

Медицински университет – Плевен
Факултет „Здравни грижи“
Катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“

Д-р Валерия Здравкова Рачева

**Промяна в нивата на някои белтъци при жени с
овариални тумори**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по докторска програма: „Клинична лаборатория“



Плевен 2023

Медицински университет – Плевен
Факултет „Здравни грижи“
Катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“

Д-р Валерия Здравкова Рачева

***Промяна в нивата на някои белтъци при жени с
овариални тумори***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по докторска програма: „Клинична лаборатория“

Научни ръководители: Проф. Д-р Аделаида Русева, д.м.

Доц. Д-р Павлина Йорданова- Лалева, д.м.

Рецензенти: Проф. Д-р Милена Велизарова, д.м.

Проф. Д-р Таня Денева, д.м.

Плевен 2023

Дисертационният труд е написан на 180 стандартни страници и е онагледен с 79 фигури, 65 таблици и 5 приложения.

Използваните литературни източници включват 160 заглавия - 4 на кирилица и 156 на латиница.

Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не отговарят на номерата на фигурите и таблиците в дисертационния труд.

Авторът е редовен докторант към катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“, Факултет „Здравни грижи“, Медицински университет – Плевен и работи като асистент в катедра „Медицинска физика, медицинска биофизика, предклинични и клинични науки“, Факултет „Фармация“ на Медицински университет – Плевен и като Завеждащ Клинична лаборатория на УМБАЛ „Света Марина“ – Плевен.

Във връзка с дисертационния труд са реализирани 3 публикации.

Дисертационният труд е обсъден, приет и предложен за публична защита на заседание на Катедрен съвет на катедра „Клинична лаборатория, клинична имунология и алергология“ при МУ – Плевен, състоял се на 20.10.2023г.

Научно жури в състав:

Председател: Доц. Д-р Ирена Генчева-Ангелова, д.м.

Членове: Акад. Д-р Григор Горчев, д.м.н.

Проф. Д-р Милена Велизарова, д.м.

Проф. Д-р Тая Денева, д.м.

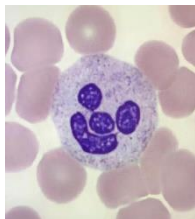
Проф. Д-р Яна Бочева, д.м.

Резервни членове: Доц. Д-р Ангел Йорданов, д.м.

Проф. Д-р Красмира Икономова, д.м.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на от часа в зала на МУ – Плевен

Материалите по защитата са публикувани на интернет страницата на МУ – Плевен.



„Учителят може да отвори вратата, но ученикът трябва да влезе сам!“

Дзен

С огромна благодарност на:

- моите научни ръководители - за вдъхновението, търпението, вярата и градивната критика по време на научната ми работа!
- семейството ми за това, че са моят най-голям съдник и най-голям приятел, за това че подкрепят мечтите ми и помагат те да станат реалност!

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ	6
II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	9
III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ	10
1. Материал.....	10
2. Методи	13
2.1. Анкетен метод.....	13
2.2. Клинични методи	13
2.3. Лабораторни методи за определяне на изследваните протеини	14
2.4. Статистически методи	18
IV. РЕЗУЛТАТИ.....	21
V. ОБСЪЖДАНЕ.....	59
VI. ИЗВОДИ.....	74
VII. ПРИНОСИ.....	77
VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ	79
IX. ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	80

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ В ТЕКСТА

ОК Овариален карцином

FDA Администрация по храните и лекарствата

ROMA алгоритъм за риск от злокачествено заболяване на яйчниците

TTR, Prealb - транстретин, преалбумин

TFR - трансферин

АроА1LP - АпоА1 липопротеин

β_2 MG - β_2 микроглобулин

СА 125 - карциномен антиген 125

Mean - средна аритметична величина

Me – медиана

X_{\min} - минимално значение на признака

X_{\max} - максимално значение на признака

SD - стандартно отклонение

95% CI, ДИ - доверителен интервал

ROC крива - Receiver Operating Characteristic curve

AUC - Area Under the Curve площ под ROC крива

Sp - специфичност (Specificity)

Sn - чувствителност (Sensitivity)

PPV - положителна прогнозна стойност

NPV - отрицателна прогнозна стойност

КГ - Контролна група

α - ниво на значимост

p - гаранционна вероятност

r_{pb} - точково-бисериален коефициент

r - коефициент на корелация на Пирсън

J - индекс на Youden

VIF - инфлационен фактор за мултиколинеарност

Exp(B) - отношение на шансовете

S.E. - средна стохастична (стандартна) грешка

ВЪВЕДЕНИЕ

Туморите на яйчника са хетерогенна група и отделните представители се различават един от друг по морфологичния си строеж и биологичните си характеристики. Те могат да бъдат наблюдавани сред жените от всички възрастови групи.

По-голямата част от овариалните тумори са доброкачествени (най-често овариални кисти) и могат да причинят проблеми поради своя размер, близост до различни органи и болка или дискомфорт. Останалата част от тях са злокачествени и тяхното ранно диагностициране е от огромно значение за подобряване преживяемостта на пациентките.

Златен стандарт за разграничаването на доброкачествените от злокачествените овариални тумори е хистопатологичната биопсия. Тя е инвазивен метод и получаването на резултат от нея изисква продължителен период от време.

Овариалният карцином (ОК) е с най-висока смъртност сред гинекологичните карциноми в развитите страни и неговата петгодишна преживяемост остава ниска през последните 50 години. Основните причини за това са липсата на ранна клинична симптоматика, диагностициране в напреднал стадий както и неефективни скринингови програми.

Настоящият труд е насочен към определяне на серумни маркери и панели от маркери, които биха могли да подпомогнат предоперативното разграничаване на доброкачествените от злокачествените яйчникови тумори.

При прегледа на специализираната литература по темата, установихме следните нерешени проблеми и дискусативни моменти:

1. Определянето на концентрацията на СА125 в серум се използва широко, но той е недостатъчен като единствен биомаркер за ранен ОК и има най-голямо значение за мониториране на терапията и откриване на рецидив на заболяването.

2. Одобрените от FDA - OVA1, OVERA, ROMA и CPH-I тестове имат предимства и недостатъци. Необходими са още допълнителни изпитвания и анализ на диагностичната им надеждност, преди да могат да се направят окончателни заключения по отношение на тези тестове.

3. Изследвани са широк спектър от серологични маркери за ОК. Понастоящем липсва перфектен и надежден биомаркер - стабилен, силно специфичен и чувствителен, евтин. До момента не е одобрен нито един метод за ранна диагностика и скрининг. Поради това откриването и валидирането на нови биомаркери за това заболяване дава надежда за неговото ранно откриване.

4. От всички изследвани биомаркери, демонстриращи връзка с ОК, трябва да бъдат избрани биомаркерите с най-висока информативна стойност, поотделно или комбинирани в мултибиомаркерни панели. Необходимо е да отговарят на следните изисквания:

- биомаркерът трябва да показва измерими промени в неинвазивните проби, получени от пациенти в ранен стадий или предклинично заболяване.
- биомаркерът трябва да бъде информативен за всички хистологични и патологични подтипове на ОК
- биомаркерът трябва да е достатъчно надежден

5. Кръвният протеом съдържа безценен запас от белтъци и техните серумни концентрации показват предвидими промени в отговор на развил се злокачествено заболяване. При подходящо комбиниране, тези белтъци биха могли да бъдат добър способ за диагностициране на яйчникови тумори.

6. Необходима е ефективна стратегия за скрининг за откриване на ранен стадий на заболяването, която има способността да направи разлика между доброкачествената тъкан и ранните злокачествено трансформирани клетки, с висока диагностична чувствителност и специфичност. Това значително би намалило смъртността от ОК.

Анализът на данните от литературата и собствените ни наблюдения в ежедневно клинична практика показват актуалността на проблема за съвременна диагностика на ОК чрез нови маркери и маркерни биопанели.

В българската научна литература не са разглеждани възможностите на серумните протеини за диагностициране на овариални тумори, както и приложението им за предоперативно разграничаване на злокачествените от доброкачествените овариални тумори. Тези нерешени проблеми в клиничната практика дадоха основание да изберем темата на дисертационния труд, с цел максимално бързо, изпреварвайки инвазивния метод – хистопатологична биопсия, да подпомогнем вземането на правилни и насочени решения диагноза на овариален тумор и диференциална диагноза на доброкачествени и злокачествени овариални тумори.

За тази цел проследихме и анализирахме промените в концентрациите на пет серумни протеина – транстиретин (преалбумин TTR), трансферин (TFR), АпоА1 липопротеин (АроА1LP), β_2 микроглобулин (β_2 MG) и карциноембрионален антиген 125 (CA 125) при жени с овариални тумори.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел:

Да се проследи промяната в концентрацията на пет протеина –преалбумин (транстретин), трансферин, АпоА1липопротеин, β_2 микроглобулин и СА125 при жени с овариални тумори и да се проучи тяхната информативна стойност и диагностичните им възможности за доказване на овариален тумор, както и за предоперативното разграничаване на овариален карцином от доброкачествените овариални заболявания.

Задачи:

1. Да се анализират и сравнят серумните концентрации на TTR, TFR, ApoA1 LP, β_2 MG и СА125 при таргетната група жени с овариални тумори и здравите контроли и да се определи съществува ли корелационна зависимост между настъпващите промени в петте протеина и менопаузалния статус на пациентките.
2. Да се изследва и анализира диагностичната надеждност и да се определи каква е прогностичната стойност на проучваните лабораторни биомаркери за доказване на овариални тумори.
3. Да се анализират и сравнят серумните концентрации на TTR, TFR, ApoA1 LP, β_2 MG и СА125 при група А1 (жени с овариален карцином) и група А2 (жени с овариални кисти) и да се определи съществува ли корелационна зависимост между настъпващите промени в петте протеина и менопаузалния статус на пациентките.
4. Да се анализират и сравнят серумните концентрации на TTR, TFR, ApoA1 LP, β_2 MG и СА125 при група А1 (жени с овариален карцином) и да се определи съществува ли корелационна зависимост между настъпващите промени в петте протеина и стадия на ОК- ранен (I и II) или късен (III и IV).

5. Да се изследва и анализира диагностичната надеждност и да се определи каква е прогностичната стойност на проучваните лабораторни биомаркери за разграничаване на овариален карцином от доброкачествени овариални кисти.

6. На базата на получените резултати да се предложи диагностичен алгоритъм (формула) с изследваните биомаркери при овариални тумори, който да бъде прилаган в предоперативното диагностициране и разграничаване на злокачествените от доброкачествените овариални тумори.

МАТЕРИАЛ

1. Дизайн на проучването

По характер проучването е проспективно по отношение на изследваните биомаркери, сравнително с използването на контролна група, диагностично и неинтервенционно по отношение на изследваните пациенти.

2. Изследвани пациенти.

2.1. Критерии за включване и изключване на изследваните лица за оформяне на таргетните групи

А. Критерии за включване - жени на възраст над 18 години, с документиран овариален тумор, планиран за хирургична интервенция и без анамнеза за злокачествено заболяване през предходните 5 години.

Б. Изключващи критерии- жени на възраст под 18 години и диагностицирано в предходните 5 години злокачествено заболяване.

2.2. Критерии за включване и изключване на изследваните лица за оформяне на контролната група

А. Критерии за включване-жени на възраст над 18 години, без документиран овариален тумор и без анамнеза за злокачествено заболяване през предходните 5 години.

Б. Изключващи критерии- жени на възраст под 18 години и диагностицирано в предходните 5 години злокачествено заболяване.

3. Оформяне на таргетните и контролните групи.

През периода януари 2020 г. – ноември 2020 г. бяха изследвани общо 180 жени на средна възраст 45.94 години (обхват 21.0-83.0 години), отговарящи на критериите за включване и изключване на лицата от изследването. Според изработените критерии, изследваните лица бяха разделени в две групи: таргетна група - жени с овариални тумори и контролна група – здрави жени, без овариални тумори. При всички пациентки е събрана подробна анамнеза относно актуалното им клинично състояние, минали заболявания и менопаузален статус.

Таргетна група (А): 120 жени на средна възраст 48.95 години (обхват 21.0-83.0 години), хоспитализирани в Гинекологична клиника на УМБАЛ „Света Марина“ гр. Плевен в периода 01.2020г. - 11.2020г. При гинекологичен преглед и TVUS на тези пациентки беше установен овариален тумор. След проведената оперативна интервенция и направената хистопатологична биопсия е поставена окончателната диагноза, което доведе до оформяне на две таргетни подгрупи.

Първа таргетна подгрупа (А1): 60 пациентки с доказан хистологично овариален карцином, на средна възраст 57.67 години (обхват 29.0-83.0 години). От анамнестичните данни на пациентките, получихме информация за менопаузалния им статус: 40 от тях (66.7%) са в менопауза, останалите 20 (33.3%) са в пременопауза.

Менопауза се определя като липса на менструация в 12 последователни месеца или възраст ≥ 50 години, когато жената не е сигурна в честотата на менструалните цикли.

Пременопаузата е периода между първата менструация и началото на перименопаузата. В този период няма симптоми на перименопауза или менопауза, все още има менструация (редовна или не) и репродуктивните способности са запазени.

Втора таргетна подгрупа (А2): 60 пациентки с доказана хистологично овариална киста, на средна възраст 40.23 години (обхват 21.0-70.0 години).

Според данните от анамнезата 15 (25%) са в менопауза, а останалите 45 (75%) – в пременопауза.

Контролна група (В): 60 здрави, асимптомни жени, без клинично или параклинично изявени заболявания, на средна възраст 39.92 години (обхват 22.0-68.0 години), посетили УМБАЛ „Света Марина“ по повод на профилактичен преглед, включващ гинекологичен преглед и лабораторни изследвания. При гинекологичния преглед и TVUS няма установени овариални тумори. От анамнестичните данни, установихме, че 12 (20%) са в менопауза, а 48 (80%) са в пременопауза.

При работата с всички участници в проучването са спазвани препоръките и указанията, заложи в „ Ethical Issues in Patient Safety Research: Interpreting Existing Guidance“ на Световната здравна организация (СЗО). Спазени бяха всички процедури в съответствие с етичните стандарти на Комисията по човешки изследвания (институционални и регионални), както и Декларацията от Хелзинки от 1975 г., преработена през 2000г. На основание чл.87, чл.88 и чл.89 от „Закон за здравето“ всички пациенти са изразили информирано съгласие в писмена форма за медицинските дейности, които се осъществяват спрямо тях. Проучването е одобрено от Комисията по етика на научно-изследователската дейност при Медицински Университет - Плевен.

За целите на проучването от всички пациентки беше взет биологичен материал- венозна кръв. Кръвта беше взета при стандартизирани условия - сутрин, на гладно (след 12-часова хранителна пауза) от кубиталната вена във вакуумтейнер, гел съдържащ сепариращ гел VACUETTE® Greiner Bio. След 30 минутен престой на стайна температура за ретрахиране на съсирека, кръвта беше центрофугирана за 15 минути при 3000g за отделяне на серум. С помощта на вариабилна автоматична пипета с пластмасов накрайник за еднократна употреба, 500 µl серум беше прехвърлен в епруветка тип Eppendorf, която беше точно обозначена с ID номер. От анализ бяха отстранени всички проби с хемолиза, иктер или липемия, което би могло да компрометира получените

резултати. Отделените серуми бяха съхранявани на -20°C до извършване на анализа.

4. Място на научното изследване.

Всички лабораторни анализи са извършени в Клинична лаборатория на УМБАЛ „Света Марина“ Плевен.

5. Референтни интервали и cut off стойности на изследваните показатели за диагностициране.

Използвани са референтни интервали и cut off стойности от фирмите производители на китовите реактиви, с които са извършени лабораторните определяния на изследваните показатели.

Таблица 1. Референтни интервали и cut off стойности според фирмите, производители на работните реактиви (TOSOH - ST AIA-PACK OVCA и MEDICON - PREALBUMIN, APOA1, TRANSFERRIN, B2 MICROGLOBULIN)

Показател	Референтна / cut off стойност
CA 125	< 35 IU/mL
преалбумин / транстиретин	0.2-0.4 g/L
трансферин	2-3.6 g/L
β_2 микроглобулин	< 2.4 mg/L
АпоА1 липопротеин	>1.4 g/L

МЕТОДИ

1. Анкетен метод – за събиране на информация за: възраст, менопаузален статус, минали и настоящи заболявания.

2. Клинични методи – анамнеза и физикално изследване - гинекологичен статус

3. Хистопатологична биопсия

4. Лабораторни методи за определяне на изследваните протеини

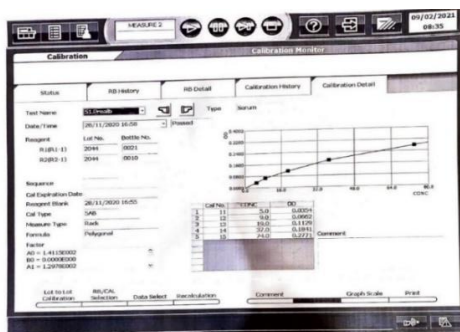
При провеждане на всички лабораторни изследвания са спазени изискванията на Медицински стандарт по Клинична лаборатория и Международния стандарт за качество и компетентност на медицинските лаборатории ISO 15189.

3.1. Определяне на преалбумин (транстиретин)

За определяне концентрацията на преалбумин (транстиретин) е използван ин витро тест PREALBUMIN (MEDICON) за количествено определяне на преалбумин в човешки серум с автоматичен биохимичен анализатор BECKMAN COULTER AU 480.

а/ Принцип на метода

Използва се имунотурбидиметричен метод. Когато пробата се смеси с подходящия буфер (R1) и антисерумен разтвор (R2), преалбуминът реагира специфично с античовешките антитела на преалбумин, което води до образуване на неразтворими агрегати. Абсорбцията на тези агрегати при 340 nm е пропорционална на концентрацията на преалбумин в пробата.



Фигура 1. Калибрационна крива на транстиретин

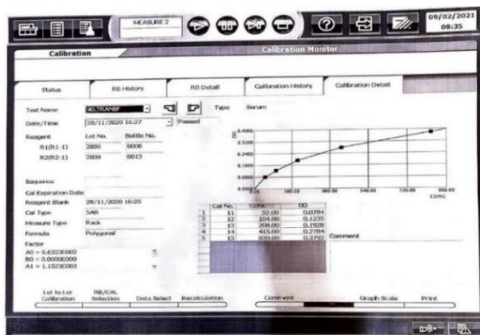
3.2. Определяне на трансферин

За определяне концентрацията на трансферин е използван ин витро тест TRANSFERRIN (MEDICON) за количествено определяне на трансферин в човешки серум с автоматичен биохимичен анализатор BECKMAN COULTER AU 480.

а/ Принцип на метода

Прилага се имунотурбидиметричният метод. Когато пробата се смеси с подходящия буфер (R1) и антисерумен разтвор (R2), трансферинът реагира селективно с античовешки трансферинови антитела, водещи до образуване на

неразтворими агрегати. Абсорбцията на тези агрегати на 520 nm е пропорционална на концентрацията на трансферин в пробата. Реакцията е двугочкова кинетична.



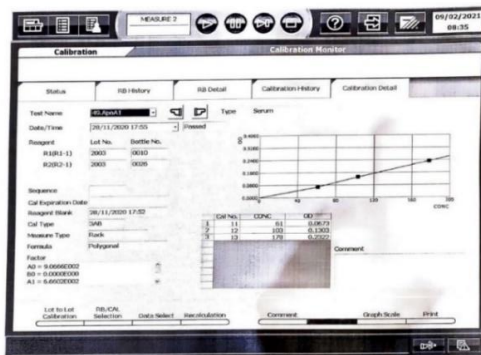
Фигура 2. Калибрационна крива на трансферин

3.3. Определяне на АпоА1липопротеин

За определяне концентрацията на АпоА1липопротеин е използван ин витро тест APO A1 (MEDICON) за количествено определяне на АпоА1липопротеин в човешки серум с автоматичен биохимичен анализатор BECKMAN COULTER AU 480.

а/ Принцип на метода

Прилага се имунотурбидиметричният метод. Смесването на анти-Апо А1 антитела води до формиране на антиген-антитяло комплекси, което води до увеличаване на мътнината на разтвора. Това е свързано с увеличаване на абсорбцията на 540 nm.



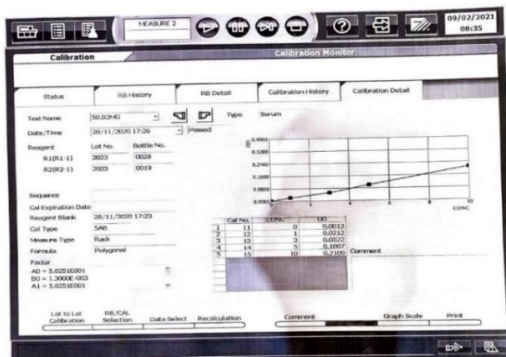
Фигура 3. Калибрационна крива на ApoA1 липопротеин

3.4. Определяне на $\beta 2$ микроглобулин

За определяне концентрацията на $\beta 2$ микроглобулин е използван ин витро тест V2 MICROGLOBULIN (MEDICON) за количествено определяне на $\beta 2$ микроглобулин в човешки серум с автоматичен биохимичен анализатор BECKMAN COULTER AU 480.

а/ Принцип на метода

Прилага се имунотурбидиметричният метод. Когато проба се смеси с буфер R1 и латексов разтвор R2, $\beta 2$ микроглобулинът реагира специфично с анти - човешки $\beta 2$ микроглобулинови антитела, покрити с латексови частици и образува неразтворими агрегати. Абсорбирането на тези агрегати е пропорционално на концентрацията на $\beta 2$ микроглобулин в пробата.



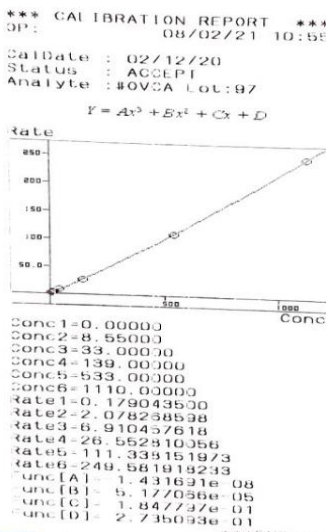
Фигура 4. Калибрационна крива на $\beta 2$ микроглобулин

3.5. Определяне на карциноембрионален антиген CA125

За определяне концентрацията на CA125 е използван ин витро тест ST AIA-PACK OVCA (TOSOH) за количествено определяне на CA125 в човешки серум или хепаринизирана плазма с автоматична платформа за имунологични анализи TOSOH AIA 360.

а/ Принцип на метода

Прилага се имуноензимен анализ. CA125, присъстващ в изследваната проба, се свързва с моноклонални антитела, имобилизирани върху магнитни перли и с ензим-белязани моноклонални антитела в реактива. Магнитните перли се промиват, за да се премахнат всички несвързани ензим-белязани моноклонални антитела, и след това се инкубират с флуорогенен субстрат, 4-метилумбелиферил фосфат (4MUP). Количеството на ензим - белязаните моноклонални антитела, които се свързват с перлите, е право пропорционално на концентрацията на CA125 в изследваната проба.



Фигура 5. Калибрационна крива на CA125.

4. Статистически методи

Статистическите изследвания са извършени с методи, които са съобразени с характера на разглежданите процеси и естеството на данните за тях. Данните от проучването са обработени със софтуерни статистически пакети STATGRAPHICS; SPSS и EXCEL for Windows. Резултатите са описани чрез таблици, графики и числови показатели за структура, честота, средни стойности, корелационни коефициенти и др. Използваното критично ниво на значимост е $\alpha = 0.05$ и нулевата хипотеза се отхвърля, когато р стойността (p-value) е по-малка от α , т.е. $p < 0.05$.

Бяха приложени следните методи:

1. Дескриптивен анализ – в табличен вид е представено честотното разпределение на разглежданите признаци, разбити по групи на изследване.
2. Непараметричен тест на Колмогоров-Смирнов и Шапиро-Уилк – за проверка на формата на честотното разпределение спрямо формата на нормалното разпределение.
3. Вариационен анализ – за оценка на характеристиките на централната тенденция и статистическо разсейване. Централната тенденция е описана чрез средна аритметична стойност (Mean), когато формата на разпределението наподобява нормална крива или чрез медианата (Me), когато разпределението не е нормално.
4. Графичен анализ – за визуализация на получените резултати.
5. Непараметричен тест на Ман-Уитни – за проверка на хипотези за различие между две независими извадки.
6. Корелационен анализ – за установяване на корелации между количествени признаци и оценка на силата на корелационната зависимост, чрез коефициентът на корелация на Пирсон (r). Точково бисерален корелационен коефициент изчислихме за установяване на връзки между една дихотомна (качествена) и една количествена променлива.

7. Регресионен анализ – логистична регресия- за моделиране на връзки. Използвахме логистичен регресионен анализ за описание на връзки между една зависима променлива и една или повече независими променливи. Така се установява индивидуалното действие на всеки фактор. Логистичният регресионен анализ е използван, за да се определи модел, чрез който може да се прогнозира вероятността един пациент да попадне в групата със заболяване или в групата без заболяване.

8. Критерии за валидиране на скрининг тестове и диагностичната способност на посочените показатели- чрез ROC анализ (Receiver Operating Characteristic). Оценяването на специфичност и чувствителност и определяне на прагови стойности при диагностичните тестове се осъществява чрез построяване на ROC криви и изчисляване на площта под кривата AUC (area under the curve).

Стойност на AUC 1.0 означава маркер с висока диагностична стойност.

За оценяване на валидността на скринирация тест се използват следните критерии:

- чувствителност

-специфичност

-положителна предсказваща стойност

-отрицателна предсказваща стойност

Таблица 2. Оценяване на диагностичната надеждност на лабораторните тестове.

Диагноза	Резултати от теста		Всичко
	Положителни	Отрицателни	
Със заболяване	a истински положителни	b фалшиво отрицателни	a+b
Без заболяване	c фалшиво положителни	d истински отрицателни	c+d
Всичко	a+c	b+d	N

Диагностичната чувствителност (Sensitivity) представлява способността на теста да открива лицата със заболяване. Измерва се с вероятността за позитивен тест при скринираните болни лица. Дефинира се с дяла на положителните случаи от теста (a) в групата на действително болните (a+b) към всички болни, т.е. с отношението $\frac{a}{a+b}$. Тест със 100% чувствителност правилно идентифицира всички пациенти със заболяването.

Диагностичната специфичност (Specificity) характеризира способността на теста да открива здравите лица. Измерва се с вероятността за отрицателен тест при скринираните здрави лица. Дефинира се с отношението на отрицателните случаи според теста (d) сред групата на здравите (c+d), т.е. с отношението $\frac{d}{c+d}$. Тест със 100% специфичност коректно идентифицира индивидите без данни за заболяването, за което е предназначен.

Положителната предсказваща стойност (Positive predictive value) на теста се измерва с вероятността за наличие на заболяване при лицата с положителен тест. Дефинира се с отношението на положителните случаи от теста (a) към всички положителни случаи в групата (a+c), т.е. с отношението $\frac{a}{a+c}$.

Отрицателната предсказваща стойност (Negative predictive value) на теста се измерва с вероятността за отсъствие на заболяване при лицата с отрицателен тест. Дефинира се с дяла на отрицателните случаи според теста (d) към всички отрицателни случаи в групата (b+d), т.е. с отношението $\frac{d}{b+d}$.

PPV и NPV зависят от преобладаване на заболяването сред изследваните.

РЕЗУЛТАТИ

Нашето проучване е планирано, за да проучим какви са възможностите на някои серумни белтъци за диагностициране на овариален тумор и най-вече могат ли тези протеини да се прилагат в предоперативната диференциална диагноза на овариалните тумори.

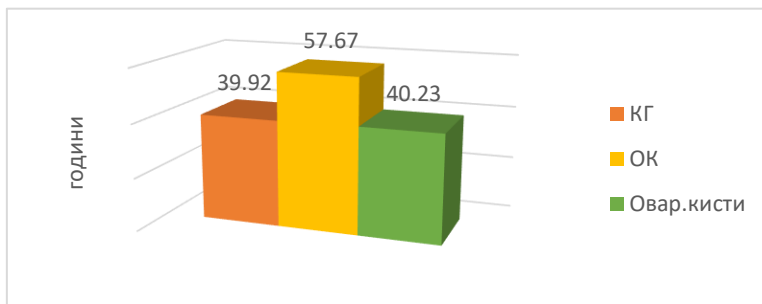
В проучването бяха включени 180 жени, на които определихме серумните концентрации на петте протеина, които са обект на нашето проучване - преалбумин (транстиретин, TTR), трансферин (TFR), АпоА1липопротеин (Апо А1LP), СА125 и β_2 микроглобулин (β_2 MG).

Използвахме данни от анамнезата и допълнителна информация от документацията на болничната информационна система и получихме данни за менопаузален статус на пациентките и хистопатологична диагноза на жените с доказан овариален тумор. Това ни помогна при оформяне на изследваните групи.

Използвайки методите на дескриптивната статистика, изчислихме основните обобщаващи характеристики: средна аритметична величина (Mean), медиана (Me), минимално (x_{min}) и максимално (x_{max}) значение на признака, както и показатели на разсейване - стандартно отклонение (SD) и доверителен интервал 95% CI (ДИ).

Таблица 3. Обобщаващи характеристики на групите по показателя възраст.

Показатели	Групи			
	Таргетна (А)			Контролна (В)
	Овариален карцином (А1)	Овариални кисти (А2)	Общо (А)	
N	60	60	120	60
Mean \pm SD	57.67 \pm 12.85	40.23 \pm 12.24	48.95 \pm 15.280	39.92 \pm 11.21
95% CI	54.35 - 60.99	37.07 - 43.39	46.19 - 51.71	37.02 - 42.82
Me	59	39.5	48	40
Min	29	21	21	22
Max	83	70	83	68



Фигура 6. Разпределение на работните групи – ОК (A1), овар.кисти (A2) и КГ (B) по възраст.

Проведения сравнителен анализ установи наличието на статистически значими различия ($p < 0.05$) по отношение на възрастта в следните двойки от пациентски групи - таблица 4.

Таблица 4. Ниво на значимост по отношение на фактора възраст в различните сравнявани групи пациенти.

Сравнявани групи пациенти	Mann-Whitney U	H _z	Sig.
Група А - Група В	2396.000	3.652	0.000
Подгрупа А1 - Подгрупа А2	616.000	6.212	0.000
Подгрупа А1 - Група В	579.000	6.406	0.000
Подгрупа А2 - Група В	1783.000	-0.087	0.928

Измерихме концентрациите на петте протеина на всичките 180 пациентки в нашата извадка. Използвахме корелационен анализ за установяване и оценка на единичните корелации на менопаузалния статус с различни количествени променливи в рамките на цялата група от 180 пациентки и на създадените от нас групи.

Таблица 5. Корелационна връзка на менопаузалния статус с петте протеина в цялата група пациенти (n=180).

Протеини	Pearson r	N	Sig. (2-tailed)
Prealbumin	- 0.269	180	0.003
ApoA1LP	- 0.126	180	0.091
CA125	0.374	180	0.000
TFR	- 0.330	180	0.000
β2MG	0.428	180	0.000

Поради това, че ще отчитаме промени в серумните концентрации при жени с овариални тумори, смятаме, че е необходимо да установим настъпват ли промени в изследваните протеини при КГ пациентки, свързани ли са те с възрастта на пациентките и с техния менопаузален статус. Използвали сме средната аритметична стойност (Mean), когато формата на разпределение наподобява нормална крива или медианата (Me), когато разпределението не е нормално.

Таблица 6. Обобщаващи характеристики за петте протеина в група В (КГ) n=60.

Протеини	Характеристики				
	Mean ± SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.27 ± 0.04	0.26 - 0.28	0.28	0.18	0.36
TFR	2.67 ± 0.44	2.56 - 2.78	2.70	1.55	3.48
ApoA1LP	1.80 ± 0.23	1.74 - 1.86	1.76	1.3	2.31
CA125	14.92 ± 9.22	12.54 - 17.30	12.95	3	51.6
β2MG	1.38 ± 0.76	1.18 - 1.58	1.04	0.55	4.1

Използвайки корелационен анализ установихме, че няма корелационна връзка със статистическа значимост между възрастта и концентрациите на петте протеина в групата здрави жени (Таблица 6).

Таблица 7. Корелационна връзка на възрастта с петте протеина в група В (КГ) n=60.

Протеини	Pearson r	N	Sig. (2-tailed)
Prealbumin	0.010	60	0.940
ApoA1LP	- 0.060	60	0.650
CA125	- 0.126	60	0.337
TFR	0.162	60	0.216
β2MG	0.110	60	0.400

Установихме, че няма статистически значима корелационна връзка и между менопаузалния статус и серумните концентрации на изследваните биомаркери в КГ (В) пациентки (Таблица 7).

Таблица 8. Корелационна връзка на менопаузалния статус с петте протеина в група В (КГ) n=60.

Протеини	Pearson r	N	Sig. (2-tailed)
Prealbumin	- 0.07	60	0.587
АpoA1LP	0.06	60	0.620
CA125	- 0.14	60	0.280
TFR	0.62	60	0.637
β2MG	0.23	60	0.080

Първи етап на проучването

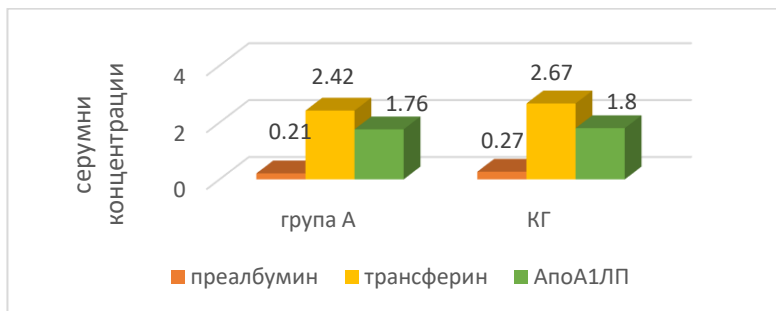
Какви промени настъпват в концентрациите на петте протеина при жени с овариални тумори?

Обект на първия етап от нашето проучване бяха двете групи : Група А - жени с овариални тумори (n=120) и група В - контролната група (n=60) пациентки.

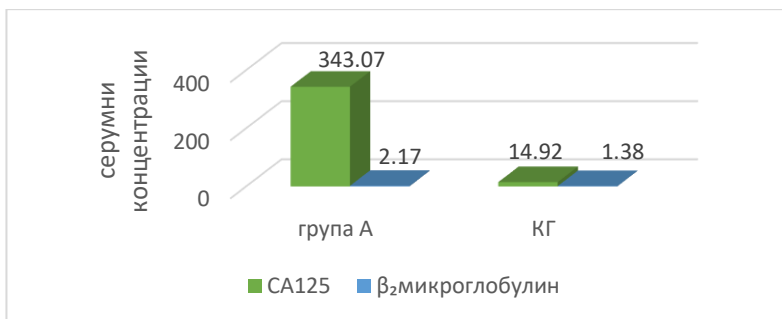
Таблица 9. Обобщаващи характеристики за петте протеина в групата на жените с овариални тумори - група А (n=120).

Протеини	Характеристики				
	Mean ± SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.21 ± 0.07	0.20 - 0.22	0.22	0.04	0.33
TFR	2.42 ± 0.70	2.29 - 2.55	2.53	0.49	3.90
АpoA1LP	1.76 ± 0.27	1.71 - 1.81	1.74	1.08	2.62
CA125	343.07 ± 488.65	254.74 - 431.40	72.8	2.1	1892.00
β2MG	2.17 ± 1.58	1.88 - 2.46	1.86	0.65	10.46

Средните стойности на петте биомаркера в двете наблюдавани групи са представени на Фигури 7 и 8.



Фигура 7. Средни стойности на преалбумин, трансферин и АроА1ЛП в група А и КГ (група В).



Фигура 8. Средни стойности на CA125 и β_2 MG в група А и КГ (група В).

Приложеният сравнителен анализ установи статистически значими различия за двете групи в стойностите на Prealbumin, CA125, TFR и β_2 MG. В стойностите на АроА1ЛП различията за двете групи са статистически незначими.

Таблица 10. Ниво на статистическа значимост за петте протеина в група А (n=120) и група В (КГ; n=60)

Протеини	Група А	Група В	Mann-Whitney U	z	Ниво на значимост p
Prealbumin	0.21	0.27	1575.000	- 6.140	0.000
TFR	2.42	2.67	2829.500	- 2.337	0.019
АроА1ЛП	1.76	1.80	3281.500	- 0.965	0.337
CA125	343.07	14.92	1337.500	6.860	0.000
β_2 MG	2.17	1.38	2204.000	4.230	0.000

В групата на жените с овариални тумори чрез корелационния анализ и изчисляване на корелационен коефициент (r), доказахме няколко зависимости между отделните протеини. В случая за установяване на връзка между две количествени променливи е изчислен корелационен коефициент на Пирсън (*Pearson`s correlation coefficient*).

Установихме значителна отрицателна корелационна връзка със статистическа значимост между:

- преалбумин и β_2 микроглобулин;
- трансферин и β_2 микроглобулин

Значителна положителна корелационна връзка, статистически значима между:

- преалбумин и АпоА1 липопротеин.
- преалбумин и трансферин
- СА125 и β_2 микроглобулин

Умерена корелационна връзка с отрицателен знак и статистическа значимост между:

- преалбумин и СА125
- трансферин и СА125
- АпоА1липопротеин и β_2 микроглобулин.

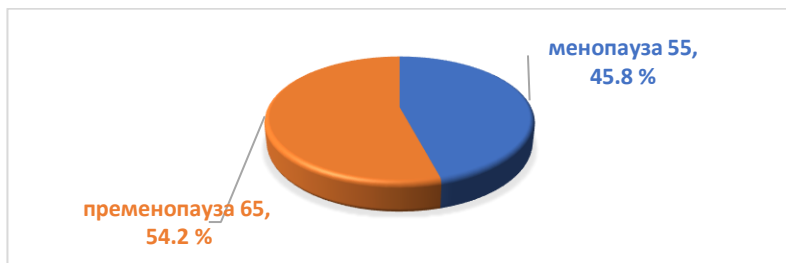
Умерена корелационна връзка с положителен знак и статистическа значимост установихме между:

- трансферин и АпоА1липопротеин

Между СА125 и АпоА1липопротеин установихме слаба по сила корелационна връзка с отрицателен знак, която е статистически незначима.

Как менопаузата се отразява върху промените, настъпващи в концентрациите на петте протеина в група А?

За да отговорим на този въпрос, разпределихме пациентките от група А с овариални тумори на : жени с овариални тумори в менопауза (n=55) и жени с овариални тумори в пременопауза (n= 65).



Фигура 9. Разпределение на жените с овариални тумори според менопаузалния статус.

Определихме общите статистически характеристики на петте протеина в групата на жените в менопауза.

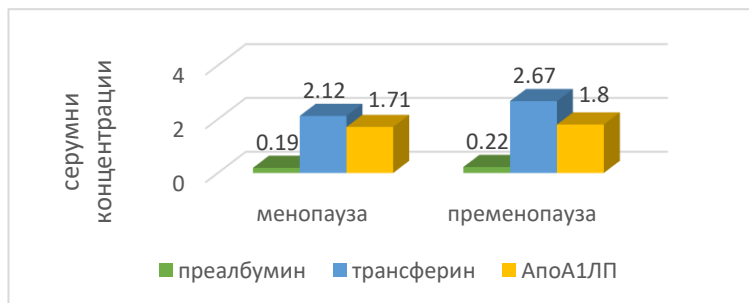
Таблица 11. Обобщаващи характеристики за петте протеина в групата на жените в менопауза (n=55).

Протеини	Характеристики				
	Mean ± SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.19 ± 0.08	0.17 - 0.21	0.20	0.04	0.33
TFR	2.12 ± 0.68	1.94 - 2.30	2.15	0.49	3.41
ApoA1	1.71 ± 0.26	1.64 - 1.78	1.72	1.08	2.44
CA125	535.13 ± 568.20	381.52 - 688.74	275.70	4.00	1892.00
β2MG	2.91 ± 1.91	2.39 - 3.43	2.74	0.88	10.42

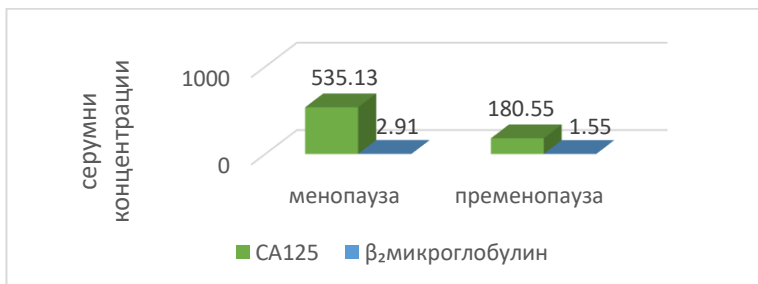
Определихме общите статистически характеристики на петте протеина и при пациентките в пременопауза в групата на жените с овариални тумори.

Таблица 12. Обобщаващи характеристики за петте протеина в групата на жените в пременопауза (n=65).

Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.22 \pm 0.06	0.21 - 0.23	0.22	0.06	0.31
TFR	2.67 \pm 0.61	2.52 - 2.82	2.72	1.07	3.90
ApoA1	1.80 \pm 0.26	1.74 - 1.86	1.78	1.23	2.62
CA125	180.55 \pm 331.70	98.36 - 262.74	42.30	2.10	1365.00
β 2MG	1.55 \pm 0.81	1.35 - 1.75	1.21	0.65	4.02



Фигура 10. Средни стойности на преалбумин, трансферин и АпоА1ЛП в група А по менопаузален статус.



Фигура 11. Средни стойности на CA125 и β 2MG в група А по менопаузален статус.

Сравнихме средните стойности на измерваните протеини при жените в менопауза и в пременопауза и приложихме корелационен анализ изчислявайки точково-бисериален коефициент (*Point Biserial Correlation Coefficient* r_{pb}) и установихме:

- значителна положителна корелационна връзка със статистическа значимост между менопаузалния статус и β_2 MG в групата на жените с овариални тумори
- умерена положителна корелационна връзка със статистическа значимост между менопаузалния статус и CA125 в групата на жените с овариални тумори
- умерена отрицателна корелационна връзка със статистическа значимост между менопаузалния статус и TFR в групата на жените с овариални тумори
- умерена отрицателна корелационна връзка със статистическа значимост между менопаузалния статус и TTR в групата на жените с овариални тумори

Между менопаузалния статус и ApoA1LP има отрицателна слаба корелационна връзка, която е статистически незначима, според приетото от нас ниво на статистическа значимост - $p < 0.05$.

Таблица 13. Корелации между менопаузалния статус и петте протеина в група

A . * r_{pb} Point Biserial Correlation Coefficient

Протеини	r_{pb}	N	Sig. (2-tailed)
Prealbumin	- 0.21	120	0.023
ApoA1LP	- 0.18	120	0.053
CA125	0.36	120	0.000
TFR	- 0.39	120	0.000
β_2 MG	0.43	120	0.000

Между концентрациите на по-голяма част от серумните протеини при пациентките в менопауза се наблюдават различни корелационни зависимости, които са статистически значими.

Налице са значителна положителна корелационна връзка между :

- ApoA1LP и преалбумин
- трансферин и преалбумин

Значителна отрицателна корелационна връзка между :

- преалбумин и β_2 MG
- трансферин и β_2 MG

Умерена положителна корелационна връзка между :

- β_2 MG и CA125

Умерена отрицателна корелационна връзка между :

- преалбумин и CA125
- ApoA1LP и β_2 MG

Между останалите протеини при жените в менопауза с овариални тумори има слаби корелационни връзки, които са статистически незначими.

При жените в пременопауза с овариални тумори също се наблюдават различни корелационни зависимости в нивата на по-голяма част от серумните биомаркери, които са статистически значими.

Налице са значителна положителна статистически значима корелационна зависимост между :

- трансферин и ApoA1LP
- CA125 и β_2 MG
- преалбумин и ApoD1LP

Положителна корелационна връзка с умерена сила, статистически значима между:

- преалбумин и трансферин

Отрицателна умерена корелационна зависимост със статистическа значимост между:

- преалбумин и CA125

Между останалите протеини при жените в пременопауза с овариални тумори има слаби корелационни връзки, които са статистически незначими.

Каква е диагностичната чувствителност и специфичност на изследваните биомаркери при диагностицирането на овариален тумор?

За тази цел използвахме ROC (Receiver Operating Characteristic Curve) анализ, с помощта на който се оценяват диагностичните качества на изследваните показатели, базирани върху чувствителността и специфичността на тестовете. Диагностичната специфичност и чувствителност, както и положителната и отрицателната предиктивна стойност за всеки един показател са показани на Таблица 14. Двойките от кореспондиращите си числа за чувствителност и специфичност на съответния показател са отразени като точки на правоъгълна координатна система. При тяхното съединяване се получава линия, наречена ROC крива, която илюстрира връзката между чувствителността и специфичността. Площта под нея AUC (Area Under the Curve) показва до каква степен по стойностите на съответния плазмен протеин пациентите в извадката могат да се класифицират в една от двете групи: болни (жени с овариални тумори) и здрави (жени без овариални тумори). Това е видно от Таблица 16. Колкото коефициента AUC е по-близък до 1, толкова диагностичната способност на съответния тест е по-добра.

Използвахме граничните стойности (cut off) и референтните интервали за изследваните показатели по препоръките на производителите на отделните китове реактиви, но получихме резултати, които според нас биха могли да бъдат подобрени. За тази цел решихме да определим прагови величини за нашата извадка, които най-добре биха разграничили жени с овариални тумори от жени без овариални тумори Таблица 15.

Таблица 14. Cut off стойности и референтен ранг според производителите на китовете реактиви на изследваните количествени показатели за доказване на овариален тумор и стойности на критериите за валидиране на скрининг тестове.

Показател	Cut off/	Sn(%)	Sp(%)	PPV(%)	NPV(%)
CA125	≥ 35 IU/mL	63.3	96.7	97.4	56.9
prealbumin	0.20-0.40g/L	44.2	90	89.8	44.6
TFR	2.0-3.6g/L	33.3	90	87	40.3
АpoAIIIP	≤ 1.4 g/L	10.8	95	81.3	34.8
β ₂ MG	≥ 2.4 mg/L	37.5	91.7	90	42.3

Таблица 15. Cut off стойности на изследваните количествени показатели за разграничаване на пациентите с овариален тумор и стойности на критериите за валидизация на скрининг тестове.

Показател	Cut off	Sn(%)	Sp(%)	PPV(%)	NPV(%)
CA125	≥ 31.5 IU/mL	65.0	96.7	97.5	58.0
prealbumin	≤ 0.25 g/L	68.3	78.3	86.3	55.3
TFR	≤ 1.98 g/L	27.5	96.7	94.3	40.0
АpoA1LP	≤ 1.94 g/L	77.5	35.0	70.5	43.8
β_2 MG	≥ 2.06 mg/L	46.7	85.0	85.9	44.0

Таблица 16. AUC (Area Under the Curve) – коефициенти по отношение на риска за наличие на овариален тумор.

Тест	AUC	Стандартна грешка	Ниво на значимост р	95% Доверителен интервал	
				Долна граница	Горна граница
Prealbumin	0.781	0.034	0.000	0.714	0.849
АpoA1LP	0.544	0.046	0.334	0.455	0.634
CA125	0.814	0.031	0.000	0.754	0.874
TFR	0.607	0.042	0.019	0.525	0.689
β_2 MG	0.694	0.041	0.000	0.614	0.774

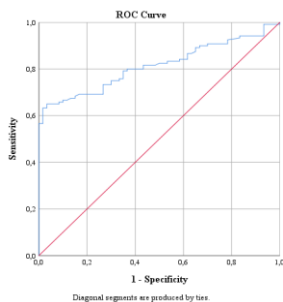
От таблица 16 е видно, че нивата на значимост на Prealbumin, CA125, TFR и β_2 MG са по-малки от 0.05 (съответно 0.000 ; 0.000 ; 0.019 ; 0.000), следователно те могат надеждно да бъдат използвани за отдиференциране на овариален тумор. Диагностичните способности на Prealbumin, CA125 и β_2 MG за наличие на овариален тумор са сравнително добри - > 69 %, тъй като AUC коефициентите им са високи - за CA125 (AUC=0.814; 95% ДИ 0.754÷0.874), Prealbumin (AUC=0.781; 95% ДИ 0.714÷0.849) и β_2 MG (AUC=0.694; 95% ДИ 0.614÷0.774). Праговите им значения са ≤ 31.5 IU/mL за CA125, което определя Sn 65 % и Sp 96.7%; за β_2 MG ≤ 2.06 mg/L, което определя Sn 46.7 % и Sp 85 %; за Prealbumin ≤ 0.25 g/L , което определя Sn 68.3 % и Sp 78.3 %.

За всеки един показател е изчислен и индекс на Youden (J). Този индекс е предложен през 1950г. като начин за обобщаване на ефективността на диагностичен тест. Той е мярка за способността на диагностичния тест да балансира чувствителността (откриване на заболяване) и специфичността (липса на заболяване). Изчислява се по следния начин:

$$\text{Sensitivity (\%)} + \text{Specificity (\%)} - 1 = \text{Youden Index}$$

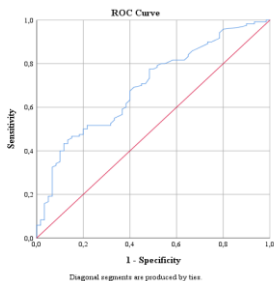
Колкото по-висока и по-близка до 1 е стойността на индексът на Youden, толкова способността на дадения тест за прилагане за диагностични цели е по-голяма.

На фигури 12 - 16 са представени ROC кривите на петте изследвани протеина.



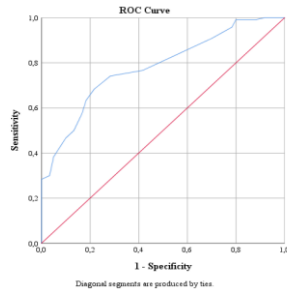
Фигура 12. ROC крива за CA125.

J индекс = 0.617, Sensitivity = 0.650, Specificity = 0.967



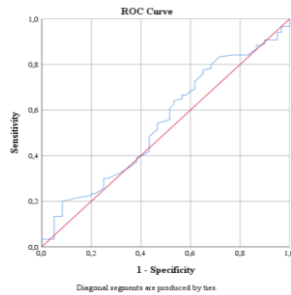
Фигура 13. ROC крива за beta2MG.

J индекс = 0.317, Sensitivity = 0.467, Specificity = 0.850



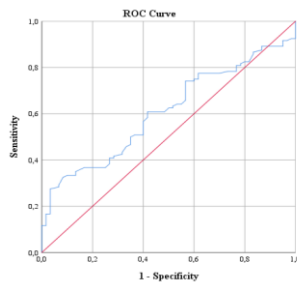
Фигура 14. ROC крива за Prealbumin.

Ј индекс = 0.467, Sensitivity = 0.683, Specificity = 0.783



Фигура 15. ROC крива за ApoA1LP.

Ј индекс = 0.125, Sensitivity = 0.775, Specificity = 0.350



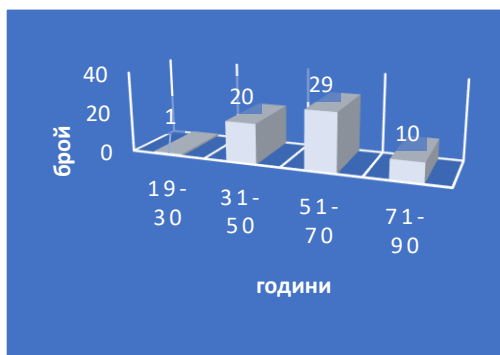
Фигура 16. ROC крива за TFR.

Ј индекс = 0.242, Sensitivity = 0.275, Specificity = 0.967

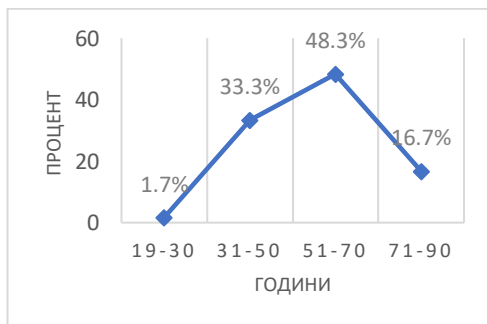
Втори етап на проучването

Какви промени настъпват в концентрациите на петте протеина в оформените подгрупи пациентки: група А1 и група А2?

Обект на втория етап от нашето проучване бяха двете таргетни подгрупи: А1- жените с доказан ОК и А2 – жените с доказани овариални кисти. Резултатите във Фигури 17 и 18 показват, че ОК е в най-голям процент сред жените във възрастов диапазон 51-70 години (N=29; 48.3%), последвани от групата във възрастов диапазон 31-50 години (N=20; 33.3%). Пациентките във възрастов диапазон 71-90 години (n=10; 16.7%) и 19-30 години (n=1; 1.7%) са с най-малък относителен дял (n=1; 1.7%).



Фигура 17. Разпределение по години в група А1.



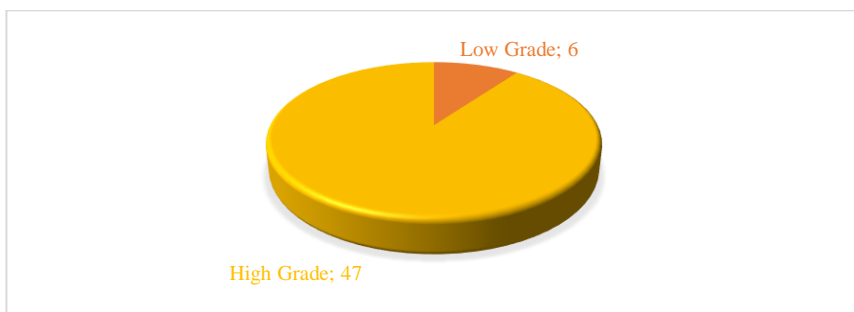
Фигура 18. Процентно разпределение по възраст в група А1.

От данните в болничната информационна система събрахме информация за хистологичния вариант на ОК, стадия на карцинома по FIGO и за неговата степен на диференциация. От данните на Фигура 19 става ясно, че преобладаващия хистологичен вариант е серозен епителен овариален карцином - 53 пациенти (88.3%). Муцинозен, светлоклетъчен и ендометроиден са представени съвсем слабо в нашата извадка от пациенти съответно 2 пациенти (3.33%); 3 пациенти (5%); 2 пациенти (3.33%).



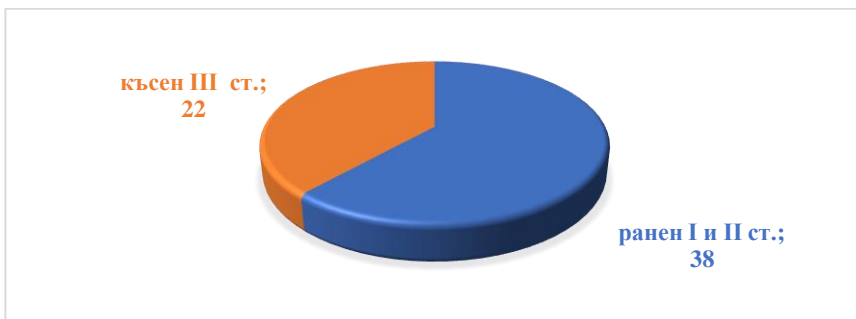
Фигура 19. Разпределение на ОК по хистологичен вариант.

Резултатите на Фигура 20 показват, че по-голям процент са жените с висока степен на диференциация на серозен епителен ОК High Grade 47 (88.7 %), а жените с ниска степен на диференциация на ОК Low Grade са само 6 (11.3%).



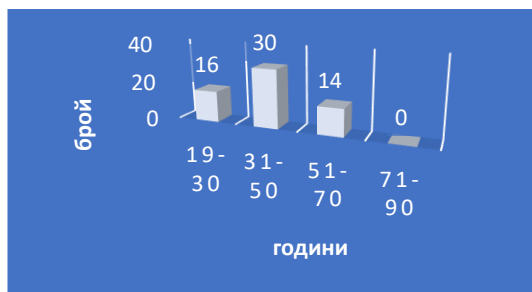
Фигура 20. Разпределение на епителен серозен ОК по степен на диференциация.

По отношение на стадиите според FIGO, разпределението в групата на ОК е следното: 38 (63.3 %) са пациентките с ранен стадий на ОК, включващ I и II стадий, 22 (36.7 %) са пациентките с късен стадий на ОК- III стадий (Фигура 21). Сред изследваните жени, няма такива в IV стадий.

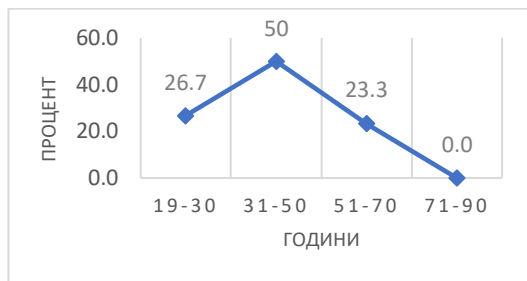


Фигура 21. Разпределение на ОК по стадий.

Резултатите във фигури 22 и 23 показват, че сред жените с овариални кисти е най-голям процента на тези във възраст 31-50 години (n=30; 50.0%). Пациентките във възрастов диапазон 19-30 години (n=16; 26.7%) и 51-70 (n=14; 23.3%) години са с почти еднакво представяне в нашата изследвана извадка.



Фигура 22. Разпределение по възраст в подгрупа А2.



Фигура 23. Процентно разпределение по възраст в подгрупа А2.

От болничната информационна система получихме информация за вида на овариалните кисти според направената хистопатологична биопсия. В най-голям процент са ендометроидните кисти (n=25; 41.7 %) и серозните кистаденоми (n=20; 33.3 %). Дермоидните и фоликуларни кисти са представени с по-малък относителен дял, съответно 5 (8.3 %) и 10 (16.7 %).



Фигура 24. Разпределение на овариални кисти по хистологичен вариант.

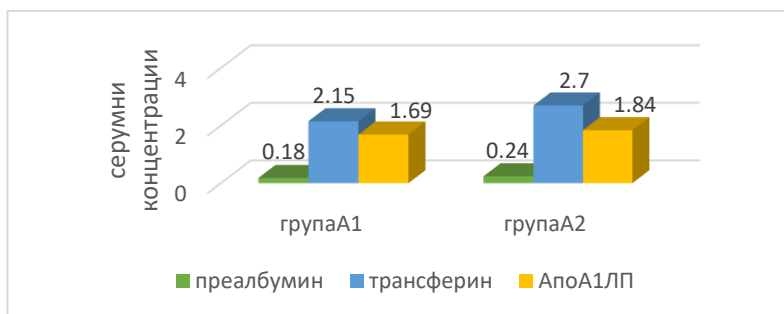
Използвахме сравнителен анализ и изчислихме необходимите показатели. Получените данни относно статистическите характеристики на петте биомаркера са представени на таблица 17 и таблица 18.

Таблица 17. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените с ОК.

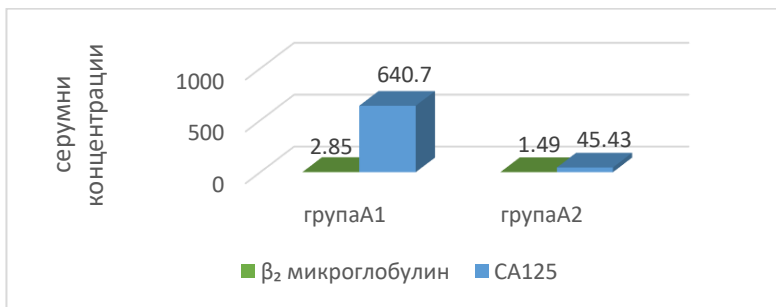
Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Ме	Min	Max
Prealbumin	0.18 \pm 0.08	0.16-0.20	0.19	0.04	0.33
TFR	2.15 \pm 0.70	1.97-2.33	2.0	0.49	3.41
АpoA1LP	1.69 \pm 0.28	1.62-1.76	1.68	1.08	2.36
CA125	640.70 \pm 543.79	500.22-781.18	422.70	4.2	1892
β 2MG	2.85 \pm 1.85	2.37-3.33	2.49	0.65	10.46

Таблица 18. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените с овариални кисти.

Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Ме	Min	Max
Prealbumin	0.24 \pm 0.04	0.23-0.25	0.23	0.14	0.31
TFR	2.70 \pm 0.58	2.55-2.85	2.71	1.07	3.9
АpoA1LP	1.84 \pm 0.22	1.78-1.90	1.79	1.38	2.62
CA125	45.43 \pm 68.50	27.73-63.13	20.3	2.1	450.5
β 2MG	1.49 \pm 0.80	1.28-1.70	1.13	0.74	3.21



Фигура 25. Средни стойности на преалбумин, трансферин и АpoA1LP за подгрупа A1 и A2.



Фигура 26. Средни стойности на CA125 и β_2 микроглобулин при жени за подгрупа A1 и A2.

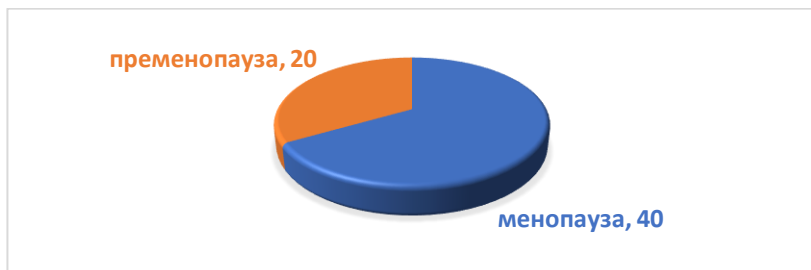
Таблица 19. Ниво на статистическа значимост за петте протеина в подгрупа A1 и A2. *p- ниво на значимост

Протеини	Група	Група A2	Mann-	z	P*
Prealbumin	0.18	0.24	981.5	- 4.293	0.000
TFR	2.15	2.70	1044	- 3.965	0.000
ApoA1LP	1.69	1.84	1202.5	- 3.133	0.0017
CA125	640.70	45.43	404	7.324	0.000
β_2 MG	2.85	1.49	741.5	5.553	0.000

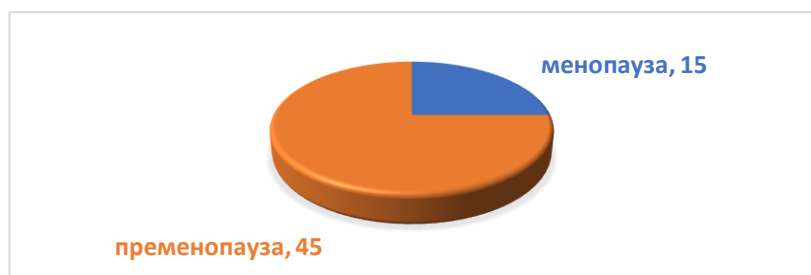
Проведеният сравнителен анализ установи наличието на статистически значими различия по отношение на петте изследвани биомаркера в двете изследвани подгрупи.

Как менопаузата се отразява върху промените, настъпващи в концентрациите на петте протеина в двете изследвани подгрупи?

За да отговорим на този въпрос, разделихме жените с ОК и тези с овариални кисти според техния менопаузален статус.



Фигура 27. Разпределение на ОК според менопаузален статус.



Фигура 28. Разпределение на овариални кисти според менопаузален статус.

В група А1 жените в менопауза са 40 (66.7 %), а тези в пременопауза са 20 (33.3%). Използвайки корелационен анализ установихме статистически значима умерена положителна корелационна връзка между менопаузалния статус и β_2 MG и статистически значима умерена отрицателна корелационна връзка между менопаузалния статус и TFR.

Таблица 20. Корелации между менопаузалния статус и изследваните протеини в група А1.

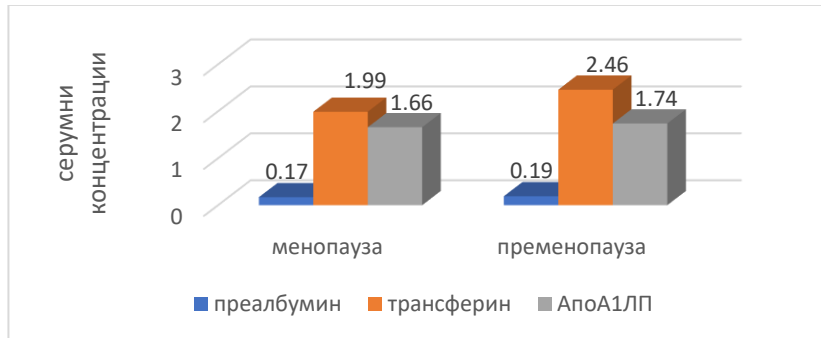
Протеини	r_{pb}	N	Sig. (2-tailed)
Prealbumin	- 0.146	60	0.264
АpoA1LP	- 0.133	60	0.313
CA125	0.205	60	0.115
TFR	- 0.323	60	0.012
β_2 MG	0.318	60	0.013

Таблица 21. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените с ОК в менопауза (n = 40).

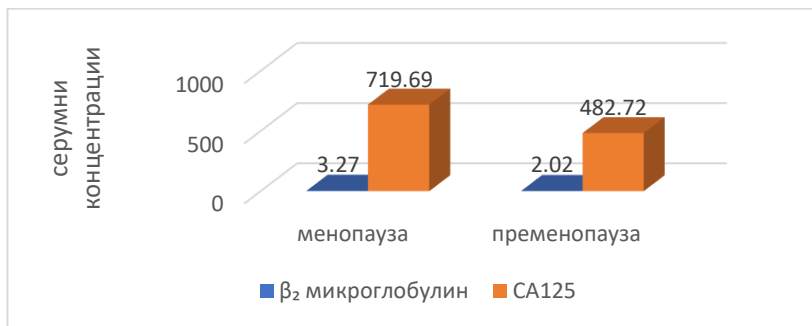
Протеини	Характеристики				
	Mean ± SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.17 ± 0.08	0.14-0.20	0.17	0.04	0.33
TFR	1.99 ± 0.71	1.76-2.22	1.98	0.49	3.41
АpoA1LP	1.66 ± 0.26	1.58-1.74	1.67	1.08	2.33
CA125	719.69± 560.85	540.32-899.06	746.05	8.9	1892
β2MG	3.27 ± 2.06	2.61-3.93	2.84	0.97	10.46

Таблица 22. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените с ОК в пременопауза (n = 20).

Протеини	Характеристики				
	Mean ± SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.19 ± 0.07	0.16-0.22	0.20	0.06	0.31
TFR	2.46 ± 0.55	2.20-2.72	2.45	1.49	3.13
АpoA1LP	1.74 ± 0.32	1.59-1.89	1.73	1.23	2.36
CA125	482.72 ± 469.64	262.92-702.52	302.65	4.2	1365
β2MG	2.02 ± 0.87	1.61-2.43	2.01	0.65	4.02



Фигура 29. Средни стойности на преалбумин, трансферин и АpoA1LP според менопаузния статус в група А1.



Фигура 30. Средни стойности на CA125 и β_2 MG според менопаузалния статус в група A1.

Сравнявайки средните стойности на петте протеина в двете наблюдавани групи, установихме наличие на статистически значими различия в TFR и β_2 MG ($p < 0.05$). При останалите три протеина - Prealbumin, ApoA1LP и CA125 не установихме статистически значими различия ($p > 0.05$).

Таблица 23. Ниво на статистическа значимост за петте протеина според менопаузалния статус в група A1. *p- ниво на значимост

Протеини	Група A1	Група A1	Mann-	z	p*
Prealbumin	0.17	0.19	316.5	- 1.300	0.194
TFR	1.99	2.46	247.5	- 2.384	0.017
ApoA1LP	1.66	1.74	342.5	- 0.894	0.373
CA125	719.69	482.72	297.5	1.599	0.110
β_2 MG	3.27	2.02	221	2.799	0.005

В група A2 жените в менопауза са 15 (25.0%), а тези в пременопауза са 45 (75.0%). Установихме статистически значима умерена положителна корелационна връзка между менопаузалния статус и β_2 микроглобулина.

Таблица 24. Корелации между менопаузалния статус и изследваните протеини в група A2.

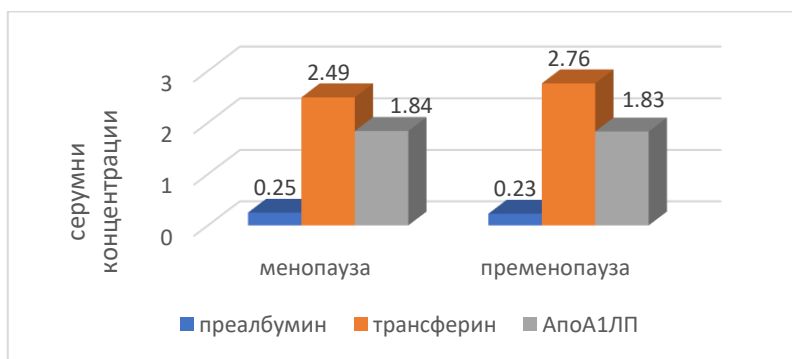
Протеини	r_{pb}	N	Sig. (2-tailed)
Prealbumin	0.165	60	0.209
АроА1ЛП	0.018	60	0.894
СА125	- 0.021	60	0.874
TFR	- 0.200	60	0.125
β 2MG	0.320	60	0.013

Таблица 25. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените в менопауза с овариални кисти (n = 15).

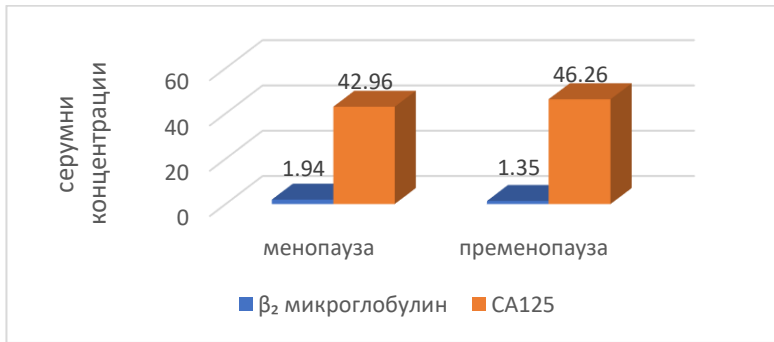
Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Ме	Min	Max
Prealbumin	0.25 \pm 0.04	0.23-0.27	0.23	0.19	0.31
TFR	2.49 \pm 0.40	2.27-2.71	2.47	1.87	3.24
АроА1ЛП	1.84 \pm 0.21	1.72-1.96	1.75	1.62	2.44
СА125	42.96 \pm 109.18	17.50-103.42	14.41	4.0	450.5
β 2MG	1.94 \pm 0.94	1.42-2.46	1.41	0.88	3.21

Таблица 26. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените в пременопауза с овариални кисти (n = 45).

Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Ме	Min	Max
Prealbumin	0.23 \pm 0.05	0.22-0.25	0.23	0.14	0.31
TFR	2.76 \pm 0.62	2.57-2.95	2.76	1.07	3.90
АроА1ЛП	1.83 \pm 0.23	1.76-1.90	1.79	1.38	2.62
СА125	46.26 \pm 47.75	31.91-60.61	28	2.1	246.9
β 2MG	1.35 \pm 0.69	1.14-1.56	1.1	0.74	3.09



Фигура 31. Средни стойности на преалбумин, трансферин и АроА1LP според менопаузалния статус в група А2.



Фигура 32. Средни стойности на CA125 и β_2 микроглобулин според менопаузалния статус в група А2.

Сравнявайки средните стойности на петте протеина в двете наблюдавани групи, установихме наличие на статистически значими различия в β_2 MG и CA125 ($p < 0.05$). При останалите три протеина - Prealbumin, АроА1LP и TFR не установихме статистически значими различия ($p > 0.05$).

Таблица 27. Ниво на статистическа значимост за петте протеина според менопаузалния статус в група А2. *p- ниво на значимост

Протеини	Група А2	Група А2	Mann-	z	*p
Prealbumin	0.25	0.23	316.5	-1.161	0.246
TFR	2.46	2.76	247.5	1.852	0.064
АроА1LP	1.84	1.83	342.5	0.077	0.936
CA125	42.96	46.26	297.5	2.612	0.009
β_2 MG	1.94	1.35	221	-2.194	0.029

Каква е диагностичната чувствителност и диагностичната специфичност на всеки един протеин за разграничаване на овариален карцином от овариална киста?

За да проверим каква е диагностичната чувствителност и специфичност на биомаркерите за разграничаване на ОК от овариална киста, използвахме ROC curve анализ и определихме cut off стойности.

Таблица 28. Прагови величини на изследваните количествени показатели за разграничаване на ОК и стойности на критериите за валидиране на скрининг тестове.

Показател	Cut off	Sn(%)	Sp(%)	PPV(%)	NPV(%)
CA125	≥ 99.05 IU/mL	81.7	90	89	83
prealbumin	≤ 0.205 g/L	73.3	66.7	71.4	68.8
TFR	≤ 2.37 g/L	78.3	61.7	74	67.1
АpoA1LP	≤ 1.615 g/L	86.7	45	77.1	61.2
β₂ MG	≥ 1.295 mg/L	85	70	74	82.4

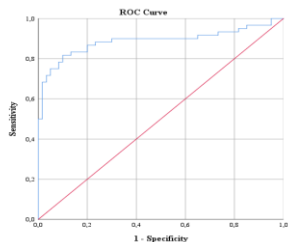
Таблица 29. AUC (Area Under the Curve) – коефициенти по отношение на наличие на ОК.

Area Under the Curve					
Тест	AUC	Стандартна грешка	Ниво на значимост p	95% ДИ	
				Долна граница	Горна граница
Prealbumin	0.727	0.047	0.000	0.635	0.820
Аpo A1 LP	0.666	0.050	0.002	0.568	0.764
CA125	0.888	0.034	0.000	0.822	0.954
TFR	0.710	0.047	0.000	0.617	0.803
β ₂ MG	0.794	0.041	0.000	0.713	0.875

От таблица 29 е видно, че нивата на значимост на петте протеина са по-малки от 0.05, следователно те могат надеждно да бъдат използвани за разграничаване на овариален карцином от овариална киста. Диагностичните им способности за разграничаване на овариален карцином от овариална киста са сравнително добри - надхвърлят 66 %, тъй като AUC коефициентите им са високи. Праговете им значения определят добра Sn и Sp Таблица 28.

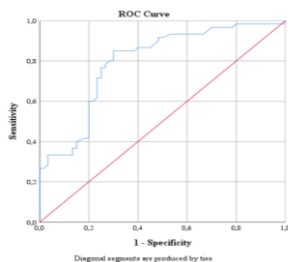
За всеки един показател на базата на Sensitivity и Specificity е изчислен и индекс на Youden (J) .

На фигури 33 - 37 са представени ROC кривите за петте протеина при разграничаването на ОК и овариална киста.



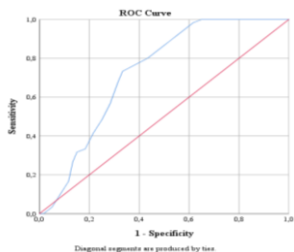
Фигура 33. ROC крива за CA125.

J индекс = 0.717, Sensitivity = 0.817, Specificity = 0.900;



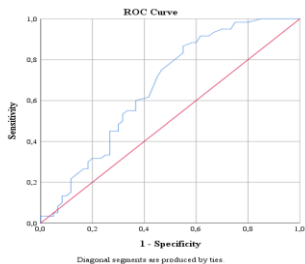
Фигура 34. ROC крива за β_2 MG.

J индекс= 0.550, Sensitivity = 0.850, Specificity = 0.700;



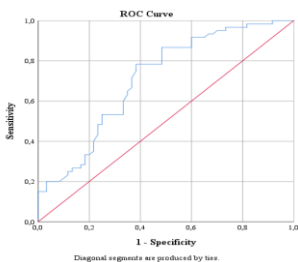
Фигура 35. ROC крива за Prealbumin.

J индекс = 0.400, Sensitivity = 0.733, Specificity = 0.667.



Фигура 36. ROC крива за Apo A1LP.

J индекс= 0.317, Sensitivity = 0.867, Specificity = 0.450



Фигура 37. ROC крива за TFR.

J индекс= 0.400, Sensitivity = 0.783, Specificity = 0.617.

Каква е промяната на петте протеина в зависимост от стадия на ОК –ранен или късен?

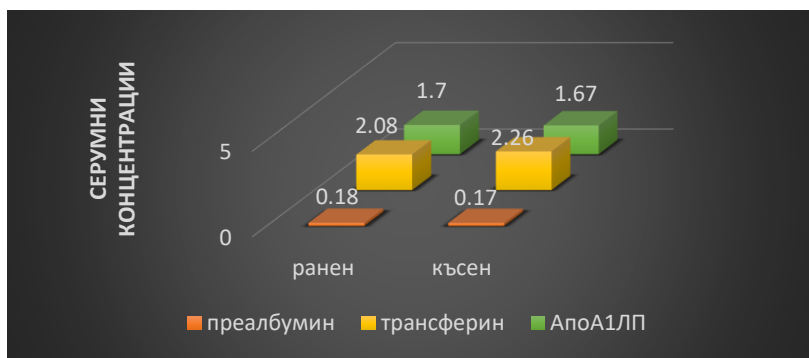
За да отговорим на този въпрос разпределихме жените с ОК в две групи: жени с ранен стадий на ОК, включващ I и II стадий и жени с късен стадий на ОК, включващ III стадий. В нашата извадка няма пациентки в IV стадий на ОК. Разпределението на пациентките е представено на Фигура 21.

Таблица 30. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените с ранен стадий на ОК (n=38).

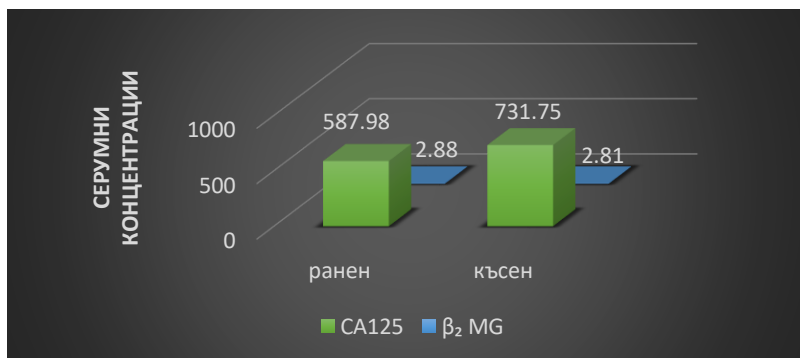
Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.18 \pm 0.08	0.15-0.21	0.19	0.14	0.31
TFR	2.08 \pm 0.77	1.83-2.33	1.96	1.07	3.9
ApoA1LP	1.70 \pm 0.29	1.61-1.80	1.71	1.38	2.62
CA125	587,98 \pm 506,61	368.59-787.37	361.25	2.1	450.5
β 2MG	2,88 \pm 2,15	2.17-3.59	2.36	0.74	3.21

Таблица 31. Обобщаващи статистически характеристики на петте протеина в групата на жените с късен стадий на ОК (n=22).

Протеини	Характеристики				
	Mean \pm SD	95% ДИ	Me	Min	Max
Prealbumin	0.17 \pm 0.07	0.14-0.20	0.17	0.14	0.31
TFR	2.26 \pm 0.54	2.02-2.50	2.32	1.07	3.9
АpoA1LP	1.67 \pm 0.27	1.55-1.79	1.60	1.38	2.62
CA125	731.75 \pm 591.67	469.42-994.08	666.30	2.1	450.5
β 2MG	2.81 \pm 1.14	2.30-3.32	2.95	0.74	3.21



Фигура 38. Средни стойности на преалбумин, трансферин и ApoA1LP при ранен и късен стадий на ОК.



Фигура 39. Средни стойности на CA125 и β 2MG при ранен и късен стадий на ОК.

Използвайки сравнителен анализ, изчислихме нивото на статистическа значимост за петте протеина според стадия на ОК и установихме, че не се наблюдава статистически значимо различие в нивата и на петте изследвани маркера при лицата с късен и ранен стадий на ОК.

Използвайки корелационен анализ не установихме корелационна връзка на стадия с петте изследвани биомаркера.

Трети етап на проучването

Моделиране на връзки на овариален тумор чрез логистична регресия.

Тази програма е разработена специално за нашето проучване и с нея се стремим да покажем по-точно връзките между наличието на овариален тумор, възрастта и петте лабораторни биомаркера.

➤ Нашият изследователски въпрос е:

“ Каква е тежестта на шестте фактора: възраст, Prealbumin, ApoA1LP, CA125, TFR и β 2MG при определяне на риска за възникване на туморно образуване на яйчника?”

Таблица 32. Логистичен модел на връзката наличие на овариален тумор и шестте количествени фактора.

	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI for Exp(B)	
						Lower	Upper
Години	0.029	0.018	2.493	0.114	1.029	0.993	1.067
Prealb β_1	-0.019	0.005	12.573	<0.001	0.982	0.972	0.992
Apo A1 LP	1.487	0.936	2.522	0.112	4.424	0.706	27.727
CA125 β_2	0.046	0.014	10.778	0.001	1.047	1.019	1.076
TFR	0.334	0.428	0.609	0.435	1.397	0.604	3.233
β 2MG	0.248	0.263	0.894	0.345	1.282	0.766	2.145
Constant β_0	-1.309	2.150	0.371	0.543	0.270		

Означаваме с Y наличието на туморно образуване на яйчника - алтернативната зависима променлива. Двете и значения са 1 (пациентът

има овариален тумор) и 0 (пациентът няма овариален тумор), а вероятностите за тяхното настъпване са съответно p и $(1-p)$. Нека X е даден показател - възраст или клиничко-лабораторен показател т.е. независима променлива.

Оценките на параметрите са дадени в колона $\text{Exp}(B)$ на Таблица 35. Всяка от тези оценки, която е свързана с количествена факторна променлива, показва колко пъти (съответно с колко процента) ще се измени шансът за Y при нарастването на съответната факторна променлива с единица при контролирано (постоянно) равнище на останалите фактори.

Оценените вероятности са по-малки от равнището на значимост α . Това потвърждава статистическата значимост за развитие на овариален тумор на два параметъра - преалбумин - $p < 0.001$ и СА125 - $p = 0.001$.

Въз основа на резултатите линейната форма на оцененния логистичен модел ще бъде:

$$\ln \frac{\hat{p}}{1-\hat{p}} = -1.309 - 0.019X_1 + 0.046X_2 \quad \text{където: } X_1 - \text{Prealbumin} \\ X_2 - \text{CA125}$$

Видът на оцененния модел, изразен по отношение на вероятността за сбъждане на резултативното явление Y , ще има следния

вид:
$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-1.309 - 0.019X_1 + 0.046X_2)}}$$

Шансът за наличие на туморно образуване на яйчника:

- ще се увеличи 0.982 пъти, съответно с 1.8%, при намаляване на Prealb с 0.01 g/L;
- ще се увеличи 1.047 пъти, съответно с 4.7%, при увеличаване на СА125 с 1 IU/mL.

Регресионните коефициенти B за останалите количествени променливи са статистически незначими. По тази причина нямаме достатъчна

убеденост да тълкуваме съответстващите им шансови отношения Exp(B).

Оценките на параметрите в този вид на модела не могат да се интерпретират директно. Те се използват само за изчисляване на вероятността за сбъждане на Y при различни значения на факторните променливи.

Множествена логистична регресия за пациенти с ОК и овариална киста.

➤ **Формула с участието на петте протеина, която да се прилага в предоперативното разграничаване на ОК от овариална киста.**

Модел при менопауза - Оценките на параметрите са дадени в колона exp(B) на Таблица 33. Всяка от тези оценки, която е свързана с количествена факторна променлива, показва колко пъти (съответно с колко процента) ще се измени шансът за Y при нарастването на съответната факторна променлива с единица при контролирано (постоянно) равнище на останалите фактори.

Таблица 33. Логистичен модел на връзката **овариална киста** и петте количествени фактора при жени в менопауза.

	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI за Exp(B)	
						Lower	Upper
Prealb_	0.002	0.010	0.054	0.816	1.002	0.984	1.021
Apo A1 LP	3.212	2.589	1.539	0.215	24.833	0.155	3969.273
CA125	-0.010	0.005	3.982	0.046	0.990	0.980	1.000
TFR	0.193	0.905	0.045	0.831	1.212	0.206	7.143
β 2MG	-0.126	0.462	0.075	0.785	0.881	0.357	2.179
Constant	-5.398	4.956	1.186	0.276	0.005		

Шансът за наличие на овариална киста при жени в менопауза ще:

- се увеличи **1.002 пъти**, съответно с 0.2%, при повишаване на Prealb (X_1) с 0.01 g/L;
- се увеличи **24.833 пъти**, съответно с 2483.3%, при повишаване на Apo A1 LP (X_2) с 1 g/L;
- се увеличи **0.01 пъти**, съответно с 1.0% при намаляване на CA125 (X_3) с 1 IU/mL;
- се увеличи **1.212 пъти**, съответно с 21.2% при повишаване на TFR (X_4) с 1g/L;
- се увеличи **0.119 пъти**, съответно с 11.9% при намаляване на β 2MG (X_5) с 1mg/L.

Видът на оценения модел, изразен по отношение на вероятността за наличие на овариална киста при жени в менопауза, ще има следния вид:

$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-5.398 + 0.002X_1 + 3.212X_2 - 0.010X_3 + 0.193X_4 - 0.126X_5)}}$$

e – Неперово число = 2.718

Модел при пременопауза –Оценките на параметрите са дадени в колона Exp(B) на Таблица 34.

Таблица 34. Логистичен модел на връзката наличие на **овариална киста** и петте количествени фактора при жени в пременопауза.

	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI за Exp(B)	
						Lower	Upper
Prealbumin	-0.002	0.010	0.051	0.822	0.998	0.978	1.018
ApoA1 LP	2.155	2.296	0.881	0.348	8.630	0.096	776.384
CA125	-0.013	0.005	8.609	0.003	0.987	0.978	0.996
TFR	0.584	0.674	0.749	0.387	1.792	0.478	6.717
β 2MG	-0.279	0.589	0.225	0.635	0.756	0.238	2.401
Constant	-1.933	3.631	0.283	0.595	0.145		

Това показва, че шансът за наличие на овариална киста при жени в пременопауза ще:

- се увеличи **0.002 пъти**, съответно с 0.2%, при понижаване на Prealb (X_1) с 0.01 g/L;
- се увеличи **8.630 пъти**, съответно с 863.0%, при повишаване на Apo A1 LP (X_2) с 1 g/L;
- се увеличи **0.013 пъти**, съответно с 1.3% при понижаване на CA125 (X_3) с 1 IU/mL;
- се увеличи **1.792 пъти**, съответно с 79.2% при повишаване на TFR (X_4) с 1 g/L;
- се увеличи **0.244 пъти**, съответно с 24.4% при понижаване на β 2MG (X_5) с 1mg/L.

Видът на оценения модел, изразен по отношение на вероятността за наличие на киста при жени в пременопауза, ще има следния вид:

$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-1.933 - 0.002X_1 + 2.155X_2 - 0.013 + 0.584X_4 - 0.279X_5)}}$$

Общ модел без значение от менопаузалния статус - Оценките на параметрите са дадени в колона exp(B) на следващата таблица.

Таблица 35. Логистичен модел на връзката наличие на **овариална киста** и петте количествени фактора без значение от менопаузалния статус.

	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95% CI за Exp(B)	
						Lower	Upper
Prealbumin	-0.002	0.007	0.089	0.765	0.998	0.985	1.011
ApoA1 LP	2.616	1.633	2.566	0.109	13.676	0.557	335.600
CA125	-0.012	0.003	12.639	0.000	0.988	0.982	0.995
TFR	0.481	0.498	0.934	0.334	1.618	0.609	4.298
β 2MG	-0.394	0.322	1.493	0.222	0.675	0.359	1.268
Constant	-2.846	2.714	1.099	0.294	0.058		

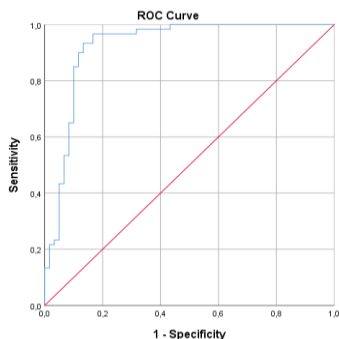
Това показва, че шансът за наличие на **овариална киста** при доказан овариален тумор без значение от менопаузалния статус ще:

- **се увеличи 0.002 пъти**, съответно с 0.2%, при понижаване на Prealb (X_1) с 0,01 g/L ;
- **се увеличи 13.676 пъти**, съответно с 1367.6%, при повишаване на Apo A1 LP (X_2) с 1 g/L;
- **се увеличи 0.012 пъти**, съответно с 1.2,% при понижаване на CA125 (X_3) с 1 IU/mL ;
- **се увеличи 1.618 пъти**, съответно с 61.8% при повишаване на TFR (X_4) с 1 g/L;
- **се увеличи 0.325 пъти**, съответно с 32.5% при понижаване на β 2MG (X_5) с 1 mg/L.

Видът на оценения модел, изразен по отношение на вероятността за наличие на киста, ще има следния вид:

$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-2.846 - 0.002 + 2.616X_2 - 0.012X_3 + 0.481X_4 - 0.394X_5)}}$$

Използвахме логистичният модел без значение от менопаузалния статус и изчислихме за всеки един пациент с ОК и овариална киста вероятността диагностицираният овариален тумор да бъде овариална киста. Чрез ROC анализ и построяване на ROC крива определихме граничната стойност за тази вероятност - **60 %**.



Фигура 40. ROC крива на вероятността \hat{p} .

Таблица 36. AUC коефициент на вероятността \hat{p} .

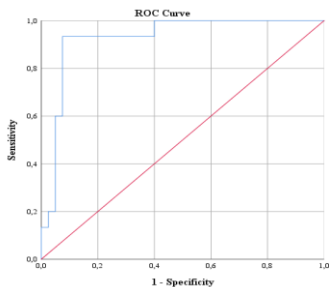
Area Under the Curve					
Тест	AUC	Стандартна грешка	Ниво на значимост p	95% ДИ	
				Долна граница	Горна граница
Вероятност \hat{p}	0.923	0.027	0.000	0.870	0.976

Видно е, че диагностичната стойност на изчислената от нас вероятност е висока. Нейната статистическа значимост $p = 0.000$ - по-малка от нивото на значимост 0.05. AUC коефициентът е висок (AUC=0.923; 95% ДИ 0.870 ÷ 0.976). Изчисленият праг е $\geq 60\%$, което определя Sn 96.7 % и Sp 83.3%. Изчислихме и J индекс за вероятността \hat{p} .

J индекс= 0.800, Sensitivity = 0.967, Specificity = 0.833.

За по-голяма прецизност на резултатите, приложихме и логистичните модели при менопауза и пременопауза. Изчислихме за всеки един пациент с ОК и овариална киста в менопауза и в пременопауза вероятността \hat{p} диагностицираният овариален тумор да бъде овариална киста. Чрез ROC анализ и построяване на ROC крива определихме граничните стойности за тази вероятност при двата модела.

Модел при менопауза: Граничната стойност на вероятност за овариална киста е **30 %**.



Фигура 41. ROC крива на вероятността \hat{p} при модел в менопауза.

Таблица 37. AUC коефициент на вероятността \hat{p} при модел в менопауза.

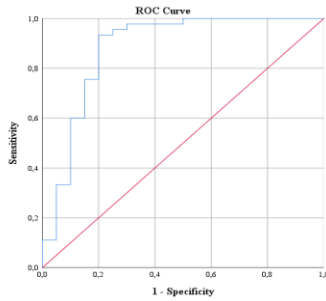
Area Under the Curve					
Тест	AUC	Стандартна грешка	Ниво на значимост p	95% ДИ	
				Долна граница	Горна граница
Вероятност \hat{p}	0.927	0.038	0.000	0.852	1.000

Диагностичната стойност на изчислената от нас вероятност е висока. Нейната статистическа значимост p е 0.000 - по-малка от нивото на значимост 0.05. AUC коефициентът е висок (AUC=0.927; 95%ДИ 0.852÷1.000;). Изчисленият праг е $\geq 30\%$, което определя Sn 93.3 % и Sp 90 %.

Изчислихме и J индекс за вероятността \hat{p} при жени в менопауза.

J индекс= 0.833, Sensitivity = 0.933, Specificity = 0.900.

Модел при пременопауза: Граничната стойност на вероятност за овариална киста е **78 %**.



Фигура 42. ROC крива на вероятността \hat{p} при модел в пременопауза.

Таблица 38. AUC коефициент на вероятността \hat{p} при модел в пременопауза.

Area Under the Curve					
Тест	AUC	Стандартна грешка	Ниво на значимост лр	95% ДИ	
				Долна граница	Горна граница
Вероятност \hat{p}	0.880	0.056	0.000	0.770	0.990

Диагностичната стойност на изчислената от нас вероятност е висока. Нейната статистическа значимост p е 0.000 - по-малка от нивото на значимост 0.05. AUC коефициентът е висок (AUC=0.880; 95% ДИ 0.770÷0.990;). Изчисленият праг е $\geq 78\%$, което определя Sn 93.3% и Sp 80%. Изчислихме и J индекс за вероятността p при жени в пременопауза. J индекс= 0.733, Sensitivity = 0.933, Specificity = 0.800.

ОБСЪЖДАНЕ

Овариалните тумори са често срещани при жените във всички възрастови групи. Анализите от нашето изследване потвърждават тези данни - възрастта на наблюдаваните пациентки с овариален тумор варира от 21 години до 83 години.

Понастоящем доказването на овариален тумор се осъществява чрез гинекологичен преглед с TVUS и измерването на туморен маркер СА125.

В нашето проучване за първи път в България проучихме промените, които настъпват в концентрациите на пет серумни протеина при жени с овариални тумори (n=120) и при здрави жени без доказан овариален тумор (n=60).

Чрез получената информация от досиетата на пациентките и анамнестичните данни, успяхме да изключим други състояния, които могат да повишат или намалят концентрациите на определяните от нас биомаркери.

Менопаузата е период от живота на жените, който се характеризира с трайно спиране на функцията на яйчниците и доста литературни източници описват настъпващи промени в концентрациите на различни лабораторни показатели в този период.

За да проверим как менопаузата се отразява върху концентрациите на петте протеина в цялата извадка пациенти (n=180), т.е. повлиява ли тя нивата на биомаркерите, както при здравите жени, така и при жените с доказан овариален тумор, направихме разделение по менопаузален статус. Нашите резултати показаха, че между менопаузалния статус и четири от изследваните от нас биомаркери - транстиретин, трансферин, СА125 и β_2 микроглобулин се наблюдава статистически значима връзка. Няма статистически значима връзка само между менопаузалния статус и АпоА1липопротеин в цялата изследвана от нас група пациенти.

Промени, настъпващи в концентрациите на петте протеина при жени с овариални тумори.

Сравнявайки групата на жените с овариален тумор и контролната група здрави жени установихме, че концентрациите на наблюдаваните биомаркери при здравите жени са в референтни граници. Чрез корелационен анализ установихме, че възрастта и менопаузалния статус при здрави жени **не са фактори**, които биха оказали влияние или биха довели до промяна в серумните концентрации на измерваните протеини.

В нашето проучване се установи, че концентрациите на четири от изследваните биомаркери, а именно транстиретин, трансферин, АпоА1липопротеин и β_2 микроглобулин в групата на жените с овариален тумор са в референтни граници. Нивото на СА125 е значително повишено извън референтния ранг. Това потвърждава факта, че СА125 е туморен маркер, свързан с процеси, протичащи в яйчниците и повишени нива на СА125 се наблюдават и при доброкачествени и при злокачествени заболявания на яйчника.

Направеният от нас сравнителен статистически анализ между двете работни групи пациентки - жени с овариален тумор и здрави жени доказва, че наличието на овариален тумор, води до статистически значими различия в нивата на четири от серумните белтъци за двете групи. Нашите резултати показаха, че при жените с овариален тумор концентрациите на транстиретин и трансферин се понижават, а концентрациите на СА125 и β_2 MG се повишават. Нивата на АроА1LP се понижават в много малка степен в групата на жените с овариални тумори и тази промяна е статистически незначима.

Доказахме различни корелационни зависимости между наблюдаваните белтъци, които също потвърждават по-горе направения извод, че в нивата на изследваните от нас протеини при жените с овариални тумори

настъпват промени и тези промени са в различни корелационни връзки помежду си.

Как менопаузата се отразява върху промените, настъпващи в концентрациите на петте протеина при жените с овариален тумор?

Разделяйки пациентките според менопаузалния статус и анализирайки получените резултати, установихме, че при пациентките в менопауза с овариален тумор (n=55), нивата на транстиретин и трансферин са по-ниски, нивата на СА125 и β 2MG са значително по-високи, а нивото на ApoA1LP е незначително по-ниско в сравнение с нивата на тези биомаркери при жените в пременопауза с овариални тумори (n=65).

Можем да направим заключение, че при жените с овариални тумори менопаузалния статус е **фактор**, който влияе на концентрацията на определяните от нас биомаркери. В най-малка степен менопаузата се отразява върху промяната в нивото на ApoA1LP.

Освен това установихме, че при жените в менопауза с овариален тумор нивата на три от протеините - транстиретин, СА125 и β 2 микроглобулин са извън референтните граници, докато при жените в пременопауза с овариален тумор само нивата на СА125 са извън референтния ранг.

Установихме различни статистически значими корелационни връзки между различните протеини в групата на менопаузалните и в групата на пременопаузалните жени с доказан овариален тумор. Някои от тези зависимости са общи за двете групи:

- транстиретин и ApoA1липопротеин- положителна връзка
- транстиретин и трансферин- положителна връзка
- транстиретин и СА125- отрицателна връзка
- СА125 и β 2 микроглобулин- положителна връзка.

Това ни дава основание да направим заключение, че промените в концентрациите на тези двойки серумни белтъци при жените с овариални

тумори корелират помежду си без значение от менопаузалния статус на пациентките.

Каква е диагностичната чувствителност и специфичност на изследваните биомаркери при диагностицирането на овариален тумор?

Използвайки граничните стойности (cut off) и референтните граници за изследваните показатели според препоръките на производителите на отделните китове реактиви, проверихме техните диагностични качества. Според получените от нас резултати, свързани с диагностичната надеждност за доказване на овариален тумор най-добра чувствителност (63.3%), специфичност (96.7 %), PPV (97.4 %) и NPV (56.9 %) показва СА 125 (Таблица 14) .

С цел да подобрим диагностичните качества на петте протеина, определихме прагови стойности за нашата извадка пациенти, които най-добре биха отграничили жени с овариални тумори от жени без овариални тумори, а именно:

- за СА125 ≥ 31.5 mU/L
- за TTR ≤ 0.25 g/L
- за TFR ≤ 1.98 g/L
- за β_2 MG \geq на 2.06 mg/L
- за ApoA1LP ≤ 1.94 g/L

Когато приложим определените от нас прагови стойности, с най-добра Sn е ApoA1LP 77.5%, с най-добра Sp 96.7% са СА125 и TFR, с най-висока PPV 97.5% и NPV 58% отново е СА125 (Таблица 15).

Термините скрининг и диагностика често се използват взаимозаменяемо, но съществува важно разграничение между тях по отношение както на клиничната им употреба, така и на изискванията за ефективност. Скрининговият тест се използва за оценка на индивидуалния риск от развитие на заболяване и обикновено е насочен към асимптоматични индивиди, но може да бъде специално насочен и към рискови

популации. Скрининговите тестове трябва да бъдат фокусирани върху постигане на висока чувствителност за откриване на заболяване, за да се ограничи броят на фалшивите отрицателни резултати, водещи до пропуснати диагнози в изследваната популация. Диагностичен тест пък се използва, за да се определи дали дадено лице има или не дадено заболяване и е насочен към лица, които са симптоматични. Като такъв, диагностичният тест трябва да бъде изключително точен при определяне на заболяването, с цел постигането на висока специфичност за диагностика на заболяването.

Според данните от ROC curve анализ и AUC коефициентите (таблица 16), установихме, че диагностичната стойност на TTR, CA125, TFR и β_2 MG за диагностициране на овариален тумор е висока. Техните р значения са по-малки от нивото на значимост 0.05, тяхната специфичност е над 78%, а PPV над 85%. Това дава основание да смятаме, че тези показатели могат да се използват като **диагностични** тестове при наличие на овариален тумор. AUC коефициентите на CA125, TTR и β_2 MG са най-високи, съответно 0.814; 0.781; 0.694, което ни дава основание да смятаме, че тези три показателя могат правилно да разграничат жени с овариални тумори от здрави в 69 %.

Разграничаването на доброкачествените от злокачествените тумори на яйчниците е ключ към успеха за успешното лечение на овариалните тумори. ОК е осмият най-често срещан рак при жените в световен мащаб и е водеща причина за смъртност сред всички гинекологични злокачествени заболявания. Липсата на специфични симптоми и ефективни скринингови програми за откриване на заболяването в ранен стадий са причина за високата смъртност и за това, че почти 70% от пациентите са диагностицирани в напреднало заболяване (стадий III или IV) и тяхната 5-годишна преживяемост е под 30%. Ранното откриване на ОК е отдавна търсена цел и предизвикателство. Много изследователи са се опитали да съставят диагностични модели за диагностицирането на ОК, за да подобрят неговото откриване.

Това ни накарва да проверим могат ли определяните от нас пет биомаркера да послужат при диагностицирането на карцинома на яйчника, което би могло да се използва в предоперативното разграничаване на злокачествените от доброкачествените образувания на яйчника.

В нашето изследване от групата на жените с овариални тумори $n=60$ са с ОК и $n=60$ с овариални кисти.

Сравнявайки възрастовото разпределение на двата вида овариални тумори в нашата извадка от пациенти, можем да направим следния извод: ОК преобладава във възрастов диапазон 51-70 години, докато овариалните кисти са по-чести във възрастов диапазон 31-50 години.

Според различни литературни източници високостепенният епителен серозен карцином на яйчниците представлява приблизително 70–80% от всички подтипове рак на яйчника. Нашето проучване потвърждава тези данни. В направеното от нас проучване този вид ОК е диагностициран в 88.7 % от пациентките.

Какви промени настъпват в концентрациите на пет протеина при жени с ОК и жени с овариални кисти.

Нашите резултати показваха, че в групата на пациентките с ОК, нивата на транстретин, CA125 и β_2 микроглобулин са извън референтните граници, докато в групата на жените с овариални кисти само концентрацията на CA125 е малко над граничната стойност 35 IU/mL.

Установихме, че стойностите на транстретин, трансферин, и АпоА1липопротеин са значително по-ниски при жените с ОК, в сравнение с жените с овариални кисти. CA125 и β_2 MG са със значително по-високи концентрации в групата на пациентките с ОК, в сравнение с пациентките с овариални кисти. Тези различия в концентрациите на изследваните биомаркери са статистически значими.

Има направени няколко проспективни проучвания, свързани с един от одобрените от FDA анализ - OVA 1 тест, който включва петте изследвани от

нас протеина и осигурява оценка на вероятността от злокачествено заболяване за овариален тумор. Нашите резултати потвърдиха данните от тези проучвания, че при наличие на ОК нивата на транстиретин, трансферин, и АпоА1липопротеин се понижават, а нивата на СА125 и β_2 MG се повишават.

Влияние на менопаузалния статус върху петте протеина при жените с ОК и овариални кисти.

Нашите резултати показват, че при пациентките в менопауза с ОК стойностите на TTR и трансферин са по-ниски от референтните стойности, а стойностите на СА125 и β_2 MG са по-високи от референтните. При жените в пременопауза с ОК промени извън референтните граници има в концентрацията на TTR - по-ниски от референтния ранг и на СА125 –по-високи от референтния ранг.

Установихме умерена положителна корелационна връзка между менопаузалния статус и β_2 микроглобулина и умерена отрицателна корелационна връзка между менопаузалния статус и трансферина.

Сравнявайки средните стойности на петте протеина при менопаузалните жени с ОК (n=40) и жените в пременопауза с ОК (n=20), установихме наличие на статистически значими различия в TFR и β_2 MG ($p < 0.05$). При останалите три протеина - транстиретин, АроА1LP и СА125 не установихме статистически значими различия ($p > 0.05$).

Сравнявайки средните стойности на петте изследвани биомаркера при менопаузалните и пременопаузалните жени с ОК, установихме по-ниски концентрации на транстиретин, трансферин и АпоА1липопротеин при жените в менопауза, докато стойностите на СА125 и β_2 MG при менопаузалните пациентки са по-високи отколкото са при жените с овариален карцином в пременопауза.

Менопаузалния статус при жените с ОК е значим фактор, свързан в най-голява степен с промените в концентрациите на TFR и β_2 MG.

Резултатите от нашето проучване показват, че при пациентките с овариални кисти промяна извън референтните стойности има само в стойностите на СА125 - по-високи са от референтните граници, и при жените в менопауза и при тези в пременопауза.

В групата на жените с овариални кисти установихме умерена положителна корелационна връзка между менопаузалния статус и β_2 микроглобулина.

Сравнявайки средните стойности на петте протеина в групата на жените в менопауза с овариални кисти (n=15) и жените в пременопауза с овариални кисти (n=45), установихме наличие на статистически значими различия в β_2 MG и СА125 ($p < 0.05$). При останалите три протеина - TTR, ApoA1LP и TFR не установихме статистически значими различия ($p > 0.05$).

Сравнявайки средните стойности на петте протеина при менопаузалните и пременопаузалните жени с овариални кисти, установихме, че концентрациите на трансферин и СА125 са по-ниски при менопаузалните пациентки. Нивата на TTR и β_2 MG при жените в менопауза с овариални кисти са по-високи в сравнение с жените в пременопауза с овариални кисти. Концентрациите на ApoA1липопротеин и при пациентките в менопауза и пременопауза с овариални кисти са почти еднакви.

Менопаузалния статус при жените с овариални кисти е значим фактор, свързан в най-голяма степен с промените в концентрациите на β_2 MG и СА125.

Каква е диагностичната чувствителност и диагностичната специфичност на всеки един протеин за разграничаване на овариален карцином от овариална киста?

При прилагане на cut off стойност за СА125 35 IU/mL, данни от направени проучвания доказват, че неговата чувствителност при разграничаване на доброкачествени и злокачествени образувания варира от 61 до 90%, докато специфичността му варира от 35 до 91%. Положителната прогностична стойност варира между 35 и 91%, а отрицателната прогностична стойност е между 67 и 90%.

Използвайки същата прагова стойност, нашите резултати показаха 90% Sn и 63.3 % Sp, 71% PPV и 86.4 % NPV за този туморен маркер за разграничаване на доброкачествени и злокачествени образувания на яйчника.

Има публикувани данни, че когато стойности под 35 IU/mL се определят като нормални, СА125 е повишен при 80% от епителните ракови заболявания на яйчниците. В нашето проучване ние потвърждаваме това - СА 125 е над 35 IU/mL при 90% от жените с епителен овариален карцином.

Има литературни данни според които нивата на СА125 остават нормални при муцинозни, ендометриодни и светлоклетъчни епителни карциноми. Нашите резултати потвърдиха, че серумната концентрация на СА125 при ендометриодните епителни ОК е в референтни граници, но при муцинозните и светлоклетъчните епителни ОК, тя е значително повишена. Двете пациентки с хистологично доказан ендометриоден епителен ОК са с нормални стойности на СА125, докато при пациентките със светлоклетъчен (n=3) и с муцинозен (n=2) ОК, стойностите на СА125 са значително завишени.

Според други литературни източници СА125 е повишен при приблизително 50%-60% от ранен стадий епителен карцином на яйчниците и 75%-90% от пациентите с напреднал стадий на заболяването. Данните от нашето изследване сочат, че СА125 е повишен при 89.5 % от пациентките с ранен (I и II) стадий на ОК и при 90.9 % при пациентките с късен (III и IV) стадий на ОК.

Според различни автори на публикации нивата на СА125 при жени без ОК остават нормални, докато нивата, свързани със злокачествено заболяване, имат тенденция да се повишават. Ние потвърждаваме това твърдение. Нашите резултати сочат, че 96.7 % от здравите жени (без овариален тумор) са с нормални стойности на СА125. Само 2 жени (3.33 %) имат леко завишени стойности на туморния маркер, което пък доказва други твърдения, че неговата концентрация може да бъде повлияна от допълнителни фактори: тютюнопушене, затлъстяване, възраст, етническа принадлежност. От

анамнестичните данни на двете пациентки с повишени стойности на СА125, получихме информация, че са дългогодишни пушачки.

Има литературни данни според които, концентрации на СА125 > 95 IU/mL при жени в менопауза могат да помогнат за разграничаване на доброкачествени от злокачествени образувания и нашите наблюдения доказват този факт. При жените в менопауза с ОК 59 (98.3 %) са с СА125 > 95 IU/mL.

Има доказателства, че транстиретинът е понижен при епителен ОК. В нашето проучване при 40 (66.7 %) от жените с ОК се наблюдават понижени стойности на TTR.

Съобщава се, че нивото на АпоА1LP намалява в серумите на пациенти с рак на яйчниците. Нашите резултати показаха, че нивата на АпоА1LP са понижени само при 12 (20%) от пациентките с ОК и неговата Sn е ниска като самостоятелен маркер.

Някои автори съобщават за понижени нива на трансферин в серума на пациенти с рак на яйчниците. В нашето проучване 31 (51.7%) от жените с ОК, показаха понижени стойности на TFR.

TTR, TFR и АпоА1LP са отрицателни реагенти на острата фаза на възпалението. Техните концентрации намаляват при наличие на възпаление в организма. С нашите резултати ние потвърждаваме теорията, че туморогенезата е тясно свързана с възпалението.

Ние определихме прагови величини за определяните от нас биомаркери и извършихме ROC curve анализ за да проверим каква е диагностичната способност на биомаркерите за разграничаване на ОК от овариални кисти.

Праговите стойности, които определихме са следните:

- СА125- ≥ 99.05 IU/mL;
- β_2 MG - ≥ 1.295 mg/L;
- TTR - ≤ 0.205 g/L;

- ApoA1LP- $\leq 1.615\text{g/L}$;
- TFR - $\leq 2.37\text{g/L}$.

Установихме че, диагностичната стойност и на петте протеина е висока. Техните р значения са по-малки от нивото на значимост 0.05 (Таблица 29). Това дава основание да смятаме, че тези показатели могат да се използват като **диагностични** тестове за разграничаване на ОК от овариална киста. AUC коефициентите са високи за всички протеини и надхвърлят 0.666. Праговете им значения определят много добра Sn и Sp (Таблица 28). За CA125 Sn 81.7% Sp 90%; за транстиретин Sn 73.3% Sp 66.7%; за TFR Sn 78.3% Sp 61.7 %; за ApoA1LP Sn 86.7% Sp 45%; за β_2 MG Sn 85% Sp 70%. Високата Sn на петте протеина дава основание да смятаме, че те могат да бъдат използвани и като **скриниращи** тестове за доказване на ОК. Можем да направим извод от получените AUC коефициенти, че тези показатели могат правилно да разграничат ОК от овариална киста в 66.6 % и могат да бъдат използвани в предоперативната диагностика.

Каква е промяната на петте протеина в зависимост от стадия на ОК –ранен или късен?

Според нашите резултати, наблюдавайки пациентките с ранен и късен стадий на ОК, установихме, че промяна извън референтния ранг има в концентрациите на три от протеините- транстиретин, CA125 и β_2 MG. Но статистически значими различия между двете групи не се наблюдават. Не намерихме и корелационна връзка между стадия и нивата на петте изследвани биомаркера.

Това показва, че и при ранен и късен стадий на ОК нивата на петте биомаркера търпят промени, които не зависят от стадия.

Моделиране на връзки на овариален тумор чрез логистична регресия.

Прилагайки логистичен регресионен анализ първо проверихме каква е тежестта на шестте фактора: възраст, TTR, ApoA1LP, CA125, TFR и

β_2 MG при определяне на риска за възникване на туморно образуване на яйчника. Потвърдихме статистическата значимост за развитие на овариален тумор на два параметъра - TTR и CA125. Стигнахме до следните заключения:

- При увеличаване на TTR с 0.01 g/L шансът да е налице туморно образуване ще се намали с 0.8% до 2.8%.
- При увеличаване на CA125 с 1 IU/mL шансът да е налице туморно образуване ще се увеличи с 1.9% до 7.6%.

По отношение на шанса за наличие на туморно образуване на яйчника, можем да направим следния извод:

Шансът за наличие на туморно образуване на яйчника:

- ще се увеличи при намаляване на TTR и при увеличаване на CA125.

Това би могло да бъде използвано в практиката като диагностичен тест при жени със симптоматика. Откриването на ниски стойности на TTR и повишени нива на CA125 и наличие на неспецифични симптоми (диспепсия, подуване на корема, ранно засищане, газове) е повод да бъде осъществен гинекологичен преглед с TVUS.

Разработването на тест или алгоритъм, който да осигури точен подход за оценка на риск от злокачествено заболяване на яйчниците е отдавна търсена цел. Многовариантен анализ, включващ туморни биомаркери заедно с ултразвук и подходящ алгоритъм, би бил полезен в предоперативната диагностика на овариалните тумори.

Високите AUC коефициенти от направения ROC curve анализ, ни дадоха основание да потърсим някаква формула, включвайки петте протеина и менопаузалния статус за диференциална диагноза между ОК и овариална киста, която да бъде прилагана предоперативно.

Формула с участието на петте протеина, която да се прилага в предоперативното разграничаване на ОК от овариална киста.

Резултатите от нашето проучване са сходни с резултатите от мултибиомаркерния анализ OVA1, който служи за оценка на нивото на риск от злокачественост при пациенти с ОК и също е базиран на петте биомаркера-транстиретин, трансферин, АпоА1липопротеин, СА125 и β_2 микроглобулин. Този тест комбинира резултатите от нивата на петте протеина с информация за менопаузалния статус на пациента за класифициране на рисковата група на ОК. OVA1 е показал 96% чувствителност, 35% специфичност, 40% положителна прогнозна стойност (PPV) и 95% отрицателна прогнозна стойност (NPV).

Използвайки отново логистична регресия ние анализирахме три модела: при жени в менопауза, жени в пременопауза и общ модел без значение от менопаузалния статус. Създадохме формули за всеки един модел, чрез които получихме **вероятността** даден овариален тумор да бъде овариална киста. Чрез тях можем да кажем колко пъти (съответно с колко процента) ще се измени шансът за овариална киста при нарастването или намаляването на всеки един протеин с единица при постоянно ниво на останалите фактори.

Нашите резултати показаха, че шансът за наличие на **овариална киста при жени в менопауза** ще:

- **се увеличи** при повишаване на TTR, на АроА1 липопротеин и на TFR и при намаляване на СА125 и β_2 MG.

Нашите резултати показаха, че шансът за наличие на **овариална киста при жени в пременопауза** ще:

- **се увеличи** при повишаване на TFR и АроА1 липопротеин и при понижаване на TTR, на СА125 и на β_2 MG.

Резултатите показаха, че шансът за наличие на **овариална киста** при доказан овариален тумор **без значение от менопаузалния статус** ще:

- **се увеличи** при повишаване на TFR и ApoA1 липопротеин и при понижаване на TTR, на CA125 и на β_2 MG.

Използвайки тези регресионни модели и ROC анализ, построихме ROC криви и изчислихме прагови стойности за вероятността за овариална киста.

При модела без значение от менопаузалния статус получихме прагова стойност за вероятността $\geq 60\%$. AUC коефициентът е висок 0.923. Тази прагова стойност показва добра Sn 96.7 % и Sp 83.3%. Това ни дава основание да смятаме, че тя като „показател“ може правилно да разграничи овариална киста от ОК без значение от менопаузалния статус в 92.3 %.

При модела с менопауза получихме прагова стойност за вероятността $\geq 30\%$. Тази прагова стойност показва добра Sn 93.3 % и Sp 90 %. AUC коефициентът е висок 0.927 Това ни дава основание да смятаме, че тя като „показател“ може правилно да разграничи овариална киста от ОК при жени в менопауза в 92.7 %.

При модела с пременопауза получихме прагова стойност за вероятността $\geq 78\%$. Тази прагова стойност показва добра Sn 93.3 % и Sp 80 %. AUC коефициентът е висок 0.880 Това ни дава основание да смятаме, че тя като „показател“ може правилно да разграничи овариална киста от ОК при жени в пременопауза в 88.0 %.

Статистическата значимост на вероятността и в трите логистични модела е 0.000 - по-малка от нивото на значимост 0.05. Това дава основание да смятаме, че тя може да се използва като **диагностичен** тест в предоперативното разграничаване на овариална киста от ОК.

Високата диагностична Sn, която определихме на „показателя“ вероятност \hat{p} и при трите логистични модела, ни дава основание да смятаме, че тя може да се използва и като **скринингов** тест при безсимптомни лица или пациентки с риск.

Всяка една от изработените от нас формули, може да бъде приложена в компютърна програма и прилагайки получените стойности от концентрациите на всеки един от петте плазмени протеина, да бъде получен резултат за „вероятност“ даден овариален тумор да бъде диференциран като овариална киста или овариален карцином. Това би могло да бъде използвано в предоперативната диагностика, след проведен гинекологичен преглед и установен овариален тумор.

Тези тестове са лесно достъпни, неинвазивни, адаптивни за по-голямата част от анализаторите, с които работим в клиничната лаборатория, могат рутинно да бъдат изследвани и са икономически изгодни.

Смятаме, че изследванията и резултатите от този дисертационен труд биха подпомогнали диагностицирането на рака на яйчниците, за да подобрят неговото откриване и по този начин да се повиши преживяемостта на пациентките с това коварно заболяване.

ИЗВОДИ

1. При здрави жени концентрациите на петте протеина са в референтни граници. Възрастта и менопаузалния статус **не** са фактори, които биха оказали влияние или биха довели до промяна в плазмените концентрации на измерваните протеини при жени без доказан овариален тумор.

2. При наличието на овариален тумор, настъпват статистически значими промени в нивата на петте наблюдавани серумни белтъка. Концентрациите на TTR, TFR и ApoA1LP се понижават, а концентрациите на CA125 и β_2 MG се повишават.

3. При жените с овариални тумори менопаузалния статус е фактор, който влияе на концентрацията на определяните от нас биомаркери.

а/ Нивата на TTR, TFR и ApoA1LP са по-ниски при жени с овариален тумор в менопауза от тези на жените в пременопауза. Нивата на CA125 и β_2 MG са значително по-високи при жени с овариален тумор в менопауза от тези на жени в пременопауза.

б/ При жените в менопауза с овариален тумор нивата на TTR, CA 125 и β_2 MG са извън референтните граници, докато при жените в пременопауза с овариален тумор само нивата на CA125 са извън референтния ранг.

4. Установихме, че диагностичната способност на транстиретин, CA125 и β_2 MG е сравнително добра – те могат правилно да разграничат пациентки с овариален тумор от жени без овариален тумор в 69% и според нас тези показатели могат да се използват като **диагностични** тестове при наличие на овариален тумор.

5. Сравнявайки двете подгрупи - жени с ОК и жени с овариални кисти, установихме, че :

а/ При пациентките с ОК нивата на TTR, CA125 и β_2 MG са извън референтните граници, докато в групата на жените с овариални кисти само концентрацията на CA125 е извън референтните стойности.

б/ Настъпват статистически значими различия в концентрациите и на петте протеина. Нивата на TTR, TFR и АпоА1LP са значително по-ниски при жените с ОК, в сравнение с нивата им при жени с овариални кисти. CA125 и β_2 MG са със значително по-високи концентрации в групата на пациентките с ОК, в сравнение с пациентките с овариални кисти.

6. Сравнявайки жените в менопауза и пременопауза с ОК установихме, че:

а/ При менопаузалните жени отклонения в референтните стойности има при TTR, TFR, CA125 и β_2 MG, докато при пременопаузалните жени с ОК извън референтния ранг са TTR и CA125.

б/ Настъпват статистически значими промени в концентрациите на TFR и β_2 MG.

в/ концентрациите на TTR, TFR и АпоА1LP са по-ниски, а концентрациите на CA125 и β_2 MG са по-високи при жените в менопауза с ОК в сравнение с жените в пременопауза с ОК.

7. Сравнявайки жените в менопауза и пременопауза с овариални кисти, установихме, че:

а/ и при двете групи пациентки, отклонения в референтните стойности има само в стойностите на CA125.

б/ настъпват статистически значими промени в концентрациите на CA125 и β_2 MG.

в/ концентрациите на TFR и CA125 са по-ниски, а концентрациите на TTR и β_2 MG са по-високи при жените в менопауза с овариални кисти в сравнение с жените в пременопауза с овариални кисти. Нивата на АроА1 LP са почти еднакви при наличие на овариална киста, без значение от менопаузалния статус.

8. Установихме, че промените, които настъпват в нивата на биомаркерите при наличието на ОК, не зависят от стадия на карцинома.

9. Установихме, че диагностичната способност на петте протеина за разграничаване на ОК от овариална киста е сравнително добра ($AUC \geq 0.666$). Високата диагностична $Sp (\geq 61.7 \%)$ на четири от протеините: CA125, β_2 MG, TFR и TTR ни дават основание да смятаме, че тези показатели могат да се използват като диагностични тестове за отдиференциране на ОК от овариална киста.

Високата диагностична $Sn (> 73 \%)$ на петте протеина ни дава основание да смятаме, че те могат да бъдат използвани и като скриниращи тестове за доказване на ОК.

Смятаме, че те могат правилно да разграничат ОК от овариална киста в 66.6 % и могат да бъдат използвани в предоперативната диагностика.

10. Според създадените логистични модели определихме каква е вероятността даден овариален тумор да бъде овариална киста при: жени в менопауза, жени в пременопауза, жени без определяне на менопаузален статус.

ПРИНОСИ

I. Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България е осъществено проучване и анализ на промените в концентрациите на пет протеина – TTR, TFR, ApoA1LP, CA125 и β_2 MG при жени с овариални тумори.

2. За първи път в България е осъществено проучване и анализ на промените в концентрациите на петте биомаркера и техните възможности за разграничаването на доброкачествени от злокачествени овариални тумори.

3. За първи път в България се прави опит за определяне на прагови стойности на нивата на петте серумни белтъка:

а/ като предсказващи овариален тумор.

б/ като разграничаващи доброкачествени от злокачествени овариални тумори.

3. За първи път в България е използвана адекватна система от статистически методи за комплексен анализ и моделиране на връзки на биомаркерите:

а/ с оглед на тяхната диагностична стойност при определяне на риск от овариален тумор.

б/ с оглед тяхното прилагане в предоперативната диагностика за разграничаване на ОК от овариална киста.

II. Приноси с научно-приложен и потвърдителен анализ

1. Анализирани са значителна по обем литература по темата, потвърждаваща актуалността на проблема и доказваща необходимостта от ефективни програми за ранно откриване на ОК.

2. Анализирани са информативната стойност и диагностичните възможности на биомаркерите при наличието на овариален тумор и в предоперативната диференциална диагноза на ОК и доброкачествените овариални тумори.

2. Потвърдиха се настъпващите промени в концентрациите на петте серумни белтъка при жени с ОК, залегнали в признатия от FDA OVA1 тест, а именно:

а/ понижаване на концентрацията на транстиретин, трансферин и АпоА1липопротеин.

б/ повишаване концентрацията на СА125 и β_2 MG.

3. Проучена е зависимостта между стойностите на биомаркерите и менопаузалния статус и се потвърди ролята на менопаузалния статус като фактор, влияещ върху промените в нивата на петте биомаркера при жените с ОК.

5. Създаден е софтуерен продукт - формула за:

а/ вероятност в % за наличие на овариален тумор според получени стойности на концентрациите на транстиретин и СА125.

б/ вероятността в % диагностициран вече овариален тумор да бъде доброкачествен.

6. Нашите резултати могат да послужат като информационна база за оптимизиране на диагностичния процес при пациентки с овариален тумор, с оглед ранното откриване на карцином на яйчника.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Логистични модели

1. Логистичен модел за вероятност за наличие на туморно образуване на яйчника спрямо стойностите на транстиретин и СА125.

$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-1.309 - 0.019 \cdot X_1 + 0.046 \cdot X_2)}}$$

където: транстиретин (X_1)

СА125 (X_2)

2. Логистичен модел за вероятност за наличие на овариална киста при жени в менопауза:

$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-5.398 + 0.002X_1 + 3.212X_2 - 0.010X_3 + 0.193X_4 - 0.126X_5)}}$$

където: транстиретин (X_1)

Аро А1 липопротеин (X_2)

СА125 (X_3)

TFR (X_4)

β_2 MG (X_5)

3. Логистичен модел за вероятност за наличие на овариална киста при жени с овариален тумор без значение от менопаузалния статус

$$\hat{p} = \frac{1}{1 + e^{-(-2.846 - 0.002 + 2.616X_2 - 0.012X_3 + 0.481X_4 - 0.394X_5)}}$$

където: транстиретин (X_1)

Аро А1 липопротеин (X_2)

СА125 (X_3)

TFR (X_4)

β_2 MG (X_5)

ПУБЛИКАЦИИ И НАУЧНИ СЪОБЩЕНИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

I. Публикации свързани с дисертационния труд:

1. **Racheva, V.Z.**, Ruseva, A.L., Yordanov, A.D. *The role of five plasma proteins in the diagnosis of ovarian tumors*. Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche, 2023, 182(4): 222-230; ISSN:0393-3660; Web of Science, Scopus
2. **Racheva, V.Z.**, Ruseva, A.L., Gorcheva, Z.V., Yordanov, A.D. *The role of β 2 microglobulin, transferin and CA125 in the diagnosis of women with ovarian tumors*. Gazzetta Medica Italiana Archivio per le Scienze Mediche, **in press**; ISSN:0393-3660; Web of Science, Scopus
3. **V. Racheva**, A. Ruseva, S. Mateva, I. Malkodanski. *The Role of Three Plasma Proteins in the Diagnosis of Ovarian Tumors*. Journal of Biomedical and Clinical Research. 2022, 15(1): 41-46; ISSN: 1313-6917; Web of Science (CABI)

II. Участия в научноизследователски проекти в МУ Плевен, свързани с дисертационния труд:

1. Промяна в нивата на някои плазмени белтъци при жени с овариални тумори.

III. Участия в научни форуми в България:

1. Постер на тема „Промяна в концентрациите на пет плазмени протеина при жени с овариални тумори“ на XIV Национална конференция по клинична лаборатория 14-16.10.2022 г.