид прекурсорния протеин (Amyloid precursor protein, APP) чрез протеолиза от α -, β - и γ -секретази (67, 110, 111).

Протеолизата на APP е физиологичен процес в нервната тъкан, при който под действието на α -секретази се образуват разтворими фрагменти от APP ($sAPP\alpha$) (94). При БА преобладава процес на протеолиза под действието на β - и γ -секретази, при което се отделят по-слабо разтворим β -пептиди, изграден от 39-43 аминокиселини ($sAPP\beta$ и $A\beta$) (94). Най-често дължината на молекулата на $A\beta$ е от 40 или 42 аминокиселини ($A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$). Най-висока склонност към агрегация *in vivo* е характерна за $A\beta_{42}$ (94). При нарушаване на баланса между образуване и разграждане на $A\beta$ пептидите те кумулират като олигомери, протофибрили, фибрили в крайна сметка се образуват плаки. Това е т.нар. амилоидна каскада, която финализира с дегенерация на нервната тъкан.

За APP (101) и $A\beta$ е присъща склонността за свързване с метални йони (101, 102, 111). *In vitro* проучвания демонстрират, че медта и цинкът повишават агрегацията и преципитацията на $A\beta$, което води до синаптична дисфункция и акцелерация на амилоидогенезата (112). В плаките кумулират йони на желязо, мед и цинк и стават предпоставка за тяхното нарастване (67, 95). Според Hayne JD et al. $A\beta$ е с умерен афинитет към $Cu(II)$, $Cu(I)$ и $Zn(II)$ (94). Комплексът $A\beta$ -Cu води до структурни промени в молекулата на амилоида. Веднъж редуцирани, медните йони могат да доведат до образуване на високо токсични супероксидни

радикали. Оксидативният стрес поради нарушен баланс между образуването и разграждането на тези радикали (111, 113) е причина за нарушен метаболизъм на Аβ (114). Този пептид е директно отговорен за Аβ-асоцииран оксидативен стрес с нарушаване на нервната тъкан свързано със загуба на неврони (22, 113).

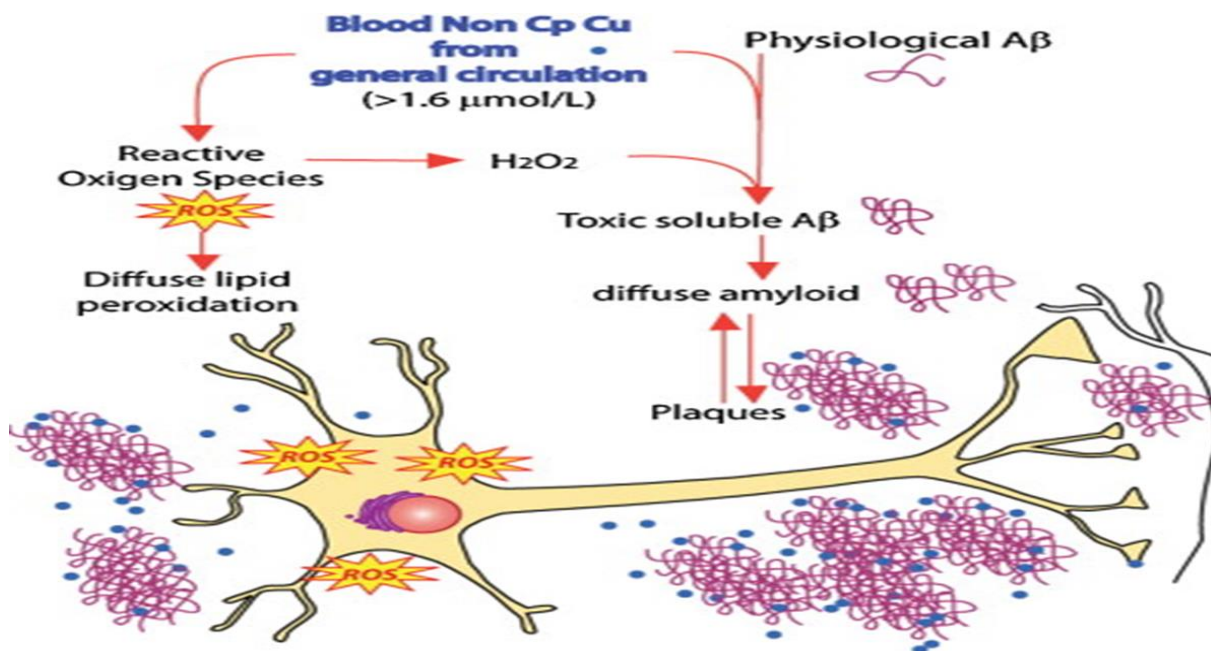
Асоциираният с Аβ оксидативен стрес има следните механизми: окисляване на мембранни протеини, липиди, ДНК, синтез на водороден пероксид, дисфункция на нервните клетки (113). В амилоидните плаки се натрупва мед, докато вътреклетъчната мед намалява (102). Амилоидната патология може да предхожда невроналното увреждане до 20 години. Аβ има редица физиологични функции включително и антиоксидантен ефект. Съществува предположение, че отлагането на Аβ е компенсаторен механизъм срещу оксидативен стрес в нервната тъкан (114), но с развитието на болестния процес антиоксидантната роля се измества от подчертан прооксидантен ефект (114, 115).

За формирането на Аβ значение имат както медта, така и цинкът (101), желязото и манганът (95), а APP има значение за поддържане на медната хомеостаза в нервната тъкан (29). Прицелното място за медната интоксикация са ядрото и митохондриите. Установено е повишено фрагментиране на ДНК (37, 116). Излагането на ДНК на въздействието на водороден прекис и редуциращи агенти в присъствието на Cu^{2+} , води до нарушения в структурата на ДНК (Фиг. 2). Алфатокоферолът в тези случаи проявява подчертан антиоксидантен ефект (116). Има съобщения за забавяне прогреса на БА при прием на високи дози витамин Е (133).

Наличието на Аβ води до хиперфосфорилиране на тау протеините в невроните. Тогава тау протеините се преразпределят в невроните и агрегират, формирайки сплетения. Това води до клетъчна смърт за невроните и за астроцитите (97, 109). Анатомичното разпределение на тези процеси определя клиничните прояви на болестта.

Предполага се, че под действието на Аβ и неврофибрилерните сплетения се усилва клетъчната апоптоза (103). Нарушена е функцията на антиоксидантните ензими (101) и се развива оксидативен стрес (97). Такива освен Cu/Zn SOD са още глутатионпероксидаза и каталаза, които съдържат съответно селен и желязо.

Това синергично действие, което допълва взаимоотношаваната физиология на микроелементите в организма подсказва, че един по-общ поглед върху тяхната обмяна в организма би могъл да обясни някои патогенетични зависимости.



Фигура 2. Токсични ефекти на медта при БА (102): повишаване на несвързаната с церулоплазмина мед в общата циркулация води до повишение в нервната тъкан. Поради високата си реактивоспособност свободните медните йони лесно влизат във взаимодействия с образуване на кислородни радикали, които директно увреждат нервните клетки. Оксидативният стрес променя физиологичния метаболизъм на амилоида, при което се натрупват неразтворими амилоидни олигомери, които образуват плаки

В условия на оксидативен стрес в нервната тъкан поради изместване в редоксбаланса на глутатиона се стига до освобождаване на цинкови йони от МТ. Цинковите йони от своя страна повишават агрегацията на Аβ (111, 113), което улеснява отлагането на плаки. Нарушената хомеостаза, с последващо натрупване в нервната тъкан, на някои микроелементи, в това число желязо, цинк и мед, водят до оксидативен стрес, което от своя страна се свързва с повишен риск от развитие на когнитивен дефицит и невродегенеративните промени при БА (15, 37, 108, 111, 114). Продукти в резултат на оксидативен стрес се натрупват и с напредване на възрастта и затова тя се разглежда като рисков фактор за дементни състояния, а според някои автори дори и като основен рисков фактор за БА (114).

Повишени нива на мед в организма се свързват с когнитивни нарушения и ускоряване развитието на БА (7). По данни на различни автори (7, 117) нивата на серумната/плазмената мед са статистически значимо по-високи при БА сравнено със здрави контроли, за разлика от нивата на мед изследвана в ликвор, където статистически значима разлика не е установена. Повишението на тоталната серумна/плазмена мед е за сметка на несвързаната с церулоплазмина мед (7). Несвързаната с церулоплазмина мед е добър кандидат за индикация на нарушена медната обмяна. Специфично корелира с когнитивните възможности оценени с Mini Mental State Examination (MMSE) тест, така както и $A\beta$ (102). Salustri C et al. (70) доказват обратно пропорционална зависимост между концентрацията на „свободната“ мед и резултатите за когнитивните възможности, измерени чрез MMSE: $r = -0.407$; $p < 0.001$. Несвързаната с церулоплазмин мед има предиктивна стойност за влошаване на когнитивните функции при БА (102). Откритието, че при БА в серума има статистически значимо повишение на „свободна,, мед (118) бе последвано от разбирането за вариациите на медното съдържание в ликвора (102). Повишените нива на несвързаната с церулоплазмин мед в ликвора достигат мозъка и влизат в реакция с $A\beta$, което се приема за базисното взаимодействие при стартиране на невродегенеративните процеси (119) (Фиг. 2). Серумните нива на нецерулоплазминовата мед корелират с нивата на $A\beta$ и тау протеините в ликвора на болни от БА. Също така високите нива на НСС се свързват с типичното за БА забавяне в ритъма на ЕЕГ (102).

БМ и БУ са модели на състояния за нарушена медна хомеостаза във висока степен. По-малки генетични дефекти в гените свързани с медната хомеостаза, могат да доведат до различни клинични прояви при определени условия. Дори и при нормален прием на мед чрез диетата при хора с генетична предиспозиция, податливост, към системна медна дисхомеостаза, може да се стигне до състояние на медно експониране с токсикоza (21). Предположението за съществуването на меден фенотип при БА означава, че при някои спорадични случаи поради генетична предиспозиция, дори и при нормалния прием на мед чрез храната, е свързано с повишен риск от развитие на болестта (7).

Генетичната предиспозиция към меден дисбаланс при БА се разглежда като състояние между генетично детерминирани БМ и БУ (21). Това, което свързва трите болести е генетичен дефект в АТФазите. При БА мутации от рода на loss-of-function в АТР7В генът води до повишаване на NCC в серума над 1.6 $\mu\text{mol/l}$, докато при случаите без такава мутация NNC е в референтен интервал. Това подсказва два възможни подхода при оценка на риска за развитие на БА: 1) Стратифициране според стойностите на NCC в серум или 2) Генетичен анализ на гени, участващи в метаболизма на медта – АТР7В, АТОХ1, COMMD1 (21).

7.3. Клинична картина

Заболяването има хроничен, прогресиращ характер и съобразно тежестта на клиничната симптоматика се различават ранен, умерен и тежък напреднал стадий на развитие. Първият и най-впечатляващ симптом са паметовите нарушения (109, 120). С прогресиране на заболяването се засяга и дългосрочната памет. Развиват се редица когнитивни нарушения: обеднява езиковия речник, агнозия, апраксия, страдат разсъжденията и абстрактното мислене. Настъпват личностови и поведенчески промени, депресивни състояния, обърканост и нарушения в съня. Неврологичните функции, с изключение на когнитивния статус, са запазени (103).

7.4. Диагноза

Поставянето на диагноза деменция е сложен процес, който включва поредица от невропсихологични, клинични, образни и лабораторни изследвания (121). Диагнозата БА се поставя съобразно консенсусни критерии (96). През април 2015 г. в София бе изготвен Национален консенсус за ранна диагностика и лечение на БА и други форми на деменция към Българското дружество по деменции (50). Консенсусът има за цел да се осъвременят диагностичните и терапевтични критерии за всички видове деменции. Диагностичният алгоритъм има следните принципи:

- Анамнеза – от пациента и близките му
- Невропсихологично изследване за оценка на вида и степента на когнитивното нарушение

- Соматичен и неврологичен преглед
- Лабораторни тестове: ПКК, кръвна захар, електролити, чернодробни ензими, креатинин, серумни нива на В₁₂, фолиева киселина, TSH, изследване за HIV и др.
- Конвенционално невроизобразяващо изследване (КТ или МРТ)
- ЕКГ
- Психиатрична консултация
- Изследване на ликвор
- Функционално невроизобразяващо изследване
- Доплерова сонография на магистрални артерии на главата
- ЕЕГ
- Генетично изследване

Акцентът все по-често се поставя върху установяването на начални когнитивни нарушения, които се проявяват още преди развитието на класическата клинична картина (121). В проведено проучване сред българско градско население от 2010 г. за ролята на субективните когнитивни оплаквания и риска от деменция е установена най-висока статистически значима положителна корелация със затруднения в ориентацията, запомнянето и затруднения при смятане (122). Тези данни са в потвърждение на обсъжданата в литературата възможност субективните когнитивни оплаквания да имат предсказваща стойност в развитието на деменция (122).

С понятието „субективно когнитивно нарушение” (Subjective cognitive impairment, SCI) някои автори обозначават клиничния стадий, който предхожда състоянието на лекото когнитивно нарушение (Mild cognitive impairment, MCI) и се характеризира с наличие на субективни паметови оплаквания при липса на обективен паметов когнитивен дефицит (120).

Когнитивните функции се оценяват количествено с невропсихологични тестове. Широко използван в практиката е тестът MMSE, който се характеризира със сравнително ниска чувствителност и специфичност, поради което се препоръчва да се използва в съчетание с други тестове и скали (121). MMSE включва компоненти, изследващи различни когнитивни области: ориентация за време и

място, памет, внимание, смятане, реч, гнозис и праксис (96). Недостатък на теста е зависимостта на резултатите от нивото на образование и езикови познания на изследваните лица.

Други невропсихологични тестове са: Memory impairment screen (MIS), тест с рисуване на часовник (Clock drawing test, CDT), Isaacs set test (IST), 7 minute screen (7MS), The general practitioner assessment of cognition (GPCOG) и The four iadl score (4-IADL) (121). Специфичен за БА е Alzheimer’s disease Assessment Scale – Cognitive subscale (ADAS – cog). Въпреки, че някои от скалите са с високи чувствителност и специфичност те не бива да се прилагат самостоятелно при поставяне на диагноза (121).

Молекулярно-генетичният анализ постигна големи успехи в насока идентифициране на генетичните дефекти при различни случаи на дементен синдром. Генетичните тестове се препоръчват при фамилни случаи и при случаи с ранно начало на БА (преди 65 годишна възраст) (123).

През 2012 г. у нас е публикуван Алгоритъм за диагностика и лечение на заболявания, протичащи с деменция (124), представен на Схема 1.



Схема 1. Алгоритъм за диагностика и лечение на заболявания, протичащи с деменция (124)

Новата концепция за БА определя заболяването като прогресиращо състояние, което започва с определени биологични промени в мозъка без придружаващи когнитивни нарушения в асимптоматичната фаза на болестта. В последствие се развиват паметови нарушения с наличие на характерни абнормни биомаркери и след това развитие на лека, умерена и тежка фаза на деменция. Изведените критерии за поставяне на диагноза БА с интегрирани биомаркери изглеждат така:

– Вероятна деменция при БА – клинични критерии + А β биомаркер и/или биомаркер за невродегенерация

– Възможна деменция при БА – клинични критерии + А β биомаркер и биомаркер за невродегенерация

– Малко вероятна деменция на базата на БА – липса на А β биомаркер и маркер за невродегенерация

Диагностичният процес при БА има и морално-етична страна – тази на пациента и тази на неговите близки. Поставянето на диагноза БА, подобно на други тежки диагнози, е присъда за цял живот за пациента и близките му. В Report of the Special Committee on Aging, Unites States Senate – Alzheimer’s Disease and dementia (100), се казва че между перспективата да боледуват или да се грижат за болен от БА запитаните отговарят в съотношение 50/50.

През 2014г. с участието на Експертния център по деменции при Александровска болница е разработен Национален план за диагностика, лечение и грижи при деменциите (2014-2020). Постигане на целите на Националния план за ранна диагностика на БА и индивидуален план за лечение, ще има голямо влияние върху благосъстоянието, качеството на живот и зачитане на човешките права на хората с деменции и грижещите се за тях (50).

8. Обобщение на литературния обзор

От направения преглед на литературата за значението на микроелемента мед за живите организми, неговото медицинско значение и възможностите за определянето на статуса на медта, могат да се направят следните по-важни изводи:

– експанзивно развитие на познанията и научните изследвания в областта на микроелементния анализ и нови приложения в клиничната практика, което надминава досегашната специфична област на приложение – редки генетични дефекти като БМ и БУ. Медицинското значение на микроелементите за патогенезата, диагностиката, предиктивното значение и възможностите за лечение се разпростира над широк спектър от социално значими заболявания като захарен диабет, хронични хепатити, невродегенеративни заболявания, сърдечно-съдови заболявания и др.

– характеризирането на медната хомеостаза в организма не се свежда само до измерването на серумна/плазмена мед, церулоплазмин и 24-ч куприуреза.

– изследването на свободния пул на медта в кръвта е с по-голямо клинично значение пред определянето на тоталната серумна мед, но все още няма стандартизиран метод за тази цел.

– по-информативно за метаболизма на медта е определянето на ензимната активност на церулоплазмина, в сравнение с определянето му като белтъчна концентрация.

– стандартизирането на изследването на мед и особено на преданалитичния етап е от кардинално значение за определяне на статуса на мед в организма.

– изборът на метод за измерване на медна концентрация зависи от вида на биологичния материал и очакваните минимални стойности. ET-AAS е с по-добра чувствителност пред пламъковата AAS и е най-често използвания метод за определяне на мед в ликвор.

– познаването на факторите на биологична и аналитична вариация за серумна мед са от важно значение при тълкуване на резултатите при определени клинични състояния.

– БА е най-честата форма на деменция в България с честота около 70 000 души. Идеята за участието на микроелементите в патогенезата на различни невродегенеративни заболявания търпи ренесанс и вече има генетични доказателства за това. Новите перспективи в медицината на невродегенеративните заболявания са епигенетиката и епигеномиката като подходи за превенция, ранна диагноза и терапевтичен изход от състоянията.

– стремеж към установяването на позитивни критерии за диагнозата БА, както и възможности за установяването на маркери от периферна кръв с достатъчно добра специфичност и чувствителност при определяне на риска и ранна диагностика на заболяването.

Настоящото проучване е инспирирано от интерес към физиологията на микроелементите, тяхната природа и значение за лабораторната и клиничната медицина. Разгледани са някои практически аспекти от процеса на анализ на пробите за мед. Събрани се актуални данни за разпределението на медта в българската популация, което да бъде като основа за бъдещи проучвания за ролята на медта при различни социално-значими състояния. Здравето е най-важното качество на живота, а качеството на живот е основна грижа на медицината и обществото.

IV. 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 преаналитичния 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.

V. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

A) МАТЕРИАЛИ

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

1.1.1. Контаминация при серумни проби

Използвани са следните видове 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.

При 11 доброволци е взета кръв в двата вида епруветки и до 2 часа е определено съдържанието на мед в серума чрез пламъкова ААС. Всички проби са изследвани при еднакви условия – кръвта е взета от един и същ лаборант и епруветките са центрофугирани при $\leq 1200g$ за 10 мин. при 25°C (използвана е центрофуга UNIVERSAL 320, 1401/1406, Hettich zentrifugen, Германия).

1.1.2. Контаминация при проби урина

Изследвани са съдовете за колекция на урината, за транспорт и съхранение и за предварителна подготовка на пробата (разреждане).

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

Използвани са полиетиленови, стерилни, контейнери от 2 L, за еднократна употреба. Същите са с широко гърло, тъмни стени и винтова капачка. Всички съдове за колекция на урина са напълнени с бидестилирана вода и концентраци-

ята на мед е определена чрез пламъкова ААС през различни интервали от време: веднага след напълване на съда; 6, 18 и 24 часа след напълване.

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

Използвани са полиетиленови съдове от 50 mL, с винтова капачка, за еднократна употреба. За целите на опита са напълнени с:

1. Бидестилирана вода

2. 1% HNO₃ азотна киселина (приготвена от 65% HNO₃, Merck KGaA, Darmstadt, Германия).

Първото измерване за съдържание на мед е направено веднага след напълването на съдовете. След това, при стайна температура, така напълнените съдове са съхранявани за 2, 24 и 48 часа. За всеки интервал от време е измерена концентрацията на мед в екстрактите с вода и киселина. Използваният метод е пламъкова ААС.

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

Изследвани са полипропиленови, стерилни, 15 mL съдове за еднократна употреба, с конусовидно дъно. Те са напълнени с бидестилирана вода и съхранявани при стайна температура за 2 часа. Концентрацията на мед във водния екстракт е измерена чрез пламъкова ААС веднага след напълването и след 2 часа престой.

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 (СТ₀) 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 (ДРА, 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. Пациентите са инструктирани да започнат събирането на урината от следващия ден след приемане на лекарството. Използвани са полиетиленови съдове, които по времето на колекция на урината са съхранявани със затворен капак. Не са използвани никакви добавки като стабилизатор. След събиране на диурезата цялото количество е внимателно размесено и част от него е прехвърлено в съдовете за транспорт и съхранение. 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 да 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

Изследвани са общо 473 здрави лица, както следва:

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. Разпределението на изследваните лица по пол и по възраст е представено на Табл. 8.

Таблица 8. Разпределение на изследваните лица по пол и възраст

Възраст	Мъже		Жени		Общо	
	n	%	n	%	n	%
< 31 год.	27	15.7	22	10.6	49	12.9
31-40 год.	28	16.3	45	21.7	73	19.3
41-50 год.	59	32.5	49	23.7	105	27.7
51-60 год.	30	17.5	62	30	92	24.3
61-70 год.	21	12.2	24	11.6	45	11.9
> 70 год.	10	5.8	5	2.4	15	3.9
Всички	172	45.4	207	54.6	379	100

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.

Подборът на лицата за включване в проучването е направен с помощта на следните критерии:

Критерии за включване

- Съгласие на лицата за участие в проучването
- Клинично здрави лица от двата пола
- Възраст – ≥ 12 г.в.

- Без наличие на токсична експозиция
- Без прием на хранителни добавки

Критерии за изключване

- Не се изследват лица с хронични страдания или боледуващи от простудни и други заболявания към момента на вземане на кръв и две седмици преди това.
- Изключват се лица, които приемат лекарствени средства
- Не се изследват лица в особено физиологично състояние – бременност, кърмене
- Не се изследват лица претърпели хирургична операция до 3 месеца преди вземането на кръвта

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 (21) и собствени съображения. Изключени са лицата приемали алкохол 24ч. преди изследването. В групата на пушачите са включени лица, които пушат 10 и повече цигари дневно.

При всички лица е изследвана серумната концентрация на 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. 9.

Таблица 9. 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 Curgenil). Само при 2 пациента, въпреки терапията, 24-часовата куприуреза 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, куприуреза, 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. Преди венепункцията се изчаква 10 мин. в седнало положение при психичен покой. Кръвта е взета при минимално травмиране. 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 K₂EDTA; 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 клинично-химични показатели

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.

Лабораторни изследвания на серумните параметри

– **Лабораторни изследвания за оценка на здравословното състояние на включените в проучването лица:** Gluc, CRP, Creat, TP, Alb, AsAT, AlAT, TBil, TChol, TG, HDL, LDL и Ср. Анализите са извършени с клинично-химичен анализатор Cobas Integra 400, ROCHE с реактиви и калибрационни материали на фирмата производител при спазване на препоръките за работа. Резултатите за LDL са получени индиректно чрез пресмятане по формулата на Friedewald.

Аналитична надеждност на използваните методи

Качественият контрол е извършен с контролни материали от лиофилизиран човешки серум в две нива – нормално (Precinorm U, Ref№10171743 122) и патологично (Precipath U, Ref№10171778 122). Невъзпроизводимостта на резултатите във време е определена чрез данни от извършвания ежедневно вътрелабораторен качествен контрол (ВЛКК) в продължение на 20 работни дни (n = 20). Лабораторията участва в програмите „Клинична химия“ и „Имунохимия“ към Национал-

ната система за външна оценка на качеството (НСВОК). Резултатите за коефициента на вариация (CV%) и максимално допустимото процентно отклонение на средна аритметична от „прицелната стойност” (d%) са в рамките на допустимата граница според действащия Медицински стандарт по Клинична лаборатория.

– **Определяне на церулоплазмин в серум**

Серумният церулоплазмин е определен чрез имунотурбидиметричен метод с използването на клинично-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 стабилизирани 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.

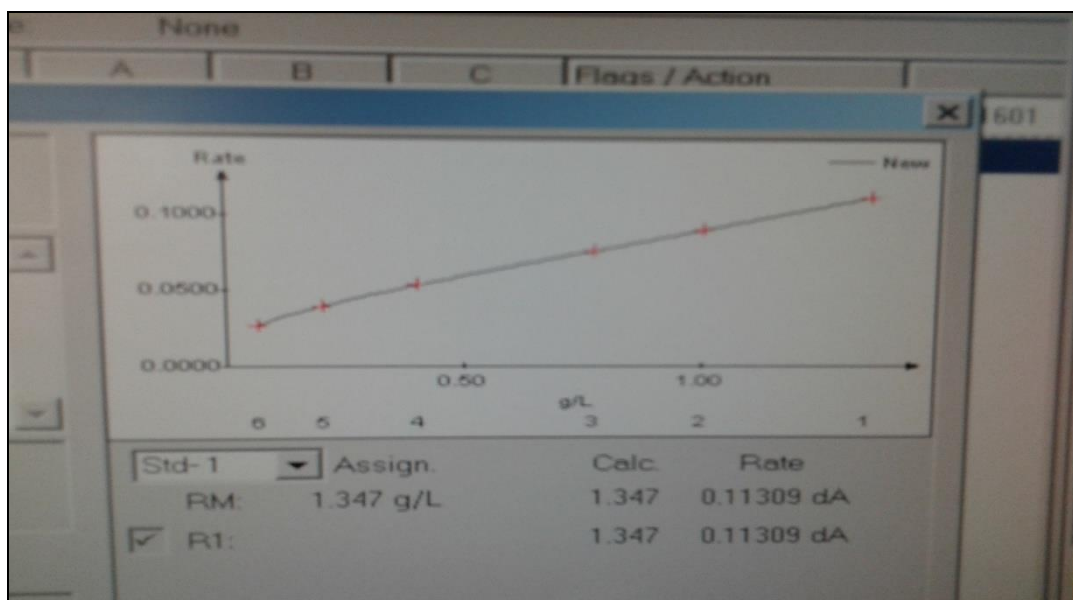
– Калибрационната крива се получава автоматично и се визуализира графично (Фиг. 3).

– 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 (117).



Фигура 3. Калибрационна крива на церулоплазмин определен с имунотурбидиметричен метод на клинично-химичен анализатор Cobas Integra 400 Plus

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

Невъзпроизводимост в непрекъснатата 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. 10. 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 (133) 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. 11.

Таблица 10. 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 11. 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. 12). Получените от нас средни аритметични стойности попадат в допустимия интервал на използваните контролни материали.

Резултатите за максимално допустимото процентно отклонение (d%) от участието на лабораторията в програма „Имунохимия” (2014/2015 г.) към НСВОК, са в рамките на допустимото отклонение – до 24%.

Таблица 12. 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 обявения от производителя референтен обхват. Получените от нас стойности са: средна стойност 0.25 ± 0.04 (от 0.19 до 0.38) g/L.

– Определяне на цинк в кръвен серум

Изследването е извършено с плъмъкова ААС на атомно-абсорбционен спектрофотометър „AAAnalyst” 400, Perkin Elmer. Предварителната подготовка на пробата включва центрофугиране на кръвта при < 1200 g за 10 мин на стайна температура и разреждане 1:4 с бидестилирана вода. Използван е метод на калибрационната крива със стандарт за цинк Zinc standard Perkin Elmer Pure, 2% HNO₃, 1000 mg/L; ЛОТ № 19-08ZNX1; PE#N9300168. Абсорбциите се сравняват с получената специфична абсорбция на подходящо приготвени стандартни разтвори с позната концентрация на съответния микроелемент. Анализаторът извършва трикратно измерване на всяка проба и автоматично изчислява средната аритметична от измерванията. Полученият резултат се умножава по фактора за разреждане и за превръщане в съответната мярна единица – $\mu\text{mol/L}$. Невъзпроизводимостта на метода бе определена с помощта на следните контролни материали с обявени стойности за цинк: Seronorm™ Trace Elements Serum L-1, REF 201405, LOT 0903106, SERO, Norway и Seronorm™ Trace Elements Serum L-2, REF 203105, LOT 0903107, SERO, Norway. За разреждане на пробите и на стандартите е използвана бидестилирана вода.

Резултатите от участието на лабораторията в програма „Микроелементи“ (съвместно с INSTAND) към НСВОК са за 2013г. са: $d\% = 7.4$ и за 2014г. $d\% = -9.5\%$. Получените резултати са в рамките на допустимото отклонение.

– **Определяне на антитела срещу HCV (анти-HCV антитела) и HCV-РНК** – показателите са изследвани в серум. Използван е ELISA тест HCV Ab (DIA.PRO), Италия, REF CVAB.CE. Вирусната HCV-РНК е изследвана посредством метода PCR.

Лабораторни изследвания в урина

– Изследване на протеинурия

Общият белтък в урина е определен чрез турбидиметричен метод с клинично-химичен анализатор Cobas Integra 400 Plus, ROCHE, Германия. Методът е калибриран с С.f.a.s. PUC (Ref№03121305) – стандартен материал на производителя. Границата на откриване на метода е 0.04 g/L, а линейният диапазон – 0.04-2.0 g/L.

За изследване на протеинурия бе използвана проба урина събирана за 24 часа. След измерване на диурезата цялото количество урина е размесено внимателно и около 30 мл са прехвърлени в стерилна полипропиленова чашка, която се доставя в лабораторията за анализ. Изследването е извършвано до 2 часа след това. Преди анализа всяка порция урина е центрофугирана при $< 1200g$ за 10 мин на стайна температура. Резултатът за протеинурия g/24h се получава по формулата:

$$\text{Протеинурия (g/24h)} = \text{концентрация на белтък (g/L)} \times \text{диуреза (L)}$$

Във ВЛКК са използвани следните контролни материали: Precinorm PUC (Ref№03121313) и Precipath PUC (Ref№03121318). Лабораторията участва в програмата „Количествено химично изследване на урината“ към НСВОК и резултатите са в границите на допустимия $d\%$ (до 24%). За 2014г. $d\% = -0.38$ и -14.17 и за 2015г. $d\% = -3.85$.

– Изследване на цинкуреза

Определянето на цинкуреза е извършено с пламъкова ААС на атомноабсорбционен спектрометър AAnalyst 400, Perkin Elmer, САЩ. За целите на проучването е използвана 24-часова урина. Събирането на урината е извършено след информирание на пациентите за условията на събиране и съхранение на пробата. Използвани са

3. Метод за определяне на мед в серум и урина

3.1. Апаратура

Изследванията са проведени с атомно-абсорбционен спектрофотометър “AAAnalyst 400”. Използваните работни параметри на спектрофотометъра са представени на Табл. 13.

Таблица 13. 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

3.2. Центрофуга Universal 320, 1401/1406, Hettich zentrifugen, Германия.

3.3. Автоматични пипети

3.4. Реактиви, калибратори и контролни материали

3.4.1. Бидестилирана вода

3.4.2. Основен калибрационен разтвор за определяне на мед: Atomic spectroscopy Standard, Copper, 1000 mg/L, 2% HNO₃, Perkin Elmer Pure, PE#N9300114, LOT#: 19-09CUX1

3.4.3. Междинен калибрационен разтвор с концентрация 10 mg/L – 1 ml основен калибрационен разтвор се разреждат до 100 ml с бидестилирана вода.

3.4.4. Работни калибрационни разтвори, които се приготвят от междинния калибрационен разтвор чрез подходящо степенно разреждане с концентрации на мед 0.15, 0.25, 0.5, 1.0 и 1.5 mg/L.

3.4.5. Контролни материали

– Контролен серум Seronorm™ Trace Elements Serum L-1, REF 201405, LOT 0903106, SERO, Norway

– Контролен серум Seronorm™ Trace Elements Serum L-2, REF 203105, LOT 0903107, SERO, Norway

– Контролна урина Seronorm™ Trace Elements Urine L-1, REF 210605, LOT 1011644, SERO, Norway

– Контролна урина Seronorm™ Trace Elements Urine L-2, REF 210705, LOT 1011645, SERO, Norway

3.5. Ход на определянето

За построяване на калибрационна крива са използвани стандартни разтвори с различни концентрации. Първо се определя сляпа проба с бидестилирана вода. Последователно са определят останалите стандартни разтвори. Анализаторът автоматично построява калибрационна крива, която се визуализира графично. След оценяването ѝ се прехвърля 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

4.1. Апаратура

Изследванията са проведени с атомно-абсорбционен спектрофотометър “Perkin Elmer 3030”. Използваните работни параметри на спектрофотометъра са представени на Табл. 14 и Табл. 15.

Таблица 14. 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 15. 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	–

4.2. Центрофуга Universal 320, 1401/1406, Hettich zentrifugen, Германия.

4.3. Автоматични пипети

4.4. Реактиви, калибратори и контролни материали

4.4.1. Бидестилирана вода

4.4.2. Основен калибрационен разтвор за определяне на мед: Atomic spectroscopy Standard, Copper, 1000 mg/L, 2% HNO₃, Perkin Elmer Pure, PE#N9300114, LOT#: 19-09CUX1

4.4.3. Междинен калибрационен разтвор с концентрация 1 mg/L – 100 µl основен калибрационен разтвор се разреждат до 100 ml с бидестилирана вода.

4.4.4. Работни калибрационни разтвори, които се приготвят от междинния калибрационен разтвор чрез подходящо степенно разреждане с концентрации на мед 2.5, 5, 10 и 15 µg/L.

4.5. Ход на определянето

Пробите се изследват по метода на стандартните добавки. В две пластмасови епруветки с капаче тип Eppendorf се накапват по 250 µl ликвор. В една от тях се допълва до 1000 µl бидестилирана вода (разреждане на пробата 1:4), а във втората се добавят 20 µl работен стандартен разтвор и се допълва до 1000 µl бидестилирана вода. Епруветките се запушват и съдържанието им се размесва добре. Инжекционен обем – 20 µl. Следва стартиране на програмата. Използва се пиролитна графитна тръбичка. Крайният резултат се изчислява по следната формула:

$$C_x = \frac{A_x}{A_{x+g} - A_x} \times C_g, \text{ където}$$

C_x – търсената концентрация

C_g – концентрацията на стандартната добавка

A_x – абсорбцията на определяемата проба

A_g – абсорбцията на стандартната добавка.

Резултатите се получават в $\mu\text{g/L}$ и за да се получи концентрацията в $\mu\text{mol/L}$ концентрацията се дели на атомната маса на медта 63.546.

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:

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

където умножението в скоби изразява съдържанието на мед в церулоплазмина (25, 66).

6. Определяне на индекс на телесна маса (ИТМ)

Индексът на телесна маса е изчислен по формулата:

$\text{ИТМ} = T/h^2$, където T е теглото в килограми, а h – височината в метри.

7. 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 Exel (v.2010). Графичните изображения са изготвени с помощта на Excel и SPSS v.19.

7.1. Статистически методи за обработка на данните при определяне границите на референтната област от еднократни измервания на група здрави лица.

За определянето на референтния обхват на мед в изследваните групи индивиди са използвани статистически методи, препоръчвани от Експертната група по теория на референтните стойности (EPTRV) към Международната федерация по клинична химия (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC).

На Фиг. 5 е представен алгоритъмът на препоръчвания от EPTRV метод за определяне на референтни граници (65). Този алгоритъм лежи в основата на специализираната програма REFVAL за статистическа обработка на събраните референтни стойности и определяне границите на референтната област.



Фигура 5. Алгоритъм на препоръчвания от EPTRV метод за определяне на референтни граници (65)

За проверка вида на разпределението са използвани тестовете на Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilks, Anderson-Darling, хистограми и коефициентите на асиметрия и ексцес.

Извършена е проверка за рязко отклоняващи се стойности.

Видът на разпределението определя избора на статистически метод за извеждане на референтните граници. При гаусово разпределение се прилага параметричен метод. При негаусово разпределение са извършва трансформация на данните, което се извършва автоматично чрез програмата REFVAL. При нормализиране на разпределението след трансформацията, доказано с теста на Anderson–Darling и коефициентите на асиметрия и ексцес се прилага параметричен метод, а в противен случай – непараметричен метод. Определя се 0.90 доверителен интервал за всяка от двете референтни граници.

7.2. Зависимостта между някои явления е изследвана с корелационен анализ.

7.3. Статистически методи за обработка на данните при проучване на различните клинични състояния с медна дисхомеостаза.

Приложени са дескриптивен анализ и непараметричен тест – Kruskal-Wallis H тест за откриване на статистически значими разлики. Приложен е T-тест за несвързани извадки при негаусово разпределение.

7.4. Стандартизация на данните за структурата на населението в изследваните населени места и честотата на хоспитализация на пациенти с БА. Стандартизираните стойности за броя на хоспитализациите са теоретични и показват какъв брой хоспитализации се очаква да има във всяко населено място, ако възрастовата структура не е наблюдаваната, а съвпада със стандартната структура.

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

Всички анализи са извършени в една серия. Използван е клинично-химичен анализатор ABX Pentra 400, Франция.

8.1. 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.

8.2. 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.

8.3. Ензимна активност на церулоплазмин – автоматичен ензимен метод с хромоген субстрат o-dianisidine, който след оксидиране под действие на холо-церулоплазмина, образува цветно жълто-кафяво съединение с максимална абсорбция при 460 nm. Методът се характеризира с: невъзпроизводимост ($Cv\% = 1.8$ в непрекъснатата серия и 2.6% в прекъснатата серия); линейност 12.1-194.1 IU/L; $Ld = 11.58$ IU/L и висока степен на корелация с концентрацията на церулоплазмин измерен с имунологичен метод (Pearson коефициент = 0.892; $p < 0.001$). Високата корелация между ензимната активност на церулоплазмина и измерената концентрация са дали основание на авторите да калкулират специфичната активност на церулоплазмина като отношение между активността и концентрацията на церулоплазмина (eCp/iCp UI/mg). Всички използвани реактиви са от фирмата производител Sigma-Aldrich, USA (126).

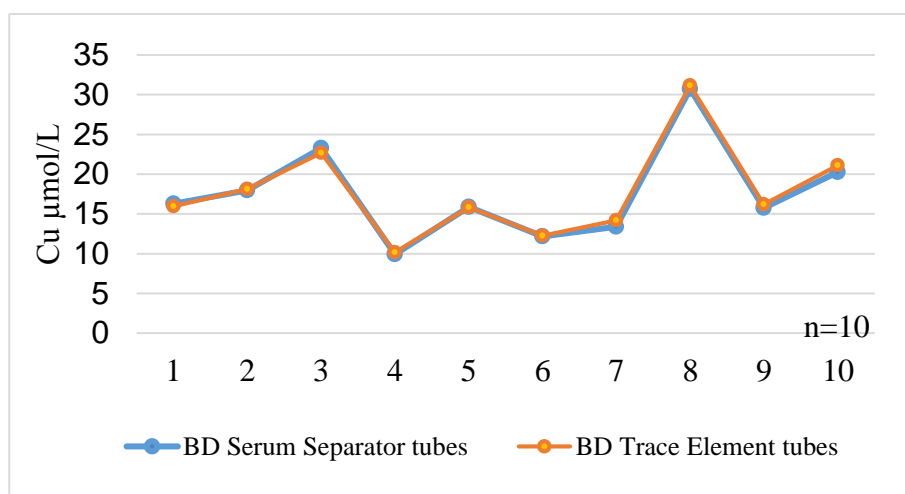
VI. РЕЗУЛТАТИ

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

Използваната от нас система за откриване и отстраняване на контаминиращи фактори, както и използването на директен метод за определяне на мед в кръвен серум с пламъкова ААС осигуряват ефективен контрол на контаминацията.

1.1.1. Серумни проби – сравнението между двата вида епруветки установи еднакви концентрации на мед в пробите серум: $17.56 \pm 6.01 \mu\text{mol/L}$ (BD Serum Separator tubes) и $17.76 \pm 6.00 \mu\text{mol/L}$ (BD Trace Element tubes) ($p = 0.20$) (Фиг. 6).



Фигура 6. Концентрация на мед в серум на пациенти при двата вида изследвани епруветки – BD Serum Separation tubes и BD Trace Element tubes, $p = 0.20$

1.1.2. Проби урина

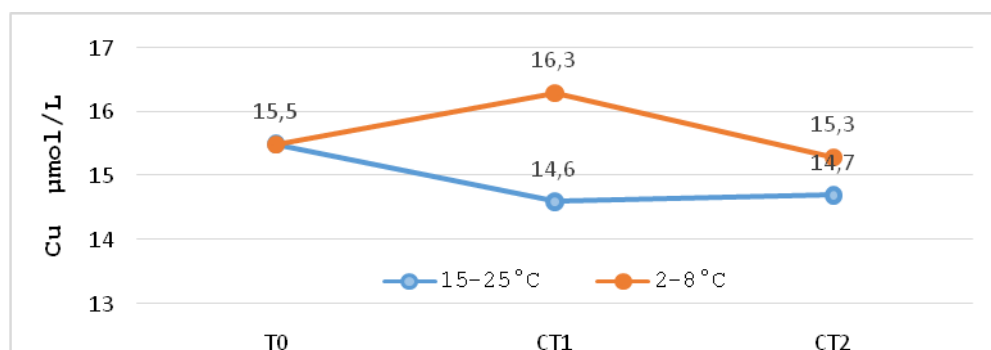
Измерената концентрация на мед във водните екстракти и екстрактите с азотна киселина от съдовете използвани за изследване на урина са по-ниски от границата за надеждно определяне ($0.17 \mu\text{mol/L}$) на медта с използвания метод. Измерените концентрации във водни екстракти при съдовете за транспорт и съхранение на ури-

на са по-високи от тези отчетени в екстрактите с азотна киселина. Вероятно азотната киселина потиска абсорбционния сигнал при атомизация в пламък (115).

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

1.2.1. Серум (n = 11)

Резултатите от експеримента за стабилност на мед в серум са представени на Табл. 16 и Фиг. 7. 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 7. Стабилност на мед (Cu µmol/L) в проби от серум

Таблица 16. Резултати от анализа на данните за стабилност на мед в проби серум

	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)

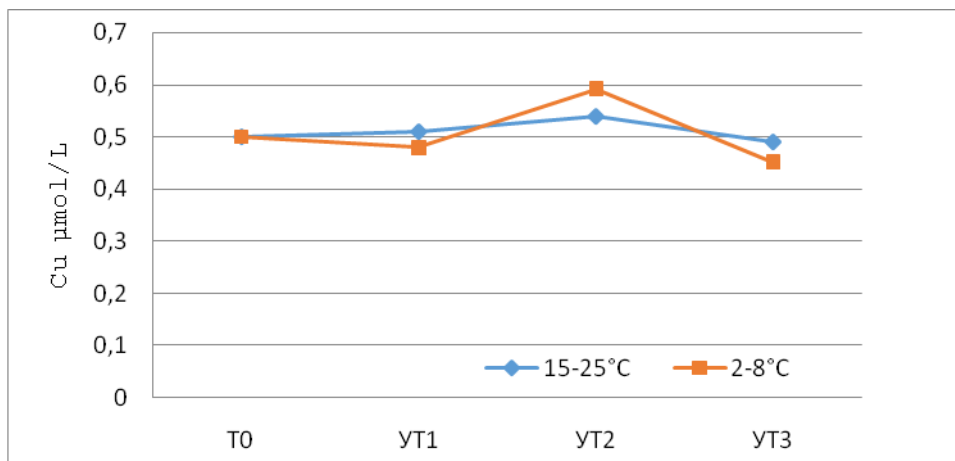
Концентрацията на медта (Cu µmol/L) в пробите урина от контролни пациенти е представена на Табл. 17 и Фиг. 8.

Проверката на стабилността на мед в проба урина, при контролната група пациенти, показва 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 17. Резултати от анализа на данните за стабилност на показателя в урина при контролна група пациенти

t°C	T ₀	УТ ₁		УТ ₂		УТ ₃	
		15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C	15-25°C	2-8°C
$\bar{x} \pm SD$	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 $\mu\text{mol/L}$ 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; *наличие на значима разлика между изследваните условия



Фигура 8. Стабилност на мед в проби урина – контролни урини

Проби урина при пациенти след прием на ДПА (n = 14)

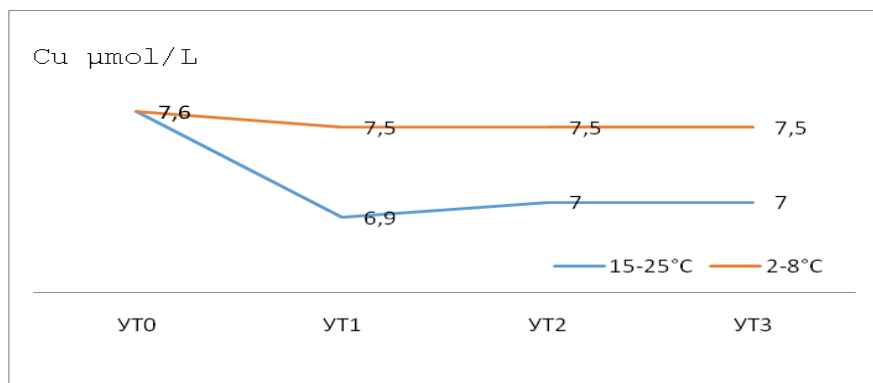
Концентрацията на мед (Cu $\mu\text{mol/L}$) в пробите урина е представена на Табл. 18 и Фиг. 9. При изследване стабилността на мед в проба урина, събирана за 24 часа от пациенти на фона на ДПА с течение на времето се установява понижение на концентрациите по-изразено при съхранение на стайна температура. Тогава средното про-

центно отклонение на концентрациите също е по-изразено ($d\% = -9.2$). При хладилна температура промените са незначителни с тенденция към понижаване $d\% = -1.8$.

Таблица 18. 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 9. Стабилност на мед в проби урина при пациенти след прием на ДПА

1.2.3. Ликвор

Концентрацията на мед (Cu $\mu\text{mol/L}$) в пробите ликвор е представена на Табл. 19. Статистическият анализ на данните показва, че няма значима разлика в концентрацията на мед измервана при подобрите периоди от време за съхранение ($p > 0.05$).

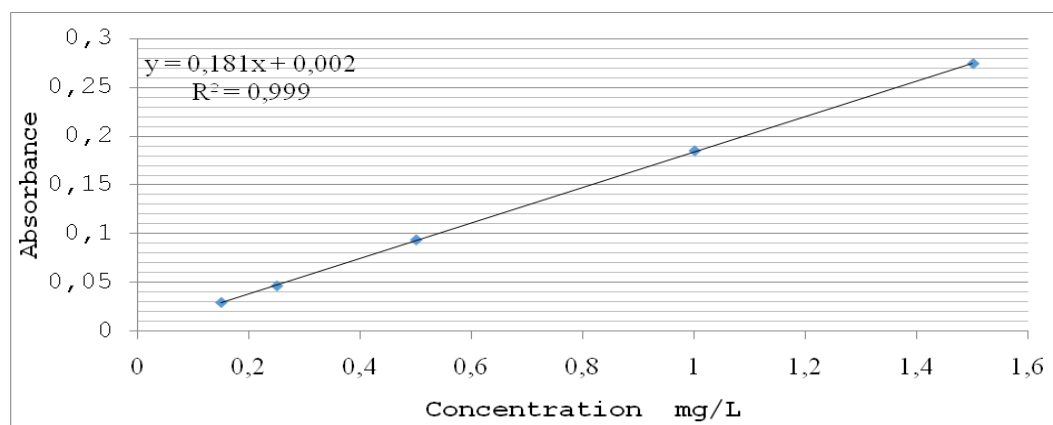
Таблица 19. Резултати от дескриптивен анализ на данните и t-тест за свързани извадки

	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

На Фиг. 10 е представена калибрационната крива на метода. Зависимостта между концентрацията на медта в кръвен серум и измерената абсорбция е линейна ($r = 0.999$). Калибрацията е извършена със стандартни разтвори с различни концентрации: 0.15, 0.25, 0.5, 1.0 и 1.5 mg/L. Всяка от тях е трикратно измерена и е взета средната аритметична. Калибрационната крива се построява автоматично от анализатора.



Фигура 10. Калибрационна крива за определяне на мед с директна пламъкова ААС

Аналитичната чувствителност на метода, изразена като характеристична концентрация (абсолютна концентрация на медта даваща 1% абсорбция или 0.0044A), установена от нас е 0.026 $\mu\text{mol/L}$. Границата на откриване отразява едновременно амплитудата на сигнала и базисния шум (базисната линия) и представлява най-ниската концентрация, която статистически достоверно се разграничава от сляпата проба. Границата на откриване изчислена от вариацията на сляпата проба ($L_d = X + 3SD$, $n = 20$) е 0.17 $\mu\text{mol/L}$ (0.01 mg/L). Рутинните измервания около границата на откриване са ненадеждни, защото шумът на сигнала представлява значим процент от общия измерваем сигнал. По правило, добро качество на резултатите се постига над границата на надеждно количествено определяне, която е 33% над L_d . Установената от нас граница на надеждно количествено определяне е 0.23 $\mu\text{mol/L}$ (0.015 mg/L). Линейният обхват на метода е 0.15-1.5 mg/L (2.4-23.6 $\mu\text{mol/L}$).

През целия период на проучването е извършвана проверка на невъзпроизводимостта и недостоверността на резултатите. Невъзпроизводимостта е оценена

чрез контролни материали с обявени прицелни стойности и стойности на допустимия интервал, посочени на Табл. 20.

Таблица 20. 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. 21.

Таблица 21. 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. 22).

Таблица 22. 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. 23. Концентрациите са изразени в $\mu\text{mol/L}$.

За времето на провеждане на проучването лабораторията участва в програмата „Trace elements 01” към Society for Promoting Quality Assurance in Medical Laboratories e.V. INSTAND, Германия. Резултатите са представени на фиг. 4.

Таблица 23. 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

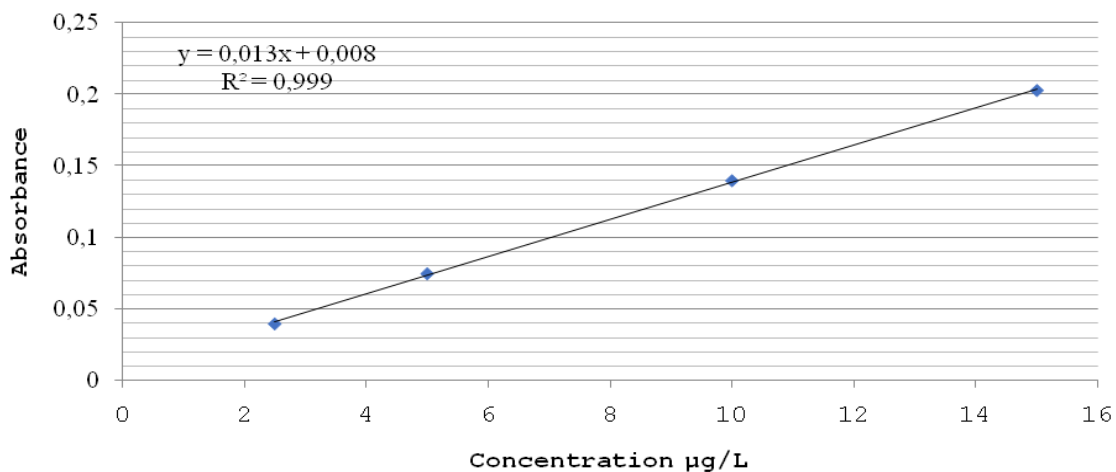
Калибрирането с помощта на подходящи стандарти е необходим етап от анализа. Това може да бъде направено по различни начини и често използван е методът на калибрационната крива. Тя се построява чрез разреждане на изходни разтвори на определяния елемент, които обикновено са с концентрация от 1000 mg/L. Интервалът на разреждането при ЕТ-ААС е обикновено 1-50 ppb (127).

За построяването на калибрационна крива са използвани водни калибрационни разтвори със следните концентрации: 2.5, 5, 10 и 15 µg/L. Видът на кривата е представен на Фиг. 11. 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. 12).

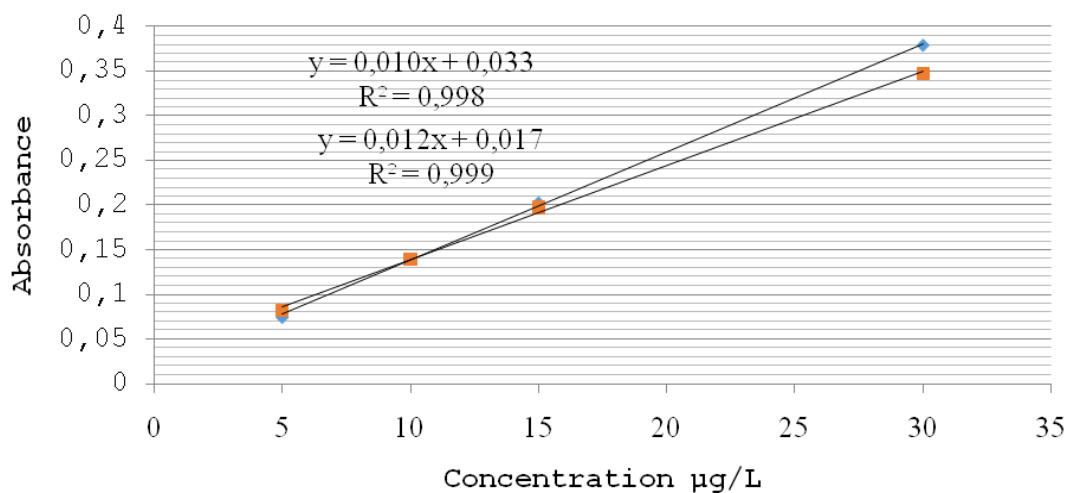
Границата на откриване, която е изчислена от вариацията на сляпата проба ($L_d = X + 3SD$, $n = 20$) е 0.005 µmol/L (0.31 µg/L). Установената от нас граница на надеждното количествено определяне е 0.007 µmol/L (0.44 µg/L). Линейният обхват на метода е 0.04-0.48 µmol/L (Фиг. 13).

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. 24.

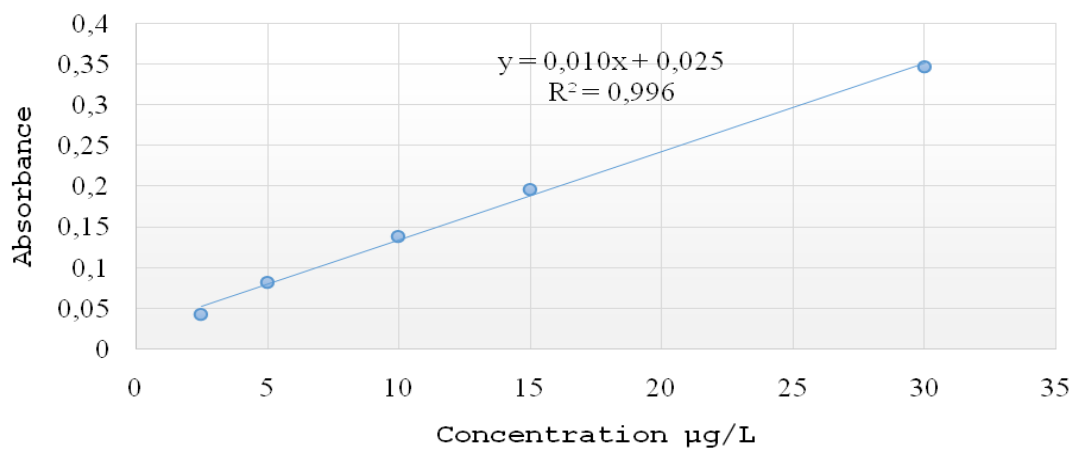
Невъзпроизводимост във време – ликвор от двама пациенти бе разпределен в епруветки тип Eppendorf – по 4 за всеки пациент. Те са съхранявани при температури от -40°C. Получените резултати са представени на Табл. 25.



Фигура 11. Калибрационна крива за определяне на мед с ET-AAS с водни стандарти ($r = 0.998$)



Фигура 12. Калибрационни криви с водни стандарти и проба ликвор



Фигура 13. Линеен обхват на метода за определяне на мед в ликвор (от 2.5 до 30 ppb, 0.04-0.48 µmol/L)

Таблица 24. 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

Таблица 25. 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. 26.

Таблица 26. 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%

Данните за всяка концентрация са средни стойности от двукратни определяния

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

Състоянието на клинично здраве на лицата от референтната група е установена чрез анамнестични данни за отсъствие на остро или хронично страдание към момента на вземане на кръвта, както и с клинично-лабораторни изследвания, доказващи липсата на анемия, нарушен глюкозен толеранс, остър възпалителен процес, чернодробна или бъбречна недостатъчност.

4.1. Резултати от хематологични и клинично-химични изследвания

Резултатите са представени таблично – Табл. 27.

Таблица 27. Резултати от проведените хематологични и клиничко-химични изследвания на референтната група лица (n = 379)

	Hgb g/L	RBC 10 ¹² /L	WBC 10 ⁹ /L	Gluc mmol/L	CRP mg/L	Creat μmol/L	TP g/L	Alb g/L
Mean	141.32	4.67	6.81	5.47	2.31	71.67	70.95	45.74
SE	0.69	0.02	0.09	0.05	0.11	0.87	0.34	0.22
Median	140.0	4.62	6.6	5.39	1.99	70.0	70.79	45.8
SD	12.85	0.49	1.62	0.91	1.79	14.86	5.15	3.28
Skewness	0.389	0.539	0.470	4.99	1.573	0.295	-.610	-.101
Range	69	3.29	9.50	11.96	10.69	90	43.23	18.6
Minimum	120	3.61	3.5	3.46	0.24	30	42.45	36.0
Maximum	181	5.8	12.5	6.3	5.42	120	85.68	54.6
	AsAT U/L	AlAT U/L	TChol mol/L	TG mmol/L	HDL mmol/L	Cu μmol/L	Zn μmol/L	Cu/Zn ratio
Mean	19.65	22.17	7.06	1.25	1.46	16.04	13.85	1.21
SE	0.44	0.71	1.79	0.049	0.048	0.17	0.19	0.01
Median	18	19	5.20	1.09	1.41	15.89	13.00	1.118
SD	7.53	12.32	2.149	0.712	0.50	3.33	3.68	0.3
Skewness	1.85	3.604	7.827	2.38	2.07	0.8	1.9	0.8
Range	63	111	10.56	5.94	3.43	22.79	29.83	2.43
Minimum	5	7	0.85	0.29	0.59	7.47	7.65	0.32
Maximum	40	55	10.79	6.23	4.02	30.26	37.48	2.75

При 57 човека от клинично здравата група са изследвани освен серумните нива на микроелементите (Cu и Zn), и серумни липиди TChol, TG, HDL, LDL. Тяхното разпределение по пол и населено място е представено на Табл. 28.

Таблица 28. Серумни липиди при клинично здрави индивиди ($\bar{x} \pm SD$)

Параметър	Контроли (n = 31)	Хиперлипемия (n = 25)	p-value
TCholmmol/L	4.6 ± 0.8	6.2 ± 1.02	< 0.001
HDL mmol/L	1.5 ± 0.4	1.5 ± 0.3	0.84
LDL mmol/L	2.6 ± 1.03	4.1 ± 0.6	< 0.001
TG mmol/L	0.91 ± 0.4	1.09 ± 0.4	0.098
LDL/HDL отношение	1.83 ± 0.9	2.8 ± 0.8	< 0.001
Cu μmol/L	15.06 ± 1.8	15.9 ± 3.2	0.15
Zn μmol/L	13.27 ± 2.02	13.43 ± 2.09	0.49
Cu/Zn отношение	1.16 ± 0.2	1.21 ± 0.25	0.26

4.2. Тип на разпределение на резултатите за серумна мед в изследваната група здрави лица

Видът на разпределението на резултатите за серумна мед е изследван отделно в общата група и за двата пола.

4.2.1. Оценка на хистограмите

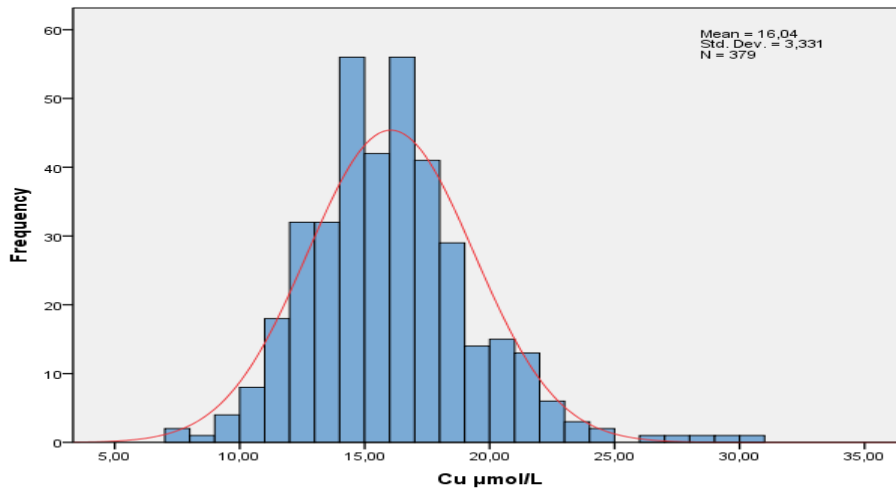
Типът на разпределението включва субективна оценка на хистограмите (Фиг. 14) и проверка за рязко отклоняващи се стойности. Общо 1 пациент (от мъжки пол) е отстранен от референтната група поради наличие на рязко отклоняваща се стойност. Изключването се базира на критерии за отстраняване на не-обичайно ниски и високи резултати заложи в програмата REFVAL (59).

4.2.2. Коефициенти на асиметрия (Skewnes – Gs) и ексцес (Kurtosis – Gk)

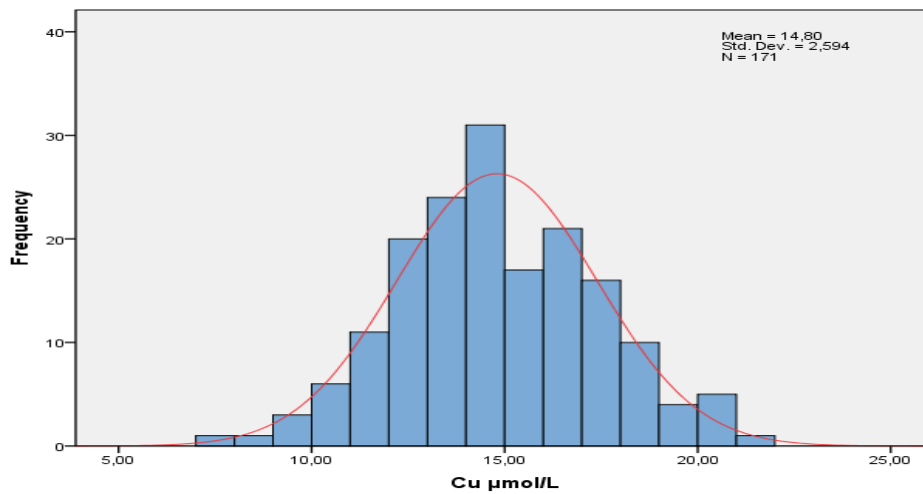
В Табл. 29 са посочени стойностите и статистическата значимост на коефициентите на асиметрия (Gs) и ексцес (Gk) на данните.

4.2.3. Показатели за измерване на централната тенденция

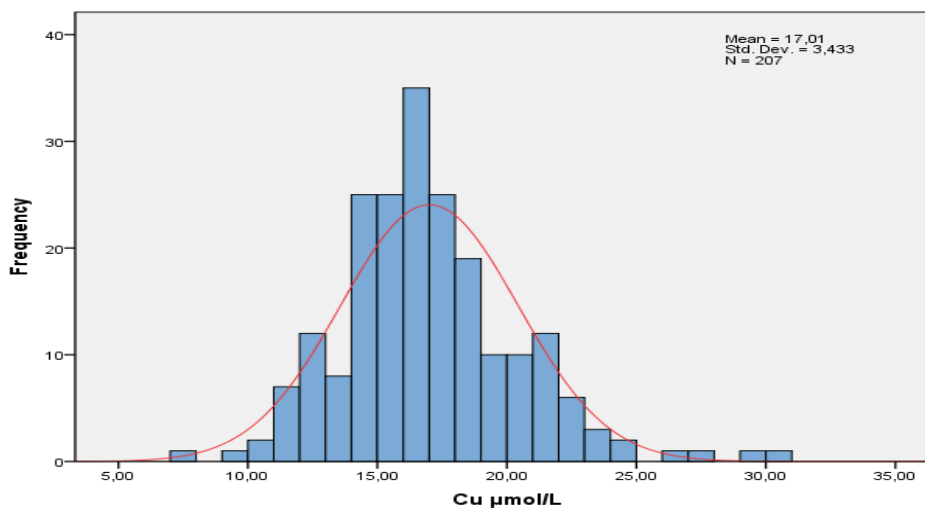
Лявата асиметрия в разпределението на резултатите се потвърждава и чрез показателите за измерване на централната тенденция – средна аритметична (mean) и медиана (median). Както в общата група, така и при двата пола median < mean, което означава по-голямо натрупване на резултатите вляво.



А) Обща група



Б) Мъже



В) Жени

Фигура 14. Хистограми на разпределението на серумна мед в общата група (А) и в двата пола (мъже – Б; жени – В)

4.2.4. Разпределението на резултатите за серумна мед в изследваната референта група (Табл. 29)

Таблица 29. Серумна мед в изследваната представителна извадка

		Персентиля						
$\mu\text{mol/L}$	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

Оценка на вида на разпределението на резултатите от определянето на мед в кръвен серум на клинично здрави лица от българската популация е представено на Табл. 30.

Таблица 30. Оценка вида на разпределението

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 $1 - P \geq 0.95\%$

4.3. Граници на референтната област за серумна мед в кръвен серум на лица от българската популация (Табл. 31)

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 31. Граници на референтната област за серумна мед в кръвен серум

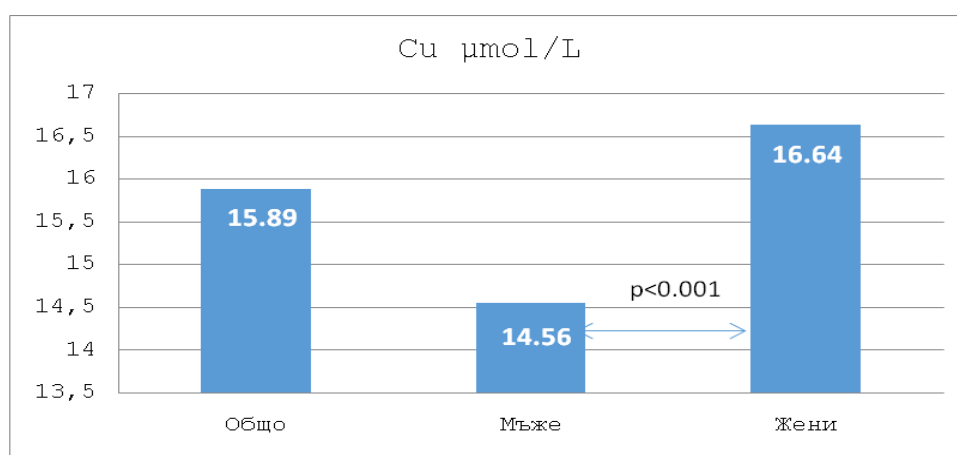
	Мед $\mu\text{mol/L}$		
	Мъже	Жени	Общо
Брой случаи	172	207	379
Ранг	7.47-28.95	7.97-30.26	7.4-30.26
Медиана	14.56	16.64	15.89
0.025 фрактил	9.89	11.06	10.33
90% ДИ	9.4-10.4	10.5-11.6	9.9-10.7
0.975 фрактил	19.95	24.87	23.65
90% ДИ	19.4-20.5	23.7-26.1	22.8-24.5

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 за серумна мед в зависимост от пола са представени на Фиг. 15, Табл. 32 и Схема 2.

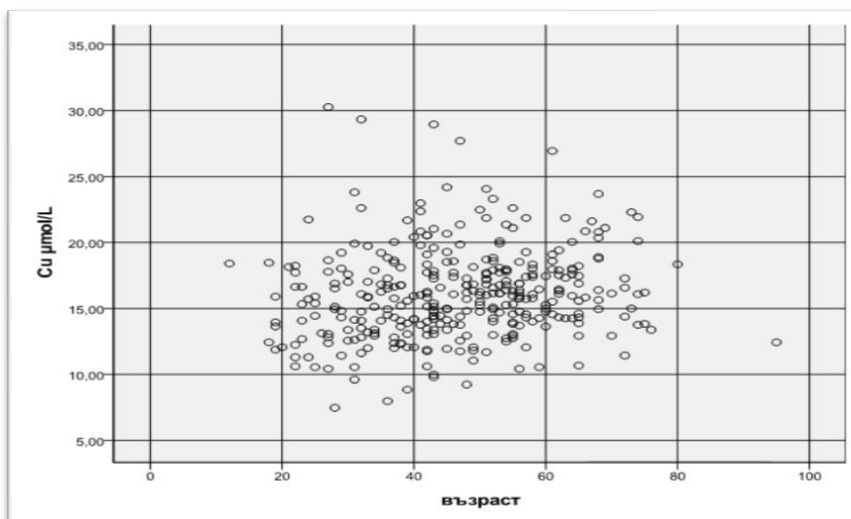
Установени са по-ниски стойности на мед при мъжете със статистически значима разлика спрямо жените ($p < 0.001$).



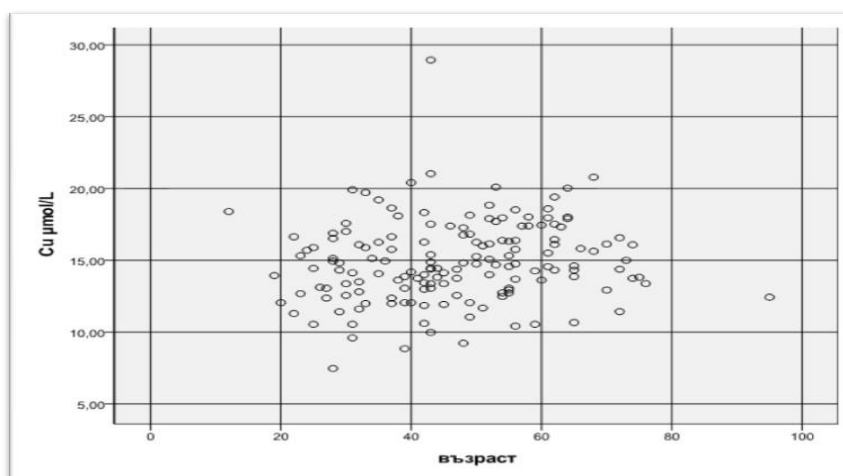
Фигура 15. Разпределение на серумната мед според пола (представени са медианите на резултатите)

Таблица 32. Разпределение на резултатите за серумна мед по пол

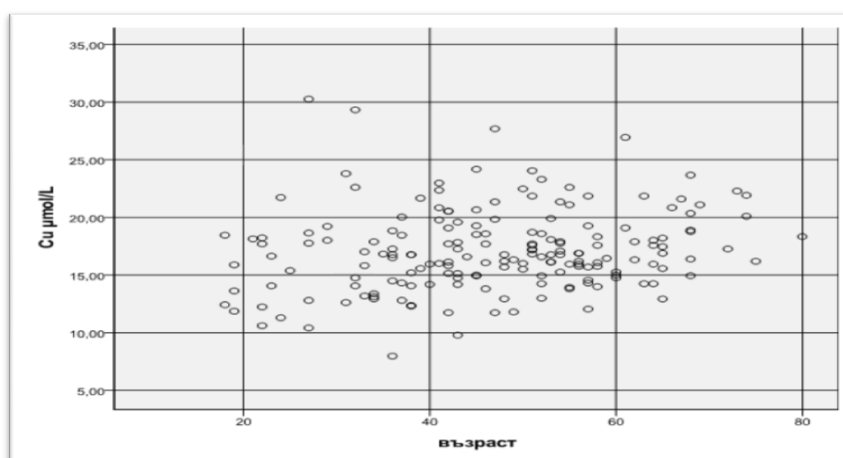
	Cu $\mu\text{mol/L}$		
	Мъже	Жени	Общо
n	172	207	379
Средна възраст	49 \pm 13	45 \pm 14	47 \pm 14
Средна ст.	14.88	17.00	16.04
SD	2.80	3.43	3.33
SEM	0.213	0.238	0.171
Медиана	14.56	16.64	15,89
Минимум	7.47	7.97	7.47
Максимум	28.95	30.26	30.26
IQR	13.06-15.65	14.76-18.65	13.87-17.89



А) Данни за общия брой изследвани (n = 379): $p < 0.001$; $r = 0.2$



Б) Данни за мъжки пол (n = 172): $p = 0.029$; $r = 0.174$



В) Данни за женски пол (n = 207): $p = 0.009$; $r = 0.2$

Схема 2. Възрастови промени в серумната концентрация на мед общо за изследваната група (А) и при двата пола (мъже – Б; жени – В)

5.2. Влияние на възрастта

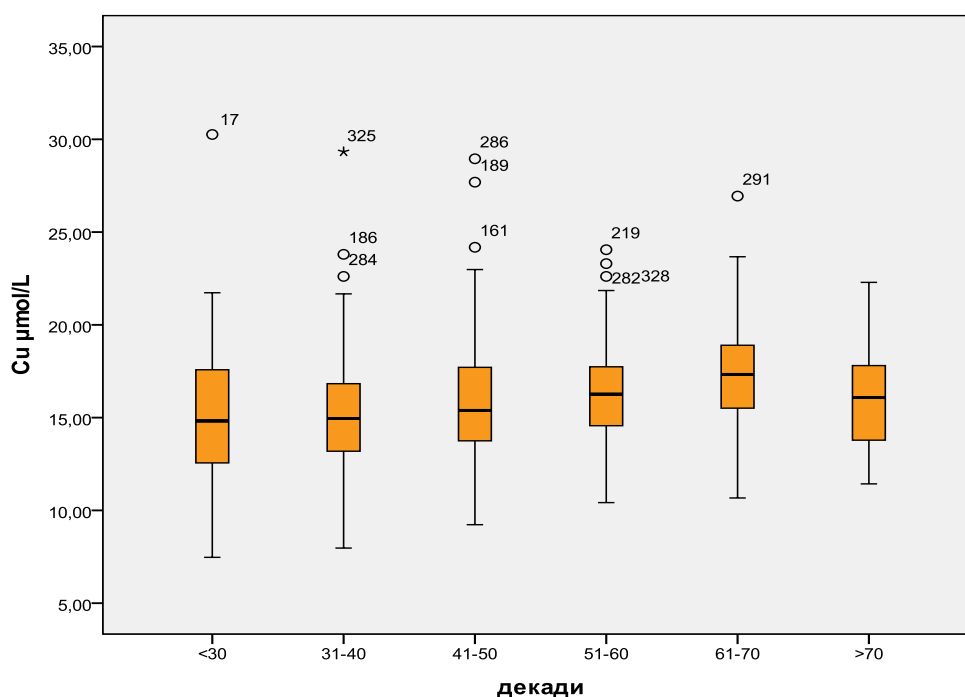
Промените на серумната мед в зависимост от възрастта са показани на Табл. 33, Табл. 34 и Фиг. 16.

Таблица 33. 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

Таблица 34. Разпределение на резултатите по персентили

Декади	Персентили						
	5	10	25	50	75	90	95
< 30	10.48	11.3	12.49	14.82	17.64	18.46	20.47
31-40	10.26	12.01	13.15	14.95	16.92	19.98	21.95
41-50	11.05	11.83	13.75	15.39	17.77	20.66	22.44
51-60	11.96	12.79	14.56	16.26	17.75	20.04	21.85
61-70	12.93	14.09	15.23	17.33	18.99	21.3	23.12
> 70	11.43	12.03	13.75	16.08	18.34	22.06	*



Фигура 16. Резултати за серумна мед според възрастта по декади

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. 35).

Таблица 35. 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 $\mu\text{mol/L}$			
$\bar{x} \pm SD$	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

И при трите възрастови групи се установи разпределение на резултатите за серумна мед близко до нормалното (тест на Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.05$), поради което анализът на данните продължи с прилагане на параметричния тест ANOVA Post Hoc за търсене на статистическа значимост между променливите. Получените резултати са представени на Табл. 36.

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

Таблица 36. Статистическа значимост на серумната мед според възрастта

Възраст (год.)		Cu $\mu\text{mol/L}$ $\bar{x} \pm \text{SD}$	p-value
Над 65	$\geq 40-65$	14.22 ± 2.3	$< 0.001^*$
	≤ 39	13.6 ± 3.3	$< 0.001^*$
40-65	> 65	17.48 ± 3.3	$< 0.001^*$
	≤ 39	13.6 ± 3.3	1.000
Под 39	> 65	17.48 ± 3.3	$< 0.001^*$
	$\geq 40-65$	14.22 ± 2.3	1.000

*наличие на статистически значима разлика

5.3. Влияние на географското положение

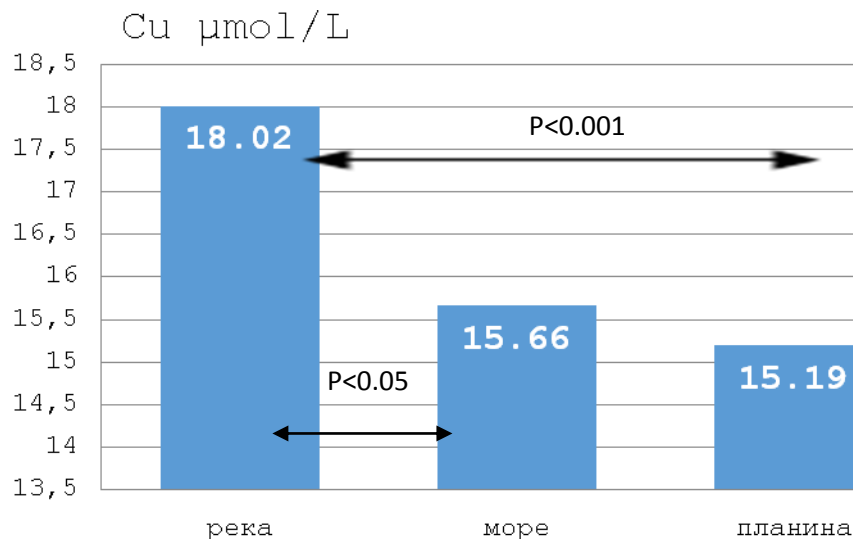
Наличие на значима разлика в серумната мед се установи ($p < 0.001$) между различните географски области включени в изследването. Данните от дескриптивния анализ на серумна мед според географската принадлежност са представени на Табл. 37.

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. 17.

Таблица 37. Дескриптивен анализ на данните за серумна мед според географската принадлежност

Група	n	\bar{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 17. Концентрация на серумната мед според географската принадлежност

5.4. Влияние на телесната маса

Установи се наличие на значима разлика в ИТМ между мъжете и жените ($p = 0.02$), като при мъжете е по-висок. Данните са представени в Табл. 38.

Установи се ниска степен на корелация между серумната мед и ИТМ както при мъже ($r = 0.305$; $p = 0.130$), така и при жени ($r = 0.192$; $p = 0.254$).

Таблица 38. Разпределение на серумната мед според ИТМ

	n	ИТМ		Cu μmol/L	
		$\bar{x} \pm SD$	Медиана	$\bar{x} \pm SD$	Медиана
Общо	63	23.53 ± 3.7	23.6	15.25 ± 2.7	14.82
Мъже	27	24.7 ± 3.5	24.6	14.83 ± 1.9	14.38
Жени	36	22.6 ± 3.6	21.8	15.56 ± 3.2	15.23

5.5. Проучване влиянието на тютюнопушене, прием на алкохол и физическа активност

Резултатите за серумната мед според влиянието на горепосочените фактори са представени на Табл. 39. С увеличаване на физическата активност серумните нива на медта спадат.

Таблица 39. Фактори, които могат да влияят върху серумните нива на мед

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

6. Резултати от проведените клинично-лабораторни изследвания за характеризирани на клиничното състояние на пациентите, включени в проучването – здрави, БУ и ХХС (Табл. 40)

Таблица 40. 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 \pm 12	37 \pm 12	51 \pm 10
Hgb g/L	148.9 \pm 15.2	143.5 \pm 13.5	147.5 \pm 12
WBC.10 ¹² /L	6.4 \pm 1.5	5.6 \pm 1.7	6.7 \pm 2.3
Creat $\mu\text{mol/L}$	82 \pm 13	72 \pm 18	79 \pm 14
TP g/L	70.24 \pm 3.9	71.6 \pm 5.9	72.22 \pm 6.7
Alb g/L	45.87 \pm 3.81	46.09 \pm 8.3	45.9 \pm 2.5
UPRO g/24h	н.о.	0.35 \pm 0.2	н.о.
AsAT/AlAT	19.6/19.7	30/34	60/78
TbIl	н.о.	15 \pm 7.8	14 \pm 6.22
INR	н.о.	1.15 \pm 0.11	н.о.
Cu $\mu\text{mol/24h}$ урина	н.о.	10.95 \pm 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 \pm SD = 5.564 \pm 0.708

7. Резултати от характеризирани на статуса на медта при клинично здрави лица от българската популация с разширен панел от лабораторни изследвания (Табл. 41)

8. Информативно съдържание на показатели за меден статус при някои патологични състояния – БУ, ХХС и БА (Табл. 42 и Табл. 43)

Таблица 41. Характеризиране на меден статус при клинично здрави лица от българската популация

Параметър	Резултати
n	41
Възраст	44 ± 13
Пол (мъже : жени)	16:25
Cu $\mu\text{mol/L}$	13.7 ± 2.72
Cp g/L (iCp)	0.276 ± 2.85
Cp IU/L (eCp)	103.4 ± 20.4
eCp/iCp IU/mg	3.72 ± 0.44
Cu:Cp	6.46 ± 0.75
NCC	0.64 ± 1.72
% NCC	2.3 ± 11.7

Таблица 42. 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:Cp	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 43. 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
Cp g/L	0.27 ± 0.2	0.31 ± 0.5
Cp IU/L	103.8 ± 9.8	96.3 ± 10.7
eCp/iCp	3.9 ± 0.4	3.2 ± 0.6
NCC	0.93 ± 0.7	3.66 ± 1.7
Cu:Cp	6.7 ± 0.3	7.74 ± 0.57

При двете групи пациенти, представени на Табл. 43, 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 ($p < 0.005$).

VII. 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 лабораторното изследване до интерпретацията на получения резултат. Plebani M et al. съобщават, че етапите извън аналитичното определяне са по-уязвими по отношение на риска от грешки (40). В микроелементния анализ контаминацията на пробата е кардинален проблем особено при определяне на елементи в биологичен материал с ниско съдържание (2). 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 (128), (66, 129, 130) и амниотична течност (2). Методични проблеми при определянето на мед няма (2) и методите за анализ на други биологични материали не се различават съществено от тези при серумни проби (131). 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”) (40), които са заложили като критерии в актуалния международен стандарт за акредитиране на медицински лаборатории – International Standard for medical laboratories accreditation – ISO 15189:2012 (39). 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). Според ISO 15189:2012 процесът на мониториране и контрол на показателите на качеството трябва да бъде планиран и периодично проверяван чрез обективни показатели (40).

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

Основната задача на клиничната лаборатория е да подпомага диагностиката и лечението на пациента. За да може това да се осъществи е необходимо лабораторната дейност непрекъснато да се подобрява и контролира. Това се отнася до всички етапи от общия лабораторен процес (Total testing process) (40). Най-много грешки се допускат при вземане, обработване и съхраняване на биологичните материали (48). Повече от 2/3 от лабораторните грешки произхождат от преданалитичния етап. Издадените през последните години ръководства в България (47, 48), както и Медицинския стандарт по Клинична лаборатория дават информация за стабилността на редица лабораторни показатели, но няма данни за високоспециализирани изследвания като микроелементен анализ.

1.1. Изследване контаминацията на пробите за анализ

Контролът на контаминация при изследване на мед е най-лесен в сравнение с всички други олигоелементи поради липсата на мед в лабораторната среда (56). Косвено доказателство за това е отличното съвпадение на средните измерени стойности при различни проучвания за серумна мед (10, 66, 101), мед в урина при пациенти с БУ (27, 28) и на мед в гръбначно-мозъчна течност (53, 57, 64).

При определяне на мед съдовете за събиране на биологичния материал и за неговото съхранение са основен потенциален източник на замърсяване на пробата (25). При различните видове биологичен материал се използват различни по обем и вид контейнери, но при повечето случаи те са съставени от полиетилен или полипропилен. Известно е, че при провеждане на изследвания в кръв видът на епруветките влияе върху получения резултат (42). В днешно време разнообразието на видовете епруветки е голямо. 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 (9, 41). 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. Използването на серумни епруветки от полиетилен със сепариращ гел е свързано с бързо и качествено отделяне на серума (41). Получените еднакви стойности за серумна мед от двата вида тествани епруветки дава основание да се заключи, че материалът, от който са изработени епруветките, съставът на сепариращия гел и капачката имат еднакво отношение към контаминацията на пробата. 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: $10.33\text{-}23.65 \mu\text{mol/L}$). В продуктивния си каталог фирмата производител декларира съдържание на мед във водни екстракти от епруветки BD Trace Element Tubes 5 mg/L ($0.07 \mu\text{mol/L}$) (132). 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 (2, 10, 11, 66, 101, 130), 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. ЕТ-ААС е значително по-чувствителен метод от пламъковата ААС (56).

Това съществено усложнява проблема за контрола на контаминацията, тъй като концентрацията на мед в урината е много ниска (0.16-0.24 $\mu\text{mol/L}$) (56). Чужди и български автори препоръчват всички използвани съдове при изследване на мед да бъдат грижливо предварително почиствани с 10-20% HNO_3 (2, 25, 41) като изключение може да се направи за съдове използвани при определяне на мед в кръвен серум, където очакваните средни стойности са високи (56). Изследването на лабораторните съдове при анализа на урина с пламъкова ААС в настоящото проучване е направено според международни препоръки (25) и по модели на експерти в този тип анализ (2). Получената от нас максимална стойност на мед във воден екстракт от тестването на съдовете за анализ на урината е $0.04 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$. Тази концентрация представлява 28% от ДРГ (0.142-0.825 $\mu\text{mol/L}$) за мед в урината за българската популация (2). Куприурезата се повишава значително при БУ или след прием на хелиращи медикаменти. Според алгоритъма за поведение при БУ от 2012 г. един от критериите за диагноза на заболяването е куприуреза над 1.6 $\mu\text{mol/L}$ (27). Пак според същото ръководство добър терапевтичен отговор е налице в интервала 3-8 $\mu\text{mol}/24\text{h}$. 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 (53). Изследването на куприуреза е свързано с допълнителни затруднения в преаналитичния етап – правилното отчитане на количеството урина и нейното подходящо съхранение по време на 24 часовия период на отделяне на урината (27). Употребата на стерилни полиетиленови съдове, с широко гърло и градуирана маркировка е напълно подходящо за целите на анализа.

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

Условията на съхранение са важни за стабилността на пробите – поддържане на определен температурен режим и времетраене на съхранението, както и евентуално добавяне на консервиращи вещества. В идеалния случай най-добре би било пробата да бъде изследвана възможно най-бързо след получаването ѝ, но когато се налага това време да бъде удължено, то трябва да се познават специфичните за всеки анализ условия за съхранение. Препоръките за транспорт и съхранение на пробите са обикновено емпирични и недостатъчни (133). Нестабилността се дава като абсолютна разлика, като коефициент или като процент отклонение на получените резултати от измерванията в първоначалния момент (T_0) и след определен период от време (T_x) (134). Оценката на нестабилността би могло да се направи чрез следните подходи:

- Пресмятане на средното процентно отклонение/разлика ($d\%$) по следния начин: $[(T_x - T_0)/T_0]_x \cdot 100$.

- Сравняване на средното процентно отклонение ($d\%$) с границата на приемливата промяна Acceptable Change Limit (ACL), която е базирана на аналитичната неточност на изследвания показател (ISO 5725-6)(134) или с общата грешка (Allowable total error, ATE) базирана на аналитичната и биологичната вариация (135).

- Допустимата неточност въз основа на промяната в рамките на индивидуалната биологична вариация – ATE (134).

- Промени в концентрацията под 10% (133).

- Медицински значими промени (133).

1.2.1. Стабилност в проби серум

Експериментално е изследвана стабилността на мед в кръвен серум за период от 1 и от 2 седмици при два температурни режима. Изборът на продължителност на съхранение е продиктуван от практиката – най-често в лабораторията се получават серуми транспортирани между 3-5 дни като ние удвоихме този пе-

риод на времето от пробовземането до извършването на анализа. По време на съхранението стабилизатори не са използвани. Статистическият анализ за наличие на значима разлика в концентрациите между изследваните периоди и температури (Табл. 16) показва наличие на значима разлика при всички случаи с изключение на 2 седмици в хладилни условия. Като абсолютни стойности разликата в концентрациите е под 1 $\mu\text{mol/L}$. Значение на тази разлика е пренебрежимо малка (под 10%) (133) и това се доказва със сравнението на средното процентно отклонение (d%) на резултатите с данни за АТЕ (135) (Табл. 44). Резултатите за средното процентно отклонение за всички изследвания условия не надвишават критерия за приемлива грешка (7.47%) базирана на аналитичната и биологичната вариация (135).

Таблица 44. 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

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.

1.2.2. Стабилност в проби урина

При изследване стабилността на медта 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. 17 и Табл. 18. Клиничната значимост на тези разлики е оценена чрез критерия за допустимата неточност въз основа на промяната в рамките на биологичната вариация (d%) (Табл. 45). 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 (134). В настоящото проучване не се установиха стойности на процентно отклонение на средната аритметична стойност, за различните периоди на съхранение от начално измерената в $УТ_0$, които да надхвърлят $ACL\%$. Абсолютната стойност на промяната в концентрацията на медта при всички тествани условия е под $1 \mu\text{mol/L}$.

Таблица 45. 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

По литературни данни пробите ликвор се съхраняват при стандартни условия – замразяване при температура -70°C (14). В нашето проучване е изследвана стабилността на микроелемента мед в ликвор при съхранение на температура -20°C . Статистическият анализ показва наличието на незначима разлика ($p > 0.05$) между сравняваните периоди. Средното процентно отклонение (d%) спрямо референтните условия ($ЛТ_0$) 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. Той е относителен аналитичен метод, при който концентрацията на определяемия елемент се отчита по калибрационна крива, построена с помощта на стандартни разтвори. Концентрациите на стандартите получени след разреждането на основния стандарт и използвани за построяването на калибрационна крива, осигуряват надеждност на получените резултати в клинично значимите области – патологично ниска, референтна и патологично висока. Калибрационната крива на метода е представен на Фиг. 10. Методът е линеен с $R^2 = 0.9998$, а линейният диапазон е 2.4-23.6 $\mu\text{mol/L}$.

Границата на откриване и граница на надеждно количествено определяне са съответно: 0.17 $\mu\text{mol/L}$ и 0.23 $\mu\text{mol/L}$. По литературни данни референтният обхват за серумна мед е около 8.8-29.4 $\mu\text{mol/L}$ (130), 10.7-26.0 $\mu\text{mol/L}$ (2), а за урина 0.07-1.0 $\mu\text{mol/L}$ (56). Концентрациите в ликвор при здрави са в следния порядък: 0.31-1.72 $\mu\text{mol/L}$ (45), 0.23 $\mu\text{mol/L}$ (57) и 0.18 $\mu\text{mol/L}$ (53). 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 $\mu\text{mol/24 ч}$.

Възпроизводимостта и точността на аналитичния метод сумарно се определя от общата грешка. Тя включва както предварителната подготовка, така и атомно-абсорбционното измерване. Възпроизводимостта на метода в серия е висока. Установените от нас CV са групирани около 2% за серумните проби и 5% за пробите урина (Табл. 21), което потвърждава високата надеждност на пламъковата ААС при определяне на мед, използвана в настоящото проучване. Получените данни са близки до съобщаваните в литературата (11, 56, 66, 130).

Възпроизводимостта във време по подразбиране е винаги по-голяма от тази в серия, защото втората е компонента на първата и е под въздействието на фактори, които действат за кратко време. Получената от нас възпроизводимост, изразена като вариационен коефициент е между 2-4% за серумни проби и между 7-8% за пробите урина (Табл. 22). Тези стойности са близки до съобщените в литературата (Табл. 46).

Таблица 46. Сравнителни данни за възпроизводимост и точност на пламъковата ААС при изследване на мед в серум (литературни данни)

	Наши данни	Цачев К. (56)	Díaz Romero C. (11)
Характеристична концентрация	0.05	0.09	0.07
Възпроизводимост в серия (CV%)	1.1	2.7	3.0
	2.01		
Възпроизводимост във време (CV%)	2.1	5.5	4.3
	3.4		
Точност – (d%)	-2.6	-1.5	2.7
	-3.8		

Изследванията, проведени с пламъкова ААС за определяне на мед в кръвен серум при определяне на референтна граница в представителна извадка от българската популация, притежават необходимата възпроизводимост и достоверност. Сравнението на резултатите за невъзпроизводимостта и неточността на метода са сходни с тези от литературата.

Лабораторията участва в контролен цикъл „Trace elements 01” INSTAND, където получените резултати са в рамките на доверителния интервал на измерването, за което лабораторията получи Сертификат за качество.

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

Предимство на ЕТ-ААС пред пламъковата ААС е по-високата чувствителност на метода. Това заедно с по-малкия обем на пробата бяха основните съображения, поради които се насочихме към използването на ЕТ-ААС при определяне на мед в ликворни проби.

Калибрацията е направена по метода на стандартната добавка. Методът е често прилаган при беспламъкова атомна абсорбция. Подходящ е при епизодични анализи на малък брой проби с неизвестен или сложен състав. Широко се използва в първоначалните етапи от разработването на методи като достъпен метод за оценка на точността и проверка на матричния ефект (131).

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 (45, 53, 57).

Аналитичната чувствителност е оценена чрез определяне на границата на откриване – L_d . Установената от нас граница на откриване е $L_d = 0.005 \mu\text{mol/L}$, граница на надеждно количествено определяне е 0.007 $\mu\text{mol/L}$. По данни от 1983 г. концентрацията на мед в ликвор нормално е в диапазона 0.31-1.72 $\mu\text{mol/L}$ (45). Нови сведения за средни стойности при контролни групи пациенти представят по-ниски концентрации: $0.19 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$ (14), $0.14 \pm 0.007 \mu\text{mol/L}$ (58), $0.18 \pm 0.04 \mu\text{mol/L}$ (53). Очевидно използването на ET-ААС метода за определяне на мед в гръбначно-мозъчна течност е напълно подходящо и с необходимата чувствителност.

Възпроизводимостта на метода е висока. Установената вариация в серия е $CV\% = 4.83$, а във време – 6.01%. Изследванията проведени с ET-ААС 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%). За приемливи се счита стойности на аналитичната откриваемост между 95 и 105% (125).

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

Терминът „референтни стойности“ е въведен през 1969 г. от Grasbeck и Saris и взема предвид всички характеристики на референтната група по пол, възраст, фактори от околна среда, методи за подбор на лицата, процедура за вземане на биологичния материал, условията за съхранение и пр. (65). Референтните стойности са

результати за даден лабораторен показател, получен от изследването на един индивид или група индивиди при точно описани условия за получаването им (137).

Изследванията върху референтните граници подлежи на периодично проучване, поради промяна стила на живот, промяна и развитие на аналитичните принципи и процедури и свързаните с това аналитична надеждност (65). Подробното проучване на референтния интервал, в представителна популационна група, може да бъде база за по-задълбочени наблюдения при влияния от околната среда, при професионална експозиция, заболявания или физиологични състояния, както и ефективност при медикаментозна терапия (66).

За последен път дефиниране на референтни граници за серумна мед при българи е направено през 1987 г. (2). Една от целите в настоящото проучване е актуализиране на данните и цялостно характеризиране на медния статус при здрави индивиди от българска популация.

Референтната група индивиди е подбрана според препоръките на Международната федерация по клинична лаборатория (IFCC).

Подборът на включените в проучването индивиди е по предварително определени критерии. Референтната група е подразделена по пол и възраст. Методът за определяне на мед в кръвен серум е валидиран. Използван е непараметричен персентилен метод. Използван е 90% доверителен интервал. Доверителният интервал е непрекъснатата поредица от значения, който обхваща с определена вероятност (напр. 90%) всички възможни значения на изчислената граница (2,65). При използването на непараметричен метод доверителният интервал дава възможност да се определи необходимият минимален брой референтни лица. При 90% доверителен интервал този брой е 120 души (2, 137).

Определянето на вида на разпределението на резултатите е важно за статистическия анализ при определяне на референтни граници. Разпределението на данните се отнася до начина по който група резултати е разположена около една централна точка (136). Видът на разпределение на резултатите определя вида на статистическите тестове приложени при анализа, което е важно за достоверността на статистическите заключения. При медицинските проучвания по-чести са

разпределенията различни от гасовото (2, 136), което се потвърди и в нашето проучване. За определяне на вида на разпределение на резултатите се използват следните статистически методи: построяване и оценка на хистограмата, тест на Kolmogorov-Smornoff, коефициент на асиметрия (G_s -skewness), коефициент на ексцес (G_k -kurtosis). Тестовете, с които се определя вида на разпределението са включени в програмата REFVAL за определяне на референтни граници (137).

При оценка на разпределението на резултатите за серумната мед с програмата REFVAL, 1 резултат (от мъжки пол) бе отстранен като рязко отклоняващ се и не е включен в крайното пресмятане на границите на референтния интервал.

Анализът на получените в настоящото проучване стойности за G_s и G_k 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. Това означава, че дясната страна на графиките е по-дълга от лявата, което означава по-малка честота на резултатите за серумна мед които са близо до горна референтна граница. Стойностите на G_k говорят за плоскостта или стръмнината на кривата на разпределение. При мъжете кривата на разпределение на резултатите е по-полегата ($G_k < 0$). В общата група и при жените е налице по-висока крива с по-стръмни рамена, което показва натрупване на стойностите в централната част (островърхност на кривата). При разпределенията с лява асиметрия разграничаването на ниски стойности, т.е. на недоимъчни състояния, става по-лесно (2). Подобно на нашето проучване данните за разпределението на резултатите за серумна мед при здрави българи са данните от изследването на Цачев К. от 1987г. (2).

Литературната справка за серумните нива на мед при различни здрави популации от различни географски райони, с различен хранителен режим, показва общи тенденции – полово зависими разлики със стойности по-високи при жените (10, 41, 66, 130, 134). Обратно, в проучване на българска популация от 1987 г. (2), по-високи нива на мед са установени при мъжете – 17.3 $\mu\text{mol/l}$ срещу 16.8 $\mu\text{mol/l}$ при жените. Сравнителни данни за референтни стойности в различни националности съобщени в литературата са представени на Табл. 47.

Таблица 47. Референтни стойности на серумна мед в различни проучвания съобщени в литературата

Област/страна	Cu $\mu\text{mol/L}$		n
	Мъже	жени	
Италия, 1990 (130)	8.81-29.42		218
Иран, 2009 (10)	10.99-21.98	12.56-24.34	2233
Италия, 2011 (66)	12.1-18.9	12.7-24.8	215
Испания, 2002 (11)	11.01-22.03	12.6-24.4	395
България, 1987 (2)	11.1-26.2	10.7-27.3	345
Настоящо проучване, 2015	9.9-19.95	11.06-24.9	397

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 $\mu\text{mol/L}$. Средната на всички референтни стойности по литературни данни е за мъжете 16.4 $\mu\text{mol/L}$ и за жените – 18.5 $\mu\text{mol/L}$. Установената от нас средни стойности за мъже и за жени са съответно 14.8 $\mu\text{mol/L}$ и 17.0 $\mu\text{mol/L}$, т.е. по-ниски от общата средна референтна стойност. В сравнение с данните от проучването за българската нация от 1987 г. средната стойност на серумната мед при мъжете е по-ниска с 2.74 $\mu\text{mol/L}$, а при жените с 0.86 $\mu\text{mol/L}$ (2).

Установената в проучването ДРГ (10.3 $\mu\text{mol/L}$) за двата пола е еднаква с данните от 1987г. (10.7 $\mu\text{mol/L}$) (2). В сравнение със същото проучване ДРГ при мъжете се понижава, а при жените се повишава. В сравнение с данни за други страни установената от нас ДРГ е от същия порядък (Табл. 47).

ГРФ от нашето проучване е по-висока при жените (24.9 $\mu\text{mol/L}$) отколкото при мъжете (19.9 $\mu\text{mol/L}$), която зависимост е същата и при изследването то 1987г. (мъже – 26.2 $\mu\text{mol/L}$ и жени – 27.3 $\mu\text{mol/L}$). Установената от нас ГРГ е от същия порядък по литературни данни (Табл. 47). В сравнение с данните от 1987г. значително понижение (с 6.25 $\mu\text{mol/L}$) се забелязва в ГРГ при мъже. Установените от нас средни стойности на концентрацията на серумната мед 14.88 $\mu\text{mol/L}$ за мъжете са по-ниски от тези, съобщени за нашето население от други автори – Цачев К. (1987) при 184 мъже – 17.3 $\mu\text{mol/L}$ (2).

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. Посочените разлики с данните от

1987 г. вероятно са резултат от действието на различни фактори като възрастова характеристика на изследваните лица, начин на хранене, условия на труд и бит, аналитична вариация и др.

Приемът на мед в организма става най-вече с храната и водата (7, 8, 21). 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. Подобни ниски стойности за недостатъчност на мед (под 5%) се съобщават и за населението от Канарските острови (11) и Кувейт (138). Съвременни данни за района на Сантяго, Чили (148) съобщават за дефицит на мед при 32.9% от населението над 60-годишна възраст.

5. Фактори на вариация на мед в кръвта

5.1. Влияние на пола

Разликите между двата пола за серумна мед са добре известни и потвърдени от много автори (2, 4, 5, 10, 11, 14). Затова за този показател се изчисляват референтни граници отделно за мъже и жени. Резултатите от настоящото проучване потвърждават разликите между двата пола с висока степен на значимост ($p < 0.001$).

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

Обяснението за тази разлика най-често е действието на естрогените, които стимулират синтеза на церулоплазмин (4). От гледна точка на това, че в своята физиология микроелементите в организма са взаимосвързани (1, 2, 93), логично е по-високите нива на мед при жените да отразят адаптивни физиологични механизми по отношение на немалката честота на железен дефицит сред тази субпопулация (14).

5.2. Влияние на възрастта

Обусловените от възрастта разлики в резултатите от различни лабораторни изследвания се дължат на физиологични промени в организма, които протичат

по време на растежа, хормонални промени и дегенеративни изменения с напредването на възрастта (2). От друга страна съдържанието на мед в организма зависи от редица фактори на околната среда като диета, индустриализация, географско разположение, геоложки състав на почвите и водите, начин на приготвяне на храната, прием на медикаменти и др. (8, 9, 22).

Липсват данни от задълбочени проучвания за разпределението на концентрацията на серумната мед по възрастови групи за българската популация. Чужди автори съобщават за разлика между декадите с (11) или без (66) статистическа значимост.

Нашето изследване 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. В абсолютни стойности максималната разлика между групите възлиза на $2.79 \mu\text{mol/L}$. 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 ($p < 0.001$) повишени нива на мед, се отчетоха при по-възрастните хора (Табл. 35). Този резултат представлява интерес във връзка със случаите на спорадична форма на БА с проявен полиморфизъм на АТР7В генът, при които генетично е детерминирана дисхормеостаза на медта в посока натрупване, като повишението е за сметка на свободната фракция на медта (7). 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 (21).

Възрастовите промени са по-силно изразени при жените ($CV\% = 22$) и то във възрастовата група ≤ 65 г.в. Различната динамика наблюдавана при двата пола може да се обясни с факта, че при жените менструалната активност и менопаузата повлияват серумните нива на мед (4). Нашите резултати показват относителна стабилност на концентрациите на мед в серума в 4 и 5 десетилетие. Най-

високи стойности са измерени във възрастта над 61 г.в. Данните в литературата съобщават за най-високи стойности на серумната мед в декадата между 20 и 30 г.в. (5, 11) или 41-60 г.в. (66). Очевидно данните за възрастовото разпределение на мед в кръвта при популации от различна националност са доста разнородни, което би могло да се отдаде на фактори като аналитична вариация, вид на биологичния материал използван за определяне на медта, стил на живот, генетични различия и др.

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. Изследвано е градското население от 5 града – София, Пазарджик, Русе, Раднево и Варна. 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. 37 и Фиг. 17.

По литературни данни значимостта на разликите в серумната мед в зависимост от географското разположение са противоречиви (11, 66).

По данни за българската популация от 1987 г. (2) има сведения за наличието на геолого-географски обусловени различия в серумната концентрация на медта, като проучването сравнява лица от българска популация с лица от чужда националност посетили България като туристи.

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. Бъдещи проучвания, които да включат изследване

състава на почвите и водите в изследваните региони биха дали конкретни данни за установената географска зависимост на серумната мед.

5.4. Влияние на телесната маса

Известно е, че телесната маса влияе върху някои клинично-лабораторни показатели. Значението на телесната маса за серумните нива на мед е оценено чрез изследване корелацията на ИТМ и концентрацията на серумната мед. Проучването установи, че ИТМ се различава статистически между половете ($p = 0.02$), като е по-висок при мъжете (24.7 ± 3.5) в сравнение с жените (22.6 ± 3.6). За разлика от данни в литературата (**10, 138**) не се установи корелация между ИТМ и серумните нива на медта в изследваната група индивиди от българската популация ($r = 0.305$; $p = 0.13$).

5.5. Зависимост между нивата на серумна мед и липидния профил

Някои микроелементи като мед и цинк, имат важна роля за модулирането на липидния статус в организма (**140**). В процеса на атерогенеза медта окислява LDL. Roland A et al. съобщават за метод, чрез който свързването на медта и LDL се измерва количествено, което дава информация за ефекта от приложението на антиоксиданти (**140**).

Резултатите от нашето проучване са представени на Табл. 28. Статистически значима разлика в серумните концентрации на мед ($p = 0.541$) и цинк ($p = 0.741$) между контролни индивиди и лица с хиперлипемия не е установена. Не е установена значима корелация между серумните нива на липиди и микроелементите мед и цинк, както в контролната група пациенти, така и при лицата с хиперлипемия (Табл. 48).

Резултатите, цитирани в литературата са противоречиви (**141**). За по-задълбоченото изясняване на корелационната зависимост между липидния профил и статуса на микроелементи е необходимо да се проведе проучване с голям брой включени единици.

Таблица 48. Корелационна зависимост между липидния профил и серумни нива на мед и цинк в изследвана група клинично здрави лица от българска популация: контролна група (n = 31) и лица с хиперлипемия (n = 25).

Параметър	Контролна група пациенти n = 31		Пациенти с хиперлипемия n = 25	
	Cu $\mu\text{mol/L}$	Zn $\mu\text{mol/L}$	Cu $\mu\text{mol/L}$	Zn $\mu\text{mol/L}$
TChol	r = -0.009 p = 0.963	r = 0.013 p = 0.945	r = 0.079 p = 0.712	r = -0.032 p = 0.88
HDL	r = -0.088 p = 0.663	r = 0.075 p = 0.710	r = 0.237 p = 0.301	r = 0.116 p = 0.615
LDL	r = -0.076 p = 0.712	r = 0.087 p = 0.671	r = 0.290 p = 0.202	r = 0.027 p = 0.907
TG	r = 0.277 p = 0.138	r = 0.107 p = .573	r = -0.099 p = 0.661	r = 0.071 p = 0.754
LDL/HDL	r = 0.027 p = 0.897	r = 0.038 p = 0.855	r = 0.053 p = 0.819	r = -0.049 p = 0.833

r – коефициент на Pearson; p-value – уровень на значимост

Дефицитът на някои микроелементи като цинк, мед, манган и др. може да доведе до нарушена липидна обмяна. От друга страна наличието на висока корелация между липидния профил и даден микроелемент би дало възможност чрез промяна в диетата да се повлияе благоприятно върху липидния статус (**141**). Хиперлипемията е основен рисков фактор за заболявания на сърдечно-съдовата система (**141**), а освен това се посочват и като един от рисковите фактори за развитие на БА (**21, 93**).

5.6. Влияние на тютюнопушенето, консумацията на алкохол, физическа активност и продължителността и качеството на съня

По-голямата част от анкетираните лица (58%, n = 18) са непушачи. Не се установи статистическа разлика в нивата на серумната мед в зависимост от употребата на цигари. Тези данни потвърждават съобщените в литературата (**5, 41**).

Анализът на влиянието на алкохола върху резултатите за мед в кръвен серум установи, че не съществува статистическа зависимост, което е в съгласие с други публикувани данни (**41, 66**). Оценката на влиянието на алкохола се усложнява от комбинираното въздействие на редица фактори – едновременна употреба

на алкохол и цигари, контрол на достоверността на отговорите на лицата за употребата на алкохол и брой изпушени цигари дневно.

По отношение на физическата активност се установи незначима разлика в концентрацията на мед, като тенденция към по-ниски нива се установи при активно спортуващите лица. Според Díaz Romero C et al. повишената физическа активност се свързва с понижение на серумната мед (11). Съществуват и противоположни мнения (142).

Song Ch et al. (143) предполагат, че микроелементите мед и цинк участват в процеси определящи продължителността на съня, поради факта че те са антагонисти на рецептора за N-methyl-D-aspartate glutamate (NMDA), който медира съня (143). По литературни данни нормални нива на цинк и съотношение Cu/Zn са отчетени само при индивиди с продължителност на съня над 7-9 часа в денонощието (142). Нашите наблюдения са за тенденция за статистически по-висока серумна мед ($p = 0.09$) при индивиди, които спят под 7 часа в денонощието и характеризират съня си с трудно заспиване и лесно събуждане. Тълкуването на данните от тези въпроси трябва да се извършва с предпазливост предвид субективния характер на въпросите и отговорите.

6. Показатели, с които може да бъде характеризиран медния статус в организма

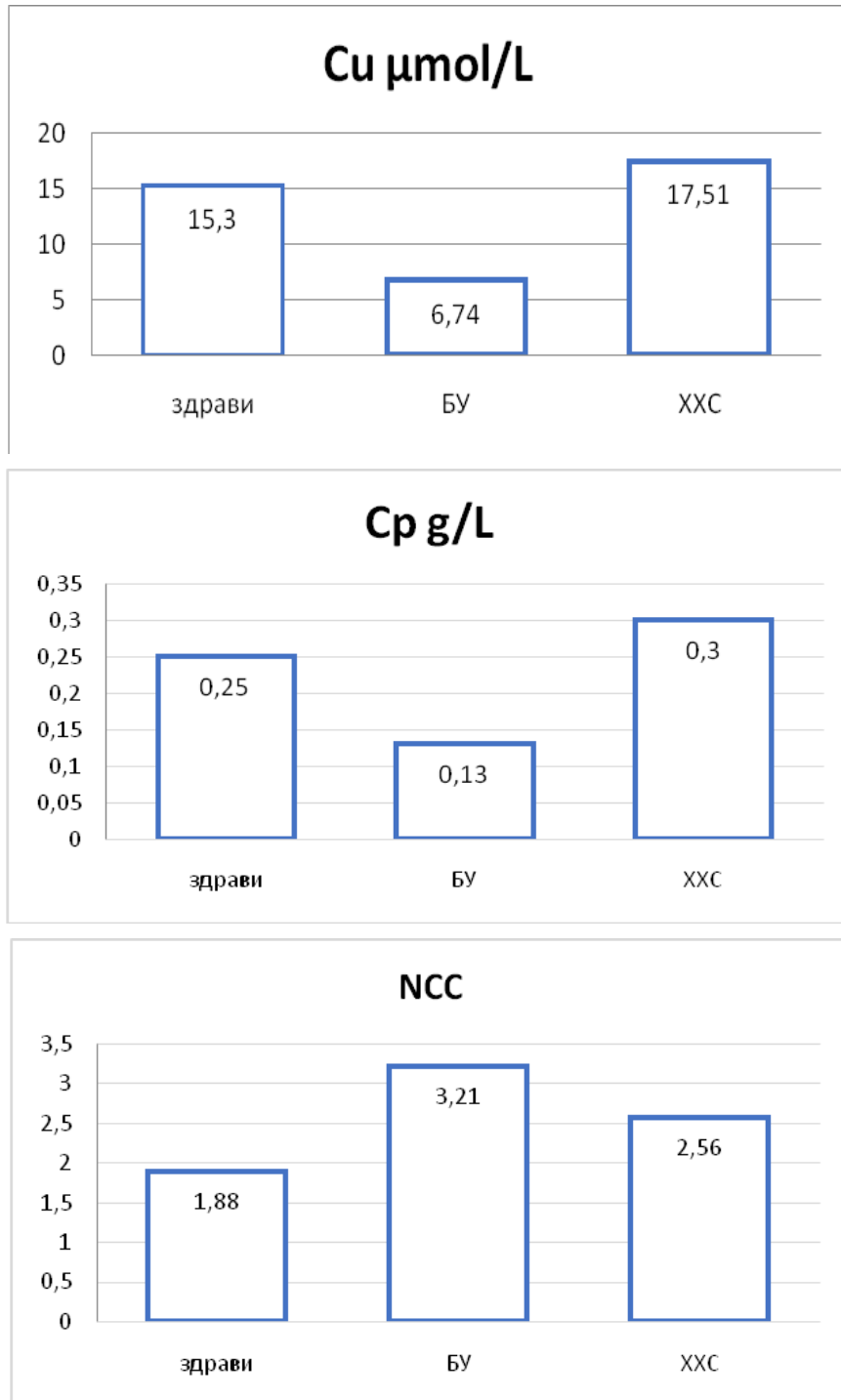
Характеризирането на медния статус в организма означава възможност за измерване на показатели, свързани с медната обмяна. Това е широко понятие, в което влиза както общата мед в кръвта, така и измерването на различни функционални форми на медта в процеса на нейния метаболизъм и разпределение в организма. 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 (144), АТР7А, мРНК на АТР7А (29), определяне с PCR методи на мРНК на IL-2 (16), бластогенна активност на левкоцитите, гена експресия на

медни металоензими (16) 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 (7, 27, 72). 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) (1, 126). 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. 42. и Фиг. 18.

При клинично здрави индивиди са измерени средни концентрации за серумна мед и церулоплазмин в рамките на референтния обхват. Тези две изследвания са най-честите и рутинно назначаваните при изясняване на медния статус на пациентите (27, 28). Понижение на серумната мед и на церулоплазмина може да се наблюдава, както при състояния на дефицит на мед, така и при БУ, която е генетично детерминиран дефект на медната обмяна, при която е налице натрупване на мед в организма (145) (Фиг. 18).



Фигура 18. 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 (здрави), болни с БУ и лица с ХХС

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 ме-

тоди за разпознаване на холо- от апоформата на церулоплазина (67). 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 церулоплазина (Cu:Cr). Това става по следната формула: [серумна мед $\mu\text{mol/L}$] x 0.132/ [церулоплазмин g/L] (145).

Отношението Cu:Cr 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:Cr 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.

Infusino I et al. препоръчват всяка лаборатория да определи собствени референтни граници за серумна концентрация на церулоплазмин (67), което също важи и за „cut off” стойността на Cu:Cr отношението (145). Според данните от проведеното проучване (Табл. 41), Cu:Cr за изследваната група е 6.46 ± 0.75 . Тази стойност е близка до цитирани в литературата – 6-8 (145) и има своето физиологично обяснение.

Съдържанието на мед в структурата на церулоплазина се измерва най-добре чрез измерване на оксидазната активност на церулоплазина, поради недостатъците на имунологичните методи, които вече бяха споменати (146). 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 (147).

По данните, представени на Фиг. 19 е видно, че при хора без съмнение за нарушения в хомеостазата на медта се наблюдава нормална оксидазна активност на церулоплазина, 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 (27, 28)]. При същата популация отношението Cu:Ср е 6.46, което потвърждава физиологичните нива на медта в свързана и “свободна” форма (145).

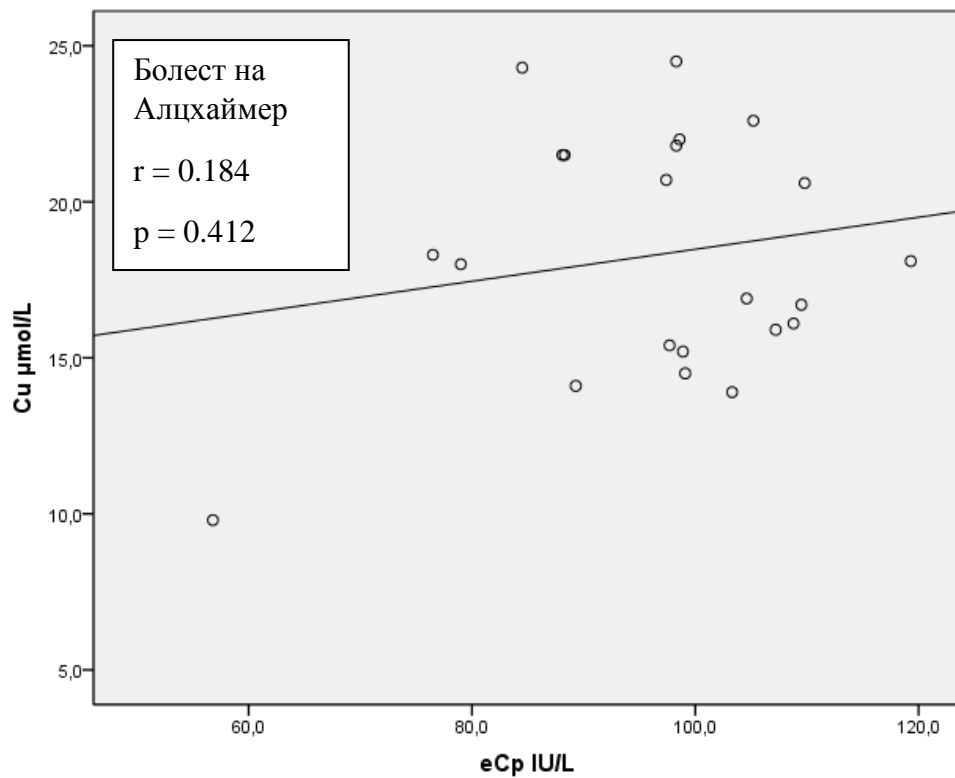
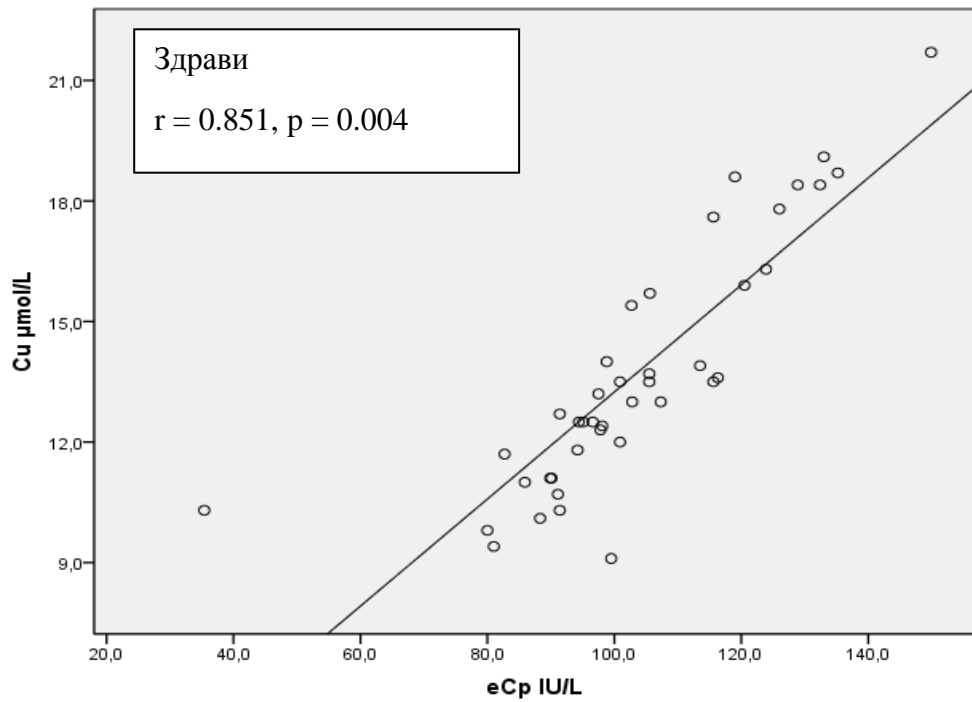
Ползата от клиничното приложение на оксидазната активност на церулоплазмина се доказва от установената висока степен на корелация е между eСр и iСр ($r = 0.832$, $p = 0.002$) от една страна, и от друга – между eСр и серумните нива на мед при здрави ($r = 0.851$, $p = 0.004$) (Фиг. 19). В подкрепа на установената в настоящото проучване корелационна зависимост при здрави, са данните на Merle U et al., където коефициентът на корелация между концентрацията и ензимната активност на церулоплазмина е $r = 0.94$ (148). Същият колектив доказва по-ниска корелационна зависимост между двата показателя ($r = 0.70$) при пациенти с БУ.

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 ($NCC > 1.6 \mu\text{mol/L}$) (7), тези корелационни зависимости са по-слаби в сравнение със здрави и са както следва: между eСр и iСр ($r = 0.315$, $p = 0.15$) и между eСр и серумните нива на мед ($r = 0.181$, $p = 0.41$). Данните са представени графично – Фиг. 19 и Фиг. 20.

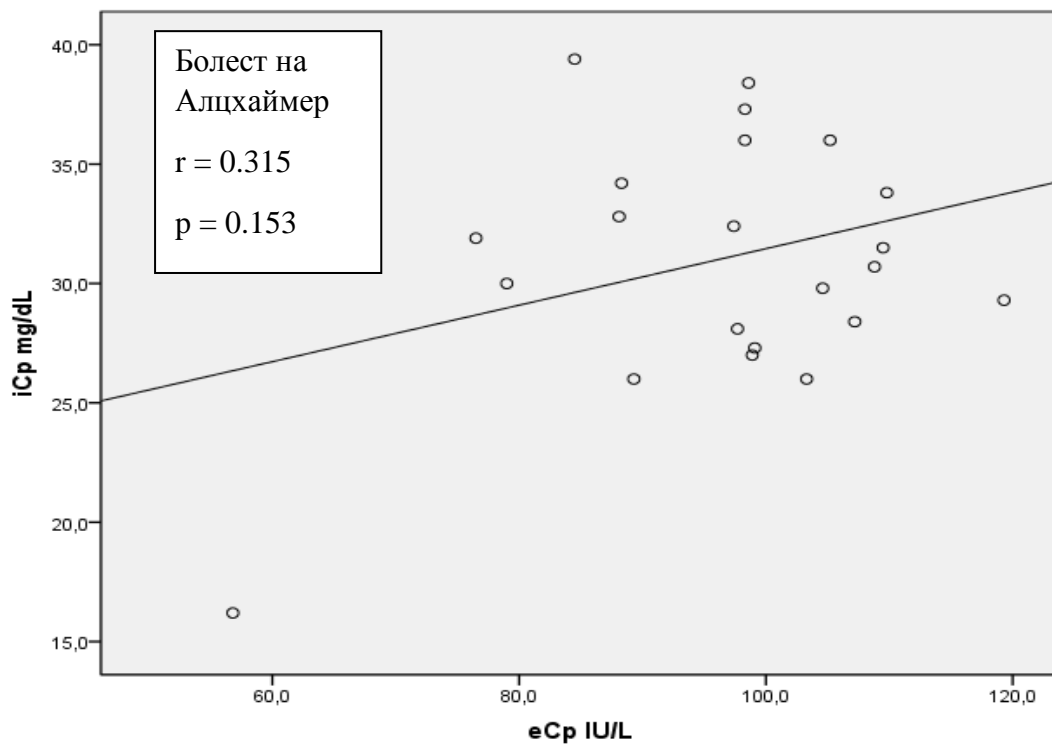
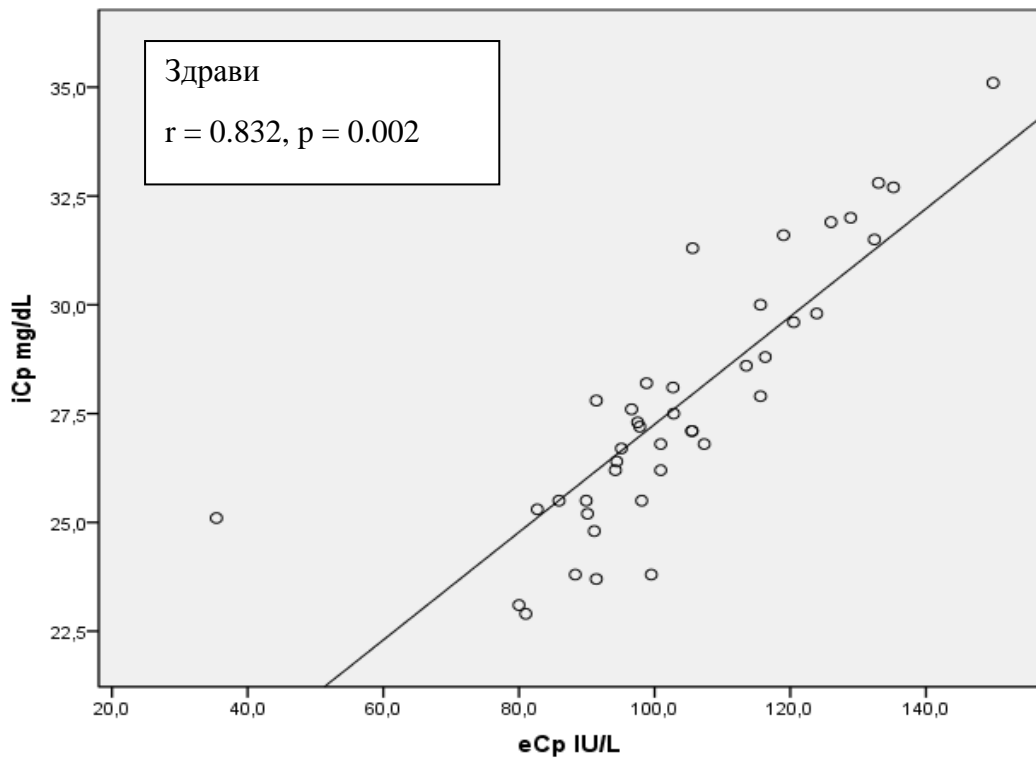
Установените корелационни зависимости показват, че само измерването на серумните нива на медта при пациенти, при които се очаква нарушена медна обмяна може да бъде подвеждащо. Измерването на оксидазната активност на церулоплазмина дава яснота при клиничното тълкуване на резултатите за серумна мед и някои автори дори предлагат eСр да се използва като дискриминативен биохимичен, неинвазивен тест за диагноза при състояния с меден дисбаланс като БУ (148).

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. 21 – 2), които следват същата зависимост.

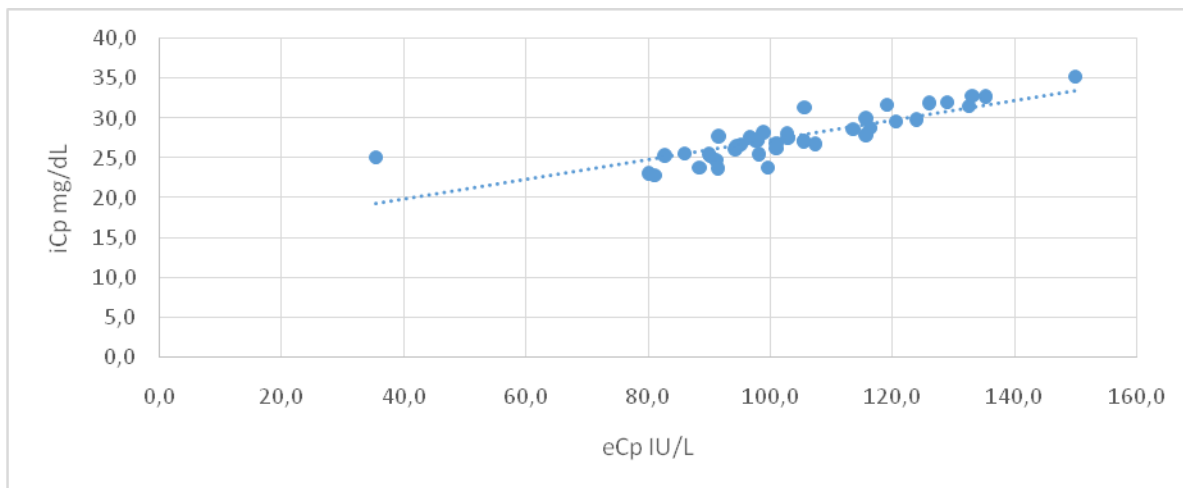
Характеризирането на медния статус с панел от няколко изследвания е поинформативно, но са необходими следващи проучвания, които да включат и състояния с нарушена медна хомеостаза.



Фигура 19. Корелационна зависимост между концентрация на серумна мед и оксидазна активност на Ср при здрави и пациенти с болест на Алцхаймер

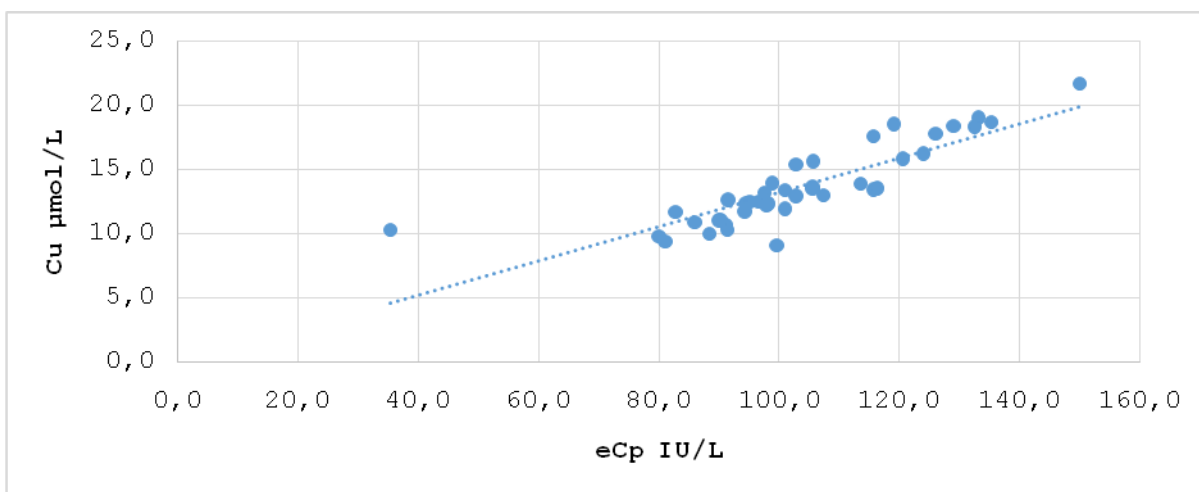


Фигура 20. Корелационна зависимост между концентрация на и оксидазна активност на Ср при здрави и пациенти с болест на Алцхаймер



1)

Фигура 21. 1) Корелационна зависимост между ензимната активност на церулоплазмина (eCp IU/L) и неговата концентрация (iCp mg/dL) в серума на здрави пациенти

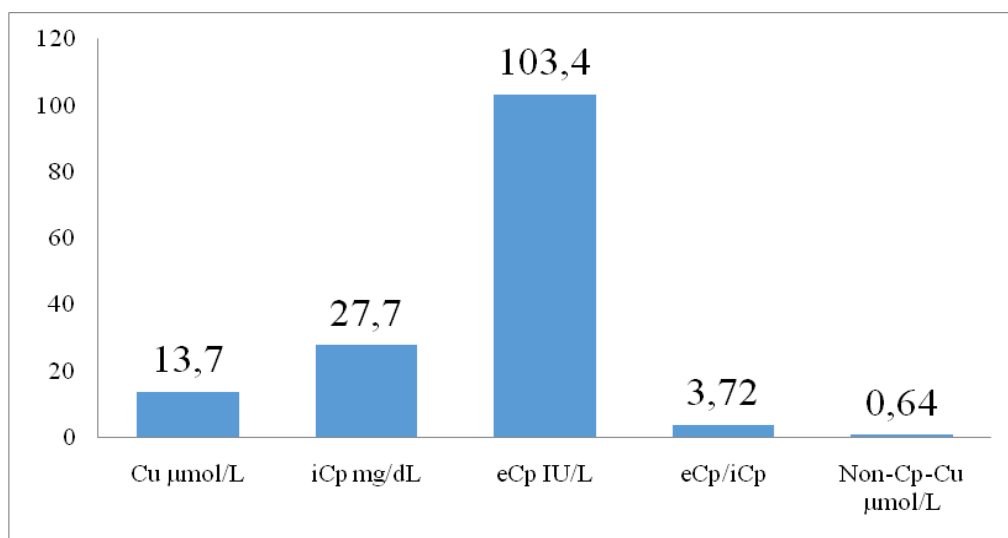


2)

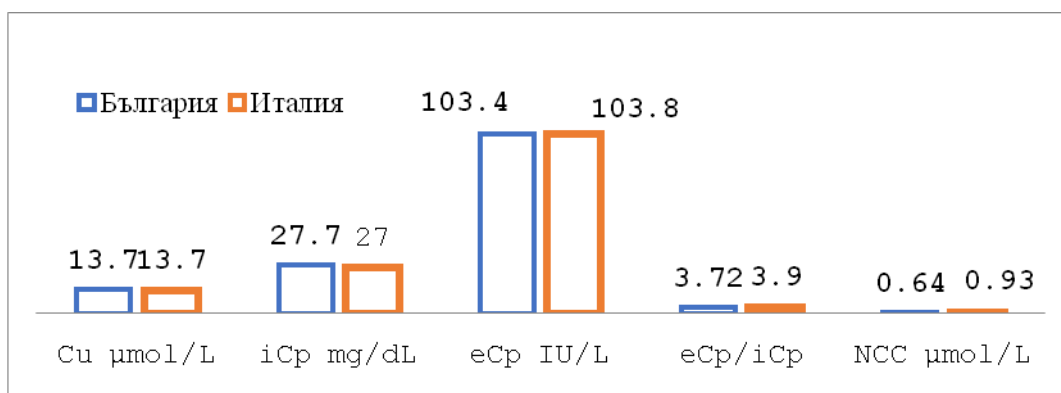
Фигура 21. 2) Корелационна зависимост между ензимната активност на церулоплазмина и серумните нива на мед при клинично здрави лица

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. 22, Фиг. 23 и Табл. 43). 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 (**66, 130**). 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 (156). Може да се направи заключението, че факторите, които въздействат върху медното съдържание и разпределение в организма са комплексни: от външната среда и генетичната предиспозиция.



Фигура 22. Средни стойности за серумна мед (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 (Non-Cp-Cu $\mu\text{mol/L}$) при клинично здрави лица от българската популация



Фигура 23. 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 (71, 102, 150-152), БП (37, 97, 153) и множествена склероза (154-156).

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 (67). В унисон с това твърдение, най-често в литературата се съобщава за слабо, но чувствително повишение на „свободната“ мед в серум (6, 119, 150, 152) и ликвор (6) при пациенти с БА.

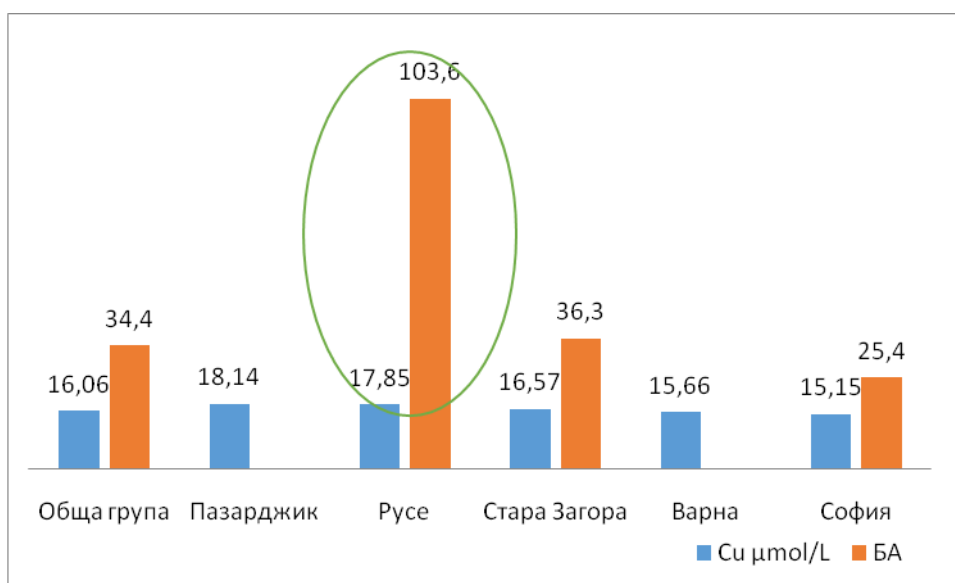
Squitti R et al. определят нивата на „свободна“ мед за прогностичен маркер в оценката на риска от развитие на късната форма на БА (7,71). Предполага се за съществуването на генетични варианти (при спорадичните форми на заболяването) в синтеза на церулоплазмин или за нарушено инкорпориране на медните йони в структурата на белтъка, поради които функционалната годност на церулоплазмина е понижена. В амилоидните плаки е налице концентриране на олигоелементи (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 (71).

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)

Публикация на Shen XL et al. за по-висока смъртност от БА в региони на Китай, където почвите са с по-високо съдържание на мед, ни накара да направим съпоставка между установените от нас нива на серумна мед в различните населени места с честотата на БА в България (22). Данни за честотата на болните с деменция (код по МКБ 10 F00 – F03), 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.

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. 24). Същевременно в местата с най-ниска серумна мед (София) има най-малко болни с БА под наблюдение (25.4 души на 100 000 население).



Фигура 24. 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 данните на НЗОК (Табл. 49) 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 49. 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 (**96**). 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 (**150**). 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. 50.

Таблица 50. 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. 37 и Табл. 50 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. 51). 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 51. 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 (7, 158, 159). Brewer GJ. установява правопрпорционална връзка между епидемиологията на БА и употребата на медни ВиК инсталации (159). 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 (151). 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 (7).

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 (27, 28). Резултатите от лабораторните изследвания на изследваните от нас пациенти са представени на Табл. 40 и Фиг. 19. 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 (27, 145). 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 (27, 145). Представената в това проучване група от пациенти с БУ включва индивиди с дългогодишна терапия с хелираци медикаменти. Според водещи ръководства за диагностика и терапия на БУ (27, 28) 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 статистически значима разлика в серумните нива, като по-висока мед е отчетена при БА (7). 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 сво-

бодната фракция (160). 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 (7).

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 (7, 27, 159), се оказва във връзка и с повишен риск за развитие на БА по смисъла на идентифицирани loss-of-function варианти при пациенти с БА (7).

Brewer GJ съобщава за количество свързано с церулоплазмина мед при норма до 70% (159). Всяко повишение на свободната фракция се свързва с токсични прояви на медта. Squitti R et al установяват обратнопропорционалната зависимост между нивата на „свободната“ мед и когнитивните способности (159, 161), а също и предиктивната роля на концентрацията на NCC за когнитивния спад с времето (162). Спекулативно е да се твърди, че БА е сенилна форма на БУ, но е вярно, че двете заболявания споделят общи патогенетични механизми (7).

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% (7, 159)], 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. 40 и 42 и Фиг. 18.

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 (27). Повишени са нивата на чернодробните ензими AsAT и AlAT. В сравнение със здравата група и тази с БУ (виж Табл. 40) 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 (163). 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 (164). Нефротоксичността на препаратите се проявява обикновено първо с протеинурия, като състоянието може да прогресира до нефрозен синдром като късно усложнение (165). 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 (159).

Що се отнася до характеризиране на медния статус при трети групи изследвани пациенти (Табл. 42), видно, че там има различия като значимо най-високи нива ($p < 0.001$) на серумна мед са измерени при ХХС, а значимо най-ниски ($p < 0.001$) – при БУ. Както при здравите, така и при пациентите с ХХС стойностите на серумната мед са в рамките на референтния обхват, а очаквано – при БУ пациентите са с нива на серумна мед под ДРГ. Тези данни кореспондират и с измерената концентрация на церулоплазмина – най-ниски нива и под ДРГ са установени при БУ. Значимо по-висока концентрация на церулоплазмина е измерена при ХХС в сравнение със здравите пациенти ($p < 0.05$), вероятно като резултат от възпалителните процеси в черния дроб. Всички пациенти с ХХС включени в настоящото проучване са без данни за чернодробна цироза и енцефалопатия. По литературни данни пациенти с ХХС и ХЕ в сравнение със здрави контроли и с пациенти с ХХС

без ХЕ, не се различават в концентрацията на церулоплазмина, но е налице значима разлика в ензимната активност на церулоплазмина (63).

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. 41), 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 (145). Последното е видно чрез резултата за съотношението Cu:Ср (Табл. 41), който за изследваната група е 6.46, т.е. между 6 и 8 атома за молекула.

При дискутираните в нашето проучване групи (зdrави, БУ и ХХС) най-често негативни резултати за NCC са получени за групата с ниски серумни нива на мед (пациенти с БУ), което е упоменато и в литературата (145). 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 Cu:Ср, 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 (27, 28, 61, 67, 145).

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 (71). 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 (21, 145).

VIII. 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 беспламъкова 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 нарастване на концентрацията на медта в серума, паралелно нарастване 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.

IX. ПРИНОСИ

1. Стандартизирани са условията на преаналитичния 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 характеризиране 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 характеризиране на медния статус при здрави и при пациенти с нарушена медна хомеостаза.

X. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Цачев К. Микроелементи и тяхното значение за клиничната практика. – Клиничната лаборатория и клиничната медицина. Кръстев З, Т Шипков. София, Иван Сапунджиев – ЕООД, 2005, 277-294.
2. Цачев К. Референтни граници на селен, цинк, мед, желязо и магнезий в кръвен срум и амниотична течност и информативното им съдържание при някои злокачествени заболявания. 1987. Дисертация за присъждане на научната степен „Кандидат на медицинските науки”.
3. Цветкова Т. Олигоелементи – референтни граници, интерференция и възможни източници на грешки. В: Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория, уреди за измерване, анализатори. Цветкова Т., Ст. Данев. Пловдив, Васил Петров – ВАП, 2001, 589-597.
4. Babić Ž, Tariba B, Kovačić J, Pizent A, Varnai VM, Macan J. Relevance of serum copper elevation induced by oral contraceptives: ameta-analysis. *Contraception*. 2013; 87(6):790-800.
5. Angelova M, Asenova S, Nedkova V, Koleva-Kolarova R. Copper in the human organism. *Trakia Journal of Sciences*.2011; 9(1):88-98.
6. Milne D. B. Trace elements. *Tietz Fundamentals in clinical chemistry*. Second edition. Burtis C. A., W. B. Saunders, 1994; 568-574.
7. Squitti R, Polimanti R. Copper phenotype in Alzheimer’s disease: dissecting the pathway. *Am J Neurodegener Dis*. 2013; 21;2(2):46-56.
8. Freeland-Graves JH, Sanjeevi N, Lee JJ. Global perspectives on trace element requirements. *J Trace Elem Med Biol*.2015;31:135-41.
9. Trace elements in human and animal nutrition. Mertz W, Fifth edition. Maryland, USA, Academic Press, 1987.
10. Ghayour-Mobarhan M, Shapouri-Moghaddam A, Azimi-Nezhad M, Esmaeili H, Parizadeh SM, Safarian M et al. The relationship between established coronary risk factors and serum copper and zinc concentrations in a large Persian Cohort.*Journal of Trace Elem. Med. Biol*.2009; 23: 167-175.
11. Díaz Romero C, Henríquez Sánchez P, López Blanco F, Rodríguez Rodríguez E, Serra Majem L. Serum copper and zinc concentrations in a representative sample of the Canarian population. *J Trace Elem Med Biol*. 2002; 16(2):75-81.

12. Andrews, N.C. Pathology of iron metabolism. In: Hematology. Basic Principles and Practice. Editors: R. Hoffman, E. J. Benz, Jr., S. J. Shattil, B. Furie, H. J. Cohen, L. E. Silbrstein, P. McGlave. 4th Edition, 2005. Elsevier Inc, 473-480.
13. Iron deficiency (medicine). Достъпно на: [http://en.wikipedia.org/wiki/Iron_deficiency_deficiency_\(medicine\)](http://en.wikipedia.org/wiki/Iron_deficiency_deficiency_(medicine))
14. Quinn JF, Harris C, Kaye JA, Lind B, Carter R, Anekonda T, Ralle M. Gender effects on plasma and brain copper. *International J of Alzheimer's disease*.2011; 1-4.
15. De Romaña DL, Olivares M, Uauy R, Araya M. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elem. Med. Biol.*2011; 25; 3-13.
16. Bonham, M. et al. The immune system as a physiological indicator of marginal copper status. *British Journal of Nutrition*.2002; 87; 393-403.
17. Barnard ND, Bush AI, Ceccarelli A, Cooper J, de Jager CA, Erickson KI, Fraser G, Kesler S et al. Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.2014; 35 Suppl 2:S74-8.
18. Gibson RS. Content and bioavailability of trace elements in vegetarian diets. *Am J Clin Nutr*.1994; 59(suppl); 1223S-32S.
19. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Current Drug Metabolism*. 2012; 13(3):237-250.
20. Sadhra SS, Wheatley AD, Cross HJ. Dietary exposure to copper in the European Union and its assessment for EU regulatory risk assessment. *Science of the Total Environment*.2007; 374:223-234.
21. 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.
22. Shen XL, Yu JH, Zhang DF, Xie JX, Jiang H. Positive relationship between mortality from Alzheimer's disease and soil metal concentration in mainland China. *J Alzheimers Dis*. 2014; 42(3):893-900.
23. Mursu J, Robien K, Harnack LJ, Park K, Jacobs DR Jr. Dietary supplements and mortality rate in older women: the Iowa Women's Health Study. *Arch Intern Med*. 2011; 171(18):1625-33.
24. Squitti R, Bressi F, Pasqualetti P, Bonomini C, Ghidoni R, Binetti G, Cassetta E, Moffa F, Ventriglia M, Vernieri F, Rossini PM. Longitudinal prognostic value of serum "free" copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology*. 2009; 72(1):50-5.

25. Control of Pre-analytical Variation in Trace Element Determinations; Approved Guideline; NCCLS document C38-A (ISBN 1-56238-332-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 1997.
26. Lutsenko S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr Opin Chem Biol.* 2010; 14(2):211-7.
27. European Association for Study of Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol.* 2012; 56(3):671-85.
28. Roberts EA, Schilsky ML; American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology.* 2008; 47(6):2089-111.
29. Prohaska JR(1). Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(3):826S-9S.
30. Xu W, Barrientos T, Andrews N. Iron and Copper in Mitochondrial Diseases. *Cell Metabolism.*2013; 17:319-328.
31. van Veen S, Sørensen DM, Holemans T, Holen HW, Palmgren MG, Vangheluwe P. Cellular function and pathological role of ATP13A2 and related P-type transport ATPases in Parkinson's disease and other neurological disorders. *Front Mol Neurosci.* 2014; 7:48.
32. Fatemi N, Sarkar B. Insights into the mechanism of copper transport by the Wilson and Menkes disease copper-transporting ATPases. *Inorganica Chimica Acta.*2002; 339:179-187.
33. Kono S. Aceruloplasminemia: an update. *Int Rev Neurobiol.* 2013; 110:125-51.
34. De Domenico I, Ward DM, di Patti MC, Jeong SY, David S, Musci G, Kaplan J. Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *EMBO J.* 2007; 26(12):2823-31.
35. Chen H, Attieh ZK, Syed BA, Kuo YM, Stevens V, Fuqua BK, Andersen HS et al. Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopperferroxidase family, and characterization in rodents and human cells. *J Nutr.* 2010; 140(10):1728-35.
36. Palumaa P. Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett.* 2013; 587(13):1902-10.
37. Mitra J, Vasquez V, Hegde PM, Boldogh I, Mitra S, Kent TA, Rao KS, Hegde ML. Revisiting Metal Toxicity in Neurodegenerative Diseases and Stroke: Therapeutic Potential. *Neurol Res Ther.* 2014; 1(2):1-9.
38. Rossi L, Lombardo MF, Ciriolo MR, Rotilio G. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases associated with copper imbalance. *Neurochem Res.* 2004; 29(3):493-504.

39. Lippi G, Banfi G, Church S, Cornes M, De Carli G, Grankvist K, Kristensen GB et al. European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group for Preanalytical Phase. Preanalytical quality improvement. In pursuit of harmony, on behalf of European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working group for Preanalytical Phase (WG-PRE). *Clin Chem Lab Med*. 2015; 53(3):357-70.
40. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A, Chiozza ML. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014; 24(1):105-13.
41. 1995 IUPAC, *Pure and Applied Chemistry* 67, 1575-1608
42. Bowen RA, Remaley AT. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. *Biochem Med (Zagreb)*. 2014; 24(1):31-44.
43. Cuhadar S, Atay A, Koseoglu M, Dirican A, Hur A. Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions. *Biochem Med*. 2012;22(2):202-14.
44. European Confederation of Laboratory Medicine. European urinalysis guidelines. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2000; 231:1-86.
45. Tsalev DL, Zaprianov ZK. Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice. Florida, CRC Press, Inc. 1983, Volume I.
46. Bornhorst JA, Hunt JW, Urry FM, McMillin GA. Comparison of sample preservation methods for clinical trace element analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Am J Clin Pathol*. 2005; 123(4):578-83.
47. Шипков Т. Лабораторният резултат (кратък справочник). София, Издателство „Диагностика”, 2007.
48. Ламбрева Л, Паскалева И, Пенев М, Свиначков Д, Цачев К, Шипков Т, Шищенко М. Осигуряване на качеството в Клиничната лаборатория, Преданалитичен етап. Т. Шипков. София, Издателство „Диагностика”, 2010.
49. Кюмюрева – Лазарова ВС. Тълкуване на клинично-лабораторните показатели при изследване на деца и възрастни. Стара Загора, Издателска къща „Форум”, 1999.
50. Българско Дружество по деменции, достъпно на <http://www.dementia-bulgaria.com>
51. Цачев К., Атанасова Б. Изследване на олигоелементи в Клинично-лабораторната практика. В: Ръководство за упражнения по клинична химия със студенти по фармация. Цачев К. София, Издателство Класика, 2008, 153-165.
52. Цветкова Т. Клиничнолабораторна оценка на някои олигоелементи (микроелементи). Мед. В: Клиничнолабораторни резултати – подбор и избор на анализа, оценка

и корелации на резултатите. Редактор Т. Цветкова. Медицинско издателство ЕТ Васил Петров, Пловдив, 1998, 262-264.

53. Agarwal RP), Henkin RI. Zinc and copper in human cerebrospinal fluid. *Biol Trace Elem Res.* 1982; 4(2-3):117-24.
54. Pall HS, Williams AC, Blake DR, Lunec J, Gutteridge JM, Hall M, Taylor A. Raised cerebrospinal-fluid copper concentration in Parkinson's disease. *Lancet.* 1987; 2(8553): 238-41.
55. Gazzaniga GC, Ferraro B, Camerlingo M, Casto L, Viscardi M, Mamoli A. A case control study of CSF copper, iron and manganese in Parkinson disease. *Ital J Neurol Sci.* 1992; 13(3):239-43.
56. Цачев К. (1994) Рационализиране на изследването на олигоелементи в клиничната лаборатория. Дисертация за присъждане на научната степен „Доктор на медицинските науки”.
57. Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Aguilar MV, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, González-Muñoz MJ et al. Cerebrospinal fluid levels of transition metals in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 1998; 105(4-5):479-88.
58. Melø TM, Larsen C, White LR, Aasly J, Sjøbakk TE, Flaten TP, Sonnewald U, Syversen T. Manganese, copper, and zinc in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis. *Biol Trace Elem Res.* 2003; 93(1-3):1-8.
59. Gerhardsson L, Lundh T, Minthon L, Londos E. Metal concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2008; 25(6):508-15.
60. Gerhardsson L, Blennow K, Lundh T, Londos E, Minthon L. Concentrations of metals, beta-amyloid and tau-markers in cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2009; 28(1):88-94.
61. Braga F, Szöke D, Valente C, Panteghini M. Biologic variation of copper, ceruloplasmin and copper/ceruloplasmin ratio (Cu:Cp) in serum. 2013; 415:295-6.
62. Canox for drug, Достъпно на: <http://www.canox4drug.com/en/test.html>
63. Marano M, Vespasiani Gentilucci U, Altamura C, Siotto M, Squitti R, Bucossi S, Quintiliani L, Migliore S, Greco F, Scarciolla L, Quattrocchi CC, Picardi A, Vernieri F. Altered metal metabolism in patients with HCV-related cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis.* 2015.27.
64. Dusek P, Roos PM, Litwin T, Schneider SA, Flaten TP, Aaseth J. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's diseases. *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:193-203.

65. Пенев М. (1986) Граници на референтната област и биологични вариации на някои хематологични лабораторни показатели. Дисертация за присъждане на научната степен „Кандидат на медицинските науки”.
66. Bocca B, Madeddu R, Asara Y, Tolu P, Marchal JA, Forte G. Assessment of reference ranges for blood Cu, Mn, Se and Zn in a selected Italian population. *J Trace Elem Med Biol.* 2011; 25(1):19-26.
67. Infusino I, Valente C, Dolci A, Panteghini M. Standardization of ceruloplasmin measurements is still an issue despite the availability of a common reference material. *Anal Bioanal Chem.* 2010; 397(2):521-5.
68. Wang JS, Lu Y, Wang XH, Zhu QR. Urinary copper/zinc ratio: a promising parameter for replacement of 24-hour urinary copper excretion for diagnosis of Wilson's disease in children. *World J Pediatr.* 2010; 6(2):148-53.
69. Ivanova I, Petkova T, Dragneva S, Krastev Z. Comparison between 6-hour and 24-hour cupriuria in monitoring of therapy with D-penicillamine in patients with Wilson disease. *Biochimica medica* 2013; 23(1); 1-134; A1-A55.
70. Salustri C, Barbati G, Ghidoni R, Quintiliani L, Ciappina S, Binetti G, Squitti R. Is cognitive function linked to serum free copper levels? A cohort study in a normal population. *Clin Neurophysiol.* 2010; 121(4):502-7.
71. Squitti R. Copper dysfunction in Alzheimer's disease: from meta-analysis of biochemical studies to new insight into genetics. *J Trace Elem Med Biol.* 2012; 26(2-3):93-6.
72. Walshe JM. Monitoring copper in Wilson's disease. *Adv Clin Chem.* 2010; 50:151-63.
73. Propst A, Propst T, Feichtinger H, Judmaier G, Willeit J, Vogel W. Copper-induced acute rhabdomyolysis in Wilson's disease. *Gastroenterology.* 1995; 108(3):885-7.
74. Xu W, Barrientos T, Andrews NC. Iron and copper in mitochondrial diseases. *Cell Metab.* 2013; 17(3):319-28.
75. Teckman J, Perlmutter DH. Conceptual advances in the pathogenesis and treatment of childhood metabolic liver disease. *Gastroenterology.* 1995; 108(4):1263-79.
76. Mareček Z, Brůha R. Wilson's disease. *Vnitr Lek.* 2013; 59(7):578-83.
77. Kostadinova AD, Mihaylov MY, Ivanova ID, Robeva RT. Nephrotic syndrome after treatment with D-penicillamine in a patient with Wilson's disease. *Revista Romana de medicina de laborator.* 2014; 22(2):181-188.
78. Rashed MN. The role of trace elements on hepatitis virus infections: a review. *J Trace Elem Med Biol.* 2011; 25(3):181-7.

79. Rashed MN, Ahmed MM, Al-Hossainy AF, Abd SM. Trends in speciation analysis of some heavy metals in serum of patients with chronic hepatitis C and chronic hepatitis B using differential pulse adsorptive stripping voltammetric measurement and atomic absorption spectrophotometry. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(2):138-45.
80. Guo CH, Chen PC, Lin KP, Shih MY, Ko WS. Trace metal imbalance associated with oxidative stress and inflammatory status in anti-hepatitis C virus antibody positive subjects. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2012 ; 33(2):288-96.
81. Liggi M, Sini M, Sorbello O, Civolani A, Demelia L. HBV and HCV infections in Wilson's disease patients: copper overload could be protective? *Clin Biochem.* 2012; 45(13-14):1095-6.
82. Arciello M, Gori M, Balsano C. Mitochondrial dysfunctions and altered metals homeostasis: new weapons to counteract HCV-related oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:971024.
83. Minhe L, Huimin J, Baiquan X, Xi C, Zhenxiang X. Relationship between viral hepatitis and four trace elements in sera. *Varian Instruments at Work Number AA-89, China,* 1989.
84. Grüngreiff K, Hebell T, Gutensohn K, Reinhold A, Reinhold D. Plasma concentrations of zinc, copper, interleukin-6 and interferon- γ , and plasma dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C. *Mol Med Rep.* 2009; 2(1):63-8.
85. Guo CH, Chen PC, Ko WS. Status of essential trace minerals and oxidative stress in viral hepatitis C patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Med Sci.* 2013; 10(6):730-7.
86. Кръстев З. Хронични вирусни хепатити. В: Наръчник по хепато-гастроентерология за фамилия лекар. Кръстев З. Изд. Иван Сапунджиев ЕООД, 2002, 132-133.
87. Arain SA, Kazi TG, Afridi HI, Talpur FN, Mughal MA, Shah F, Arain SS, Panhwar AH. Estimation of copper and iron burden in biological samples of various stages of hepatitis C and liver cirrhosis patients. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 160(2):197-205.
88. Percival SS. Copper and immunity. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(5 Suppl):1064S-1068S.
89. Scheiber IF, Mercer JF, Dringen R. Metabolism and functions of copper in brain. *Prog Neurobiol.* 2014; 116:33-57.
90. Borisov VB. Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies. *Mol Aspects Med.* 2002; 23(5):385-412.
91. Scheiber IF, Dringen R. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. *Neurochem Int.* 2013; 62(5):556-65.
92. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliek SH, Schousboe A, Haydon PG et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem.* 2012; 121(1):4-27.

93. Squitti R, Salustri C, Siotto M, Ventriglia M, Vernieri F, Lupoi D, Cassetta E, Rossini PM. Ceruloplasmin/Transferrin ratio changes in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2010; 2011:231595.
94. Hayne DJ, Lim S, Donnelly PS. Metal complexes designed to bind to amyloid- β for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. *Chem Soc Rev.* 2014; 43(19):6701-15
95. White AR, Kanninen KM, Crouch PJ. Editorial: Metals and neurodegeneration: restoring the balance. *Front Aging Neurosci.* 2015; 7:127
96. Димитров И. Деменции и леки когнитивни нарушения: невроеидемиологични и диагностични аспекти. Издателство Актуална медицина стилиана Савова, Варна, 2010.
97. Гатева П, Панагис Мосхонас СГл Болестта на Алцхаймер – какво нова във фармакотерапията? *Медицински преглед.* 2011; 47(4):34-40.
98. Kenche VB, Barnham KJ. Alzheimer's disease & metals: therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol.* 2011; 163(2):211-9.
99. Crutch S, McCulloch Y. What is dementia? Alzheimer's Society, 2012, достъпно на: <http://www.alzheimers.org.uk>
100. Report of the Special Committee on aging United States Senate. Alzheimer's disease and dementia: a comparison of international approaches. 112th Congress, Report 112-254; S.Res.81, Sec. 17(d), 2011.
101. Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(3):169-73.
102. Squitti R. Copper subtype of Alzheimer's disease (AD): meta-analyses, genetic studies and predictive value of non-ceruloplasmin copper in mild cognitive impairment-conversion to full AD. *J Trace Elem Med Biol.* 2014; 28(4):482-5.
103. Шотеков П, Георгиев Д, Никоевски Н, Сарафов С, търнев И. Дегенеративни заболявания на нервната система. В: Неврология, Шотеков П. Медицинско издателство АРСО – Асен Петров. София. Второ издание, 2010, 344-366.
104. Трайков Л, Николова Г, Търнев И, Райчева М, Райчев, Мехрабиан Ш, Янчева С. Честотата на $\epsilon 4$ алела на аполипопротеин Е при пациенти с болестта на Алцхаймер в България. *Българска Неврология.* 2003; 3(3):207.
105. González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics.* 2014; 6(2):292-300.

106. Brewer GJ, Kanzer SH, Zimmerman EA, Celmins DF, Heckman SM, Dick R. Copper and ceruloplasmin abnormalities in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen.* 2010; 25(6):490-7.
107. Lam PK, Kritz-Silverstein D, Barrett Connor E, Milne D, Nielsen F, Gamst A, Morton D, Wingard D. Plasma trace elements and cognitive function in older men and women: the Rancho Bernardo study. *J Nutr Health Aging.* 2008; 12(1):22-7.
108. Schrag M, Mueller C, Oyoyo U, Smith MA, Kirsch WM. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: a quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog Neurobiol.* 2011; 94(3):296-306.
109. Райчев Р, Райчев И. Системни дистрофични заболявания на нервната система и мускулния апарат. Деменции. В: Основи на неврологията. Артик – 2001, София, 2011, 518-524.
110. Lleó A, Cavedo E, Parnetti L, Vanderstichele H, Herukka SK, Andreasen N, Ghidoni R, Lewczuk P, Jeromin A, Winblad B, Tsolaki M, Mroczko B, Visser PJ, Santana I, Svenningsson P, Blennow K, Aarsland D, Molinuevo JL, Zetterberg H, Mollenhauer B. Cerebrospinal fluid biomarkers in trials for Alzheimer and Parkinson diseases. *Nat Rev Neurol.* 2015; 11(1):41-55.
111. Multhaup G. Amyloid precursor protein, copper and Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother.* 1997;51(3):105-11.
112. Rossi L, Arciello M, Capo C, Rotilio G. Copper imbalance and oxidative stress in neurodegeneration. *Ital J Biochem.* 2006; 55(3-4):212-21.
113. Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA. Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol.* 2000; 130(2-3):184-208.
114. Mangialasche F, Polidori MC, Monastero R, Ercolani S, Camarda C, Cecchetti R, Mecocci P. Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Res Rev.* 2009;8(4):285-305.
115. Markesbery WR. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(1):134-47.
116. Tanner MS. Role of copper in Indian childhood cirrhosis. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67(5 Suppl):1074S-1081S.
117. Agarwal R, Kushwaha SS, Tripathi CB, Singh N, Chhillar N. Serum copper in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Indian J Clin Biochem.* 2008; 23(4):369-74.

118. Squitti R, Pasqualetti P, Dal Forno G, Moffa F, Cassetta E, Lupoi D, Vernieri F, Rossi L, Baldassini M, Rossini PM. Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology*. 2005; 64(6):1040-6.
119. Squitti R, Zito G. Anti-copper therapies in Alzheimer's disease: new concepts. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2009; 4(3):209-19.
120. Киркова В, Трайков Л. Невропсихологично изследване при лица със субективни когнитивни нарушения. *Българска неврология*. 2010; 10(3):94-97.
121. Димитров И, Делева Н, Трайков Л. Скринингови невропсихологични тестове за когнитивни нарушения и деменции. *Българска неврология*. 2007; 7(2):74-76.
122. Димитров И, Трайков Л, Миланов И, Делева Н, Киркова В, Ушева Н. Субективни когнитивни оплаквания и риск за деменция при извадка от българско градско население. *Българска неврология*. 2010; 10(2):64-67.
123. Трайков Л, мехрабиан Ш, Йорданова А, Рачевъ М, Радемакер Р, Крутс М, Масларов Д, Кременски И, Ван Броекховен К. Нова PSEN1 мутация при българска фамилия с ранно начало и атипична клинична картина на болестта на Алцхаймер. *Българска неврология*. 2007; 7(1):36-40.
124. Трайков Л. Алгоритъм за диагностика и лечение на заболявания, протичащи с деменция. *Българска неврология*. 2012; 12(2):154-156.
125. Ламбрева Л. Оценка на количествените аналитични методи. В: Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория, уреди за измерване, анализатори. Цветкова Т., Данев Ст. Пловдив, Медицинско издателство ЕТ "Васил Петров – ВАП, 2001; 104-115
126. Siotto M, Pasqualetti P, Marano M, Squitti R. Automation of o-dianisidine assay for ceruloplasmin activity analyses: usefulness of investigation in Wilson's disease and in hepatic encephalopathy. *J Neural Transm*. 2014; 121(10):1281-6.
127. Цачев К. Диагностична надеждност на лабораторните показатели. В: Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория, уреди за измерване, анализатори. Цветкова Т., Данев Ст. Пловдив, Медицинско издателство ЕТ "Васил Петров – ВАП, 2001; 115-117.
128. Хавезов И, Цалев Д. Безпламъкови методи на атомно-абсорбционния анализ. София, Университетско издателство Св. Климент Охридски, 1991.
129. Schultze B, Lind PM, Larsson A, Lind L. Whole blood and serum concentrations of metals in a Swedish population-based sample. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014; 74(2):143-8.

130. Sabbioni E, Apostoli P, Minoia C. Impiego dell'ETA-AAS Zeeman nella definizione dei valori di riferimento di 22 elementi in traccia nei liquidi biologici. In: Applicazioni dell'ETA-AAS Zeeman nel laboratorio chimico e tossicologico. Minoia C, Caroli S. Edizioni Libreria Cortina, Padova, Italy, 1990; 371-400.
131. Хавезов И, Цалев Д. Атомно-абсорбционен анализ. София, Наука и изкуство, 1980.
132. BD Product Catalogue. 2010; 13-5.
133. Дукова – Пенева П., Пенев М. Лабораторна хематология. София, Издателска къща Таурус Адвертайзинг ЕООД, 2014.
134. Oddoze C, Lombard E, Portugal H. Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. Clin Biochem. 2012; 45(6):464-9.
135. Quality requirements. Desirable Biological Variation database specifications. Updated for 2014. Достъпно на: <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm/>.
136. Ламбрева Л. Статистически методи в клиничната лаборатория. В: Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория, уреди за измерване, анализатори. Цветкова Т., Данев Ст. Пловдив, Медицинско издателство ЕТ "Васил Петров – ВАП, 2001; 88-96.
137. Цачев К. Референтни стойности и граници на референтната област. В: Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория, уреди за измерване, анализатори. Цветкова Т., Данев Ст. Пловдив, Медицинско издателство ЕТ "Васил Петров – ВАП, 2001; 117-120.
138. Abiaka C, Olusi S, Al-Awadhi A. Reference ranges of copper and zinc and the prevalence of their deficiencies in an Arab population aged 15-80 years. Biol Trace Elem Res. 2003 Jan; 91(1):33-43.
139. Olivares M, Lera L, Albala C, Pizarro F, Araya M. Prevalence of zinc and copper deficiencies in older subjects living in Metropolitan Santiago. Rev Med Chil. 2011 Mar; 139(3):283-9.
140. Roland A, Petterson RA, Leake DS. Measurement of Copper Binding Sites on Low Density Lipoprotein. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001; 21:594-602
141. Al-Sabaawy OM. The relation ship between serum lipid profile and selected trace elements for adult men in mosul city. Oman Med J 2012; 27(4):300-3
142. Zhang HQ, Li N, Zhang Z, Gao S, Yin HY, Guo DM, Gao X. Serum zinc, copper, and zinc/copper in healthy residents of Jinan. Biol Trace Elem Res. 2009 Oct; 131(1):25-32.
143. Song CH, Kim YH, Jung KI. Associations of zinc and copper levels in serum and hair with sleep duration in adult women. Biol Trace Elem Res. 2012; 149(1):16-21.

144. Squitti R, Polimanti R. Copper hypothesis in the missing heritability of sporadic Alzheimer's disease: ATP7B gene as potential harbor of rare variants. *J Alzheimers Dis.* 2012; 29(3):493-501.
145. Twomey PJ, Wierzbicki AS, Reynolds TM, Viljoen A. The copper/caeruloplasmin ratio in routine clinical practice in different laboratories. *J Clin Pathol.* 2009; 62(1):60-3.
146. Walshe JM. Clinical Investigations Standing Committee of the Association of Clinical Biochemists. Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. in *Clin Biochem.* 2003; 40(Pt 2):115-21.
147. Schosinsky KH, Lehman HP, Beeler MF. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. 1974;20/12:1556-1563.
148. Merle U, Eisenbach C, Weiss KH, Tuma S, Stremmel W. Serum ceruloplasmin oxidase activity is a sensitive and highly specific diagnostic marker for Wilson's disease. *J Hepatol.* 2009; 51(5):925-30.
149. Squitti R, Ghidoni R, Scrascia F, Benussi L, Panetta V, Pasqualetti P, Moffa F, Bernardini S, Ventriglia M, Binetti G, Rossini PM. Free copper distinguishes mild cognitive impairment subjects from healthy elderly individuals. *J Alzheimers Dis.* 2011; 23(2):239-48.
150. Национален статистически институт, достъпно на: <http://www.nsi.bg/sites/default/files/files/pressreleases/Census2011final.pdf>
151. Ventriglia M, Brewer GJ, Simonelli I, Mariani S, Siotto M, Bucossi S, Squitti R. Zinc in Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis of Serum, Plasma, and Cerebrospinal Fluid Studies. *J Alzheimers Dis.* 2015. [Epub ahead of print]
152. Squitti R, Polimanti R, Siotto M, Bucossi S, Ventriglia M, Mariani S, Vernieri F, Scrascia F, Trotta L, Rossini PM. ATP7B variants as modulators of copper dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2013;15(3):515-22.
153. Kristinsson J, Snaedal J, Tórsdóttir G, Jóhannesson T. Ceruloplasmin and iron in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a synopsis of recent studies. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2012; 8:515-21.
154. Aspli KT, Flaten TP, Roos PM, Holmøy T, Skogholt JH, Aaseth J. Iron and copper in progressive demyelination--New lessons from Skogholt's disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2015; 31:183-7.
155. Sedighi B, Ebrahimi HA, Haghdoost AA, Abotorabi M. Comparison of serum levels of copper and zinc among multiple sclerosis patients and control group. *Iran J Neurol.* 2013; 12(4):125-8.

156. Dzieżyc K, Litwin T, Członkowska A. Multiple sclerosis in two patients with coexisting Wilson's disease. *Mult Scler Relat Disord*. 2014; 3(3):387-90.
157. Наумова Е, Иванова М. HLA и антропология. В: Главен комплекс на тъканната съвместимост, Издателство „ЛИЦЕ”, 2006: 29-56.
158. Brewer GJ. Copper toxicity in Alzheimer's disease: cognitive loss from ingestion of inorganic copper. *J Trace Elem med Biol* 2012; 26:89-92.
159. Brewer GJ. Metals in the causation and treatment of Wilson's disease and Alzheimer's disease, and copper lowering therapy in medicine. *Inorganic Chim Acta*. 2012; 393:135-141.
160. James SA, Volitakis I, Adlard PA, Duce JA, Masters CL, Cherny RA, Bush AI. Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(2):298-302.
161. Squitti R, Barbati G, Rossi L, Ventriglia M, Dal Forno G, Cesaretti S, Moffa F, Caridi I, Cassetta E, Pasqualetti P, Calabrese L, Lupoi D, Rossini PM. Excess of nonceruloplasmin serum copper in AD correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau. *Neurology*. 2006;67(1):76-82.
162. Squitti R, Bressi F, Pasqualetti P, Bonomini C, Ghidoni R, Binetti G, Cassetta E, Moffa F, Ventriglia M, Vernieri F, Rossini PM. Longitudinal prognostic value of serum "free" copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology*. 2009;72(1):50-5.
163. Shyamal D, Kunal R. Wilson's Disease: An Update. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006; 2(9):482-493.
164. Wiggelinkhuizen M, Tilanus ME, Bollen CW, Houwen RH. Systematic review: clinical efficacy of chelator and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009; 29:947-58.
165. Siafakas CG, Jonas MM, Alexander S, Herrin J, Furuta GT. Early onset of nephrotic syndrome after treatment with D-penicillamine in a patient with Wilson's disease. *Am J Gastroenterol*. 1998 Dec; 93(12):2544-6.