

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ“ –
ВАРНА
ФАКУЛТЕТ ПО МЕДИЦИНА
КАТЕДРА ПЕДИАТРИЯ**

Д-р Вилхелм Русланов Младенов

**ЯЙЧНИКОВА ПОЛИКИСТОЗА В ЮНОШЕСКА ВЪЗРАСТ - СЪВРЕМЕННИ
АСПЕКТИ И НАСОКИ ЗА ДИАГНОСТИКА**

АВТОРЕФЕРАТ

**НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА
СТЕПЕН „ДОКТОР“**

Научна специалност „Педиатрия“

**Научен ръководител:
Проф. д-р Виолета Михова Йотова, д.м.н.**

ВАРНА, 2026 г.

Дисертационният труд съдържа общо общо 173 страници, онагледени с 25 таблици и 16 фигури. Библиографията съдържа 180 литературни източника, от тях 4 на кирилица и 176 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, приет и насочен за защита пред научно жури от Катедрен съвет към Катедра Педиатрия на МУ „Проф. д-р Параскев Стоянов“ – Варна на 08.07.2026 г.

Научно жури:

Председател: Проф. д-р Емил Георгиев Ковачев, д.м.н., Медицински университет - Варна

Външни членове:

Доц. д-р Чайка Кирилова Петрова, д.м., Медицински университет - Плевен

Доц. д-р Ралица Николаева Робева, д.м., Медицински университет - София

Доц. д-р Нарцис Нисим Калева-Ходжева, д.м., Медицински университет - Пловдив

Вътрешни членове:

Проф. д-р Емил Георгиев Ковачев, д.м.н., Медицински университет – Варна

Проф. д-р Димитричка Дучева Близнакова, д.м., Медицински университет – Варна

Резервни членове:

Доц. д-р Маргарита Алексиева Аршинкова, д.м., Медицински университет – София

Доц. д-р Красимира Иванова Колева, д.м., Медицински университет – Варна

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на открито заседание на научното жури, което ще се проведе на 20.10.2026 г. от 13 ч. в УМБАЛ „Света Марина“, ет. 5, зала 501.

Материалите по защитата са на разположение в Научен отдел на Медицински университет – Варна и са публикувани на страницата на Медицински университет – Варна.

СЪДЪРЖАНИЕ

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ.....	5
ЧАСТ I. ВЪВЕДЕНИЕ.....	7
ЧАСТ II. ПРЕДПОСТАВКИ, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	9
ЧАСТ III. ДИЗАЙН, УЧАСТНИЦИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО.....	11
1. Дизайн и участници в проучването.....	11
2. Методи на проучването.....	13
3. Медико-статистическа обработка на данните.....	19
ЧАСТ IV. РЕЗУЛТАТИ.....	22
1. Обща характеристика на участниците в проучването.....	22
2. Антропометрична характеристика на участниците.....	23
3. Клинични характеристики и прояви на хиперандрогенизъм.....	24
4. Хормонални профили на участниците.....	29
5. Метаболитни и сърдечно-съдови показатели на участниците.....	35
6. Ултразвуково изследване на яйчниците.....	45
7. Резултати от изследване на избрани микроРНК-и (miRNA).....	46
ЧАСТ V. ОБСЪЖДАНЕ.....	54
1. Характеристика на участниците.....	54
2. Наднормено тегло и затлъстяване.....	55
3. Прояви на клиничен хиперандрогенизъм и менструални нарушения.....	56
4. Хормонални резултати при участниците.....	58
5. Кардио-метаболитни нарушения при участниците.....	65
6. Поликистична морфология на яйчниците (ПКМЯ).....	74
7. МикроРНКи (miRNA).....	75

ЧАСТ VI. ОСНОВНИ ИЗВОДИ.....	80
ЧАСТ VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	83
ЧАСТ VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ЧАСТ IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	85
БЛАГОДАРНОСТИ.....	87

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

17-OHP – 17-хидроксипрогестерон

AMH – антимюлеров хормон

AN – acanthosis nigricans

AUC – площ под кривата

CRP – С-реактивен протеин

DHEA-S – дехидроепиандростерон сулфат

FAI – индекс на свободни андрогени (free androgen index)

FGS – Ferriman-Gallwey Score

FSH – фоликулостимулиращ хормон

LC-MS/MS – течна хроматография - тандемна масспектрометрия

LH – лутеинизиращ хормон

MiRNA – микроРНК(и)

RIA – радиоимунен анализ

ROC - receiver operating characteristic (работна характеристика на приемника)

SD – стандартно отклонение

SHBG – глобулин, свързващ половите хормони (sex hormone binding globulin)

A4 – андростендион

АН – артериално налягане

АХ – артериална хипертония

ВНХ – вродена надбъбречна хиперплазия

ДАН – диастолично артериално налягане

Е – естрадиол

ЗК – група на здрави контроли

И – инсулин

ИР – инсулинова резистентност

ИТМ – индекс на телесна маса

КГ – кръвна глюкоза

МС – метаболитен синдром

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ – нарушен глюкозен толеранс

НТ – наднормено тегло

ОДЯ – обем на десен яйчник

ОЛЯ – обем на ляв яйчник

ОМ – олигоменорея

ОТ – обиколка на талията

ОЯО – общ яйчников обем

ПКМЯ – поликистична морфология на яйчниците

САН – систолно артериално налягане

СПЯ – синдром на поликистоза на яйчниците

СС – сърдечно-съдов

ССЗ – сърдечно-съдови заболявания

ССР – сърдечно-съдов риск

Т – тестостерон

Т2ЗД – тип 2 захарен диабет

ТГ – триглицериди

УЗ – ултразвук, ултразвуков

Х – общ холестерол

ХА – хиперандрогенизъм

ХАК – група на контроли с идиопатичен хиперандрогенизъм

ХГ – хипергликемия на гладно

ХИ – хиперинсулинемия на гладно

ЧАСТ I. ВЪВЕДЕНИЕ

Синдромът на поликистоза на яйчниците (СПЯ) е едно от най-честите ендокринни нарушения и най-честото хиперандрогенно заболяване при жени в детеродна възраст. От първото му описание в научната литература през 1935 г. от американските гинеколози Щайн и Льовентал до днес, интересът към заболяването и свързаните с него коморбидности и усложнения, чието начало често е още в юношеска възраст, остава изключително голям.

Въпреки високата честота на СПЯ, неговата етиология и патофизиология все още не са напълно изяснени. Невроендокринни нарушения, водещи до повишени нива на лутеинизиращия хормон (LH), тъканно-селективна инсулинова резистентност и хиперинсулинемия, генетични и епигенетични фактори, както и дисбаланс между андрогени, фоликулостимулиращ хормон (FSH) и антимюлеров хормон (AMH), взаимно се допълват и оформят самоподдържащ се порочен кръг.

Клиничната картина на СПЯ се променя с възрастта — от предимно овулаторна дисфункция и хиперандрогенизъм в юношеството, често съпроводени от затлъстяване и метаболитни нарушения, до предимно метаболитно разстройство в зряла възраст, свързано със затлъстяване, инсулинова резистентност, нарушен глюкозен и липиден метаболизъм и повишен сърдечно-съдов риск. Поради това, от няколко месеца група от изявени специалисти в областта на СПЯ предприеха многоетапен процес за приемане на ново име на синдрома, отразяващо мултисистемните му характеристики. Предложението на учените е наименованието на заболяването да се промени на полиендокринен метаболитен овариален синдром (PMOS). Преминаването към новото наименование трябва да се осъществи за период от 3 години.

СПЯ е значима причина и за репродуктивни проблеми — нарушен фертилитет, усложнения на бременността, преждевременни раждания и спонтанни аборти. При жените със СПЯ е повишен и рискът от някои карциноми (ендометриален, овариален). Освен това психичните разстройства — тревожност, депресия, емоционален дистрес, хранителни разстройства — са чести сред пациентките. Всички тези проблеми водят до сериозно нарушение на качеството на живот, което налага ранна диагностика на заболяването още в

юношеска възраст и своевременно предприемане на мерки за превенция на бъдещите усложнения.

Диагностичните критерии за СПЯ при зрели жени са добре установени, но не могат да се прилагат директно за юношеската възраст. Олигоменореята и клиничните прояви на хиперандрогенизъм (хирзутизъм, акне) са физиологични явления, характерни за пубертетния преход, а увеличеният обем на яйчниците и мултикистичният им вид при ехографско изследване са нормална находка при момичета в тази възраст. Тези особености създават предпоставки както за късна и неточна диагноза, така и за свръхдиагностициране. Затова през последните години се полагат сериозни усилия за откриване на нови биомаркери с висока специфичност и чувствителност, които биха улеснили изясняването на патогенетичния механизъм на СПЯ, по-ранното поставяне на диагнозата и мониторирането на лечението.

СПЯ остава едно от сложните и многостранни предизвикателства в съвременната детска ендокринология. Растящата му честота, съчетана с дългосрочните репродуктивни, метаболитни и психо-емоционални последици, превръща СПЯ от чисто репродуктивно заболяване в значим медико-социален проблем. Актуалността на темата се определя от необходимостта от обогатяване на диагностичните критерии в юношеска възраст с нови, високоспецифични биомаркери. Чрез своевременното диагностициране и прилагането на персонализирани, ранни интервенции може да се осигури ефективна превенция на късните усложнения и да се подобри трайно качеството на живот на пациентките.

ЧАСТ II. ПРЕДПОСТАВКИ, ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Предпоставки за избор на темата

1. Ранното откриване (диагноза) може да послужи за превенция и ранно лечение на СПЯ и свързаните с него придружаващи заболявания и усложнения.
2. Настоящите методи за диагностика на СПЯ, особено в юношеска възраст, са несъвършени и недостатъчно категорични и създават предпоставки за свръхдиагностициране или закъсняло поставяне на диагнозата.
3. Някои от критериите за СПЯ се припокриват с физиологични феномени при момичета в пубертетна възраст, както и с прояви на други заболявания, протичащи с хиперандрогенизъм.
4. Липсват проучвания сред подрастващи в България относно идентифициране на нови биомаркери за диагностициране на СПЯ, както и валидиране на пригодността им за практиката.
5. Малък брой проучвания в световен мащаб сред подрастващи относно пригодността на перспективните нови диагностични биомаркери за СПЯ.
6. Усъвършенстване на клиничната лаборатория през последните години, което позволява изследването на нови биомаркери.
7. Необходимост от създаване на национален консенсус за диагностика и лечение на СПЯ при подрастващи.

Цел

Целта на настоящият научен труд е подобряване и обогатяване на диагностичния набор при пациенти в юношеска възраст със СПЯ.

Задачи

1. Да се оцени клиничния и лабораторен профил на пациентки в юношеска възраст със СПЯ.
2. Да се изследват някои нови потенциални диагностични биомаркери за СПЯ в юношеска възраст (AMH, FAI) и да се определят най-специфичните им и чувствителни за диагностициране на СПЯ прагови (cut-off) стойности.

3. Да се установят корелации между хормоналните биомаркери, настоящите диагностични критерии за СПЯ в юношеска възраст (хиперандрогенизъм, поликистична морфология на яйчниците), както и с метаболитните отклонения, СС нарушения, наличието на затлъстяване.
4. Да се определи честотата на метаболитни и СС нарушения (дислипидемия, нарушен гликемичен контрол, инсулинова резистентност, хиперинсулинизъм, артериална хипертония) при пациентки със СПЯ в юношеска възраст.
5. Да се оцени чувствителността и специфичността на избрани miRNA като диагностичен маркер за СПЯ в юношеска възраст и да се установят корелации с хиперандрогенизма, метаболитните и СС нарушения, наличието на затлъстяване, поликистичната морфология на яйчниците.

ЧАСТ III. ДИЗАЙН, УЧАСТНИЦИ И МЕТОДИ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

1. Дизайн и участници в проучването

Научното изследване е тип случай-контрола. Таргет за участие в него са девойки на възраст до 18 г. с диагноза СПЯ, поставена според критериите на Международния Консорциум по Детска Ендокринология (ISPE) и съответстваща по ИТМ и възраст контролна група от здрави момичета. Участничките са набирани сред хоспитализирани девойки по повод на СПЯ или други състояния в Първа детска клиника за периода от 01.11.2021 г. до 01.12.2023 г., след получено разрешение от КЕНИ и подписване на информирано съгласие.

1.1. Включващи критерии за участие за девойки със СПЯ:

1.1.1 Девойки на възраст до 18 години, покриващи критериите за СПЯ при подрастващи според Международния Консорциум по Детска Ендокринология (ISPE):

а. Нередовна менструация/олигоменорея;

б. Хиперандрогенизъм:

- Биохимичен – ниво на Т $\geq 1,7$ nmol/l и/или FAI >5 ;
- Клиничен.

1.1.2. Две и повече години след менархе;

1.1.3. Липса на други причини за хиперандрогения и менструални нарушения;

1.1.4. Подписано информирано съгласие от родител и от пациент, след етично разрешение от КЕНИ.

1.2. Изключващи критерии:

1.2.1. По-малко от 2 години след менархе;

1.2.2. Други уточнени причини за хиперандрогенизъм;

1.2.3. Други ендокринни причини за менструални нарушения;

1.2.4. Тежки хронични заболявания или заболявания, които могат да се отразят на биохимичния хиперандрогенизъм (напр. тип 1 ЗД, синдром на Кушинг и др.);

1.2.5. Прием на противозачатъчни и други хормонални препарати (с изключение на тиреоидни хормони) в предходните 3 месеца;

1.2.6. Отказ от подписване на информирано съгласие.

2. Включващи критерии за група на здравите контроли:

2.1. Възраст до 18 години;

2.2. Сходни на изследваната група възраст и ИТМ;

2.3. Две и повече години след менархе;

2.4. Липса на нарушения на менструалния цикъл;

2.5. Липса на хиперандрогенизъм и други ендокринни нарушения;

2.6. Липсващ прием на противозачатъчни и други хормонални препарати (с изключение на тиреоидни хормони) в предходните 3 месеца;

2.7. Подписано информирано съгласие от родител и от пациент, след етично разрешение от КЕНИ.

При част от момичетата, включени в групата на здравите контроли, в хода на изследванията се установи биохимичен хиперандрогенизъм, без да се намерят ендокринни причини за него. Тъй като девойките нямаха менструални нарушения и не можеха да бъдат включени към групата на участничките със СПЯ решихме да формираме трета контролна група на момичета с идиопатичен хиперандрогенизъм.

3. Включващи критерии за групата на момичета с идиопатичен хиперандрогенизъм:

2.1. Възраст до 18 години;

2.2. Повече от 2 години след менархе;

2.3. Данни за биохимичен хиперандрогенизъм;

2.4. Липса на менструални нарушения;

2.5. Подписано информирано съгласие от родител и от пациент.

Протоколът беше одобрен от Комисията по етика на научните изследвания (КЕНИ) към Медицински Университет – Варна с решение № 107 от 28.10.2021 г., преди започване на включване на участниците.

Изследването на микроРНКи беше финансирано чрез проект № 21019

г. към Фонд „Наука“ на Медицински Университет – Варна.

Участието на всички момичета в проучването беше напълно доброволно, и всеки участник беше свободен да се оттегли по всяко време без да посочва конкретна причина. Всички участници получиха устна и писмена информация за проучването и предстоящите процедури, имаха възможност свободно да задават въпроси, на които изчерпателно беше отговорено от изследователя. За всеки участник всички процедури по проучването започваха след подписването на Информирано съгласие.

С цел спазване на етичните изисквания за анонимност при обработка на данните, всеки участник получи индивидуален и анонимен код за участие.

2. Методи на проучването

2.1. Анкетен метод

При посещението си в Първа детска клиника на УМБАЛ „Света Марина“ – Варна, с всеки участник, в присъствието на родител беше проведено интервю, включващо подробно събиране на анамнестични данни относно:

- анамнеза на бременността и раждането;
- перинатална анамнеза за доношеност, тегло и дължина при раждането и послеродов период;
- фамилна анамнеза за социално-значими заболявания, хиперандрогенни състояния или заболявания сред родственици по първа и втора линия;
- фамилна анамнеза за репродуктивни неудачи при членове на семейството по първа и втора линия;
- анамнеза на предходни или съпътстващи хронични заболявания при участниците;
- лекарствена анамнеза за прием на медикаменти при участниците;
- анамнеза за клинични симптоми (хирзуртизъм, акне, менструални нарушения и др.), както и данни за начало и прогресия на симптомите, дата на последна редовна менструация при участниците.

2.2. Антропометрия

Всички антропометрични измервания бяха извършени сутринта в деня на изследването, от добре обучен изследовател и с едни и същи уреди.

- **Теглото (Т)** беше определяно с точност до 0,1 kg посредством калибрирана дигитална везна SECA 861 (SECA Ltd, Hamburg, Germany), като всеки пациент беше претеглен без обувки и с леко облекло.
- **Ръстът (Р)** беше определян със стандартен сертифициран и стандартизиран медицински ръстомер Harpenden 2000 (Hamburg, Germany), с точност 0,1 cm, при изправен стоеж и глава, позиционирана при хоризонтална Франкфуртска равнина, без обувки и с леко облекло.
- **Обиколката на талията (ОТ)** беше измервана с неразтеглив, еластичен метър SECA 201 (Seca Ltd., Hamburg, Germany), разположен на хоризонталната линия, разделяща дясната средна аксиларна линия между долния ръб на десето ребро и крилото на илиачната кост, с точност до 0,1 cm, след отстраняване на всички горни дрехи, при изправена позиция, в края на спокойно издишване.
- За оценка на наличието на наднормено тегло или затлъстяване бе изчислен **ИТМ** по стандартната формула $ИТМ = T (kg)/P (m)^2$. Наличието на наднормено тегло и затлъстяване се определи, прилагайки референтните стойности CDC на ИТМ за деца и юноши, в зависимост от пола и възрастта. Наднормено тегло се дефинира като $ИТМ \geq 85$ -и персентил, а затлъстяване като $ИТМ \geq 95$ -и персентил за съответния пол и възраст.

2.3. Клиничен преглед

При всички участнички се проведе пълен физикален преглед, с насочено внимание към наличието на прояви на клиничен хиперандрогенизъм като хирзутизъм, акне, косопад, силно омазняване на косата.

- За оценка на наличния хирзутизъм се приложи модифициран вариант на скалата Ferriman-Gallwey, като наличието на ≥ 8 точки съответства на наличието на клиничен хирзутизъм.

- Пубертетното развитие се определи чрез стадиране по метода на Tanner с допълнително уточняване на възрастта на настъпване на менархе.
- Артериалното налягане (АН) се измери със сфигмоманометър, с големина на маншетата, съответстваща на възрастта на пациентките. Приложи се аускултаторния метод на Korotkoff, с измерване на АН на дясната мишница на участничките, в седнало положение след 30 минути покой и среда на мишницата на нивото на сърцето (American Heart Association 2019). Измерването се извърши трикратно през 2 минути като за анализа се използва средната аритметична стойност от последните две измервания, поотделно за САН и ДАН.
- Пулсовата честота се измери на a. radialis в седнало положение на участника за 1 минута.

2.4. Лабораторни биохимични и хормонални изследвания

Биохимичните и хормоналните лабораторни показатели бяха изследвани в Централната клинична лаборатория на УМБАЛ „Св. Марина” ЕАД – гр. Варна. Всички кръвни проби бяха взети от периферна венозна кръв при стандартизирани условия – сутрин на гладно след 12 часова хранителна пауза и при максимално щадене на участниците и пациентите. Допълнително, за изследване на miRNAs се изолира серум чрез използване на вакутейнер с гел сепаратор, центрофугиран за 15 минути при 2500 G. Серумите бяха отпипетирани във вакутейнери без адитив, с последващо съхранение на материала във фризер при температура -80°C. Изследвани бяха следните **метаболитни** параметри:

- **Кръвна глюкоза** (mmol/l) - приложи се ензимен хексокиназен метод на апарат с използван биохимичен анализатор ADVIA chemistry 1800, Siemens. Референтните стойности за лабораторията са 3,3 – 5,6 mmol/l.
- **Липиден профил: общ холестерол** (mmol/l) - измери се чрез ензимно определяне с холестеролестераза, холестеролоксидаза, пероксидаза (ензимен метод CHE-CHOD-POD) и колориметрия (Trinder) с норми за лабораторията между 2,7 - 5,2 mmol/l. **Триглицеридите** (mmol/l) се изследваха посредством ензимна хидролиза с липаза и колориметрично определяне на глицерола с глицеролкиназа,

глицерофосфатоксидаза и пероксидаза (ензимен метод GPO-POD) (Trinder), с референтни стойности от 0,4 до 1,77 mmol/l. **HDL-холестерол** (mmol/l) - преципитация на LDL и VLDL и определяне на холестерола в надутаечната течност, с граници на нормалните стойности между 1,03 - 1,55 mmol/l. **LDL-холестерол** (mmol/l) - с изчисление по формулата на Friedewald, с референтна стойност за лабораторията до 2,6 mmol/l. Всички липидни показатели са анализирани на апарат с използван биохимичен анализатор ADVIA chemistry 1800, Siemens.

- **С-реактивен протеин (CRP)** (mg/l) се изследва на апарат с използван биохимичен анализатор ADVIA chemistry 1800, Siemens, с приложение на имуно-турбидиметричен анализ. Референтните стойности за лабораторията са от 0-5 mg/ml.
- **Инсулин** – използва се търговски кит (DRG Insulin Enzyme Immunoassay Kit) за количествено определяне на инсулин в човешки серум/плазма чрез сандвичен ензимен имуноанализ (ELISA). Тестът регистрира нива на инсулин между 0 и 100 μ U/ml, като чувствителността на метода се определя на 1,76 μ U/ml, с референтни стойности от 2,0-29,1 μ U/ml.
- Стойностите на кръвната глюкоза и инсулина се използваха за изчисляване на **хомеостазен модел за оценка на инсулиновата резистентност (HOMA-IR)**. За целта се приложи общоприетата формула: $\text{HOMA-IR} = [\text{кръвна глюкоза на гладно (mmol/l)} \times \text{инсулин на гладно (}\mu\text{U/ml)}] / 22,5$. Стойностите на HOMA-IR >2,6 се асоциират с наличие на инсулинова резистентност (ИР).

Хормоналните показатели също бяха изследвани сутрин на гладно, във фоликуларна фаза (между 3.–5. ден) на менструалния цикъл на участничките, а при пациентките с вторична аменорея – след 90. ден от последната менструация. Изследвани бяха следните хормони:

- **Лутенизиращ хормон (ЛХ, LH)** (IU/l) - хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,05 IU/l. Референтните стойности за теста във фоликуларна фаза са между 1,1-11,6 mIU/ml. За анализа е използван имунологичен анализатор Immulite 2000 Xpi, Siemens.

- **Фоликулостимулиращ хормон (ФСХ, FSH)** (IU/l) – хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,1 IU/l. Референтни стойности за теста във фоликуларна фаза са между 2,8-11,3 mIU/ml. За анализа е използван имунологичен анализатор Immulite 2000 Xpi, Siemens.
- **Естрадиол** (pmol/l) - хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,39 pmol/l. Референтните стойности са до 529 pmol/l. За анализа е използван имунологичен анализатор ADVIA Centaur CP, Siemens.
- **Тестостерон (Т)** (nmol/l) - хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,5 nmol/l. Референтни стойности за теста са между 0-1,38 nmol/l. За определяне е използван имунологичен анализатор Immulite 2000 Xpi, Siemens.
- **Андростендион** (nmol/l) - хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,3 nmol/l. Референтните стойности са между 1,0-11,5 nmol/l. За определяне е използван имунологичен анализатор Immulite 2000 Xpi, Siemens.
- **17-ОН–прогестерон (17ОНР)** (ng/ml): NovaTec, Germany, LOD = 0,05 ng/ml. Кръстосана реактивност: с 11-деоксикортизол (0,846 %), с прогестерон (0,590 %), с прегнелон (0,250 %), с тестостерон (0,017 %); с алдостерон, андростендион, кортизол, ДНЕА, преднизолон, холестерол: < 0,01 %. Методът е идентичен за базални или стимулирани серумни концентрации. Серумните нива на 17ОНР са отчетени в ng/ml. Референтните стойности за деца са между 0,2 - 0,9 ng/ml, а при жени във фоликуларна фаза на менструалния цикъл са между 0,2-1,3 ng/ml и между 1,0-4,5 ng/ml в лутеалната фаза на цикъла.
- **Свързващ половите хормони глобулин (SHBG)** (nmol/l) – хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,02 nmol/l. Референтните стойности за теста са между 18-144 nmol/l. За определяне е използван имунологичен анализатор Immulite 2000 Xpi, Siemens.
- **Антимюлеров хормон (АМН)** (pmol/l) - електрохемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,21 pmol/l.

Референтните стойности за теста са между 2,1-84,1 pmol/l. За определяне е използван имунологичен анализатор Cobas e 601, ROCHE.

- **Пролактин (μIU/ml)** - хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 10,6 mIU/l. Референтните стойности са между 40–530 μIU/ml. За определяне е използван имунологичен анализатор Immulite 2000 Xpi, Siemens.
- **Кортизол (nmol/l)** - хемилуминисцентен имунологичен анализ с неизотопно маркиране на антитела при LOD = 0,5 nmol/l. Референтните стойности са между 115,7–451,2 nmol/l. За определяне е използван имунологичен анализатор ADVIA Centaur CP, Siemens.
- Стойностите на Т и SHBG бяха използвани за изчисление на **индекса на свободни андрогени (FAI)** по формулата $FAI = [T \text{ (nmol/l)} / SHBG \text{ (nmol/l)}] \times 100$. Стойности на FAI над 5 се асоциират с андрогенен излишък.

2.5. Изследване на микроРНКи (miRNA)

Изследването на избрани miRNA беше извършено в лабораторията на катедра Биохимия, молекулна медицина и нутригеномика към катедра Фармация на Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“, Варна.

За извличане на шест циркулиращи miRNA от серумни проби от по 200 μl се използва комплектът NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG., Düren, Germany). След оценка на концентрацията и чистотата на RNA, се извърши синтез на cDNA върху 90 ng РНК. Този процес включваше използването на stem-loop праймери за miR-451a, miR-15a-5p, miR-320-5p, miR-28-5p, miR-103a-5p и miR-194-5p, и обратни U6 праймери като ендогенен референтен контрол чрез комплекта RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) беше използван за количествена PCR (qPCR), заедно с разредени 3 пъти cDNA шаблони, miRNA-специфични директни праймери, универсален обратен праймер и U6 директни и обратни праймери. За всички qPCR реакции се извършиха трикратни цикъла. За смекчаване на ефектите на партидите и за контролиране на експерименталната вариабилност qPCR реакциите бяха разделени на две партиди: първата партида включваше 17 проби от пациентки със СПЯ, 6 проби от здрави

контроли и 4 проби от хиперандрогенни контроли; втората партида включваше 17 проби от девойки със СПЯ, 5 проби от здрави контроли и 4 проби от хиперандрогенни контроли. За определяне на сравнителните нива на експресия на miRNA се използва методът $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Извършиха се два отделни сравнителни анализа на експресията на miRNA: здрави контроли спрямо пациентки със СПЯ и хиперандрогенни контроли спрямо момичета със СПЯ. За първото сравнение, бяха изчислени стойностите на кратната промяна на miRNA при пациенти със СПЯ, използвайки здравите контроли като референтна група. За второто сравнение, бяха изчислени стойностите на кратната промяна на miRNA при пациенти със СПЯ, като за референтна група бяха използвани хиперандрогенните контроли. За провеждане на qPCR анализи се използва системата QuantStudio 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

2.6. Ехографско изследване за наличие на ПКМЯ

При всеки участник се проведе ултразвуково изследване на яйчници и матка, с цел установяване наличието на ПКМЯ. Използва се ехограф „ALOKA Prosound SSG-3500” с трансабдоминален трансдюсер с плаваща честота от 3,5 до 6 MHz, като изследването се извърши от един и същ изследовател. Като ПКМЯ приехме наличието на увеличен с >2 SD, т.е. над 12 ml, обем на единия или двата яйчника.

2.7. Медико-статистическа обработка на данните

За обработка на данните беше използван специализиран статистически пакет за персонален компютър – SPSS for Windows, версия 25.0 (Chicago, IL, USA), GraphPad Prism версия 6.01 (GraphPad Software, Inc., Boston, MA, USA). Нивото на статистическа значимост бе възприето като стойности $p \leq 0,05$. При обработката на данните бяха приложени следните методи на анализ:

- Метод на статистическа групировка на данните – признаците са подредени според вида си във вариационни, интервални, категорийни, степенни и динамични статистически редове.
- Метод на статистическо оценяване:
 - а) точкови оценки – за изчисляване на средната аритметична величина на непрекъснати признаци;

б) интервални оценки:

- Доверителна вероятност (сигнификантност) – p . При коефициенти $p=0,95$ (95%), грешката от I род е 0,05 (5%);
- Интервали на доверителност (CI). Използвани са 95% интервали на доверителност около точковата оценка, които се интерпретират като вероятност този интервал да съдържа реалната точкова стойност в 95% от случаите.
- Графичен метод – използвани са линейни и плоскостни графични изображения и други диаграми.
- Описателен (дескриптивен) анализ - с определяне мерки за централна тенденция, мерки за разсейване на разпределението.
- Вариационен анализ - при сравняване на непрекъснати променливи са използвани анализи на независими подгрупи - t -тест на Student-Fisher при независими извадки, а при множествени сравнения на признаци с няколко категории е правена корекция на стойността на p по Bonferroni според броя на сравненията (ANOVA тест).
- Непараметричен анализ – при анализ на категориите признаци се използва критерий χ^2 (хи-квадрат) по Pearson. За някои сравнения се приложиха Mann-Whitney и Kolmogorov-Smirnov непараметрични тестове, които имат по-голяма статистическа мощ.
- Корелационен анализ – определени са еднопроменливи коефициенти на линейна корелация по Pearson и на Spearman при неправилно разпределение. При оценка на някои признаци е използван и парциален множествен корелационен анализ, където при оценка на връзката между две променливи е отчетено влиянието и на други фактори. Корелационният коефициент r може да приема стойности между 0 и -1 при обратно пропорционална връзка и между 0 и +1 при наличието на права асоциация. Силата на взаимовръзката между два признака се определя от стойността на коефициента на корелация r :
 - при $r < 0,30$ – слаба корелация
 - при r между 0,30 и 0,50 – умерена корелация

- при r между 0,50 и 0,70 – значителна корелация
 - при r между 0,70 и 0,90 – силна корелация
 - при $r > 0,90$ – много силна корелация
- **Линеен регресионен анализ** – за комплексна оценка на независимия ефект на отделни признаци върху дадена непрекъсната променлива се приложи многофакторен линеен регресионен анализ. Получените регресионни модели представят зависимата променлива като резултат от различни комбинации от независими или предикторни признаци по формулата: $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_n x_n$, където y – изследвана непрекъсната променлива β_0 – константа, наречена начална (intercept) $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ – изчислени регресионни коефициенти на променливите $x_1, x_2, \dots, x_n$ – комбинация от независими признаци, чийто ефект се изпитва. Използван е модел за обратно извеждане на незначимите променливи от регресионното уравнение, след като първоначално са включени всички променливи в регресията, с нива на значимост 0,05 за включване и 0,1 за изключване от уравнението.
 - За определяне на чувствителността и специфичността на потенциалните диагностични биомаркери за СПЯ, както и намиране на cut-off стойности се използва анализ на ROC-криви с изчисление на площта под кривата (AUC), където AUC между 0,6-0,7 означава лош модел, 0,7-0,8 – добър модел, 0,8-0,9 – много добър модел и $>0,9$ – отличен модел. За определяне на чувствителността и специфичността се използва индексът на Youden, изчислен по формулата:

$J = \text{Чувствителност} + \text{Специфичност} - 1$, където:

- **Чувствителност (Sensitivity)** = $TP / (TP + FN)$
- **Специфичност (Specificity)** = $TN / (TN + FP)$

(TP = истински положителни, FN = фалшиво отрицателни, TN = истински отрицателни, FP = фалшиво положителни). Чувствителност и специфичност между 70-80 % са приемливи, между 80-90 % - добри и >90 % - отлични.

ЧАСТ IV. РЕЗУЛТАТИ

1. Обща характеристика на участничките в проучването

След подписване на информирано съгласие и след прилагане на всички включващи и изключващи критерии за участие, в проучването бяха включени 59 участнички на възраст от 12,9 до 17,9 години.

Според дизайна на изследването всички участнички бяха разделени на три групи:

- i. Група на пациентките със СПЯ. В нея бяха включени девойки с поставена диагноза СПЯ, съгласно избраните диагностични критерии. За по-кратко, по-нататък в текста те ще бъдат отбелязвани като „пациентки“ или „СПЯ“. В тази група попаднаха 61 % от участничките ($n = 36$).
- ii. Група на здравите контроли, със сходни на пациентките възраст и ИТМ. По-нататък в текста те ще бъдат отбелязвани като „зdravi контроли“ или „ЗК“. В тази група бяха включени 25,4 % от участничките ($n = 15$).
- iii. Група на контроли с идиопатичен хиперандрогенизъм. По-нататък в текста те ще бъдат означавани като „хиперандрогенни контроли“ или „ХАК“. В тази група попаднаха 13,6 % от участничките ($n = 8$).

Средната възраст на всички участнички в проучването беше $15,8 \pm 1,3$ г., без значими разлики между групите ($p = 0,739$).

Табл. 1 Възрастова характеристика на групите

Показател	СПЯ ($n=36$)	ЗК ($n=15$)	ХАК ($n=8$)	p
Възраст (г.)	$15,9 \pm 1,5$	$15,6 \pm 1,0$	$15,8 \pm 1,1$	ns

Резултатите са представени като средна стойност $\pm SD$; ns – незначима разлика.

2. Антропометрична характеристика на участниците

При всички участници се проведеха антропометрични измервания, съгласно протокола на проучването. Между различните групи не се установиха значими разлики в антропометричните показатели, включително и параметрите за генерализирано и абдоминално затлъстяване – ИТМ и обиколка на талията (ОТ) (табл. 2).

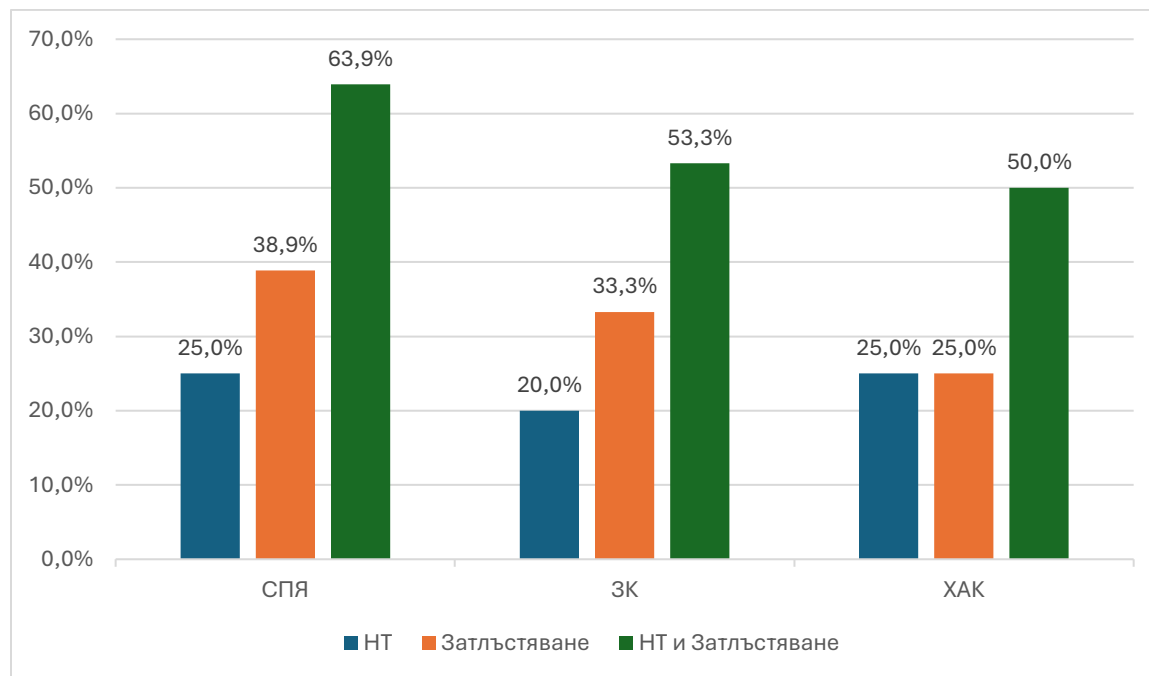
Табл. 2 Антропометрична характеристика на участниците

Показател	СПЯ (n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	p
Тегло (kg)	73,2±18,6	71,7±17,2	61,1±13,5	ns
Ръст (cm)	161,7±7,4	165,7±5,3	159,2±9,3	ns
ИТМ (кг/м ²)	28,1±7,6	26,1±5,7	24,0±4,5	ns
ОТ (cm)	86,3±17,9	83,0±17,6	78,6±9,6	ns

Резултатите са представени като средна стойност±SD; ns – незначима разлика.

Като използвахме определението на CDC за наднормено тегло и затлъстяване (НТ – ИТМ >85. персентил, затлъстяване – ИТМ >95. персентил), базирано на специфичните за пол и възраст криви за ИТМ, определихме честотата на НТ и затлъстяване в трите групи (фиг. 1).

Фиг. 1 Честота на НТ и затлъстяване при момичета със СПЯ, здрави контроли и хиперандрогенни контроли



Установихме, че 59,3 % от всички участнички са с наднормено тегло и затлъстяване, съответно 23,7 % с НТ и 35,6 % със затлъстяване, но без статистически значими разлики между трите групи ($p = 0,663$, $p = 0,926$ и $p = 0,742$). Честотата на наднормено тегло и затлъстяване при момичетата със СПЯ е 63,9 % ($n = 23$), от които 25 % са с НТ ($n = 9$) и 38,9 % със затлъстяване ($n = 14$).

3. Клинични характеристики и прояви на хиперандрогенизъм

Използвахме данните от проведения физикален преглед при всички участнички, за да оценим наличието на основните симптоми на клиничен хиперандрогенизъм. Клиничният профил на участничките от трите групи е представен в Табл. 3.

Табл. 3 Честота на хиперандрогенни симптоми и олигоаменорея при участничките от трите групи

Показател	СПЯ (n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	p
Хирзутизъм	88,9 %	20,0 %	37,5 %	<0,001
Акне	69,4 %	40,0 %	62,5 %	ns
Алоpecia	8,3 %	0,0 %	0,0 %	ns
Косопад	25,0 %	21,4 %	12,5 %	ns
Омазняване	72,2 %	46,7 %	37,5 %	ns
Олигоаменорея	100,0 %	0,0 %	0,0 %	<0,001

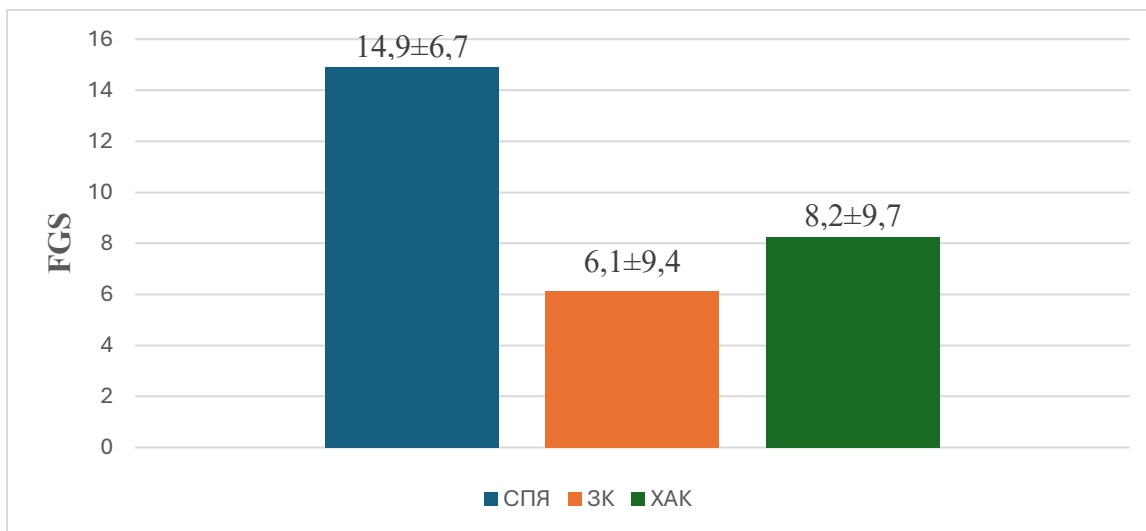
Резултатите са представени като процент; ns – незначима разлика.

Олигоаменорея (ОМ) се установи при 100 % от девойките със СПЯ и 0 % в останалите 2 групи. Този резултат се дължи на това, че ОМ е задължителен критерий за поставяне на диагноза СПЯ в юношеска възраст. Същевременно, при контролните групи включващ критерий за участие в проучването беше липсата на менструални нарушения.

От всички хиперандрогенни симптоми, единствената статистически значима разлика се установи по отношение на хирзутизма, който беше сигнификантно по-чест при девойките със СПЯ ($p < 0,001$).

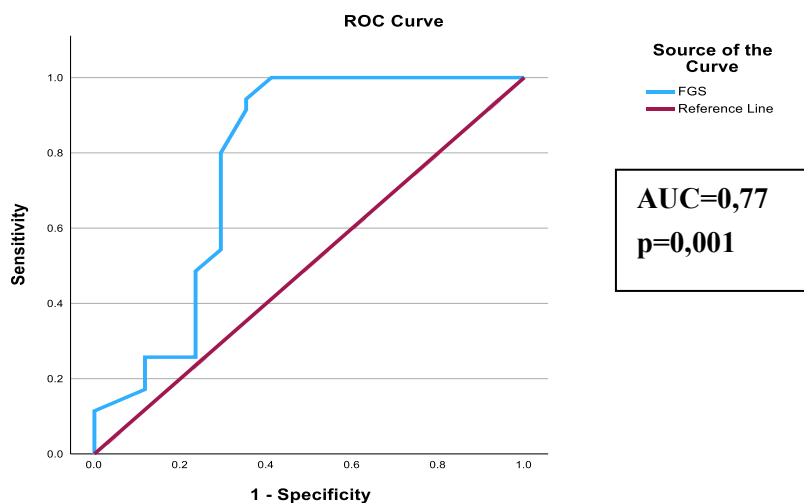
Клинично хирзутизмът беше оценен чрез модифицираната скала на Ferriman-Gallwey, като общ сбор ≥ 8 се приема за наличие на хирзутизъм. При проведения анализ се установи значимо по-висок среден FGS при девойките със СПЯ в сравнение със здравите контроли ($p < 0,05$). Не се установиха значими разлики между групата на СПЯ и ХАК, както и между ЗК и ХАК. Данните са представени на фигура 2.

Фиг. 2 Средна стойност $\pm$ SD на FGS в трите изследвани групи



За да определим чувствителността и специфичността на FGS като диагностичен маркер за СПЯ проведохме анализ на ROC крива (фиг. 3).

Фиг. 3 ROC крива за определяне на чувствителност и специфичност на FGS като диагностичен маркер за СПЯ с данни за AUC и p



Установи се AUC=0,77, отговаряща на добър модел за диагностициране на СПЯ ($p = 0,001$). След изчисление на индекса на Youden намерихме cut-off стойност от 6,0 с най-добра чувствителност и специфичност (съответно 94 % и 65 %) за диагностициране на СПЯ.

При проведения корелационен анализ в групата на СПЯ се установи права корелация между FGS и ОТ, хирзутизъм, нивото на инсулина и HOMA-IR. При отчитане на влиянието на възрастта и ИТМ се запази положителната корелация на FGS с хирзутизъм, нивото на инсулин и HOMA-IR (табл. 4).

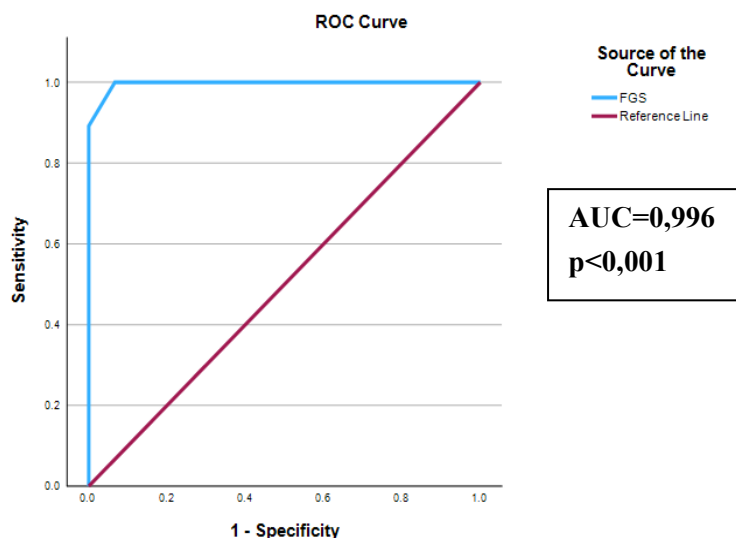
Табл. 4 Резултати за корелации на FGS

Корелация	r	p
Хирзутизъм	0,442	0,01
Инсулин	0,366	<0,05
HOMA-IR	0,391	<0,05

Резултатите са представени като корелационен коефициент r

Поради препоръките FGS да бъде съобразен с етническите особености на популацията решихме да оценим чувствителността и специфичността на приетия у нас сбор на FGS ≥ 8 като cut-off за определяне наличието на хирзутизъм при българските момичета. При проведения анализ на ROC-крива се установи, че cut-off за FGS сбор от 7,5 т. има 100 % чувствителност и 93 % специфичност за определяне наличието на хирзутизъм при девойките от нашата популация (фиг. 4).

Фиг. 4 ROC крива на FGS за определяне на чувствителност и специфичност за диференциране на хирзутизъм с данни за AUC и p



Проведе се линеен регресионен анализ за оценка на влиянието на инсулиновата резистентност (НОМА-IR) върху FGS. Резултатите показват, че моделът е статистически значим ($F = 8,584$, $p = 0,006$) и инсулиновата резистентност е статистически значим предиктор за тежестта на клиничния хирзутизъм ($R^2 = 0,206$, $p = 0,006$). Стойността на нестандартизирания коефициент $B = 0,696$ ($p = 0,006$) показва, че повишаването на НОМА-IR с 1 единица е свързано с нарастване на Ferriman-Gallwey Score (FGS) с приблизително 0,7 точки. Този резултат потвърждава патофизиологичната роля на хиперинсулинемията за стимулиране на хиперандрогенизма.

Потърсихме наличие на положителни корелации на някои антропометрични показатели (ИТМ, ОТ) и клиничните прояви на хиперандрогенизъм, но след отчитане на влиянието на възрастта и груповата принадлежност на участничките парциалният корелационен анализ установи положителна корелация единствено между ИТМ и омазняване на косата ($p < 0,05$).

4. Хормонални профили на участничките

При всички участнички се проведе анализ на панел от хормонални изследвания – LH, FSH, Estradiol (E), Testosterone (T), Androstenedione (A4), 17OHP, SHBG, AMH, Prolactin и Cortisol. Получените резултати бяха анализирани чрез тест ANOVA и корекция на стойността на p по Bonferroni. Резултатите са представени в табл. 5.

Табл. 5 Сравнение на хормоналните показатели между трите групи

Показател	СПЯ(n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	p СПЯ vs ЗК	p СПЯ vs ХАК	p ХАК vs ЗК
LH (mIU/ml)	12,1 $\pm$ 14,7	11,0 $\pm$ 14,9	7,8 $\pm$ 6,0	ns	ns	ns
FSH (mIU/ml)	5,4 $\pm$ 2,0	5,5 $\pm$ 3,3	5,3 $\pm$ 1,9	ns	ns	ns
E (pmol/l)	349,6 $\pm$ 248,9	468,9 $\pm$ 285,7	457,7 $\pm$ 361,6	ns	ns	ns
T (nmol/l)	1,7 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2	<0,001	ns	<0,001
A4 (nmol/l)	14,3 $\pm$ 5,4	6,9 $\pm$ 3,7	13,1 $\pm$ 3,5	<0,001	ns	<0,05
17OHP (nmol/l)	0,8 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,5	ns	ns	ns
SHBG (nmol/l)	29,7 $\pm$ 23,3	47,1 $\pm$ 22,0	54,5 $\pm$ 24,7	ns	<0,05	ns
AMH (pmol/l)	47,7 $\pm$ 32,4	25,9 $\pm$ 15,6	33,6 $\pm$ 28,0	<0,05	ns	ns
Prol (ng/ml)	267,5 $\pm$ 111,9	330,4 $\pm$ 258,2	276,7 $\pm$ 77,0	ns	ns	ns
Cort (nmol/l)	398,4 $\pm$ 187,7	354,1 $\pm$ 154,3	330,3 $\pm$ 74,2	ns	ns	ns
FAI	10,6 $\pm$ 12,0	2,4 $\pm$ 1,9	4,9 $\pm$ 2,5	<0,05	ns	ns

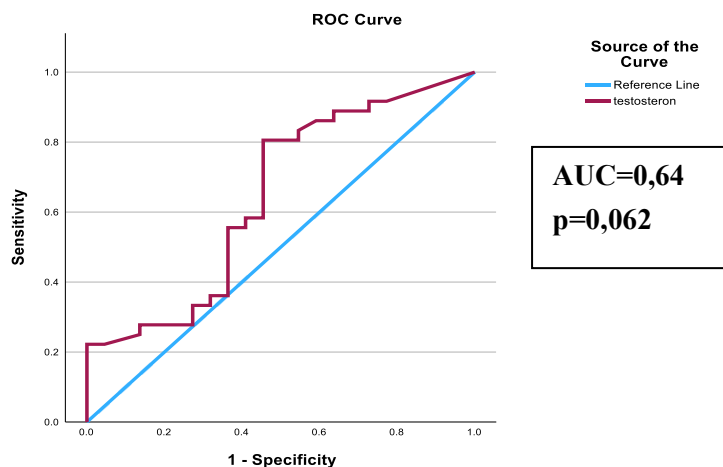
Данните са представени като средна стойност $\pm$ SD; ns – незначима разлика; Prol – Prolactin; Cort - cortisol

При проведения анализ се доказват значимо по-високи нива на T и A4 в групата на СПЯ в сравнение с групата на ЗК (всички $p < 0,001$), но без значима разлика с ХАК. SHBG е значимо по-нисък в групата на СПЯ в сравнение с ХАК ($p < 0,05$), но без статистически значима разлика с групата на ЗК. В групата на ХАК, T и A4 са значимо по-високи в сравнение с групата на ЗК ($p < 0,001$ и $0,05$). Нивото на AMH и FAI са значимо по-високи в

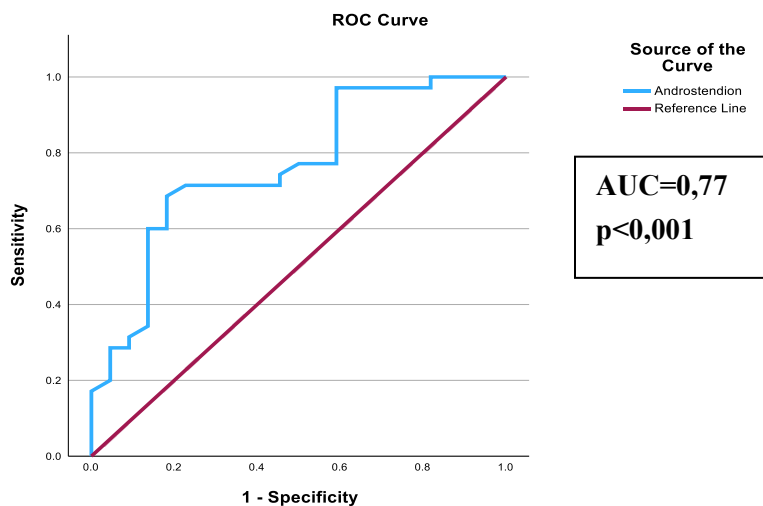
групата със СПЯ в сравнение със ЗК (всички $p < 0,05$), но не се установяват значими разлики между СПЯ и ХАК, както и между ЗК и ХАК.

За определяне на чувствителността и специфичността на показателите, които са значимо по-високи в групата на СПЯ в сравнение със ЗК, се проведе анализ на ROC криви (фиг. 5, 6, 7 и 8).

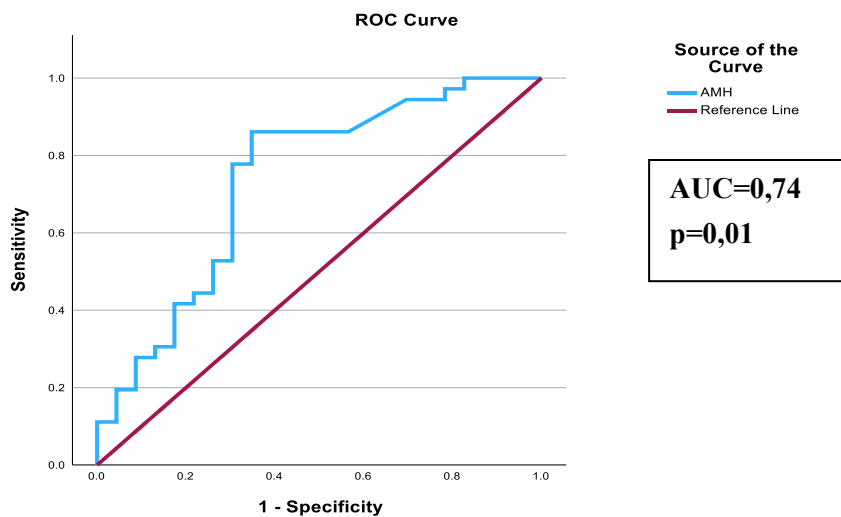
Фиг. 5 ROC крива на Т с AUC и p



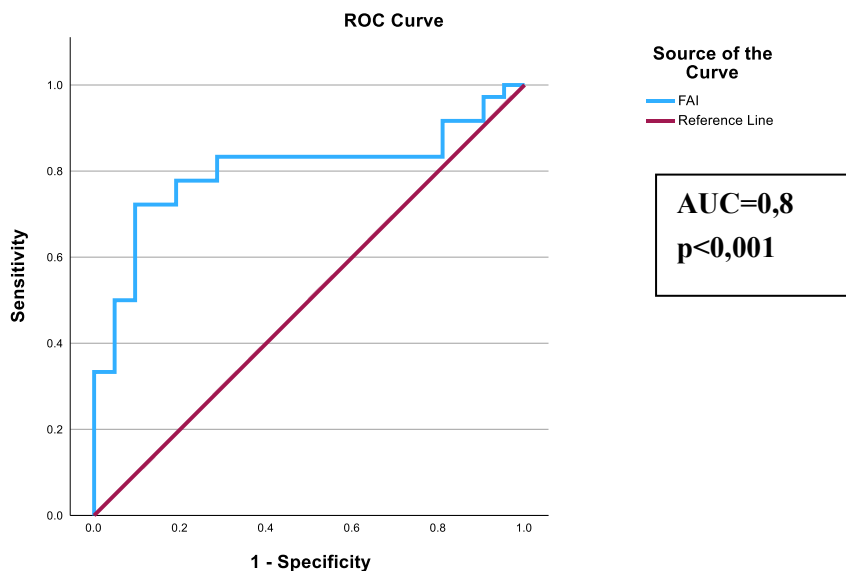
Фиг. 6 ROC крива на 4А с данни за AUC и p



Фиг. 7 ROC крива на АМН с данни за AUC и



Фиг. 8 ROC крива на FAI с данни з



От четирите показателя, А4, АМН и FAI показват добра и много добра чувствителност и специфичност за диагностициране на СПЯ, докато Т демонстрира добра чувствителност,

но лоша специфичност. След изчисление на индекса на Youden се определиха cut-off стойности за всеки от показателите (табл. 6).

Табл. 6 Cut-off стойности, чувствителност и специфичност на А4, АМН и FАI

Показател	Cut-off	Чувствителност	Специфичност
Т (nmol/l)	1,13	80,6 %	54,5 %
А4 (nmol/l)	11,6	69 %	100 %
АМН (pmol/l)	23,6	86 %	65 %
FАI	6,2	72 %	90 %

Чувствителност и специфичност между 70-80 % - приемливи, между 80-90 % - добри и > 90 % - отлични.

Както се вижда на таблица 8, cut-off стойност за А4 от 11,6 nmol/l има отлична специфичност и приемлива чувствителност; за АМН стойност от 23,6 pmol/l - добра чувствителност и приемлива специфичност; за FАI стойност от 6,2 - приемлива чувствителност и добра специфичност и за Т – cut-off от 1,13 nmol/l – добра чувствителност, но лоша специфичност за диагностициране на СПЯ.

Проведе се корелационен анализ в групата със СПЯ за откриване на корелации между трите биомаркера с най-добра чувствителност и специфичност (А4, АМН и FАI) и известните хормонални, метаболитни и морфологични отклонения, характерни за СПЯ. След отчитане на влиянието на възрастта и ИТМ се установиха корелациите, представени в табл. 7.

Табл. 7 Корелационни коефициенти r между А4, АМН и FAI и хормонални и яйчникови морфологични параметри и статистическата им значимост

	Androstenedione	АМН	FAI
Androstenedione	-	-	$r = 0,636^{***}$
FAI	$r = 0,636^{***}$	-	-
Testosterone (T)	$r = 0,630^{***}$	-	$r = 0,486^*$
SHBG	$r = -0,410^*$	-	$r = -0,602^*$
ОДЯ	-	$r = 0,519^{**}$	-
ОЛЯ	-	$r = 0,558^{**}$	-

ОДЯ – обем на десен яйчник; ОЛЯ – обем на ляв яйчник; статистическа значимост:

** $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$*

Установяват се значими правопрпорционални корелации между А4, FAI и нивото на Т, както и умерена обратнопропорционална корелация с нивото на SHBG. За АМН се установяват значими правопрпорционални корелации с обема на яйчниците, а за FAI – умерена положителна корелация с Т, умерена такава с А4 и значима отрицателна корелация с SHBG.

За изследване на връзката между трите потенциални биомаркера и корелиращите с тях показатели се проведе линеен регресионен анализ.

Регресионният анализ за изследване на връзката между А4 и FAI не установи статистически значимо влияние на FAI върху нивата на андростендион ($R^2 = 0,011$, $F = 0,377$, $p = 0,544$). Причината, вероятно е ниския афинитет на А4 към SHBG, поради което промените на FAI нямат отношение към нивата на андростендион.

Линейният регресионен анализ за изследване на връзката между серумните нива на Т и А4 показва резултат, който е статистически значим ($R^2 = 0,336$, $p < 0,001$), като нивата на Т обясняват 33,6 % от вариацията на андростендиона (табл. 8).

Табл. 8 Линеен регресионен анализ със зависима променлива Androstenedione

Модел	Нестандартизиран В	р	95,0 % CI Долна/горна гр.	VIF
(Константа)	7,127	<0,001	3,234/11,020	
Testosteron	4,235	<0,001	2,126/6,343	1,000

Насоката на зависимостта между нивата на Т и А4 е положителна. Връзката е силна и директна, тъй като в стероидогенезата при жените (в яйчниците и надбъбречните жлези) А4 е директен прекурсор на Т.

Поради установената правопрпорционална корелация между нивото на АМН и обемите на яйчниците се проведе множествен линеен регресионен анализ, за да се оцени значимостта на яйчниковия обем като предиктор на нивото на АМН. Въпреки че общият регресионен модел е статистически значим ($R^2 = 0,320$, $p = 0,01$), анализът на отделните коефициенти показва, че нито обемът на десния яйчник ($B = 1,060$, $p = 0,648$), нито обемът на левия яйчник ($B = 5,156$, $p = 0,052$) се явяват самостоятелни значими предиктори за нивата на АМН. Стойностите на VIF (1,966) изключват мултиколинеарност (табл. 9).

Табл. 9 Линеен регресионен анализ със зависима променлива АМН

Модел	Нестандартизиран В	р	95,0 % CI долна/горна гр.	VIF
(Константа)	-6,570	0,727	-45,017/31,876	
ОДЯ	1,060	0,648	-3,674/5,795	1,966
ОЛЯ	5,156	0,052	-0,041/10,354	1,966

За подобряване на статистическата значимост се създаде съвкупна променлива „Общ яйчников обем“ (сума от обемите на левия и десния яйчник, ОЯО). Проведеният линеен регресионен анализ показва, че този модел е надежден и статистически значим ($R^2 = 0,304$, $F = 12,236$, $p = 0,002$). ОЯО обяснява 30,4 % от вариацията в нивата на АМН. Нестандартизираният коефициент $B = 0,732$ ($p = 0,002$) показва, че увеличението на ОЯО с

всеки 1 cm³ е свързано с линейно покачване на стойностите на АМН с приблизително 0,73 pmol/l (табл. 10).

Табл. 10 Линеен регресионен анализ със зависима променлива АМН

Модел	Нестандартизиран В	р	95,0 % CI долна/горна гр.	VIF
(Константа)	0,732	0,962	-30,339/31,802	
ОАО	2,776	0,002	1,150/4,401	1,000

5. Метаболитни и сърдечно-съдови показатели на участничките

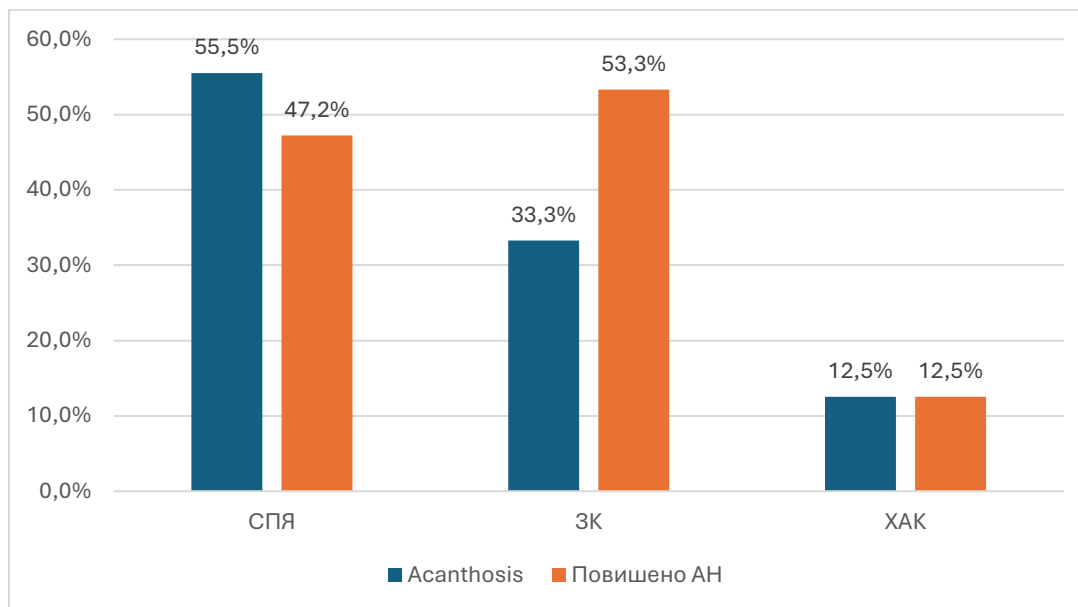
Оценихме и честотата на acanthosis nigricans и повишено артериално налягане като прояви на метаболитни и сърдечно-съдови нарушения. За дефиниране на повишено артериално налягане използвахме препоръките на Американската Академия по Педиатрия (AAP) за юноши над 13 год. възраст – систолно АН ≥ 130 mmHg и/или диастолно АН ≥ 80 mmHg. Данните са представени в табл. 11 и на фигура 9.

Табл. 11 Данни за систолно (САН) и диастолно (ДАН) артериално налягане в трите групи

Показател	СПЯ (n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	р СПЯ vs ЗК	р СПЯ vs ХАК	р ХАК vs ЗК
САН (mmHg)	117,5 $\pm$ 12,5	116,4 $\pm$ 11,2	114,1 $\pm$ 4,8	ns	ns	ns
ДАН (mmHg)	77,8 $\pm$ 8,9	77,5 $\pm$ 11,9	72,7 $\pm$ 6,5	ns	ns	ns
Високо АН	47,2 %	53,3 %	12,5 %	ns	ns	ns

Резултатите са представени като средна стойност $\pm$ SD и проценти; ns – незначима разлика.

Фиг. 9 Честота на acanthosis nigricans и повишено АН при всички участници



Общо при 44,1 % от участниците беше установена acanthosis nigricans. Най-висока беше честотата в групата със СПЯ, като разликата с останалите групи достигна статистическа значимост ($p = 0,05$). Проведохме корелационен анализ по Pearson за установяване на връзка между acanthosis nigricans, метаболитните нарушения и хиперандрогенията. Освен очакваната положителна корелация на acanthosis nigricans с НОМА-IR ($r = 0,478$, $p < 0,001$) и нивото на инсулина ($r = 0,510$, $p < 0,001$) установихме значими положителни корелации и с наличието на затлъстяване, наличието на хирзутизъм и FGS, повишено АН, хиперхолестеролемия (дефинирана като общ холестерол $\geq 5,17$ mmol/l, NHLBI Guidelines 2011), хипертриглицеридемия (дефинирана като триглицериди $\geq 1,47$ mmol/l, NHLBI Guidelines 2011) и отрицателна корелация с нивото на SHBG. Корелациите са представени в таблица 12.

Табл. 12 Резултати за корелации на acanthosis nigricans

Корелация	r	p
НОМА-IR	0,478	<0,001
Инсулин	0,510	<0,001
Затлъстяване	0,481	<0,001
Хирзутизъм	0,303	<0,05
FGS	0,289	<0,05
Повишено АН	0,312	<0,05
Хиперхолестеролемия	0,304	<0,05
Хипертриглицеридемия	0,315	<0,05
SHBG	-0,488	<0,001

Резултатите са представени като корелационен коефициент r; FGS - Ferriman-Gallwey Score; SHBG – свързващ половите хормони глобулин

Установените корелации потвърждават значението на ИР и свързаната с нея хиперинсулинемия както като фактор, потенциращ хиперандрогенизма, така и като рисков фактор за ССЗ чрез повлияване на липидните нива и АН.

Стойностите на САН и ДАН са без значими различия между трите групи. При 44,1 % от всички участнички се измери повишено АН. Въпреки разликите в честотата между трите групи не се достигна статистическа значимост ($p = 0,142$). При проведения корелационен анализ по Pearson се установи значима положителна корелация на повишеното АН, освен с acanthosis nigricans, с наличието на затлъстяване, нивото на инсулин, НОМА-IR и отрицателна корелация с нивото на SHBG. Резултатите са представени в таблица 13.

Табл. 13 Резултати за корелации на повишено АН

Корелация	r	p
Затлъстяване	0,410	0,001
НОМА-IR	0,405	0,001
Инсулин	0,421	<0,001
SHBG	-0,304	<0,05

Резултатите са представени като корелационен коефициент r

Според протокола на проучването при всички участнички се изследваха показатели на глюкозната (глюкоза, инсулин на гладно и НОМА-IR) и липидната обмяна (общ, HDL- и LDL-холестерол, триглицериди), както и CRP като маркер за СС риск. Данните за показателите на глюкозния метаболизъм са представени в табл. 14.

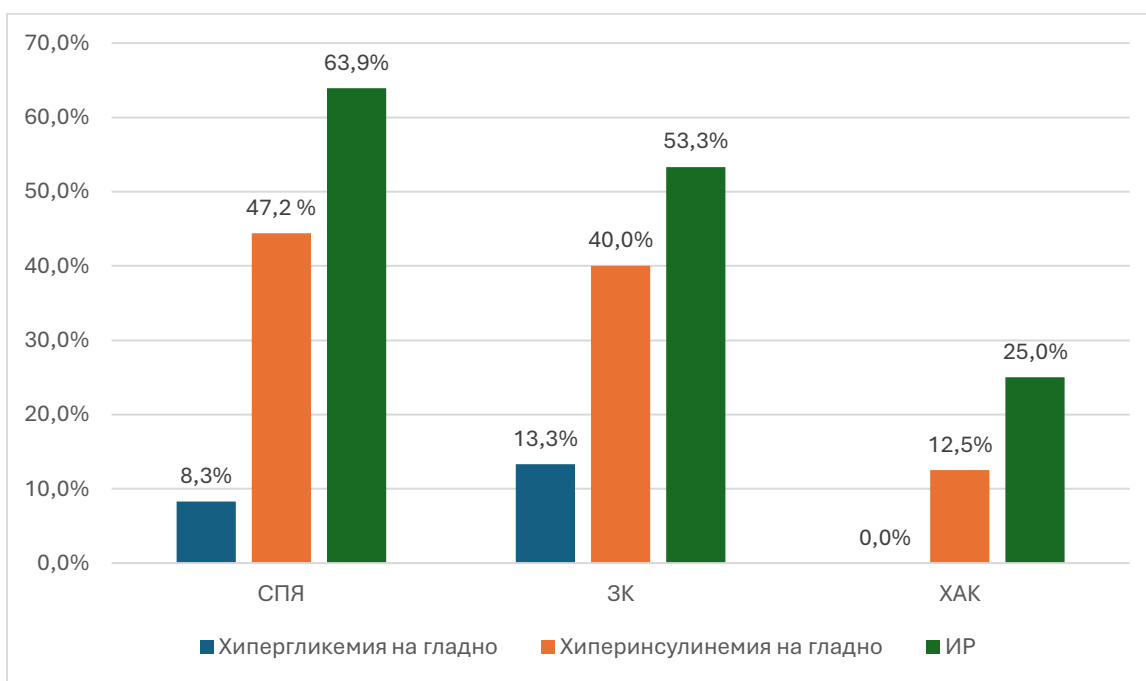
Табл. 14 Стойности на глюкоза на гладно (КГ), инсулин на гладно (И) и НОМА-IR в трите групи

Показател	СПЯ (n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	p СПЯ vs ЗК	p СПЯ vs ХАК	p ХАК vs ЗК
Глюкоза на гладно (mmol/l)	4,6±0,7	4,7±0,5	4,4±0,8	ns	ns	ns
Инсулин на гладно (μIU/ml)	22,9±17,4	17,7±12,4	10,0±6,5	ns	ns	ns
НОМА-IR	4,9±4,3	3,8±3,0	2,0±1,4	ns	ns	ns

Данните са представени като средни стойности ±SD; ns – липсва статистическа значимост.

От проведения анализ се установиха незначими разлики в средните стойности на КГ, И и НОМА-IR в трите групи. Въз основа на критериите на ADA за хипергликемия на гладно (КГ $\geq 5,6$ mmol/l и $\leq 6,9$ mmol/l) и хиперинсулинемия на гладно (И ≥ 15 μ IU/ml) се определи честотата на тези нарушения, както и на инсулиновата резистентност (НОМА-IR $\geq 2,6$) при всички участнички. Резултатите са представени на фиг. 10.

Фиг. 10 Честота на хипергликемия на гладно (ХГ), хиперинсулинемия на гладно (ХИ) и инсулинова резистентност (ИР) в трите изследвани групи



Хипергликемия на гладно $\geq 5,6$ mmol/l се установява при 8,5 % от всички участнички в проучването – 3 девойки със СПЯ и 2 от здравите контроли. ИР се намери при 55,9 % от всички участници (23 момичета със СПЯ, 8 здрави контроли и 2 хиперандрогенни контроли), а хиперинсулинемия на гладно при 40,7 % от всички девойки (16 в групата на СПЯ, 6 здрави контроли и 1 в групата на хиперандрогенните контроли). Въпреки, че разликите между групите не достигат статистическа значимост (за ХГ $p = 0,549$; за ХИ $p = 0,245$ и за ИР $p = 0,131$), ИР и хиперинсулинемията са най-чести в групата на СПЯ.

За групата на СПЯ се проведе селектирано изследване на коефициентите на корелация между показателите на глюкозната обмяна и нивата на липидите, САН, ДАН, CRP и

симптомите на хиперандрогенизъм. След отчитане на влиянието на възрастта и ИТМ се установи правопрпорционална корелация между нивото на инсулина и хипергликемията на гладно ($r = 0,617$, $p < 0,001$), правопрпорционална корелация между HOMA-IR и FGS ($r = 0,436$, $p = 0,013$), както и между HOMA-IR и хипергликемията на гладно ($r = 0,709$, $p < 0,001$).

За отчитане влиянието на нивата на андрогените върху КГ, инсулина и HOMA-IR се извърши линеен многофакторен регресионен анализ, при който не се установи значимо влияние на андрогените върху глюкозната хомеостаза. При отчитане на влиянието на показателите на глюкозната хомеостаза върху андрогените и SHBG се установи значимо влияние на HOMA-IR и нивото на инсулина върху SHBG. Линеиният регресионен анализ показва, че HOMA-IR оказва статистически значимо отрицателно влияние върху нивата на SHBG ($B = -2,036$, $p = 0,022$). Инсулиновата резистентност обяснява 14,4% от вариацията на нивата на SHBG ($R^2 = 0,144$, $p = 0,022$), като нарастването на HOMA-IR с 1,0 прогнозира спад в стойностите на SHBG с 2,036 nmol/l. Нивото на инсулина също оказва значимо отрицателно влияние върху SHBG ($B = -0,598$, $p = 0,006$), като обяснява 20 % от вариацията на нивата му ($R^2 = 0,200$, $p = 0,006$). Всяко покачване на инсулина с 1 $\mu\text{IU/ml}$ води до спад в нивото на SHBG с 0,598 nmol/l. Понижението на SHBG води до повишаване на нивото на свободния тестостерон и засилване на проявите на хиперандрогенизъм.

При всички участнички беше изследван липиден профил (общ, LDL- и HDL-холестерол и триглицериди) и CRP като маркер за сърдечно-съдов риск. Резултатите са показани в табл. 15.

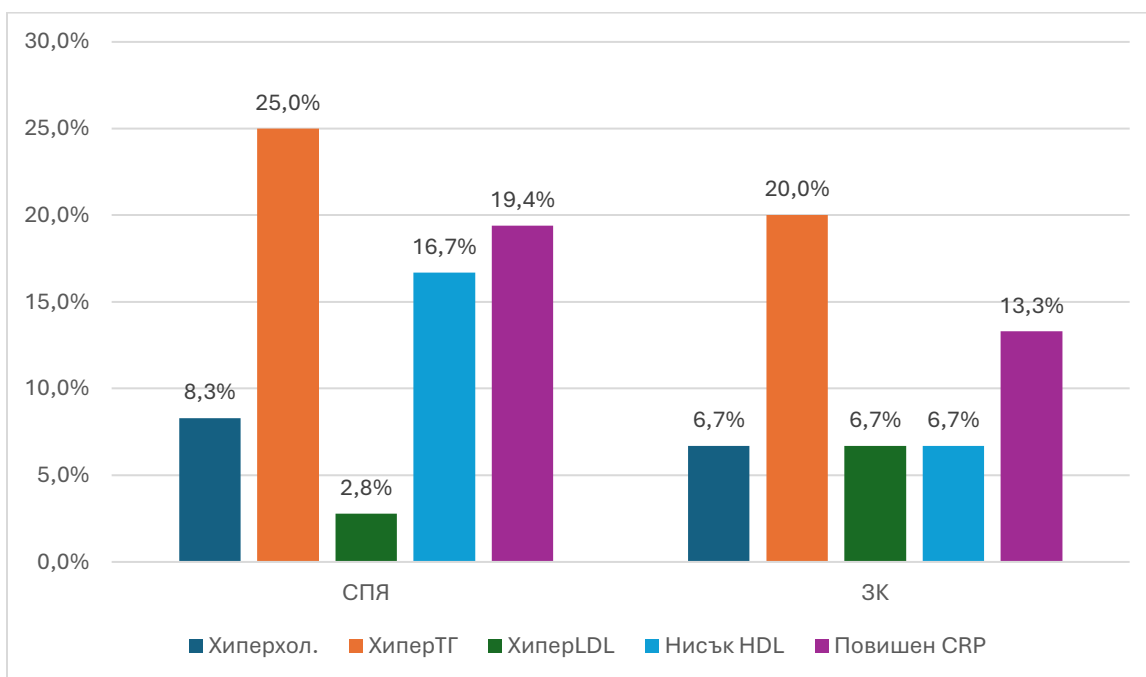
Не се установяват значими разлики в липидния профил и нивото CRP между групите. За да определим честотата на дислипидемии при всички участнички използвахме критериите за юношеска възраст (12-19 г.) на NHLBI за хиперхолестеролемия (общ холестерол $\geq 5,17$ mmol/l), хипертриглицеридемия (триглицериди $\geq 1,47$ mmol/l), повишен LDL-холестерол (LDL $\geq 3,36$ mmol/l) и нисък HDL-холестерол (HDL $\leq 1,03$ mmol/l). За повишен CRP използвахме стойността за висок СС риск за юношеска възраст (12-19 г.) – CRP $\geq 3,0$ mg/l. В групата на момичетата с идиопатичен хиперандрогенизъм не се установи нито едно от тези нарушения. Честотата на дислипидемията и повишен CRP при момичетата със СПЯ и ЗК е показана на фиг. 11.

Табл. 15 Нива на общ холестерол (X), LDL-холестерол (LDL), HDL-холестерол (HDL), триглицериди (ТГ) и С-реактивен протеин (CRP) в трите групи

Показател	СПЯ (n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	Р СПЯ vs ЗК	Р СПЯ vs ХАК	Р ХАК vs ЗК
X (mmol/l)	4,3±0,6	4,3±0,9	4,3±0,4	ns	ns	ns
LDL (mmol/l)	2,4±0,6	2,4±0,8	2,4±0,5	ns	ns	ns
HDL (mmol/l)	1,3±0,3	1,5±0,3	1,5±0,3	ns	ns	ns
ТГ (mmol/l)	1,2±0,8	0,9±0,5	0,8±0,3	ns	ns	ns
CRP (mg/l)	2,7±4,4	1,3±1,1	1,4±1,0	ns	ns	ns

Данните са представени като средни стойности ±SD; ns – липсва статистическа значимост.

Фиг. 11 Честота на хиперхолестеролемия, хипертриглицеридемия, висок LDL, нисък HDL и повишен CRP при девойки със СПЯ и здрави контроли



От всички хиперлипидемии, най-висока е честотата на хипертриглицеридемията и в двете групи. При 9 момичета със СПЯ и 3 здрави контроли се установи ниво на ТГ $\geq 1,47$ mmol/l. Въпреки, че девойките със СПЯ и хипертриглицеридемия са 3 пъти повече от здравите момичета със същото липидно нарушение, статистически разликата е незначима ($p = 0,283$). Второ по честота нарушение на липидната хомеостаза в групата на СПЯ, което се установи при 6 от участничките, е понижения HDL $\leq 1,03$ mmol/l. При здравите контроли, нисък HDL се установи при 1 момиче. Отново статистическата разлика е незначима ($p = 0,323$). Разликата в честотата на високия LDL $\geq 3,36$ mmol/l между двете групи също е незначима ($p = 0,666$) – 1 момиче със СПЯ и 1 здрава контрола. Повишен общ холестерол се установи при 3 момичета със СПЯ и 1 здрава контрола, като разликата е незначима ($p = 0,698$). Като втори по честота маркер за повишен СС риск в двете групи, след хипертриглицеридемията, се оформи повишеният CRP $\geq 3,0$ mg/l. Такъв се установи при 7 девойки със СПЯ и 2 здрави контроли, като статистическата разлика отново е незначима ($p = 0,373$).

В групата на СПЯ се потърсиха корелационни зависимости между липидните показатели, CRP, хиперандрогенията и нарушенията на глюкозния метаболизъм, след отчитане на влиянието на възрастта и ИТМ. Установените значими корелации, корелационния коефициент r и статистическата им значимост са показани в табл. 16.

Табл. 16 Корелационни коефициенти r между липидите, андрогените, инсулина и SHBG в групата на СПЯ и статистическата им значимост

	Холестерол	ТГ	LDL	HDL
Холестерол	-	$r = 0,434^*$	$r = 0,894^{***}$	-
ТГ	$r = 0,434^*$	-	-	$r = -0,465^*$
LDL	$r = 0,894^{***}$	-	-	
HDL		$r = -0,465^*$		
Инсулин	-	-	-	$r = -0,413^*$
SHBG	-	-	-	$r = 0,447^*$
Testosteron	-	-	$r = 0,472^*$	

Статистическа значимост: $^ p \leq 0,05$; $^{**} p \leq 0,01$; $^{***} p \leq 0,001$*

Установява се правопрпорционална корелация между нивата на общия холестерол и триглицеридите ($r = 0,434$, $p < 0,05$) и общия холестерол и LDL ($r = 0,894$, $p < 0,001$). ТГ показват обратнопропорционална корелация с HDL ($r = -0,465$, $p < 0,05$), а HDL – обратнопропорционална корелация с нивото на инсулина ($r = -0,413$, $p < 0,05$) и правопрпорционална с нивото на SHBG ($r = 0,447$, $p < 0,05$). От липидите, единствено при LDL се установява корелация с андрогените (тестостерона) и тя е правопрпорционална ($r = 0,472$, $p < 0,05$).

При проведения множествен регресионен анализ в групата на СПЯ не се установява влияние на андрогените върху нивата на липидите и CRP. Върху нивата на ТГ значимо положително влияние оказват показателите за генерализирано и абдоминално затлъстяване (ИТМ и ОТ), както и нивото на инсулина (табл. 17).

Табл. 17 Резултати от множествен регресионен анализ със зависима величина ТГ

	ИТМ	ОТ	Инсулин
R²	0,278	0,310	0,133
p	<0,001	<0,001	0,018
B	0,054	0,024	0,017
95,0 % CI горна/долна гр.	0,024/0,084	0,012/0,037	0,003/0,032

При множествения регресионен анализ се установи, че върху нивата на HDL положително влияние оказва SHBG, а отрицателно влияние – ИТМ, ОТ и инсулина (табл. 18).

Върху CRP положително влияние оказват ИТМ, ОТ и инсулина (таб. 19).

Табл. 18 Резултати от множествен регресионен анализ със зависима величина HDL

	ИТМ	ОТ	Инсулин	SHBG
R²	0,408	0,426	0,199	0,466
p	<0,001	<0,001	0,006	<0,001
B	-0,26	-0,11	-0,008	0,009
95,0 % CI горна/долна гр.	-0,037/-0,015	-0,016/-0,007	-0,014/-0,002	0,006/0,013

Табл. 19 Резултати от множествен регресионен анализ със зависима величина CRP

	ИТМ	ОТ	Инсулин
R²	0,193	0,180	0,281
p	0,07	0,01	<0,001
B	0,255	0,105	0,135
95,0 % CI горна/долна гр.	0,073/0,437	0,027/0,182	0,060/0,0210

6. Ултразвуково изследване на яйчниците

При участниците от трите групи се проведе ултразвуково изследване на малък таз за установяване наличието на поликистична морфология на яйчниците (ПКМЯ), която при девойки се определя като увеличен яйчников обем > 2 SD (>12 ml). Резултатите от ехографското изследване са представени в табл. 20.

Табл. 20 УЗ обем на яйчниците и наличие на ПКМЯ при участниците от трите групи

Показател	СПЯ (n=36)	ЗК (n=15)	ХАК (n=8)	p СПЯ vs ЗК	p СПЯ vs ХАК	p ХАК vs ЗК
ОЛЯ (cm³)	9,5±3,3	9,3±4,2	8,5±2,0	ns	ns	ns
ОДЯ (cm³)	9,4±3,5	10,4±3,4	6,7±2,0	ns	ns	ns
ОЯО (cm³)	18,9±6,5	20,1±7,8	16,5±3,5	ns	ns	ns
ПКМЯ (%)	23,3 %	33,3 %	0,0 %	ns	ns	ns

ОЛЯ – обем на ляв яйчник; ОДЯ – обем на десен яйчник; ОЯО – общ яйчников обем; ПКМЯ – поликистична морфология на яйчниците; ns – без статистическа значимост.

От проведения анализ не се установява значима разлика в обемите на яйчниците и наличието на ПКМЯ между групите. При проведения множествен корелационен анализ с отчитане на влиянието на възрастта, освен вече описаната корелация с АМН, не се установяват корелации с клиничния и биохимичния хиперандрогенизъм, както и с метаболитните показатели.

7. Резултати от изследване на подобрани микроРНК-и (miRNA)

При общо 53 девойки от всички участнички (34 от групата на СПЯ, 11 от ЗК и всички 8 от ХАК) се проведе изследване на подобрани miRNA, за да се оцени пригодността им като потенциални диагностични биомаркери за СПЯ. Възрастта и антропометричните характеристики на участничките са представени в табл. 21, а значимите клинични и биохимични разлики между групите – в табл. 22.

Табл. 21 Възраст и антропометрични характеристики на участничките, при които са изследвани miRNA.

Показател	СПЯ (n=34)	ЗК (n=11)	ХАК (n=8)	p
Възраст (г.)	16,0±1,4	15,3±1,5	15,8±1,1	ns
Тегло (kg)	71,9±15,8	74,1±16,5	61,1±13,5	ns
Ръст (cm)	161,8±7,6	165,6±5,9	159,2±9,3	ns
ИТМ (кг/м ²)	27,5±6,4	27,0±5,4	24,0±4,5	ns
ОТ (cm)	85,0±16,0	87,4±19,1	78,6±9,6	ns

Данните са представени като средни стойности ±SD; ns – липсва статистическа значимост.

Табл. 22 Значими клинични и биохимични разлики между групите

Показател	СПЯ (n=34)	ЗК (n=11)	ХАК (n=8)	p СПЯvsЗК	p СПЯvsХАК	p ЗКvsХАК
Хирзутизъм	88,2 %	10,0 %	37,5 %	<0,001	<0,001	ns
FGS	15,1±6,8	3,5±7,3	8,2±9,7	<0,001	0,01	ns
Омазняване	74,0 %	50,0 %	37,5 %	ns	0,032	ns
Инс. (μIU/ml)	22,8±17,6	15,5±10,3	10,0±6,5	ns	0,014	ns
T (nmol/l)	1,8±0,8	0,8±0,1	2,2±0,2	<0,001	ns	<0,001
A4 (nmol/l)	14,5±5,4	4,8±2,6	13,1±3,5	<0,001	ns	0,001
AMH (pmol/l)	49,1±32,9	19,3±12,9	33,6±28,0	0,015	ns	ns
SHBG (nmol/l)	28,9±22,6	46,4±21,5	54,5±24,7	ns	0,020	ns
FAI	10,9±12,2	1,9±0,8	4,9±2,5	<0,001	0,028	0,034

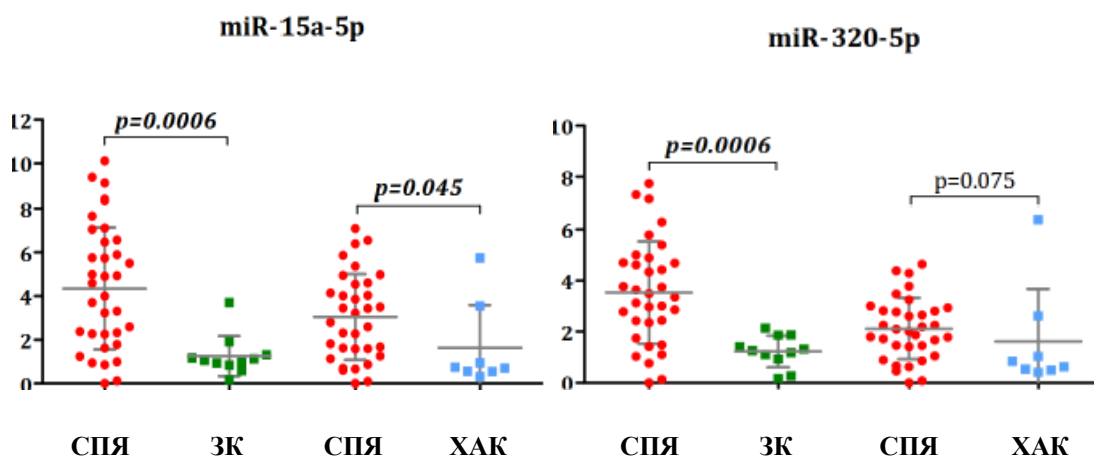
Данните са представени като средни стойности ±SD или проценти; ns – липсва статистическа значимост.

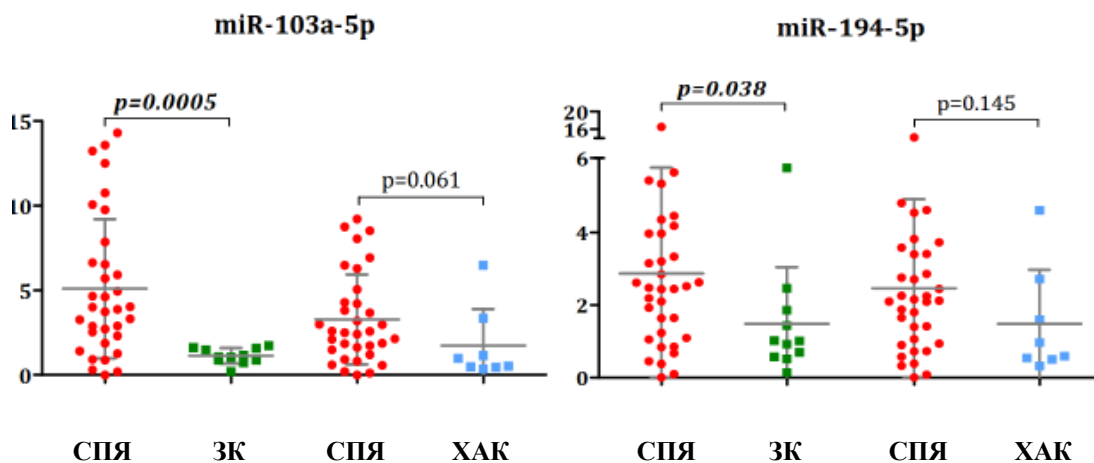
Изследвани са шест miRNA – miR-451a, miR-15a-5p, miR-320-5p, miR-28-5p, miR-103a-5p и miR-194-5p. Повечето от тях не са изследвани при пациенти със СПЯ и, с изключение на miR-451a, miR194-5p и miR-15a-5p не са изследвани при девойки. Причината да изберем miR-451a е, че е установена значително понижена при момичета със СПЯ в сравнение със здрави контроли, със 100 % чувствителност и 100 % специфичност за диагностициране на СПЯ (Diaz et al., 2020). MiR-103a-3p и miR-28-3p също са открити значително понижени при пациенти със СПЯ (Udesen et al., 2023). Има съобщения, че miR-320 е потенциален биомаркер за нарушения на липидния и глюкозния метаболизъм, които често са свързани със СПЯ, и е повишена при тези състояния, но понижена при СПЯ (Du et al., 2021; Sørensen et al., 2014; Cirillo et al., 2019). Установено е, че miR-194 е

свърхекспресирана при жени със СПЯ и нарушен глюкозен метаболизъм, както и че е повишена в гранулоза клетки на жени със СПЯ, където индуцира апоптоза (Chen et al., 2019; Wu et al., 2021). Решихме да проучим дали бихме открили подобни промени в нивата на други членове на семействата miR-103, miR-28, miR-320 и miR-194. Причината да изберем miR-15a-5p е, че е намерена значително повишена при пациенти с ендометриален карцином и е предложена като биомаркер за ранното му откриване. Също така нивото ѝ корелира с нивата на андрогените (Zhou et al., 2021).

Установи се, че четири от шестте анализирани miRNA, miR-320-5p, miR-103a-5p, miR-15a-5p и miR-194-5p показват значимо различна експресия при девойките със СПЯ. Тези четири miRNA са значимо повишени в групата на СПЯ в сравнение със здравите контроли (всички $p < 0,05$). Освен това, miR-15a-5p е значимо свърхекспресирана в групата със СПЯ в сравнение и с хиперандрогенните контроли ($p = 0,045$) (фиг. 12).

Фиг. 12 Сравнителна експресия на четирите значимо различни miRNA при пациентките със СПЯ в сравнение с контролните групи

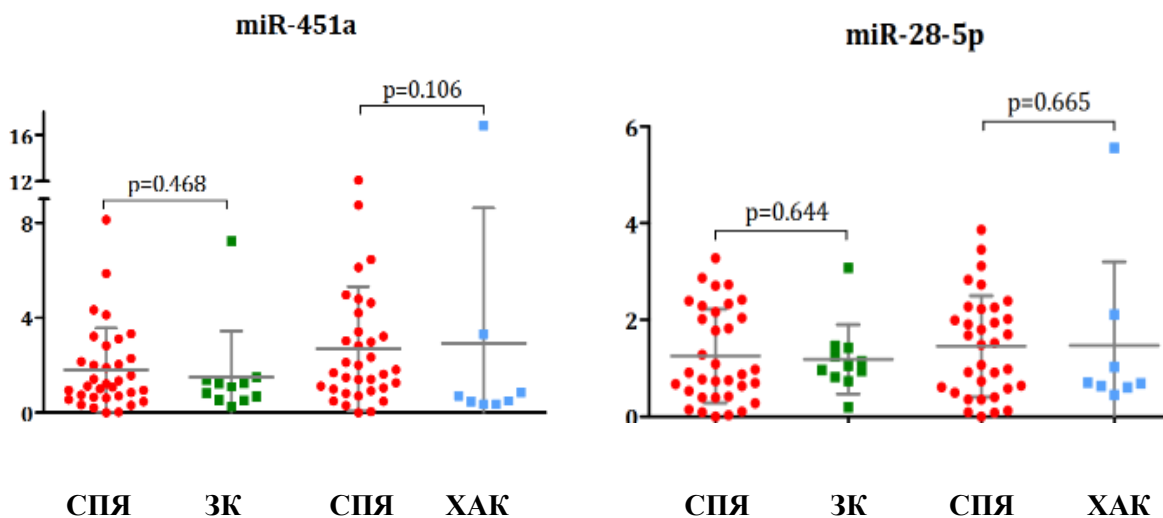




ЗК – здрави контроли; ХАК – хиперандрогенни контроли; значимост при $p < 0,05$.

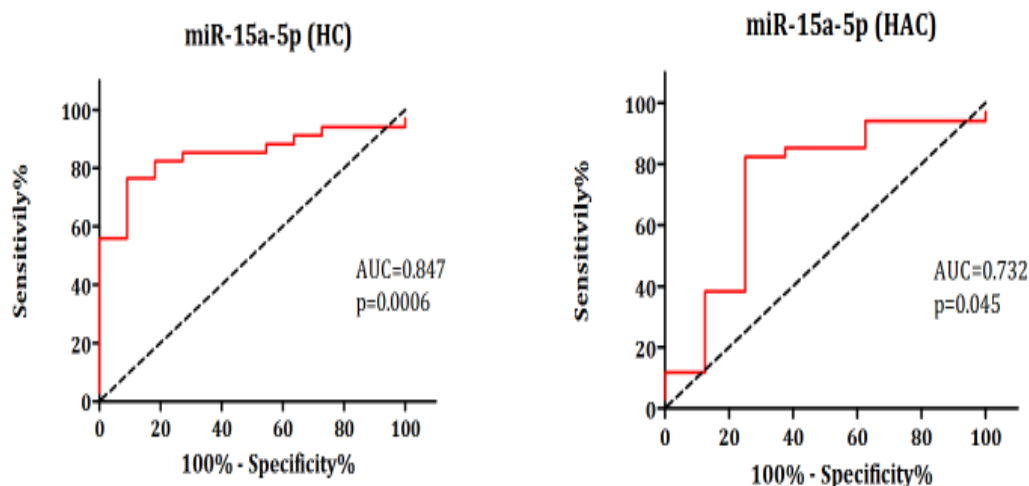
При останалите две микроРНКи, miR-451a и miR-28-5 не се намират статистически значими разлики в експресията между трите изследвани групи (фиг. 13).

Фиг. 13 Сравнителна експресия на двете незначимо различни miRNA при пациентките със СПЯ в сравнение с контролните групи



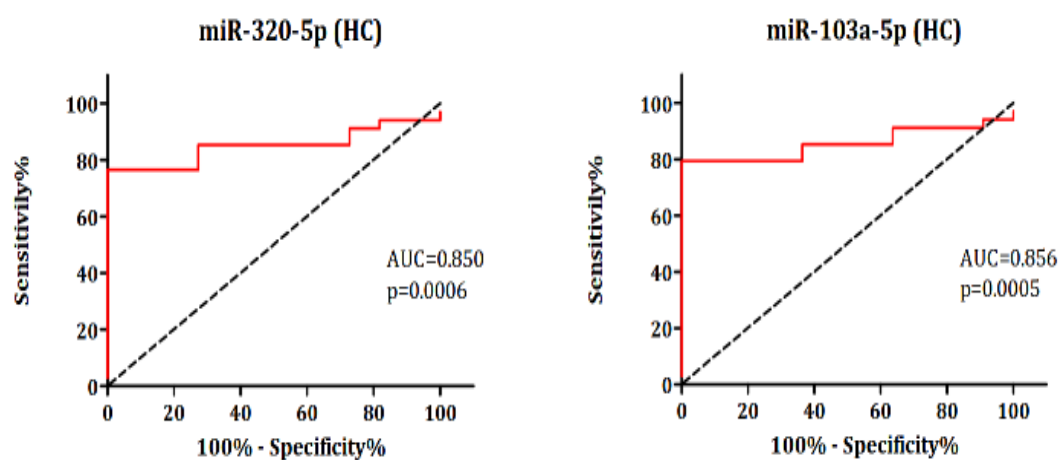
Чувствителността и специфичността на всяка от четирите miRNA като потенциален диагностичен биомаркер за СПЯ са оценени чрез анализ на ROC криви (фиг. 14, 15 и 16, табл. 23).

Фиг. 14 ROC крива на miR-15a-5p за определяне на чувствителност и специфичност при разграничаване на СПЯ от ЗК и ХАК



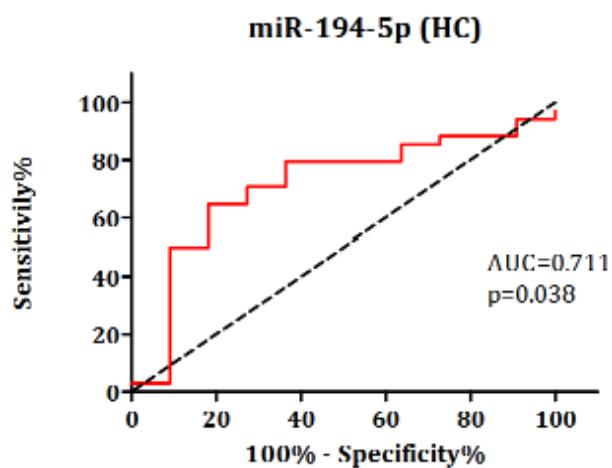
AUC – площ под кривата; HC – здрави контроли; HAC – хиперандрогенни контроли; статистическа значимост при $p < 0,05$

Фиг. 15 ROC криви на miR-320-5p и miR-103a-5p за определяне на чувствителност и специфичност при разграничаване на СПЯ от ЗК



AUC – площ под кривата; HC – здрави контроли; статистическа значимост при $p < 0,05$

Фиг. 16 ROC крива на miR-194-5p за определяне на чувствителност и специфичност при разграничаване на СПЯ от ЗК



AUC – площ под кривата; HC – здрави контроли; статистическа значимост при $p < 0,05$

Табл. 23 Чувствителност и специфичност на четирите miRNA за разграничаване на пациенти със СПЯ и здрави контроли

miRNA	Чувствителност	Специфичност
miR-320-5p	76 %	100 %
miR-103a-5p	76 %	100 %
miR-194-5p	65 %	81 %
miR-194-5p	76 %	91 %

MiR-15a-5p, miR-320-5p, miR-103-5p и miR-194-5p демонстрират статистически значима точност като независими диагностични маркери. MiR-15a-5p допълнително показва способност да диференцира СПЯ от хиперандрогенните контроли. Оптималните прагови стойности за miR-320-5p и miR-103a-5p ефективно разграничават пациентките със СПЯ от здравите контроли с 100 % специфичност и 76 % чувствителност. MiR-194-5p показва 65 % чувствителност и 81 % специфичност за диагностициране на СПЯ. MiR-15a-5p показва по-висока специфичност при разграничаване на пациентки със СПЯ от здрави контроли (91 % специфичност, 76 % чувствителност) в сравнение с разграничаването на девойките със СПЯ от ХАК (75 % специфичност, 82 % чувствителност).

В групата на СПЯ се проведе корелационен анализ за установяване на корелации между четирите променени miRNA и клинични, метаболитни и хормонални показатели, свързани със СПЯ. След отчитане на влиянието на възрастта и ИТМ се намират значими положителни корелации на miR194-5p със САН, miR15a-5p с FGS, miR103a-5p с косопад и САН и miR320-5p с FGS и CRP, както и обратнопропорционална корелация на miR320-5p с нивото на глюкозата (табл. 24).

Таб. 24 Корелационни коефициенти r между четирите miRNA и клинични и биохимични показатели и статистическата им значимост

	miR-194-5p	miR15a-5p	miR-103a-5p	miR320-5p
САН	$r = 0,462^*$	-	$r = 0,475^*$	-
FGS	-	$r = 0,550^*$	-	$r = 0,513^*$
Косопад	-	-	$r = 0,508^*$	-
КГ	-	-	-	$r = -0,457^*$
CRP	-	-	-	-

Статистическа значимост: $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$

За отчитане на влиянието на хиперандрогенията, метаболитните и СС нарушения върху четирите повишени miRNA при момичетата със СПЯ се проведе линеен регресионен анализ. Резултатите са представени в табл. 25.

Табл. 25 Резултати от множествен регресионен анализ със зависима величина всяка от четирите miRNA и независими величини CRP и САН

	miR194-5p	miR15a-5p	miR103a-5p	miR320-5p
CRP	$R^2 = 0,447$ p < 0,001	$R^2 = 0,231$ p = 0,004	$R^2 = 0,243$ p = 0,003	-
САН	-	$R^2 = 0,159$ p = 0,019	-	$R^2 = 0,188$ p = 0,01

От проведения регресионен анализ не се установи влияние на хиперандрогенията върху избраните miRNA. Намери се влияние на някои показатели за СС риск – CRP и САН. CRP влияе положително върху експресията на miR194-5p, miR15a-5p и miR103a-5p. САН оказва положително влияние върху нивата на miR15a-5p и miR320-5p.

ЧАСТ V. ОБСЪЖДАНЕ

1. Характеристика на участниците

В проучването бяха включени общо 59 девойки, разпределени в три, съответни по възраст и ИТМ групи: основна група от пациентки със СПЯ ($n=36$), контролна група от клинично здрави момичета (ЗК, $n=15$) и група на момичета с идиопатичен хиперандрогенизъм (ХАК, $n=8$). Сформирането на този небалансиран дизайн (приблизително съотношение 2,4:1 в полза на СПЯ спрямо ЗК и 4,5:1 в полза на СПЯ спрямо ХАК) беше обусловено от логистични ограничения (проучването започна по време на извънредната епидемична обстановка поради пандемията от COVID-19) и строгите критерии за изключване при подбора на здравите контроли. За да се компенсира по-малкият размер на контролните групи и да се осигури коректност на резултатите, при статистическия анализ бяха приложени непараметрични тестове и методи, подходящи за извадки с неравен обем.

Средната възраст на всички участници в проучването е $15,8 \pm 1,3$ години (12,9-17,9), без значима разлика между групите. Това е важно при обработката и интерпретацията на данните, тъй като изключва възрастта като потенциален модифициращ фактор и позволява по-добра съпоставимост на резултатите.

При девойките със СПЯ диагнозата на практика беше поставена при включване в проучването. Средната възраст на поставяне на диагнозата СПЯ при участниците е $15,9 \pm 1,5$ години. В международната литературата не се откриват големи проучвания относно средна възраст на поставяне на диагноза СПЯ при подрастващи. Özer и съавтори при изследване на 305 девойки с менструални нарушения, от които 36 със СПЯ намират средна възраст на поставяне на диагнозата СПЯ $15,3 \pm 1,5$ г. Оплакванията при момичетата са се появили на средна възраст $13,6 \pm 1,6$ г. (Özer et al., 2025). Международното ръководство за диагностициране и лечение на СПЯ (The International Evidence-Based Guideline For The Assessment And Management of PCOS) препоръчва оценка за това състояние да се прави между 13-19 г. в., но само ако са преминали 2 и повече години след менархе (Teede et al., 2023). В метаанализ, включващ 20 проучвания с 14 010 участници на възраст между 10-24 г., повечето (19 проучвания) с възраст на пациентките < 19 г.,

Neven и съавтори намират, че от менархе до поставяне на диагнозата СПЯ преминават средно между 2,8-6,9 г. (Neven et al., 2024). Момичетата със СПЯ в нашето проучване са на възраст между 12,9 и 17,9 г. и при всички от тях са минали повече от 2 години след менархе, което съответства на препоръките на Международното ръководство и на възрастта на диагностично уточняване в световен мащаб.

2. Наднормено тегло и затлъстяване

Всички участнички в нашето проучване си съответстват по ИТМ, което също има важно методологично значение. Така, при анализа на данните се елиминира влиянието на затлъстяването като страничен фактор, тъй като наднорменото тегло само по себе си причинява сходни хормонални и метаболитни промени с тези, срещани при СПЯ. По този начин, може да се разграничи каква част от намерените нарушения се дължат на самия синдром.

Наднорменото тегло (НТ) и затлъстяването са често срещани при СПЯ, като усложняват протичането на синдрома. Повишената висцерална мастна тъкан при пациентките със СПЯ и затлъстяване увеличава ИР и хиперинсулинизма, което стимулира продукцията на андрогени, повишава адипогенезата и намалява липолизата (Bila et al., 2025). Честотата на наднормено тегло и затлъстяване при девойките със СПЯ в настоящото проучване възлиза на 63,9 %, като 25 % от тях са с наднормено тегло и 38,9 % - със затлъстяване. Тази честота е сравнима с установената от други изследователи. Например, Elahi и съавтори при изследване на 42 девойки със СПЯ на средна възраст $15,9 \pm 1,6$ г. докладват сходна с установената от нас честота на НТ и затлъстяване от 61,9 % (Elahi et al., 2024). Azargoon и съавтори установяват честота на затлъстяване от 37,9 % при 58 девойки със СПЯ на възраст $16 \pm 0,9$ г., което е в пълно съответствие с намерената от нас честота от 38,9 % (Azargoon et al., 2020). По-ниска честота докладват Bhargavi и съавтори. При проучване на 100 пациентки със СПЯ на възраст 15-20 г. (54 % между 19-20 г.) авторите установяват общо НТ и затлъстяване при 46 % от участничките (Bhargavi et al., 2025). В контраст с тези данни и в съответствие с нашите, при широкомащабно проучване, включващо 137 502 девойки на възраст 15-19 г., от които 1563 със СПЯ, Christensen и съавтори установяват затлъстяване при 63,1 % от пациентките със СПЯ (Christensen et al.,

2014). Данните от цитираните автори потвърждават високата честота на НТ и затлъстяване при СПЯ в юношеска възраст и са напълно съвместими с получените от нас резултати.

3. Прояви на клиничен хиперандрогенизъм и менструални нарушения

Проявите на андрогенен излишък (хирзутизъм и кистично акне) са основен диагностичен критерий за СПЯ. От клиничните симптоми на хиперандрогенизъм при девойките със СПЯ в нашето проучване с най-голяма честота е хирзутизма (88,9 %), като разликите с двете контролни групи са значими. Клинично хирзутизмът беше оценен по модифицираната скала на Ferriman-Gallwey. Девойките със СПЯ имат значимо по висок среден FGS в сравнение със здравите контроли ($14,9 \pm 6,7$ срещу $6,1 \pm 9,4$; $p < 0,05$). В литературата честотата на докладвания хирзутизъм при девойки със СПЯ варира в широки граници. В метаанализ на 12 проучвания, включващи 149 477 девойки на средна възраст 16,99 г. Naz и съавтори установяват 18 % честота на хирзутизма и 35 % честота на акне (Naz et al., 2019). Авторите не дават данни за стойността на FGS. Нашите резултати са сходни с публикуваните от Jakubowska-Kowal и съавтори, които намират честота на хирзутизма между 88,1%-91,5% при девойки със СПЯ, в зависимост от приложените диагностични критерии (Jakubowska-Kowal et al., 2026). Същевременно авторите установяват биохимичен хиперандрогенизъм при 54,9%-55,3% от момичетата със СПЯ, като тази разлика показва значението на подробната анамнеза относно наличието на повишено окосмяване, както и важността на подробния клиничен преглед (Jakubowska-Kowal et al., 2026). Yetim и съавтори също установяват сходна с намерената от нас честота на хирзутизма. В своето проучване, включващо 53 девойки със СПЯ и 26 здрави контроли авторите намират честота на хирзутизма от 87 % в групата на СПЯ (Yetim et al., 2016).

Поради значимата разлика по отношение на FGS между пациентките със СПЯ и здравите контроли решихме да оценим чувствителността и специфичността на FGS като диагностичен маркер за СПЯ. След анализ на ROC-крива и определяне на индекса на Youden се установи, че cut-off стойност за FGS от 6 точки разграничава пациентките от здравите момичета с 94 % чувствителност и 65 % специфичност. При проведения корелационен анализ не установихме корелации между FGS, нивата на андрогените и FAI.

Тези резултати съответстват на публикуваните от Hestiantoro и съавтори данни от проучване на 76 млади жени със СПЯ (Hestiantoro et al., 2019). В нашето проучване линейният регресионен анализ установи, че инсулиновата резистентност влияе значимо на FGS и е предиктор за тежестта на клиничния хиперандрогенизъм, което потвърждава значението на хиперинсулинемията за андрогенния излишък при СПЯ.

Редица публикации в научната литература потвърждават валидността на FGS за фенотипна оценка на наличния хирзутизъм и доказване на хиперандрогенизма не само при СПЯ, но и при други хиперандрогенни състояния (Azziz et al., 2008, Hagan et al., 2019). През последните години се препоръчва cut-off стойността на FGS за дефиниране на хирзутизма да бъде съобразена с етническите особености на популацията (Spritzer et al., 2022, Teede et al., 2023). При проведения от нас анализ се установи, че cut-off за FGS от 7,5 т. определя наличието на хирзутизъм с чувствителност от 100 % и специфичност от 93 %, което съответства на приетата у нас стойност на $FGS \geq 8$ (Орбецова, 2009). Докато FGS е високо чувствителен и специфичен показател за оценка на хирзутизма, той има недостатъчно добра специфичност като маркер за СПЯ и не корелира с биохимичния хиперандрогенизъм, поради което не препоръчваме този показател да се използва самостоятелно за диагностициране на заболяването.

По отношение на останалите симптоми на хиперандрогенизъм не установихме значими разлики между групите. Акне се среща при 69,4% от нашите пациентки със СПЯ, 40% от здравите контроли и 62,5% от хиперандрогенните контроли. В цитираното по-горе проучване на Jakubowska-Kowal и съавтори, честотата на акне при девойките със СПЯ е между 68,8%-70,2% и е подобна на установената в нашето проучване. В метаанализ Ramezani Tehrani и съавтори установяват честота на акне от 59 % при пациентки със СПЯ на възраст под 19 г. и 39 % при здрави момичета (Ramezani Tehrani et al., 2021). Въпреки липсата на статистическа значимост на честотата на акнето в трите групи при нашето проучване, то се среща често при пациентките със СПЯ и не трябва да се пропуска като симптом на хиперандрогенизъм при съмнение за синдрома.

Омазняването на косата е друга пилосебацейна проява на хиперандрогенизма и се среща при 72,2 % от нашите пациентки със СПЯ. Този симптом рядко се описва като самостоятелен белег на хиперандрогенизма и обикновено се включва към проявите на себорея, поради което в литературата не се установяват данни относно честотата му при

девойки със СПЯ. В едно проучване на 146 жени със СПЯ, Abusailik и съавтори установяват себорея при 43,2 % от пациентките и андрогенна алопеция при 42,5 % (Abusailik et al., 2021). При нашите пациентки със СПЯ прояви на андрогенна алопеция се срещат при 8,3 %, а косопад при 25 %. Алопецията е много рядка при девойки със СПЯ и не се препоръчва като диагностичен критерий. Няма и проучвания относно честотата ѝ при СПЯ в юношеска възраст (Meczekalski et al., 2023; Ramezani Tehrani et al., 2019).

Вторият задължителен критерий за диагностициране на СПЯ е наличието на олигоменорея (ОМ) (Ibanez et al., 2017; Teede et al., 2023). Поради този факт, ОМ се установява при 100 % от нашите пациентки със СПЯ. Тъй като включващ критерий за участничките в двете контролни групи е липсата на менструални нарушения, при никоя от тях не се намери ОМ. В международната литература честотата на докладваната ОМ варира в зависимост от използваните диагностични критерии за СПЯ. Например, в проучването на Yetim и съавтори, които прилагат Ротердамските критерии за диагностика на СПЯ честотата на ОМ е 83 % (Yetim et al., 2016). В своето проучване, Jakubowska-Kowal и съавтори установяват сходна на намерената от нас честота на ОМ - 100 % от при използване на критериите на ICPE (прилагани и в нашето изследване) и на Международното ръководство за диагностициране и лечение на СПЯ и 91,8 % при използване на Ротердамските критерии (Jakubowska-Kowal et al., 2026).

4. Хормонални резултати при участничките

4.1. Андрогени и SHBG

Очаквано, при анализа на хормоналните нива на участничките в нашето изследване се намират значимо по-високи стойности на тестостерон (Т), андростендион (А4) и индекса на свободни андрогени (FAI) при девойките със СПЯ спрямо групата на здравите контроли. Хиперандрогенните контроли също имат по-високи нива на Т и А4 спрямо здравите момичета, докато разликата с групата на СПЯ е незначима.

Хиперандрогенизмът заема централно място в патофизиологията на СПЯ и е приет за задължителен диагностичен критерий при подрастващи. От патогенетична гледна точка, персистиращите високи нива на андрогени инхибират нормалната фоликулогенеза на интраовариално ниво, предизвиквайки преждевременна атрезия на антралните фоликули,

което води до олигоменорея. Освен това, хиперандрогенизмът участва в „порочен кръг“ с ИР и компенсаторната хиперинсулинемия. Висцералното затлъстяване и ИР стимулират андрогенната продукция в яйчника, като едновременно с това потискат чернодробния синтез SHBG, което води до повишено ниво на свободни андрогени. Те влошават инсулиновата чувствителност в периферните тъкани, което задълбочава метаболитните и хормоналните нарушения (Kim et al., 2021).

В търсене на надеждни биомаркери за биохимичен хиперандрогенизъм (общ Т, А4, FAI), редица международни проучвания се опитват да дефинират оптимални гранични стойности (cut-off) за диагностика на СПЯ. Поради вариабилността в използваните лабораторни методи и хетерогенността на изследваните кохорти обаче, докладваните прагове и тяхната чувствителност и специфичност варират значително. Например, Kumar и съавтори предлагат относително ниска cut-off стойност за Т от 25,1 ng/dl (0,8 nmol/l). Този праг показва умерена чувствителност от 78,1%, но отлична специфичност от 92,6%. Както обаче и самите автори отбелязват, този по-нисък праг е подходящ за азиатската популация, в която нивото на Т е по-ниско (Kumar et al., 2024). Khashchenko и съавтори, изследвайки кохорта от 130 момичета в юношеска възраст, идентифицират по-висока гранична стойност ($T > 1,15 \text{ nmol/l}$). Авторите съобщават за добра чувствителност (75–93%) и висока специфичност (83–93%) на този cut-off (Khashchenko et al., 2020). Резултатите от нашето проучване показват частично сходство с цитираните литературни данни по отношение на чувствителността на Т, но значително се различават по отношение на неговата специфичност. В нашето изследване оптималната прагова стойност от 1,13 nmol/l достига едва 54,5% специфичност при добра чувствителност от 80,6 %. Това несъответствие може да се дължи на използването на стандартни радиоимунологични методи (RIA) за изследване на Т в нашето и цитираните проучвания. За разлика от златния стандарт LC-MS/MS (течна хроматография с tandemна масспектрометрия) RIA проявяват по-ниска точност и кръстосана реактивност при ниските концентрации на тестостерон, характерни за женския пол. Въз основа на получените резултати и регистрираната ниска специфичност, ние не можем да препоръчаме изолираното изследване на общия тестостерон като самостоятелен диагностичен маркер за СПЯ в клиничната практика.

В нашето проучване A4 и FAI демонстрираха значително по-висока диагностична чувствителност и специфичност за разграничаване на пациентките със СПЯ от здравите контроли, в сравнение с изолираното измерване на Т. A4 с cut-off от 11,6 nmol/l отдиференцира успешно пациентките с 69% чувствителност и 100% специфичност. Постигането на 100% специфичност означава, че стойности на A4 над този праг напълно изключват фалшиво-позитивни резултати сред здравите контроли и служат като добър маркер за наличието на СПЯ. FAI с cut-off от 6,2 демонстрира 72% чувствителност и 90% специфичност при разграничаване на пациентките от контролните групи. По-високата чувствителност на FAI спрямо A4 (72% срещу 69%) показва, че той успява да идентифицира по-голям процент от реално засегнатите пациентки, отчитайки свободните андрогени, които са биологично активните. Предимството на A4 се обяснява патофизиологично с факта, че андростендионът е ключов прекурсор в стероидогенезата, отразяващ едновременно както овариалната, така и надбъбречната свръхпродукция на андрогени, а последната може да се наблюдава в до 46 % от пациентките със СПЯ (Rosenfield, 2020). От друга страна, FAI отразява по-точно реалния тъканен андрогенизъм в сравнение с общия тестостерон.

Редица международни проучвания потвърждават значението FAI като добър диагностичен маркер за СПЯ, с висока чувствителност и специфичност. Sağsak и съавтори намират, че cut-off стойност за FAI от 3,45 има 90 % чувствителност и 84 % специфичност за разграничаване на девойки със СПЯ от здрави момичета. Авторите установяват по-висок праг от 6,15, който отграничава пациентките със СПЯ от такива със затлъстяване и ИР, но без СПЯ, с 89 % чувствителност и 77 % специфичност (Sağsak et al., 2021). Този резултат е много близък до установения в нашето изследване, в което честотата на НТ и затлъстяване в контролната група е голяма (53,3 %). Khashchenko и съавтори също определят FAI като маркер с добра чувствителност и специфичност за диагностициране на СПЯ. В тяхното изследване прагова стойност >2,75 е с чувствителност от 75 % и специфичност от 93 % (Khashchenko et al., 2020). Момичетата в тяхната контролна група са с по-нисък ИТМ от пациентките със СПЯ, което е най-вероятната причина за този нисък cut-off.

Подобно на резултатите от нашето изследване, значението на андростендиона (A4) като по-добър маркер за хиперандрогенизъм от тестостерона при пациентки със СПЯ се

доказва в няколко проучвания. При изследване на 86 жени със СПЯ и 43, съответстващи по възраст и ИТМ контроли, O'Reilly и съавтори намират повишен Т само при 65 % от пациентките, като същевременно повишен А4 се установява при 88 %. Авторите определят чувствителността на А4 като диагностичен маркер на 88,3 %, а специфичността на 97,7 % (O'Reilly et al., 2014). Khashchenko и съавтори определят стойност на А4 от 11,45 ng/ml като подходяща за диагностициране на СПЯ при подрастващи, с чувствителност до 78,2 % и специфичност, достигаща до 93,7 % (Khashchenko et al., 2020).

За да се оцени реалната диагностична независимост на А4 и FAI, в нашето проучване бе извършен корелационен анализ, при който статистически бе елиминирано влиянието на възрастта и ИТМ. За А4 се установи значителна правопрпорционална корелация с Т и FAI. Това потвърждава, че нарастването на А4 върви паралелно с увеличаването на общата и свободната фракция на тестостерона и доказва общия им патогенетичен източник – ензимната дисрегулация в яйчниците. Намери се и умерена обратнопропорционална корелация със SHBG, което доказва влиянието на хиперандрогенията върху синтеза му в черния дроб. Намаляването на SHBG води до повишаване на нивото на свободния тестостерон и засилване на хиперандрогенните прояви. За FAI, очаквано се установи значителна положителна корелация с А4 и умерена с Т, както и значителна отрицателна корелация със SHBG.

За да се определи степента на причинно-следствена връзка между изследваните андрогенни маркери, в настоящото проучване беше приложен линеен регресионен анализ. Той не установи статистически значимо влияние на FAI върху вариабилността на А4 ($R^2=0,011$, $p=0,544$). Липсата на регресионна зависимост доказва, че А4 и FAI функционират като два статистически независими диагностични биомаркера. Те обхващат различни аспекти на андрогенния излишък (общ прекурсорен пул и свободна тъканна бионаличност), което е аргумент в полза на тяхното съвместно използване за постигане на по-добра диагностична точност. За разлика от предходния резултат, линейната регресия, оценяваща зависимостта между серумните концентрации на Т и А4, показва висока статистическа значимост ($R^2= 0,336$, $p<0,001$). Според получените данни, нивата на общия Т успяват самостоятелно да обяснят 33,6% от общата вариация на андростендиона в изследваната група. Насоката на тази зависимост е положителна, тъй като А4 е основен прекурсор за синтеза на тестостерон. При СПЯ е налице засилване на андрогенната

продукция, в резултат на което нараства паралелно секрецията и на двата хормона (А4 и Т).

В допълнение, настоящото изследване установи значимо по-ниско ниво на SHBG при момичетата със СПЯ в сравнение с тези с идиопатичен хиперандрогенизъм ($p < 0,05$), докато липсва такава разлика с групата на здрави контроли. Това може да се обясни с по-голямата честота на затлъстяването и НТ при девойките със СПЯ и здравите контроли и по-високите (макар и незначимо) стойности на НОМА-IR и инсулин при пациентките със СПЯ в сравнение с хиперандрогенната контролна група. Известно е, че хиперинсулинемията инхибира синтезата на SHBG (Ibanez et al., 2027; Nicolaides et al., 2020; Qu et al., 2020).

В обобщение, получените от нас данни доказват, че за разлика от общия тестостерон, изследването на А4 и FAI осигурява значително по-висока диагностична точност и надеждност при диференцирането на СПЯ. Това се потвърждава и в международната литература (Khashchenko et al., 2020; O'Reilly et al., 2014; Sağsak et al., 2021). Поради своята висока специфичност, А4 (при cut-off $>11,6$ nmol/l) се явява добър потвърждаващ маркер, докато FAI (при cut-off $>6,2$) предлага много добра сензитивност. Тези резултати дават основание да препоръчаме включването на А4 и FAI като рутинна практика в диагностичния алгоритъм за СПЯ при подрастващи пациентки.

4.2. Антимюлеров хормон (АМН)

АМН отдавна представлява научен интерес като потенциален диагностичен биомаркер за СПЯ. Приложимостта му в диагностиката е пряко свързана с неговата роля в патогенезата на заболяването. АМН се синтезира от гранулоза клетките на преантралните и малките антрални яйчникови фоликули, като модулира ранните етапи на фоликулогенезата. Налични са доказателства, че продукцията на хормона при СПЯ е повишена вследствие на интринзич дисфункция в самите гранулоза клетки, като високата му локална концентрация в яйчника нарушава селекцията на доминантен фоликул и води до фоликуларен арест (Deans, 2019). Благодарение на разработването на достатъчно чувствителни лабораторни методи бе установено, че серумните нива на АМН са между 2 и 4 пъти по-високи при пациентки със СПЯ. Това повишение се обяснява частично с

увеличената маса на гранулоза клетките, резултат от големия брой растящи фоликули. Поради тясната си корелация с общия брой на яйчниковите фоликули, повишения антрален фоликуларен брой и нарастването на яйниковия обем, АМН притежава висок потенциал като алтернативен на УЗ изследване диагностичен маркер за СПЯ. В последната редакция на Международното ръководство за диагностика и лечение на СПЯ от 2023 г. АМН е включен като диагностичен критерий за СПЯ при възрастни, макар че не се препоръчва като самостоятелен тест (Teede et al., 2023). Въпреки редица проучвания, които доказват пригодността му като подходящ маркер при подрастващи, АМН все още не е приет за диагностичен критерий в тази възрастова група поради недостатъчна специфичност (Ibanez et al., 2017, Teede et al., 2023).

Сред основните задачи на настоящото проучване бяха изследването на потенциала на АМН като диагностичен биомаркер за СПЯ в пубертетна, определянето на оптимална прагова стойност за диференциация между пациентки и здрави контроли, както и оценка на възможностите за неговото внедряване в клиничната практика. Анализът на хормоналния профил на участничките в проучването установи статистически значимо по-високи нива на АМН при девойките със СПЯ в сравнение със здравата контролна група ($p < 0,05$).

За оценка на диагностичната ефективност (чувствителност и специфичност) на хормона и за дефиниране на прагова стойност, разграничаваща двете изследвани групи, бе проведен анализ на ROC крива. Резултатите показаха добра разделителна способност на теста с площ под кривата $AUC=0,74$ ($p < 0,01$). Чрез изчисляване на индекса на Youden като най-оптимален диагностичен cut-off за СПЯ се определи стойността от 23,6 pmol/l (3,3 ng/ml), характеризираща се с 86% чувствителност и 65% специфичност.

Резултатите от настоящото проучване корелират в голяма степен с данните, публикувани от Sopher et al. При изследване на 31 девойки без затлъстяване (ИТМ < 95-и персентил) – 16 със СПЯ и 15 здрави контроли, авторите установяват значимо по-високи нива на АМН при пациентките, както и положителна корелация с андрогенния профил и яйчниковите обеми. Те предлагат cut-off стойност на АМН от 3,4 ng/ml, която е твърде близка до дефинирания от нас праг от 3,3 ng/ml (23,6 pmol/l). В цитираното проучване тази стойност притежава 40% чувствителност и 93,8% специфичност при предсказване на СПЯ (Sopher et al., 2014). За разлика от него, установената в нашето изследване прагова

стойност показва значително по-висока чувствителност (86%), но по-ниска специфичност (65%). Тази разлика най-вероятно се дължи на по-малкия обем на участниците в изследването на Sopher ($n = 31$ спрямо $n = 59$ в нашето проучване).

Близи до нашите резултати се съобщават и от Wiweko и съавт., които дефинират диагностичен праг от 4,45 ng/ml със 76,1% чувствителност и 74,6% специфичност за СПЯ (Wiweko et al., 2014). По-високи референтни граници публикуват Yetim и съавт. – 6,1 ng/ml (чувствителност: 81,1%; специфичност: 92,3%) (Yetim et al., 2016). В мащабен метаанализ, обхващащ 15 проучвания, Tsukui и съавт. препоръчват cut-off стойност на АМН за диагностициране на СПЯ в адолесцентна възраст между 6 ng/ml и 7 ng/ml, характеризираща се с 66,3% чувствителност и 81% специфичност (Tsukui et al., 2022). В сравнение с посочените литературни източници, установената от нас прагова стойност от 23,6 pmol/l (3,3 ng/ml) се отличава с по-висока диагностична чувствителност (86%).

За установяване на взаимовръзката между антимюлеровия хормон АМН и характерните за синдрома на поликистозните яйчници СПЯ клинични проявления – хиперандрогения, метаболитни нарушения и морфологични яйчникови промени, бе приложен частичен корелационен анализ, контролиращ влиянието на възрастта и индекса ИТМ. Анализът регистрира статистически значителна положителна корелация между нивата на АМН и обемите на десния ($r=0,519$; $p<0,01$) и левия яйчник ($r=0,558$; $p<0,01$).

Причинно-следствените зависимости между обемите на двата яйчника и концентрацията на АМН бяха проучени чрез линеен регресионен анализ. Оценката на отделните регресионни коефициенти показва, че изолирано нито обемът на десния яйчник ($B=1,060$; $p=0,648$), нито този на левия ($B=5,156$; $p=0,052$) се явяват значими предиктори за нивата на хормона. За разлика от тези резултати, общият яйчников обем (ОЯО) оказва статистически значимо влияние върху нивата на АМН ($R^2=0,304$; $F=12,236$; $p=0,002$), като обяснява 30,4% от тяхната вариабилност. Увеличението на ОЯО с всеки 1 cm³ е свързано с линейно покачване на стойностите на АМН с приблизително 0,73 pmol/l. В съответствие с нашите данни, правопрпорционална корелационна зависимост между яйчниковия обем и нивата на АМН се констатира в редица международни проучвания, които препоръчват използването на АМН като алтернатива на УЗ изследване (Pawelczak et al., 2012; Sopher et al., 2014; Wiweko et al., 2014; Yetim et al., 2016).

В заключение, установеният в настоящото изследване диагностичен праг за АМН от 23,6 pmol/l (3,3 ng/ml) притежава висока диагностична ефективност, позволяваща точното идентифициране на 86% от девойките със СПЯ. Доказаната статистически значима положителна корелация с обема на яйчниците аргументира потенциалното приложение на АМН в клиничната практика като алтернатива на ултразвуковото изследване. Това предимство е особено важно за юношеската възраст, когато провеждането на ехографско изследване често е затруднено и неточно. Въз основа на получените резултати препоръчваме включването на АМН в стандартния диагностичен панел за оценка на СПЯ при подрастващи, но предвид по-ниската му специфичност, не като основен, а като подкрепящ основните диагностични критерии маркер.

5. Кардио-метаболитни нарушения при участничките

5.1. Acanthosis nigricans

Acanthosis nigricans (AN) представлява хиперпигментиран участък от кожата с кадифена повърхност, който обхваща симетрично предимно зоните на шията, аксилите, задколенните ямки и др. Етиологията на AN е мултифакторна, но най-често тази дерматологична проява се асоциира с високи нива на серумен инсулин. Патофизиологичният механизъм включва свързване на инсулина към рецепторите за инсулиноподобни растежни фактори, което предизвиква пролиферация на епидермалните клетки (Tyebkhan et al., 2024). При пациентките със СПЯ често се установява висока честота на AN, тъй като състояния като затлъстяване, инсулинова резистентност (ИР) и хиперинсулинемия се наблюдават при значителна част от тях. В научната литература се съобщава за честота на AN между 5,2% и 82%, в зависимост от наличието на съпътстващ метаболитен синдром, ИР, затлъстяване или захарен диабет тип 2 (Tyebkhan et al., 2024). В изследване, обхващащо 270 жени със СПЯ на медианна възраст 28 години, Schmidt и съавтори установяват AN при 36,9% от случаите, като доказват корелации между AN и ИТМ, ИР, дислипидемията и нивата на свободния тестостерон (144). При проучване сред 175 девойки със СПЯ от Бангладеш на средна възраст $16,8 \pm 1,7$ години, Kamrul-Hasan и съавтори откриват AN при 77,7% от изследваните лица (Kamrul-Hasan et al., 2021).

В настоящото изследване честотата на АН е 55,5%, което представлява статистически значимо завишение в сравнение с контролните групи ($p = 0,05$). Вариацията спрямо данните на Kamrul-Hasan и съавтори вероятно се дължи на етническите характеристики на анализираниите популации, тъй като е известно че АН проявява по-висока честота при индивиди с по-тъмен цвят на кожата (Kamrul-Hasan et al., 2021, Tyebkhan et al., 2024). В нашето изследване, в групата на пациентките със СПЯ се регистрират значими положителни корелации с НОМА-IR и инсулиновите нива, както и умерени положителни корелации с клиничните прояви на хиперандрогенизъм (хирзутизъм и FGS) и кардио-метаболичните нарушения (затлъстяване, повишено артериално налягане, дислипидемия). Наблюдава се и умерена отрицателна корелация с нивата на SHBG. Тези резултати са в съответствие с установените от Schmidt и колектив корелации (Schmidt et al., 2015). Получените данни потвърждават ключовата роля на ИР и последващата хиперинсулинемия като патогенетичен фактор за развитието на хиперандрогенизъм (чрез стимулиране на овариалната андрогенна синтеза) и като рисков фактор за сърдечно-съдови заболявания (чрез модулиране на липидния профил и артериалното налягане).

5.2 Артериално налягане

Анализът на стойностите на систолното и диастолното артериално налягане при участничките в настоящото проучване не установи значими разлики между средните стойности на тези показатели в трите изследвания групи. Използвайки определението за повишено артериално налягане според препоръките на Американската Академия по Педиатрия (AAP) за юноши над 13 год. възраст (сistolно АН ≥ 130 mmHg и/или диастолно АН ≥ 80 mmHg) (Blanchette et al., 2019), общо при 44,1 % от всички участнички в проучването се установява повишено артериално налягане, като разликите между групите са статистически незначими. Този резултат е напълно обясним, имайки предвид, че по-голямата част от участничките в проучването са с наднормено тегло и затлъстяване.

Сред момичетата със СПЯ честотата на повишено АН е 47,2 %, като се установяват умерени положителни корелации с наличието на затлъстяване, НОМА-IR и нивата на инсулин, както и умерена отрицателна корелация с нивата на SHBG. Тези резултати подкрепят данните за повишен риск от дисрегулация на АН вследствие на характерния за СПЯ хиперинсулинизъм, който предизвиква дисбаланс в автономната нервна система,

намалена продукция на азотен окис и повишена бъбречна реабсорбция на натрий (Marchesan et al., 2019). Отрицателната връзка между АН и SHBG доказва значението на хиперандрогенията, вследствие повишено ниво на свободни андрогени, за повишения риск от хипертония в резултат на андроген-индуцирано ремоделиране на съдовата стена и активация на ренин–ангиотензин-алдостероновата система (Casella et al., 2006).

Установената в настоящето проучване честота на повишено АН сред пациентките със СПЯ се различава от публикуваните в литературата данни. Zhang и колектив установяват повишено АН при 18,2 % от пациентките със СПЯ (Zhang et al., 2018), докато Abbas и съавтори намират АХ при 11,1 % от изследваните от тях момичета (Abbas et al., 2025). Проучванията при зрели жени със СПЯ също намират по ниска честота на АН в сравнение с нашето изследвания. Например, в метаанализ, включващ 10 проучвания при жени, установената честота на АХ при пациентките със СПЯ е 13,1 % (Wekker et al., 2020). Малко по-голяма честота, 17,6 % се установява в едно българско проучване (Robeva et al., 2025). Вероятно, причините за по-голямата честота на повишено АН при нашите пациенти са методологични. Стойностите на АН се влияят от различни фактори, като например тревожност или притеснение от предстоящите манипулации. За избягване на този ефект се препоръчва неколнократно измерване на АН в рамките на една визита (трикратно по протокола на настоящото изследване), което обикновено води до понижение на стойностите, но невинаги тези промени са достатъчно големи, за да променят класифицирането на АН като повишено (Flynn et al., 2017). Освен това, измерванията може да се различават значително между отделните визити. Например, едно проучване сред подрастващи установява, че само 56 % от изследваните юноши са имали повишени стойности на АН при 3 различни визити (McNiece et al., 2007). Въпреки това, имайки предвид значението на затлъстяването, хиперинсулинемията, дилипидемията и хиперандрогенизма за развитие на АХ е препоръчително АН да бъде редовно проследявано при девойки със СПЯ, за да се вземат своевременно мерки за регулирането му и предотвратяване на бъдещи СС усложнения.

5.3. Глюкозна хомеостаза

При всички участнички в настоящето проучване се проведеха изследвания на глюкозната хомеостаза – КГ на гладно, инсулин на гладно и НОМА-IR. Анализът на данните не установи статистически значими разлики между стойностите на тези показатели в трите изследвани групи. Не се установиха значими разлики и по отношение на нарушената гликемия на гладно (дефинирана като КГ на гладно $\geq 5,6$ mmol/l и $\leq 6,9$ mmol/l), хиперинсулинемията на гладно (дефинирана като инсулин на гладно ≥ 15 μ IU/ml) и инсулиновата резистентност (НОМА-IR $\geq 2,6$). В групата на пациентките със СПЯ, нарушена гликемия на гладно (НГГ) се регистрира при 5,3 % от девоите, като тази честота е сравнима с установената при други изследвания. При изследване на 66 девоии със СПЯ на средна възраст $15,8 \pm 2,0$ г., Flannery и съавт. намират нарушен глюкозен метаболизъм при 18,2 % от пациентките. НГГ се наблюдава при 3 %, нарушен глюкозен толеранс (НГТ) - при 15,2 % и тип 2 ЗД - при 1,5 %. Авторите не намират разлика в честотата на НГТ според наличието или не на затлъстяване и препоръчват скриниране за нарушения на глюкозния метаболизъм чрез провеждане на ОГТТ при всички девоии със СПЯ, независимо от ИТМ (Flannery et al., 2013). В ретроспективно кохортно проучване, обхващащо 98 девоии със СПЯ и 150 момичета със затлъстяване на възраст между 13 и 18 г., които са имали 2 или повече измервания на КГ на гладно през поне 6 месеца, Javed и съавтори не намират значимо различна промяна в нивата на гликемията на гладно или повишен риск от развитие на НГГ при пациентките със СПЯ в сравнение с контролите. Авторите достигат до извода, че ИТМ, а не СПЯ, е най-силният предиктор за промените в нивата на КГ на гладно и развитието на НГГ. Това предполага, че за разлика от НГТ, изолираният риск от НГГ при подрастващи може да се дължи главно на затлъстяването, а не на патофизиологията на СПЯ (Javed et al., 2015). Подобни резултати съобщават и Palmert и съавт. в едно от най-ранните проучвания, посветени на нарушенията на глюкозния толеранс при девоии със СПЯ. При изследване на 27 момичета, 8 от тях (29,6 %) са с НГТ, а при 1 е установен нелекуван до момента тип 2 ЗД. Авторите отбелязват, че КГ на гладно и обичайните сурогатни показатели за инсулинова резистентност са слаби предиктори на НГТ и диабет в тяхното проучване, докато стойността на глюкозата на 120-тата минута при ОГТТ се оказва най-надежден скринингов метод – извод, който по-късно е потвърден многократно в по-големи кохорти (Palmert et al., 2002).

Съпоставени, тези данни показват, че за разлика от НГТ, който се среща независимо от ИТМ и се счита за специфично свързан с патофизиологията на СПЯ, изолираната НГГ при подрастващи остава сравнително рядка находка (в диапазона от около 2–5 % в отделните проучвания) и изглежда обусловена в по-голяма степен от съпътстващото затлъстяване, отколкото от самия синдром. Резултатите от настоящето проучване, при което не се установи значима разлика в честотата на НГГ между групите, са в съответствие с тази тенденция и допълнително подкрепят тезата, че изследването само на КГ на гладно не е достатъчно чувствителен метод за оценка на нарушенията на въглехидратната обмяна при девойки със СПЯ, а провеждането на ОГТТ остава предпочитан скринингов подход, независимо от телесното тегло (Flannery et al., 2013; Palmert et al., 2002).

Тази разлика в поведението на двата типа нарушения на въглехидратната обмяна вероятно отразява различни патофизиологични механизми в основата им. Kim и съавт. изследват 143 жени със СПЯ и установяват, че изолираната НГГ и изолираният НГТ се асоциират с различни модели на инсулинова резистентност – докато НГТ се свързва предимно с периферна (мускулна) инсулинова резистентност, то НГГ е обусловена главно от чернодробна инсулинова резистентност, изразяваща се в невъзможност за адекватно потискане на чернодробната глюконеогенеза и продукция на глюкоза. При пациентките с комбинирано нарушение (НГГ и НГТ едновременно) се установяват и двата типа инсулинова резистентност (Kim et al., 2010).

Съществените разлики в патофизиологията на НГГ и НГТ обясняват и защо простото измерване на глюкозата на гладно е недостатъчен скринингов метод при подрастващи и възрастни жени със СПЯ. Тъй като преобладаващият метаболитен дефицит при СПЯ засяга периферната инсулинова чувствителност, а не толкова чернодробната глюконеогенеза, по-голямата част от нарушенията на въглехидратната обмяна при това заболяване се извяват именно като НГТ, а не като изолирана НГГ. Хиперандрогенемията и затлъстяването, от своя страна, изглежда допринасят допълнително за влошаване на чернодробната инсулинова чувствителност, което би могло да обясни защо ИТМ, а не самата диагноза СПЯ, се очертава като по-силен предиктор на НГГ при подрастващите в проучването на Javed и съавт. (Javed et al., 2015; Kim et al., 2010).

Базирайки се на данните от гореописаните проучвания и недостатъчната диагностична стойност на НГТ за установяване на нарушения на глюкозната хомеостаза можем да препоръчаме включването на ОГТТ към диагностичния алгоритъм за СПЯ в юношеска възраст, независимо от ИТМ на пациентките.

В настоящото изследване, след коригиране за ИТМ и възраст се установиха положителни корелации между нивото на инсулина и хипергликемията на гладно ($r=0,617$, $p<0,001$), HOMA-IR и FGS ($r=0,436$, $p=0,013$) HOMA-IR и хипергликемията на гладно ($r=0,709$, $p<0,001$). При проведения линеен регресионен анализ за намиране на причинно-следствена връзка между хиперандрогенията, КГ, инсулина и HOMA-IR не се установи значимо влияние на андрогените върху глюкозната хомеостаза. Този резултат се различава от описаните в литературата. В редица проучвания (напр. Zhang и съавт.) FAI се асоциира независимо с честотата на НГТ и с показатели на ИР дори след коригиране за възраст, ИТМ и обиколка на талията (Zhang et al., 2018). Възможно обяснение за тази разлика е фактът, че повечето изследвания, установяващи значима връзка между андрогените и глюкозната обмяна, разглеждат стойностите на КГ на 120-та минута при ОГТТ, докато при изследване единствено на показателите на гладно (какъвто е случаят в настоящето проучване) тази връзка обикновено отслабва или изчезва, тъй като хиперандрогенемията засяга предимно периферната инсулинова чувствителност, която се проявява по-отчетливо след глюкозно натоварване (Baculescu et al., 2025; Zhang et al., 2018).

При отчитане на влиянието на показателите на глюкозната хомеостаза върху андрогените и SHBG се установи значимо влияние на HOMA-IR и нивото на инсулина върху SHBG. Проведеният линеен регресионен анализ показва, че HOMA-IR и нивото на инсулина оказват статистически значимо отрицателно влияние върху нивата на SHBG. Понижението на SHBG води до повишаване на нивото на свободния тестостерон и засилване на проявите на хиперандрогения.

Тези резултати съответстват на данните в литературата. Например, в проучване на Biernacka-Bartnik и съавт. се установява умерена отрицателна корелация между HOMA-IR и SHBG, като пациентки с ниски стойности на HOMA-IR имат значимо по-нисък риск от понижени нива на SHBG. Тази взаимовръзка се обяснява с потискащото действие на компенсаторната хиперинсулинемия върху чернодробната синтеза на SHBG, тъй като

HOMA-IR отразява предимно чернодробната, а не мускулната инсулинова резистентност (Biernacka-Bartnik et al., 2023).

5.4. Липиден метаболизъм и CRP

Нарушенията на липидния метаболизъм са чести при СПЯ и се дължат на комбинирания ефект на затлъстяването, инсулиновата резистентност и хиперандрогенизма. Най-честите установявани нарушения на липидната обмяна при жените със СПЯ са хипертриглицеридемия, повишени нива на LDL- и VLDL-холестерол и понижено ниво на HDL-холестерол (Osibogun et al., 2020). Затлъстяването, чрез свързаната с него инсулинова резистентност и хиперинсулинемия е основен фактор за развитие на дислипидемия, изразяваща се в повишена продукция на триглицериди. От друга страна, хиперандрогенията води до активиране на гени, свързани с разграждането на HDL-холестерола (Diamanti-Kandarakis et al., 2007).

В настоящото проучване при всички участнички бяха изследвани липиден профил (общ, LDL- и HDL-холестерол и триглицериди) и CRP, като маркери за СС риск. При проведените анализ на резултатите не се установяват значими разлики в показателите на мастната обмяна и нивото CRP между трите групи. За да се определи честотата на дислипидемията при всички участнички бяха използвани критериите за юношеска възраст на NHLBI за хиперхолестеролемия (общ холестерол $\geq 5,17$ mmol/l), хипертриглицеридемия (триглицериди $\geq 1,47$ mmol/l), повишен LDL-холестерол (LDL $\geq 3,36$ mmol/l) и нисък HDL-холестерол (HDL $\leq 1,03$ mmol/l) (NHLBI Guidelines, 2011).

В нашето проучване хипертриглицеридемията се оформи като най-честото нарушение на липидната обмяна и при девойките със СПЯ, и при здравите контроли - $n = 9$ (25 %) срещу $n = 3$ (20 %), без статистически значима разлика между двете групи ($p = 0,283$). Пониженият HDL-холестерол е второто по честота нарушение на липидната хомеостаза в групата на СПЯ, което се регистрира при 16,7 % от пациентките ($n = 6$). При здравите контроли, нисък HDL се установи при 6,7 % ($n = 1$), като отново статистическата разлика между двете групи е незначима ($p = 0,323$). Разликата в честотата на повишения LDL между двете групи също е незначима ($p = 0,666$) – 1 момиче със СПЯ (2,8 %) и 1 здрава контрола (6,7 %). Повишен общ холестерол се установи при 8,3 % от момичетата със СПЯ ($n = 3$) и при 6,7 % от здравите контроли ($n = 1$), като разликата отново е статистически незначима

($p=0,698$). В контролната група на момичета с идиопатичен хиперандрогенизъм не се установяват нарушения на липидната обмяна.

В групата на СПЯ, след коригиране на влиянието на възрастта и ИТМ се установи умерена положителна корелация на нивата на общия холестерол и триглицеридите ($r=0,434$, $p<0,05$) и силна положителна корелация на общия холестерол и LDL ($r=0,894$, $p<0,001$). ТГ показват умерена обратнопропорционална корелация с HDL ($r=-0,465$, $p<0,05$), а HDL – умерена отрицателна корелация с нивото на инсулина ($r=-0,413$, $p<0,05$) и умерена положителна корелация с нивото на SHBG ($r=0,447$, $p<0,05$). От всички изследвани липидни фракции, единствено при LDL се намери умерена правопрпорционална корелация с тестостерона ($r=0,472$, $p<0,05$).

При проведения множествен регресионен анализ в групата на СПЯ не се установи влияние на андрогените върху нивата на липидите и CRP. Върху нивата на ТГ значимо положително влияние оказват показателите за генерализирано и абдоминално затлъстяване (ИТМ и ОТ) и нивото на инсулина, а върху нивата на HDL положително влияние оказва SHBG, а отрицателно влияние – ИТМ, ОТ и инсулина.

Установяването на по-високи нива на триглицеридите и по-ниски на HDL в настоящото изследване отчасти съответстват на публикуваните от Fruzzetti и съавтори данни. При изследване на 120 девойки със СПЯ и 30 здрави контроли авторите установяват значимо по-високи нива на триглицеридите и по-ниски на HDL-холестерола, сходно на резултатите от нашето проучване, както и положителна и отрицателна корелация на тези липиди със свободния тестостерон и FAI (Fruzzetti et al., 2009). Липсата на статистически разлики в нивата на липидите между групите в нашето изследване и липсата на корелация с FAI най-вероятно се дължи на по-малкия брой на участниците.

В най-актуалният мета-анализ по темата, обединяващ 13 проучвания и 1789 девойки на възраст 10–20 г., диагностицирани изключително по специфичните за юношеска критерии за СПЯ, Tu и съавтори намират, че СПЯ групата има значимо по-високи стойности на триглицериди спрямо контролите, докато не се установяват статистически значими разлики по отношение на HDL-холестерола (Tu et al., 2026). Тези резултати са в съответствие с настоящото проучване, макар разликата да не достига статистическа значимост (вероятно поради по-малкия брой на участниците). Липсата на значима разлика в HDL-холестерола между групите се повтаря и в двата анализа, а

хипертриглицеридемията се откроява като най-чувствителния по отношение на СПЯ липиден показател.

Установената липса на корелация между хиперандрогенията и липидните нарушения в настоящето проучване съответства на съвременните схващания, че основният фактор за дислипидемия при СПЯ е затлъстяването и свързаната с него инсулинова резистентност, докато хиперандрогенията има независим и по-малък ефект, най-вече по отношение на HDL (Guo et al., 2022).

В настоящото изследване, като втори по честота маркер за повишен СС риск след хипертриглицеридемията в групата на пациентките със СПЯ се оформи повишеният CRP $\geq 3,0$ mg/l. Такъв се установи при 19,4 % от девойките със СПЯ ($n = 7$) и 13,3 % от здравите контроли ($n = 2$), като статистическата разлика между групите е незначима ($p=0,373$). Не се намериха корелации между CRP и показателите на въглехидратната и липидната обмяна, както и връзка между CRP и андрогените.

Липсата на значима разлика в CRP между групите и липсата на корелация с андрогените в настоящото изследване съвпадат с данните от проучване при индийски подрастващи момичета, при което CRP показва по-висока тенденция при пациентките със СПЯ, но без статистическа значимост спрямо контролите, а значима положителна корелация се установява единствено с ИТМ (Ganie et al., 2014). Авторите достигат до извода, че CRP е свързан по-скоро с телесното тегло, отколкото със самия СПЯ. Това контрастира с данните при възрастни жени, където CRP е значимо по-висок при СПЯ. В проучване, включващо 116 жени със СПЯ и 94 контроли, Boulman и съавт. установяват, че 36,8% от пациентките със СПЯ имат CRP над 5 mg/l, срещу само 9,6% от контролите (Boulman et al., 2004). Вероятно, причината за тази разлика с установените в юношеската възраст данни, е че системното нискостепенно възпаление, свързано с хроничната инсулинова резистентност, все още не се е изявило клинично в този по-ранен етап на заболяването. Проучване при жени със СПЯ без затлъстяване и ИР установява, че при тях CRP не се различава от контролите въпреки значимо по-високия FAI, което сочи, че CRP се повишава предимно при съпътстващо затлъстяване, а не директно вследствие на хиперандрогенията (Butler et al., 2023).

6. Поликистична морфология на яйчниците (ПКМЯ)

Ултразвуковата ПКМЯ е образ на хистопатологичните промени на яйчниците при СПЯ, изразяващи се в наличие на голям брой малки антрални фоликули с арест в развитието им в преовулаторен стадий. В диагностичните алгоритми за СПЯ при подрастващи, ПКМЯ не се препоръчва като диагностичен критерий поради няколко причини. При подрастващи момичета е невъзможно използването на трансвагинален трансдюсер, а трансабдоминалният достъп не е достатъчно информативен относно броя на антралните фоликули. Ячниковият обем в юношеска възраст е по-голям отколкото при зрели жени, а мултикистичен образ на яйчниците се приема за вариант на нормата до 8 години след менархе и не е свързан с хиперандрогенизъм. Така около 1/3 до 1/2 от здравите подрастващи момичета покриват критериите за ПКМЯ, без да имат СПЯ (Peña et al., 2020; Rosenfield, 2015). Поради тези особености се препоръчва ПКМЯ да се използва само като допълнителен критерий при диагнозата на СПЯ, като ячниковият обем е по-подходящ от броя на фоликулите. За увеличен над > 2 SD се приема обем яйчниците над 12 ml (Ibanez et al., 2017; Rosenfield, 2015).

В настоящото проучване не се установява значима разлика в обемите на яйчниците и наличието на ПКМЯ между групите. При проведения множествен корелационен анализ с отчитане на влиянието на възрастта, се установи единствено вече описаната положителна корелация с АМН, но не и корелации с клиничния и биохимичния хиперандрогенизъм, както и с метаболитните показатели.

Липсата на значима разлика в обемите на яйчниците и наличието на ПКМЯ между групите в настоящото проучване е добре документирана и очаквана находка в литературата. Обзорна статия отбелязва, че обемът на яйчника достига максимума си 1,2–3,8 години след менархе, като през този период броят на фоликулите и обемът на яйчника могат значително да се припокриват между подрастващи със СПЯ и здрави контроли (Welt et al., 2013). Международното ръководство за диагностика на СПЯ при подрастващи препоръчва избягване на УЗ изследване до 8 години след менархе поради това припокриване с нормалната пубертетна физиология и ниската специфичност на ПКМЯ за диагноза на СПЯ в тази възрастова група (Bahreiny et al., 2023).

7. МикроРНКи (miRNA)

През последните години редица проучвания обръщат внимание върху диагностичния потенциал на различни микроРНКи (miRNA) като биомаркери за СПЯ или свързаните с него метаболитни нарушения, но главно при жени в репродуктивна възраст. Броят на проучванията, засягащи юноши със СПЯ е силно ограничен.

В настоящото проучване бяха изследвани 6 предварително подбрани miRNA - miR-451a, miR-15a-5p, miR-320-5p, miR-28-5p, miR-103a-5p и miR-194-5p. От тях, miR-451a, miR-194-5p и miR-15a-5p са изследвани при девойки, а останалите на са изследвани при СПЯ до настоящото проучване.

При анализа на подбраните miRNA се установи, че четири от тях са с различна експресия при пациентките със СПЯ в сравнение с контролните групи. MiR-320a-5p, miR-103a-5p, miR-15a-5p и miR-194-5p са свръхекспресирани при пациентките със СПЯ в сравнение със здравите контроли, а miR-15a-5p е повишена при девойките със поликистоза и в сравнение с групата на хиперандрогенните контроли. При останалите две микроРНКи, miR-451a и miR-28-5 не се намират статистически значими разлики в експресията между трите изследвани групи.

От четирите свръхекспресирани miRNA при девойките със СПЯ miR-320-5p и miR-103a-5p показват най-висока специфичност и чувствителност за диагностициране на синдрома (76 % чувствителност, 100 % специфичност), следвани от miR-15a-5p (76 % чувствителност, 91 % специфичност), като тези miRNA биха могли да се използват като независими диагностични маркери при пациентки със заболяването. В допълнение, miR-15a-5p показва много добър профил на чувствителност при разграничаването на девойки със СПЯ не само от здравите момичета, но и от пациентките с идиопатичен хиперандрогенизъм (82 % чувствителност, 75 % специфичност).

Първото публикувано изследване на нива на miRNA при пациенти в юношеска възраст е на Diaz и колектив. То включва 31 момичета със СПЯ, без затлъстяване, и 13 контроли. MiR-451a, miR-652-3p, miR-106b-5p и miR-206 са със значително понижена експресия при момичетата със СПЯ в сравнение с контролите (Diaz et al., 2020). Авторите установяват, че miR-451a е 100% чувствителна и 100% специфична, miR-652-3p е 81% чувствителна и 100% специфична, а miR-106b-5p е 100% чувствителна и 85% специфична за

диагностициране на СПЯ. За miR-451a, miR-652-3p, miR-106b-5p и miR-206 авторите намират обратна корелация със степента на андрогенен излишък и НОМА-IR и положителна корелация с нивата на SHBG (Diaz et al., 2020). В настоящото проучване не се откриха значими разлики в относителните нива на експресия на miR-451a при пациентките със СПЯ и контролите и не се потвърдиха описаните корелации. Въпреки че, броят и възрастта на участничките в двете проучвания са сходни, в нашето проучване по-голямата част от участничките са наднормено тегло и затлъстяване, което вероятно допринася за разликата в резултатите.

В проучване при жени със СПЯ, Udesen и съавтори установяват значително понижена експресия на серумните нива на miR-28-3p, miR-103a-3, miR-139-5p и miR-376a-3p. Авторите намират корелации на miR-28-3p и miR-139-5p с общия тестостерон и съотношението LH:FSH. MiR-28-3p показва специфичност от 100% и чувствителност от 59% за диагностициране на СПЯ, като има съобщения, че тази miRNA е свързана с пролиферацията на гранулоза клетките (Udesen et al., 2023). В настоящото проучване се оцени относителната експресия на miR-28-5p, за която също се съобщава, че е свързана с пролиферацията на гранулозните клетки и е установена като дисрегулирана при овариални и други видове карциноми (Meng et al., 2019), но не се откриха значими разлики в относителната ѝ експресия при пациентките и контролните групи.

MiR-320 участва в метаболизма на глюкозата и липидите и е потенциален биомаркер за свързани метаболитни нарушения (Du et al., 2021). При няколко проучвания на експресията на miR-320 при жени със СПЯ са установени разнопосочни резултати. Например, Krentowska и съавт. установяват ниски серумни нива на експресия на miR-320 при жени със СПЯ в сравнение със здрави контроли и корелации с КГ на гладно, нивата на инсулин и НОМА-IR, независимо от възрастта, ИТМ и нивата на андрогените (Krentowska et al., 2024). Rashad и колектив също установяват по-ниски серумни нива на експресия на miR-320 при пациентки със СПЯ в сравнение със здрави контроли, както и отрицателна корелация със серумния инсулин на гладно, НОМА-IR и фенотипа на СПЯ. Според авторите, чувствителността на серумните нива на експресия на miR-320 за диагностициране на СПЯ е 80 %, а специфичността - 97,5 % (Lewy et al., 2001). От друга страна, Soyman и съавт. не откриват значими разлики в нивата на експресия на miR-320

при 50 жени със СПЯ и 50, съответстващи по ИТМ и възраст здрави контроли (Soyman et al., 2022).

В настоящото проучване се оцениха нивата на miR-320-5p, член на семейството miR-320, която до момента не е изследвана при СПЯ. MiR-320-5p (и miR-320) е описана като туморен супресор, влияещ върху клетъчната пролиферация и миграция (Li et al., 2021). При СПЯ се установява значителна степен на пролиферация и ниска степен на апоптоза на гранулоза клетките, което е свързано с абнормна фоликулогенеза, водеща до ановулация (Ruiz-Manriquez et al., 2022). В нашето изследване miR-320-5p е значимо свръхекспресирана при пациентките със СПЯ в сравнение със здравите контроли ($p = 0,0006$). Тя показва също тенденция към свръхекспресия в групата със СПЯ в сравнение с групата на хиперандрогенните контроли ($p = 0,079$). В групата със СПЯ miR-320-5p корелира положително с FGS и CRP и отрицателно с нивото на глюкозата. При проведения регресионен анализ се установи, че САН оказва положително влияние върху нивото на miR-320-5p.

При хората, miR-103 е установена в кръвта и гранулоза клетките на яйчника и участва в стероидната синтеза, инсулиновия сигнален път и фоликулогенезата (De Nardo Maffiazioli et al., 2022; Sørensen et al., 2014). Murri и съавт. установяват понижена експресия на miR-103 при жени със затлъстяване, но повишена експресия при пациентки със СПЯ, както и положителна корелация с концентрациите на тестостерон (Murri et al., 2013). De Nardo Maffiazioli и колектив съобщават за намалена експресия на miR-103a-3p и положителна корелация с нивата на андрогените при 36 бразилски жени със СПЯ (De Nardo Maffiazioli et al., 2022). В нашето проучване изследвахме експресията на miR-103a-5p, която до момента не беше оценявана при пациентки със СПЯ. Подобно на Murri и колектив, установихме значимо повишена експресия в групата със СПЯ в сравнение със здравите контроли ($p = 0,0005$), но без значими разлики в експресията в сравнение с групата на хиперандрогенните контроли ($p = 0,061$). В групата със СПЯ miR-103a-5p показва положителна корелация със САН и косопада и, за разлика от гореспоменатите проучвания, липса на корелации с други метаболитни параметри и нивата на андрогените. При проведения множествен регресионен анализ се установи значимо положително влияние на CRP върху експресията на miR-103a-5p. CRP е валидиран като фактор за повишен сърдечно-съдов риск, заедно с повишените нива на LDL холестерол (Wong et al.,

2022), и в редица проучвания е намерен повишен при пациентки със СПЯ (Rudnicka et al., 2021).

MiR-194 е установена като повишено експресирана в гранулоза клетките на жени със СПЯ и в модели на СПЯ при плъхове, където индуцира апоптоза (Wu et al., 2021). Jiang и съавт. в своето проучване, включващо 65 жени със СПЯ с нарушен глюкозен метаболизъм, 65 жени със СПЯ с нормален глюкозен метаболизъм и 45 здрави жени, установяват, че miR-194 е свръхекспресирана при жени със СПЯ и корелира с НОМА-IR (Jiang et al., 2016). Подобно на тези резултати, в настоящото изследване намерихме значителна свръхекспресия на друга miRNA от семейството miR-194. MiR-194-5p е значително свръхекспресирана при пациентките със СПЯ в сравнение със здравата контролна група и показва 65% чувствителност и 81% специфичност за диагностициране на СПЯ. Не се установиха значителни разлики в експресията ѝ в сравнение с групата на хиперандрогенните контроли. В групата на СПЯ miR-194-5p корелира положително със САН, а при проведения регресионен анализ се намери, че нивото ѝ се влияе значимо от CRP. В литературата се съобщава, че miR-194-5p има регулаторна роля при различни видове рак и е предложена като биомаркер за карцином на гърдата (Yen et al., 2021), но, доколкото ни е известно, не е била оценявана или съобщавана при пациентки със СПЯ до момента.

MiR-15a-5p е установена като значително свръхекспресирана в плазмата и туморната тъкан на пациентки с ендометриален карцином (ЕК) и е идентифицирана като обещаващ биомаркер за ранното му откриване. Намерена е връзка между нивото ѝ и тестостерона, който е повишен при СПЯ, както и корелация с DHEA-S (Du et al., 2021). Тези находки определят избора за изследване на miR-15a-5p в настоящото проучване. Тя се намери значително свръхекспресирана в групата със СПЯ в сравнение с двете контролни групи ($p = 0,006$ и $p = 0,045$), но показва по-висока специфичност при разграничаването на пациентки със СПЯ от здрави контроли, отколкото при разграничаването на пациентки със СПЯ от групата на хиперандрогенните контроли. Освен това, miR-15a-5p показва значителна положителна корелация с FGS в групата на СПЯ. При проведения регресионен анализ се установи значимо положително влияние на някои от показателите за СС риск (САН и CRP) върху експресията на тази miRNA.

В заключение, в настоящото проучване бяха установени четири значително свръхекспресирани miRNA при девойките със СПЯ. MiR-320-5p и miR-103a-5p показаха оптимални характеристики за диагностични маркери за СПЯ, следвани от miR-15a-5p, като тези miRNA биха могли да се използват като потенциални независими диагностични биомаркери за заболяването. Допълнително, miR-15a-5p показва също много добър профил на чувствителност при разграничаването на пациентки със СПЯ от момичета с други хиперандрогенни състояния. Полезността на тези биомаркери за клиничната практика трябва да бъде валидирана чрез допълнителни проучвания, включващи повече пациентки и здрави контроли. Точната роля на тези miRNA за етиопатогенезата на СПЯ и корелацията им със свързаните със СПЯ съпътстващи заболявания трябва да бъдат допълнително изяснени.

ЧАСТ VI. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

По задача 1

- 1.1. Олигоменореята е основна клинична проява на СПЯ в юношеска възраст и се установява при всички пациентки.
- 1.2. Пациентките със СПЯ са с изразени прояви на клиничен хиперандрогенизъм, като най-чест е хирзутизмът, следван от себорея и акне. Андрогенната алоpecia е много рядка хиперандрогенна проява в юношеска възраст.
- 1.3. Ferriman-Gallwey скорът е значимо по-висок при девойки със СПЯ в сравнение с момичета без синдрома. $FGS \geq 6$ може да разграничи пациентките със СПЯ от здравите момичета с добра чувствителност. FGS корелира положително с хирзутизма, НОМА-IR и нивото на инсулина, като НОМА-IR е статистически значим предиктор за тежестта на хирзутизма.
- 1.4. Наднормено тегло и затлъстяване се установяват при 2/3 от момичетата със СПЯ.
- 1.5. Acanthosis nigricans се среща значимо по-често при девойките със СПЯ и корелира положително със затлъстяването, клиничния хиперандрогенизъм, артериалното налягане и дислипидемията и негативно със свързващия половите хормони глобулин.
- 1.6. Девойките със СПЯ имат значимо по-високи нива на тестостерон и андростендион, както и значимо по-висок индекс на свободни андрогени (FAI) в сравнение със здравите момичета.

По задача 2

- 2.1. Като маркер с най-висока специфичност (90 %) и чувствителност (72 %) при разграничаване на пациентките със СПЯ от здравите момичета се представи FAI с прагова стойност (cut-off) от 6,2.
- 2.2. Прагова стойност на андростендион от 11,6 nmol/l разграничава девойките със СПЯ от здравите контроли с висока специфичност (100 %) и добра чувствителност (69 %).
- 2.3. АМН с cut-off от 23,6 pmol/l (3,3 ng/ml) разграничава пациентките от здравите контроли с висока чувствителност (86 %) и добра специфичност (65 %).
- 2.4. FAI, андростендион и АМН са подходящи за включване към общия панел от диагностични критерии за СПЯ в юношеска възраст.

По задача 3

3.1. Общият яйчников обем се явява значим предиктор на нивото на АМН.

3.2. Не се намират корелации между нивото на АМН, андрогените, метаболитните и СС показатели.

3.3. За андростендион и FAI не се намират корелации и причинно-следствени връзки с метаболитните и СС показатели.

По задача 4

4.1. Повишено систолно и/или диастолно АН се установява при почти половината от девойките със СПЯ и корелира положително с наличието на затлъстяване, acanthosis nigricans, НОМА-IR, нивото на инсулин, както и отрицателно с нивото на SHBG.

4.2. Честотата на нарушенията на глюкозната хомеостаза е висока при девойките със СПЯ като най-чести са инсулинова резистентност (ИР) и хиперинсулинемията на гладно. Повишена гликемия на гладно се установява рядко. В нашата изследвана група не регистрирахме пациентки с тип 2 захарен диабет.

4.3. Хипертриглицеридемията е най-честото нарушение на липидната обмяна при девойките със СПЯ и се установява при 1/4 от тях. Следващото по честота нарушение е пониженият HDL-холестерол, следван от хиперхолестеролемията и повишения LDL-холестерол.

4.4. TG, HDL и LDL следват известните закономерности при затлъстяване и СПЯ при възрастни, включително влиянието им върху SHBG.

4.5. Не се установи статически значимо влияние на андрогените върху липидните нарушения.

По задача 5

5.1. При девойките със СПЯ miR-320-5p и miR-103a-5p показват най-висока специфичност (100 %) и чувствителност (76 %) за диагностициране на заболяването. 5.2. MiR-15a-5p разграничава пациентки от здрави момичета с 91 % специфичност и 76 % чувствителност.

5.3. MiR-15a-5p показва и много добър профил на чувствителност при разграничаването на девойки със СПЯ от други хиперандрогенни състояния (75 % специфичност, 82 % чувствителност).

5.4. В комбинация тези miRNA биха могли да се използват като независими диагностични маркери при пациентки със СПЯ.

5.5. При miRNA с диагностично значение за СПЯ се доказаха положителни връзки със систолното артериално налягане (САН), FGS CRP.

5.6. Не се установяват причинно-следствени връзки между експресията на miRNA и хиперандрогенията, нарушенията на глюкозната и липидната обмяна, както и яйчниковата морфология.

ЧАСТ VII. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Научният проект е първият в страната и втори в световен мащаб, изследващ експресията на избрани микроРНКи при девойки със СПЯ и контролни групи.
2. Настоящият научен труд е първият в страната и в световен мащаб, изследващ експресията на miR-320a-5p, miR-103a-5p, miR-15a-5p и miR-194-5p при девойки със СПЯ и определящ тяхната чувствителност и специфичност като диагностични маркери за СПЯ.
3. Настоящото проучване е първото за страната и едно от малкото в световен мащаб, определящо най-чувствителната и специфична диагностична прагова стойност на АМН при подрастващи момичета със СПЯ.
4. Настоящото проучване е първото за страната и едно от малкото в световен мащаб, определящо най-чувствителната и специфична диагностична прагова стойност на андростендион и FAI при подрастващи момичета със СПЯ.
5. Това е първото за страната проучване, което разглежда всеобхватно СПЯ в юношеска възраст, включително с подробна клинична и лабораторна оценка.
6. Настоящото изследване е първото за страната, определящо честотата на наднормено тегло, затлъстяване, метаболитни и сърдечно съдови нарушения при девойки със СПЯ.
7. Настоящият научен труд дава възможност да се обогати диагностичният алгоритъм за СПЯ при девойки под 18 годишна възраст с нови високоспецифични и чувствителни биомаркери.

ЧАСТ VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящият дисертационен труд разглежда всеобхватно и в дълбочина клиничните и лабораторните характеристики на СПЯ в юношеска възраст, както и честотата на свързаните с него коморбидности и усложнения, някои от които вече са налице в тази млада възрастова група. Получените данни биха спомогнали за подобряване на комплексната грижа за момичетата със заболяването и намаляването или предотвратяването на бъдещи негативни последици върху цялостното здравословно състояние на пациентките.

Научното изследване обогатява и набора от маркери за по-ранна и сигурна диагностика на СПЯ в юношеска възраст, когато настоящите валидни диагностични критерии се припокриват с физиологични феномени, характерни за пубертета.

Основно ограничение на настоящият научен труд е сравнително малкият размер на контролните групи ($n = 15$ и $n = 8$) спрямо пациентската извадка ($n = 36$), което води до ненапълно балансиран дизайн. Това ограничение беше наложено от строгите критерии за подбор на клинично здрави момичета. За да се минимизира влиянието върху статистическата мощност, се приложиха консервативни непараметрични методи за анализ.

Поради относително ограничения общ брой на участниците ($n = 59$), резултатите трябва да се интерпретират с известна предпазливост, тъй като може да не отразяват напълно характеристиките на цялата популация. Въпреки това, получените резултати съвпадат с тенденциите в световната литература и служат за добра база за бъдещи по-мощни проучвания.

В заключение, настоящата дисертационна разработка предоставя ценни данни за СПЯ в юношеска възраст и обогатява набора от диагностични критерии за заболяването. За потвърждаване на тези констатации са необходими бъдещи мултицентрични изследвания с по-големи и балансирани извадки.

ЧАСТ IX. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ, СЪОБЩЕНИЯ И УЧАСТИЯ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Пълнотекстови научни публикации:

1. Mladenov, V.; Radanova, M.; Galcheva, S.; Iotova, V. Selected microRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers in Polycystic Ovary Syndrome in Adolescent Girls. *Appl. Sci.* 2025, 15, 2772. <https://doi.org/10.3390/app15052772>
2. Mladenov, V., Radanova, M., & Iotova, V. (2024). Polycystic ovary syndrome in adolescents—controversial diagnostic criteria and potential new biomarkers. *Scripta Scientifica Medica*, 56(2), 7-13.
3. Младенов, В., С. Галчева, Т. Карамфилова, В. Йотова. Хиперандрогенизъм при момичета в пубертетна възраст – сравнение на клинични, биохимични и хормонални характеристики. *Наука Ендокринология*, Брой 2 (77) / 2023, стр. 73
4. Младенов, В. "Съвременни аспекти на диагностиката и лечението на синдрома на поликистоза на яйчниците при подрастващи." *Pediatrics* 62.1 (2022): 14.

Международни участия:

1. Mladenov V, Galcheva S, Radanova M, Iotova V. Comparison between, clinical, metabolic and hormonal parameters and selected microRNAs in adolescent girls with PCOS and healthy controls. 62nd Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE), Liverpool, United Kingdom, November 16–18, 2024.

Участия в България:

1. В. Младенов, М. Раданова, В. Йотова. Нови биомаркери за диагностика на синдрома на поликистоза на яйчниците в юношеска възраст. Доклад на XIII Национален конгрес по ендокринология, 02-05.10.2025 г., Пловдив
2. В. Младенов. Потенциални нови диагностични биомаркери за синдром на поликистоза на яйчниците в юношеска възраст. Доклад на XVII национална конференция по клинична лаборатория, 18-20.09.2025 г., Варна

3. В. Младенов. Нови биомаркери за яйчникова поликистоза в юношеска възраст.
Доклад на деветата педиатрична среща „С грижа за децата“, 24-27.04.2025 г.,
Свети Влас

БЛАГОДАРНОСТИ

На всички участнички в проучването и техните родители.

На научния ми ръководител проф. д-р Виолета Йотова, д.м.н. за идеята, съдействието и съветите.

На проф. Мария Раданова, д.б. за идеите и помощта.

На доц. д-р Соня Галчева, д.м. за съветите и помощта.

На проф. д-р Яна Бочева, д.м. за нововъведенията в клиничната лаборатория.

На ръководството и служителите на УМБАЛ „Света Марина“ и Медицински университет „Проф. д-р Параскев Стоянов“ за осигуряването на условия, финансиране и помощ за осъществяването на научния проект.

На колегите от Първа детска клиника, Клиниката по образна диагностика и Клинична лаборатория.