



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - ПЛОВДЕН

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

Катедра „Химия и биохимия“

Светла Петрова Асенова

**ПРИЛОЖЕНИЕ НА АНАЛИТИЧНИ МЕТОДИ ЗА
ОЦЕНЯВАНЕ НА ВРЪЗКАТА МЕЖДУ КОСТНА
ПЛЪТНОСТ, НИВА НА БИОГЕННИ ЕЛЕМЕНТИ И НА
ОКСИДАТИВЕН СТРЕС ПРИ ОСТЕОПОРОЗА**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД

за присъждане на образователната и научна степен „доктор”

Професионално направление *4.2. Химически науки*

Докторска програма: „Аналитична химия”

Научен ръководител:

доц. Радка Томова, дх

Научен консултант:

доц. Бисера Атанасова, дм

Плевен, 2024 г.

Дисертационният труд е представен на 208 страници. Съдържа 39 фигури, 44 таблици и 5 графики. Библиографията обхваща 174 източника, като са включени и 7 приложения.

Докторантът работи като преподавател в сектор „Химия“ при Медицински университет – Плевен.

Проби от серум са предоставени от Ревматологичен център „Света Ирина“ - София.

Пробите са взети в съответствие с изискванията за осигуряване на качеството на клиничните лабораторни анализи.

Атомно-абсорбционният анализ за определяне на калций, мед, цинк, магнезий и желязо са проведени в Клинична лаборатория на Университетска болница „Александровска“ – София.

Спектрофотометричният анализ за определяне на оксидативен стрес е проведен в научна лаборатория на МУ– София, катедра „Медицинска физика и биофизика”.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 19.09.2024 г. от 13⁰⁰ ч. в 113 зала на Факултет Фармация, Медицински университет гр. Плевен

СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ

Съкращения на български език

КА - кластерен анализ

АГК - анализ на главните компоненти

ААС - атомно-абсорбционна спектроскопия

АОА - антиоксидантна активност

Съкращения на латиница

DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry) – двойноенергийна рентгенова абсорбциометрия

BMI - индекс на телесната маса

BMD - костна минерална плътност

T-Score - броят на отклоненията от стандарта за костна плътност – средната стойност за здрави хора на възраст 30-години от същия пол

TE - тролокс еквивалент

RSA - радикал улавяща активност

ROS - активни кислородни видове

СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение	5
Цел и задачи на дисертационния труд	6
Материал и методи	7
Резултати и обсъждане	9
1. Изследване на нивото на оксидативен стрес.....	9
2. Изследване на зависимостите между средните стойности на биогенните елементи, AOA и BMD.....	10
3. Корелационен и регресионен анализ	12
4. Многовариационен статистически анализ за определяне на връзката между BMD, концентрации на Ca, Cu, Mg, Zn, Fe и AOA при пациенти	16
5. Многовариационен статистически анализ за определяне връзката между BMD на бедро, Cu, Mg, Zn и AOA при пациенти и контроли	25
6. Многовариационен статистически анализ за определяне връзката между BMD на лумбални прешлени, Cu, Mg, Zn и AOA при пациенти и контроли	31
7. Многовариационен статистически анализ за определяне връзката между намалението на BMD и анкетни данни, свързани с менопауза, употреба на цигари, кафе и млечни продукти при пациенти с остеопороза	36
8. Многовариационен статистически анализ за определяне на връзката между: намалена BMD при пациенти с <i>различна локализация на остеопения и остеопороза</i> , концентрация на Ca, Cu, Mg, Zn, AOA	40
Заклучение	46
Изводи	46
Приноси	47
Научни публикации свързани с дисертацията	48

ВЪВЕДЕНИЕ

Остеопорозата е социално и икономически значимо заболяване. Тя инвалидизира голям брой хора. Огромни средства се отделят за операции от фрактури и деформации. Операциите съкращават живота на някои пациенти в напреднала възраст.

Състоянието на пациентите с остеопороза се описва от много клинични фактори едновременно, които определят степента на заболяването. Разглеждането им фактор по фактор води до ниско информационно ниво. Необходимо е полученият голям обем от данни да се класифицира и моделира. Интерпретацията на всички фактори едновременно и намирането на обективни връзки помежду им е база както за успешното диагностициране, така и за индивидуалния подход в лечението на всеки пациент. За целта към данните от различните клинично-лабораторни анализи се прилагат статистически подходи каквито са корелационният и регресионният анализ, многовариационните статистически подходи като КА и АГК.

Всички те са използвани за интерпретация на масивите от данни на болни от остеопороза и на здрави доброволци, които включват: костна плътност; избрани рутинни клинични показатели; собствени лабораторни резултати за микроелементен състав (съдържание на калций, мед, цинк, магнезий и желязо); биомаркери за нивото на оксидативен стрес в кръвен серум.

Съществуват множество фактори, които влияят върху калциево-фосфорната обмяна, особено в съчетание на негативни фактори от начина на живот, от начина на хранене и от придружаващи заболявания. Все още ролята на микроелементите мед, цинк, желязо, магнезий не е напълно изяснена. Но все повече данни говорят, че те имат съществена роля за калциево-фосфорната обмяна и за нивото на оксидативен стрес. Резултатите за нивата на биогенните елементи са получени чрез прилагането на Пламъкова ААС, а за нивото на оксидативен стрес – чрез фотометричен АВТС-анализ.

Публикуваните от други автори резултати за серумните нива на микроелементи при намалена костна плътност не са еднозначни, защото не са приложени изключващи критерии при подбора на

участниците в проучването. Липсват и изследвания на връзката между нивото на оксидативен стрес в организма, концентрацията на споменатите биогенни елементи и костната плътност.

Това ни мотивира да разработим проучване с участието на жени от българската популация, добре подбрани чрез изключващи критерии, за изясняване на влиянието на RSA и концентрациите на биогенните елементи върху BMD.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Целта на настоящия дисертационен труд е: Изследване на връзките между костна плътност, нива на биогенните елементи калций, магнезий, желязо, мед и цинк и оксидативен стрес при жени в менопауза чрез аналитични и хеометрични подходи.

Задачите на настоящия дисертационен труд са:

1. Аналитично определяне на серумните концентрации на калций, магнезий, желязо, мед и цинк, както и нивото на оксидативен стрес при пациенти с остеопороза;
2. Да се открият взаимни връзки между изследваните биогенни елементи, оксидативен стрес и костна минерална плътност чрез корелационен, регресионен и многовариационен статистически анализ;
3. Статистическо идентифициране на образци на подобие (фенотипове) сред изследваните групи от пациенти и да се дефинират дискриминиращи параметри, отговорни за формиране на групите на подобие;
4. Да се анализират резултатите от анкетно проучване за фамилна обремененост и вредни битови навици с негативен ефект върху костната плътност на жени пациенти в менопауза.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Настоящото проспективно проучване, проведено за периода от юни 2018 до 2023 г. включва общо 118 жени на възраст 62.75 ± 8.64 години от Софийски регион. При 95 от тях е диагностицирана намалена костна плътност. При останалите 23 жени е установена нормална костна плътност и е сформирана контролна група.

Изследваните групи жени са подбрани според следните критерии: жени, в менопауза или постменопауза без проведено лечение или терапия за остеопороза; без заболявания на парашитовидната жлеза, бъбречни заболявания и диабет; без системен прием на Ca, Cu, Zn, Mg, Fe, P, витамин Д и колагенови добавки. Изследваните групи индивиди нямат кръвно-родствена връзка по между си.

Проведохме експериментално-статистическото изследване със следните етапи:

- Провеждане на анкета за определяне на риска от остеопороза;
- Определяне на BMD по метода DEXA. На базата на резултата T-Score, жените са разделени в три групи: с остеопороза (под $-2,5$ SD); остеопения (между $-1,0$ и $-2,5$ SD); контролна група с нормална плътност (над $-1,0$ SD);
- Аналитично определяне на нивото на общ калций, мед, цинк, магнезий, желязо и АОА в кръвен серум.

Всеки участник в проучването е подписал информирано съгласие.

Аналитични методи

Серумните концентрации на биогенните елементи **калций, магнезий, мед, цинк и желязо** са определяни чрез пламъков ААС Perkin-Elmer AAnalyst 300 при подходящите за всеки биогенен елемент условия - разреждане на серума, подходящи добавки, сила на тока на използваната лампа - източник на монохроматичната светлина, концентрация на водния стандарт за калибрация, инструментални параметри.

АОА на серума е определена чрез спектрофотометричен АВТS-тест. Методът се основава на спектрофотометрично регистриране на промяната на абсорбцията на използвания в системата хромофор

катион-радикал ABTS^{•+} в резултат от протичането на свободно-радикалови процеси с вещества с радикал-улавяща активност. В резултат се понижават концентрацията на радикала в пробата, интензитетът на оцветяване на разтвора и измерената абсорбция. Намалението на абсорбцията съответства на RSA на пробата. За построяване на калибровъчна крива е използван RSA ефектът на водно разтворимия аналог на витамин Е – Тролокс, като се добавя различно количество стандартен разтвор на Тролокс с концентрация 1 mmol/L. Данните са използвани за преизчисляване на антиоксидантния капацитет на серума като TE.

Статистически методи

Статистическият анализ е извършен със софтуерен продукт STATISTICA 7,0.

Корелационен анализ: изчисляване на коефициента на корелация; проверка на значимостта на корелационната зависимост.

Регресионен анализ: дефиниране на регресионен модел

Методи на многовариационната статистика

КА: z – трансформация на изходните данни; определяне на Евклидовото разстояние за подобие между обектите; свързване на обектите в кластери на подобие по метода на Ward; графично представяне на получените кластери (дендрограми); определяне на статистическата значимост на кластерите по критерий на Sneath; интерпретация на кластерите по обекти и по променливи.

АГК: z – трансформация на изходните данни; определяне на оптимален брой главни компоненти (чрез scree plot); varimax rotation метод

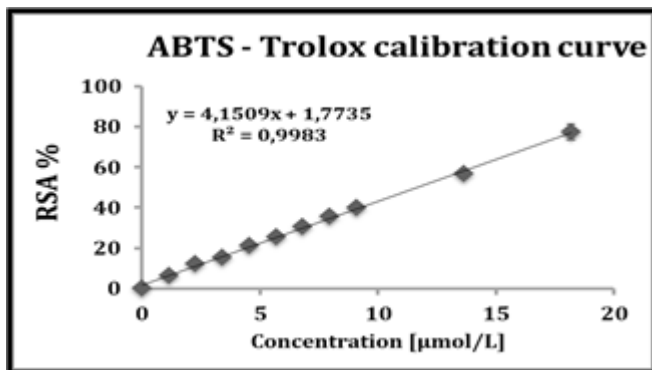
При анализа на данните са използвани и още: дескриптивен анализ; вариационен анализ; one way ANOVA.

За ниво на значимост, при което се отхвърля нулевата хипотеза, бе прието $P < 0.05$.

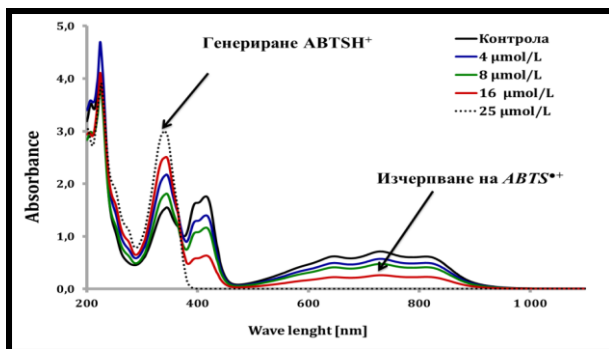
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изследване на нивото на оксидативен стрес

Първата стъпка от изследването на АОА на кръвен серум е проследяването на ефективността на стандартния референт Trolox да намалява концентрацията на използвания радикал 2,2'-азинобис (3-етилбензотиазолин-6-сулфонова киселина) при добавянето на различни концентрации на антиоксиданта. На базата от получените резултати за абсорбцията на пробите беше определен RSA за съответната концентрация и посрояване на калибровъчна графика.



Графика 1. Концентрационна зависимост на RSA на референта Trolox в моделна система, съдържаща ABTS радикал



Фигура 1. Абсорбционни спектри на ABTS радикал преди и след взаимодействието с Trolox

Получените данни показват ясно изразен ефект на нарастване на RSA с нарастване на концентрацията на референта Тролокс в пробите. При снемането на абсорбционния спектър при дължина на вълната 734 nm при максималната тествана концентрация от 25 $\mu\text{mol/L}$, е отчетена екстинкция от 0.0024, отговаряща на пълно обезцветяване и изчерпване на количеството радикал в пробата. При концентрация от 18 $\mu\text{mol/L}$ определената по формулата RSA е приблизително 80%. На фигурата като допълнителна информация са дадени аналитичния вид на уравнението описващо зависимостта между концентрацията и RSA както и R^2 . На базата на уравнението $y = 4.1509x + 1.7735$, и $R^2 = 0.9983$ се вижда много добра линейност.

Пълните резултати получени при изследването на кръвен серум на пациенти и здрави доброволци чрез ABTS метод за определяне на RSA, както и резултатите от атомно абсорбционния анализ за определяне на биогенни елементи и антропометрични показатели са предоставени подробно в дисертационния труд.

2. Изследване на зависимостите между средните стойности на биогенните елементи, общата АОА и BMD

В изследването включихме 83 участници, които са близки по възраст и BMI. Така направената извадка от изследваната популация намалява влиянието на възрастта и BMI при проучването на биогенните елементи и общата антиоксидантна активност, и улеснява сравняването им между изследваните групи.

За изследване взаимовръзката на мед и цинк въвеждаме нов показател K - отношението $Cu, \mu\text{mol/L}/Zn, \mu\text{mol/L}$

Таблица 1. Средни стойности ($\pm SD$) на серумно ниво на Cu, Zn, Mg и АОА

Параметър	Общо	Пациенти с намалена BMD	Пациенти с остеопения	Пациенти с остеопороза	Контроли
Брой пациенти	83	71	18	53	12
Възраст	63.57 \pm 8.07	64.18 \pm 7.96	64.44 \pm 9.33	64.09 \pm 7.54	59.92 \pm 8.07

BMI	24.58 ± 3.69	24.30 ± 3.73	24.39 ± 4.33	24.27 ± 3.54	26.24 ± 3.10
BMD, g/cm ²	0.761 ± 0.152	0.709 ± 0.07	0.726 ± 0.071	0.703 ± 0.069	1.072 ± 0.135
Cu, μmol/L	21.18 ± 5.24	21.71 ± 5.43	23.21 ± 5.83	21.2 ± 5.25	18.02 ± 2
Zn, μmol/L	13.84 ± 2.46	13.95 ± 2.55	14.39 ± 3.10	13.80 ± 2.35	13.14 ± 1.80
$Zn, \frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} / \text{BMI}$	0.5751 ± 0.1307	0.5866 ± 0.1329	0.6103 ± 0.1728	0.5785 ± 0.1173	0.5073 ± 0.0954
$K = \text{Cu}/\text{Zn}$	1.58 ± 0.51	1.62 ± 0.54	1.68 ± 0.58	1.59 ± 0.54	1.39 ± 0.2
Mg, mmol/L	0.90 ± 0.17	0.92 ± 0.18	0.97 ± 0.12	0.90 ± 0.19	0.79 ± 0.09
AOA,% (TE)	68.80 ± 11.13 (6.78 ± 0.95)	71.12 ± 10.35 (7.02 ± 0.87)	67.29 ± 7.28 (6.63 ± 0.56)	72.42 ± 10.95 (7.15 ± 0.93)	55.10 ± 1.5 (5.40 ± 0.03)

По отношение на BMI и по възраст, групите нямат статистически значими разлики, въпреки ясната тенденция за намален BMI при пациентите с остеопороза.

Серумните концентрации на *мед* и *магнезий* на всички пациенти са повишени спрямо контролите и разликите са статистически значими, но няма статистическа разлика между групите с остеопороза и остеопения по тези показатели.

Наблюдавахме повишени серумни нива на *цинк* в групите с намалена костна плътност в сравнение с контролната група, като разликите не са със статистическа значимост. При включване на показателя Zn μmol/L за единица BMI отчитаме статистическо различие $p = 0.05$ между групата с намалена костна плътност и контроли.

При пациенти с нормална костна плътност съотношението мед : цинк е 1.4 а при пациенти с остеопороза е 1.6, като стойността му закономерно се променят със степента на заболяването.

Пациентите с остеопороза имат по-висока антиоксидантна активност в отговор на повишените свободнорадикални процеси в организма.

С намаляване на костната плътност се повишава нивото на RSA, в резултат на повишеното производство на ROS. По-високото ниво на радикалите вероятно усилва производството на чернодробните ензими, както е *Cu,Zn-SOD*. От друга страна кинетиката на радикаловите реакции ни дава основание да считаме, че свърхпроизводството на радикали уврежда протеиновата структура на оксиредуктазите, особено при пациенти с по-бавни биохимични механизми.

Серумната концентрация на мед е повишена при пациентите и повишава RSA. При деструкцията на металопротеините се освобождават редокс активни метални йони. По-високото ниво на радикали уврежда и клетъчните мембрани, което улеснява преминаването на свободната мед в кръвта. Повишената концентрация на медни йони в серума иницира вторични радикални процеси и повишава допълнително RSA на пациентите.

3. Корелационен и регресионен анализ

Направена е оценка на корелационните коефициенти за група от 100 пациенти с остеопороза и остеопения, описани чрез следните 9 променливи – възраст, T-score, BMI, BMD, серумно ниво на Ca, Mg, Cu, Zn и AOA. На таблица 2 са представени стойностите на корелационните коефициенти, като статистически значимите са маркирани както следва: шрифт „болд” – коефициенти, показващи значима корелация; шрифт „италикс” – коефициенти, показващи умерена корелация. Немаркираните коефициенти са статистически незначими.

Таблица 2. Корелационни коефициенти за 9 променливи

	Ca	Mg	Cu	Zn	AOA	Age	T - score	BMI	BMD
Ca	1.00								
Mg	0.05	1.00							
Cu	0.20	0.35	1.00						
Zn	- 0.11	0.30	-0.16	1.00					
AOA	0.09	0.10	-0.31	0.10	1.00				
Age	0.07	-0.05	-0.01	-0.07	0.30	1.00			
T- score	0.02	0.29	-0.01	0.12	0.62	0.29	1.00		
BMI	0.03	-0.18	-0.003	0.02	-0.32	-0.38	-0.38	1.00	
BMD	-0.01	-0.28	-0.05	-0.09	-0.54	-0.30	-0.83	0.39	1.00

Могат да се направят следните заключения:

- Ca няма значими корелации с никой от останалите променливи, така че е практически невъзможно да се потърсят причинно следствени връзки с участието на Ca;
- Mg е значимо корелиран с Cu, Zn, T-score и BMD, така че може да се предположи, че този минерален компонент може да участва в регресионен модел за множествена регресия за BMD и минерални компоненти;
- Cu е значимо корелирана с AOA;
- Zn показва значима корелация само с Mg;
- AOA е значимо корелиран с няколко други променливи – Cu, възраст, T-score, BMI, BMD, така че е реален множествено регресионен модел за връзката на AOA с костна плътност и някои други параметри;
- Параметърът „възраст” е значимо корелиран с T-score, BMI, BMD, така че и този параметър е възможна зависима променлива за регресионен модел за костна плътност;

- T-score и ВМІ са други потенциални независими променливи за регресионен модел по отношение на костна плътност (значими корелации с BMD).

От данните за корелационния анализ става ясно, че би могъл да се предложи регресионен модел (множествена регресия) за връзка между костна плътност и параметри като магнезий, АОА, T-score, ВМІ, възраст.

В настоящото изследване бе полезно да се провери дали е възможен адекватен модел за връзката между костната плътност BMD (зависима променлива) и една или няколко независими променливи от набора с данни. Целта е да се получи удобен начин за предсказване на костната плътност на пациенти като функция на лесно достъпни независими променливи като минерални компоненти, АОА, ВМІ.

Предварително проведенят корелационен анализ даде някои индикации за възможни стохастични връзки като основание за провеждане на дисперсионния анализ. Бяха проверени множество регресионни връзки, като повечето от получените модели, както за единична, така и за множествена регресия не бяха адекватни.

Най-добрият модел, получен при изследването, показва добра адекватност:

$$BMD = 1.141 - 0.729 AOA + 0.136 BMI$$

Той показва връзката между костната плътност, АОА и ВМІ.

На следващата таблица са показани статистическите показатели за проведена множествена регресия $BMD = f(\text{all parameters})$

Таблица 3. Обобщение и статистически анализ на модела за множествена регресия $BMD = f(\text{all parameters})$

	Beta	Std.Err. of Beta	B	t(91)	p-level
Intercept			1,141	6.21	0.000
Ca	-0.014	0.058	-0.012	-0.23	0.816
Mg	-0.018	0.068	-0.015	-0.26	0.795

Cu	-0.044	0.064	-0.001	-0.69	0.493
Zn	-0.012	0.062	-0.001	-0.19	0.846
AOA	-0.729	0.080	-0.001	-1.42	0.076
Age	-0.101	0.060	-0.002	-1.67	0.098
BMI	0.136	0.062	0.005	2.17	0.032

От таблицата се вижда, че статистически значимите регресионни коефициенти са за променливите AOA и BMI. От данните за регресионния анализ е извадена променливата T-score, тъй като тя е свързана с зависимата променлива BMD и се изчислява на базата на експериментални данни за BMD.

Регресионният модел е със свободен член на регресията. Регресионният коефициент за AOA е с отрицателен знак (BMD намалява при увеличение на параметъра), а този за BMI е с положителен знак.

Измерената BMD по метода DEXA сравнихме със стойностите на BMD предсказани по модела.

Съответствието е впечатляващо за такава комплексна система $R = 0.843$; $R^2 = 0.710$.

По принцип такъв модел може да служи за предсказване на костната плътност по данни за AOA и BMI. И двете независими променливи са логично свързани с костната плътност AOA като клиничен индикатор за състоянието на пациенти с остеопения или остеопороза; BMI като индекс на телесна маса, който се изчислява лесно, може да служи като важен показател за степента на заболяване, като тегло под нормата говори за опасност от костни фрактури.

4. Многовариационен статистически анализ за определяне на връзката между: BMD, концентрации на Ca, Cu, Mg, Zn, Fe и AOA при пациенти

Входните данни бяха стандартизирани, за да се избегне влиянието на различната размерност на включените параметри върху процедурите за класифициране. Затова бе направено трансформиране на входните данни със специфични размери в безразмерни със специфично нормално разпределение със средна стойност нула и стандартно отклонение от ± 1 . Като мярка за сходство на данните бяха използвани Евклидовите разстояния между тях, а като процедура за свързване на параметрите и обектите – методът на Ward. В получената дендрограма значимостта на кластерите беше определена чрез теста на Sneath – прекъсване на кластерите на височина $1/3$ или $2/3$ от максималната в графиката, D_{\max} .

Наборът от входни данни за това конкретно изследване се състои от 59 пациента (условно наричани „обекти“), описани чрез 11 клинични параметри (условно наричани „променливи“), така че изходната матрица е с размерност [59x11].

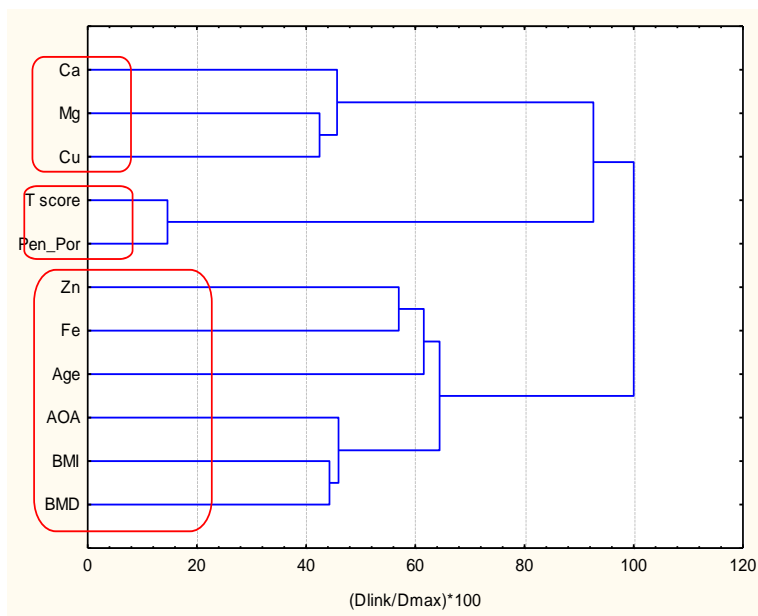
Измерените променливи (дескриптори) бяха: концентрациите на Ca, Cu, Mg, Zn и Fe; AOA; T-score; BMI; BMD; възраст; код за състоянията (1 за остеопения и 2 за остеопороза).

Йерархично групиране на променливи

На Фиг. 2 е представена йерархичната дендрограма за кластериране на 11 променливи.

Формират се три основни и статистически значими кластера: C1 (BMD, BMI, AOA, Age, Fe, Zn); C2 (T-score, Pen_Por) ; C3 (Ca, Mg, Cu).

Може да се приеме, че C1 съответства на антропометричните фактори като BMI, BMD, Age, AOA) и на нивата на два съществени компонента на кръвта (Fe, Zn) – поради това този кластер може да се нарече условно „*ефект на общия здравен статус*“. C2 очевидно е свързан с параметри, отговорни за „*диагноза остеопороза или остеопения*“, а C3 – с нивата на съществени елементи, свързани със „*състояние на намалена костна плътност*“.



Фигура 2. Йерархична дендрограма за 11 променливи

Тези резултати са потвърдени чрез прилагането на кластерирането на K – means, за което е изисквана предварителна хипотеза за съществуване на 3 кластера.

Йерархично групиране на обекти

В следващите таблици са представени членовете на всеки идентифициран от анализа кластер.

Таблица 4. Членове на кластерите. Разстояние от кластерния центроид. Променливи в кластер.

Членове на кластер 1 и разстояние от кластерния центроид.
Кластерът съдържа 2 променливи.

Променливи	Разстояние
T-score	0.355091
Pen_Por	0.355091

Членове на кластер 2 и разстояние от кластерния центроид.
Кластерът съдържа 3 променливи.

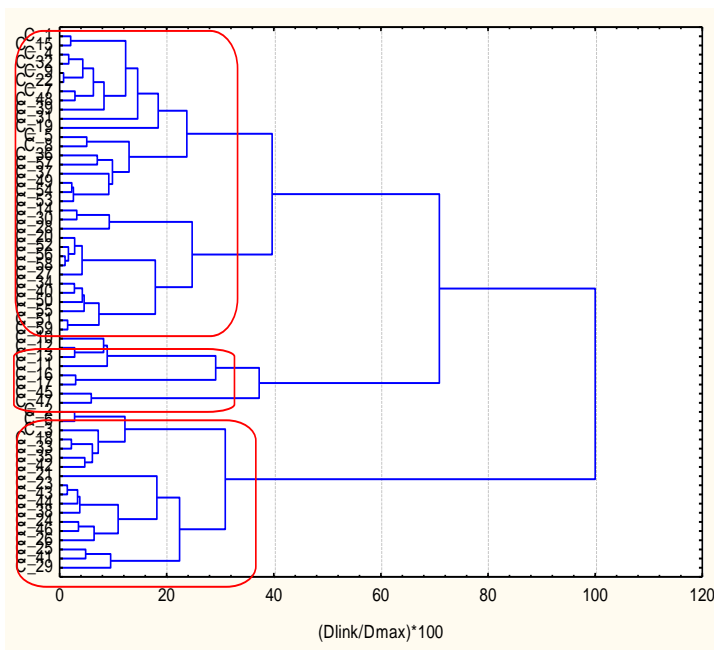
Променливи	Разстояние
------------	------------

Ca	0.724779
Mg	0.716695
Cu	0.694088
Членове на кластер 3 и разстояние от кластерния центроид. Кластерът съдържа 6 променливи.	
Променливи	Разстояние
Zn	0.948792
Fe	0.897872.
АОА	0.836456
Age	0.945784
BMI	0.788613
BMD	0.889304

Единствената разлика с ЙКА е номерацията на кластерите, но съдържанието на кластерите е едно и също.

Следователно може да се допусне, че три фактора са свързани със структурата на набора от данни: дескриптори, отговорни за „*диагноза остеопороза или остеопения*“; дескриптори, свързани със „*състояние на намалена костна плътност*“; дескриптори, свързани с „*ефект на общ здравен статус*“.

На Фиг. 3 е представена йерархичната дендрограма за кластериране на 59 пациента.



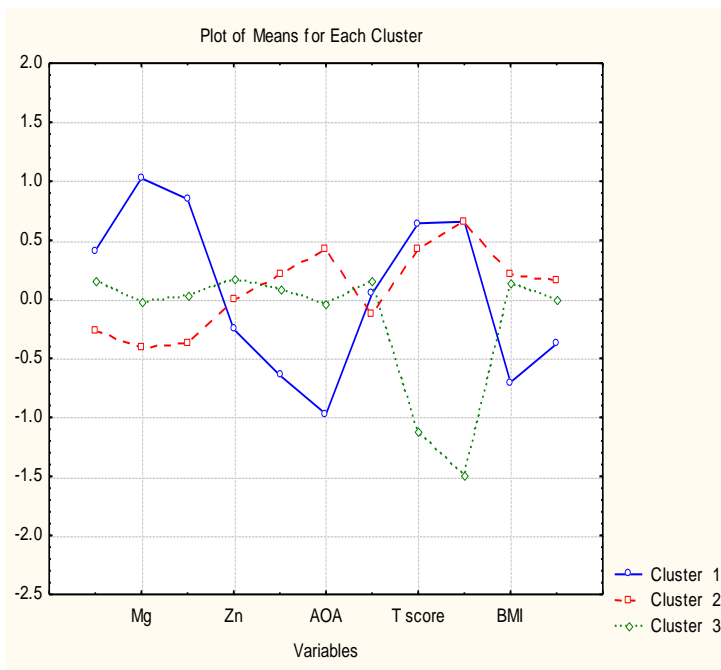
Фигура 3. Йерархичната дендрограма за кластериране на 59 пациента

Формирани са 3 кластера (потвърдени и от кластериране K-means), като:

- ✓ Кластер 1 съдържа 12 обекта (условен номер 1, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 19, 30, 45, 47);
- ✓ Кластер 2 съдържа 29 обекта (условен номер 4, 5, 7, 8, 9, 14, 20, 22, 27, 28, 31, 32, 34, 36, 37, 39, 40, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59);
- ✓ Кластер 3 съдържа 18 обекта (условен номер 2, 3, 6, 18, 31, 23, 24, 25, 26, 29, 33, 35, 38, 41, 42, 43, 44, 46).

Много важно е да се дефинират специфични дескриптори за всеки идентифициран кластер от пациенти и така да се разберат причините за формиране на тези групи на подобие от различни пациенти.

На фиг. 4 е представена графика на средните стойности на всяка променлива за всеки идентифициран кластер от пациенти.



Фигура 4. Графика на средните стойности от всяка променлива за всеки идентифициран кластер от пациенти (нормализирани стойности)

Номерът на всеки кластер на графиката съответства на номера, представен на таблиците с разпределение на пациентите: кластер 1 има 12 члена, кластер 2 – 29 и кластер 3 – 18. Последователността на променливите на графиката е: *Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, AOA, Age, T-score, Pen_Por, BMI, BMD*

Кластер 1 се характеризира с най-високи нива за *Ca, Mg, Cu*, най-ниски нива за *Zn, Fe, AOA, BMI, BMD* и междинна стойност по параметрите *Age, T-score* са близки по стойност на обектите от кластер 2, а *Pen_Por* (2 остеопороза) е съответно еднакъв. Може да се допусне, че този фенотип представлява *пациенти с най-влошен костен метаболизъм*. Кластер 1 е най-малката група и е образец за пациенти с *най-негативен ефект от остеопороза, пациенти с най-значителни метаболитни нарушения*.

Кластер 2 е образец за *ефект от остеопороза в начален стадий* – най-ниски нива на *Ca, Mg, Cu*, междинни стойности за *Zn*, най-високи

за Fe и АОА. Стойностите на тези показатели (Ca, Mg, Cu, Zn, Fe и АОА) са по-близки до стойностите на кластер 3, отколкото от тези при кластер 1. Имат високи нива за ВМІ, почти съвпадащи стойности с тези при кластер 3. T-score са близки по стойност на обектите от кластер 1, а Pen-Por (2 остеопороза) е съответно еднакъв. Тази група се отличава с най-малка възраст Age и най-високи нива на BMD. Това е най-голямата група от пациенти и изисква допълнителни проучвания за изясняване на приликите и разликите с кластер 1 и 3.

Пациентите от кластер 3 са пациенти със стойност Pen-Por 1 – *остеопения*. Те са с междинна позиция по отношение на нивата на Ca, Mg, Cu, Fe и все още високи нива на ВМІ и BMD. Тази група се отличава с най-голяма възраст Age и най-високи нива на Zn. Можем да приемем, че това е група пациенти заслужаващи повишено внимание и съответни медицински интервенции.

Получените по-високи стойности за BMD за кластер 2 в сравнение с кластер 3 може да се обяснени с голямата разлика в костната плътност в различните места на локализация на заболяването. В кластер 2 са пациенти с локализация на заболяването на бедро са 13,8%, а в кластер 3 с намалена костна плътност на бедро са 72%, а в кластер 1 са 33,34%. Това определи разделянето на пациентите според локализацията на заболяването в нашите следващи проучвания.

Факторен анализ и анализ на главни компоненти

В таблицата по-долу са представени факторните тегла на променливите за 3 латентни фактора.

Таблица 5. Факторни тегла

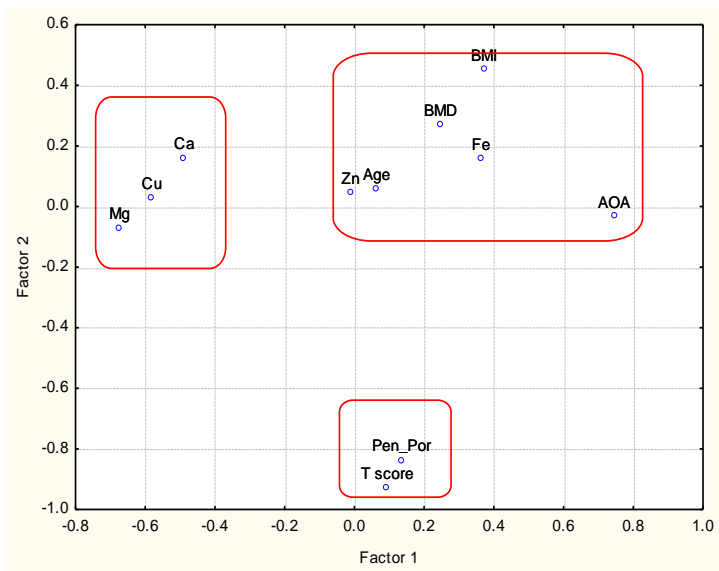
Факторни натоварвания. Екстракция: Основни компоненти (маркираните натоварвания са значителни)			
Променливи	Фактор - 1	Фактор - 2	Фактор- 3
Ca	-0.488	0.160	0.077
Mg	-0.674	-0.070	-0.132
Cu	-0.581	0.029	0.579
Zn	-0.010	0.046	-0.656

Fe	0.363	0.159	-0.545
AOA	0.746	-0.033	0.015
Age	0.064	0.057	-0.438
T-score	0.095	-0.929	-0.135
Pen_Por	0.136	-0.838	0.290
BMI	0.373	0.451	0.665
BMD	0.249	0.270	0.736
Обяснена вариация %	28.5	21.8	18.4

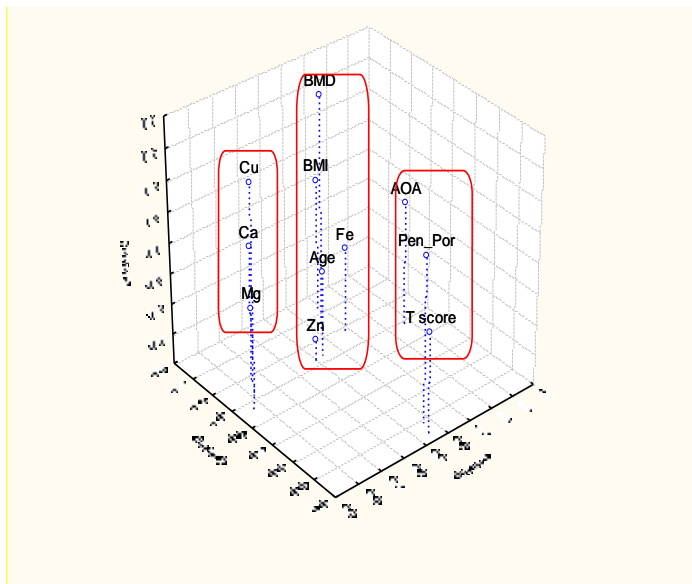
Три скрити фактора (главни компоненти) обясняват почти 70% от общата вариация на системата. Фактор 1 (над 28% обяснение на общата вариация) е свързан с нивата на основните компоненти, отговорни за *състоянието на остеопороза* (подобно на кластер 3 в йерархичния кластерен анализ или кластер 2 в К-средно кластерирането). Фактор 2 (над 20% от общата вариация) може да се нарече условно “диагностичен фактор за остеопороза” (пълно съответствие на резултатите от двете процедури за кластериране). Фактор 3 е условен „*фактор на общото здравно състояние*” (включива антропометрични показатели) и съответства на кластерите от двете процедури по кластериране.

Може да се заключи, че структурата на данните се определя от три латентни фактора, всеки един от тях свързан с определен клиничен смисъл.

На фигури 5 и 6 са илюстрирани резултатите от факторния анализ, като групирането на променливите е направено с 2- и 3D графики.

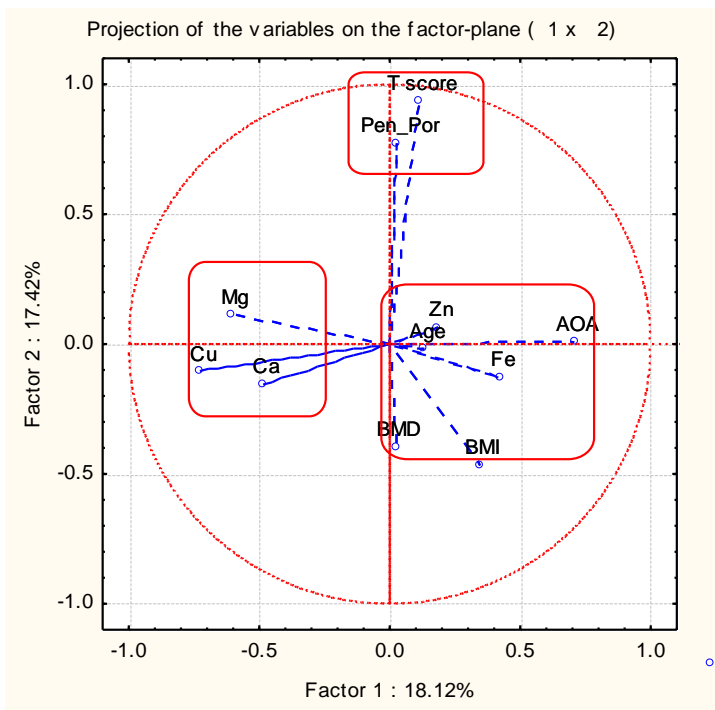


Фигура 5. Диаграма за факторни тегла за първите 2 главни компонента



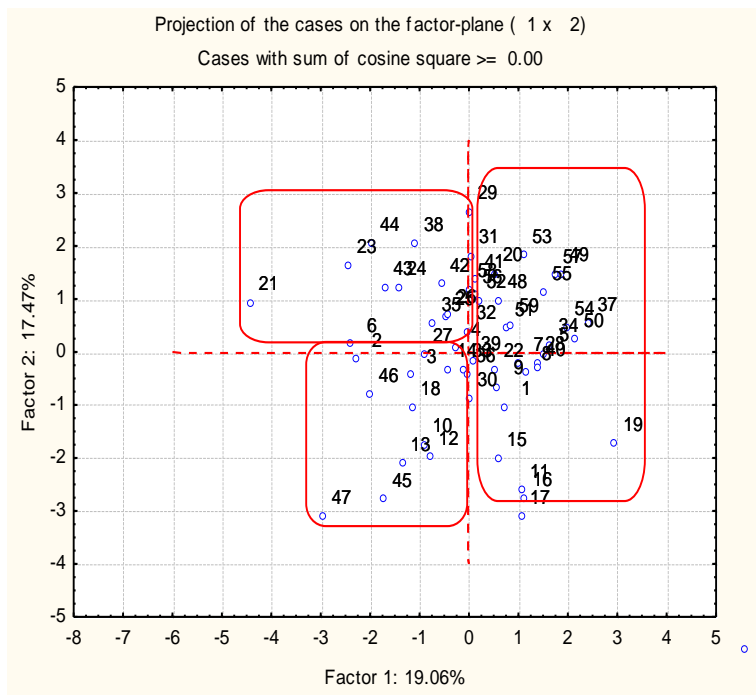
Фигура 6. 3D диаграма за факторните тегла (първите 3 главни компонента от факторен анализ)

При анализа на главни компоненти се стига до резултати, които потвърждават ролята на 3 скрити фактора за обяснение на структурата на входните данни.



Фигура 7. Диаграма за факторните тегла за равнината на първите два компонента от анализа на главни компоненти

На Фиг. 8 е показана диаграмата за факторните резултати. Много добре се разделят трите групи (образци) от пациенти.



Фигура 8. Диаграма за факторни резултати за първите два главни компонента

5. Многовариационен статистически анализ за определяне връзката между BMD на бедро, Cu, Mg, Zn и AOA при пациенти и контроли

Исходната матрица за този специфичен случай е с размер [54 x 9] или 54 обекта (пациенти и контроли), описани от 9 променливи. За интерпретация на данните е използван кластерен анализ и анализ на главни компоненти.

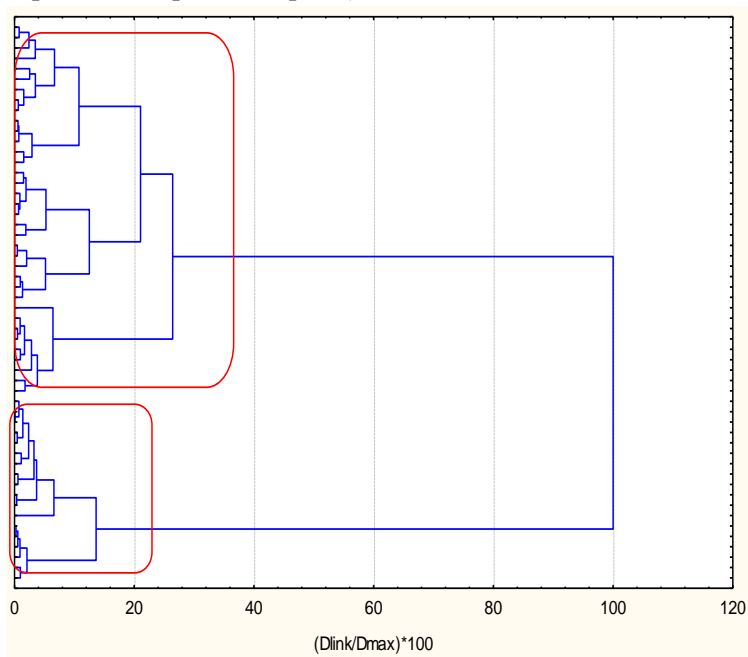
При йерархично кластериране на променливите (възраст, Cu, Mg, Zn, AOA, T-score, BMI, BMD и вид заболяване/контроли) се формират 3 статистически значими кластери:

Кластер 1 (Mg, Zn, Cu) – този кластер илюстрира влиянието на минералния състав

Кластер 2 (AOA, T-score, възраст) – влияние на AOA и възрастов фактор

Кластер 3 (BMI, BMD, вид заболяване и контроли) – ефект на телесните индекси и видът на проблема.

На следващата фигура 9 е представена йерархичната диаграма за кластериране на 54 обекта (пациенти със заболяване с остеопения и остеопороза на бедро и контроли).



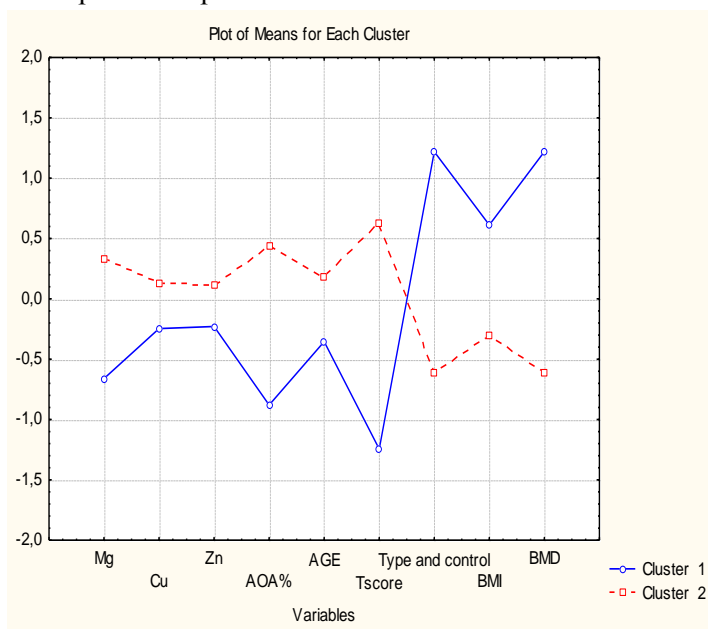
Фигура 9. Йерархична диаграма за кластериране на 54 обекта

Формират се два кластера. Малкият кластер се състои от 18 обекта (номера 37 – 54). Той е формиран от всички обекти – контроли. Големият кластер включва 36 обекта с номера 1 – 36 (всички пациенти със заболяване), като 19 от тях са с код 1 (остеопения) и 17 с код 2 (остеопороза).

Важен етап в изследването е определяне на променливите, отговорни за идентифицирането на двата кластера (контроли и пациенти). На фиг. 10 е представена графика на средните стойности на всяка променлива (стандартизирани изходни данни) за всеки от идентифицираните кластери. Лесно могат да се определят

специфичните черти (дескриптори) за кластера с контроли и за кластера с пациенти.

Кластерът на контролните обекти се характеризира с ниски стойности на компонентите на минералния състав (магнезий, цинк, мед), на АОА, възрастта и високи стойности на T- score, кода за заболяване (код 3 за контроли) и телесните индекси. Обратно, кластерът с пациенти, диагностицирани с остеопения или остеопороза на бедрото, се характеризира с високи стойности компонентите на минералния състав (магнезий, цинк, мед), на АОА, възрастта и ниски стойности на T- score, кода за заболяване (код 1 и 2 за пациенти) и телесните индекси. Това е логичен резултат, предполагащ, че заболяването засяга по-възрастни хора с понижена BMD стойност.



Фигура 10. Графика за средни стойности (стандартизирани изходни данни) за всяка променлива за всеки идентифициран кластер (кластер 1 – контроли, син цвят; кластер 2 – пациенти, червен цвят)

В следващия етап на хеометричната обработка на данните бе проведен факторен анализ за определяне на скритите фактори,

отговорни за структурата на данните. На Таблица 6 са представени факторните тегла за идентифициране скрити фактори.

Три латентни фактора обясняват над 70% от общата вариация на системата и могат да се интерпретират като статистически значими.

Първият скрит фактор обяснява над 35% от общата вариация и включва високи факторни тегла за променливите, свързани с телесните индекси и кодовете за контроли и тип заболяване на пациентите. Този фактор може да се нарече условно “фактор на телесни индекси”, като определя влиянието на BMI и BMD за характера на здравния проблем.

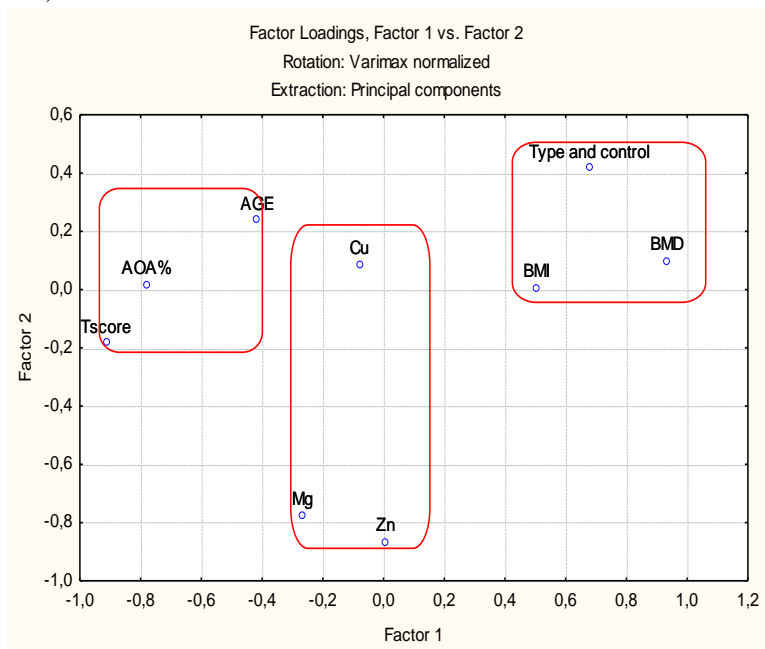
Таблица 6. Факторни тегла

Факторни натоварвания (маркираните натоварвания са >0,7)			
Променливи	Фактор - 1	Фактор- 2	Фактор- 3
Mg	-0,266	-0,778	-0,228
Cu	-0,080	-0,743	-0,265
Zn	0,007	-0,867	0,220
AOA%	-0,379	0,015	0,768
AGE	-0,418	0,242	0,705
Tscore	-0,214	-0,182	0,914
Type and control	0,778	0,420	0,113
BMI	0,703	0,004	0,496
BMD	0,933	0,099	0,148
Expl.Var %	36.4	20.2	16.8

Вторият скрит фактор обяснява над 20% от общата вариация и условно може да се нарече “фактор на минерален състав”, тъй като е свързан с значими стойности на трите химически (минерални) компонента в списъка на променливите.

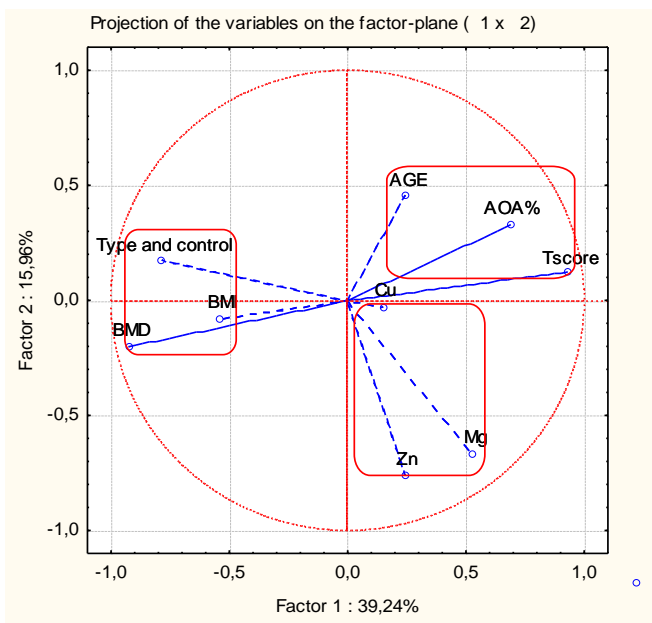
Последният (трети) латентен фактор с обяснение на над 15% от общата вариация на системата е свързан с възрастовата характеристика, AOA и Tscore променливата. Условно може да се нарече “възрастов фактор”.

Графично ролята на трите идентифицирани скрити фактора може да се представи (за равнината на фактор1/фактор2) по следния начин (Фиг. 11):



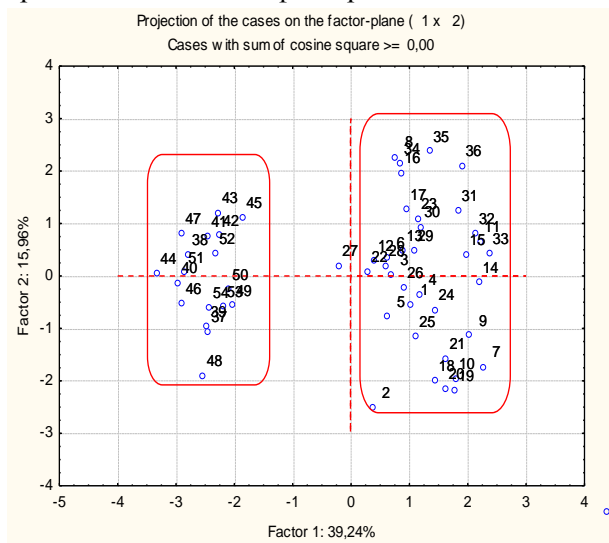
Фигура 11. Графика за идентифицираните скрити фактори

Допълнителното провеждане на АГК за демонстриране на проекциите на променливите и обектите в равнината на фактор 1/фактор 2 потвърди напълно коментираните дотук резултати (Фиг. 12 и Фиг. 13)



Фигура 12. Проекция на променливите в равнината фактор 1/фактор 2

Ясно се разделят трите фактора със съответните факторни тегла за значимите променливи за всеки фактор.



Фигура 13. Проекция на обектите в същата равнина

Убедително се разделят двата кластера на подобие – на пациенти със заболяване (обекти 1 – 36 в дясната част на графиката) и на контроли (с номера 37 – 54 в лявата част). Единственият спорен обект е номер 27, който е много близо до групата на пациентите, но формално може да се отнесе и към групата на контролите (макар и диагностициран с остеопороза на бедрото, показва неочаквано висока стойност BMD, която е по-близка на тази от обектите – контроли, отколкото на тези на обектите – пациенти.

6. Многовариационен статистически анализ за определяне връзката между BMD на лумбални прешлени, Cu, Mg, Zn и AOA при пациенти и контроли

Исходната матрица в този случай е с размерност 64 обекта (пациенти с остеопороза на лумбален прешлен и контроли), които са охарактеризирани с 9 променливи (същите, както при случаите за остеопороза на бедро) или [64 x 9]. Исходните данни са стандартизирани и подложени на кластерен и факторен (анализ на главни компоненти) анализ.

Отново се формират три кластера с почти аналогичен състав, както при случаите за бедро. Има само една особеност – мястото на цинка. Формално той принадлежи към кластера с участници AOA, възраст и T-score, но при избор на друго ниво на значимост на кластерите може да се причисли и към кластера с мед и магнезий (минерален фактор). Струва ни се, че втората възможност е по-логична и ще я използваме при интерпретацията.

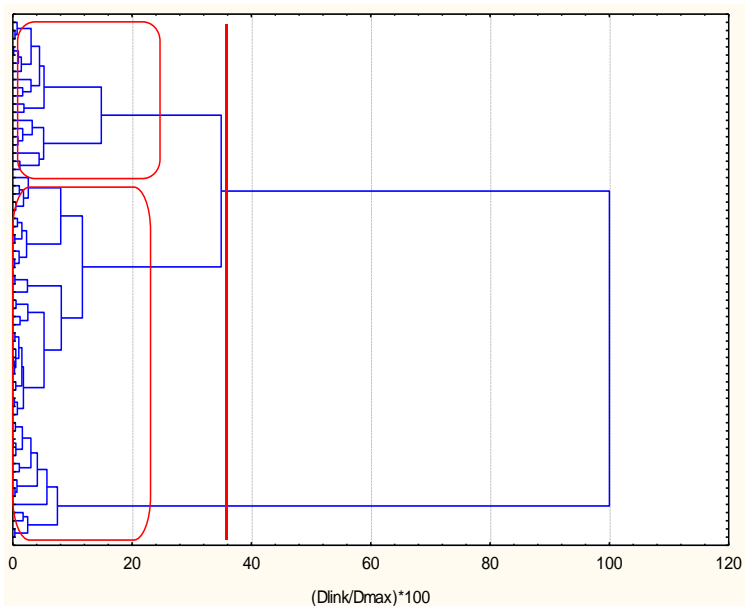
Така имаме три кластера от променливи, които отговарят напълно на идентифицираните по намаление на костна плътност на бедро пациенти. Първият включва минералните компоненти, вторият е “възрастов кластер” и третият – кластер на телесните индекси и кода за заболяване.

Кластер 1 (Mg, Zn, Cu) – “минерален” кластер

Кластер 2 (AOA, T-score, възраст) – влияние на AOA и възрастов кластер

Кластер 3 (BMI, BMD, вид заболяване и контроли) – кластер на телесните индекси и видът на проблема.

На следващата фигура 14 е представена йерархичната диаграма за кластериране на 64 обекта (пациенти със заболяване с остеопороза и контроли).



Фигура 14. Йерархична дендрограма за кластериране на 64 обекта

Формират се два значими кластера:

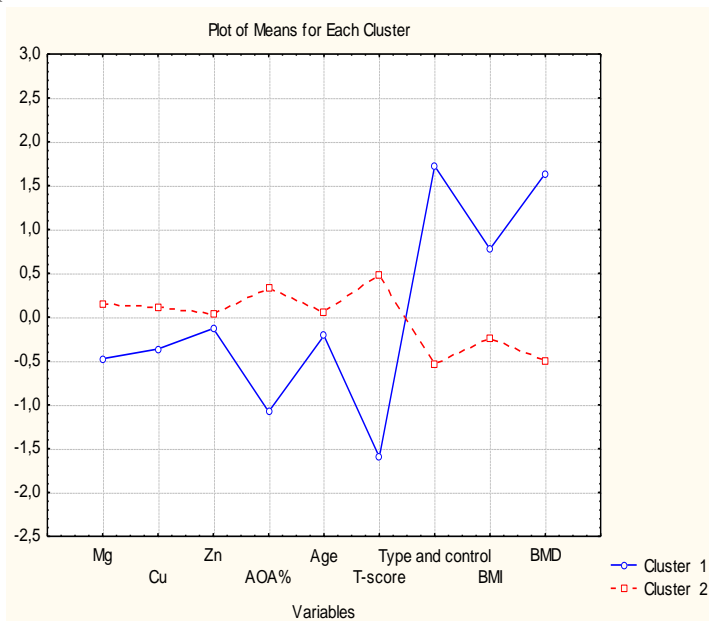
Голям кластер с 49 обекта (номера на обектите 1 – 49, всички с код 2 – остеопороза)

Малък кластер с 15 обекта (номера на обектите 50- 64, всички с код 3 – контроли)

Резултатът е аналогичен на този за пациенти с бедрено заболяване. Получено е много добро разделяне на контролите от пациентите със заболяване. Логично е да се очаква, че това сепариране се дължи на същите специфични фактори, както и при случаите за проблеми с бедрото.

На фиг. 15 е представена графика на средните стойности на всяка променлива (стандартизирани изходни данни) за всеки от идентифицираните кластери. Лесно могат да се определят

специфичните черти (дескриптори) за кластера с контроли и за кластера с пациенти.



Фигура 15. Графика за средни стойности (стандартизирани изходни данни) за всяка променлива за всеки идентифициран кластер (кластер 1 – контроли, син цвят; кластер 2 – пациенти, червен цвят).

Кластерът на контролните обекти се характеризира с ниски стойности на компонентите на минералния състав (магнезий, цинк, мед), на АОА, възрастта и високи стойности на T-score, кода за заболяване (код 3 за контроли) и телесните индекси. Обратно, кластерът с пациенти, диагностицирани с остеопения или остеопороза на бедрото, се характеризира с високи стойности на компонентите на минералния състав (магнезий, цинк, мед), на АОА, възрастта и ниски стойности на T-score, кода за заболяване (код 2 за пациенти) и телесните индекси. Това е логичен резултат, предполагащ, че заболяването засяга по-възрастни хора с понижена BMD стойност.

Единствените малки разлики със случаите за пациенти и контроли от обектите “бедро” са свързани с нивото на цинка и с данните за възраст. Тук нивата на цинк за двата кластера са почти еднакви и това

определя и спорната позиция на променливата “цинк” при кластериране на променливите. Много близки са средните стойности за променливата “възраст” при контролите и при диагностицираните пациенти. При случаите “бедро” контролите са значително по-млади от пациентите. В този смисъл показателите цинк и възраст не са подходящи дескриптори за сепариране на контролите и пациенти, диагностицирани с остеопороза на прешлените.

В следващия етап на хемометричната обработка на данните бе проведен факторен анализ за определяне на скритите фактори, отговорни за структурата на данните. На Таблица 7 са представени факторните тегла за идентифицираните скрити фактори.

Три латентни фактора обясняват почти 75 % от общата вариация на системата и могат да се интерпретират като статистически значими.

Първият скрит фактор обяснява над 35 % от общата вариация и включва високи факторни тегла за променливите, свързани с телесните индекси и кодовете за контроли и тип заболяване на пациентите. Този фактор може да се нарече условно “ фактор на телесни индекси”, като определя влиянието на BMI и BMD за характера на здравния проблем.

Таблица 7. Факторни тегла

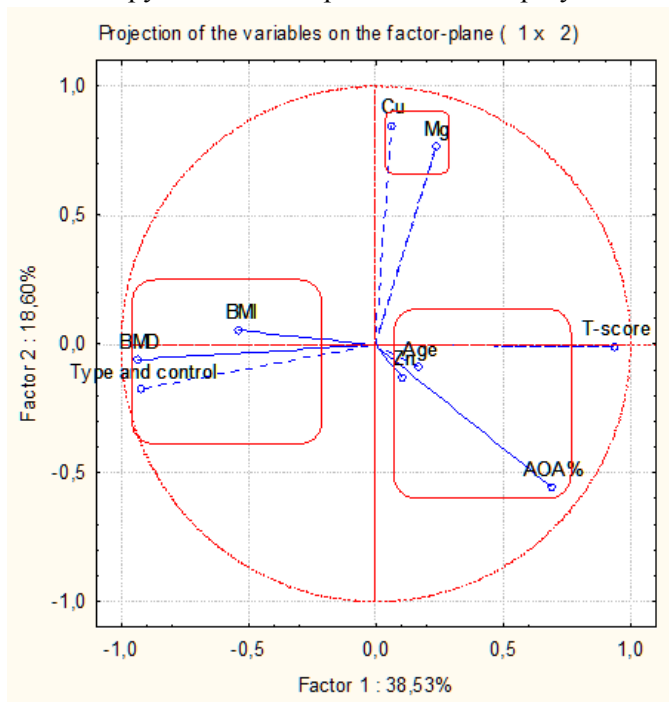
Факторни натоварвания (Varimax нормализирани) (маркираните натоварвания са >0,7)			
Променливи	Фактор - 1	Фактор - 2	Фактор - 3
Mg	0,187	-0,782	0,322
Cu	0,013	-0,848	-0,233
Zn	0,106	0,832	0,110
AOA%	0,048	0,512	0,722
Age	-0,263	0,085	0,775
T-score	0,010	-0,045	0,937
Type and control	-0,908	0,229	-0,027
BMI	-0,542	-0,027	0,142
BMD	-0,931	0,116	0,029
Expl. Var %	38.5	19.7	16.2

Вторият скрит фактор обяснява почти 20% от общата вариация и условно може да се нарече “фактор на минерален състав”, тъй като е свързан с значими стойности на трите химически (минерални) компонента в списъка на променливите.

Последният (трети) латентен фактор с обяснение на над 15% от общата вариация на системата е свързан с възрастовата характеристика, АОА и Т-score променливата. Условно може да се нарече “възрастов фактор”.

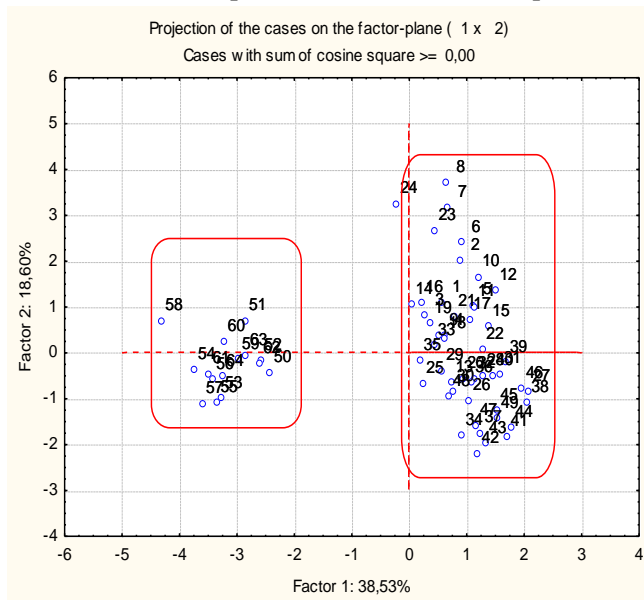
Тези три скрити фактора са отговорни за структурата на данните в изследваната система и могат да се обобщят като “костна плътност”, “минерален състав” и “възраст”.

Графичната представа за проекцията на променливите и на обектите в равнината на фактор 1/фактор 2 (фигури 16 и 17) като резултат от анализа на главни компоненти илюстрира много убедително постигнатите и с другите хеометрични подходи резултати.



Фигура 16. Проекция на променливите в равнината фактор 1/фактор 2

Ясно са разделени трите латентни фактора със съответните факторни тегла за значимите променливи за всеки фактор. Потвърждава се и специфичната позиция на променливите цинк и възраст.



Фигура 17. Проекция на обектите в същата равнина

Убедително се разделят двата кластера на подобие – на пациенти със заболяване (обекти 1 – 49 в дясната част на графиката) и на контроли (с номера 50 – 64 в лявата част). Единственият спорен обект е номер 24, който е много близо до групата на пациентите, но формално може да се отнесе и към групата на контролите (макар и диагностициран с остеопороза на прешлен, показва неочаквано висока стойност за мед, която доближава обекта 24 по-близка до нивата мед за контроли, отколкото на тези на обектите – пациенти.

7. Многовариационен статистически анализ за определяне връзката между намалението на BMD и анкетни данни свързани с менопауза, употреба на цигари, кафе и млечни продукти при пациенти с остеопороза

Изходната матрица при това изследване включва 49 пациенти с остеопороза и 9 променливи, като 5 от тях са свързани с клинични

показания, а останалите 4 – резултати от анкета, свързани с продължителност на менопауза и употреба на цигари, кафе и млечни продукти. Вместо променлива BMD присъства нова Δ BMD – намаление на костна плътност (разлика между средната стойност на костната плътност на контролите и костната плътност на пациентите). Целта е да се потърси връзка между намалението на костната плътност (Δ BMD) и отговорите на анкетираните по поставените въпроси.

След йерархично кластериране променливи се формират два добре дефинирани кластера:

Кластер 1 (АОА, възраст, години менопауза, BMI, млечни продукти)

Кластер 2 (T-score, BMD, пушене, пиене на кафе)

Още при това разделяне на променливите в образци на подобие (кластери) може да се заключи, че външните фактор (включени в анкетата) са свързани по някакъв начин с костната плътност: злоупотребата с пушене и често пиене на кафе действа директно (понижава) костната плътност, докато другите два фактора (липса на менструация и ежедневно използване на млечни продукти) влияят индиректно върху понижението на костната плътност посредством директно влияние върху АОА и BMI и чрез възрастовия показател.

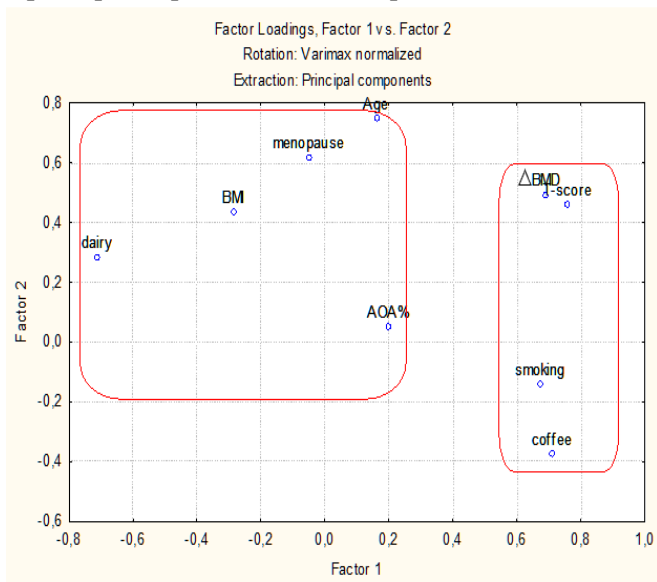
На Таблица 8 са представени стойностите на факторните тегла за идентифицираните два скрити фактора, определящи структурата на данните за изследваната система.

Таблица 8. Факторни тегла

Факторни натоварвания (Varimax нормализирани) Екстракция: Основни компоненти (маркираните натоварвания са > 0,7)		
Променливи	Фактор - 1	Фактор - 2
АОА%	0,200	0,751
Age	0,160	0,750
T-score	0,758	0,461
BMI	-0,286	0,736
Δ BMD	0,790	0,493
menopause	-0,050	0,720

smoking	0,773	-0,142
coffee	0,710	-0,374
dairy	-0,213	0,784
Expl.Var %	39.6	27.4

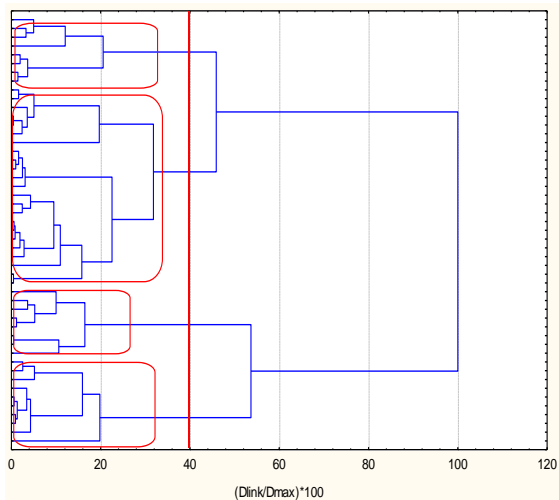
Резултатите от анализа на главни компоненти напълно потвърждават откритите връзки при йерархичното кластериране. Двата скрити фактора обясняват около 70% от общата вариация на системата, като първият може да се нарече условно “фактор на директното влияние върху промяната на костната плътност” (с почти 40% обяснение на общата вариация), а вторият – “фактор на индиректното влияние върху костната плътност” (почти 30 % обяснение на общата вариация). На фигура 18 е представена равнинната проекция на факторните тегла, където отново личат добре откритите зависимости между анкетните фактори и променливите, свързани с костната плътност.



Фигура 18. Графична проекция на факторните тегла в равнината на фактор 1/фактор 2

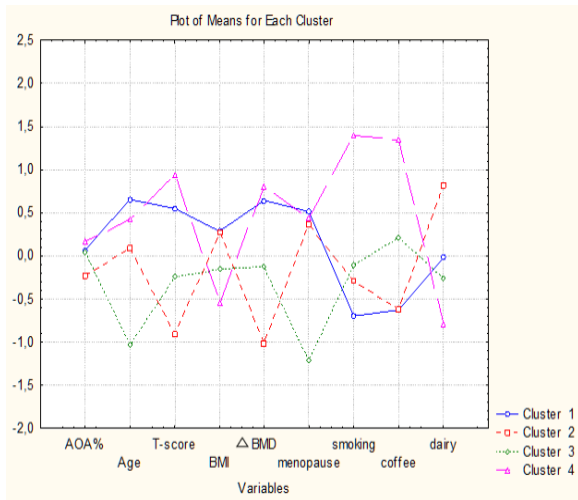
От извършения хеометричен анализ може да се направят и някои изводи за формираните образци на подобие сред пациентите. По

принцип групата е хомогенна по отношение на типа на заболяването, но въпреки това е възможно да се идентифицират 4 образца (кластери) сред обектите (Фиг. 19).



Фигура 19. Йерархична дендрограма за кластериране на 49 обекта

На Фигура 20 е представена графика за средните стойности на всяка променлива за всеки един от идентифицираните образци на подобие.



Фигура 20. Средни стойности (стандартизирани данни) за всяка променлива и за всеки идентифициран кластер

Тип 1 пациенти (кластер 1): сравнително понижена костна плътност, макар и с отдавнашна менопауза, но ниско потребление на цигари, кафе и умерена консумация на млечни продукти при относително висока стойност на и възрастта – образец на “устойчиви” пациенти;

Тип 2 пациенти (кластер 2): най-слабо понижена костна плътност и с отдавнашна менопауза, висока възраст и ниско потребление на кафе, но значителна употреба на млечни продукти; пушачи – образец на пациенти, без установен здравословен режим;

Тип 3 пациенти (кластер 3): средно понижено на костна плътност, сравнително млади, с най-малко години без менопауза, със значителна консумация на кафе и цигари, а с умерена консумация на млечни продукти – образец на “проблемни” пациенти с потенциално влошаване на здравословното състояние.

Тип 4 пациенти (кластер 4): с най-значително понижено на костна плътност, силна зависимост от кафе, цигари, без ежедневна консумация на млечни продукти – образец на най-значимо “заstrasени” пациенти.

Тази своеобразна класификация, макар и без количествени измерения, позволява детайлно диагностициране на пациенти с остеопороза на базата на хранителен режим и отношение към употреба на вредни навици от типа на домашните (битови) “наркомании”.

8. Многовариационен статистически анализ за определяне на връзката между: намалена BMD при пациенти с различна локализация на остеопения и остеопороза, концентрация на Ca, Cu, Mg, Zn, AOA

Входната матрица в този случай е с размери [84 x 9]. Матрицата е комбинация от случаи с намалена костна плътност на бедро (36) и случаи с намалена костна плътност на лумбални прешлени (48). Така обектите са общо 84, използват като дескриптори на състоянието 9 променливи - Ca, Cu, Mg и Zn, AOA, T-score, BMI, възраст, Δ BMD – намаление на костна плътност.

След йерархично кластериране по променливи се образуват три големи кластера: C1 (Ca, Mg, Cu); C2 (Zn, AOA, Age, BMI); C3 (T-score, Δ BMD).

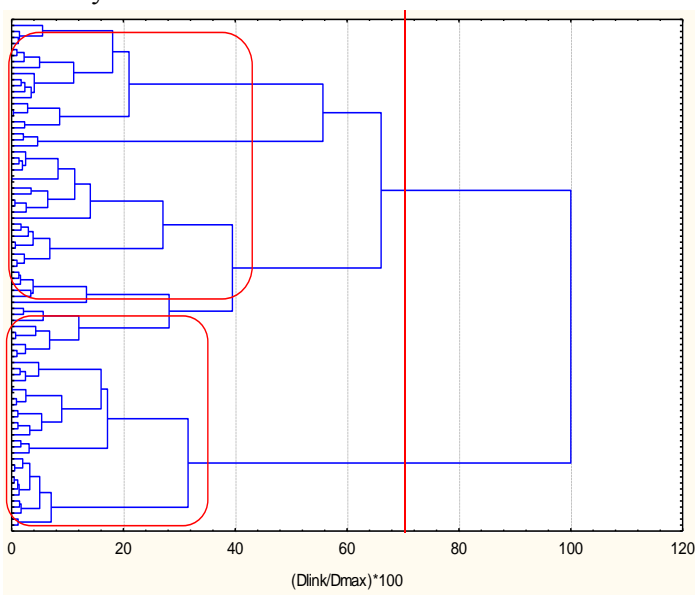
Първият кластер предлага „образец на химично въздействие“. В кластера е показана връзката между химичните дескриптори, свързани с медицинското състояние на намалена костна плътност, така че това е *химическа кластерна връзка* със състоянието на пациентите.

Вторият кластер е „образец на физическо въздействие“ и показва свързаното въздействие на показателите Zp и АОА, както и на показателите ВМІ и Age – *кластер на физически условия*.

Третият кластер е „образец на диагностично въздействие“, демонстрира логическата връзка между показателя за състоянието T-score и намалението на костна плътност Δ BMD.

Докато в *кластер 2* се демонстрира логическата връзка между възрастта на пациента и показателя за състоянието T-score – *диагностичен кластер в зависимост от възрастта*, то кластер 3 показва свързаното въздействие на показателите АОА, ВМІ и ВМD – *кластер физически условия*.

На фиг. 21 е показана йерархичната дендрограма за разделяне на всичките 84 случая.



Фигура 21. Йерархична дендрограма за кластериране на 84 случая (обекта)

Могат да бъдат идентифицирани два основни кластера. За удобство членовете на всеки кластер са представени в таблици 34 и 35 като резултати от кластериране *K-means* според априорната хипотеза за съществуване на 2 кластера (вероятно, „бедрени“ и „гръбначни“ образци на подобие).

Кластерирането на променливи с *K-means* показва същото разделяне като йерархичното групиране.

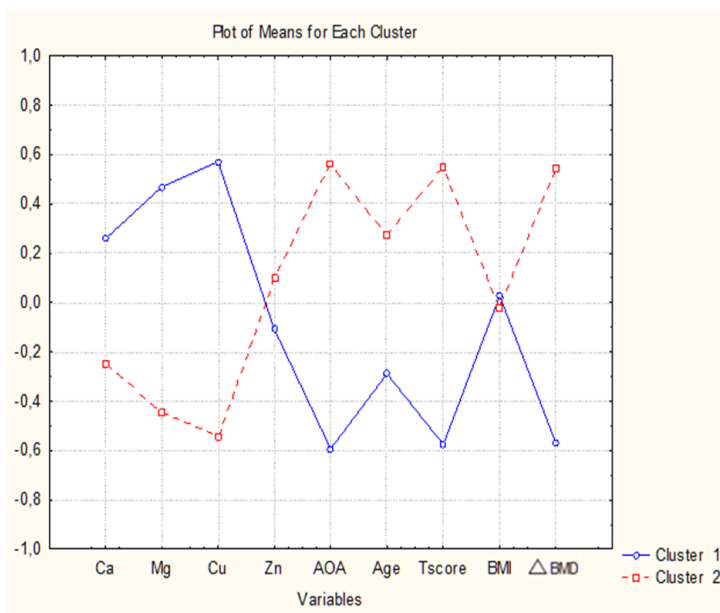
✓ Кластер 1 съдържа 38 случая (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 39, 41).

Това е кластер, съдържащ предимно случаи с намалена костна плътност на бедрото (34 от общо 36 случая с остеопороза на бедрото; четири случая с остеопороза на лумбален прешлен са класифицирани погрешно в кластера „бедро“, което е приемлив резултат). Следователно кластер 1 може да бъде наречен модел на „намалена костна плътност на бедрото“ с над 90% правилно класифицирани случаи.

✓ Кластер 2 съдържа 46 случая (35, 36, 40, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84).

Вторият кластер може да се нарече образец на „намалена костна плътност на лумбални прешлени“, тъй като включва 44 случая с лумбална локализация на заболяването (4 случая липсват, тъй като са класифицирани погрешно в кластер 1, а 2 случая са добавени погрешно към кластера от случаите на бедрата). Процентът на правилно класифициране е почти 90%, което е много добър резултат.

На фиг. 22 са нанесени средните стойности за всяка променлива за всеки идентифициран кластер.



Фигура 22. Графика на средните стойности за всяка променлива за всеки кластер

Може лесно да се види, че и двата кластера (син – „бедрен“ образец и червен – „гръбначен“ образец) са много добре разделени. Кластер 1 се характеризира с по-високи стойности на променливите „химическо въздействие“ (Ca, Mg, Cu) и по-ниски стойности на променливите „физическо въздействие“ (AOA, Възраст) и „диагностичните“ променливи (ΔBMD). За кластер 2 се открива обратната тенденция на въздействията. Нивата на Zn и стойностите на BMI не са важни за дискриминацията между двата кластера.

В таблица 9 са представени факторните натоварвания за 3 идентифицирани латентни фактора, отговорни за структурата на данните.

Таблица 9. Факторни натоварвания

Факторни натоварвания (Varimax нормализиран). Значителните натоварвания са маркирани с удебелен шрифт			
Променливи	Фактор - 1	Фактор - 2	Фактор - 3
Ca	-0,678	-0,091	0,326

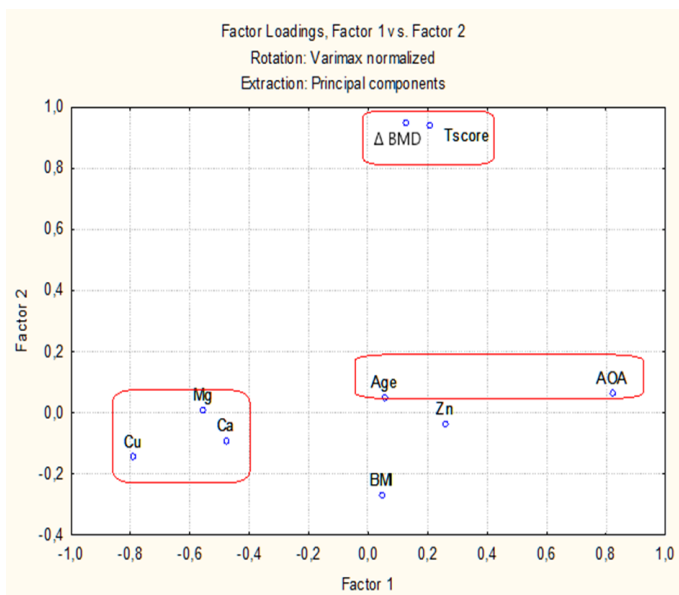
Mg	-0,657	0,009	-0,597
Cu	-0,790	-0,145	0,089
Zn	0,259	-0,035	-0,462
AOA	0,422	0,066	0,882
Age	0,054	0,051	0,660
T-score	0,206	0,941	0,055
BMI	0,046	-0,269	0,239
Δ BMD	0,127	0,948	0,113
Expl.Var%	29.9	22.1	18.8

Три латентни фактора обясняват над 70 % от общата дисперсия на системата. Като цяло те съответстват почти изцяло на направените по-горе изводи.

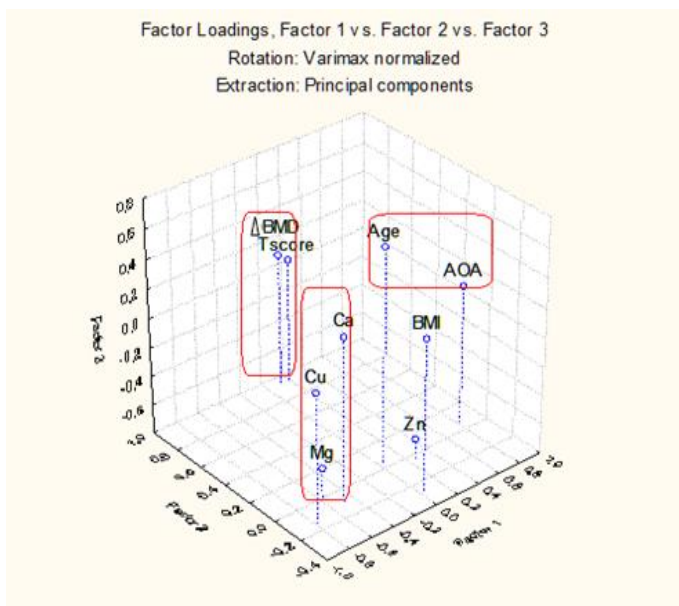
Първият латентен фактор с обяснение на близо 30% от общата дисперсия може условно да се нарече “химичен фактор” (високи натоварвания за Ca, Mg и Cu). Вторият (обяснение над 22% дисперсия) може условно да се нарече „диагностичен фактор” поради високите натоварвания и връзката между T-score и Δ BMD променливите. И накрая, латентен фактор 3 (условен „физически фактор“) разкрива връзката между възрастта и AOA. Променливите Zn и BMI показват статистически незначими натоварвания и имат незначително влияние върху структурата на набора от данни.

На Фиг. 23 е представена двумерната графика на разпределението на факторните натоварвания в равнината Фактор 1 спрямо Фактор 2.

В този случай няма доказателство за връзка между AOA и T-score, AOA е свързан с възрастта.



Фигура 23. Графика на факторни натоварвания (F1 / F2)



Фигура 24. 3D диаграма на факторните натоварвания при зададените условия

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От нашите проучвания можем да направим заключение, че пациентите с намалена костна плътност показват по-високи стойности на RSA, повишени концентрации на мед и цинк и повишени стойности на съотношението Cu/Zn в сравнение с контролната група.

Повишаването на серумните нива на мед и цинк при пациенти с намалена костна плътност може да се дължи на разграждането на медта и цинка, които са компоненти на ензимите, участващи в костния метаболизъм. Това разграждане се задейства от повишено ниво ROS в клетките в контекста на остеопороза. Повишената концентрация на медни йони в серума инициира вторични радикални процеси, които допълнително повишават неговата АОА. Пациентите с нормален костен метаболизъм поддържат по-ниски серумни концентрации на Cu и Zn, тъй като тяхната втретклетъчна функция остава непокътната. Намаленото генериране на допълнителни радикали обяснява пониския серумен АОА, наблюдаван в контролната група.

Тези констатации потвърждават съвместното въздействие на свободните радикали и редокс-активните метали, като медта, както върху АОА, така и върху ВМД.

Приложеният от нас многовариационен статистически анализ прояви връзката между ВМД, съдържанието на биогеинни елементи и АОА.

ИЗВОДИ

- При определяне на концентрацията на Cu, Zn и Mg в кръвния серум получихме по-високи средни стойности при пациенти с нарушен костен метаболизъм, по-изразени при пациенти с остеопения.
- Отношението Cu/Zn се оказва важен маркер за степента на заболяването.
- Повишаването на стойностите на общата антиоксидантна активност в кръвния серум при пациенти с остеопороза е по-високо, отколкото при контроли и пациенти с остеопения.
- Корелационният анализ дефинира стохастични връзки между костна плътност, магнезий, АОА, T-score, BMI, възраст.

- Създаден е регресионен модел за зависимост между костната плътност и индекс на телесна маса и АОА, който може да се използва за лесно диагностично предсказване на намалението на костна плътност от лесно достъпни дескриптори.
- Обобщените резултати *от хемометричния анализ* дефинират следните основни фактори, определящи структурата на експерименталните данни:
Фактор, отговорен за формиране на „образец на диагностично въздействие“, включващ дескрипторите T-score, ΔBMD; фактор, свързан със състояние на намалена костна плътност и формиращ „образец на ефекта на минералното съдържание“ и отчитащ ролята на дескрипторите Ca, Mg, Cu; фактор, свързан с общия здравен статус и разкриващ връзки между дескрипторите BMD, BMI, AOA, Age, Fe, Zn, формиращи „образец на физическо състояние на пациента“.

ПРИНОСИ

1. Предложен е оригинален маркер за степента на заболяване от остеопороза и остеопения, използващ отношението на концентрациите Cu/Zn вместо традиционните клинични анализи на серумните концентрации на двата компонента.
2. Създаден е адекватен регресионен модел за връзката между костната плътност на пациента и независимите параметри АОА и индекс на телесната маса, който позволява лесно и експресно предсказване на стойността на костната плътност и предварително познати стойности на регресорите.
3. На базата на резултати от един от хемометричните анализи чрез кластерен и факторен анализ (пациенти без контролна група) са идентифицирани три условни фенотипа пациенти с намалена костна плътност (остеопения или остеопороза като основна диагноза): фенотип 1: пациенти с най-негативен ефект от остеопороза и най-значителни метаболитни нарушения; фенотип 2: пациенти, засегнати от остеопороза в начален стадий; фенотип 3: пациенти с типична остеопения.

4. Определени са чрез хемометричен анализ и специфичните дескриптори за всеки един от идентифицираните фенотипа. Това позволява улеснение на диагностичната процедура и предварително класифициране на пациента към някои от фенотиповете.

ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Св. Асенова**, П. Андреева-Гатева. Профилактика на остеопорозата чрез микронутриенти – съвременни патофизиологични аспекти. *Обща медицина*, 2020; 22, (2):66-72. ISSN 1311-1817, Web of Science (CABI); Scopus; Q4; SJR₂₀₂₀ – 0.111
2. R. Tomova, **S. Asenova**, B. Atanasova, K. Tzoneva, M. Slavova. Flame atomic absorption determination of serum copper and zinc in disordered bone metabolism. *Bulgarian Chemical Communications*, 52, (1), 76-80, 2020. DOI: 10.34049/bcc.52.1.5099, e-ISSN: 0324-1130, p-ISSN:0861-9808, Web of Science; Scopus; Q4; SJR₂₀₂₀ – 0.179
3. Radka Tomova, **Svetla Asenova**, Rodina Nestorova, Bisera Atanasova, Liliya Atanasova, Mariana Nikolova, Miglena Slavova. Multivariate statistical analysis for assessment of the relationships between bone density, biogenic elements content, and the level of oxidative stress in osteoporotic women. *J of IMAB*, 28(4):4742-4748, 2022., ISSN 1312-773X, Web of Science; Q4; IF₂₀₂₂ – 0.2
4. Tomova, R., **Asenova, S.**, Atanasova, B., Tzoneva, K., Nikolova, M., Slavova, M., Hadjiolova, R. Macro- and Microelements and their physiological importance for the bone mineral density. *Knowledge-International Journal*. 2018; 26 (4), pp. 1211-1217
5. Радка Томова, **Светла Асенова**, Павлина Косева. Калций, фосфор и други фактори за костно здраве. *Chemistry: Bulgarian Journal of Science Education* 2020, 29 (4):527-547. Реферирано в MIAR (International Matrix for the Analysis of Journals) РИНЦ (Российский индекс научного цитирования)
6. Radka Tomova, Mariana Nikolova, Miglena Slavova, **Svetla Asenova**. Osteoporosis and high school education. Paris, France 2021, Ejuons XII – International Conference on Mathematics, Engeneering, Natural&Medical Sciences. Full Text Book, p. 355-365.

НАУЧНИ ФОРУМИ В ЧУЖБИНА

1. Tomova, R., **Asenova, S.**, Atanasova, B., Tzoneva, K., Nikolova, M., Slavova, M., Hadjiolova, R. Macro- and Microelements and their physiological importance for the bone mineral density. XVIII-th INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE THE POWER OF KNOWLEDGE, 27-29.09.2018, Agia Triada, Greece.
2. Radka Tomova, Mariana Nikolova, **Svetla Asenova**, Miglena Slavova. Osteoporosis and Education. EJONS 12th International Conference on Mathematics, Engineering, Natural&Medical Sciences, July 9-11, 2021, Paris, France
3. Radka Tomova, **Svetla Asenova**, Lilia Atanasova, Rodina Nestorova, Bisera Atanasova, Tzvetanka Petranova, Mariana Nikolova. Redox state and biogenic elements in osteoporosis with different localization. 3rd International Conference on Medical, Health and Life Sciences (ICMeHeLS), 06-09 July Budapest, Hungary, 2023, Abstract Book, p. 13, ISRES Publishing, ISBN 978-625-6959-06-4

НАУЧНИ ФОРУМИ В БЪЛГАРИЯ

1. Томова Р, **Асенова С**, Бояджиева Е. Калций, фосфор и други фактори за костно здраве. 48-та Национална конференция на учителите по химия с международно участие „Актуални тенденции в химическото образование“, 25 – 27.10.2019 г, гр. София.
2. Radka Tomova, **Svetla Asenova**, Bisera Atanasova, Rodina Nestorova, Liliya Atanasova, Mariana Nikolova, Miglena Slavova. Atomic absorption analysis of copper and zinc and spectrophotometric analysis of antioxidant ctivity in serum of women with impair bone density. 11^{та} Национална конференция по химия, ХТМУ, 23-25 юни 2022, София.
3. Radka Tomova, **Svetla Asenova**, Rodina Nestorova, Bisera Atanasova, Liliya Atanasova, Mariana Nikolova, Miglena Slavova. Multivariate statistical analysis for assessment of the relationships between bone density, biogenic elements content, and the level of oxidative stress in osteoporotic women. Natural Conference “Natural Sciences 2022”, NCNS2022, 30 септември - 2 октомври 2022 г. Шумен.

Благодарности

Благодаря на всички, които допринесоха за реализирането на този дисертационен труд:

- На моя научен ръководител доцент Радка Томова, дх за оказаната подкрепа и научно ръководство;
- На моя научен консултант доц. Бисера Атанасова, дм от Клинична лаборатория на Университетска болница „Александровска“, за помощта и съдействието по клинично-лабораторната част на дисертацията;
- На д-р Родина Несторова от Ревматологичен център „Света Ирина“ - София, за неценена помощ при подбор на пациенти и осигуряване на изследваните серумни проби.
- На доцент Надя Христова, дф и главен асистент Лилия Атанасова, дф от катедра „Медицинска физика и биофизика“, МУ-София за подкрепата и доверието в мен.
- На Научноизследователския отдел при МУ-Плевен за дадената възможност и насоки.
- На професор Ангелина Стоянова, дх, ръководител сектор „Химия“, както и на всички колеги от катедрата за подкрепата и градивните коментари и забележки при обсъждане на проекта – дисертационния труд.
- На всички мои близки, приятели и роднини за тяхното търпение.