

Резюмета на научните трудове на д-р Ирена Димитрова Иванова,  
кандидат в конкурс за „доцент“ към Факултет Медицина на МУ – Варна,  
съгласно обява в Държавен вестник, бр. 59 от 26.07.2022г.

ПУБЛИКАЦИИ И ДОКЛАДИ, ПУБЛИКУВАНИ В НАУЧНИ ИЗДАНИЯ,  
РЕФЕРИРАНИ И ИНДЕКСИРАНИ В СВЕТОВНОИЗВЕСТНИ БАЗИ ДАННИ С  
НАУЧНА ИНФОРМАЦИЯ

**Г7-1 - Ivanova I, Atanasova B, Kostadinova A, Bocheva Y, Tzatchev K. Serum Copper and Zinc in a Representative Sample of Bulgarian Population. Acta Medica Bulgarica. 2016 Oct 1;43(2):21–31.**

Серумни нива на мед и цинк в репрезентативна извадка от българската популация

Медта (Cu) и цинкът (Zn) са есенциални микроелементи. Съдържанието на Cu и Zn в организма зависи от редица фактори - възраст, пол, диета, състав на питейната вода, географско местоположение и генетична предразположеност. Установяването на съдържанието на мед в организма придобива актуалност не само при редки генетични заболявания като болестта на Уилсън, но и при социално – значими заболявания като сърдечно-съдови, нарушен глюкозен толеранс, невродегенеративни и туморни заболявания. Настоящото изследване има за цел да проучи разпределението на серумните нива на Cu и Zn в представителна група от българското население и да се определят факторите на биологична вариация. Нивата на Cu и Zn в серума са измерени при 379 българи (172 мъже и 207 жени) от 5 различни региона на България чрез пламъкова атомна абсорбция с помощта на AAnalyst 400, Perkin Elmer. Статистическите анализи са извършени от SPSS, 19. Медианата и интерквартилният диапазон (IQR) за Cu в кръвта са 15.89 (13.87-17.89)  $\mu\text{mol/L}$  и за Zn - 13.00 (11.7-14.68)  $\mu\text{mol/L}$  в изследваната група. Установени са по-високи нива на Cu при жените, отколкото при мъжете ( $p < 0,001$ ). Установено е намаляване на Zn с напредване на възрастта ( $p > 0.05$ ). Значителна разлика ( $p < 0,05$ ) е открита в серумната Cu между млади хора ( $< 30$  години) и възрастни над 61 години. Наблюдава се статистически значима разлика в серумните нива на Cu и Zn ( $p < 0,05$ ) по отношение на географското разположение.

## Serum Copper and Zinc in a Representative Sample of Bulgarian Population

Copper (Cu) and zinc (Zn) are essential for life. Body Cu and Zn content depends on variety of factors - age, gender, and diet, type of drinking water, geographical location and genetic predisposition. Copper status becomes even more relevant not only in rare genetic disorders such as Wilson disease but in diseases such as cardiovascular ones, impaired glucose tolerance and neuro-degenerative and tumor diseases. The study aimed to examine the distribution of serum Cu and Zn in a representative group of the Bulgarian population and to describe factors which influence metal content. It also aimed to describe the link between serum Cu levels and the frequency of Alzheimer's disease (AD) in Bulgarians. Cu and Zn in serum were measured in 379 individuals (172 males and 207 females) from 5 different regions in Bulgaria by flame atomic absorption using AAnalyst 400, Perkin Elmer. Statistical analyses were performed by SPSS, 19. Median and inter-quartile range (IQR) for blood Cu were 15.89 (13.87-17.89)  $\mu\text{mol/L}$  and for Zn - 13.00 (11.7-14.68)  $\mu\text{mol/L}$  in the examined group. Higher Cu levels in females than in males were found ( $p < 0.001$ ). Decrease of Zn with aging was established ( $p > 0.05$ ). Significant difference ( $p < 0.05$ ) was found in serum Cu between young people ( $< 30$  year old) and adults over 61 year old. Statistically significant difference in Cu and Zn was observed ( $p < 0.05$ ) in respect of residences.

**Г7-2 - Rongioletti M, Squitti R, Ghidoni R, Ivanova I, Benussi L, Binetti G, Siotto M, Papa F. Copper Failure in Wilson and Alzheimer Disease. Am J Clin Pathol. 2018 Jan;149(Suppl 1):S11–S11.**

Дисбаланс в медната хомеостаза при болест на Уилсън и болест на Алцхеймер

Дисбалансът на медната обмяна е причина за болестта на Уилсън (Wilson's Disease, WD), която е рядко генетично заболяване, характеризиращо се с повишени нива на несвързана с церулоплазмина мед (non-Cp Cu) и съотношението мед-церулоплазмин (Cu:Cp). Мета-анализи показват аномалии на медта при болестта на Алцхеймер (Alzheimer's Disease, AD). Досега не е представяно директно сравнение на статуса на медта при двете заболявания. Целта на проучването е изследване на статуса на медта чрез измерване на серумна мед, церулоплазмин, non-Cp Cu, Cu:Cp и 24 – часова куприуреза с коригиране спрямо пол и възраст при пациенти с AD, WD (девет пациенти с WD на изходно ниво и 24 WD пациенти на лечение с D-пенициламин [D-pen] и здрави контроли (35 здрави контроли). В извадка от 385 случая на AD и 336 здрави контроли,

изследвани в предишни проучвания, non-Cp Cu и Cu:Cp са били по-високи при AD, отколкото при здрави контроли (и двете  $P < .001$ ), но по-ниски, отколкото при пациенти с WD на изходно ниво. Докато non-Cp Cu е сходен при AD и WD, средната стойност на Cu:Cp разграничава AD от WD ( $P < .016$ ), със стойност на Cu:Cp Cohen's d от 0.8 (показващ голям биологичен ефект) при AD спрямо здрави контроли, което допълнително увеличава стойността при WD до 2.2. Концентрациите на мед в 24-часовата урина при 35 здрави контроли са сравнени с тези в началото на група пациенти с AD, анализирани в предишно проучване за ефекта на D-pen върху прогресията на заболяването. Пациентите с AD на изходно ниво са имали по-високи концентрации на мед в 24-часовата урина ( $P < 0.001$ ; AD 12.05  $\mu\text{g}/\text{ден}$  [медиана, интерквартилен диапазон 7.85–22.50]), отколкото здрави контроли (4.82  $\mu\text{g}/\text{ден}$  (среден, интерквартилен диапазон: 3.31–7.43)). Стойности на медта в 24-часовата урина, по-високи от граничната стойност от 200  $\mu\text{g}/\text{ден}$ , са открити при 87% от WD и 78% от AD. Директното сравнение на пациенти с AD и WD показва нарушена обмяна на медта, засягаща и двете заболявания, но с различна тежест, като Cu:Cp отношението е значително повече нарушено при случаите с WD.

### Copper Failure in Wilson and Alzheimer Disease

Copper failure is the cause of Wilson disease (WD), a rare disorder typified by increased levels of copper nonbound to ceruloplasmin (non-Cp Cu) and copper-ceruloplasmin ratio (Cu:Cp). Meta-analyses also show copper abnormalities in Alzheimer disease (AD); however, a direct comparison of copper biological status in the two diseases has never been carried out. An investigation of copper status in serum (copper, ceruloplasmin, non-Cp Cu and Cu:Cp, adjusting for sex and age) and a 24-hour copper urine assessment of patients with AD, WD (nine WD patients at baseline and 24 WD patients under D-penicillamine [D-pen] treatment)], and healthy controls (35 healthy controls) was carried out. In a sample of 385 AD cases and 336 healthy controls investigated in previous studies, non-Cp Cu and Cu:Cp were higher in AD than healthy controls (both  $P < .001$ ), but lower than in WD patients at baseline. While non-Cp Cu was similar in AD and WD, mean value of Cu:Cp distinguished AD from WD ( $P < .016$ ), with the Cu:Cp Cohen d value of 0.8 (indicating a large biological effect) in AD vs healthy controls, which further increases in WD to 2.2. Concentrations of 24-hour urine copper in 35 healthy controls were compared with those at baseline of an AD patient group analyzed in a previous study on the effect of D-pen on the disease progression. AD patients at baseline had

higher concentrations of 24-hour urine copper ( $P < .001$ ; AD 12.05  $\mu\text{g/day}$  [median, interquartile range 7.85–22.50]) than healthy controls (4.82  $\mu\text{g/day}$  (median, interquartile range: 3.31–7.43)). Values of 24-hour urine copper higher than the cutoff of 200  $\mu\text{g/day}$  were found in 87% of WD and 78% of AD. The direct comparison of AD and WD patients shows a copper failure affecting both diseases, but at a different degree, with the Cu:Cp signifying a more severe grade in WD.

**Г7-3 - Vodenicharov V, Ivanova I, Mitov K. Assessing Salivary Cortisol in Research of Shift Work Risks Among Casino Employees in Bulgaria. J IMAB. 2018 Dec;24(4):2228–31.**

Оценка на кортизол в слюнка при изследване на рисковете от работата на смени сред служителите на казина в България

Въпреки че ефектите от посменният режим на работа върху служителите в казина са документирани, няма данни, които специално да описват ефекта на стреса върху секрецията на хормоните. Настоящото изследване оценява използването на концентрацията на кортизол в слюнката като биомаркер за нивото на стрес сред служители на казина в България. Тези нови данни подчертават необходимостта от изследване на циркадния ритъм на кортизола в такава работна среда. В настоящото изследване са включени 15 здрави служители (9 жени и 6 мъже) от четири казина в София. Всички са с работен режим дневна и нощна смяна. Пробите от слюнка за определяне на кортизолови нива са получени по време на работните смени и са взети 3кратно през дневна смяна и 3кратно през последващата нощна смяна. Нивата на кортизол в слюнката са определени чрез течна хроматография-тандемна масспектрометрия (LC/MS/MS). Резултатите за кортизола в слюнката са представени в ng/ml. Средните (+/- SD) нива на кортизол в слюнката за дневна смяна (средно 4,254 ng/ml, +/- SD 1,8978 ng/ml) са по-високи от тези на нощната смяна (средно 1,819 ng/ml, +/- SD 0, 8906 ng/ml). Нивата на кортизол в слюнката на хора, работещи на 12-часови смени в казината, показват нормална динамика както при дневните, така и при нощните смени. Резултатите показват нормална денонощна динамика на кортизола. Нивата на кортизол са с най-високи стойности сутрин и най-ниски през нощта. Това е първото изследване, оценяващо нивата на кортизол при служители на посменна работа в казина.

## Assessing Salivary Cortisol in Research of Shift Work Risks Among Casino Employees in Bulgaria

Although the effects of shift work on casino employees have been documented, no data exists describing the effect of stress on the hormone secretion. The present quantitative study evaluates the use of salivary cortisol concentration as a biomarker of the stress level among casino employees in Bulgaria. This new data emphasize the need to examine the circadian rhythm of cortisol in a casino environment. Fifteen healthy employees (9 women and 6 men) from four casinos in Sofia were included in the present study. All of them were working rotating day and night shifts. The participants gave salivary samples for determination of cortisol levels during their shift work. Samples were taken 3 times during one day shift and 3 times during their next night shift. Salivary cortisol levels were obtained by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). The results for salivary cortisol were presented in ng/ml. Mean (+/- SD) for dayshift salivary cortisol levels (Mean 4,254 ng/ml, +/- SD 1,8978ng/ml) were higher than those of the night shift (Mean 1,819 ng/ml, +/- SD 0,8906 ng/ml). Salivary cortisol levels of people working 12 hour shifts in casinos showed normal dynamics in both of their day and night shifts. The results show normal diurnal cortisol dynamics. Cortisol levels had highest values in the morning and lowest at night. This is the first research assessing cortisol levels in casino employees.

**Г7-4 - Karamfilova V, Gateva A, Assyov Y, Alexiev A, Savov A, Yaneva N, Ivanova I, Ivanova-Boyanova R, Ivanova R, Vlahova Z, Mateva L, Kamenov Z. PNPLA3 I148M Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes. J Gastrointest Liver Dis. 2019 Dec;28(4):433–8.**

PNPLA3 I148M полиморфизъм при пациенти с неалкохолна стеатоза на черния дроб

Неалкохолната стеатозна болест на черния дроб (NAFLD) е тясно свързано със затлъстяването и инсулиновата резистентност и следователно предразполага към диабет тип 2 и сърдечно-съдови заболявания. Отлагането на липиди в черния дроб изглежда е критично в патогенезата на NAFLD. Често срещан генетичен вариант е пататин-подобният фосфолипазен домейн-съдържащ протеин 3 (PNPLA3), който се свързва с

NAFLD. Целта на настоящото проучване е да се оцени връзката между PNPLA3, ключов ген на липидния метаболизъм и метаболитните характеристики при пациенти със затлъстяване и NAFLD с и без предиабет. Включени са общо 208 пациенти с NAFLD със затлъстяване без диабет (n=125) и с предиабет (n=83). Генотипизирането на PNPLA3 I148M вариант (rs738409) се извърши чрез рестрикционен анализ. По отношение на полиморфизма на rs738409 (I148M), CG генотипът е положително свързан с предиабет, инсулинова резистентност, дислипидемия и метаболитен синдром в сравнение с дивия CC генотип. Носителите на варианта PNPLA3 I148M имат 9,6 пъти по-висок риск от глюкозни нарушения в сравнение с дивия генотип (OR 9,649, 95%CI 2,100-44,328, p=0,004). Носителите на варианта PNPLA3 I148M също имат 3 пъти по-висок риск за наличие на метаболитен синдром (OR 2,939, 95% CI: 1,590-5,434, p=0,001) и 2,1 пъти по-висок риск за наличие на инсулинова резистентност (OR 2,127, 95% CI: 1,078-4,194, p=0,029). PNPLA3 I148M се свързва с повишен риск от предиабет, метаболитен синдром и инсулинова резистентност при пациенти със затлъстяване с NAFLD.

#### PNPLA3 I148M Polymorphism in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease, Obesity and Prediabetes

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is closely associated with obesity and insulin resistance, and therefore predisposes to type 2 diabetes and cardiovascular diseases. Lipid deposition in the liver seems to be critical in the pathogenesis of NAFLD. A common genetic variant, the patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) has been associated with NAFLD. The aim of the present study was to evaluate the association between PNPLA3, key gene of lipid metabolism and the metabolic traits in obesity NAFLD patients with and without prediabetes. A total of 208 obese NAFLD patients without (n=125) and with prediabetes (n=83) were included. The genotyping of PNPLA3 I148M variant (rs738409) was performed by restriction analysis. Regarding rs738409 (I148M) polymorphism, CG genotype was positively correlated with prediabetes, insulin resistance, dyslipidemia and metabolic syndrome compared to the wild CC genotype. The carriers of the PNPLA3 I148M variant have 9.6-fold higher risk of glucose disturbances compared to wild genotype (OR 9.649, 95%CI 2.100-44.328, p=0.004). The carriers of the PNPLA3 I148M variant also have a 3 times higher

risk for the presence of metabolic syndrome (OR 2.939, 95% CI: 1.590-5.434, p=0.001) and a 2.1-fold higher risk for the presence of insulin resistance (OR 2.127, 95% CI: 1.078-4.194, p=0.029). PNPLA3 I148M is associated with increased risk of prediabetes, metabolic syndrome and insulin resistance in obese patients with NAFLD.

**Г7-5 - Genova M, Atanasova B, Ivanova I, Todorova K, Svinarov D. Trace Elements and Vitamin D in Gestational Diabetes. Acta Medica Bulgarica. 2018 Mar 1;45(1):45–9.**

#### Микроелементи и витамин D при гестационен диабет

Гестационният захарен диабет (ГЗД), едно от най-честите усложнения на бременността и се дефинира като непоносимост към глюкоза с начало или първо разпознаване по време на бременност. Неговото разпространение варира в световен мащаб в зависимост от характеристиките на основната популация и приложените диагностични критерии. Етиологията е мултифакторна и не е достатъчно изяснена. Наличните данни предполагат, че основата на патогенезата е относително намалена инсулинова секреция, съчетана с инсулинова резистентност, предизвикана от бременността. Идентифицирани са променливи и непроменливи рискови фактори за развитие. Микроелементите и витамин D могат да допринесат за изясняване на модифицируемите фактори при прогнозиране на риска. Основните микроелементи по време на бременност са необходими за преодоляване на системния оксидативен, метаболитен и възпалителни стрес. Натрупани са все още неубедителни доказателства за връзката между по-високата честота на недостатъчност/дефицит на витамин D по време на бременност и ГЗД. По-ниското ниво на 25-ОН витамин D може да бъде свързано с повишен риск от развитие на анемия, включително и при бременни жени. Този преглед има за цел да предостави преглед на възможната връзка между витамин D и микроелементите като рискови фактори за развитието на ГЗД.

## Trace Elements and Vitamin D in Gestational Diabetes

Gestational diabetes mellitus (GDM), one of the most common pregnancy complications, is defined as glucose intolerance with onset or first recognition during pregnancy. Its prevalence varies worldwide in dependence on characteristics of the underlying population and applied diagnostic criteria. The etiology is multifactorial and not sufficiently elucidated. Available evidence suggests that the base of pathogenesis is relatively diminished insulin secretion coupled with pregnancy-induced insulin resistance. Modifiable and non-modifiable risk factors for development have been identified. Trace elements and vitamin D could be contributed to modifiable factors for prediction the risk in a large population. Essential trace elements in pregnancy are necessary to overcome systemic oxidative, metabolic and inflammatory stress. Evidence, still inconclusive, has been accumulated about the relation between higher incidence of vitamin D failure/deficiency during pregnancy and GDM. The lower level of 25-OH vitamin D could be associated with increased risk for anemia development, also including pregnant women. This review intends to provide an overview of the possible link between both vitamin D and trace elements as risk factors for GDM development.

**Г7-6 - Squitti R, Ghidoni R, Simonelli I, Ivanova ID, Colabufo NA, Zuin M, Benussi L, Binetti G, Cassetta E, Rongioletti M, Siotto M. Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2018 Jan;45:181–8.**

Дисхомеостаза на медта при болестта на Уилсън и болестта на Алцхаймер, както може да се види от индикаторите за мед в серума и урината

Нарушената обмяна на медта е причина за болестта на Уилсън (Wilson's Disease, WD), което е рядко заболяване, характеризиращо се с повишени нива на мед в кръвта, несвързана с церулоплазмин (non-Cp Cu, „свободна“ мед). При болестта на Алцхаймер (Alzheimer's Disease, AD) мета-анализите показват, че медта намалява в мозъка, но се увеличава в серума, поради увеличаването на non-Cp Cu компонента. Въпреки приликите, не е извършвано директно сравнение на биологичния статус на медта при



двете заболявания досега. За да запълним тази празнина, ние оценихме серумната мед, церулоплазмин, non-Cp Cu и Cu:Cp при 721 лица, изследвани в предишни проучвания и бяха преоценени за сравнение на маркерите за статус на мед между AD, WD и здрави контроли. По-конкретно, данните от 336 здрави контроли бяха сравнени с тези от извадка от 9 пациенти с WD приети в Liver Unit San Paolo School of Medicine, Университет Милано, Италия. След това оценихме 24-часовата екскреция на мед в урината при 24 пациенти с WD на лечение с D-пенициламин (D-pen) и при 35 здрави контроли и сравнихме резултатите с тези на пациенти с AD, участващи в клинично изпитване фаза II на D-pen, публикувано по-рано. След коригиране за пола и възрастта, серумните non-Cp Cu и Cu:Cp се констатираха по-високи стойности при AD и WD, отколкото при здрави контроли (и двете  $p < 0,001$ ). Докато non-Cp Cu е подобен между AD и WD, Cu:Cp е по-висок при WD ( $p < 0,016$ ). 24-часовата екскреция на мед в урината при пациенти с AD (12,05  $\mu\text{g}/\text{ден}$ ) е по-висока, отколкото при здрави контроли (4,82  $\mu\text{g}/\text{ден}$ ;  $p < 0,001$ ). 77,8% от пациентите с AD при лечение с D-pen са имали 24-часова екскреция в урината над 200  $\mu\text{g}/\text{ден}$ , което предполага недобър контрол на медната екскреция. Това проучване дава нов поглед върху патофизиологията на хомеостазата на медта при AD, показвайки нарушен баланс в медната обмяна, а съотношението Cu:Cp дава надежди да бъде добър дескриминативен маркер за статуса на медната обмяна. Отвъд своите ограничения, това проучване дава нов поглед върху медната дисфункция при AD, което предполага потенциала на терапията с цинк за тези пациенти с AD, характеризиращи се с променен метаболизъм на медта, тъй като нашата лаборатория наскоро въведе идеята за различни „видове“ AD. Независимо от това, ако терапията с цинк може да подобри когнитивните дефицити при този процент пациенти с AD, както може да се очаква от опита с WD, трябва да бъде доказано чрез специално клинично изпитване.

#### Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators

Abnormal handling of copper is the cause of Wilson disease (WD), a rare disorder typified by increased levels in plasma copper not-bound to ceruloplasmin (non-Cp Cu, also known as 'free' copper). In Alzheimer's disease (AD), meta-analyses show that copper decreases in brain but increases in serum, due to the non-Cp Cu component increase. Despite

the similarities, a direct comparison of copper biological status in the two diseases has never been carried out. To fill this gap, we evaluated serum copper, ceruloplasmin, non-Cp Cu and Cu:Cp in 721 subjects investigated in previous studies and were re-evaluated for the comparison of markers of copper status among AD, WD and healthy controls. More specifically, data from 336 healthy controls were compared with those of a sample of 9 patients with WD, recruited from the Liver Unit San Paolo School of Medicine, University of Milan, Italy. We then assessed 24 h copper urinary excretion in 24 WD patients under D-penicillamine (D-pen) treatment and in 35 healthy controls, and compared results with those of AD patients participating to a D-pen phase II clinical trial previously published. After adjusting for sex and age, serum non-Cp Cu and Cu:Cp resulted higher in AD and in WD than in healthy controls (both  $p < 0.001$ ). While non-Cp Cu was similar between AD and WD, Cu:Cp was higher in WD ( $p < 0.016$ ). 24 h urinary copper excretion in AD patients ( $12.05 \mu\text{g/day}$ ) was higher than in healthy controls ( $4.82 \mu\text{g/day}$ ;  $p < 0.001$ ). 77.8% of the AD patients under D-pen treatment had a 24 h urinary excretion higher than  $200 \mu\text{g/day}$ , suggestive of a failure of copper control. This study provides new insight into the pathophysiology of copper homeostasis in AD, showing a failure of copper control and the Cu:Cp ratio as an eligible marker. Beyond its limitations, this study provides new insight into the disposal of copper dysfunction in AD, suggesting the potential of Zinc therapy for those AD patients typified by altered copper metabolism, as our laboratory has recently pioneered with the notion of different “types” of AD. Nevertheless, if Zinc therapy can improve cognitive deficits in this percentage of AD patients, as it might be expected from the WD experience, has to be proven through a dedicated phase II clinical trial.

**Г7-7 - Ivanova I, Atanasova B, Kostadinova A. Targets in urinalysis for Wilson's disease. Journal of Integrated OMICS. 2017; 7(2):1-12.**

#### Цели в анализа на урината при болест на Уилсън

Урината е често използвана проба за анализ с клинично значение за откриване и проследяване на лечението на широк спектър от заболявания. Лабораторните проби от урина се класифицират по вида на събирането и по процедурата за събиране на: първа и

втора сутрешна урина, произволна порция урина, 24-часова проба от урина и др. Тълкуването на резултатите е полезен клиничен инструмент.

Хармонизирането в лабораторната медицина изисква задълбочено познаване на всички стъпки в цялостния процес на тестване. Някои критични фактори (подходящо време за вземане на проби; вид на пробата; контейнер и обем на пробата; транспортиране и съхранение с подходяща продължителност и температурен режим) могат да служат като индикатори за качество. Една ефективна стратегия за диагностициране въз основа анализа на урина трябва да се основава на стандартни процедури за събиране, транспорт и анализ.

Подчертаното значение на анализа на урината при диагностиката и лечението на болестта на Уилсън (Wilson's Disease, WD) е причината за нашия специален интерес към този биологичен материал – подготовка на пробата преди анализ, аналитично определяне на мед в урината, честота на изследвания на урината за проследяване на адекватността на хелиращата терапия, превенция на вероятни неблагоприятни ефекти като нефротичен синдром, ефективен клиничен лабораторен подход като цяло.

Урината е стабилна биологична матрица за анализ на мед. Стабилността е доста по-висока в случай на приложение на D-пенициламин (1000 mg/ден) в сравнение с контролната група урини изследвани при два температурни режима (стайна 15-25°C и хладилна 2-8°C температура). Пластмасови контейнери и епруветки са изключително подходящи за вземане на проби и преданалитична подготовка с гаранция за липса на контаминация. Пламъковата атомна абсорбция е приемлив аналитичен метод за анализ на мед в урина в концентрационен диапазон над 0,23  $\mu\text{mol/L}$  (граница на откриване). Мониторинг на концентрацията на протеин в урината в 24-часова проба се препоръчва най-малко на всеки 6 месеца при пациенти с WD на D-пенициламин, за да се предотврати евентуално развитие на нефротичен синдром - рядък, но тежък нежелан ефект.

#### Targets in urinalysis for Wilson's disease

Urine is a commonly used specimen for analysis with clinical importance to detect and manage a wide range of disorders, prevalent and rare. Laboratory urine samples are classified by the type of collection or by the collection procedure – first and second morning urine, a random urine portion, 24-hour urine sample and etc. Results interpretations are useful clinical

tools. Harmonization in laboratory medicine requires deep knowledge of all steps in total testing process - from pre pre-analytical to post – examination. Some critical factors (proper time for sampling; sample type; sample container and volume; transport and storage with appropriate time and temperature) may serve as quality indicators. An effective urine diagnosing strategy should be based on standard procedures for collection, transport and analysis.

Underlined impact of urine analysis in Wilson’s disease (WD) management is the reason for our special interest in this biological specimen – sample preparation before analysis, analytical determination of copper in urine, frequency of urine examinations to monitor the adequacy of chelating therapy, prevention of probable adverse effects as nephrotic syndrome, effective clinical laboratory approach as whole in this very complicated clinical situation.

Our experience defines urine as a delicate but stabile biological matrix for copper analysis. The stability is rather higher in the case of D-penicillamine administration (1000 mg/day) in comparison to urine control group for both studied temperature regimens (ambient 15-25°C and refrigeration 2-8°C). Plastic containers and tubes are pointedly suitable for sample collection and pre-analytical preparation with guarantee the lack of contamination. Flame atomic absorption is acceptable analytical method for copper urine analysis in concentration range  $Cu \geq 0.23 \mu\text{mol/L}$  (Limit of detection). Monitoring of urine protein concentration in 24-hour sample is recommended at least every 6 months in WD patients on D-penicillamine to prevent eventual development of nephrotic syndrome - rare but severe adverse effect.

**Г7-8 - Vodenicharov V, Ivanova I, Mitov K. Occupational Stress among Welders in Bulgaria. Acta Morphologica et Anthropologica. 2020;27(1–2):98–101.**

#### Професионален стрес сред заварчиците в България

Основната цел на това изследване е да се оцени нивото на кортизол в слюнката на български заварчици. Изследвани са общо 39 здрави доброволци, работещи като заварчици – 31 мъже и 8 жени; възраст  $37 \pm 9$  г. Бяха събрани две проби от слюнка за всеки участник в специализирани контейнери – Salivette (Sarstedt, Rommelsdorf, Германия). Първа проба (кортизол 1) между 9 и 11 сутринта и втора между (кортизол 2) 15 – 17 часа. Референтните стойности на кортизола са 0,2-4,4 ng/ml. Повишени нива на кортизол над референтния диапазон са открити само при първите проби за кортизол. Средните нива

на кортизол 1 в слюнката са  $3,47 \pm 2,47$  ng/ml за всички изследвани индивиди с по-високи нива при мъжете ( $3,67 \pm 2,35$  ng/ml), отколкото при жените ( $2,71 \pm 2,95$  ng/ml). Настоящото количествено изследване оценява използването на концентрацията на кортизол в слюнката като биомаркер за стрес сред заварчиците в България.

### Occupational Stress among Welders in Bulgaria

The main goal of this study is to assess salivary cortisol levels among Bulgarian welders. Totally 39 healthy volunteers working as welders have been investigated – 31 males and 8 females; age  $37 \pm 9$  yr. Two saliva samples were collected for each participant in specialized containers – Salivette (Sarstedt, Rommelsdorf, Germany). First sample (Cortisol 1) between 9 and 11 am and second between (Cortisol 2) 15 – 17 pm. Cortisol reference values are 0,2-4,4 ng/ml. Increased cortisol levels above the reference range were found only in Cortisol 1. Mean Cortisol 1 salivary levels are  $3,47 \pm 2,47$  ng/ml for all studied individuals with higher levels in males ( $3,67 \pm 2,35$  ng/ml) than females ( $2,71 \pm 2,95$  ng/ml). The present quantitative study evaluates the use of salivary cortisol concentration as a biomarker of stress among welders in Bulgaria

**Г7-9 - Ivanova I, Vodenicharov V, Atanasova B, Mitov K. Zinc Salivary Levels in Healthy Individuals of Bulgarian Population. Acta Morphologica et Anthropologica. 2018;25(3–4):50–3.**

Нива на цинк в слюнката при здрави индивиди от българското население

Основната цел на това изследване е да се оцени нивото на цинк (Zn) в слюнката при здрави българи. Изследвани са общо 40 здрави доброволци – 31 мъже и 9 жени. Нивата на Zn са измерени в сутрешна слюнка, събрана в специализирани епруветки Saliveti, Sarstedt. След центрофугиране слюнката бе разредена 1:2 с 1% HNO<sub>3</sub>. За определянията бе използвана пламъкова атомно-абсорбционна спектрометрия (AAAnalyst 400, Perkin-Elmer, с корекция за деутерий). Средните нива на Zn в слюнката са  $1,43 \pm 0,57$   $\mu\text{mol/L}$  за всички изследвани индивиди и по-високи нива при жените ( $1,76 \pm 0,56$   $\mu\text{mol/L}$ ), отколкото при мъжете ( $1,36 \pm 0,55$   $\mu\text{mol/L}$ ) без значима разлика ( $p = 0,076$ ). Нашите предишни проучвания установяват значително по-високи серумни нива на Zn при жени

(13,09 ± 2,25 μmol/l), отколкото при мъже (12,45 ± 3,58 μmol/l). Вероятно нивата на цинк в слюнката следват подобна биологична полова вариация, както серумните нива.

### Zinc Salivary Levels in Healthy Individuals of Bulgarian Population

The main goal of this study is to assess zinc (Zn) salivary levels in healthy Bulgarian individuals. Totally 40 healthy volunteers have been investigated – 31 males and 9 females. Zn is measured in morning saliva collected in Saliveti tubes, Sarstedt. After centrifugation, the saliva is diluted 1: 2 with 1%HNO<sub>3</sub> and Zn is measured by flame atomic absorption spectrometry (AAAnalyst 400, Perkin-Elmer, with deuterium correction). Mean Zn salivary levels are 1.43 ± 0.57 μmol/ L for all studied individuals and higher levels in females (1.76 ± 0.56 μmol / L) than males (1.36 ± 0.55 μmol/L) with no significant difference (p = 0.076). Our previous studies establish significantly higher serum Zn levels in females (13.09 ± 2.25 μmol/l) than in males (12.45 ± 3.58 μmol/l). It seems likely that salivary Zn levels follow similar biological gender variation, as serum levels do.

**Г7-10 - Genov D, Ivanova I, Pencheva V, Kundurdgiev A. Serum uromodulin - A marker for diagnosis of chronic kidney diseases. Acta Medica Mediterranea. 2019;35(6):3249–53.**

Серумен уромодулин - маркер за диагностика на хронични бъбречни заболявания

Хроничната бъбречна недостатъчност е едно от най-честите хронични заболявания, водещи до увреждане и значително намаляване на качеството на живот. Основна роля в диагностиката му играе клиничната лаборатория, тъй като предоставя бързи, лесни и сравнително евтини методи. Въпреки че има добре установени маркери като серумен креатинин и цистатин С, търсенето на нови надеждни биомаркери за подпомагане на оценката на бъбречната функция и за прогнозиране на еволюцията на заболяването продължава. Един от тях може да бъде уромодулинът, известен също като протеин на Tamm-Horsfall. Точната му функция обаче все още предстои да бъде изяснена. Целта на изследването е да се оцени ролята на серумния уромодулин като маркер за бъбречно увреждане при пациенти с хронични бъбречни заболявания. Общо 68 пациенти бяха включени в това проспективно обсервационно проучване в Клиниката по нефрология на УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ за период от две години (2017-2018 г.). Средната възраст на пациентите е 62,21±11,869 години със съотношение мъже/жени

31/37 (45,6% / 54,4%). При всички пациенти са извършени лабораторни изследвания на кръв и урина, абдоминална ехография с измерване на резистивен индекс и серумен уромодулин. Серумните нива на уромодулин са значително отрицателно корелирани със серумния креатинин ( $r = -0,720$ ,  $p < 0,0001$ ), уреята ( $r = -0,717$ ,  $p < 0,0001$ ), пикочната киселина ( $r = -0,296$ ,  $p = 0,017$ ), цистатин С ( $r = -0.353$ ,  $p = 0.004$ ) и резистивен индекс ( $r = -0.353$ ,  $p = 0.004$ ). Съответно, установена е положителна връзка с изчислената скорост на гломерулна филтрация ( $r = 0,692$ ,  $p < 0,0001$ ). Серумните нива на уромодулин значително корелират с резистивния индекс и всички вече установени лабораторни параметри, използвани за оценка на бъбречното увреждане. Натрупаните данни дават основание да заключим, че уромодулинът може да се използва като потенциален маркер за диагностика и ранна оценка на прогресията на хроничното бъбречно заболяване.

#### Serum uromodulin - A marker for diagnosis of chronic kidney diseases

Chronic kidney disease is one of the most frequent chronic diseases causing disability and a significant decrease in quality of life. A major role in its diagnosis plays the clinical laboratory because it provides fast, easy and relatively cheap methods. Although there are well-established markers such as serum creatinine and cystatin C, the search for new reliable biomarkers to help assess kidney function and to predict the evolution of the disease continues. One of them can be Uromodulin, also known as Tamm-Horsfall protein. However, its exact function still needs to be clarified. The aim of the study was to evaluate the role of serum uromodulin as a marker of the renal impairment in patients with chronic renal diseases. A total of 68 patients were enrolled in this prospective observational study in the Clinic of Nephrology of the University Hospital "St. Ivan Rilski" for a period of two years (2017-2018). The mean age of the patients was  $62.21 \pm 11.869$  years with the male/female ratio 31/37 (45.6% / 54.4%). Laboratory blood and urine tests, abdominal ultrasound with resistive index measurement and serum uromodulin investigations were performed in all patients. Serum uromodulin levels were significantly negatively correlated with serum creatinine ( $r = -0.720$ ,  $p < 0.0001$ ), urea ( $r = -0.717$ ,  $p < 0.0001$ ), uric acid ( $r = -0.296$ ,  $p = 0.017$ ), cystatin C ( $r = -0.353$ ,  $p = 0.004$ ) and resistive index ( $r = -0.353$ ,  $p = 0.004$ ). Correspondingly, a positive relationship with estimated glomerular filtration rate ( $r = 0.692$ ,  $p < 0.0001$ ) was found. Serum uromodulin levels significantly correlate with the resistive index and all already established laboratory parameters used for evaluation of renal impairment. It can be used as a potential marker for diagnosis and early assessment of chronic kidney disease progression.

**Г7-11 - Ivanova I, Siotto M, Genova M, Atanasova B, Squitti R. Study of ceruloplasmin activity in healthy Bulgarians. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2017;55(Special Suppl):S998-S998.**

Изследване на активността на церулоплазмин при здрави българи

Церулоплазмин (Cp) е основният транспортен протеин на медта (Cu) в организма. Обикновено се измерва за диагностициране на редки заболявания като болест на Уилсън (Wilson's Disease, WD), синдром на Менкес и ацерулоплазминемия. Cp може да се определи както протеинова концентрация (iCp) и като ензимна активност (eCp). Рутинното имунологично изследване е натоварено с някои методологични ограничения, така че оценката на ензимната eCp активност може да бъде полезен подход. Настоящото проучването обхваща 41 здрави българи (мъже:жени = 16:25) на средна възраст  $43 \pm 13$  години. Всички серуми бяха изследвани за iCp, eCp и серумна Cu. Използвани са следните методи: iCp -имунотурбидиметричен метод (Sigma-Aldrich, Pentra ABX); eCp - ензимен метод с хромогенен субстрат о-дианизидин (Sigma-Aldrich, Pentra ABX); серумни нива на Cu – пламъкова атомна абсорбция (Perkin Elmer, AAnalyst 400 Plus). Резултатите са представени като средно $\pm$ SD и диапазон: iCp –  $36,9 \pm 5,4$  (27,9 до 50,99) mg/dL; eCp –  $106,7 \pm 20,4$  (34,32 до 156,13) IU/L и серумна Cu –  $15,4 \pm 1,8$  (12,4 до 20,16)  $\mu$ mol/L. Установена е лека значима разлика между eCp при мъже и жени ( $p=0,0458$ ), с по-високи стойности при жените ( $111,9 \pm 18,2$  IU/L) спрямо мъжете ( $98,6 \pm 20,5$  IU/L). Корелацията между iCp и eCp е висока  $-r=0,838$ . Установена е ниска корелация между Cu и iCp ( $r=0,520$ ), както и между Cu и eCp ( $r=0,43$ ). Това е първото изследване на eCp при здрави българи. Открихме средни стойности, подобни на тези, докладвани в литературата за други популации. При 5% ( $n=2$ ) от индивидите eCp е извън референтния диапазон за метода (60 – 140 IU/L). Установена е добра корелация между iCp и eCp, а също и за Cp (концентрация и ензимна активност) и Cu. Напоследък се наблюдава повишено клинично значение на eCp. Състоянието на медта изглежда е важно не само за редки заболявания, но и при социално значими заболявания. По-задълбочени познания за eCp (референтни диапазони, фактори на вариации, клинично значение) може да са необходими при нарушен меден баланс.



## Study of ceruloplasmin activity in healthy Bulgarians

Ceruloplasmin (Cp) is the major carrier of copper (Cu) in the body. Typically, it is measured for diagnosis of rare diseases such as Wilson disease (WD), Menke's syndrome and aceruloplasminemia. Cp could be determined both as protein concentration (iCp) and enzymatic activity (eCp). Routine immunological testing is loaded with some methodological limitations, so evaluation of enzymatic Cp activity might be a useful approach. The study comprised 41 healthy Bulgarians (male:female = 16:25) with average age of  $43 \pm 13$  years old. All sera were examined for iCp, eCp and serum Cu. The following methods were used: iCp - immunoturbidimetric method (Sigma-Aldrich, Pentra ABX); eCp - enzymatic method with chromogenic substrate o-dianisidine (Sigma-Aldrich, Pentra ABX); serum Cu - flame atomic absorption (Perkin Elmer, AA Analyst 400 Plus). Results are presented as mean  $\pm$  SD and range: iCp -  $36,9 \pm 5,4$  (27,9 to 50,99) mg/dL; eCp -  $106,7 \pm 20,4$  (34,32 to 156,13) IU/L and serum Cu -  $15,4 \pm 1,8$  (12,4 to 20,16)  $\mu$ mol/L. Slight significant difference between male and female eCp ( $p=0,0458$ ) was found, with higher values in females ( $111,9 \pm 18,2$  IU/L) vs. males ( $98,6 \pm 20,5$  IU/L). The correlation between iCp and eCp was high -  $r=0,838$ . Mild correlation was established between Cu and iCp ( $r=0,520$ ), and also between Cu and eCp ( $r=0,43$ ). This is the first study on eCp in healthy Bulgarians. We found mean values similar to those reported in the literature for other populations. In 5% ( $n=2$ ) of individuals eCp was out of the reference range for the method (60 - 140 IU/L). Good correlation was established between iCp and eCp, and also for Cp (concentration and enzymatic activity) and Cu. Recently, increased clinical implication of eCp is observed. Copper status seems to be important not only for rare disorders but in social significant diseases also. Deeper knowledge on eCp (reference ranges, factors of variations, clinical significance) could be necessary in disordered copper balance.

**Г7-12 - Vodenicharov V, Vodenicharov E, Mitov K, Stoyneva Z, Ivanova I. Stress Levels and Risks among Casino Employees in Bulgaria. Acta Morphologica et Anthropologica. 2016;23:111-4.**

### Нива на стрес и рискове сред служителите в казината в България

Стресът е част от съвременния начин на живот и в някои случаи може да доведе до стрес-свързани заболявания. Това особено важи за стресът свързан с натоварването в работната среда. Заетите на работа в казината се причисляват към служителите с високо натоварване поради посменната работа. Целта на това проучване е да се измери нивото

на стрес и риска от развитие на високи нива на стрес сред жените и мъжете, работещи в 18 казина в България. Това проучване е проведено върху 388 служители (221 жени и 167 мъже) от 18 казина, които са попълнили въпросника за скалата на възприемания стрес. Резултатите показват по-високи общи нива на стрес сред работещите жени в казината, отколкото при мъжете. Рискът от развитие на стрес също е по-висок в групата на жените. Тези нови данни може да отворят пътя към нови изследвания на работния стрес и може би едно от бъдещите предизвикателства пред българските казина ще бъде интегрирането на програми за превенция на стреса и повишаване на осведомеността, за да се сенсibiliзират служителите към проблеми, свързани със стреса.

### Stress Levels and Risks among Casino Employees in Bulgaria

The aim of this study was to measure the stress level and the risk of developing high levels of stress among female and male casino workers in Bulgaria. This quantitative study was conducted on 388 casino employees (221 women and 167 men) from 18 casinos, who completed Perceived Stress Scale questionnaire. The results show higher general stress levels among working women in casinos than men. The risk of developing stress is also higher in the group of women. The study of the levels of stress and risk of developing stress has never been done before among Bulgarian casino employees. These new data may open the way to new studies in working stress and perhaps, one of the future challenges for Bulgarian casinos will be integrating stress prevention and awareness programs to sensitize gaming employees to problems related to stress

**Г8-1 - Ivanova I, Atanasova B, Vodenicharov V, Mitov K, Blood collection tubes: an aspect of preanalytic variations of copper and zinc analyses. International Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research. 2017;3(7): 2081-2084.**

Епруветки за кръв: аспекти в преданалитичните вариации при определяне на мед  
и цинк

Като част от общият процес на лабораторните анализи е преданалитичният етап, който е най-натоварен с грешки – около 70%, поради което за гарантиране на висока аналитична надеждност на резултатите е необходимо познаване и мониториране на всеки един етап от анализа, особено на вземането и обработването на биологичните проби.

Епруветките за вземане на кръв са от съществено значение за качеството на пробата. Целта на настоящото проучване е да се изследва приложимостта на епруветките Barricor LH (LH – lithium heparin) за определяне на мед (Cu) и цинк (Zn) с оглед на влиянието на добавките и компонентите на епруветките. Направено е сравнение между няколко вида епруветки при анализа на микроелементи. В проучването са включени 32 доброволци, на които кръв е взета едновременно в 3 вида епруветки: Barricor LH (REF 365032) и специализирани за микроелементен анализ K<sub>2</sub>EDTA плазма (REF 368381) и серумни с гел (TE) (REF 368380). Концентрациите на Cu и Zn са измерени с пламъкова атомна абсорбция с помощта на AAnalyst 400, Perkin Elmer. Определянията са направени в една серия, за да се минимализира влиянието на аналитичната вариация.

При определянето на Cu се установи статистически значима разлика между резултатите в зависимост от типа на епруветката ( $p > 0.001$ ). Медианата и интерквартилният диапазон (Mediana (IQR)) са както следва: K<sub>2</sub>EDTA 19,06 (14,76 – 31,59), Barricor LH 19,43 (4,76 – 31,96) и TE серумни епруветки 19,34 (15,01 – 35,23). По отношение на определянето на Zn измерванията не показва значима разлика ( $p = 0,753$ ). Резултатите са както следва Mediana (IQR): K<sub>2</sub>EDTA 10,74 (3,06 – 15,45), Barricor LH 10,25 (2,91 – 14,38) и TE серумни епруветки 10,71 (2,91 – 16,14).

Като нов тип епруветки за вземане на кръв BD Barricor LH епруветките служат за отделяне на литиево хепаринова плазма и измерванията на микроелементите Cu и Zn имат стойности близки до тези от специализираните за микроелементен анализ епруветки. Препоръчително е всяка лаборатория да установи своя начин на работа и използване на лабораторни консумативи е собствен избор основан на възможностите и нуждите на анализа. Особено важно е това съображение при определяне на нива в ниския концентрационен диапазон.

#### Blood collection tubes: an aspect of preanalytic variations of copper and zinc analyses

Blood collection devices are essential for specimen quality. The aim of the present study is to examine the applicability of newly produced Barricor LH tubes for copper (Cu) and zinc (Zn) in view of influence due to tube additives and components. Comparison to already existing tubes for trace elements is made. Blood is drawn from 32 volunteers into 3 types BD tubes: Barricor LH (REF 365032), K<sub>2</sub>EDTA (REF 368381) and Trace element (TE) serum (REF 368380). Cu and Zn concentrations are measured by flame atomic absorption using AAnalyst

400, Perkin Elmer. Statistically significant differences between Cu results exist depending on tube type ( $P < 0.001$ ) and Zn ( $R > 0.851$ ). Cu and Zn results for Barricor LH plasma tubes are comparable to those, designed for trace analysis: K2EDTA plasma and TE serum. It could be recommended for each laboratory to test the preferred blood collected tubes for determination of Cu and Zn especially when low concentrations have been suspected.

**Г8-2 - Kopchev A, Monov S, Kyrkchiev D, Ivanova I, Georgiev T. Vascular endothelial growth factor (VEGF), cartilage oligomeric protein (COMP) and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) as serum biomarkers in psoriatic arthritis. International Journal of Pharmaceutical Science. 2017;6(7):8-12.**

Съдов ендотерален растежен фактор (VEGF), хрущялен олигометричен протеин (COMP) и матрична металопротеиназа 3 (MMP-3) като серумни биомаркери при псориатичен артрит

Псориатичният артрит (PsA) е хронично възпалително мускулно-скелетно заболяване, характеризиращо се със засягане на аксиални и периферни стави, както и извънставни прояви като заболяване на кожата и ноктите, ентезит, дактилит, увеит и др. Предвид широкия клиничен спектър, оценката на естественият ход, активност, терапевтичен отговор и прогнозата на PsA е трудна. Откриването и прилагането на биомаркери би позволило персонализиране на управлението на пациенти с PsA. Серумните нива на васкуларен ендотелен растежен фактор (VEGF), хрущялен олигомерен матричен протеин (COMP) и матрична металопротеиназа 3 (MMP3) и С-реактивен протеин са измерени при 106 пациенти с псориатичен артрит – нелекувани и лекувани с метотрексат и/или биологични ( адалимумаб, етанерцепт, инфликсимаб, устекинумаб). Бяха оценени и множество клинични мерки, индекси и въпросници, използвани при PsA. Пациентите с постигната минимална активност на заболяването, CPDAI и PASDAS ремисия са имали значително по-ниски серумни концентрации на VEGF (619,55 pg/ml спрямо 430,50 pg/ml,  $p = 0,009$ ; 489,682 спрямо 768,991 pg/ml,  $p = 0,005$ ; и 459,72 срещу 726,94 pg / ml,  $p = 0,004$  съответно). Серумните нива на VEGF ( $r_s = 0,327$ ;  $p = 0,015$ ), COMP ( $r_s = 0,328$ ;  $p = 0,001$ ) и MMP-3 ( $r_s = 0,213$ ;  $p = 0,028$ ) корелират положително със CRP. Има също така положителна връзка на нивата на VEGF с PASI ( $r_s = 0,279$ ;  $p = 0,004$ ), BSA ( $r_s = 0,225$ ,  $p = 0,02$ ), PASDAS ( $r_s = 0,269$ ;  $p = 0,005$ ), CPDAI ( $r_s = 0,213$ ;  $p = 0,014$ ), HAQ-DI ( $r_s = 0,331$ ;  $p = 0,001$ ), DLQI ( $r_s = 0,232$   $p = 0,017$ )

и PsAQoL ( $rs = 0,256$ ;  $p = 0,008$ ). Серумните нива на COMP са положително свързани с броя на подутите стави ( $rs = 0,204$ ;  $p = 0,035$ ), PASI ( $rs = 0,205$ ;  $p = 0,034$ ) и BSA ( $rs = 0,247$ ;  $p = 0,010$ ). MMP-3 корелира с броя на подутите стави ( $rs = 0,255$ ;  $p = 0,008$ ). COMP, MMP-3 и особено VEGF могат да се използват като потенциални биомаркери при псориатичен артрит.

#### Vascular endothelial growth factor (VEGF), cartilage oligomeric protein (COMP) and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) as serum biomarkers in psoriatic arthritis

Psoriatic arthritis (PsA) is a chronic inflammatory musculoskeletal disorder characterized by axial and peripheral joint involvement as well as extra-articular manifestations such as skin and nail disease, enthesitis, dactylitis, uveitis, etc. Given the broad clinical spectrum, the assessment of the natural course, activity, therapeutic response and prognosis of PsA is difficult. The discovery and implementation of biomarkers would allow personalization of the management of PsA patients. The serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and matrix metalloproteinase 3 (MMP3) and C-reactive protein were measured in 106 patients with psoriatic arthritis – naive and treated with methotrexate and/or biologics (adalimumab, etanercept, infliximab, ustekinumab). Multiple clinical measures, indices and questionnaires used in PsA were also assessed. Patients with achieved minimal disease activity, CPDAI and PASDAS remission had significantly lower serum VEGF concentrations (619.55 pg / ml vs 430.50 pg / ml,  $p = 0.009$ ; 489.682 vs. 768.991 pg / ml,  $p = 0.005$ ; and 459, 72 vs 726, 94 pg / ml,  $p = 0, 004$  respectively). Serum levels of VEGF ( $rs = 0.327$ ;  $p = 0.015$ ), COMP ( $rs = 0.328$ ;  $p = 0.001$ ) and MMP-3 ( $rs = 0,213$ ;  $p = 0,028$ ) positively correlated with CRP. There was also a positive association of VEGF levels with PASI ( $rs = 0.279$ ;  $p = 0.004$ ), BSA ( $rs = 0.225$ ,  $p = 0.02$ ), PASDAS ( $rs = 0.269$ ;  $p = 0.005$ ), CPDAI ( $rs = 0.213$ ;  $p = 0.014$ ), HAQ-DI ( $rs = 0.331$ ;  $p = 0.001$ ), DLQI ( $rs = 0.232$   $p = 0.017$ ) and PsAQoL ( $rs = 0.256$ ;  $p = 0.008$ ). Serum COMP levels were positively linked with the swollen joints number ( $rs = 0.204$ ;  $p = 0.035$ ), PASI ( $rs = 0.205$ ;  $p = 0.034$ ) and BSA ( $rs = 0.247$ ;  $p = 0.010$ ). MMP-3 correlated with the number of swollen joints ( $rs = 0.255$ ;  $p = 0.008$ ). COMP, MMP-3 and especially VEGF could be used as potential biomarkers in psoriatic arthritis.

**Г8-3 - Иванова И, Атанасова Б. Баланс на медта - нови симетрии. Спешна медицина. 2022;25(1):48-59.**

#### Баланс на медта - нови симетрии

Балансът на микроелементите в човешкия организъм е строго регулиран поради двойствената им природа – от една страна есенциални за живота, а от друга - с токсичен характер при състояния на свръх-натрупване. Наличието на определена генетична предиспозиция при дадени условия от околната среда (екологична експозиция; епигенетика), може да бъде причина за проявени токсични ефекти. Третият по представителност микроелемент в човешкото тяло, след желязото и цинка, е медта. В настоящия обзор са разгледани състояния с дисбаланс на медта с акцент върху металохипотезата при някои невродегенеративни заболявания – Болест на Алцхаймер.

#### Copper balance - new symmetries

The balance of trace elements in human body is strongly regulated because of their dual nature – from one hand essential for life, but from the other hand - highly toxic in overload state. Genetic predisposition, in combination with certain environmental conditions (environmental exposure; epigenetics), could be a cause for manifested toxic effects. The third most representative trace element, after iron and zinc, is copper. In the present review, conditions with imbalance of copper are considered, with an accent on the metal hypothesis in some neurodegenerative diseases - Alzheimer's disease. The main disturbances in copper homeostasis are associated with establishing a normal concentration of ceruloplasmin and serum copper and an increase in the free copper fraction with a decrease in the oxidase activity of ceruloplasmin.

**Г8-4 - Генова М, Атанасова Б, Иванова И, Колева Р, Йорданова Я, Димитрова В, Тодорова К, Свиначков Д. Статус на витамин Д при здрави бременни жени. Спешна медицина. 2022;25(Прил.2):19.**

#### Статус на витамин Д при здрави бременни жени

Нарушеният баланс на витамин D е често срещан при жени в репродуктивна възраст от различни популации. Етиологията вероятно е мултифакторна, но отчасти се дължи на намален хранителен прием и ограничено излагане на слънчева светлина. При бременност тежкият дефицит се свързва с нарушена костна хомеостаза, вродени рахити

и фрактури при новороденото. Досега не са напълно изяснени ефектите на недостатъчност за майката и плода. Липсват специфични за бременността препоръки за прием поради съществуващите неадекватни данни, които не диференцират нуждите при бременни жени от тези при небременни. Целта е да се проучат при здрави бременни и небременни жени серумните нива на 25-хидроксивитамин D3 (25-OH-D3) като най-добър индикатор за насищане. Изследвани са общо 53 жени (20-40 г.), разделени в две групи: здрави небременни ( $n = 29$ ) и здрави бременни жени ( $24 \pm 7$  г.с.); ( $n = 24$ ). Проучването е извършено в периода февруари-май. Анализите са извършени чрез високоспециализиран дефинитивен принцип: течна хроматография с тандем масспектрометрична детекция и изотопно разреждане (ID LC-MSMS). Данните са изразени като средна стойност  $\pm$  SD. Серумната концентрация на депо-формата 25-OH-D3 при здрави небременни жени е  $41 \pm 13$  nmol/L, характерна за ниво на недостатъчност (недостатъчност 25-80 nmol/L). 14% ( $n = 4$ ) от всички жени в групата са с дефицит ( $< 25$  nmol/L). Няма жени с резултат, показващ достатъчност (80- 200 nmol/L). 86% от групата са с концентрации, показващи общо недостатъчност ( $n = 25$ ): 68% от тази подгрупа са с изразена недостатъчност и 32% с лека недостатъчност. Групата здрави бременни жени се характеризира с недостатъчност (25-OH-D3  $60 \pm 22$  nmol/L): 33% ( $n = 8$ ) са суплементирани (25-OH-D3  $96 \pm 29$  nmol/L), останалите 67% са без суплементиране (25-OH-D3  $60 \pm 29$  nmol/L). Само една бременна жена (4%) е с дефицит. Сравнителният анализ между двете групи 20 жени (здравни бременни и небременни) показва статистически силно повишение на серумните нива на 25-OH-D3 при нормална бременност с ( $p > 0.001$ ; Student's t-test, ниво на значимост  $p < 0.05$ ). Данните са в потвърждение на известни вече факти за широкото разпространение на нарушен статус на витамин D при жени в репродуктивна възраст и по време на бременност. Интригуващо, нивата на 25-OH-D3 при бременните жени са подчертано по-високи от тези при небременните. Суплементирането при нормална бременност в периодите с ограничена слънчева светлина би позволило да се излезе от зоната на недостатъчност и да се стигне до стойности, типични за достатъчност. Изглежда вероятно бременността да се свързва със специфични физиологични механизми, насочени не само към преодоляване на неонаталния дефицит, но и към осигуряване общо на по-високи нива на насищане у майчиния организъм.

## Vitamin D status in healthy pregnant women

Vitamin D imbalance is common in women of reproductive age from various populations. The etiology is probably multifactorial, but is partly due to reduced dietary intake and limited exposure to sunlight. In pregnancy, severe deficiency is associated with impaired bone homeostasis, congenital rickets and fractures in the newborn. The effects of deficiency on the mother and the fetus are not yet fully understood. Pregnancy-specific multiple dosing times are lacking due to existing inadequate data that do not differentiate the needs in pregnant women from those in non-pregnant women. The aim is to investigate in healthy pregnant and non-pregnant women the serum levels of 25-hydroxyvitamin D3 (25-OH-D3) as the best indicator of satiety. A total of 53 women (20-40 years old) were studied, divided into two groups: healthy careless (n = 29) and healthy pregnant women (24 ± 7 years old); (n = 24). The survey was conducted in the period February-May. Analyzes are performed by a highly specialized definitive principle: liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection and isotope dilution (ID LC-MSMS). Data are expressed as mean ± SD. The serum concentration of the depot form of 25-OH-D3 in healthy negligent women was 41 ± 13 nmol/L, characteristic of a level of insufficiency (insufficiency 25-80 nmol/L). 14% (n = 4) of all women in the group were deficient (< 25 nmol/L). No data with a result indicating sufficiency (80-200 nmol/L). 86% of the group had a concentration showing general insufficiency (n = 25): 68% of this subgroup had marked insufficiency and 32% had mild insufficiency. The group of healthy pregnant women was distinguished by deficiency (25-OH-D3 60 ± 22 nmol/L): 33% (n = 8) with supplements (25-OH-D3 96 ± 29 nmol/L), the remaining 67% were without supplementation (25-OH-D3 60 ± 29 nmol/L). Only one pregnant woman (4%) was deficient. Comparative analysis between the two groups of 20 women (healthy pregnant and non-pregnant) showed a statistically significant increase in serum 25-OH-D3 levels in normal pregnancy with (p > 0.001; Student's t-test, significance level p < 0.05) . The data confirm the already known facts about the widespread prevalence of impaired vitamin D status in women of reproductive age and during pregnancy. Intriguingly, 25-OH-D3 levels in pregnant women were markedly higher than in non-pregnant women. Supplementation during normal pregnancy during periods of limited sunlight would allow one to move out of the deficiency zone and reach values typical of sufficiency. It seems likely that pregnancy is associated with specific physiological mechanisms aimed not only at overcoming neonatal deficiency, but also at ensuring a general high level of saturation in the maternal body.



**Г8-5 - Ivanova I, Ivanova-Todorova E, Kyurkchiev D, Atanasova B, Genova M. 25 - OH Vitamin D3/D2 insufficiency in healthy subjects and patients with autoimmune disorders. Спешна медицина. 2022;25(Прил. 2):18.**

Недостатъчност на витамин 25-ОН D3/D2 при здрави индивиди и пациенти с  
автоимунни заболявания

Съединенията на витамин D - D2 и D3 се получават от хранителни източници, включително добавки или се произвеждат (като D3) в кожата при излагане на ултравиолетови лъчи. Тези две форми впоследствие се превръщат в черния дроб в 25-ОН витамин D3/D2 (25OHD), чиято концентрация в кръвта е релевантен показател за общото количество в човешкото тяло. Дефицитът на витамин D е разпространен в световен мащаб и се свързва с много патологични състояния: сърдечно-съдови, неврологични, метаболитни, ракови, мускулно-скелетни и автоимунни нарушения. Целта на изследването е да се определят нивата на витамин D при здрави индивиди и да се сравни с пациенти с автоимунни заболявания. Проучването обхваща общо 90 възрастни, 26 мъже и 64 жени: здрави контроли (НС) – 42 (мъже:жени – 16:26) и пациенти със съмнение за автоимунни заболявания (системен лупус, ревматоиден артрит, васкулит) – 48 (мъже:жени – 10:38). Всички участници са тествани за серумни нива 25OHD с помощта на автоматичен конкурентен метод на ензимно-свързан имуносорбентен анализ (ELISA) на устройство Alegria®. Кръвта е взета след 12 часова хранителна пауза, през периода от ноември до март. Измерените нива (ng/ml) при здравите контроли (НС) са  $17,9 \pm 6$  (мъже/жени =  $17 \pm 4/18,4 \pm 7$ ) без значими разлики в зависимост от пола ( $p = 0,442$ ). Наблюдаваните нива за групата пациенти са  $14,6 \pm 5$  (мъже/жени =  $14,5 \pm 3,5/13,8 \pm 5$ ) със значителна разлика между половете ( $p = 0,0184$ ). Концентрациите на 25OHD при пациенти с имунологични нарушения са значително по-ниски в сравнение със здрави контроли ( $p = 0,006$ ). И в двете групи не са установени нива над 30 ng/ml. По-често се установява дефицит на витамин D ( $< 20$  ng/ml) при пациенти в сравнение със здрави индивиди: 23% ( $n = 11$ ) срещу 16,6% ( $n = 7$ ). Няма проби с измерени нива  $\geq 50$  ng/ml 25OHD като маркер за достатъчност. Данните от настоящото изследване са в съответствие с вече установената честота на дефицит на витамин D сред българското население, въпреки че активното ултравиолетово облъчване за продължителен период от време (над 8 месеца) е характерно за страната. Резултатите показват, че имуномодулиращият ефект на витамин D може да бъде полезен терапевтичен инструмент при лечението на различни автоимунни състояния.

## 25 - OH Vitamin D3/D2 insufficiency in healthy subjects and patients with autoimmune disorders

Vitamin D compounds D2 and D3 are obtained from dietary sources, including supplements or produced (as D3) in the skin upon ultraviolet exposure. These two forms are subsequently converted in the liver into 25-OH vitamin D3/D2 (25OHD) which concentration in blood is a relevant indicator of total supply in human body. Vitamin D deficiency vitamin D is worldwide spread and is associated with many pathological conditions: cardiovascular, neurological, metabolic, cancer, musculoskeletal, autoimmunity disorders. The aim of the study was to define the sufficiency in vitamin D levels in healthy individuals and to compare with patients with autoimmune diseases. Materials and methods: The study comprises 90 adults in total, 26 men and 64 women: healthy controls (HC) – 42 (men:women – 16:26) and patients with suspected autoimmune disorders (systemic lupus, rheumatoid arthritis, vasculitis) – 48 (men:women – 10:38). All participants are tested for 25OHD serum levels using automatic competitive enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method on Alegria® device. The blood is taken after fasting over night, during the period of November to March. Results: Levels measured (ng/ml) in the healthy controls (HC) are  $17.9 \pm 6$  (men/women =  $17 \pm 4/18.4 \pm 7$ ) without significant differences depending on gender ( $p = 0.442$ ). The observed levels for the patient group are  $14.6 \pm 5$  (men/women =  $14.5 \pm 3.5/13.8 \pm 5$ ) with significant difference between genders ( $p = 0.0184$ ). 25OHD concentrations of the patients with immunological disorders are significantly lower in comparison to healthy controls ( $p = 0.006$ ). In both groups, levels above 30 ng/ml are not established. More frequent vitamin D deficiency ( $< 20$  ng/ml) is found for patients in comparison to healthy individuals: 23% ( $n = 11$ ) vs. 16.6% ( $n = 7$ ). There are no samples with measured levels  $\geq 50$  ng/ml 25OHD as a marker of sufficiency. Conclusion: The data of the current study is in agreement with already established prevalence of vitamin D deficiency for Bulgarian population, although active ultraviolet radiation over prolonged time period (over 8 months) is typical for the country. The results imply that immunomodulatory effect of vitamin D could be useful therapeutic tool in the treatment of various autoimmune conditions

**Г8-6 - Иванова И, Драгнева С, Атанасова Б, Петкова Т, Матева Л, Костадинова А, Скуитти Р. Оксидазна активност на церулоплазмин – сравнителен анализ между здрави и пациенти с болест на Уилсън. Спешна медицина. 2022;25(Прил. 2):17.**

Оксидазна активност на церулоплазмин – сравнителен анализ между здрави и пациенти с болест на Уилсън

Според съвременни проучвания ензимната активност на церулоплазмина (eCp) е потенциален неинвазивен маркер за диагноза на болест на Уилсън (БУ). Целта на настоящото проучване е да се сравнят концентрациите на Cp (iCp, измерени чрез имунотурбидиметрия) и стойностите за eCp между здрави контроли и пациенти с БУ (от българската популация) на дългогодишна терапия с пенициламинов препарат. В изследването са включени 41 здрави доброволци (м:ж = 16:25; ср. възраст  $43 \pm 13$  год.) и 28 пациенти с БУ (м:ж = 14:14; ср. възраст  $38 \pm 12$  год.), които са на дългогодишно лечение с пенициламин със средна доза 1000 mg/24 h. На всички индивиди са определени: серумна мед Cu(S)  $\mu\text{mol/L}$  с пламъкова атомно-абсорбционна спектрофотометрия, iCp g/L – турбидиметрично, eCp чрез ензимен метод с хромоген субстрат o-dianisidine и е изчислено съотношението eCp/iCp IU/g  $\times 10^{-1}$ . Получени са следните резултати (mean  $\pm$  SD) – за здрави: Cu(S)  $15.4 \pm 1.9$ ; iCp  $0.28 \pm 0.03$ ; eCp  $103 \pm 9$ ; eCp/iCp 4.1 и в групата с БУ: Cu(S)  $4.4 \pm 5.2$ ; iCp  $0.08 \pm 0.09$ ; eCp  $48 \pm 31$  и eCp/iCp 6. Двете сравнявани групи не се различават значимо според възрастта ( $p = 0.13$ ). Установена е значима разлика в стойностите за Cu(S), iCp, eCp ( $p < 0.001$ ) и eCp/iCp; ( $p < 0.003$ ). Установена е висока корелация между нивата на iCp и eCp както при здрави ( $R = 0.83$ ), така и при пациентите с БУ ( $R = 0.96$ ), които са на дългогодишна терапия с пенициламинов препарат. Дискусия: По данни от литературата като диагностичен критерий при пациенти с новооткрита БУ eCp има по-висока диагностична специфичност в сравнение с iCp (100% vs. 78.8%). При новодиагностицирани пациенти корелационната зависимост между iCp и eCp е по-ниска в сравнение със здрави ( $R 0.70$  vs. 0.94). Получените от нас резултати показват обратното, което дава основание да се заключи, че определянето на eCp към рутинните маркери за охарактеризирането на медния статус би могло да бъде обещаващ показател и при проследяване хода на терапията.

## Ceruloplasmin oxidase activity - a comparative analysis between healthy and patients with Wilson's disease

According to recent studies, the enzyme activity of ceruloplasmin (eCp) is a potential non-invasive marker for the diagnosis of Wilson disease (WD). The aim of the present study was to compare Cp concentrations (iCp, measured by immunoturbidimetry) and eCp values between healthy controls and WD patients (from the Bulgarian population) on long-term penicillamine therapy. The study included 41 healthy volunteers (M:F = 16:25; mean age  $43 \pm 13$  years) and 28 patients with WD (M:F = 14:14; mean age  $38 \pm 12$  years), who are on long-term treatment with penicillamine with an average dose of 1000 mg/24 h. In all individuals, the following laboratory tests were measured: serum copper Cu(S)  $\mu\text{mol/L}$  by flame atomic absorption spectrophotometry, iCp g/L - turbidimetrically, eCp by an enzymatic method with the chromogenic substrate o-dianisidine, and the ratio eCp/iCp IU was calculated  $/\text{g} \times 10^{-1}$ . The following results (mean  $\pm$  SD) were obtained - for healthy: Cu(S)  $15.4 \pm 1.9$ ; iCp  $0.28 \pm 0.03$ ; eCp  $103 \pm 9$ ; eCp/iCp 4.1 and in the group with WD: Cu(S)  $4.4 \pm 5.2$ ; iCp  $0.08 \pm 0.09$ ; eCp  $48 \pm 31$  and eCp/iCp 6. The two compared groups did not differ significantly according to age ( $p = 0.13$ ). A significant difference was found in the values for Cu(S), iCp, eCp ( $p < 0.001$ ) and eCp/iCp; ( $p < 0.003$ ). A high correlation between iCp and eCp levels was found both in healthy ( $r = 0.83$ ) and in patients with WD ( $r = 0.96$ ) who were on long-term penicillamine therapy. Discussion: According to data from the literature, as a diagnostic criterion in patients with newly diagnosed WD, eCp has a higher diagnostic specificity compared to iCp (100% vs. 78.8%). In newly diagnosed patients, the correlation dependence between iCp and eCp was lower compared to healthy ones ( $r$  0.70 vs. 0.94). Our results show the opposite, which gives reason to conclude that the determination of eCp to the routine markers for the characterization of copper status could be a promising indicator also in monitoring the course of therapy

**Г8-7 - Иванова А, Иванова И, Ценова Б, Желязкова Д, Пенков М. Биомаркери в ликвор и серум при ранна диагноза на заболяването Болест на Алцхаймер. Спешна медицина. 2022;25(Прил. 2):15.**

## Биомаркери в ликвор и серум при ранна диагноза на заболяването Болест на Алцхаймер

Проучването включи 29 индивиди, от които 19 контроли и 10 с болест на Алцхаймер (БА), които бяха изследвани за: обща и „свободна“ мед в серум, ликвор/серум отношение на албумина (CSF/S Alb), както и мед,  $\beta$ -амилоид-42 (A $\beta$ 42) и тау-протеин в ликвор. В контролната група (11 мъже и 8 жени) се получиха следните резултати: обща серумна мед –  $16.5 \pm 3.1 \mu\text{mol/l}$ ; несвързана с церулоплазмина мед (NCC) –  $3.3 \pm 0.24 \mu\text{mol/l}$ ; CSF/S Alb –  $5.75 \pm 1.9$ , ликворна мед –  $0.49 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$ ; A $\beta$ 42 –  $754.4 \pm 198.9 \text{ pg/ml}$ ; тау-протеин –  $254.22 \pm 112.2 \text{ pg/ml}$ ; резултатите при пациентите с БА (5 жени и 5 мъже) са респективно:  $14.33 \pm 0.8 \mu\text{mol/l}$ ;  $1.42 \pm 1.6 \mu\text{mol/l}$ ;  $6.99 \pm 1.2 \mu\text{mol/l}$   $0.50 \pm 0.75 \mu\text{mol/l}$ ;  $192.42 \pm 104.88 \text{ pg/ml}$ ;  $397.8 \pm 269.4 \text{ pg/ml}$ . Наблюдава се тенденция за по-висока серумна мед при контролите, без статистическа значимост ( $p = 0.070$ ). Ликворните нива на медта са почти еднакви и в двете групи ( $p = 0.8$ ), както и в двете групи функцията на кръвно-ликворната бариера, оценена чрез отношението CSF/S Alb, е запазена ( $< 10.2$ ). Статистически значима разлика ( $p < 0.001$ ) с по-ниски нива в групата с БА се установи за A $\beta$ 42, докато тау-протеинът е с несигнификантно по-високи нива при БА ( $p = 0.19$ ). По непубликувани наши данни средната стойност за серумна мед в българската популация е  $16.04 \pm 3.32 \mu\text{mol/l}$ , а за NCC –  $4.22 \pm 0.86 \mu\text{mol/l}$  ( $n = 379$ ), т.е. изследваните болни с БА са с тенденция за по-ниски нива на обща серумна мед ( $14.3 \mu\text{mol/l}$ ) и NCC ( $1.42 \mu\text{mol/l}$ ).

### Biomarkers in cerebrospinal fluid and serum in early diagnosis of Alzheimer's disease

The study included 29 individuals, 19 controls and 10 with Alzheimer's disease (AD), who were examined for: total and "free" serum copper, cerebrospinal fluid CSF/serum albumin ratio (CSF/S Alb), as well as copper,  $\beta$ -amyloid-42 (A $\beta$ 42) and tau protein in CSF. In the control group (11 men and 8 women), the following results were obtained: total serum copper –  $16.5 \pm 3.1 \mu\text{mol/l}$ ; non-ceruloplasmin copper (NCC) –  $3.3 \pm 0.24 \mu\text{mol/l}$ ; CSF/S Alb –  $5.75 \pm 1.9$ , cerebrospinal fluid –  $0.49 \pm 0.1 \mu\text{mol/l}$ ; A $\beta$ 42 –  $754.4 \pm 198.9 \text{ pg/ml}$ ; tau-protein –  $254.22 \pm 112.2 \text{ pg/ml}$ ; the results in patients with AD (5 women and 5 men) were respectively:  $14.33 \pm 0.8 \mu\text{mol/l}$ ;  $1.42 \pm 1.6 \mu\text{mol/l}$ ;  $6.99 \pm 1.2 \mu\text{mol/l}$   $0.50 \pm 0.75 \mu\text{mol/l}$ ;  $192.42 \pm 104.88 \text{ pg/ml}$ ;  $397.8 \pm 269.4 \text{ pg/ml}$ . There was a trend for higher serum copper in controls, without statistical significance ( $p = 0.070$ ). CSF copper levels were almost the same in both groups ( $p = 0.8$ ), and in both groups blood-CSF barrier function, as assessed by the CSF/S Alb ratio, was preserved

(< 10.2). A statistically significant difference ( $p < 0.001$ ) with lower levels in the AD group was found for A $\beta$ 42, while tau protein had non-significantly higher levels in AD ( $p = 0.19$ ). According to our unpublished data, the average value for serum copper in the Bulgarian population is  $16.04 \pm 3.32 \mu\text{mol/l}$ , and for NCC –  $4.22 \pm 0.86 \mu\text{mol/l}$  ( $n = 379$ ), i.e. the studied patients with AD had a tendency for lower levels of total serum copper ( $14.3 \mu\text{mol/l}$ ) and NCC ( $1.42 \mu\text{mol/l}$ ).

**Г8-8 - Иванова И, Спасов Р. Медицинска антропология и персонализирана медицина. В: Сборник "Насоки в академичното изследване и преподаване по Етнология и Антропология". София: Университетско издателство "Св. Климент Охридски"; 2018. с. 239-249. ISBN: 978-954-07-4595-4.**

#### Медицинска антропология и персонализирана медицина

Медицинската антропология е актуална и бързо развиваща се част от антропологията. Тенденцията при изучаването на състоянието на здраве и болест при човека е персонализиране на медицинска грижа. Това определя нарастващия интерес към фактори от околната среда, бита и културата на човека, като средства за профилактика и лечение. Целта е да се характеризира ефекта от вида на диетата и начина на живот (тютюнопушене, приемна алкохол и физическа активност) върху биомаркери в човешкия организъм – серумни нива на медни йони в българската популация. В проучването са включени 31 лица (м – 10 ; ж - 21) на средна възраст от  $43 \pm 15$  г., са изследвани нивата на серумната мед. Всички участници са попълнили анкета за характеризирани на навиките за употреба на алкохол (рядко/никога -  $n=14$ ; всекиден -  $n=17$ ); на цигари (пушачи –  $n=13$ ; непушачи –  $n=18$ ) и степен на физическа натовареност (не спортуват –  $n=22$ ; активно спортуващи –  $n=9$ ). Не е установена статистически значима разлика ( $p > 0,05$ ) в нивата на серумна мед между дефинираните групи. Получени са следните резултати: пушачи : непушачи ( $14,94 \pm 2,1$  към  $14,44 \pm 1,2 \mu\text{mol/L}$ ); употреба на алкохол - рядко/никога: всекиден ( $14,72 \pm 1,72$  към  $14,09 \pm 1,24 \mu\text{mol/L}$ ); не спортуват: активно спортуващи ( $15,0 \pm 1,8$  към  $13,7 \pm 0,3 \mu\text{mol/L}$ ). В контекста на медицинската антропология изучаването на факторите за биологична вариация на серумната мед представляват интерес във взаимодействието между генетичната предиспозиция и влиянието на околната среда. Данните в литературата са противоречиви. Значението на

микроелементите в патологията на редица социално-значими заболявания нараства, което определя необходимост от задълбочаване на познанията в тази област с включване на повече експериментални единици.

### Medical Anthropology and Personalized Medicine

Medical anthropology is current and fast developing part of anthropology. Tendencies in studying the state of health and disease in humans is the personalization of medical care. This defines growing interest in environmental factors, life style and cultural rights, as a means of prevention and treatment. The objective is to characterize the effect of the type of diet and lifestyle (smoking, alcohol intake and physical activity) on biomarkers in the human body – serum levels of copper ions in Bulgarians. In the study it was concluded 31 persons (men - 10, women - 21) of average age  $43 \pm 15$  years, were examine levels of serum copper. All participants filled out questionnaire to characterize the habits of alcohol use (rarely / never - n = 14; everyday - n = 17); cigaretteuse (smoking - n = 13; non-smoking - n = 18) and level of physical activity (notsports - n = 22; activesportsmen - n = 9). No statistically significant difference ( $p > 0,05$ ) in serum copper between defined groups was found. Following results were obtained: smokers: no smokers ( $14,94 \pm 2,1$  vs.  $14,44 \pm 1,2$   $\mu\text{mol} / \text{L}$ ); alcohol use - rarely / never: everyday ( $14,72 \pm 1,72$  vs.  $14,09 \pm 1,24$   $\mu\text{mol} / \text{L}$ ); nosports:activesportsmen ( $15,0 \pm 1,8$  vs.  $13,7 \pm 0,3$   $\mu\text{mol} / \text{L}$ ). In the context to medical anthropology study of factors of biological variation in serum copper levels is important in the interaction between genetic predisposition and environmental influences. The data in the literature are contradictory. The importance of microelements in the pathology of a number of socially significant diseases increases, which determines the requires necessity to deepen knowledge in this area.

**Г9-1 - Squitti R, Siotto M, Ivanova I, Rongioletti M. Chapter 42 - ATP7B and Alzheimer Disease. In: Kerkar N, Roberts EA, editors. Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE. Academic Press; 2019. p. 427–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128105320000422>**

## АТР7В и болестта на Алцхаймер

Медта е основен микроелемент, катализатор или компонент на много металлопротеини и ензими във физиологичното клетъчно функциониране. Генетичен дефект в обмяната и по-специално в екскрецията на мед е причината за болестта на Уилсън (Wilson's Disease, WD), което представлява рядко автозомно рецесивно заболяване, причинено от мутации на гена АТР7В, характеризиращо се с повишени нива на плазмена мед, несвързана с церулоплазмин (nСр-Cu, известен също като „свободен“ пул на медта). Повишаването на този компонент на плазмената мед е токсично, тъй като може да премине през кръвно-мозъчната бариера и да увеличи лабилния резерв на метала в мозъка. Мета-анализи показват, че компонентът nСр-Cu се увеличава също и при болестта на Алцхаймер (Alzheimer's Disease, AD), най-често срещаната форма на деменция, причинена от сложно взаимодействие и все още предимно неизвестни фактори. Едно скорошно проучване дава нов поглед върху патофизиологията на хомеостазата на медта при AD, вероятно произхождаща от същия променен път на WD, но по-малко увредена, като варианти на АТР7В, свързани с повишаването на риска за AD. Поддържайки ясна различната етиология на двете заболявания, ние поставихме хипотезата, че AD, типизиран от нарушения в контрола на медната обмяна, може да представлява хетерозиготна форма на WD.

## АТР7В and Alzheimer Disease

Copper is an essential micronutrient, catalyst, or component of many metalloproteins and enzymes in physiological cellular functioning. Inborn error of copper excretion is the cause of Wilson disease (WD), a rare autosomal recessive disorder caused by mutations of the ATP7B gene, typified by increased levels in plasma copper not bound to ceruloplasmin (nСр-Cu, also known as “free” copper). The expansion of this plasma copper component is toxic since it can cross the blood-brain barrier and increase the labile pool of the metal in the brain. Meta-analyses have shown that nСр-Cu component increases also in Alzheimer disease (AD), the most common form of dementia, caused by the complex interaction and still mostly unknown factors. A recent study provides new insight into the pathophysiology of copper homeostasis in AD, likely originating from the same WD altered pathway but less severely damaged, being ATP7B variants associated with the increase of susceptibility for AD. Keeping clear the



different etiology of the two diseases, we have posited the hypothesis that the AD typified by failure of copper control may represent a heterozygote form of WD.

**Пълнотекстови публикации в научни списания и сборници , извън минималните наукометрични изисквания за заемане на АД „доцент“**

**Ivanova I., Vodenicharov V., Atanasova B. Levels of copper and zinc in saliva, Спешна медицина 2022/25/Приложение 2; стр. 14. ISSN: 0861-9964**

#### Нива на мед и цинк в слюнка

Слюнката се състои от секрети на слюнчените жлези, клетъчни остатъци, течност от горните дихателни пътища и съдържа микроорганизми от устната кухина. Тестването на слюнката за наблюдение и диагностика както на орални, така и на системни състояния е предизвикателство в съответствие със съвременното развитие на науките „omics“. Изследователските приложения са насочени към дентални заболявания, хормонален, неврологичен и емоционален статус и човешкото поведение. Основните микроелементи мед (Cu) и цинк (Zn), едновременно с кортизол и други лабораторни находки в слюнката като адренкортикотропен хормон, катехоламини и различни цитокини, могат да бъдат полезни биомаркери за стрес. Zn с невротрансмисионни и рецепторни функции участва в психичното здраве. Предполага се, че Cu и Zn участват в продължителността на съня като антагонисти на йонотропния рецептор на N-метил-D-аспартат на медиатора на съня глутамат. Системната суплементация с цинк може да промени нивата на хормоните на стреса в слюнката, особено тези на кортизола. Целта на настоящото изследване е да се оценят нивата на Cu и Zn в слюнката при възрастни индивиди през различно време на деня. Проучването включва 40 доброволци на работа на смени (мъже:жени = 31:9), средна възраст  $37 \pm 9$  години (мъже:жени = 36:46). Cu и Zn се измерват в две слюнчени проби: 1-ва проба, получена в 9-11 ч. сутринта и 2-ра, получена в 15-16 ч. следобед в същия ден. Нестимулираните слюнчени проби се събират в специализирани епруветки Salivette, Sarstedt. След центрофугиране нивата на Cu и Zn се анализирани чрез атомно-абсорбционна спектрофотометрия (AAAnalyst 400) с деутериев фонов коректор. Установени са следните резултати (средно  $\pm$  SD,  $\mu\text{mol/L}$ ): 1-ва слюнка – Cu  $0,61 \pm 0,6$ ; Zn  $1,73 \pm 1,1$  и 2-ра слюнка – Cu  $0,52 \pm 0,8$ ; Zn  $1,49 \pm 0,7$ . По-ниски концентрации на Cu и

Zn се наблюдават в следобедните проби без статистическа разлика: Cu  $p = 0.508$  и Zn  $p = 0.953$ . Тенденцията за намаляване на следобедните стойности на Cu и Zn може да се обясни или с възможни дневни биологични вариации, или с натрупан през работния ден стрес. Настоящите данни са съвместими с описаните по-рано ефекти от социалните фактори на стреса. Комплексните по-задълбочени познания в този аспект могат да бъдат от полза за оралното здраве и профилактиката на заболяванията.

#### Levels of copper and zinc in saliva

Saliva is composed of salivary glands secrets, cellular debris, upper respiratory tract fluid and microorganisms in the oral cavity [1]. Saliva testing for monitoring and diagnosis of both oral and systemic conditions is a challenge in accordance with the contemporary development of "omics" sciences. Research applications are directed to dental diseases, hormonal, neurological and emotional status, and human behaviour [1,2]. Essential micronutrients copper (Cu) and zinc (Zn), simultaneously with cortisol and other laboratory salivary findings as adrenocorticotrophic hormone, catecholamines and various cytokines, could be useful stress biomarkers [3]. Zn with neurotransmission and receptor functions is involved in mental health [2]. Cu and Zn are suggestive to participate in sleep duration as antagonists of N-methyl-D-aspartate ionotropic receptor of the sleep mediator glutamate [4]. Systemic zinc supplementation may alter salivary stress hormone levels, particularly these of cortisol [2]. The aim of the present study is to assess salivary Cu and Zn levels in adults during different time of the day. The study comprises 40 volunteers at shift work (men:women = 31:9), average age  $37 \pm 9$  years (men:women = 36:46). Cu and Zn are measured in two salivary samples: 1st sample released at 9-11am and 2nd released at 15-16 pm in the same day. Non-stimulated salivary samples are collected in Salivette tubes, Sarstedt. After centrifugation Cu and Zn levels are analysed by atomic absorption spectrophotometry (AAAnalyst 400) with a deuterium background corrector. The following results are established (mean  $\pm$  SD,  $\mu\text{mol/L}$ ): 1st saliva – Cu  $0.61 \pm 0.6$ ; Zn  $1.73 \pm 1.1$  and 2nd saliva – Cu  $0.52 \pm 0.8$ ; Zn  $1.49 \pm 0.7$ . Lower concentrations of Cu and Zn are observed in the afternoon samples without statistically difference: Cu  $p = 0.508$  and Zn  $p = 0.953$ . The tendency for decreasing afternoon Cu and Zn values could be explained either by possible diurnal biological variation or accumulated during the working day stress. Present data are compatible with previously described effects of stress social factors [5]. Complex deeper knowledge in this aspect could be beneficial for oral health and disease prevention.

## **ПРЕДСТАВЕНИ ПУБЛИКАЦИИ ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА СТЕПЕН „ДОКТОР“**

**A1 - Иванова, Ирена. Меден статус - лабораторни аспекти и клинично приложение при някои патологични състояния. Медицински университет –София. Дисертационен труд.**

Меден статус - лабораторни аспекти и клинично приложение при някои патологични състояния

Медта е микроелемент с двойствена природа. Има есенциално значение за живота, но при натрупване може да предизвика токсични прояви. Медна дисхомеостаза може да се развие в следствие на генетични дефекти или 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. При редица заболявания измерването на свободния пул на медта би дало по-надеждна информация за диагнозата и хода на болестта. 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, болест на Паркинсон и мултипла склероза. Мястото на медта във физиологията на нервната тъкан, участието ѝ в енергийните процеси и относително високото съдържание на мед в мозъка, само подкрепят смисъла на клиничното приложение на медния статус в лабораторната диагностика на невродегенеративните заболявания. В Националния консенсус за ранна диагностика и лечение на болест на Алцхаймер и други форми на деменция 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 болест на Алцхаймер 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  $\beta$ -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 болест на Алцхаймер на базата на дефекти в APOE4 генът по типа на loss of function мутации, което повишава риска от развитие на заболяването.

Индивидуално ориентираната перспектива в медицината и все по-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.

#### Copper status - laboratory aspects and clinical application in some pathological conditions

Copper is a trace element with a dual nature. It is essential for life, but can be toxic when accumulated. Copper dyshomeostasis can develop as a result of genetic defects or as a result of the impact of environmental factors - lifestyle, parenteral nutrition, uncontrollable supplementation with nutritional supplements, certain genetic polymorphism or secondary to other diseases. Serum copper, copper in 24-hour urine, and ceruloplasmin concentration are routinely and most commonly used in practice to determine copper status. In a number of diseases, measurement of the free copper pool would give more reliable information about the diagnosis and the course of the disease. Measurement of ceruloplasmin concentration is complemented by its enzyme activity and ratio for its specific activity as a sensitive marker for discrete changes in copper homeostasis.

Over the last decade, the importance of copper, and trace elements in general, has undergone expansive development in their role in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and multiple sclerosis. The place of copper in the physiology of nervous tissue, its participation in energy processes and the relatively high content of copper in the brain only supports the meaning of the clinical application of copper status in the laboratory diagnosis of neurodegenerative diseases. The National Consensus for the Early Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease and Other Dementia already includes a 24-hour urine copper test, which corresponds to the amount of the free copper pool in the body.

The socioeconomic and medical significance of Alzheimer's disease is undeniably great. Efforts in the diagnosis of the disease are aimed at early diagnosis, greater specificity and the introduction of positive arguments. The application of the cerebrospinal fluid biomarkers  $\beta$ -amyloid and tau protein in the diagnosis of the disease is an achievement in objectifying the cognitive deficit. Efforts are focused on finding diagnostic opportunities with peripheral blood markers as well as indicators with predictive value. Leading scientists investigating the link between neurodegenerative diseases and micronutrients suggest the existence of a copper phenotype of Alzheimer's disease based on defects in the ATP7B gene in the type of loss of function mutations that increase the risk of developing the disease.

The individual-oriented perspective in medicine and the ever-increasing importance of epigenetic factors, some of which are trace elements, require the study of the distribution of copper in a given population depending on the structure of the population, sex, age and other factors of variation, which be the basic knowledge when searching for modern methods of diagnosis, prognosis and treatment for a number of socially significant diseases.

**Г7-1 - Kostadinova AD, Mihaylov MY, Ivanova ID, Robeva RT. Nephrotic syndrome after treatment with D-penicillamine in a patient with Wilson's disease - Rev Romana Med Lab. 2014 Jun;22(2):181–9. ISSN:1841-6624. – 2014.**

Нефротичен синдром при лечение на пациент с Болест на Уилсън с Д-пенициламин

Болестта на Уилсън е наследствено автозомно-рецесивно разстройство на медния баланс, водещо до натрупване на мед главно в черния дроб и мозъка в резултат на отсъствие или намалена функция на транспортираща мед Р-тип АТФ-аза. Медта е

основен микроелемент, но при болестта на Уилсън се натрупва до степен на токсичност. D-пенициламинът е класическо лекарство за лечение на болестта на Уилсън. Основният му ефект е да стимулира отделянето на мед с урината. Известно е, че употребата на D-пенициламин в терапията на болестта на Уилсън се усложнява от развитието на различни гломерулни заболявания. В този доклад ние описваме развитието на нефротичен синдром след 2 години лечение с D-пенициламин при 31-годишен мъж, подложен на лечение за болестта на Уилсън, с бърза регресия при спиране на лекарството. Представяме този случай, за да привлечем вниманието към рядкото усложнение като нефротичен синдром при пациенти с болест на Wilson при лечение с D-пенициламин и възможните основни причини. Изключително необходимо е терапията и клиничното състояние на пациентите с болестта на Уилсън да се проследяват редовно - препоръчваме ежемесечно.

#### Nephrotic syndrome after treatment with D-penicillamine in a patient with Wilson's disease

Wilson's disease is an inherited autosomal recessive disorder of copper balance leading to accumulation of copper mainly in liver and brain result from absent or reduced function of copper-transporting P-type ATPase. Copper is an essential trace element but in Wilson's disease it accumulate to the point of toxicity. D-penicillamine is a classic drug for treatment of Wilson's disease. Its major effect is to promote the urinary copper excretion. The use of D-penicillamine in the therapy of Wilson's disease is known to be complicated by the development of various glomerular diseases. In this report we describe the development of nephrotic syndrome after 2 years treatment with D-penicillamine in a 31-year-old male undergoing treatment for Wilson's disease, with a prompt regression at the discontinuation of the drug. We present this case to draw attention to the rare complication as nephrotic syndrome in patients with Wilson's disease under D-penicillamine treatment and possible underlying causes. It is strongly necessary the therapy and clinical condition of patients with Wilson's disease to be monitoring regularly - we recommended monthly.

**Г7-2 - Ivanova I, Atanasova B, Petrova M, Dragneva S, Vladimirova L, Krastev Z, Kostadinova A, Ivanova A, Tzatchev K. Serum and urine copper - Contamination and stability. Acta Medica Bulgarica. 2015;42(2):49–60. ISSN 0324-1750.**

## Мед в серум и урина – контаминация и стабилност

Преданалитичните фактори на вариация трябва да бъдат внимателно обмислени и изследвани в усилията за хармонизиране на всички аспекти на цялостния процес на тестване. Това проучване имаше за цел да оцени рискът за контаминация и стабилността при анализ на мед (Cu) в серум и урина чрез пламъкова атомно-абсорбционна спектроскопия (FAAS) и да сравни стабилността на пробата от урина при контролна група урини и при случаи с прием на D-пенициламин (D-PA). Нивата на Cu се измерени чрез AAnalyst 400, Perkin Elmer, САЩ. Кръвта бе събрана в епруветки BD Vacutainer® SSTTM II Advance и епруветки BD Vacutainer® Trace Element. При изследване на урината са използвани стерилни полиетиленови и полипропиленови съдове за събиране, транспортиране, съхранение и предварителна подготовка на пробите. Стабилността в серума и 24-часовата урина е оценена при два температурни режима: 15-25°C и 2-8°C, за определено време на съхранение. Не са установени значими разлики ( $p = 0,20$ ) в концентрацията на Cu между двата типа тествани епруветки със серуми на пациенти. Стабилността на пробите (серум и урина) е по-добра при температура на охлаждане. В урината стабилността е по-добра при прилагане на D-PA. Стандартизирането на анализа на Cu може да бъде постигнато чрез оценка на аспектите на преданалитичните фактори на вариациите.

## Serum and urine copper - Contamination and stability

Pre-analytical factors of variation need to be carefully considered and investigated in efforts to harmonize all aspects of the total testing process. This study aimed to evaluate contamination and stability in copper (Cu) analysis of serum and urine by flame atomic absorption spectroscopy (FAAS) and to compare the stability of urine Cu in controls and in D-penicillamine (D-PA) administration. Cu was measured by AAnalyst 400, Perkin Elmer, USA. Blood was collected in BD Vacutainer® SSTTM II Advance tubes and BD Vacutainer® Trace Element tubes. Sterile polyethylene and polypropylene vessels for collection, transportation, storage and preliminary preparation of samples were used in urinalysis. Stability in serum and 24 h urine was evaluated in two temperature regimens: 15-25°C and 2-8°C, for particular time of storage. No significant differences ( $p = 0.20$ ) in Cu concentration was found between the two types of tested tubes with patient's sera. The stability of the samples (serum and urine) was better at refrigeration temperature. In urine the stability was better in D-PA administration. Standardization of Cu analysis could be achieved by assessing the aspects of pre-analytical factors of variations.

**Г7-3 – Иванова И., Атанасова Б., Цачев К. Мед: физиологично и клинично значение. Български Медицински Журнал. 2014, VIII (2);13-19.**

#### Мед: физиологично и клинично значение

Медта е есенциален микроелемент за човека и животните. Тя има ключово значение, тъй като е задължителен компонент в активния център на редица медни металоензими и участва активно в процесите на пигментация, еритропоеза, генна експресия, оксидативен стрес и поддръжане на глюкозния баланс. Клиничните нарушения в обмяната на медта са свързани с дефицит или свърхнатрупване в организма. Фенотипно тези нарушения са много разнообразни. Оценката на медния статус изисква използването на надеждни лабораторни биомаркери, които с голяма чувствителност да могат да отразяват дори и малки промени в съдържанието на медта. Настоящият обзор представя аспекти от физиологията на медта, заболявания с нарушена хомеостаза и съвременни биомаркери за охарактеризиране на медния статус.

#### Copper: Physiological and Clinical Importance

Copper is an essential trace element for humans and animals. It plays crucial role as an integrative component of a number of copper metalloenzymes and participates in the processes of pigmentation, erythropoiesis, gene expression, oxidative stress and maintenance of glucose balance. Clinical disorders in copper metabolism are associated with deficiency or excess in the body. Phenotypically, these disorders are very diverse. Assessment of copper status requires the use of reliable laboratory biomarkers that can reflect even small changes in copper content with great sensitivity. This review presents aspects of copper physiology, clinical disorders in copper metabolism, and key laboratory biomarkers for assessment of copper status.



**Ivanova I, Atanasova B, Kostadinova A. BD Barricor LH plasma tubes for copper (Cu) and zinc (Zn) determination. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2017;55(4):eA2. ISSN: 1437-4331 .**

BD Barricor LH епруветки за определяне на мед (Cu) и цинк (Zn)

През 2016 г. Becton Dickinson пусна на пазара епруветки за събиране на плазмена кръв Barricor™ с литиев хепарин с механичен сепаратор. Специално за анализи на микроелементи се използват следните BD епруветки: K<sub>2</sub> EDTA Trace Element и Serum Trace Element (TE). Замърсяването е основен проблем при анализите на микроелементите. Стандартизирането на преданалитичната фаза изисква тестване на всеки вид епруветки в лабораториите, дори за определена партида. Основната цел на изследването е сравнение между BD Barricor™ LH епруветки с другите специализирани TE BD епруветки при анализи за Cu и Zn. Кръв беше взета едновременно от 32 пациенти в 3 вида BD епруветки: Barricor™ LH Plasma (REF 365032), K<sub>2</sub>EDTA 10,8 mg TE (REF 368381) и Serum TE (REF 368380). Стандарти, контроли и проби от пациенти бяха измерени за Cu и Zn чрез пламъчна атомна абсорбция (FAAS) - AAnalyst 400, Perkin Elmer, САЩ. Резултати (средно±SD в µmol/L) за Cu: Barricor™ LH плазма – 20,1±4,0; K<sub>2</sub>EDTA 10.8 mg TE – 19.8±3.9 и Serum TE – 20.5±4.4, а за Zn: Barricor™ LH Plasma – 10.4±2.2; K<sub>2</sub>EDTA 10,8 mg TE – 10,5±2,1 и серумен TE – 10,6±2,3. Концентрацията на Zn в хепаринови плазмени епруветки не се различава значително от тази в другите два типа TE: p>0.05. Също така не е наблюдавана статистическа разлика между серумния (TE) и плазмения (LH, K<sub>2</sub>EDTA) цинк. Установени са значителни статистически разлики между медта в 3 тествани типа епруветки с най-високите нива, измерени в BD Serum TE Tubes. Намерена е значителна разлика между плазмената Cu в LH и K<sub>2</sub>EDTA епруветките (p<0,001), а също и между Cu в LH плазмата и TE серум (p=0,006). Разликата между Cu във всичките 3 тествани типа епруветки като абсолютна концентрация е по-малка от 1 µmol/L Cu. Може да се препоръча всяка лаборатория да тества предпочитаните вакутейнери за определяне на Cu и Zn, особено когато се подозират ниски концентрации в плазмата или серума

BD Barricor LH plasma tubes for copper (Cu) and zinc (Zn) determination

In 2016 Becton Dickinson launched Barricor™ Lithium Heparin plasma blood collection tubes with mechanical separator. Especially for trace analyses the following BD

tubes are in use: K<sub>2</sub> EDTA Trace Element and Serum Trace Element (TE). Contamination is a major problem in trace analyses. So, standardization of preanalytical phase requires testing of each kind of tubes in the labs, even for particular LOT. The main goal of the study is comparison between BD Barricor™ LH tubes and the other specialized TE BD tubes for Cu and Zn. Blood was drawn simultaneously from 32 patients into 3 types BD tubes: Barricor™ LH Plasma (REF 365032), K<sub>2</sub>EDTA 10.8 mg TE (REF 368381) and Serum TE (REF 368380). All vacutainers were further processed in similar manner. Standards, controls and patient samples were measured for Cu and Zn by flame atomic absorption (FAAS) - AAnalyst 400, Perkin Elmer, USA. Results (mean±SD in µmol/L) for Cu: Barricor™ LH Plasma – 20.1±4.0; K<sub>2</sub>EDTA 10.8 mg TE – 19.8±3.9 and Serum TE – 20.5±4.4, and for Zn: Barricor™ LH Plasma – 10.4±2.2; K<sub>2</sub>EDTA 10.8 mg TE – 10.5±2.1 and Serum TE – 10.6±2.3. Zn concentration in heparin plasma tubes did not differ significantly from that in the other two TE types: p>0.05. Also no statistical difference was observed between serum (TE) and plasma (LH, K<sub>2</sub>EDTA) zinc. Significant statistical difference between copper in 3 tested tube types were established with the highest levels measured in BD Serum TE Tubes. Significant difference between plasma Cu in LH and K<sub>2</sub>EDTA tubes was found (p< 0.001) and also between Cu in LH plasma and TE serum (p=0.006). The difference between Cu in all 3 tested tube types as absolute concentration was less than 1 µmol/L Cu. It could be recommended for each laboratory to test the preferred vacutainers for determination of Cu and Zn especially when low concentrations in plasma or serum have been suspected.